

In silico Studien zu Bis-Tacrinen,
Chinazolinen und Chinazolinonen sowie
Synthese von Chinazoliniumverbindungen
als Inhibitoren von Cholinesterasen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sarah Wehle

aus Göttingen



Würzburg 2016

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Promotionsurkunde ausgehändigt am

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde von Juni 2012 bis Januar 2016 im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in den Arbeitskreisen von Prof. Dr. M. Decker und Prof. Dr. C. A. Sotriffer durchgeführt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht (2014 – 2016)

1. WEHLE, S.; Espargaró, A.; Sabaté, R.; Decker, M. Investigation into the stability and reactivity of the pentacyclic alkaloid dehydroevodiamine and the benz-analog thereof. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 2535-2543.
2. Sawatzky, E.; WEHLE, S.; Kling, B.; Wendrich, J.; Bringmann, G.; Sotriffer, C.; Heilmann, J.; Decker, M. Discovery of highly selective nanomolar carbamate-based butyrylcholinesterase inhibitors by rational investigation into their inhibition mode. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2067-2082.
3. Darras, F. H.; [†] WEHLE, S.; [†] Huang, G.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Amine substitution of quinazolinones leads to selective nanomolar AChE inhibitors with "inverted" binding mode. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4867-4881.
[†]: authors contributed equally to the publication.
4. Chen, X.; WEHLE, S.; Kuzmanovic, N.; Merget, B.; Holzgrabe, U.; König, B.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of β -amyloid aggregation. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 377-389.
5. Darras, F. H.; Pockes, S.; Huang, G.; WEHLE, S.; Strasser, A.; Wittmann, H.-J.; Nimczick, M.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH3 receptor antagonists. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 225-242.

Weitere Beiträge in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (2013 – 2016)

6. WEHLE, S.; Decker, M. Perception of the relevance of organic chemistry in a german pharmacy student's course. *Am. J. Pharm. Educ.* **2016**, *80*, Article 40.
7. Dgachi, Y.; Ismaili, L.; Knez, D.; Benchekroun, M.; Martin, H.; Szałaj, N.; WEHLE, S.; Bautista-Aguilera, O. M.; Luzet, V.; Bonnet, A.; Malawska, B.; Gobec, S.; Chioua, M.; Decker, M.; Chabchoub F.; Marco-Contelles J. Synthesis and biological assessment of racemic benzochromenopyrimidinimines as antioxidant, cholinesterase and $A\beta_{1-42}$ aggregation inhibitors for Alzheimer's disease therapy. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1318-1327.
8. Benchekroun, M.; Bartolini, M.; Egea, J.; Romero, A.; Soriano, E.; Pudlo, M.; Luzet, V.; Andrisano, V.; Jimeno, M.-L.; López, M. G.; WEHLE, S.; Gharbi, T.; Refouvelet, B.; Andrés, de L.; Herrera-Arozamena, C.; Monti, B.; Bolognesi, M. L.; Rodríguez-Franco, M. I.; Decker, M.; Marco-Contelles, J.; Ismaili, L. Novel tacrine-grafted ugi adducts as multipotent anti-Alzheimer drugs: A synthetic renewal in tacrine-ferulic acid hybrids. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 523-539.

9. Decker, M.; WEHLE, S. Alzheimer mit Hybridmolekülen in die Zange nehmen/Putting a squeeze on Alzheimer disease with hybrid molecules. *Nachr. Chem.* **2013**, *61*, 871-875.

Konferenzbeiträge (2012 – 2015)

1. WEHLE, S.; Decker, M. Dehydroevodiamine-based butyrylcholinesterase inhibitors as lead structures for positron emission tomography tracers.
12th International Meeting on Cholinesterases – Sixth Conference on Paraoxonases, Elche (Spanien), 26.9.-3.10.2015 (Poster)
2. WEHLE, S.; Darras, F. H.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Molecular docking studies to explain SARs of tertiary amine substituted acetylcholinesterase inhibitors.
DPhG Annual Meeting, Universität Frankfurt, 24.-26.09.2014 (Poster)
ChemSyStM Symposium, Universität Würzburg, 02.12.2014 (Poster)
3. WEHLE, S.; Darras, F. H.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. “Inverted” binding mode for piperidinyloxy-substituted heterocyclic acetylcholinesterase selective inhibitors.
DPhG Annual Meeting, Universität Freiburg, 9.-11.10.2013 (Poster)
4. Darras, F.H.; Pockes, S.; Huang, G.; WEHLE, S.; Strasser, A.; Wittmann, H.-J.; Nimczick, M.; Decker, M. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as dual-acting AChE inhibitors and H₃ receptor antagonists.
Drug Discovery Therapy World Congress 2013, Boston, USA, 03.-05.06.2013 (Poster)
5. WEHLE, S.; Chen, X.; Kuzmanovic, N.; König, B.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Molecular docking of bivalent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) with light-switchable capability to inhibit β -amyloid aggregation.
ChemSyStM Symposium, Universität Würzburg, 04.12.2012 (Poster und Vortrag)
6. WEHLE, S.; Chen, X.; Kuzmanovic, N.; König, B.; Sotriffer, C.A.; Decker, M. Molecular docking of photochromic bivalent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) to explain their interaction with one or two AChE binding sites.
Summer School “Medicinal Chemistry”, Universität Regensburg, 26.-28.09.2012 (Poster)

Ich möchte all denjenigen DANKEN, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Professor Michael Decker und Professor Christoph A. Sotriffer für die Aufnahme in ihre Arbeitskreise. Durch Verknüpfung von synthetischen Fragestellungen mit Molekularen Dockingstudien konnte ich interdisziplinär arbeiten, meine Fähigkeiten in beiden Bereichen vertiefen und auf Fragestellungen der medizinischen Chemie anwenden. Ich bedanke mich für stetige und zeitnahe Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die mir immer wieder neue Denkanstöße und Ideen gaben.

Im Rahmen der *in silico* Dockingstudien konnte ich auf synthetisierte sowie enzymkinetisch bestimmte Verbindungen von Dr. Fouad H. Darras, Dr. Xinyu Chen und Edgar Sawatzky zurückgreifen und ich bedanke mich ferner für die Synthese von Verbindungen, deren Idee aus dem Docking entstanden ist. Bezüglich der synthetischen Arbeit bedanke ich mich für die Kooperation mit Gabi Brunner, Sebastian Schwindl und Prof. Jörg Heilmann (Universität Regensburg) sowie Dr. Alba Espargaró und Professor Raimon Sabaté (Universität Barcelona).

Bei meinen Dry- und Wetlab-Kollegen bedanke ich mich für den fachlichen und außerfachlichen Austausch, ihr Engagement und die gemeinsame Zeit: Raphael Dives, Dr. Michael Hein, Dominik Heuler, Manuel Krug, Maximilian Kuhn, Dr. Benjamin Merget, Dmytro Mykhailenko, Yogesh Narkede, Lukas Pason, Daniel Schuster, Thomas Willmes und Dr. David Zilian; Luca Agnetta, Dr. Xinyu Chen, Dr. Fouad H. Darras, Dominik Dolles, Antonios Drakopoulos, Dr. Guozheng Huang, Martin Nimczick, Dominika Roos, Edgar Sawatzky, Dr. Ines Schmidt, Simon Schramm, Patricia Stadtmüller, Péter Varga und Joachim Wahl. Mit euch waren die letzten Jahre maximal abwechslungsreich und spannend. Ferner danke ich meinen Praktikanten Martin Rölz und Nicole Weigel für ihr Interesse und ihre engagierte Arbeit.

Den Sekretärinnen Frau Möhler, Frau Ebner und Frau Kosikors sowie dem Team der Werkstatt Georg Walter, Karl Vollmuth und Matthias Völker danke ich für unkomplizierte Hilfe und nette Gespräche. Danke Dr. Jens Schmitz für administrative und fachliche Hilfe.

Ich bedanke mich bei Frau Lozo für die Aufnahme in das „Mentoring in Science“ Programm denn dadurch habe ich meine „Mentoring-Mädels“ Dr. Naja Harms, Dr. Sonja Boyer, Dr. Mirjam Fließler, Dr. Astrid Fieselman und Sarah Schweeberg kennengelernt. Danke für eure Freundschaft! Ich bin froh darüber, unseren wissenschaftlichen Werdegang geteilt zu haben und bin auf unsere zukünftigen Wege gespannt.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanke ich mich für das erhaltene Promotionsstipendium und die damit einhergehende finanzielle Unterstützung.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie & Freunden für den Rückhalt und das Interesse an meiner Arbeit. Danke für eure immerwährende Unterstützung und Liebe.

“Search carefully and you will always find something new.”

Sir Andre K. Geim (Nobelpreis 2010)

Meinen Eltern &
meinem Bruder Fabian

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
APP	Amyloid- β Vorläufer Protein/Amyloid- β precursor protein
Ar	Aryl
AS	Aminosäure
AUC	Peakfläche/Area under the curve
A β	Amyloid- β Peptid
Å	Einheit Angström, 1 Å = 10 ⁻¹⁰ m
BChE	Butyrylcholinesterase
Bn	Benzyl
CAS	katalytisch aktives Zentrum/catalytic active site
CBS	Cholinbindestelle
Cut-off	Toleranzgrenze
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAc	Dimethylacetamid
δ	chemische Verschiebung in ppm/parts per million
<i>ee</i>	Electrophorus Electricus
<i>et al.</i>	und andere
fs	Femtosekunde
g	Gramm
h	Stunde(n)
<i>h</i>	Human
<i>n</i> -Hept	Heptylsubstituent
HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie/high performance liquid chromatography
Hz	Hertz, SI-Einheit für die Frequenz; 1 Hz = 1 s ⁻¹
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration zur Erreichung halbmaximaler Inhibition
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
konz.	konzentriert
LCMS	Flüssigchromatographie mit Kopplung an die Massenspektrometrie /Liquid chromatography–mass spectrometry
Lsg.	Lösung
M	Molar [mol/L]
M ⁺	Elternion, Ion mit der höchsten Häufigkeit
m	multipllett(s), NMR-Spektroskopie; mittel, IR-Spektroskopie
<i>m</i>	Mus musculus
MD-Simulation	Molekulardynamische Simulation
Me	Methyl
mg	Milligramm

Mp	Schmelzpunkt/melting point
MS	Massenspektrometrie/mass spectrometry
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
μ	mikro
n.b.	nicht bestimmt
NOESY	Nuklear Overhauser Effekt Spektroskopie
ns	Nanosekunde
PAS	Periphere anionische Bindestelle/peripheral anionic site
PDB	Protein Datenbank/Protein Data Bank
PET	Positronen Emissions Tomographie
ppm	part(s) per million
Pr	Propyl
q	quartett(s), NMR-Spektroskopie
quant.	quantitativ
<i>rat</i>	Rattus
R _f	Retentionsfaktor
RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung/root-mean-square deviation
RT	Raumtemperatur/rt: room temperature
s	singulett(s), NMR-Spektroskopie; stark, IR-Spektroskopie
sec.	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie/single photon emission computed tomography
t	triplett(s), NMR-Spektroskopie
Target	Zielprotein
THF	Tetrahydrofuran
Top-Pose	Dockinglösung mit bester Bewertung von der Scoringfunktion
t _R	Retentionszeit
Tc	Torpedo californica
w	schwach, IR-Spektroskopie

Bezüglich weiterer Abkürzungen, die im experimentellen Teil bei der Angabe der analytischen Daten verwendet werden, sei an dieser Stelle auf Kapitel 9 verwiesen.

Farbgebung in Bildern

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Bildern wurde, wenn nicht anders angegeben, die folgende Farbgebung verwendet: Proteinstrukturen sind grau und Liganden nach Atomtypen koloriert dargestellt. Sauerstoffatome werden rot, Stickstoffatome blau, Wasserstoffatome weiß, Schwefelatome gelb und Fluoratome hellblau dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Alzheimer'sche Erkrankung.....	2
1.2 Acetyl- und Butyrylcholinesterase.....	3
1.2.1 Strukturelle Merkmale der AChE.....	4
1.2.2 Strukturelle Merkmale der BChE.....	6
1.2.3 Protein-Ligand-Interaktionen in der ChE-Bindetasche.....	8
1.2.4 Inhibitoren der AChE und BChE.....	9
1.2.5 Inhibitionsmodalitäten von ChE-Inhibitoren.....	11
1.3 Dockingstudien.....	13
1.3.1 Scoringfunktionen.....	14
2. Zielsetzung	18
3. Dockingstudien von Chinazolin- und Chinazolinoninhibitoren in AChE	20
3.1 Chinazolinone- und Chinazolininhibitoren.....	21
3.1.1 Achirale Chinazolinone als AChE-Inhibitoren.....	21
3.1.2 Chirale Chinazolinderivate und Chinazolinone als AChE-Inhibitoren.....	23
3.2 Test und Optimierung der Dockingmethode.....	26
3.2.1 Protein- und Ligandenaufbereitung.....	27
3.2.1.1 Protonierungszustand der Chinazolin- und Chinazolinonliganden.....	28
3.2.2 Allgemeine Dockingeinstellungen.....	29
3.2.3 Redockingergebnisse zur Auswahl einer Scoringfunktion.....	30
3.2.4 Docking piperidiny substitutierter Liganden.....	33
3.2.5 Validierung ausgewählter Wassermoleküle in GOLD.....	39
3.2.6 Redockingergebnisse mit strukturellen Wassermolekülen.....	42
3.2.7 Affinitätsvorhersage mittels Scoringfunktionen.....	43
3.3 Diskussion der Bindemodi.....	46
3.3.1 Dockinglösungen mit sieben Wassermolekülen.....	47
3.3.2 Konformationssuche für Chinazolinone mit siebengliedrigem Alizyklus.....	49

3.3.3 Auswahl der Dockingposen.....	52
3.3.4 Bevorzugung des invertierten Bindemodus im Docking	52
3.3.5 Charakteristika des invertierten Bindemodus	54
3.3.6 Ligand-Enzym-Interaktionen: Amins substituent.....	55
3.3.7 Ligand-Enzym-Interaktionen: Ligandengrundgerüst	57
3.3.8 Einfluss der Linkerlänge: Propyl- vs. Hexyl-Linker	62
3.4 Fazit zu Strukturmerkmalen hochaffiner Chinazolinoninhibitoren der AChE	63
4. In silico Studien von Bis-Tacrinderivaten in AChE.....	65
4.1 Bis-Tacrine mit photochromer Einheit.....	65
4.1.1 Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung	69
4.2 Dockingstudien der Bis-Tacrinderivate	70
4.2.1 Redocking und daraus abgeleitete Dockingeinstellungen.....	71
4.2.2 Angepasste Dockingeinstellungen	73
4.2.3 Dockinglösungen in TcAChE.....	74
4.3 Molekulardynamische Simulationen von Protein-Ligand-Komplexen	78
4.3.1 Durchführung.....	79
4.3.2 Resultate	81
4.4 Fazit und Ausblick	84
5. Synthetische Studien von Dehydroevodiamin (DHED) und Benz-DHED als Cholinesteraseinhibitoren	86
5.1 Synthetische Studien zu DHED und Benz-DHED	88
5.1.1 Synthese der Ausgangsmaterialien.....	88
5.1.2 Demethylierungsreaktion bei Benz-DHED	93
5.1.3 Stabilitätsuntersuchungen von Benz-DHED und DHED	97
5.1.4 Alternativer Reaktionsweg zu Benz-DHED: Methylierung.....	99
5.1.5 Alternativer Reaktionsweg zu Benz-DHED und DHED: Oxidation	100
5.2 Verhalten von DHED und Benz-DHED in wässrigen Lösungen	104
5.2.1 UV/Vis Spektren von DHED.....	105
5.2.2 UV/Vis Spektren von Benz-DHED.....	108
5.3 Pharmakologische Untersuchungen von DHED.....	111
5.3.1 Biologisch aktive Form von Benz-DHED und DHED	111

5.3.2 Antioxidative Kapazität (ORAC Assay) von Benz-DHED und DHED	113
5.3.3 Neuroprotektion und Neurotoxizität von Benz-DHED und DHED	113
5.3.4 Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung von Benz-DHED und DHED	115
5.4 Synthetische Vorarbeiten zur Carbamatherstellung.....	116
5.4.1 Problemformulierung.....	116
5.4.2 Synthese mittels Schutzgruppentechnik.....	117
5.4.3 Oxidation von Hydroxy-Benz-DHED und Hydroxy-DHED	119
5.4.4 Anforderungen an eine Schutzgruppe für DHED/Benz-DHED	120
5.5 Fazit und Ausblick für Studien zu DHED und Benz-DHED	121
6. Dockingstudien von Chinazolin-carbamat-Inhibitoren in BChE.....	124
6.1 Carbamat-basierte Chinazolininhibitoren	125
6.2 Vorgehensweise im Docking	128
6.2.1 Redocking- und Dockingstudien für Carbamat-basierte Inhibitoren.....	129
6.2.2 Modelling-Ansatz für Carbamat-basierte Inhibitoren in <i>h</i> BChE	132
6.2.3 Evaluation der Arylring- und Methylgruppenposition	134
6.3 Diskussion der Dockingposen.....	139
6.4 Fazit des Carbamat-Modelling-Ansatzes.....	142
7. Zusammenfassung.....	145
8. Summary.....	149
9. Experimental Part.....	153
9.1 General	153
9.1.1 Working techniques and chemicals	153
9.1.2 Analytical methods.....	154
9.2 Syntheses of lactam intermediates.....	155
9.3 Anthranilic ester intermediate	159
9.3.1 Syntheses of anhydrides	160
9.3.2 <i>N</i> -alkylation reactions	164
9.3.3 Formation of methyl esters.....	170
9.4 Condensation reactions	177
9.5 Formation of quinazolinium-salts	182

9.6 Syntheses of evodiamine, benz-evodiamine and hydroxy-derivatives	184
9.7 Oxidation of evodiamine and benz-evodiamine.....	189
9.8 Stability tests of DHED and benz-DHED	191
9.9 Syntheses to benzyloxy substituted anthranilic acid derivative	194
9.10 Hydrogenations of DHED and benz-DHED	200
9.11 Syntheses of hydroxy-evodiamine and hydroxy-benz-evodiamine.....	202
9.12 Synthesis of phenol	206
9.13 UV/Vis measurements	207
9.14 IC ₅₀ -measurements	207
10. Anhang	209
10.1 Anhang zu Kapitel 1	209
10.2 Anhang zu Kapitel 3	210
10.2.1 IC ₅₀ -Werte der Chinazolinverbindungen	210
10.2.2 Redockingergebnisse: ChemScore und ASP	210
10.2.3 Zusatzinformationen zur strukturellen Wasserauswahl.....	211
10.2.4 Einstellungen der stochastischen Konformationssuche.....	214
10.2.5 Dockinglösungen der Chinazolin- und Chinazolinonliganden	215
10.2.6 Chinazolinon- und Chinazolin-Platzierung im invertierten Bindemodus	216
10.3 Anhang zu Kapitel 4	218
10.3.1 Redockingergebnisse	218
10.4 Anhang zu Kapitel 5	219
10.4.1 Methylierungsreaktionen an Benz-Rutaecarpin.....	219
10.5 Anhang zu Kapitel 6	219
10.5.1 Redockingdaten von 4BDS.....	219
10.6 Übersicht der verwendeten Dockingeinstellungen	220
11. Literaturverzeichnis	221
12. Eidesstattliche Erklärung	237





1. Einleitung

Für die pharmazeutische Forschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe ist das Verständnis über die Prinzipien, nach denen Wirkstoffmoleküle mit Makromolekülen wie Proteinen und Enzymen interagieren, von großer Bedeutung.¹ Solche Wirkstoffmoleküle modulieren die Enzymfunktion und werden Liganden oder bei Hemmung der Enzymfunktion Inhibitoren genannt.

Für die Inhibitorentwicklung wird eine Molekülstruktur benötigt, welche durch synthetische Modifikation in ihrer Affinität zum Target, als deren Wirkort, verbessert werden kann. Als Leitstrukturen kommen Naturstoffe oder synthetische Verbindungen, sogenannte „Hits“ in Frage, deren Affinität für das Target in einem entsprechenden Assaysystem bestimmt wurde.² In späteren Phasen der Wirkstoffentwicklung erfolgt die Modifikation der Struktur hinsichtlich weiterer Aspekte, wie unter anderem der Selektivität, Bioverfügbarkeit und Toxizität, bevor *in vivo* Studien durchgeführt werden.

In frühen Phasen des Wirkstoffdesigns verläuft die Entwicklung von Inhibitoren affinitätsbasiert. Die Affinität kann maßgeblich über die Wechselwirkungskomplementarität adressiert werden. Lange Zeit verlief die Entwicklung neuer Ligandenstrukturen nach der Methode von Versuch und Irrtum. Die rationale Wirkstoffentwicklung begann mit Ligandbasierten Designansätzen.³ Durch den Vergleich struktureller Merkmale von Inhibitoren des gleichen Targets wurde auf strukturelle Merkmale des Makromoleküls geschlossen. Ein weiteres Hilfsmittel für rationales Wirkstoffdesign ergab sich aus der Röntgenstrukturanalyse, die seit den 80er Jahren vermehrt auch für Proteinstrukturen eingesetzt wird.⁴ Derzeit stehen über 120'000 Röntgenstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen zur Verfügung, die für ein strukturbasiertes Design genutzt werden können.⁵ Mittels computergestützter Methoden können potentielle Inhibitoren für ein Target entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Inhibitoren der Cholinesterasen untersucht. Diese Enzyme nehmen im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer (Alzheimers disease, AD) eine besondere Bedeutung ein, denn die Cholinesterasen sind der Angriffspunkt derzeitig verfügbarer Wirkstoffe für diese Erkrankung. Anhand der 3D-Struktur dieser Enzyme sowie der Struktur bekannter Inhibitoren können mögliche Protein-Ligand-Wechselwirkungen abgeleitet werden. Darüber hinaus dienen enzymkinetische Methoden der Charakterisierung von Inhibitoren, so dass diese untereinander entsprechend ihrer Inhibitionsmodalität verglichen werden können. Anhand von Docking, einer *in silico* Methode zur Generierung von Ligandenkonformationen und –positionen in 3D-Strukturen von Enzymen, können schließlich die Interaktionen zwischen Protein und Ligand auf atomarer Ebene analysiert werden.

Durch die Vereinigung dieser interdisziplinären Methoden soll das Verständnis über die Interaktion von Cholinesterasen mit entsprechenden Inhibitoren verbessert werden. Dieses Wissen soll in einem iterativen Prozess der rationalen Verbesserung zukünftiger Wirkstoffe dienen.

1.1 Alzheimer'sche Erkrankung

Das Krankheitsbild von Morbus Alzheimer (AD) ist gekennzeichnet durch Gedächtnis- und Orientierungsstörungen, Störungen des Denk- und Urteilsvermögens, in weiterer Folge Sprachstörungen sowie Veränderung der Persönlichkeit.⁶ Weltweit leiden ca. 47 Millionen Menschen mit einem Alter >60 Jahren an AD, wobei die Zahl der Betroffenen aufgrund der steigenden Lebenserwartung zukünftig weiter zunehmen wird.⁷

Neuropathologisch kennzeichnet sich die Erkrankung durch den Verlust cholinerg Neuro-nen, die Akkumulation extrazellulärer Amyloid- β ($A\beta$) Plaques sowie neurofibrilläre Bündel (Tau-Protein-Ablagerungen) und stellt daher eine multifaktorielle Krankheit dar.^{8, 9} Die Sequenz der pathogenen Prozesse ist bis heute unklar, weshalb verschiedene Hypothesen zur Krankheitsentstehung formuliert wurden.¹⁰

Die **cholinerge Hypothese** besagt, dass die Degeneration der cholinergen Neuronen und die damit einhergehende verminderte Neurotransmission zum Verlust der kognitiven Fähigkeiten führt.¹¹⁻¹³ Defizite in der Neurotransmittersynthese an der Cholin-Acetyltransferase (ChAT),^{11, 14, 15} die reduzierte Cholinaufnahme sowie eine gestörte Freisetzung von Acetylcholin (ACh) wurden festgestellt.^{15, 16} Die Cholinesterasen Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase (AChE, BChE) sind für die Hydrolyse des Neurotransmitters ACh verantwortlich, weshalb die Gabe von AChE- und BChE-Inhibitoren dafür sorgen soll, dass genügend ACh für die Neurotransmission zur Verfügung steht (s. Kapitel 1.2.4).⁹

Der **Amyloid-Kaskaden-Hypothese** zufolge entstehen $A\beta$ -Plaques (unlösliche hydrophobe β -Faltblattstrukturen) durch Aggregation von $A\beta$ -Peptidsträngen.^{9, 17} Die extrazellulären $A\beta$ -Peptidstränge entstehen durch zweifache proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), durch β - und γ -Sekretase, in Peptidstränge einer Länge von 39-43 Aminosäuren, darunter auch $A\beta$ 40 (Aminosäuren 1-40) sowie $A\beta$ 42 (Aminosäuren 1-42). Letzterem wird eine höhere Aggregationstendenz und Neurotoxizität zugeschrieben.^{10, 18} Ob $A\beta$ -Monomere, lösliche Oligomere oder Plaques für die Neurodegeneration verantwortlich sind, ist bislang nicht aufgeklärt. Einige Studien vermuten, dass lösliche $A\beta$ -Dimere ursächlich für Synapsen- und Neuronenverlust sind.^{19, 20} Der Zusammenhang von $A\beta$ -Plaques mit

neuroinflammatorischen Prozessen wird ebenfalls diskutiert.^{21, 22} Studien konnten ferner zeigen, dass AChE die Bildung von A β -Plaques induzieren und katalysieren kann.²³⁻²⁵

Tauproteine sind ein normaler Bestandteil des Zytoskeletts von Neuronen und binden an Mikrotubuli.²⁶ Dadurch tragen sie zur Stabilität sowie zum axonalen Transport bei. Die **Tau-Hypothese** besagt, dass sich das Tauprotein aufgrund von Phosphorylierungsprozessen von den Mikrotubuli abspaltet und sich intrazellulär als gepaarte helikale Fragmente abgelagert.²⁷ Nach der Apoptose bleiben dann extrazelluläre neurofibrilläre Bündel hyperphosphorylierten Taus zurück. Sowohl die Aggregate als auch der Verlust des axonalen Transportes können zur Krankheit beitragen.¹⁷ Bisher wurde festgestellt, dass hyperphosphoryliertes Tau die AChE-Expression im Gehirn moduliert.²⁸

Des Weiteren spielen in der Entstehung von AD die genetische Disposition^{29, 30} sowie oxidativer Stress, der den neuropathologischen Kennzeichen vermutlich voraus geht und grundsätzlich in Alterungsprozessen involviert ist, eine Rolle.³¹⁻³³

Die Forschung zu neuen Wirkstoffen für die Alzheimer'sche Krankheit^{13, 34} stützt sich derzeit auf die Amyloid-Kaskaden-Hypothese^{17, 35, 36} sowie neuartige Therapieansätze mittels personalisierter Medizin.³⁷

1.2 Acetyl- und Butyrylcholinesterase

Die Cholinesterasen AChE und BChE sind Serinhydrolasen, die die Hydrolyse von Esterbindungen katalysieren.³⁸ Charakteristikum dieser Enzymklasse ist die im katalytischen Zentrum befindliche Aminosäure (AS) Serin. Reaktionszentrum der Katalyse ist die sogenannte katalytische Triade (CAS, für engl. catalytic active site), die zusätzlich zum Serin ein Histidin und ein Glutamat enthält (Ser, His, Glu).³⁹ Wichtigster Schritt in der Katalyse ist die Bildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates am Serin, wobei die Nucleophilie des Serin-OHs durch eine Protonenumlagerung auf Histidin und Glutamat verstärkt wird. Das acetylierte Serin wird durch Hydrolyse wieder regeneriert.

Die Unterscheidung der beiden Cholinesterasen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität: AChE hydrolysiert Acetylcholin (ACh, Abb. 1.1) schneller als übrige Cholinester, wohingegen BChE sowohl ACh als auch das synthetische Substrat Butyrylcholin (BCh, Abb. 1.1) in Cholin und die entsprechende Carbonsäure umsetzt.⁴⁰

Die physiologische Rolle von BChE ist noch nicht vollständig aufgeklärt.^{41, 42} BChE ist im Vergleich zu AChE reichlich im Plasma vorhanden (3 mg/L, AChE: 8 μ g/L)⁴³ und hydrolysiert Esterverbindungen wie den Benzoyl ester in Cocain, weswegen für dieses Enzym auch eine detoxifizierende Rolle diskutiert wird.⁴⁴

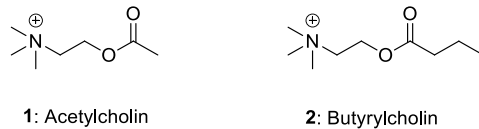


Abbildung 1.1 Natürliches und synthetisches Substrat der Cholinesterasen: Acetylcholin **1** und Butyrylcholin **2**.

Die physiologische Aufgabe von AChE besteht hauptsächlich im Abbau des kationischen Neurotransmitters ACh und somit der Termination von Reizweiterleitungen an Synapsen.⁴⁵ Der Neurotransmitter aktiviert ACh-Rezeptoren, wodurch Ionenkanäle geöffnet werden und ein postsynaptisches Aktionspotential aufgebaut wird. Das Enzym ist mit einer Umsatzfrequenz^a von 10^4 s^{-1} eines der effizientesten derzeit bekannten Enzyme.⁴⁶ Für eine derart effiziente Katalyse sind neben der katalytischen Triade noch weitere strukturelle Merkmale der Substratbindetasche entscheidend, die im Folgenden beschrieben werden.

1.2.1 Strukturelle Merkmale der AChE

Strukturelle Merkmale der AChE wurden über Röntgenstrukturanalysen der apo-Form und von Komplexen mit Inhibitoren aufgeklärt.³⁹ Die Röntgenstrukturen sind in der Protein Data Bank (PDB) mit einem vierstelligen Code (z.B. *hAChE* PDB-ID: 4EY7) hinterlegt.⁵ Röntgenstrukturen beruhen auf der Beugung von Röntgenstrahlung an Elektronen der Atome eines Proteinkristalls.⁴⁷⁻⁴⁹ Mittels mathematischer Methoden wird daraus die Elektronendichte des vermessenen Proteins erhalten.⁴⁷ Mit Hilfe der Kenntnis über die Proteinsequenz und der Strukturformel des Liganden wird ein Atommodell in die Elektronendichte gelegt und iterativ verfeinert. Ergebnis dieses Verfahrens ist die Röntgenstruktur, die ein zeitlich und räumlich gemittelt Bild des Proteins oder Protein-Ligand-Komplexes darstellt.⁴⁹ Je besser die in Å angegebene Auflösung dieser Struktur desto mehr Struktur-information ist darin enthalten (für 4EY7 beträgt die Auflösung 2.35 Å). Das Modell ist dann verlässlicher hinsichtlich der Präzision und Genauigkeit der Atompositionen (je kleiner die Nummer in Å, desto höher und besser die Auflösung).⁴⁷

Das Enzym AChE kann aus verschiedenen Organismen isoliert werden und wird dann wie folgt abgekürzt: *h* für *Homo sapiens*, *m* für *Mus musculus*, *Tc* für *Torpedo californica*, *ee* für *Electrophorus electricus*. Diese Isoformen unterscheiden sich in der Aminosäure-sequenz, die Bindetasche liegt jedoch bis auf eine Ausnahme hoch konserviert vor: Phe330 der *TcAChE* entspricht in den übrigen Isoformen einem Tyrosin.

^a Umsatzfrequenz (engl. turnover frequency): Anzahl katalysierter Reaktionen pro Zeiteinheit.

Die AChE stellt mit derzeit 49 TcAChE- sowie sieben hAChE-Röntgenstrukturen (Auflösung <math><2.5 \text{ \AA}</math>, Stand: April 2016) in der PDB ein strukturell eingehend untersuchtes Enzym dar. In diesen Röntgenstrukturen sind insgesamt 25 Liganden enthalten, die das Enzym nicht-kovalent reversibel inhibieren. Acht Komplexstrukturen weisen ein kovalent irreversibel gebundenes Serin auf. Die Bedeutung der Forschung zu AChE manifestiert sich in der großen Anzahl vorhandener Röntgenstrukturen von diesem Enzym. Dadurch ist eine gute Grundlage für die weitere Forschung zur Identifikation struktureller Merkmale hochaffiner AChE-Inhibitoren vorhanden.

Wesentliche Strukturmerkmale der AChE sind 1) die periphere anionische Bindestelle (PAS, peripheral anionic site), 2) die Oxyanion-Vertiefung, 3) die Cholinbindestelle (CBS), 4) die Acyl-Bindestelle und 4) die katalytische Triade, als Ort der Hydrolyse. Ebendiese katalytische Triade (CAS; Ser203, His447, Glu334; hAChE Nummerierung) befindet sich am Ende eines 20 Å langen Bindetaschentunnels, der zur Hälfte von aromatischen Aminosäuren flankiert wird (orange, Abb. 1.2).⁵⁰ In räumlicher Nähe zu Ser203 befindet sich die sogenannte Oxyanion-Vertiefung, bestehend aus Gly121, Gly122 und Ala204 (gelb, Abb. 1.2).^{39, 51} Die Amidprotonen dieser Aminosäuren fungieren als Wasserstoffbrücken-Donoren.⁵² Durch das Ausbilden von bis zu drei Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoff des ACh-Esters wird eine für den nucleophilen Angriff des Serins günstige Orientierung des Substrates in der Bindetasche gewährleistet.

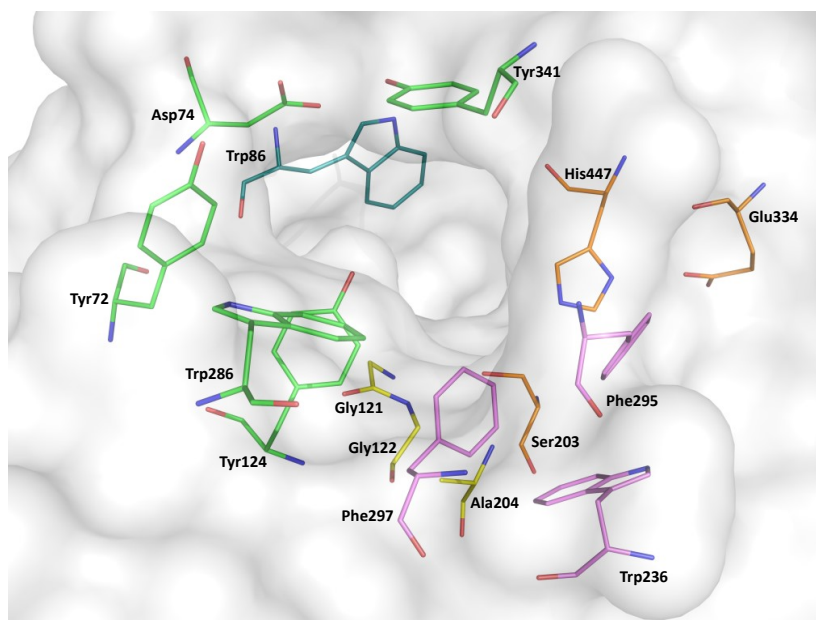


Abbildung 1.2 Strukturelle Merkmale der hAChE-Bindestasche (PDB-ID: 4EY7): CAS (orange), Oxyanion-Vertiefung (gelb), CBS (blau), Acyl-Bindestelle (pink) und PAS (grün). Die Proteinoberfläche ist in grau dargestellt. Sofern nicht anders angegeben sind alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen von Strukturen mit dem Programm PyMol erstellt worden.⁵³

Während die Esterfunktionalität durch die Oxyanion-Vertiefung stabilisiert ist, zeigt die Methylgruppe des Acylrestes in die aus Phe295, Phe297 sowie Trp236 bestehende Acyl-Bindestelle (pink, Abb. 1.2). Das quartäre Amin kann über die Ausbildung einer Kation- π -Wechselwirkung zu der aromatischen Aminosäure Trp86 in seiner Position fixiert werden. Diese Aminosäure fungiert daher als Cholinbindestelle (CBS, blau, Abb. 1.2).

Bevor das Substrat in die Nähe der CAS gelangt, findet eine Bindung an die am Binde-tascheneingang lokalisierte „periphere anionische Stelle“ statt (PAS, grün, Abb. 1.2). Die PAS besteht aus den aromatischen Aminosäuren Tyr72, Tyr124, Trp286, Tyr341 und Asp74.³⁹ Die wichtigste PAS-Aminosäure ist Trp286, weil diese Liganden nicht nur über π - π - und Kation- π -Wechselwirkungen stabilisieren kann,^{54, 55} sondern darüber hinaus in Ab-hängigkeit des Liganden eine signifikante Bewegung ihrer Ringfläche zeigt.^{56, 57} Nach der Bindung des ACh an die PAS erfolgt der Substrattransport über „Induced-fit“-Mechanismen, im Sinne einer periodischen Bewegung der überwiegend aromatischen Aminosäuren zur CAS, dem Ort der Hydrolyse.⁵⁸

Die AChE und BChE sind Isoenzyme, da sie die gleiche Reaktion katalysieren, sich aber in der Aminosäuresequenz unterscheiden. Ein Sequenzvergleich von *hAChE* und *hBChE* ergibt eine Identität von 49% sowie eine Ähnlichkeit der Aminosäuren von 66% (Berechnung s. Kapitel 10.1). Im Vergleich zur AChE wird aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität ein größeres Raumangebot der BChE-Bindetasche erwartet.

1.2.2 Strukturelle Merkmale der BChE

Die strukturellen Merkmale und die für die Katalyse entscheidenden Bindestellen der BChE-Bindetasche können durch Überlagerung auf die $\text{C}\alpha$ -Atome einer AChE-Röntgenstruktur direkt miteinander verglichen werden. Dies zeigt für *hBChE* (PDB-ID: 1POI) ebenfalls die Lokalisation der CAS am Ende einer 20 Å tiefen Bindetasche, wobei die Aminosäuren der CAS, der CBS sowie der Oxyanion-Vertiefung in ihrer Lage konserviert sind (Abb. 1.3).

Auch in dieser Isoform dienen die Aminosäuren der Oxyanion-Vertiefung dazu, ein negativ geladenes Sauerstoffatom durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in der Bindetasche zu fixieren.⁵¹

Im Vergleich zur AChE-Bindetasche, resultiert das größere Raumangebot der BChE-Binde-tasche aus dem Austausch sieben aromatischer durch sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäuren, wie Alanin, Leucin und Valin. Dadurch ergibt sich ein um ca. 200 Å³ größeres Volumen der BChE- gegenüber der AChE-Bindetasche.⁵⁹ Es wird vermutet, dass Unter-schiede in der Acyl-Bindestelle ursächlich für die Selektivität der Substratbindung von BChE

gegenüber AChE sind.³⁹ In BChE wird die Acyltasche von Leu286, Va288 sowie Trp231 gebildet und kann daher sterisch anspruchsvollere Acylreste aufnehmen und stabilisieren (entsprechende AS der hAChE: Phe295, Phe297, Trp236).

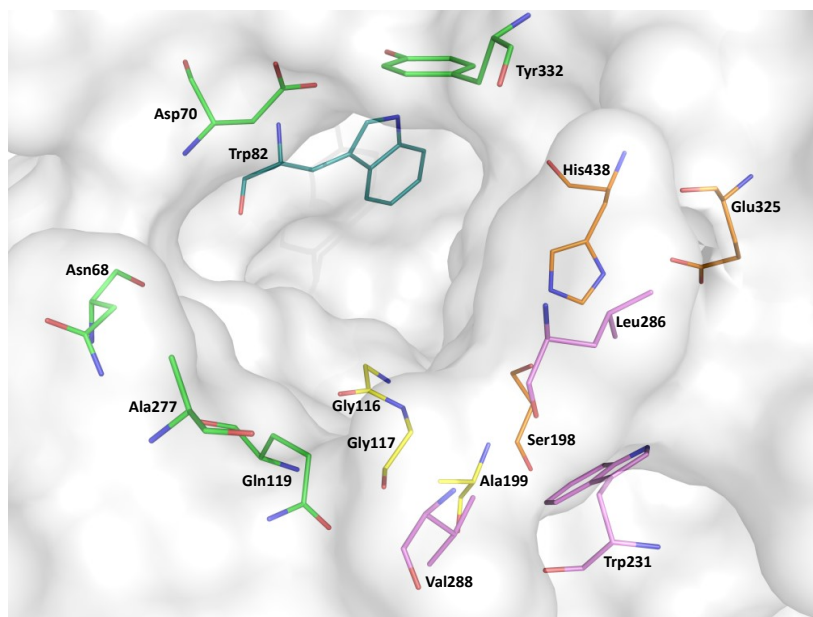


Abbildung 1.3 Strukturelle Merkmale der hBChE-Bindetasche (PDB-ID 1P0I): CAS (orange), Oxyanion-Vertiefung (gelb), CBS (blau), Acyl-Bindestelle (pink) und PAS (grün). Die Proteinoberfläche ist in grau dargestellt.

Ob BChE eine zur AChE vergleichbare PAS-Region besitzt, ist bislang umstritten.⁶⁰⁻⁶² In der Röntgenstruktur liegen an den entsprechenden Positionen zur AChE-PAS nämlich die nicht-aromatischen Aminosäuren Asn68, Gln119 sowie Ala277, wobei lediglich die beiden Aminosäuren Asp70 und Tyr332 den PAS-Aminosäuren der AChE entsprechen. Studien mit AChE-Inhibitoren, welche auch die PAS besetzen, zeigen schlechtere Inhibition der BChE.^{60, 61} Andere Studien lassen den Schluss zu, dass sich die PAS der BChE neben Asp70 und Tyr332 noch aus Phe329 zusammensetzt und somit nicht vollständig mit der Lokalisation in der AChE-Bindetasche vergleichbar ist.⁶²

Abbildung 1.4 zeigt die Unterschiede der Aminosäuren der hAChE und hBChE-Bindetasche. Abgebildet ist die Proteinoberfläche der BChE. Durch die in die Bindetasche ragenden aromatischen PAS-formenden AChE Aminosäuren Tyr72, Tyr124, Trp286 sowie Phe297 wird das größere Raumangebot der BChE- gegenüber der AChE-Bindetasche veranschaulicht.

Von der hBChE sind in der PDB derzeit 25 Strukturen hinterlegt (Auflösung <2.5 Å), wovon zwei Strukturen einen nicht-kovalenten reversiblen Liganden enthalten (Tacrin, Cholin) und die übrigen Strukturen ein kovalent irreversibel-gebundenes Serin aufweisen.

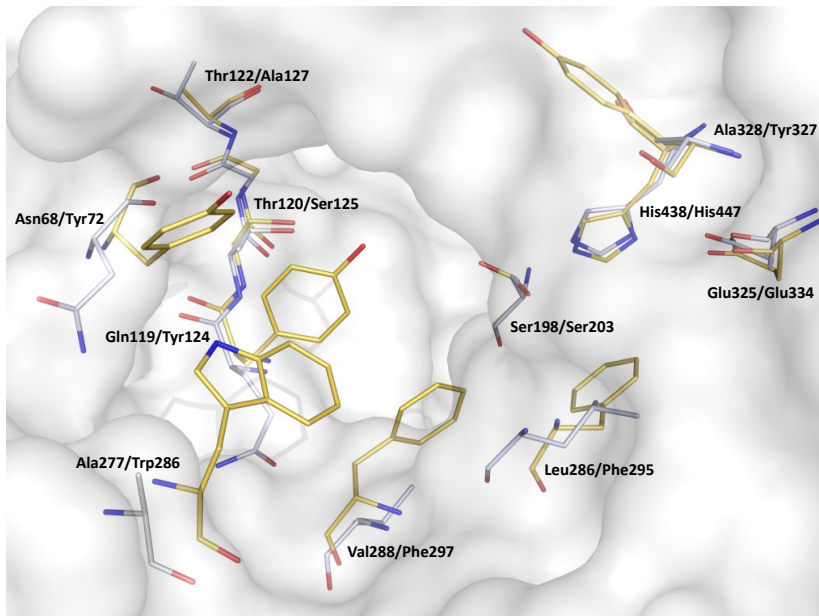


Abbildung 1.4 Unterschiede in der *hBChE*- (grau, erste Aminosäure) und *hAChE*-Bindetasche (gelb, zweite Aminosäure) durch Überlagerung der Röntgenstruktur 1P0I auf die C α -Atome von 4EY7. In grau ist die Proteinoberfläche der BChE dargestellt.

Die beschriebenen strukturellen Merkmale der AChE- und BCHE-Bindetasche dienen dazu, das natürliche Substrat für die Hydrolyse optimal in der Bindetasche zu positionieren. Die bekannten Interaktionen des Substrates in der Bindetasche können auch von Liganden, welche das Enzym inhibieren sollen, eingegangen werden und gezielt durch das Design der Inhibitorstruktur adressiert werden.

1.2.3 Protein-Ligand-Interaktionen in der ChE-Bindetasche

Die Interaktion von Cholinesterasebindetasche und Inhibitor geschieht über ungerichtete hydrophobe Wechselwirkungen sowie gerichtete nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Kation- π -Wechselwirkungen.⁶³

Wasserstoffbrückenbindungen beruhen hauptsächlich auf der elektrostatischen Anziehung von Wasserstoffbrücken-Donoren (-OH, -NH) und Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (C=O).⁶⁴ Bevorzugt nimmt die Wasserstoffbrücke zwischen -NH und O=C eine lineare Anordnung ein, wobei der Winkel N-H \cdots O größer als 150° ist. Eine größere Winkelschwankungsbreite von 100 – 180° wird für C=O \cdots H beobachtet. Der dritte Parameter zur Beschreibung von Wasserstoffbrücken ist die Abweichung der Wasserstoffbrücke aus der Akzeptorebene, die weniger als 25 – 30° betragen sollte.⁵⁴ Wassermoleküle, die Protein-Ligand-Interaktionen vermitteln, zeigen mitunter größere Abweichungen von der idealen Geometrie als dies für funktionell wichtige Wassermoleküle, die essentiell für den Katalysevorgang sind, der Fall ist.⁶⁵

Der Indolring der Aminosäure Trp86 in *hACHE* bzw. Trp82 in *hBChE* zeigt in der Substratbindung eine Präferenz zur Ausbildung von Kation- π -Wechselwirkungen.⁶⁶ Eine solche Interaktion kann auch zwischen geladenen Liganden und dem Enzym ausgebildet werden. Ursächlich für die Kation- π -Interaktion ist die Polarisationswechselwirkung zwischen einer positiven Ladung (Kation oder positiv geladenes Stickstoffatom) und dem Elektronensystem einer aromatischen Aminosäure (Trp, Phe oder Tyr).^{63, 64} Die Interaktionsenergie ist optimiert, wenn das Kation senkrecht zur Aromatenebene liegt, wobei die Winkelabhängigkeit schwächer ausgeprägt ist als beim Vorliegen von Wasserstoffbrücken.⁶⁷ Berechnungen der Interaktionsenergien von Methylammonium und Acetat (Salzbrücke) sowie Methylammonium und Benzol (Kation- π) in Ethylacetat, welches mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 6.02$ annähernd einer Proteinumgebung entspricht,⁶⁸ ergaben für die Salzbrücke eine Energie von -19.7 kcal/mol und für die Kation- π -Interaktionsenergie eine lediglich um den Faktor drei schwächere Energie von -6.2 kcal/mol.⁶⁹ In wässrigen Lösung können Kation- π -Wechselwirkungen sogar ähnlich stark sein wie Salzbrücken. Für die Ausbildung einer Wechselwirkung müssen beide Bindungspartner desolvatisiert werden. Im Gegensatz zur Ausbildung einer Salzbrücke muss bei der Kation- π -Interaktion lediglich das Kation desolvatisiert werden. Nach Desiraju lässt sich jede Bindung in einen elektrostatischen, kovalenten und Van-der-Waals Beitrag aufteilen.⁷⁰ In seiner qualitativen Einteilung liegt die Bindungsstärke einer Wasserstoffbrücke ($\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$) und einer Kation- π -Interaktion ($\text{NH}_4^+\cdots\pi$) nah beieinander, wobei letztere Wechselwirkung einen schwächeren kovalenten und dafür einen stärkeren elektrostatischen Anteil zeigt.

Die bisher eingesetzten Wirkstoffe zur Inhibition der Cholinesterasen, auf die im Folgenden eingegangen wird, zeigen Strukturmerkmale für die Ausbildung dieser beschriebenen gerichteten Wechselwirkungen.

1.2.4 Inhibitoren der AChE und BChE

Die Behandlung von AD erfolgt gegenwärtig durch AChE-Inhibitoren, womit ein symptomatischer Behandlungsansatz verfolgt wird. Tacrin **3** war der erste zugelassene Wirkstoff, der aber aufgrund von Hepatotoxizität wieder vom Markt genommen werden musste. Tacrin wurde in den späten 90-er Jahren von den Wirkstoffen Donepezil **4**,^{71, 72} Galanthamin **5**⁷³ sowie Rivastigmin **6**⁷⁴ abgelöst (Abb. 1.5).⁷⁵ Bis auf Rivastigmin sind die Wirkstoffe reversible AChE-Hemmer und können in der Bindetasche durch hydrophobe π - π -Interaktionen der aromatischen Systeme, Wasserstoffbrücken protonierter Stickstoffatome, Hydroxy- und Methoxygruppen sowie Kation- π -Wechselwirkungen des protonierten Piperidinstickstoffes von Donepezil stabilisiert werden.

Die Carbamatstruktur des Rivastigmins kann auf das Serins der katalytischen Triade übertragen werden, wodurch eine kovalente Bindung entsteht. Mit der Zeit wird das carbamoylierte Serin hydrolysiert, weshalb Rivastigmin einen pseudo-irreversiblen Inhibitor darstellt.

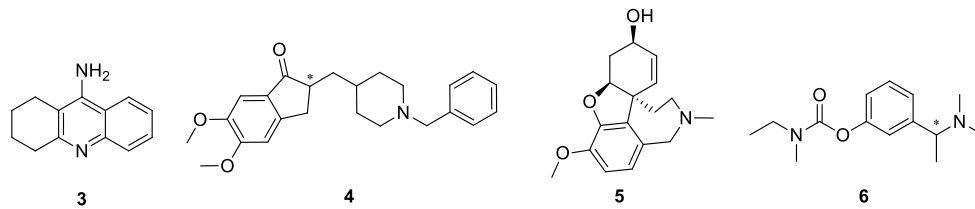


Abbildung 1.5 AChE-Inhibitoren: Tacrin **3**, Donepezil **4**, Galanthamin **5** sowie Rivastigmin **6**.

Die Behandlung mit AChE-Hemmern in frühen Stadien der AD ist im Sinne einer Symptomlinderung und Verzögerung des Krankheitsverlaufes durchaus sinnvoll, da AChE in gesunden Gehirnen für 80% der Cholinesteraseaktivität verantwortlich ist. In frühen Phasen der Erkrankung nimmt die Konzentration des Neurotransmitters ACh durch den Verlust cholinergischer Neuronen ab. Die temporäre Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration kann dann durch die AChE-Hemmung erreicht werden. Während der Progression der Krankheit wurden verminderte Konzentrationen der AChE um 30 – 67%, teilweise sogar um 90%, im Vergleich zur AChE-Konzentration eines gesunden Gehirns festgestellt.⁷⁶⁻⁷⁸ Dies würde die Gabe von AChE-Hemmern überflüssig machen. Allerdings geht mit dem Abfall an AChE auch die 40-90%-ige Konzentrationserhöhung des Isoenzym BChE in späten Phasen der AD einher.⁷⁹ *In vivo* Studien konnten zeigen, dass BChE dann die Funktion der AChE, nämlich die Hydrolyse des Neurotransmitters ACh, übernimmt.⁸⁰ Das Verhältnis von BChE/AChE kann von 0.5 bis auf 11 ansteigen.⁸¹ Andere Studien konnten eine positive Korrelation zwischen selektiver BChE-Hemmung und verbesserter Gedächtnisleistung zeigen.^{82, 83}

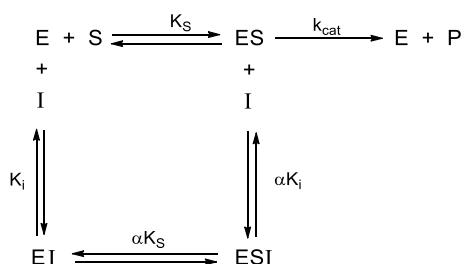
Gegenwärtige Forschungen zu selektiven BChE-Inhibitoren stützen sich auf die Entwicklung von Carbamatstrukturen⁸⁴⁻⁸⁶ welche einen pseudo-irreversiblen Hemmmechanismus zeigen (vergl. Rivastigmin **6**, Abb. 1.5).^{87, 88} Dabei kann entweder der Carbamatsubstituent⁸⁹⁻⁹¹ (R-N(C=O)) oder das Ligandengrundgerüst ((O=C)O-R) variiert werden.^{84, 85, 88} Durch die radioaktive Markierung dieser Liganden soll zukünftig die Lokalisation der BChE im Gehirn und darüber deren Bedeutung in AD weiter aufgeklärt werden.⁹²

In den letzten 10-15 Jahren fokussierte sich die Forschung immer weiter auf die Entwicklung von Inhibitoren, die mehrere Targets adressieren, um somit neue Ansätze in der Therapie der multifaktoriellen Krankheit zu schaffen. In diesem Zusammenhang wurden AChE-Inhibitoren entwickelt, die auch die A β -Fibrillenbildung inhibieren können^{25, 93-96} oder neben der AChE-Hemmung auch die Bildung freier Radikale verhindern.^{97, 98}

1.2.5 Inhibitionsmodalitäten von ChE-Inhibitoren

Die Inhibitionsgüte eines reversiblen Inhibitors (wie z.B. **3 – 5** in Abb. 1.5) wird klassischerweise durch den mittels Ellman-Assay bestimmten IC_{50} -Wert oder pIC_{50} -Wert angegeben ($pIC_{50} = -\log(IC_{50})$).⁹⁹ Im Assay wird über einen zugesetzten Farbstoff und unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen photometrisch die Restaktivität des Enzyms gemessen (für Reaktionsschema s. Kapitel 8.14). Das Auftragen der Restaktivität gegen die logarithmierten Inhibitorkonzentrationen ergibt eine sigmoidale Kurve, deren Wendepunkt den IC_{50} -Wert darstellt. Dieser Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, die notwendig ist, um halbmaximale Enzyminhibition zu erreichen. Je niedriger diese Konzentration, desto aktiver ist die untersuchte Verbindung in der Inhibition dieses Enzyms. Der IC_{50} -Wert ist keine absolute Größe im Sinne einer Dissoziationskonstante, sondern abhängig von den im Assay verwendeten Enzym- und Substratkonzentrationen sowie der Salzkonzentration und dem pH-Wert, welche die Enzymaktivität beeinflussen. Unabhängig von der Enzymkonzentration ist die Enzym-Inhibitor-Dissoziationskonstante K_i , welche direkt mit der Bindungsenthalpie des gebildeten Komplexes zusammenhängt (vergl. Kapitel 1.3.1).

Inhibitoren können Enzyme nach verschiedenen Inhibitionsmodalitäten kompetitiv, nicht-kompetitiv oder unkompetitiv hemmen (Schema 1.1).¹⁰⁰



Schema 1.1 Schema des Enzym-Substrat-Umsatzes (E und S) zu dem Katalyseprodukt (P) unter dem Einfluss eines reversiblen Inhibitors (I).¹⁰⁰ K_S ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und K_i die des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Die Frequenz der Produktbildung wird durch k_{cat} beschrieben.

Inhibitoren können an das freie Enzym binden, oder auch an den Enzym-Substrat-Komplex, wobei die Affinität des Inhibitors zum Enzym-Substrat-Komplex nicht gleich groß wie zum freien Enzym ist. Daher wird für diesen Fall die Dissoziationskonstante K_i um den Faktor α modifiziert. Gleiches gilt für die Dissoziation des Substrates von ESI.

Mit dem Wissen über die Inhibitionsmodalität der Inhibitoren, der Substratkonzentration $[S]$ sowie der Michaelis-Menten-Konstante K_M ^b können die IC_{50} -Werte mittels der Gleichung von Cheng und Prusoff in K_i -Werte umgerechnet werden (Tabelle 1.1).¹⁰¹

^b Substratkonzentration, die zu halbmaximaler Enzymumsatzgeschwindigkeit führt.

Die Inhibitionsmodalität wird häufig durch das reziproke Auftragen der Substratkonzentration (x-Achse) gegen die reziproke Geschwindigkeit (y-Achse) im Lineweaver-Burk Diagramm durch die diagnostisch unterschiedlichen Schnittpunkte der Geraden sichtbar gemacht (kompetitive Inhibitoren: Schnittpunkt der Geraden liegt auf der y-Achse; nicht-kompetitive Inhibitoren: Schnittpunkt liegt nicht auf der y-Achse; unkompetitive Inhibitoren: kein Schnittpunkt, sondern parallele Geraden). In der Praxis sind die Schnittpunkte nicht immer eindeutig zuzuordnen, weshalb als zusätzliches Diagnostikum die Geschwindigkeits-/log[S]-Diagramme ([S] \triangleq Substratkonzentration), das Eadie-Hofstee-^c sowie das Hanes-Diagramm^d herangezogen werden können.^{100, 102}

Tabelle 1.1 Inhibitionsmodalitäten mit der dazugehörigen Cheng-Prusoff-Gleichung.

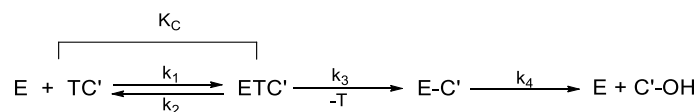
Inhibitionsmodalität	Inhibitor bindet an	Cheng-Prusoff-Gleichung
kompetitiv	freies Enzym	$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (1.1)$
nicht-kompetitiv	freies Enzym und Enzym-Substrat-Komplex	$K_i = IC_{50} \cdot \frac{K_M + \frac{[S]}{\alpha}}{K_M + [S]} \quad (1.2)$
unkompetitiv	Enzym-Substrat-Komplex	$K_i = \frac{IC_{50}}{\alpha \cdot \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right)} \quad (1.3)$

Neben der Möglichkeit der reversiblen Enzymhemmung können die Cholinesterasen durch Carbamatstrukturen, wie z.B. Rivastigmin **6**, pseudo-irreversibel gehemmt werden (Struktur s. Abb. 1.5). Die pseudo-irreversible Inhibition gliedert sich in drei Schritte (Schema 1.2): 1) Zuerst kommt es zur Anlagerung des Inhibitors bestehend aus dem Trägermolekül (T) und dem zu übertragenden Substituenten, der Carbamatgruppe (C').^{103, 104} Durch den K_C -Wert wird die Affinität von TC' für die Enzymbindetasche ausgedrückt. 2) Nachfolgend geschieht die Carbamoylierung, in der eine kovalente Bindung zwischen dem Serin des aktiven Zentrums und des Carbamates ausgebildet wird (E-C'). Das Trägermolekül verlässt die Enzymbindetasche. Die Übertragungsgeschwindigkeit des Carbamates wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_3 ausgedrückt und ist sehr viel schneller als die darauffolgende Decarbamoylierung. 3) Im letzten Schritt kommt es nämlich zur Hydrolyse des carbamoylierten Enzyms und somit zur Freisetzung des katalysefähigen Enzyms. Die Carbamidsäure

^c Aufgetragen wird $v/[S]$ (x-Achse) gegen v auf der y-Achse (v = gemessene Enzymumsatzgeschwindigkeit).

^d Aufgetragen wird $[S]$ auf der x-Achse und $[S]/v$ auf der y-Achse.

C'-OH verlässt die Enzymbindetasche. Dieser Vorgang wird auch durch die Decarbamoylierungskonstante k_4 ausgedrückt.



Schema 1.2 Schema der pseudo-irreversiblen Inhibition eines Enzyms E mittels eines Inhibitors bestehend aus einem Trägermolekül mit Carbamatsubstituenten TC'. Die Inhibition verläuft über die reversible Anlagerung von TC an E (ETC') hin zum carbamoylierten Enzym E-C'. Schema modifiziert und mit Genehmigung entnommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.

Aufgrund dieses komplexen zeitabhängigen Inhibitionsmechanismus' ist für pseudo-irreversible Inhibitoren die Angabe des IC₅₀-Wertes nicht präzise genug, da dieser eine Mischung aus Affinität, Übertragungsgeschwindigkeit und der Hemmung des irreversibel veränderten E-C'-Komplexes darstellt. Daher werden zur Beschreibung pseudo-irreversibler Inhibitoren die kinetischen Parameter K_C und k_3 angegeben.

Die Kenntnis über die strukturellen Merkmale des zu adressierenden Enzyms und das Wissen über die Liganden inklusive der Inhibitionsstärke kann in Dockingstudien synergetisch genutzt werden, um die Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor auf atomarer Ebene sichtbar zu machen, zu bewerten und zu untersuchen.

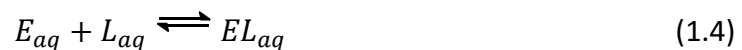
1.3 Dockingstudien

Mit der Durchführung von Dockingstudien können zwei Ziele verfolgt werden: Die Modellierung der Ligandenposition in der Bindetasche sowie die Vorhersage der Bindungsaffinität des Liganden.¹⁰⁵ Der Dockingprozess gliedert sich zum einen in den Suchalgorithmus, der den Konfigurations- und Konformationsraum absucht, um den Liganden möglichst optimal in der Bindetasche zu platzieren.¹⁰⁵ Danach schätzen Scoringfunktionen auf Grundlage der sterischen und chemischen Komplementarität von Ligand und Bindetasche die Affinität der generierten Ligandenposen ab und legen eine Rangfolge dieser fest.^{105, 106}

1.3.1 Scoringfunktionen

Scoringfunktionen nehmen verschiedene Funktionen wahr.¹⁰⁷ Darunter fällt 1) die Identifikation einer röntgenstrukturalen Pose ($\text{RMSD} \leq 2.0 \text{ \AA}$, Docking Power), 2) die Vorhersage der richtigen Affinitätsreihenfolge bekannter Liganden mit bekanntem Bindemodus (Ranking Power), 3) die Wiedergabe von Bindungsaffinitäten (Scoring Power) sowie 4) die Diskrimination zwischen tatsächlichen Liganden und zufällig ausgewählten Molekülen (Screening Power).¹⁰⁸ Nicht jede Scoringfunktion erfüllt diese Funktionen gleichermaßen, sodass abhängig von der Fragestellung eine geeignete Funktion ausgewählt werden muss.¹⁰⁷

Scoringfunktionen basieren auf mathematischen Modellen, die die Bindungsstärke (Affinität) eines Liganden (L) zu einem Enzym (E) abschätzen.¹⁰⁹ Ein nicht-kovalenter Ligand interagiert mit einem Enzym über folgende Gleichgewichtsreaktion:



Die Dissoziationskonstante K_d lässt sich über das Massenwirkungsgesetz formulieren:

$$K_d = \frac{[E_{aq}] \cdot [L_{aq}]}{[EL_{aq}]} \quad (1.5)$$

Durch Kenntnis der Bindungsstärke einer Protein-Ligand-Wechselwirkung kann die freie Bindungsenthalpie über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden:

$$\Delta G_{\text{Bindung}}^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 = R \cdot T \cdot \ln K_d \quad (1.6)$$

Gemäß Gleichung 1.6 setzt sich die Affinität eines Liganden aus der Enthalpie ΔH^0 und der Entropie ΔS^0 zusammen. Die freie Bindungsenthalpie ist auch mit der Dissoziationskonstante K_d verknüpft. Die Dissoziationskonstante kompetitiver Inhibitoren entspricht der Inhibitionskonstante K_i des entsprechenden Enzym-Inhibitor Komplexes.¹¹⁰ Aufgrund der direkten Beziehung zwischen der Bindungsenthalpie und der Dissoziationskonstante eines Protein-Ligand-Komplexes sind Scoringfunktionen oft darauf trainiert, K_i oder $\text{p}K_i$ -Werte wiederzugeben ($\text{p}K_i = -\log(K_i)$). Das Abschätzen ebendieser Werte geschieht nach drei verschiedenen Verfahren: kraftfeldbasiert, empirisch oder wissensbasiert.^{105, 109, 111}

An dieser Stelle soll anhand der in dieser Arbeit verwendeten Scoringfunktionen ein Überblick über die drei Klassen von Scoringfunktionen gegeben werden:

1. Kraftfeldbasierte Scoringfunktionen (z.B. GoldScore).^{112, 113} Kraftfeldbasierte Funktionen liegen empirische Parameter zugrunde, die aus physikalischen Messungen oder quantenmechanischen *ab initio* Rechnungen erhalten werden.¹¹⁰ Deshalb eignen sie sich gut für die korrekte Struktur- und Konformationsberechnung von Molekülen. Kraftfeldbasierte Funktionen berechnen den Score basierend auf nicht-kovalenten Termen der Molekülmechanik. Elektrostatische Protein-Ligand-Interaktionen werden durch ein Coulomb-Potential und Van-der-Waals-Wechselwirkungen durch ein Lennard-Jones-Potential beschrieben.

GoldScore berücksichtigt die interne Ligandenenergie, die durch einen Term für Wasserstoffbrücken innerhalb des Liganden und einen Term für die interne Ligandenspannung (Deformation) repräsentiert wird. Da kraftfeldbasierte Scoringfunktionen dazu neigen, polare Protein-Ligand-Interaktionen überzubewerten, enthält GoldScore einen empirisch ermittelten Van-der-Waals-Korrekturterm, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen stärker gewichtet werden.^{109, 110}

Der Vorteil der GoldScore Funktion liegt vor allem in der erfolgreichen Vorhersage des korrekten Bindemodus.¹¹³ Die Vorhersage des richtigen Bindemodus geschah für den Hartshorn-Testdatensatz (85 Komplexe) mit einer Erfolgsrate von 81%,¹¹⁴ 71% für den Original-Testdatensatz (100 Komplexe)¹¹³ sowie 72% für das „PDBbind core set“ v.2013 (195 Komplexe) und 88%, wenn die Top-3-Lösungen betrachtet werden.¹⁰⁸ Das „PDBbind core set“ ist ein sogenannter Benchmark Datensatz für die Evaluation von Docking und Scoringmethoden, dessen Daten aus der PDB extrahiert wurden. Es liegen Röntgenstrukturdaten sowie Bindungsaffinitäten (K_d , K_i , IC_{50}) der Inhibitoren vor.

2. Empirische Scoringfunktionen (z.B. ChemPLP)¹¹⁵ verwenden für die Beschreibung von Protein-Ligand Interaktionen unter anderem Terme für polare und apolare Interaktionen, Terme für Wasserstoffbrückenbindungen sowie Terme zur Beschreibung der Bindungsentropie.¹⁰⁹ Mittels multilinearer Regression werden Gewichtungsfaktoren für die einzelnen Beiträge anhand eines Trainingsdatensatzes an Protein-Ligand Komplexen berechnet, für welche sowohl Bindungsaffinitäten als auch 3D-Strukturen verfügbar sind. Der Unterschied empirischer Scoringfunktionen besteht in der Anzahl und der Art der verwendeten Terme, die die Energie der Ligandenbindung beschreiben. Aufgrund der Herleitung der Terme empirischer Scoringfunktionen auf Basis eines Trainingsdatensatzes zeigen diese Funktionen meist nur für zum Trainingsdatensatz ähnliche Liganden gute Ergebnisse hinsichtlich der Vorhersage der Affinität dieser Verbindungen.¹⁰⁹

Diverse Studien belegen, dass ChemPLP für die zuverlässige Vorhersage des richtigen Bindemodus verwendet werden kann: 87% für den „Astex diverse“-Testdatensatz (85 Komplexe),¹¹⁵ 77% für den CCDC/Astex-Testdatensatz (213 Komplexe),¹¹⁵ sowie 82% für das „PDBbind core set“ v.2013 (195 Komplexe) für die Top-Pose und 90% wenn die Top-3-Lösungen betrachtet werden.¹⁰⁸

3. Wissensbasierte Scoringfunktionen (z.B. ASP)¹¹⁶ basieren auf der Annahme, dass experimentell häufig beobachtete Atomabstände zwischen Protein und Ligand energetisch günstiger sind als selten beobachtete Zustände.¹¹⁷ Mittels des inversen Boltzmann-Gesetzes werden aus Röntgenstrukturen, die in Datenbanken wie der PDB oder CSD (Cambridge Structural Database) hinterlegt sind,^{5, 118, 119} Häufigkeitsverteilungen für intermolekulare Wechselwirkungen in Freie-Energie-Beiträge (potentials of mean force) übersetzt.¹¹⁷ Der Score ergibt sich aus der Summe aller Atompaar-Wechselwirkungen.^{109, 116}

Wissensbasierte Funktionen können ohne experimentelle Affinitätsdaten generiert werden und berücksichtigen Solvation und Entropie implizit, da diese beiden Effekte auch bei der Bildung der zugrundeliegenden Röntgenstrukturen eine Rolle spielen.¹⁰⁹ Gleichmaßen werden auch schwach polare Interaktionen (H- π , CH- π , Kation- π , CH-Halogen)⁵⁴ implizit berücksichtigt.

Astex Statistical Potential (ASP) eignet sich mit einer Erfolgsrate von 72/61% für 224/139 Komplexe des CCDC/Astex Validierungsdatensatzes,¹¹⁶ sowie einer Erfolgsrate von 73% für das „PDBbind core set“ v.2013 (195 Komplexe) für die zuverlässige Vorhersage des richtigen Bindemodus.¹⁰⁸

Hinsichtlich der Verwendung von Scoringfunktionen im Docking zur Bewertung der generierten Dockinglösungen taucht die Frage nach den Genauigkeitsgrenzen auf. Eine Fehleranalyse berechneter Protein-Ligand-Interaktionsenergien ergab einen linearen Zusammenhang zwischen dem Fehler der berechneten Bindungsenthalpie und der Anzahl möglicher Interaktionen im Komplex.¹²⁰ Diese Studie zeigt exemplarisch, dass die Affinitätsvorhersage mittels Scoringfunktionen schwierig ist, weswegen die Verbesserung in diesem Bereich derzeitiger Forschungsinhalt zur Optimierung von Scoringfunktionen ist.^{121, 122} Demgegenüber gelingt den vorgestellten wie auch anderen verfügbaren Scoringfunktionen die Vorhersage der Originalbindepote aus der Kristallstruktur (Pose Prediction) sehr viel besser.^{107, 123-125} Dies wurde unter anderem schon anhand der angegebenen Erfolgsraten ausgewählter Studien verdeutlicht.

Für die Entwicklung von Inhibitoren von Cholinesterasen wird zunächst eine Leitstruktur benötigt. Nach synthetischen Studien zur Darstellung dieser Verbindung und der enzymkinetischen Bestimmung folgt die rationale Weiterentwicklung. Hierfür ist die Kenntnis der Protein-Ligand-Interaktionen hilfreich, die auf Grundlage der Enzym-Röntgenstrukturen mittels Dockingstudien *in silico* untersucht werden kann. Im Docking werden Ligandenpositionen sowie bevorzugte Ligandenkonformationen in der Enzymbindetasche erzeugt, woraus ein Modell zur Bindemodivorhersage abgeleitet werden kann. Ein solches Modell kann dazu verwendet werden strukturelle Merkmale hochaffiner Inhibitoren abzuleiten,

wodurch die Entwicklung potentieller Inhibitorstrukturen zukünftig verbessert werden kann.

2. Zielsetzung

Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit ist das bessere Verständnis der Wechselwirkungen von Inhibitoren in der Cholinesterasebindetasche. Dieses Verständnis soll durch Dockingstudien, einer Methode zum Analysieren von Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym auf atomarer Ebene, erlangt werden. Durch synthetische Untersuchungen soll darüber hinaus die Grundlage für die Etablierung einer neuen Leitstruktur für Cholinesteraseinhibitoren gelegt werden.

Röntgenstrukturanalysen der Cholinesterasen haben die Grundlagen für *in silico* Untersuchungen der Wechselwirkungen von Inhibitoren dieser Enzyme gelegt. Der Fokus der Untersuchungen liegt auf der Entwicklung einer Dockingmethode zur Vorhersage eines bevorzugten Bindemodus von Inhibitoren und der daraus resultierenden Aufklärung der Protein-Ligand-Interaktion auf atomarer Ebene. Die Plausibilität des so entwickelten Dockingmodells kann anhand der Erklärung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen geprüft werden.

Anhand der zur Verfügung stehenden Datensätze sollten folgende Fragen adressiert werden:

- Für hochaffine aminsubstituierte AChE-selektive Chinazolin- und Chinazolinonverbindungen sind zwei bevorzugte Orientierungen in der Bindetasche denkbar. Der klassische Bindemodus mit dem Ligandengrundgerüst in der Nähe der katalytischen Triade (CAS) oder der „invertierte Bindemodus“ mit dem Aminsubstituenten in der CAS. Mittels Dockingstudien sollte geklärt werden, ob die Inhibitoren einen Bindemodus in der AChE bevorzugen. Anhand dieses Bindemodus sollten die Struktur-Affinitäts-Beziehungen erklärt werden.
- Photochrome Bis-Tacrinverbindungen zeigen einen unterschiedlichen Effekt an der AChE. Nur eines der beiden Konstitutionsisomere ist in der Lage die periphere Bindestelle (PAS) am Bindetascheneingang zu besetzen. Dies wurde durch das unterschiedliche Hemmvermögen der Amyloid- β Fibrillenbildung aufgeklärt. Für die beiden Konstitutionsisomere sollte zunächst ein plausibler Bindemodus in der AChE-Bindetasche identifiziert werden. Die Stabilität des Enzyms mit der jeweiligen Dockinglösung sollte anschließend mit molekulardynamischen Simulationen weiter untersucht werden.
- Carbamatsubstituierte Chinazolinverbindungen zeigen eine Selektivität für die BChE. Durch Dockingstudien sollte der bevorzugte Bindemodus identifiziert werden.

Die Carbamatverbindungen gehören zur Klasse der pseudo-irreversiblen Inhibitoren und zeigen eine zeitabhängige Hemmung der BChE. Diese ist auf verschiedene Interaktionszustände von Inhibitor und Enzym zurückzuführen, die auch simuliert werden können. Für das Erstellen einer Dockingmethode sollten drei Interaktionszustände auf deren Aussagekraft hin überprüft werden, bevor anhand eines Zustandes ein einheitliches Bindemodell erstellt werden sollte.

Zum Naturstoff Dehydroevodiamin (DHED) und davon abgeleiteten Derivaten sollten synthetische Studien erfolgen, um Chinazoliniumverbindungen als Leitstruktur für die Inhibitorentwicklung von Cholinesterasen zu etablieren.

- Der Naturstoff DHED sowie das Derivat (Benz-DHED) kann abhängig von den Reaktionsbedingungen in der Ring-geöffneten oder Ring-geschlossenen Form (als Chinazoliniumsalz) isoliert werden. Neben der Evaluation einer geeigneten Synthesemethode sollten Stabilitätsuntersuchungen sowie UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen bezüglich des Gleichgewichts der zwei isolierbaren Zustände erfolgen. Anhand dieser Studien soll herausgefunden werden, welche Form des Naturstoffes und des Derivates unter Assaybedingungen dominiert, so dass *in silico* Studien zur Erstellung eines Bindemodells durchgeführt werden können.

3. Dockingstudien von Chinazolin- und Chinazolinoninhibitoren in AChE

Chinazolinonverbindungen sind Bestandteile von Naturstoffen und gelten als „bevorzugte Strukturen“, da sie an den verschiedensten Targets wirken.¹²⁶⁻¹³⁰ So zeigt die Substanzklasse der Chinazolinone Aktivität gegen Tumore,¹³¹ Malaria,¹³² Diabetes,¹³³ Entzündungen¹³⁴ und Bluthochdruck.¹³⁵ Ferner wirken derartige Verbindungen krampflösend¹³⁶ und antimikrobiell¹³⁷ und als Inhibitoren unter anderem von Kinasen¹³⁸ und Cholinesterasen.¹³⁹

Unsubstituierte trizyklische Chinazolinone können AChE im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich inhibieren ($IC_{50} = 38.6 - 279 \mu M$, Abb. 3.1).¹⁴⁰ Diese Verbindungen stellen daher einen Ausgangspunkt für die Strukturoptimierung hinsichtlich einer verbesserten Inhibition von AChE dar. Durch die Einführung einer Hydroxyfunktion in *para*-Position zum C=N-Stickstoffatom und Verknüpfung der phenolischen Teilstruktur über einen Propyl-Linker mit einem tertiären Amin ergeben sich die Inhibitoren **10a**, **11a** und **12a** die eine bessere Inhibition im nanomolaren Bereich aufweisen ($IC_{50} = 33.3 - 69.2 \text{ nM}$).

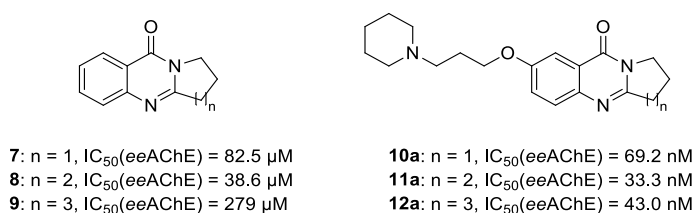


Abbildung 3.1 Vergleich der IC_{50} -Werte zur Hemmung der AChE von unsubstituierten Chinazolinonen Deoxyvasicinon **7**, Mackinazolinon **8** und der Verbindung mit siebengliedrigem Alizyklus **9** zu den analogen piperidiny substituierten Chinazolinonverbindungen **10a-12a**, welche Inhibitoren mit nanomolarer Affinität darstellen.¹⁴⁰ Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

Deoxyvasicinon **7** zeigt einen IC_{50} -Wert von $82.5 \mu M$ und die piperidinypropoxy-substituierte Verbindung **10a** eine um den Faktor 1200 bessere Inhibition von 69.2 nM (Abb. 3.1). Auch für Mackinazolinon **8** und das Chinazolinon mit ankondensiertem siebengliedrigem Ring **9** zeigen die substituierten Verbindungen **11a** und **12a** eine um den Faktor 1200 und 6500 verbesserte Inhibition.

Für die Bindung amins substituiertes Chinazolinone und Chinazoline werden zwei bevorzugte Orientierungsmöglichkeiten in der AChE-Bindetasche diskutiert: Im klassischen Binde-modus wird angenommen, dass sich der Chinazolinonheterozyklus (das Ligandengrundgerüst) in der Nähe der katalytisch aktiven Stelle (CAS) befindet und das Amin zum Bindeta-

scheneingang zeigt (Abb. 3.2). Dieser Bindemodus wird für unsubstituierte Chinazolinonverbindungen angenommen. Andererseits können aminsubstituierte Verbindungen auch mit der Aminfunktion in der Nähe der CAS platziert sein, sodass der Chinazolinonheterozyklus zum Bindetascheneingang hin orientiert ist. Dieser Bindemodus wird „invertiert“ genannt.

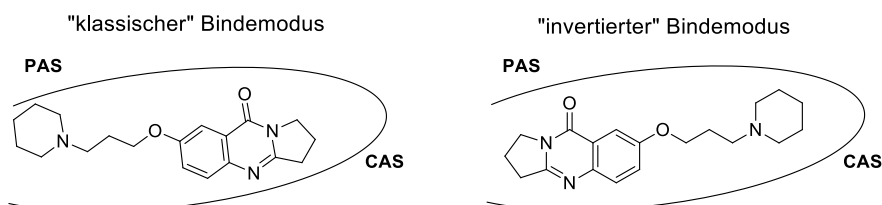


Abbildung 3.2 Schematische Gegenüberstellung des „klassischen“ und „invertierten“ Bindemodus in der AChE-Bindetasche (PAS = periphere anionische Stelle; CAS = katalytisch aktive Stelle).

Durch Dockingstudien sollte der bevorzugte Bindemodus aufgeklärt werden. Die Qualitäten des *in silico* Modells sollten durch die Erklärung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bewertet werden. Für die Dockingstudien wurde auf einen Datensatz von 44 Chinazolinon- und 10 Chinazolinverbindungen, bestehend aus chiralen (mit hydrierter C=N-Doppelbindung) sowie achiralen Strukturen, zurückgegriffen.

Zunächst werden in Kapitel 3.1.1 die achiralen Chinazolinone eingeführt. Danach folgt in Kapitel 3.1.2 eine Übersicht der chiralen Chinazolinone sowie chiraler und achiraler Chinazolinverbindungen.

3.1 Chinazolinone- und Chinazolininhibitoren

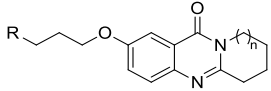
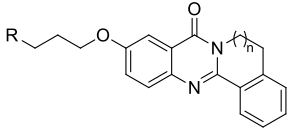








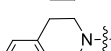
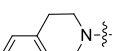










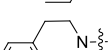
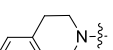










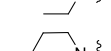
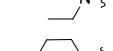




3.1.1 Achirale Chinazolinone als AChE-Inhibitoren

Die Synthese und Ermittlung der IC_{50} -Werte der Chinazolinonverbindungen an AChE erfolgte von Dr. Fouad H. Darras an der Universität Regensburg.

Die vorliegende Substanzbibliothek enthält 38 tri- und tetrazyklische Chinazolinonverbindungen, welche mit gesättigten Aminen (Pyrrolidin, Piperidin, Azepan, *N,N*-Diethylamin) sowie Imidazol und 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin als ungesättigte Amine über einen Propyl-Linker an der Hydroxyfunktion des Heterozyklus verknüpft sind (Tabelle 3.1).¹⁴¹ Anhand dieser Verbindungen sollte untersucht werden, ob die Inhibition durch unterschiedliche Aminsubstituenten moduliert werden kann. Durch die Variation der ankondensierten alizyklischen Ringe im Ligandengrundgerüst sollte ferner der sterische Einfluss dieser Komponente auf die Inhibition getestet werden.

Der Propyl-Linker wurde gewählt, weil Verbindung **10a** im Vergleich zu Verbindung **10g** mit Hexyl-Linker eine fast 6-fach bessere Inhibition zeigt ($IC_{50} = 69.2$ nM (**10a**), 390 nM (**10g**)).

Tabelle 3.1 Inhibitionsdaten tetra- und trizyklischer Chinazolinonverbindungen Für die pIC_{50} -Werte ist die mittlere Standardabweichung SEM angegeben. Alle Inhibitionsdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Tabelle modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

							
Nr.	n	R	IC_{50} (eAChE) [nM] ($pIC_{50} \pm SEM$)	Nr.	n	R	IC_{50} (eAChE) [nM] ($pIC_{50} \pm SEM$)
Tacrin	-	-	24.1 (7.62 ± 0.08)	-	-	-	-
10a	0		69.2 (7.16 ± 0.15)	13a	0		6.90 (8.16 ± 0.03)
10b	0		50.2 (7.30 ± 0.07)	13b	0		5.00 (8.31 ± 0.07)
10c	0		50.0 (7.30 ± 0.07)	13c	0		16.2 (7.79 ± 0.03)
10d	0		101 (7.00 ± 0.06)	13d	0		11.0 (7.96 ± 0.04)
10e	0		868 (6.06 ± 0.07)	13e	0		227 (6.64 ± 0.05)
10f	0		$1.9 \cdot 10^3$ (5.72 ± 0.02)	13f	0		454 (6.34 ± 0.01)
11a	1		33.3 (7.48 ± 0.05)	14a	1		5.50 (8.26 ± 0.07)
11b	1		58.5 (7.23 ± 0.03)	14b	1		13.0 (7.89 ± 0.13)
11c	1		210 (6.68 ± 0.06)	14c	1		91.1 (7.04 ± 0.03)
11d	1		43.0 (7.37 ± 0.04)	14d	1		47.5 (7.32 ± 0.05)
11e	1		723 (6.14 ± 0.04)	14e	1		625 (6.20 ± 0.04)
11f	1		$4.2 \cdot 10^3$ (5.37 ± 0.01)	14f	1		$2.4 \cdot 10^3$ (5.61 ± 0.10)
12a	2		43.0 (7.37 ± 0.06)	15a	2		57.1 (7.24 ± 0.02)
12b	2		39.2 (7.41 ± 0.03)	15b	2		53.4 (7.27 ± 0.04)
12c	2		295 (6.53 ± 0.05)	15c	2		529 (6.28 ± 0.05)
12d	2		50.6 (7.30 ± 0.07)	15d	2		72.1 (7.14 ± 0.05)
12e	2		653 nM (6.19 ± 0.03)	15e	2		$1.2 \cdot 10^3$ (5.93 ± 0.02)
12f	2		$4.0 \cdot 10^3$ (5.40 ± 0.05)	15f	2		$10 \cdot 10^3$ (4.99 ± 0.02)
10g	0		390 (6.41 ± 0.05)	13h	0		34% Inhibition bei 50 µM

Insgesamt zeigen die tetrazyklischen Chinazolinone **13** – **15** an AChE eine bessere Inhibition als trizyklische Chinazolinone **10** – **12** (s. Tabelle 3.1). Lediglich für $n = 2$ weisen die trizyklischen Chinazolinone eine leicht höhere Aktivität auf (s. auch Tabelle 10.2 für eine verkürzte Darstellung).

Auch der Amins substituent moduliert die AChE-Inhibition, wobei diese ganz offensichtlich größenabhängig ist: Piperidin- und Azepanverbindungen (\emptyset -IC₅₀(**10a** – **15a**) = 35.8 nM, bzw. \emptyset -IC₅₀(**10b** – **15b**) = 36.6 nM) zeigen gegenüber den *N,N*-Diethylamin- (\emptyset -IC₅₀ (**10d** – **15d**) = 54.2 nM) und Pyrrolidinverbindungen (\emptyset -IC₅₀ (**10c** – **15c**) = 198.6 nM) eine verbesserte Inhibition. Generell stellen die Piperidin- (IC₅₀ = 5.50 – 69.2 nM) und Azepanverbindungen (IC₅₀ = 5.00 – 58.5 nM) die aktivste Verbindungsklasse dar. Demgegenüber weisen ungesättigte Aminverbindungen einen Abfall in der Inhibition auf: Tetrahydroisochinolinverbindungen **10e** – **15e** zeigen IC₅₀-Werte zwischen 227 – 1.2·10³ nM (\emptyset = 716 nM) wohingegen Imidazolverbindungen **10f** – **15f** IC₅₀-Werte zwischen 450 – 1·10⁴ nM zeigen (\emptyset = 3.8·10³ nM).

Für die vorliegenden Inhibitoren zeigt sich die Abhängigkeit des IC₅₀-Wertes sowohl vom Chinazolinongrundgerüst als auch vom Amins substituenten.

Aufgrund der Modulation des IC₅₀-Wertes durch den Amins substituenten wurde die Hypothese aufgestellt, dass der invertierte Bindemodus für Chinazolinonverbindungen bevorzugt ist. Um diese Hypothese von synthetischer Seite zu stützen, wurde die Cyclohexylverbindung **13h** analog zur Piperidinverbindung **13a** hergestellt. Erwartungsgemäß zeigte Verbindung **13h** mit 35% Inhibition bei 50 µM eine signifikant schwächere Aktivität gegenüber der Verbindung **13a** (IC₅₀ = 6.90 nM). Aufgrund dieses Experimentes und der hohen Aktivität wurden die piperidiny substituierten Inhibitoren (**10a**, **11a**, **12a**, **13a**, **14a** und **15a**) als Testdatensatz zur Validierung der Dockingeinstellungen ausgewählt (s. Kapitel 3.2.4 und 3.2.7).

3.1.2 Chirale Chinazolinderivate und Chinazolinone als AChE-Inhibitoren

Die Synthese und Messung der IC₅₀-Werte der nachfolgend gezeigten Chinazolin- und Chinazolinonverbindungen erfolgte ebenfalls von Dr. Fouad H. Darras in Regensburg.¹⁴² Die Substanzbibliothek umfasst 16 Verbindungen, darunter sechs chirale Chinazolinon-, acht chirale Chinazolinverbindungen mit hydrierter C=N-Doppelbindung, sowie zwei achirale Chinazolinverbindungen (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Chirale tetra- und trizyklische Chinazolinon- und Chinazolinverbindungen mit den Inhibitionsdaten an *ee*AChE. Für die pIC_{50} -Werte ist die mittlere Standardabweichung SEM angegeben. Tabelle modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras *et al.*¹⁴² © 2014 American Chemical Society.

Gruppe	Nr.	Struktur	IC_{50} (<i>ee</i> AChE) [nM] ($pIC_{50} \pm SEM$)
I	16a		550 (6.26 ± 0.08)
	16b		250 (6.61 ± 0.10)
	16c		720 (6.14 ± 0.03)
	16g		230 (6.64 ± 0.16)
II	17a		530 (6.28 ± 0.04)
	17b		$6.8 \cdot 10^3$ (5.17 ± 0.06)
	17c		$20 \cdot 10^3$ (4.70 ± 0.27)
	17g		570 (6.24 ± 0.04)
III	18a		$6.9 \cdot 10^3$ (5.16 ± 0.12)
	18g		$3.3 \cdot 10^3$ (5.48 ± 0.14)
IV	19a		510 (6.29 ± 0.09)
	19b		$4.8 \cdot 10^3$ (5.32 ± 0.07)
	19c		$8.9 \cdot 10^3$ (5.05 ± 0.09)
	19g		400 (6.40 ± 0.04)
V	20a		66.5 (7.18 ± 0.05)
	20g		88.4 (7.05 ± 0.05)

Alle Inhibitionsdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Bezüglich des heterozyklischen Ligandengrundgerüsts können die Verbindungen in vier Gruppen eingeteilt werden: Gruppe **I** umfasst chirale tetrazyklische Chinazolinonverbindungen mit einer Methylgruppe am Stickstoffatom (IUPAC-Name des Ligandengrundgerüsts: 13-Methyl-13,13a-dihydro-5*H*-isoquinolino[1,2-*b*]chinazolin-8(6*H*)-on). Gruppe **II** enthält die entsprechenden Chinazolinverbindungen (13-Methyl-6,8,13,13a-tetrahydro-5*H*-isoquinolino[1,2-*b*]chinazolin). Gruppe **III** und **IV** umfassen trizyklische Chinazolinon- und Chinazolinverbindungen mit NH-Funktionalität in *para*-Position zur Carbonylfunktion (2,3,3a,4-tetrahydropyrrolo[2,1-*b*]chinazolin-9(1*H*)-on und 1,2,3,3a,4,9-hexahydropyrrolo[2,1-*b*]chinazolin). Gruppe **V** repräsentiert trizyklische Chinazoline mit einer C=N-Doppelbindung (1,2,3,9-tetrahydropyrrolo[2,1-*b*]chinazolin). Die dazu korrespondierenden Chinazolinone sind die Verbindungen **10a** und **10g** (Tabelle 3.1). In Gruppe **III** und **IV** fungiert das Stickstoffatom in *para*-Position zur Carbonylfunktion als Wasserstoffbrücken-Donor und bei Gruppe **V** als Wasserstoffbrücken-Akzeptor.

Die Daten zur Inhibition von AChE zeigen, dass Verbindungen mit Piperidiny substituent die aktivste Verbindungsklasse darstellen. Die aktivsten Verbindungen **20a** und **20g** zeigen IC₅₀-Werte von 66.5 und 88.4 nM. Die Inhibitionswerte der übrigen Piperidinverbindungen liegen zwischen 230 und 570 nM. Lediglich die piperidiny substituierten trizyklischen Verbindungen **18g** und **18a** weisen schwächere IC₅₀-Werte von $3.3 \cdot 10^3$ und $6.9 \cdot 10^3$ nM auf.

Die Azepan- und Pyrrolidinverbindungen sind mit Ausnahme des Azepans **16b** (IC₅₀ = 250 nM) und des Pyrrolidins **16c** (IC₅₀ = 720 nM) die am wenigsten aktive Klasse und zeigen eine Inhibition im ein- bis zweistellig mikromolaren Bereich (IC₅₀ = 4.8 – 20 μM).

Bei den tetrazyklischen Verbindungen **16a/17a** hat das Entfernen der Carbonylgruppe keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität (IC₅₀ = 550 bzw. 530 nM). Die trizyklischen Liganden zeigen nach Reduktion der Carbonylgruppe (**18a** vs. **19a** und **18g** vs. **19g**) einen Aktivitätsgewinn um den Faktor 14 bzw. 8. Für die trizyklischen Verbindungen **10a** (Tabelle 3.1) und **20a** hingegen führt die Reduktion der Carbonylgruppe zu keiner Modulation der AChE-Inhibition (IC₅₀ = 69.2 nM (**10a**) und 66.5 nM (**20a**)). Demgegenüber verlieren die trizyklischen Verbindungen ihre nanomolare Aktivität (IC₅₀ = 66.5 nM (**20a**)), wenn die C=N-Doppelbindung zu einer NH-Funktionalität reduziert wird und somit einen Wasserstoffbrücken-Donor darstellt (IC₅₀ = 510 nM (**19a**)).

Insgesamt zeigt das trizyklische Chinazolin **20a** mit einer C=N-Doppelbindung im Vergleich zur trizyklischen Chinazolinonverbindung **18a** und der entsprechenden Verbindung ohne Carbonylgruppe **19a** eine um den Faktor 104 und ca. 8 verbesserte Aktivität und stellt die aktivste Verbindung dieses Datensatzes dar. Zudem stellt Verbindung **20a** einen Antagonisten des Histamin-H₃-Rezeptors (H₃R) dar und wurde bereits *in vivo* an Ratten getestet.¹⁴³ Nach der AChE-Inhibitorgabe wurde das verbesserte Abrufen von Erinnerungen, nach chemisch induzierter Gedächtnisstörung, festgestellt.

Die enzymkinetischen Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, dass achirale Verbindungen mit einem Wasserstoffbrücken-Akzeptor im Ligandengrundgerüst vermutlich aufgrund ihrer Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Vergleich zu Liganden ohne diese Strukturmerkmale affinere Inhibitoren der AChE darstellen.

Im Folgenden wird beschrieben, wie auf Grundlage dieser hochaffinen Inhibitoren von AChE ein Dockingmodell zur Beschreibung des bevorzugten Bindemodus entwickelt wurde. Dazu erfolgt zunächst eine methodische Einführung, bevor Dockingstudien eines ausgewählten Testdatensatzes der Chinazolinonverbindungen vorgestellt werden.

3.2 Test und Optimierung der Dockingmethode

Alle in dieser Arbeit präsentierten Dockingstudien wurden mit dem Programm GOLD^e (**G**enetic **O**ptimisation for **L**igand **D**ocking) der Versionen 5.1, 5.2 und 5.2.2 durchgeführt.^{112, 113, 144} Diesem Dockingprogramm liegt der genetische Algorithmus (GA) zugrunde, welcher auf Annahmen aus der Evolutionstheorie beruht.¹¹² Zunächst wird eine Population an Ligandenindividuen generiert.¹⁰⁹ Jedes Individuum wird gekennzeichnet durch Gene wie Torsions- und Rotationswinkel und darüber hinaus durch die Wasserstoffbrückenkomplementarität.¹¹² Letztere wird in der sog. „Mapping-Phase“ optimiert, in der Wasserstoffbrückenbereiche des Liganden entsprechenden Proteinbereichen zugeordnet werden. Basierend auf den Protein-Ligand-Interaktionen wird jedem Individuum ein Fitnessscore zugewiesen.¹⁰⁹ Das Ausführen genetischer Operationen (Crossover und Mutation) erschafft Individuen der Folgegeneration, welche ebenfalls einen Fitnessscore erhalten. Im Sinne des Evolutionsdrucks werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Individuen mit einem relativ guten Fitnessscore, also einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit, für den Aufbau der Folgegeneration herangezogen. Über die Zeit soll sich die Population so der optimalen Lösung, also dem korrekten Bindemodus, annähern.

Der Algorithmus in GOLD ist ein stochastisches Suchverfahren. Für die Interpretation der Dockinglösungen bedeutet dies: Je häufiger ein strukturell ähnlicher Bindemodus gefunden wird, desto wahrscheinlicher stellt diese Ligandenpositionierung ein globales Minimum und damit eine realistische Bindepose dar. Der Ähnlichkeitsvergleich der Dockinglösungen wird

^e In diesem Kapitel: Redocking mit GOLD v.5.1; Dockingstudie der in Tabelle 3.1 und 3.2 gezeigten Liganden mit GOLD v.5.2.

durch ein sogenanntes Clustering vorgenommen, bei dem strukturell ähnliche Posen in Clustern zusammengefasst werden. Die Clusteranzahl (möglichst wenige Cluster) und die Anzahl Posen pro Cluster (möglichst hoch) sind daher Kriterien für die Beurteilung der Konvergenz eines Dockings.

Für die Dockingstudien wurde das sogenannte semiflexible Docking angewandt, bei dem das Protein starr und der Ligand flexibel ist. Die Ligandenflexibilität beschränkt sich dabei auf Rotationen um Einfachbindungen, die auf den aus der „Cambridge Structural Database“ (CSD)^f stammenden Torsionsverteilungen beruhen.¹¹⁹ Konformationsänderungen von Ringssystemen werden nicht berücksichtigt.

Das Programm GOLD zeigt sehr gute Leistungen in der Vorhersage eines röntgenstrukturnahen Bindemodus und wurde daher für die Dockingstudien ausgewählt.^{107, 108, 145} So befand sich das Programm GOLD mit drei Scoringfunktionen unter den besten acht von 16 getesteten Programm/Scoringfunktion-Kombinationen, hinsichtlich der Auffindung röntgenstrukturnaher Posen von einem Datensatz, der 195 Komplexe umfasst („PDBbind core sets“ v.2007^g).¹⁰⁷ Für den neueren Datensatz, das PDBbind core sets v.2013, ebenfalls 195 Komplexe, wurden alle vier GOLD/Scoringfunktionskombinationen unter den besten sechs von 21 getesteten Kombinationen platziert.^{108, 145}

Im Folgenden wird die Aufbereitung der Proteinstruktur und Erzeugung der Ligandenstrukturen beschrieben (Kapitel 3.2.1). Danach werden Einstellungen, die für das Docking, also die Platzierung eines Liganden in der Enzymbindetasche, getroffen wurden, erläutert (Kapitel 3.2.2). Daran schließt sich die Evaluation einer geeigneten Scoringfunktion durch die Durchführung eines sogenannten Redockings an (Kapitel 3.2.3).

3.2.1 Protein- und Ligandenaufbereitung

Zunächst wurde die ausgewählte Röntgenstruktur aus der Protein Datenbank (PDB) extrahiert. Danach erfolgte die Aufbereitung des Proteins mit der jeweils aktuellsten Version von MOE (Molecular Operating Environment),¹⁴⁶ indem Wassermoleküle und Liganden der jeweiligen Röntgenstruktur entfernt wurden. Das Protein wurde, sofern nicht anders angegeben, bei pH 8 mit Protonate 3D in MOE protoniert. Die Protonierung des Histidins der katalytischen Triade erfolgte am N δ -Atom, um die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Glutamat zu gewährleisten. Die Proteinstruktur wurde mit der Option „Structure Prepara-

^f Datenbank bestehend aus ca. 800'000 hoch aufgelöster Röntgen- und Neutronenkristallographie-strukturen kleiner organischer und Metallorganischer Verbindungen.

^g Benchmark Datensatz für die Evaluation von Docking und Scoringmethoden extrahiert aus der PDB. Es liegen Röntgenstrukturdaten sowie Bindungsaffinitäten (K_d , K_i , IC_{50}) vor.

tion“ korrigiert, indem fehlende Atome automatisch hinzugefügt und die Atomposition sowie -orientierung präzisiert wurde (Kraftfeld: MMFF94x). Die so aufbereitete Röntgenstruktur wurde für das Docking mit GOLD verwendet.





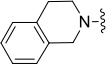

Ligandenstrukturen wurden im Programm MOE aufgebaut oder aus der entsprechenden PDB-Datei extrahiert. Die Protonierung der Liganden erfolgte ebenfalls bei pH 8. Der protonierte Ligand wurde vor dem Docking mit dem Kraftfeld MMFF94x unter Verwendung eines RMS-Gradienten von 0.001 kcal/mol·Å energieminimiert.

3.2.1.1 Protonierungszustand der Chinazolin- und Chinazolinonliganden

Für die Dockingstudien wurden alle Liganden gemäß der berechneten pK_a -Werte so protoniert, wie sie bei einem pH-Wert von 8 (entsprechend den Bedingungen des Ellman-Assay) überwiegend vorliegen. Tabelle 3.3 fasst die mit dem Programm MoKa v.2.0.1 berechneten pK_a -Werte zusammen.¹⁴⁷ Das Programm basiert auf ca. 25'000 experimentellen pK_a -Werten und nutzt einen wissensbasierten Ansatz zur Berechnung von pK_a -Werten. Die Berechnung beruht auf atomaren Deskriptoren, welche die chemische Umgebung der ionisierbaren Gruppe bzw. des Atoms in einem Raster (engl. Grid) beschreiben. Als Gütekriterium wird bei der pK_a -Wert-Berechnung die Standardabweichung angegeben. Diese liegt für die hier untersuchten Verbindungen zwischen 0.37 und 0.58 pK_a -Einheiten.

Die berechneten pK_a -Werte sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt, wobei ersichtlich wird, dass die Basizität des Amins nicht durch das Ligandengrundgerüst beeinflusst wird. Für alle gleich substituierten Verbindungen (z.B. die Piperidinverbindungen **10a** – **20a**) wurde der gleiche pK_a -Wert berechnet.

Tabelle 3.3 Mit MoKa berechnete pK_a -Werte der tertiären Amine.

Verbindung	Substituent	pK_a -Wert
10a, 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 16a, 17a, 18a, 19a, 20a		9.71
10b, 11b, 12b, 13b, 14b, 15b, 16b, 17b, 19b		9.58
10c, 11c, 12c, 13c, 14c, 15c, 16c, 17c, 19c		9.84
10d, 11d, 12d, 13d, 14d, 15d		9.84
10e, 11e, 12e, 13e, 14e, 15e		8.68
10f, 11f, 12f, 13f, 14f, 15f		7.07

Die berechneten pK_a -Werte erscheinen auch vor dem Hintergrund der in klassischen Lehrbüchern angegebenen pK_a -Werte für Piperidin (11.1), Pyrrolidin (11.3), Diethylamin (10.8) sowie Imidazol (7.0) plausibel.¹⁴⁸

Pyrrolidine und *N,N*-Diethylamine sind mit einem pK_a -Wert von 9.84 die am stärksten basischen Substituenten, gefolgt von Piperidin und Azepan. Für Imidazolverbindungen berechnet sich ein pK_a -Wert von 7.07. Unter Assaybedingungen liegen die Verbindungen demnach zu 89% neutral vor, weshalb die neutrale Form auch im Docking verwendet wurde. Für die Verbindungen **10g**, **16g**, **17g**, **18g**, **19g** und **20g** mit Hexyl-Linker wurde ein leicht höherer pK_a -Wert von 10.13 im Vergleich zu 9.71 für die Propyl-Linker Verbindungen **10a**, **16a**, **17a**, **18a**, **19a** und **20a** berechnet.

Bei den trizyklischen Inhibitoren **20a** und **20g** liegt das Ligandengrundgerüst unter den Assaybedingungen ebenfalls protoniert vor ($pK_a = 10.72$, Abb. 3.3). Auch das trizyklische Grundgerüst von Verbindung **19a-c** und **19g** liegt mit einem pK_a -Wert von 8.73 für N^3 zu 84% doppelt protoniert vor.

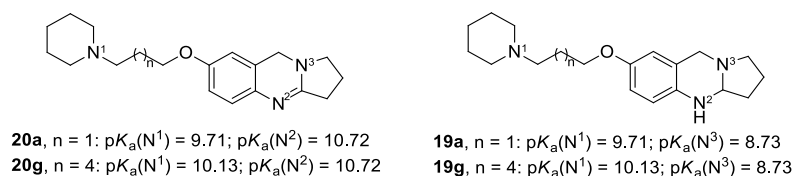


Abbildung 3.3 Berechnete pK_a -Werte trizyklischer Chinazoline **20a**, **20g** sowie der Hexapyrrolochinazoline **19a** und **19g**.

3.2.2 Allgemeine Dockingeinstellungen

Während des Dockings wurden, sofern nicht anders angegeben, 50 Posen generiert. Ein Parameter, mit dessen Erhöhung sich die Suchdauer verlängert, wodurch eine bessere Konvergenz der Dockinglösungen erhalten werden kann, ist die Operationenzahl (engl. Number of Operations). Ein konvergiertes Docking bedeutet, dass möglichst viele strukturell und energetisch ähnliche Dockinglösungen erzeugt werden. Die Berechnung der strukturellen Ähnlichkeit zweier Dockinglösungen erfolgt über den Vergleich der Atomkoordinaten dieser Posen. Berechnet wird die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung dieser Koordinaten, kurz der RMSD-Wert (root-mean-square-deviation). Die Berechnung kann in GOLD oder mit dem Programm fconv erfolgen.¹⁴⁹ Der Wert bezieht sich ausschließlich auf die schweren Atome, also alle Atome außer den Wasserstoffatomen, der zu vergleichenden Posen.

Der Suchraum, der im Docking-Prozess für die Ligandenplatzierung herangezogen wird, wurde auf die bindetaschenformenden Aminosäuren eingegrenzt:

Für die **hAChE** Struktur sind dies: Tyr72, Asp74, Trp86, Asn87, Gly120, Gly121, Tyr124, Ser125, Gly126, Ala127, Tyr133, Glu202, Ser203, Trp236, Trp286, Phe295, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, Tyr341, His447, Gly448 und Tyr449.

Für die **TcAChE** Struktur: Tyr70, Asp72, Trp84, Asn85, Gly117, Gly118, Gly119, Tyr121, Glu199, Ser200, Trp279, Phe288, Phe290, Glu327, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432, Met436, Ile439, His440 und Tyr442.

Die für Dockingstudien ausgewählten Röntgenstrukturen zeigen eine hohe Sequenzidentität zur Enzymisoform *eeAChE*, welche für die Ermittlung der IC_{50} -Werte im Ellman-Assay verwendet wurde (s. Tabelle 10.1 im Anhang).

Im Anhang (s. Kapitel 10.6) befindet sich eine tabellarische Übersicht aller Dockingeinstellungen die für die Posengenerierung der in Kapitel 3, 4 und 6 besprochenen Verbindungen verwendet wurden.

3.2.3 Redockingergebnisse zur Auswahl einer Scoringfunktion

Für jede Dockingfragestellung muss zunächst eine geeignete der vier vorhandenen Scoringfunktionen in GOLD identifiziert werden. Die Funktionenauswahl geschieht mittels eines sogenannten Redockings. Dabei wird ein bereits kristallisierter Ligand einer Röntgenstruktur aus seiner Bindetasche entfernt und durch Docking wieder in dieser platziert. Mittels dieses Vorgehens soll eine Scoringfunktion identifiziert werden, welche eine röntgenstrukturnahe Pose auf den Top-Rängen identifiziert, diese also entsprechend gut bewertet. Eine röntgenstrukturnahe Pose wird identifiziert, indem die Atomkoordinaten der Original- mit der gedockten Pose verglichen werden. Die Angabe über die Ähnlichkeit dieser Verbindungen erfolgt durch die Angabe des RMSD. Als röntgenstrukturnah gelten Posen mit einem RMSD $<2.0 \text{ \AA}$. Die Posen können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in Cluster eingeteilt werden. Das Clustering erfolgte nach der hierarchischen Clustermethode mit einem Grenzwert von 1.5 \AA unter Verwendung des „Complete-Linkage“ Fusionierungsalgorithmus. Für die vorgestellten Studien wurde ein Clustergrenzwert von 1.5 \AA für den Erhalt einer feineren Ergebnisdarstellung gewählt.

Durch das Redocking soll eine Scoringfunktion identifiziert werden, welche in der Lage ist röntgenstrukturnahe Posen zu generieren. Um die Übertragbarkeit auf das zu untersuchende Problem, also in diesem Fall die Platzierung der Chinazolinon und Chinazolinliganden in der AChE-Bindetasche zu gewährleisten, wird das Redocking mit möglichst ähnlichen Liganden mit den vier verschiedenen Scoringfunktionen des Programmes GOLD durchgeführt.¹⁴⁴ Die Ligandenauswahl erfolgte hinsichtlich der Ähnlichkeit zu den hier zu

untersuchenden Verbindungen über die Anzahl der rotierbaren Bindungen (5 – 8), das Molekulargewicht (301.43 – 451.56 g/mol) sowie die Heteroatomanzahl (4 – 6), wobei Röntgenstrukturen der *hAChE* und *TcAChE* berücksichtigt wurden. Die Wahl fiel auf: Huperzin A (**21**, PDB-ID: 4EY5, *hAChE*; Tabelle 3.4),^{150, 151} *R*-Donepezil (**4**, PDB-ID: 1EVE, *TcAChE* und 4EY7, *hAChE*)^{72, 151} sowie das Galanthaminderivat **22** (PDB-ID: 1W4L, *TcAChE*).⁷³ Diese Liganden zeigen nanomolare Inhibition von AChE (**21**, $IC_{50}(\text{ratAChE}) = 82 \text{ nM}$;¹⁵² **4** als Racemat, $IC_{50}(\text{ratAChE}) = 5.7 \text{ nM}$;¹⁵³ und das Galanthamin-derivat **22**, $IC_{50}(\text{TcAChE}) = 4.0 \text{ nM}$).⁷³ Die Ligandenstrukturen sind in ihrem für das Docking verwendeten Protonierungszustand in Tabelle 3.4 abgebildet.

Das Redocking erfolgte zunächst mit der voreingestellten Operationenzahl von 100'000 sowie mit der Erhöhung auf 500'000. Diese Erhöhung der Suchdauer ist vor allem für Liganden mit vielen Freiheitsgraden das Mittel der Wahl, um die Anzahl strukturell ähnlicher Posen zu vergrößern (s. dazu auch Kapitel 4).

Ein Redocking wird zum einen hinsichtlich der Top-Pose ausgewertet und dazu der Score, der RMSD-Wert zur Originalpose aus der Röntgenstruktur sowie die Clustergröße angegeben. Zum anderen wird die zur Originalpose ähnlichste Pose über den RMSD-Wert ausgewählt und dazu der Score, sowie der von der Scoringfunktion zugewiesene Rang dieser Pose angegeben. Ferner wird verglichen, ob die Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose im gleichen Cluster wie die Top-Pose liegt.

Das Kriterium für die Auswahl einer geeigneten Scoringfunktion ist neben einer zur Originalpose strukturell ähnlichen Top-Pose (Pose mit der besten Bewertung der Scoringfunktion; $RMSD < 2.0 \text{ \AA}$) auch die gute Bewertung (kleine Ränge 1-10) der Pose mit dem geringsten RMSD zur Originalpose.

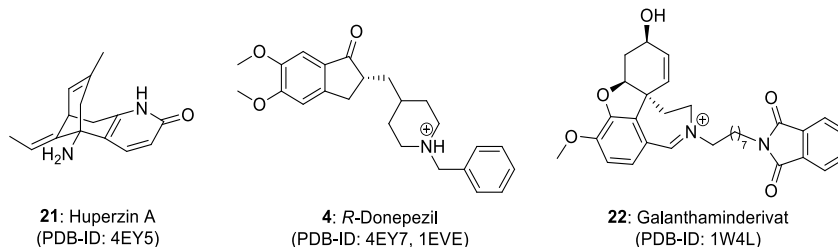
Die Redockinglösungen sind nachfolgend tabellarisch für die Scoringfunktionen ChemPLP und GoldScore dargestellt (Tabelle 3.4 und 3.5). Die Redockinglösungen der übrigen zwei Scoringfunktionen, welche in GOLD zur Verfügung stehen, ChemScore und ASP, befinden sich im Anhang (Kapitel 10.2.2).

Die Donepezilliganden der Röntgenstrukturen 4EY7 und 1EVE wurden mit Standardeinstellungen in der AChE-Bindetasche platziert. Dies ergab für beide Strukturen eine Top-Pose mit geringem RMSD zur Originalpose (0.38, 0.53 \AA) sowie eine große Clustergröße von 50 bzw. 37 Posen für 4EY7 und 1EVE. Die Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose erhält nochmals geringere RMSD-Werte und liegt im gleichen Cluster wie die Top-Pose.

Die Liganden der Strukturen 4EY5, 4EY7, 1EVE und 1W4L wurden mit der erhöhten Operationenzahl von 500'000 in der Bindetasche platziert. Auch hier wurden geringe RMSD-Werte der Top-Pose zur Originalpose observiert ($< 1.08 \text{ \AA}$). Lediglich für 1W4L liegt die

Top-Pose nicht im größten Cluster. Die Posen mit geringstem RMSD zur Originalpose liegen in den gleichen Clustern wie die Top-Posen.

Tabelle 3.4 Redockingergebnisse mit ChemPLP als Scoringfunktion und einer Operationenzahl von 500'000 bzw. 100'000 (Einstellung gekennzeichnet durch GA 100'000).



PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7 GA 100'000	107.33	0.38	50	39	106.26	0.20	ja
1EVE GA 100'000	92.01	0.53	37	44	90.16	0.43	ja
4EY5	76.79	0.36	50	48	76.41	0.34	ja
4EY7	107.32	0.35	50	48	105.67	0.19	ja
1EVE	92.07	0.53	50	48	89.56	0.46	ja
1W4L	130.92	1.08	3	7	125.15	0.85	nein (1)*

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Die Redockingergebnisse, welche mit der Funktion GoldScore erhalten wurden, sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Donepezilliganden der Röntgenstrukturen 4EY7 und 1EVE, die mit Standardeinstellungen in der AChE-Bindetasche platziert wurden, zeigen RMSD-Werte <1.04 Å zur Originalpose, sowie eine Clustergröße von 48 bzw. 40 Posen für 4EY7 und 1EVE. Die Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose erhält nochmals geringere RMSD-Werte und liegt im gleichen Cluster wie die Top-Pose.

Tabelle 3.5 Redockingergebnisse mit der GoldScore Funktion und einer „Anzahl an Operationen“ von 500'000 bzw. 100'000 (Einstellung gekennzeichnet durch GA 100'000).

PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7 GA 100'000	84.65	1.04	48	20	83.16	0.33	ja
1EVE GA 100'000	72.85	0.65	40	37	69.25	0.51	ja
4EY5	65.29	0.31	48	2	65.27	0.22	ja
4EY7	84.46	0.55	48	32	82.21	0.35	ja
1EVE	72.34	0.63	28	8	71.37	0.53	ja
1W4L	101.12	0.91	15	7	98.67	0.62	ja

Die Liganden der Strukturen 4EY5, 4EY7, 1EVE und 1W4L wurden mit der erhöhten Operationenzahl von 500'000 in der Bindetasche platziert. Auch hier wurden geringe RMSD-

Werte der Top-Pose zur Originalpose ermittelt ($<0.91 \text{ \AA}$). Die Posen mit geringstem RMSD zur Originalpose liegen in den gleichen Clustern wie die Top-Posen. Im Vergleich zu den Standardeinstellungen mit GA 100'000 wird die Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose bei verlängerter Suchdauer auf besseren Rängen (für 4EY5, 1EVE und 1W4L <8) identifiziert.

Der Vergleich der Redockingergebnisse beider hier diskutierter Scoringfunktionen zeigt, dass mit beiden Funktionen eine zur Originalpose strukturell ähnliche Top-Pose (RMSD $<1.08 \text{ \AA}$) generiert werden kann, die auch in einem großen Cluster liegt. Die Protokollvariante mit verlängerter Operationenzahl kann die Pose mit geringem RMSD zur Originalpose auf besseren Rängen identifizieren, weshalb diese Einstellung für die weiteren Dockingstudien übernommen wird.

Aufgrund der vergleichbar guten Redockingergebnisse kann keine der beiden Funktionen bevorzugt werden. Daher werden in den Kapiteln 3.2.4 – 3.2.6 weitere Untersuchungen im Bewertungsvermögen der beiden Scoringfunktionen vorgenommen, damit eine Funktion für die Dockingstudien der unterschiedlichen Chinazolin- und Chinazolinonliganden ausgewählt werden kann.

3.2.4 Docking piperidinylsubstituierter Liganden

Mittels der Dockingstudie sollte ein einheitliches Modell zur Beschreibung des Bindemodus der Chinazolin- und Chinazolinonverbindungen erarbeitet werden. Ein solches Modell soll in der Lage sein, einen bevorzugten Bindemodus für diese Substanzklasse zu identifizieren, und darüber hinaus sollen anhand des Bindemodus die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erklärt werden.

Alle Piperidinverbindungen der Datensätze aus Tabelle 3.1 und 3.2 wurden wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, aufgebaut. Da die IC_{50} -Werte der chiralen Liganden eine Mischung aus der Aktivität beider Enantiomere darstellen, wurden für diese Verbindungen beide Enantiomerstrukturen erzeugt und unabhängig voneinander für das Docking in die AChE-Bindetasche verwendet. Die Ligandenstrukturen wurden mit vergrößerter Operationenzahl unter Verwendung der GoldScore Funktion mittels Docking in der 4EY7 *hAChE*-Bindetasche platziert. Die Auswertung der Dockinglösungen erfolgte zunächst hinsichtlich der Lage des Amins substituents (in der CAS = invertierter Bindemodus oder am Binde-tascheneingang = klassischer Bindemodus). Somit sollte geklärt werden, ob die statistische Bevorzugung eines Bindemodus vorliegt. Die Auswertung ergab, dass der invertierte Bindemodus zu 66% unter den Top-5-Posen auftritt (vergl. Tabelle 10.14 im Anhang). Dieses Ergebnis wird im Sinne einer Bevorzugung des invertierten Bindemodus gegenüber dem

klassischen Bindemodus interpretiert. Für die Erklärung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden die Dockinglösungen genauer hinsichtlich von Protein-Ligand-Wechselwirkungen analysiert.

Die untersuchten Liganden besitzen durch die Carbonylgruppe (**10a – 15a, 16a** und **16g**) und die C=N-Doppelbindung (**20a, 20g**) Funktionalitäten als Protonen-Akzeptor (Wasserstoffbrücken-Akzeptor) und im Fall der NH-Gruppe (**19a, 19g**) einen Protonen-Donor (Wasserstoffbrücken-Donor). Die Tetrahydropyrrolochinazolinone **18a** und **18g** besitzen sowohl einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor (C=O) als auch einen Wasserstoffbrücken-Donor (NH). Durch diese Funktionalitäten ist zu erwarten, dass die Liganden gerichtete Wechselwirkungen in der AChE-Bindetasche zeigen.

Durch Protonierung des Amins substituenten unter Assaybedingungen kann es im invertierten Bindemodus in der Bindetasche zur Ausbildung einer Kation- π -Wechselwirkung kommen, indem das π -System von Trp86 der Cholinbindestelle (CBS) adressiert wird. Auch das natürliche Substrat Acetylcholin wird über Kation- π -Interaktionen mit dieser Aminosäure (AS) für eine effiziente Hydrolyse in der Bindetasche orientiert.⁶⁶

Die Top-Dockinglösung von Ligand **10a** in der 4EY7-Bindetasche die den invertierten Bindemodus zeigt, ist exemplarisch für den piperidiny substituierten Datensatz in Abb. 3.4 dargestellt. Als gerichtete Wechselwirkung kann in der Bindetasche eine Kation- π -Interaktion zwischen dem Amins substituenten und Trp86 identifiziert werden (*hAChE*-Nummerierung der AS). Darüber hinaus wird der Ligand auch über seine hydrophobe Interaktionsfläche in der AChE-Bindetasche stabilisiert.

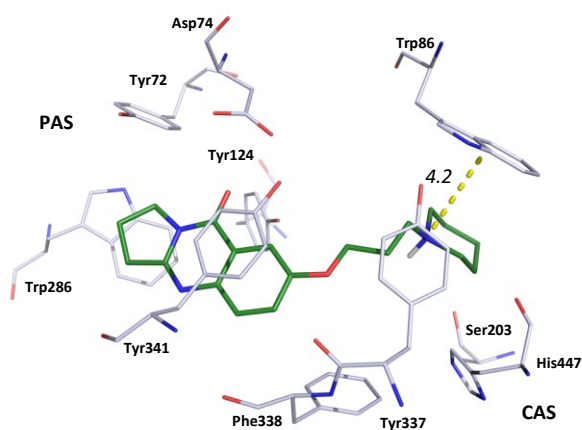


Abbildung 3.4 Top-Pose von Verbindung **10a** (dunkelgrün) in der *hAChE*-Bindetasche von 4EY7. Die vermeintliche Kation- π -Distanz zu dem geometrischen Zentrum von Trp86 ist in der Einheit Å als kursive Ziffer angegeben. Bindetaschenformende Aminosäureseitenketten sind in grau dargestellt und nach *hAChE* nummeriert. Bei allen Abbildungen befindet sich die PAS (Trp286, Tyr72 und Tyr124) links oben und die CAS (His447, Ser203 und Glu334 (letzteres hier nicht dargestellt)) unten rechts im Bild.

Weitere gerichtete Wechselwirkungen, wie etwa Wasserstoffbrücken vom Liganden zu den bindetaschenformenden Aminosäuren, konnten nicht identifiziert werden. Um insbesondere die Inhibition der Verbindungen **10a, 11a, 12a, 13a, 14a** und **15a** im IC_{50} -Bereich

von 5.50 – 69.2 nM zu erklären, reicht die Stabilisierung der Liganden durch hydrophobe Wechselwirkungen allein nicht aus.

Sofern die direkte Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand nicht möglich ist, können sogenannte strukturelle Wassermoleküle, die in der Bindetasche lokalisiert sind, Wasserstoffbrücken vom Liganden zu der Proteinumgebung vermitteln. Eine derartige Stabilisierung wird auch für den Donepezil-Liganden in der AChE-Bindetasche beobachtet (PDB-ID: 1EVE).⁷² Es sollte daher auch für die hier zu untersuchenden Chinazolin- und Chinazolinonliganden untersucht werden, ob diese in der Bindetasche durch wasservermittelte Kontakte zum Protein stabilisiert werden können.

Die Konservierung oder Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindetasche kann auch im Dockingprogramm GOLD simuliert werden (s. Kapitel 3.2.5).¹⁵⁴ Dazu müssen Koordinaten der Wassermoleküle in der Bindetasche vorgegeben werden.

Experimentelle Daten zur Aufklärung von Wassermolekül-Lokalisationen, genauer gesagt der Sauerstofflokalisationen, in Bindetaschen liefern Röntgenstrukturen genügend guter Auflösungen (<2.7 Å).⁴⁷ Diese Auflösung ist notwendig, da die Länge von Wasserstoffbrücken in diesem Bereich (2.6 – 3.2 Å) liegt.^{48, 54} Die im Redocking verwendeten Strukturen erfüllen dieses Kriterium (Auflösung: 2.16 – 2.50 Å). Die Wasserstoffatome beugen den Röntgenstrahl nicht stark genug, sie können nur in Röntgenstrukturen mit sehr guter Auflösung <0.8 Å oder in der Neutronenkristallographie sichtbar gemacht werden.¹⁵⁵ Als weiteres Kriterium zur Identifikation struktureller Wassermoleküle in Röntgenstrukturen dient die Regel, dass die Position eines Wassermoleküls mit steigender Anzahl an Bindungspartnern umso konservierter angenommen wird.⁴⁷ Demgegenüber stellen Wassermoleküle ohne Wasserstoffbrückenbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit Artefakte der Messung dar.

Zur Identifikation der Koordinaten struktureller Wassermoleküle können verschiedene Röntgenstrukturen des gleichen Enzyms verglichen werden. Durch Anwendung dieser Analysenmethode haben Berg *et al.* zwölf strukturelle Wassermoleküle in der *m*AChE-Bindetasche ermittelt.¹⁵⁶

In der *h*AChE- und *Tc*AChE-Bindetasche können 9 – 17 Wassermoleküle in einem Radius von 4 Å um den Liganden identifiziert werden (Tabelle 3.6). Für die apo-Form des Enzyms erfolgte die Auswahl der Wassermoleküle im entsprechenden Bereich in der Bindetasche.

Durch Überlagerung der Röntgenstrukturen auf die α -Atome konnten sieben Wassermoleküle ausgewählt werden, welche in drei Kristallstrukturen ähnliche Positionen inne haben (HOH722, HOH729, HOH731, HOH737, HOH881, HOH952 und HOH954 in PDB-ID: 4EY7; Durchschnitt der Positionsabweichung = 0.4 Å (s. Tabelle 10.10 im Anhang);

Abb. 3.5). Die Wassermoleküle sind mit einer dreistelligen Ziffer, wie sie im PDB-Datenfile von 4EY7 zu finden sind, angegeben.

Tabelle 3.6 Vergleich der Anzahl der Wassermoleküle in einem Radius von 4 Å um den Liganden innerhalb der AChE-Bindetasche.

Organismus	PDB-ID	Ligand	Anzahl H ₂ O	Auflösung [Å]
<i>human</i>	4EY4	-	11*	2.16
"	4EY5	(-)-Huperzin A	9	2.30
"	4EY7	Donepezil	16	2.35
<i>Torpedo californica</i>	1W4L	Galanthamin-Derivat	14	2.16
"	1EVE	Donepezil	17	2.50

* alle in der Bindetasche befindlichen Wassermoleküle.

Für die apo-Form von AChE, mit PDB-ID: 4EY4, wurden außer HOH952 sechs Wassermoleküle identifiziert. Es kann daher angenommen werden, dass HOH952 erst durch die Bindung eines Liganden in der AChE-Bindetasche stabilisiert wird.

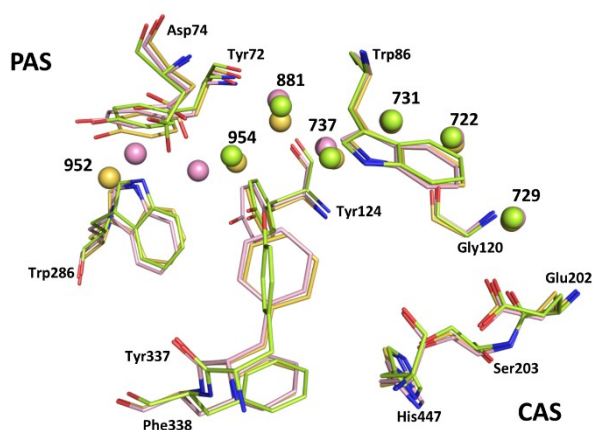


Abbildung 3.5 Überlagerung der Röntgenstrukturen zur Auswahl struktureller Wassermoleküle auf die C α -Atome der Struktur 1EVE (gelb). 4EY4 (grün), 4EY7 (grau) und 1W4L (rosa). Beginnt die Bezeichnung mit HOH7xx so ist das Wassermolekül in der Nähe der CAS zu finden, wohingegen Wassermoleküle beginnend mit der Ziffer HOH9xx am Bindetascheneingang platziert sind. Demnach liegt HOH881 in der Bindetaschenmitte.

In der Struktur 4EY5 befinden sich lediglich zwei Wassermoleküle an den gleichen Positionen wie in 4EY7 was auf das Volumen des darin kristallisierten Liganden zurückzuführen sein kann (für Struktur vergl. Tabelle 3.4). Fünf der sieben identifizierten Wassermoleküle (außer HOH729 und HOH952) gehören gemäß einer Analyse mit Relibase – einer Datenbank zur Analyse von Protein-Ligand-Strukturen der PDB – zu einem Wassercluster und somit zu einer geordneten Struktur mit der Stabilisierung der Wassermoleküle durch Wasserstoffbrückenbindungen (s. Tabelle 10.6 im Anhang).¹⁵⁷

Zunächst sollte die Konservierung der ausgewählten Wassermoleküle in den Bindetaschen von 4EY7, 4EY4, 1W4L sowie 1EVE untersucht werden. Diese Strukturen enthalten bis auf 4EY4 jeweils sieben Wassermoleküle. Die Analyse der Konservierung geschah zum einen

über das Auslesen der Besetzung (engl. Occpancy) und zum anderen über die Analyse der B-Faktoren, ein Maß für die Ordnung eines Systems.

Die Besetzung der Wassermoleküle wird außer für die Wassermoleküle HOH737 (82%), HOH952 (88%) und HOH954 (96%), der Struktur 4EY7, mit 100% angegeben (s. Tabelle 10.7 im Anhang). Für die genannten Wassermoleküle werden keine alternativen Positionen angegeben. Diese Beobachtung kann darauf hindeuten, dass die Wassermoleküle eine gewisse Fluktuation zeigen.

Als weitere Analysemethode wurde daher der Temperaturfaktor, auch B-Faktor genannt, als Maß für die statische und dynamische Ordnung des Systems herangezogen.⁴⁷ Atome mit größeren B-Faktoren gehören i. Allg. zu flexiblen Strukturbereichen in der Röntgenstruktur.⁵ Der B-Faktor beschreibt die Oszillation eines Atoms um seinen tatsächlichen Aufenthaltsort und berechnet sich aus der mittleren Auslenkung (\bar{U}^2) dieses Atoms:¹⁵⁸

$$B = 8 \cdot \pi \cdot \bar{U}^2 \quad (3.1)$$

B-Faktoren verschiedener Strukturen können *per se* nicht miteinander verglichen werden, weil sie nicht nur von der thermischen Mobilität, sondern auch von der Verfeinerungsmethode abhängen.^{155, 159} Um die Beweglichkeit der sieben ausgewählten Wassermoleküle vergleichen zu können, wurde eine Normierung anhand der Formel 3.2 durchgeführt.¹⁵⁸

$$B_{norm.} = \frac{(B_{Wasser} - \bar{B}_{Protein})}{\sigma B_{Protein}} \quad (3.2)$$

Zur Ermittlung des normierten B-Faktors, $B_{norm.}$, wurde vom B-Faktor des Wassermoleküls der berechnete Mittelwert der B-Faktoren des Proteins (ohne Wassermoleküle und Liganden) subtrahiert und durch die Standardabweichung des Mittelwertes ($\sigma B_{Protein}$) dividiert. Die normierten B-Faktoren der Wassermoleküle können untereinander verglichen werden und geben die Beweglichkeit der Wassermoleküle in Bezug auf die Beweglichkeit der Proteinatome an. Ein negativer $B_{norm.}$ -Wert kennzeichnet eine geringere Beweglichkeit eines Wassermoleküls, wohingegen ein positiver $B_{norm.}$ -Wert eine höhere Beweglichkeit in Bezug auf die Beweglichkeit des Proteins angibt.

In Tabelle 3.7 sind die $B_{norm.}$ -Werte der sieben Wassermoleküle aufgelistet. Vergrabene Wassermoleküle (buried water molecules; HOH722, HOH729, HOH731 und HOH737) zeigen verglichen mit den Proteinatomen grundsätzlich eine geringere Beweglichkeit (≤ -0.67 ; Rohdaten in Tabelle 10.8 und 10.9 im Anhang).

Tabelle 3.7 Normierte B-Faktoren ($B_{\text{norm.}}$) der sieben ausgewählten Wassermoleküle für die verglichenen Röntgenstrukturen.

Wassermolekül (Benennung aus 4EY7)	Normalisierte B-Faktoren $B_{\text{norm.}}$ [\AA^2]			
	4EY7	4EY4	1W4L	1EVE
HOH722	-0.91	-1.83	-0.96	-1.29
HOH729	-1.37	-1.03	-1.77	-1.70
HOH731	-1.10	-1.13	-0.87	-1.02
HOH737	-0.95	-0.67	-1.06	-1.10
HOH881	-0.15	-0.58	-1.21	-1.07
HOH952	0.18	-	0.39	-0.05
HOH954	-0.71	1.12	0.33	-0.25

Einhergehend damit zeigen die Wassermoleküle am Bindetascheneingang (HOH881, HOH952 und HOH954) höhere $B_{\text{norm.}}$ -Werte und somit eine größere Beweglichkeit. Das Wassermolekül HOH954 erhält in der Struktur 4EY7 einen $B_{\text{norm.}}$ -Wert von -0.71 , was auf eine Stabilisierung des Wassermoleküls an dieser Stelle hindeutet.

Anhand der Überlagerung von fünf Röntgenstrukturen wurden sieben Wassermoleküle in der AChE-Bindetasche von 4EY7 identifiziert, welche aufgrund der Analyse über die Besetzung und den normalisierten Temperaturfaktor als konserviert angesehen werden können. Diese Wassermoleküle werden als strukturelle Wassermoleküle bezeichnet. Sie zeigen untereinander Wasserstoffbrücken zu weiteren Wassermolekülen sowie zu den Aminosäuren der Bindetasche was deren Stabilisierung in der Bindetasche zusätzlich bekräftigt (Abb. 3.6).

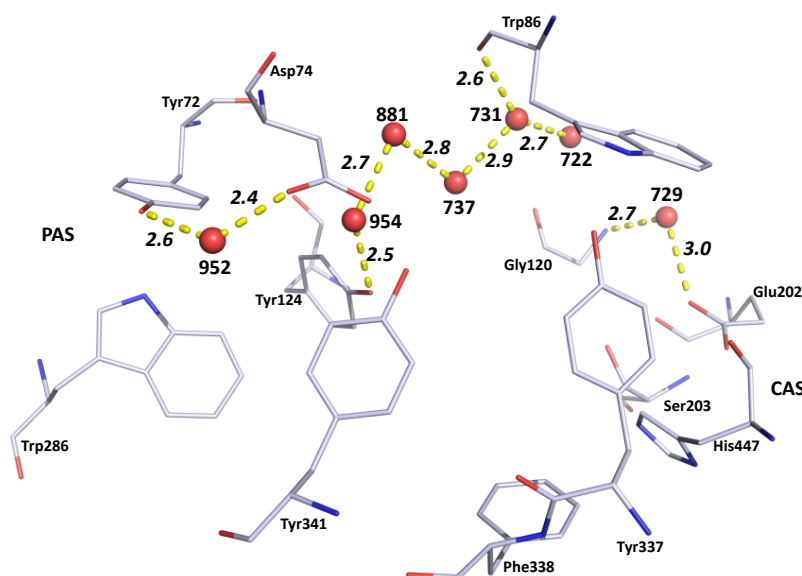


Abbildung 3.6 Darstellung der sieben strukturellen Wassermoleküle welche für Dockingstudien in der *hAChE*-Bindetasche von 4EY7 ausgewählt wurden. Aminosäureseitenketten sind in grau und Wassermoleküle als rote Sphären dargestellt. Distanzen sind in \AA als kursive Ziffern angegeben. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen aus Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

Das Wassermolekül HOH952 am Eingang der Bindetasche interagiert über eine Distanz von 2.6 und 2.4 Å mit den Aminosäureseitenketten Tyr72 und Asp74. Das ebenfalls in der PAS-Region befindliche Wassermolekül HOH954 ist 2.5 Å von Tyr124 entfernt und bildet eine Wasserstoffbrücke zu HOH881 aus (2.7 Å). HOH881 wiederum zeigt eine 2.8 Å lange Distanz zu HOH737, welches darüber hinaus durch eine Wasserstoffbrücke von 2.9 Å Länge zu HOH731 stabilisiert werden kann. Letzteres Wassermolekül zeigt zusätzlich Distanzen von 2.6 und 2.7 Å zum Sauerstoffatom von Trp86 sowie zum Wassermolekül HOH722. HOH729, am Ende der Bindetasche lokalisiert, wird vermutlich durch Wasserstoffbrücken-Distanzen von 2.7 und 3.0 Å zu Gly120 und Glu202 stabilisiert.

Die in der Röntgenstruktur gefundenen Wasserstoffbrückendistanzen zwischen 2.4 und 3.0 Å liegen im Mittel ($\emptyset = 2.7 \text{ \AA}$) im Bereich der empirisch ermittelten, literaturbekannten Distanzen für Wasserstoffbrücken von 2.6 – 3.2 Å zwischen den schweren Atomen.⁵⁴

3.2.5 Validierung ausgewählter Wassermoleküle in GOLD

Zur Testung, ob Wassermoleküle eine Rolle in der Protein-Ligand-Bindung spielen, müssten für jeden Liganden parallele Dockingläufe ohne Wasser und mit der sukzessiven Erhöhung der Wassermolekülanzahl durchgeführt werden.¹⁵⁴ Anhand der Scores kann dann die Pose mit der niedrigsten Energie identifiziert werden.

Die sieben ausgewählten Wassermoleküle wurden aus der 4EY7-Röntgenstruktur extrahiert, mittels Protonate 3D in MOE protoniert und einzeln abgespeichert. Anschließend wurden exemplarisch für das Chinazolinon **4a** acht Docking-Prozesse ohne Wassermoleküle und mit sukzessiver Erhöhung der Wassermolekülanzahl (beginnend bei dem vergrabenen Wassermolekül HOH729) mit ChemPLP in der AChE-Bindetasche durchgeführt. Dabei ergab sich mit zunehmender Anzahl an Wassermolekülen auch ein höherer „per-Atom-Score“ (Division des Scores durch die Anzahl der schweren Atome, in diesem Fall des Liganden sowie der Wassermoleküle): 3.82 ohne Wassermoleküle und 4.19 mit sieben Wassermolekülen (Tabelle 10.11 im Anhang). Der höhere per-Atom-Score wird dahingehend interpretiert, dass die Verwendung von Wassermolekülen zu energetisch günstigeren Dockinglösungen führt, weil jedes Atom dann einen höheren Beitrag zum Score liefert.

Das Programm GOLD bietet die Option, das Docking im „toggle-Modus“ durchzuführen.^{144, 154} Dabei wird die Konservierung oder Verdrängung eines Wassermoleküls vom Programm berechnet, indem der Vergleich der Wechselwirkungsenergie des Wassermole-

küls in gebundener Form mit dem Energiegewinn, der sich durch Verdrängung dieses Wassermoleküls aus der Bindetasche ergibt, gezogen wird.¹⁵⁴ Der Fitnessscore wird im toggle-Modus wie folgt berechnet:

$$Fitness = \sigma_o + \sum_w o(w)(\sigma_p + \sigma_i(w)) \quad (3.3)$$

Der Fitnessscore setzt sich aus σ_o , dem Originalscore der Ligandenpose, sowie einem über alle Wassermoleküle summierten Term zusammen: $o(w)$ ist der Besetzungsgrad des Wassermoleküls w ($o(w) = 1$ für vorhandenes und 0 für verdrängtes Wassermolekül), σ_p ist ein konstanter Strafterm, der die Änderung der freien Energie eines Wassermoleküls aufgrund des Entropieverlustes darstellt. Der Strafterm entspricht der freien Energie, die aufgewendet werden muss, um ein in Lösung befindliches Wassermolekül in die Bindetasche zu übertragen. Der letzte Term $\sigma_i(w)$ repräsentiert die intrinsische Bindungsaffinität eines Wassermoleküls zu Protein- und Ligandenatomen sowie anderen Wassermolekülen w' mit $o(w') = 1$.

Durch das Docking der piperidinylsubstituierten Liganden **10a**, **11a**, **12a**, **13a**, **14a**, **15a** aus Tabelle 3.1 sowie der jeweils aktivsten Verbindung **16g**, **17a**, **18g**, **19g** und **20a** aus Tabelle 3.2 im toggle-Modus mit den Scoringfunktionen ChemPLP und GoldScore sollte untersucht werden, wie viele der sieben ausgewählten Wassermoleküle nach der Ligandenplatzierung explizit in der Bindetasche liegen (für Dockingeinstellungen s. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2, Operationenzahl: 500'000). Damit sollte getestet werden, wie sensitiv die Scoringfunktionen gegenüber den Wassermolekülen sind und ob es Unterschiede in der Anzahl aktivierter Wassermoleküle bei den beiden Funktionen gibt. Die Positionen der Sauerstoffatome wurden der Kristallstruktur 4EY7 entnommen, während die Wasserstoffatome ihre Position für Wasserstoffbrücken durch freie Rotation um das Sauerstoffatom optimieren konnten.

Die Scoringfunktion ChemPLP erwies sich gegenüber GoldScore bezogen auf die Anzahl der tolerierten Wassermoleküle robuster, das heißt, dass unter Verwendung von ChemPLP mehr Wassermoleküle aktiv blieben, als dies für GoldScore der Fall war.

Bei Verwendung von ChemPLP blieben in 87% der Top-5-Dockingposen alle sieben Wassermoleküle aktiv. In den übrigen analysierten Lösungen wurde HOH952, welches sich am Bindetascheneingang befindet, vom Docking-Prozess ausgeschlossen. Unter Verwendung von GoldScore wurden drei Wassermoleküle vom Docking-Prozess ausgeschlossen – dies waren HOH954, HOH881 und HOH737, welche sich in der Bindetaschenmitte befinden. In 98% der Fälle blieben ≥ 4 Wassermoleküle aktiv.

Ursächlich für die unterschiedliche Toleranz der Scoringfunktionen gegenüber den Wassermolekülen kann die abweichende Ligandenplatzierung sein (Abb. 3.7). Die mit GoldScore generierten Dockinglösungen werden tiefer in der Bindetasche platziert als dies für die ChemPLP-Lösungen beobachtet wird. Die Lage des Aminstickstoffs ist für die ChemPLP-Posen im Vergleich zu den GoldScore-Posen um 1.2 – 1.5 Å bezüglich der Bindetaschenlängsachse verschoben.

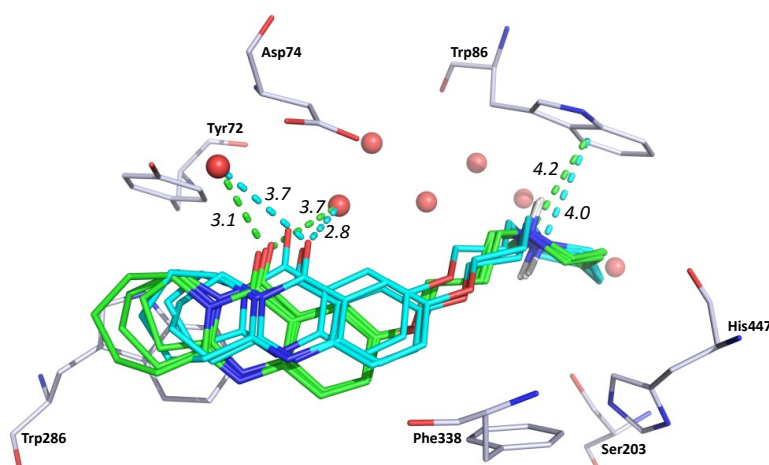


Abbildung 3.7 Vergleich der Platzierung der trizyklischen Chinazolinone **10a**, **11a** und **12a** unter Verwendung von GoldScore (hellblau) und ChemPLP (grün). Sicht auf die Längsachse der AChE-Bindetasche. Beziffert ist die gemittelte Distanz in Å der jeweils drei abgebildeten Liganden.

Die Ligandenpositionierung mit GoldScore resultiert in einer kürzeren Distanz der Kation- π -Interaktion mit Trp86 von 4.0 Å, gegenüber 4.2 Å bei Platzierung der Liganden mit ChemPLP. GoldScore-Posen zeigen ferner eine optimierte Wasserstoffbrückendistanz zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und HOH954 (2.8 Å), wohingegen bei ChemPLP eine Optimierung hinsichtlich HOH952 (3.1 Å) vorliegt. Die Berücksichtigung der Kation- π -Wechselwirkungen erfolgt in ChemPLP durch den Term „buried“, in der kraftfeldbasierten Funktion GoldScore durch den Van-der-Waals Term. Da es für die Beschreibung dieser Wechselwirkung keinen expliziten Term gibt, wurde zur Plausibilitätsprüfung dieser Interaktion zusätzlich ein Distanzkriterium herangezogen. Literaturbekannte Distanzen für Kation- π -Interaktionen liegen zwischen 3.4 – 4.0 Å.⁵⁴

Diese vorläufigen Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die Berücksichtigung von Wassermolekülen im Docking, Wasserstoffbrückendistanzen zwischen dem Liganden und den Wassermolekülen identifiziert werden können. Diese gerichteten Distanzen können ursächlich für eine bessere Stabilisierung in der Bindetasche sein. Anhand der folgenden Studien sollte ein Kriterium zur Entscheidung für eine Scoringfunktion gefunden werden. Zunächst wurde das Redocking unter expliziter Wassermolekülberücksichtigung durchgeführt.

3.2.6 Redockingergebnisse mit strukturellen Wassermolekülen

Die Redockingstudien wurden unter Verwendung der sieben ausgewählten Wassermoleküle wiederholt, um herauszufinden welchen Effekt die Verwendung dieser Wassermoleküle auf die Dockingergebnisse hat. Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Dockingergebnisse wurden alle sieben Wassermoleküle explizit verwendet und deren Besetzung auf $o(w) = 1$ gesetzt. Die Redockingstudien wurden mit den Röntgenstrukturen 4EY7 (*hAChE*) sowie 1EVE (*TcACHE*), die den Donepezilliganden enthalten, unter Verwendung der Funktionen ChemPLP und GoldScore mit einer Operationenzahl von 500'000 durchgeführt. Eine tabellarische Ergebnisübersicht befindet sich in Tabelle 3.8 und 3.9.

Tabelle 3.8 Redockingergebnisse in GOLD mit sieben strukturellen Wassermolekülen und der Funktion GoldScore.

PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7	102.63	0.58	49	26	99.36	0.35	ja
1EVE	81.39	0.58	47	23	79.84	0.52	ja

Tabelle 3.9 Redockingergebnisse mit sieben strukturellen Wassermolekülen und der Funktion ChemPLP.

PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7	144.73	0.35	49	23	143.70	0.18	ja
1EVE	118.76	0.54	50	12	118.19	0.50	ja

Unter Verwendung der sieben Wassermoleküle bleibt die Güte des Redockings erhalten. Das bedeutet, dass die Top-Pose beider Scoringfunktionen nur eine geringe Abweichung von 0.58 bis 0.35 Å zur Originalpose zeigt (diese ist vergleichbar mit den RMSD-Werten aus dem Redocking ohne Wasser, s. Tabelle 3.4 und 3.5). Auch die Pose mit dem geringsten RMSD-Wert (0.18 und 0.52 Å) zeigt für beide Scoringfunktionen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Originalpose. Anhand der großen Cluster mit 47 – 50 Posen ist schließlich abzulesen, dass das Docking strukturell sehr ähnliche Dockinglösungen produzieren konnte.

Bisher wurde herausgefunden, dass die ChemPLP-Funktion robuster gegenüber den Wassermolekülen ist und mehr Wassermoleküle explizit im Docking toleriert, als dies für GoldScore festgestellt wurde. Darüber hinaus konnte evaluiert werden, dass ein Redocking mit expliziter Verwendung der sieben ausgewählten Wassermoleküle und den Funktionen GoldScore und ChemPLP im Vergleich zum Redocking ohne Wassermoleküle vergleichbar

gute Ergebnisse liefert. Für die abschließende Entscheidung darüber, welche Scoringfunktion für die Dockingstudien der Chinazolin- und Chinazolinonliganden verwendet wird, soll getestet werden, welche Funktion besser für eine Affinitätsvorhersage geeignet ist.

3.2.7 Affinitätsvorhersage mittels Scoringfunktionen

Anhand der Affinitätsvorhersage durch die Scoringfunktionen sollte weiter geprüft werden, welche Scoringfunktion verlässliche Bindemodi für die zu untersuchenden Chinazolin- und Chinazolinonliganden liefert und somit die Erklärung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen möglich macht. Daher sollte die Vorhersage der experimentellen Daten durch die Scoringfunktionen getestet werden.

Das Docking der hier besprochenen Verbindungen verlief nach dem Protokoll aus Kapitel 3.2.1 und 3.2.2. Die Funktionen GoldScore und ChemPLP wurden mit einer Operationenzahl von 500'000 für das Docking verwendet.

Die Piperidinverbindung **13a** und die entsprechende Cyclohexylverbindung **13h** zeigen den größten Affinitätsunterschied (Faktor ca. 8000, Tabelle 3.10). Posen beider Verbindungen wurden mit GoldScore bzw. ChemPLP und den sieben Wassermolekülen erzeugt, um zu testen, welche Scoringfunktion den Aktivitätsunterschied am besten abbilden kann.

Die ChemPLP Funktion zeigt keine Diskriminierung zwischen beiden Verbindungen, da die weniger aktive Verbindung **13h** um ca. 4 Einheiten besser bewertet wird als die aktivere Verbindung **13a** (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Ergebnisse der Affinitätsvorhersage des piperidinylsubstituierten Chinazolinons **13a** und der Cyclohexylverbindung **13h** mittels ChemPLP und GoldScore.

Verbindung	IC ₅₀ (eeAChE)	ChemPLP		GoldScore	
		Bindemodus	Score ^[Rang]	Bindemodus	Score ^[Rang]
13a	6.9 nM	invertiert	140.18 ^[1]	invertiert	103.06 ^[2]
13h	34% bei 50 µM	invertiert	144.43 ^[1]	invertiert	92.79 ^[2]

GoldScore zeigt hier einen höheren Score zugunsten der Piperidinverbindung **13a** ($\Delta = 10.27$). Diese Bewertung gibt zwar nicht den ca. 8000-fachen Aktivitätsunterschied wieder, zeigt aber den deutlichsten Trend der hier getesteten Funktionen. Die Verbindungen **13a** und **13h** werden im invertierten Bindemodus vergleichbar in der Bindetasche platziert (Abb. 3.8).

Die Bindepose von **13a** zeigt eine Kation- π -Wechselwirkung von 4.0 Å zu Trp86 und eine mögliche Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoffatoms von 2.6 Å zu HOH954. Die

Ausbildung einer Kation- π -Interaktion ist für die Cyclohexylverbindung **13h** nicht möglich. Diese Bindepose kann möglicherweise durch eine Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoffatoms von 2.7 Å zu HOH954 stabilisiert werden. Für beide Ligandenbindeposen wird darüber hinaus die Möglichkeit der π - π -Interaktion in der PAS-Region von 3.6 Å und 3.5 Å postuliert (gemessen zwischen den geometrischen Ringzentren, aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 3.8 nicht dargestellt). Der invertierte Bindemodus ist auch für die Cyclohexylverbindung **13h** bevorzugt, da er vermutlich die größte Interaktionsfläche zwischen Ligand und Protein darstellt. Dies wird durch den vergleichbaren hydrophoben Beitrag zur Protein-Ligand-Bindung für **13a** ($S_{vdw_ext} = 109.58$) und **13h** ($S_{vdw_ext} = 109.84$) untermauert.

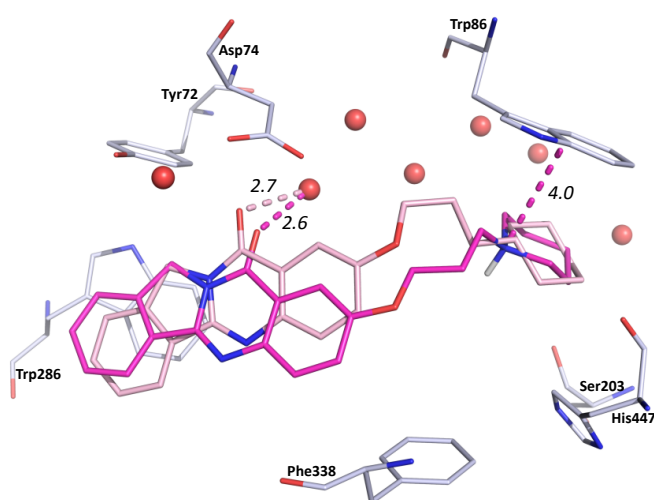


Abbildung 3.8 GoldScore-Dockinglösung von **13a** (pink) und **13h** (rosa). Distanzen sind in kursiven Ziffern in der Einheit Å angegeben.

Anschließend sollte getestet werden, ob die Affinitätsvorhersage auch für die übrigen piperidiny substituierten Chinazolinone **10a** – **15a** möglich ist. Eine Ergebniszusammenstellung befindet sich in Tabelle 3.11. Zur Auswahl einer Bindepose wurde unter den Top-5-Posen die am besten bewertete Pose mit einer Distanz von 2.6 – 3.2 Å zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und dem Wassermolekül HOH954 ausgewählt.

Schon für die Platzierung trizyklischer Chinazolinone in der AChE-Bindetasche fiel auf, dass die Carbonyl-Sauerstoffatome eine Wasserstoffbrückendistanz zu HOH954 oder HOH952 zeigen (vergl. Abb. 3.7). Für Verbindungen **14a** und **15a** fiel eine geänderte Orientierung des Liganden Grundgerüsts auf (vergl. Abb. 3.14). Die Carbonylgruppe ist bezüglich der Wassermoleküle um 180° gedreht, wodurch vermutlich die Interaktion des ankondensierten Benzolringes mit der Trp286-Ringfläche verbessert wird. Dieses Phänomen wird im Folgenden genauer erläutert (s. Abschn. 3.3.7). Verbindung **12a** wurde mit dem siebengliedrigen Ring in einer twist-sesselähnlichen Konformation für das Docking verwendet (s. Kapitel 3.3.2 für die Konformationssuche).

Tabelle 3.11 Gegenüberstellung von pIC_{50} -Werten und Score piperidiny substituiertes Chinazolinonbindeposen in der AChE-Bindetasche mit sieben Wassermolekülen.

Verbindung	Ligand	pIC_{50} eeAChE [nM]	GoldScore ^[Rang]	Distanz C=O zu HOH954 [Å]
10a		7.16	95.27 ^[1]	2.8
11a		7.48	95.63 ^[1]	2.8
12a		7.37	98.07 ^[1]	2.8
13a		8.21	103.06 ^[2]	2.6
14a		8.26	105.23 ^[1]	- [‡]
15a		7.24	96.14 ^[1]	- [‡]

[‡] C=O zeigt nicht zu den Wassermolekülen und ist bezüglich dieser um 180° gedreht.

Die Auftragung der pIC_{50} -Werte gegen die GoldScores ergibt eine lineare Regression mit einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0.92 (Abb. 3.9, die analoge Korrelation mit den ChemPLP-Scores ergibt ein R^2 von 0.73).

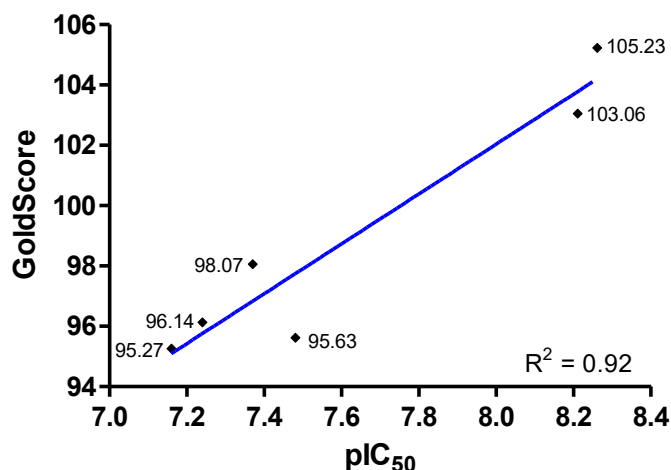


Abbildung 3.9 Korrelation der pIC_{50} -Werte mit den GoldScores der piperidiny substituierten Inhibitoren jedes Chinazolinongrundgerüsts. Berechnung und Graphenerstellung mit GraphPad Prism 5. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

Die Funktion GoldScore kann den Affinitätstrend, der auf die Unterschiede im Liganden Grundgerüst zurückzuführen ist, besser abbilden als ChemPLP. Die Korrelation darf aufgrund des kleinen Datensatzes jedoch nicht überbewertet werden, denn für die gesamten Chinazolinone aus Tabelle 3.1 berechnet sich ein R^2 von 0.45. Die ungenügende Korrelation des gesamten Datensatzes ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Unterschied in

der Bewertung von Verbindung **13a** und **13h** ($\Delta\text{GoldScore} = 10.27$) nicht im gleichen Bereich wie der Aktivitätsunterschied (ca. Faktor 8000) liegt.

Die Untersuchung der Affinitätsvorhersage wurde als abschließendes Kriterium für das Auffinden einer Scoringfunktion zur Bewertung der in Tabelle 3.1 und 3.2 gezeigten Chinazolin- und Chinazolinonliganden, der Serien **10** – **20**, durchgeführt. Wenn die sieben Wassermoleküle explizit im Docking verwendet werden, dann ist die Funktion GoldScore eher als ChemPLP in der Lage, die Affinitätsunterschiede richtig zu bewerten. Die Erklärung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ist in dieser Studie ein zentraler Bestandteil, weshalb der richtigen Affinitätsvorhersage eine größere Gewichtung eingeräumt wird, als der Toleranz gegenüber den aktiven Wassermolekülen in der Bindetasche, zumal damit ebenfalls der invertierte Bindemodus identifiziert wurde.

Die durchgeführten Tests wie Redocking, Auswahl von strukturellen Wassermolekülen, Validierung der Auswahl der Wassermoleküle mit dem Programm GOLD, Redocking unter expliziter Einbeziehung der Wassermoleküle und schließlich der Test der Affinitätsvorhersage lieferten die folgenden Einstellungen, die zum Docking der Chinazolin- und Chinazolinonliganden verwendet werden:

Dockingprogramm GOLD, Scoringfunktion GoldScore, Operationenzahl 500'000, sieben strukturelle Wassermoleküle (HOH722, HOH729, HOH731, HOH737, HOH881, HOH952 und HOH954) und die *hAChE* Röntgenstruktur mit der PDB-ID 4EY7.

3.3 Diskussion der Bindemodi

Die Bindemodi der Chinazolinon und Chinazolinverbindungen sollten unter Einbeziehung der sieben ausgewählten Wassermoleküle in der *hAChE*-Bindetasche hinsichtlich zweier Fragestellungen untersucht werden:

- 1) Kann ein bevorzugter Bindemodus (klassisch oder invertiert) für die Chinazolinon- und Chinazolinverbindung, der Serien **10** – **20**, im Docking ermittelt werden? (Kapitel 3.3.4)
- 2) Gibt es strukturelle Erklärungen für die Modulation der Ligandenaffinität aufgrund der Art des Amins substituenten und des Ligandengrundgerüsts? (Kapitel 3.3.5 – 3.3.8)

Die Plausibilität der erhaltenen Dockinglösungen soll überprüft werden, indem zum einen die anhand der Dockinglösungen ermittelten Protein-Ligand-Interaktionsdistanzen mit

literaturbekannten Abständen für diese Wechselwirkungen verglichen werden. Zum anderen sollen anhand der Dockinglösungen die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erklärt werden. Eine solche Erklärung dürfte nur für plausible Dockinglösungen möglich sein.

3.3.1 Dockinglösungen mit sieben Wassermolekülen

Alle Liganden aus Tabelle 3.1 und 3.2 wurden unter Verwendung des Standardprotokolls (Kapitel 3.2.1) aufgebaut und mit der Operationenanzahl 500'000, der Funktion GoldScore sowie unter Verwendung der sieben strukturellen Wassermoleküle in der hAChE-Bindetasche (PDB-ID: 4EY7) platziert.

Die so erhaltenen Dockinglösungen wurden hinsichtlich des Scorebereiches der Top-5-Lösungen sowie der Anzahl Posen im invertierten Bindemodus ausgewertet, wobei die Darstellung hinsichtlich des gleichen Ligandengrundgerüsts gewählt wurde (Tabelle 3.12; Serien **10** bis **20** für Strukturen vergl. Tabelle 3.1 und 3.2). Die Posen wurden lediglich hinsichtlich der Lage des Amins, entweder in der CAS für den invertierten Bindemodus oder am Bindetascheneingang für den klassischen Bindemodus, ausgewertet.

Die Scorebereiche sind sehr eng und zeigen zu 81% eine Differenz <3 Scoreeinheiten der Top-5-Lösungen. Die größte Differenz im Score beträgt 6.48 Scoreeinheiten für das S-Enantiomer von Verbindung **17g** (nachfolgend mit Verbindungsnummer *_Enantiomer*, also **17g_S** bezeichnet). Diese Aufstellung in Tabelle 3.12 zeigt, dass der Score nicht als Entscheidungskriterium für die Plausibilität der Dockingposen herangezogen werden kann, da die beiden Bindemodi nicht signifikant unterschiedlich bewertet werden. Zur Auswahl einer Bindepose aus den Top-5-Lösungen wurde daher ein Wasserstoffbrücken-Distanzkriterium herangezogen (s. Kapitel 3.3.3). Die Top-Posen liegen in Clustern mit 4 bis 47 Posen ($\emptyset = 20$ Posen).

Ferner kann anhand der Daten in Tabelle 3.12 die Bevorzugung des invertierten Bindemodus unter den Top-5-Posen abgelesen werden (55%-100%). In diesem Zusammenhang fällt auf, dass die trizyklischen Verbindungen mit siebengliedrigem Alizyklus (**12**-er Serie) den invertierten Bindemodus nur zu 7% unter den Top-5-Posen zeigen. Ein von den übrigen Chinazolinonverbindungen (**10**-, **11**-, **13**-, **14**-, und **15**-er Serie) geänderter Bindemodus erscheint vor dem Hintergrund ähnlicher IC₅₀-Werte nicht plausibel. So zeigen die Liganden **12a** – **12f** mit siebengliedrigem Alizyklus IC₅₀-Werte zwischen 39.2 nM – 4.0·10³ nM und liegen damit im gleichen Bereich wie Inhibitoren mit sechsgliedrigem Alizyklus **11a** – **11f** (33.3 nM – 4.2·10³ nM), die zu 80% den invertierten Bindemodus zeigen.

Tabelle 3.12 Dockinglösungen der Chinazolinon- und Chinazolinverbindungen (Verb.) mit Angabe des Top-5-Scorebereiches, der Anzahl Top-5-Posen im invertierten Bindemodus (i.B.) sowie der prozentuale Anteil dieses Bindemodus. Die Einteilung der Verbindungen erfolgte hinsichtlich des Ligandengrundgerüsts.

Verb.	Scorebereich	Anzahl im i.B. (Top-5)	% i.B.	Verb.	Scorebereich	Anzahl im i.B. (Top-5)	% i.B.
10a	95.64 – 94.93	5		16a _R [†]	94.14 – 92.48	0	
10b	94.90 – 94.62	5		16a _S [‡]	99.40 – 97.94	5	
10c	93.37 – 92.12	5		16b _R	103.87 – 102.92	5	
10d	92.35 – 91.05	2	77%	16b _S	102.40 – 96.64	2	55%
10e	92.49 – 91.73	5		16c _R	96.20 – 92.75	1	
10f	85.74 – 83.72	0		16c _S	92.31 – 91.54	0	
10g	101.60 – 99.37	5		16g _R	106.63 – 102.49	5	
11a	95.63 – 95.11	5		16g _S	108.04 – 105.19	5	
11b	100.69 – 99.85	5		17a _R	98.67 – 95.03	5	
11c	96.04 – 95.29	5	80%	17a _S	98.79 – 97.11	0	
11d	95.53 – 92.96	4		17b _R	99.30 – 95.47	5	
11e	103.48 – 103.04	5		17b _S	99.36 – 97.73	5	60%
11f	84.89 – 83.70	0		17c _R	94.95 – 93.36	0	
12a	102.26 – 101.06	0		17c _S	102.83 – 101.84	0	
12b	91.61 – 90.24	2		17g _R	103.73 – 99.09	5	
12c	98.93 – 97.80	0	7%	17g _S	107.19 – 100.71	4	
12d	101.06 – 100.09	0		18a _R	98.44 – 96.28	5	
12e	105.92 – 104.49	0		18a _S	95.01 – 93.69	0	75%
12f	91.49 – 90.78	0		18g _R	102.57 – 98.65	5	
13a	103.15 – 102.45	5		18g _S	103.67 – 101.10	5	
13b	108.65 – 108.03	5		19a _R	107.13 – 105.40	5	
13c	101.46 – 101.04	5	100%	19a _S	100.78 – 100.30	5	
13d	103.15 – 102.04	5		19b _R	97.64 – 95.99	0	
13e	104.20 – 103.42	5		19b _S	104.79 – 102.20	5	75%
13f	91.72 – 89.90	5		19c _R	93.85 – 91.39	0	
14a	105.23 – 101.84	5		19c _S	98.91 – 97.12	5	
14b	108.70 – 105.59	5		19g _R	107.28 – 104.73	5	
14c	102.36 – 101.14	5	100%	19g _S	112.53 -111.37	5	
14d	103.83 – 99.42	5		20a	94.50 – 93.30	5	100%
14e	103.48 – 102.27	5		20g	105.29 – 101.85	5	
14f	91.24 – 89.90	5					
15a	96.14 – 94.82	5					
15b	99.53 – 98.49	5					
15c	97.64 – 96.17	5					
15d	95.92 – 93.65	5	97%				
15e	95.94 – 90.56	4					
15f	89.28 – 86.54	5					

[†] R-Enantiomer; [‡] S-Enantiomer

Durch Verwendung des Standardprotokolls für den Aufbau der Ligandenstruktur erhielt der siebengliedrige Alizyklus nach der Energieminimierung eine sesselähnliche Konformation. Die bioaktive Form des Liganden kann bekanntermaßen von der lokalen Minimumpose abweichen. Aus diesem Grund wurde für die Liganden der **12**-er Serie eine Konformations-

suche durchgeführt, um zu testen, ob eine andere Konformation des siebengliedrigen Ringes bevorzugt den invertierten Bindemodus zeigt.

3.3.2 Konformationssuche für Chinazolinone mit siebengliedrigem Alizyklus

Im Docking-Prozess werden lediglich die Einfachbindungen des Linkers flexibel gehalten, wobei die Ringkonformationen nicht geändert wird. Aus diesem Grund wurde für die Liganden **12a** – **12f** eine stochastische Konformationssuche nach dem Monte-Carlo-Verfahren durchgeführt (Abb. 3.10).¹⁶⁰ Die Startwinkel der Bindungen werden dabei zufällig gewählt. Einziges Kriterium während der Konformationssuche ist ein intakter siebengliedriger Ring.

Ausgangspunkt der Konformationsanalyse war der mit dem Kraftfeld MMFF94x zu einem RMS-Gradienten von 0.001 kcal/mol·Å vorminimierte Ligand, bei welchem der siebengliedrige Alizyklus eine sesselähnliche Konformation einnahm (Lösung 1 in Abb. 3.10, B).

Die Konformationssuche erfolgte in dem Programm MOE 2013.08 mittels einer stochastischen Suche nach dem Monte-Carlo-Verfahren,¹⁶¹ mit dem Kraftfeld MMFF94s,^{h,162} einer Dielektrizitätskonstante von 4 sowie einem RMS-Gradienten von 0.001 kcal/(mol·Å). Es sollten lediglich die Konformationen des siebengliedrigen Alizyklus' untersucht werden, weshalb die Atompositionen und Bindungslängen des Chinazolinongerüsts inklusive des Linkers und des Aminsubstituenten fixiert wurde (A, Abb. 3.10). Eine detaillierte Übersicht aller Einstellungen ist in Kapitel 10.2.4 gezeigt.

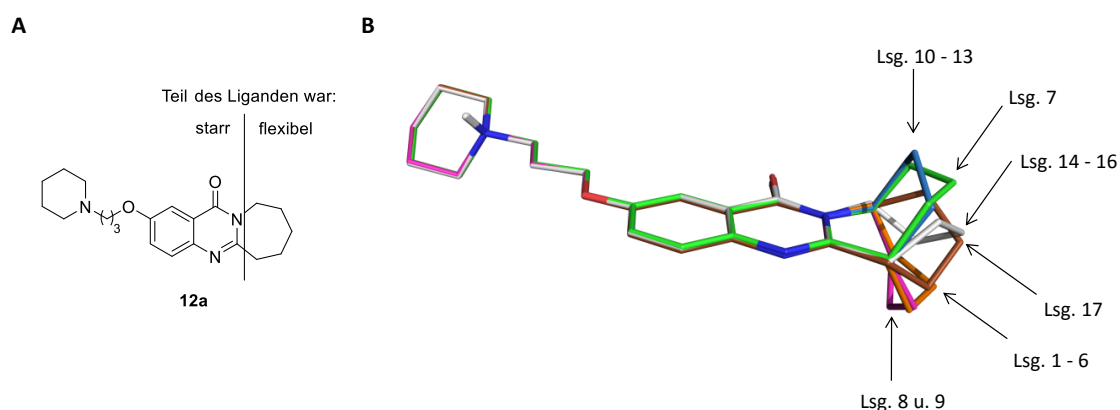


Abbildung 3.10 A) Zur Einschränkung des Suchraumes wurde ein Teil des Moleküls fixiert und nur fünf C-Atome flexibel belassen. B) Die Konformationssuche ergab sechs Konformerfamilien. Dargestellt ist die Konformation mit der geringsten Energie innerhalb der Konformerfamilie. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

^h Die Kraftfelder MMFF94x und MMFF94s unterscheiden sich in der Behandlung konjugierter Stickstoffatome. Dieser Unterschied ist hier irrelevant, weil kein Stickstoffatom Bestandteil der Konformationssuche war. Eine Nachoptimierung der Konformere mit MMFF94x ergab wie erwartet keine strukturellen Änderungen.

Die Konformationssuche ergab insgesamt 17 Konformere, die in sechs Konformationsfamilien unterteilt werden können (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13 Lösungen der Konformationssuche ausgehend von Struktur **12a** inkl. der absoluten Energien (Spalte 2), der relativen Energien (Spalte 3) sowie der RMSD-Werte inkl. der H-Atome, bezogen auf die Startstruktur (Spalte 4) und relativ innerhalb der Energiefamilien (letzte Spalte) berechnet mit fconv.¹⁴⁹

Lösung	Energie [kcal/mol]	Δ Energie [kcal/mol]	RMSD [Å] zur Startstruktur	RMSD [Å] in der Konformationsfamilie
1	2.08	0.00	0.150	0.000
2	2.08	0.00	0.144	0.022
3	2.08	0.00	0.148	0.020
4	2.08	0.00	0.144	0.024
5	2.08	0.00	0.147	0.023
6	2.08	0.00	0.149	0.015
7	2.10	0.02	1.361	0.000
8	3.18	1.10	0.624	0.000
9	3.18	1.10	0.623	0.014
10	3.20	1.12	1.550	0.000
11	3.20	1.12	1.552	0.008
12	3.20	1.12	1.548	0.008
13	3.20	1.12	1.555	0.013
14	3.91	1.83	0.860	0.000
15	3.91	1.83	0.862	0.008
16	3.91	1.83	0.859	0.007
17	3.94	1.86	0.960	0.000

Die Konformationsfamilien unterteilen sich aufgrund der Planarität des Chinazolinon-Grundgerüsts in drei Sub-Familien, welche in der Energie nur geringe Abweichungen in der ersten oder zweiten Nachkommastelle zeigen (vergl. Lösung 1 und 7, sowie 14 und 17).

Die Einteilung in die Konformationsfamilien ist auch anhand der RMSD-Werte zur Startstruktur abzulesen (vorletzte Spalte in Tabelle 3.13). Lösungen 1-7 repräsentieren eine sesselähnliche, Lösungen 8, 9 und 10-13 eine wannenähnliche und Lösungen 14-17 eine twist-sesselähnliche Konformation.

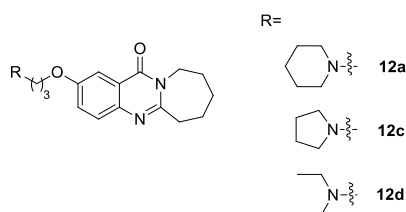
Alle erhaltenen Konformere wurden anschließend als Ligand **12a** oder nach Austausch des Amins substituents als Pyrrolidin- und *N,N*-Diethylaminverbindung mittels Docking in der hAChE-Bindetasche platziert, um den gesamten Konformationsraum des Liganden abzudecken. In Tabelle 3.14 ist der Top-Score sowie der Bindemodus der Dockinglösungen zusammengestellt. Als eindeutiges Ergebnis wird festgestellt, dass der klassische Bindemodus signifikant höher populiert ist als der invertierte Bindemodus. Letzterer wird für die Konformere nur bei ≤ 12 Posen identifiziert. Lediglich für das Konformer 17 wird der invertierte Bindemodus für die Top-Posen gefunden. Dieser Bindemodus ist nicht nur

energetisch durch das Auftreten auf den Top-Posen, sondern auch quantitativ mit 35, 41 und 25 Posen der Liganden **12a**, **12c** und **12d** unter den 50 generierten Posen bevorzugt.

Bei Cycloheptan und Cycloheptenringen stellt eine Twist-Konformation des Alizyklischen Ringes jeweils ein Energieminimum dar.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Daher ist auch Konformation 17 eine angemessene Konformation zur Repräsentation des Alizyklus.

In der untersuchten Verbindung ist der Alizyklus Bestandteil des Chinazolinongrundgerüsts, weshalb die erhaltenen Energiewerte nicht direkt mit den Energiewerten unsubstituierter Cycloheptanringe verglichen werden können.

Tabelle 3.14 Docking von Ligand **12a**, **12c** und **12d** mit den sechs identifizierten Konformationen inkl. sieben Wassermolekülen in der 4EY7-Bindetasche. Angegeben ist der GoldScore der Top-Pose. Die Reihenfolge der Ligandenkonformere ist analog zu Abb. 3.10.



Lig_Konf.	Bindemodus	Score	Lig_Konf.	Bindemodus	Score	Lig_Konf.	Bindemodus	Score
12a_10	klassisch	95.65	12c_10	klassisch	94.63	12d_10	klassisch	93.40
12a_7	klassisch	97.45	12c_7	klassisch	96.83	12d_7	klassisch	95.21
12a_14	klassisch	100.82	12c_14	klassisch	97.70	12d_14	klassisch	98.09
12a_17	invertiert	98.07	12c_17	invertiert	97.21	12d_17	invertiert	95.43
12a_1	klassisch	102.26	12c_1	klassisch	99.97	12d_1	klassisch	101.15
12a_8	klassisch	102.07	12c_8	klassisch	98.92	12d_8	klassisch	101.07

Alle trizyklischen Verbindungen mit ankondensiertem siebengliedrigem Alizyklus **12a** – **12f** wurden mit der Konformation 17 in die AChE-Bindetasche gedockt und zeigten erwartungsgemäß das vermehrte Auftreten des invertierten Bindemodus unter den Top-5-Lösungen (77% anstelle von 7%; Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15 Dockinglösungen mit Angabe des Top-5 Scorebereiches und die Anzahl Posen, sowie der prozentuale Anteil dieser im invertierten Bindemodus (i.B.) innerhalb der Top-5-Lösungen der Liganden mit siebengliedrigem Alizyklus.

Verbindung	Scorebereich	Top-5 im i.B.	i.B.
12a	98.07 – 97.61	5	77%
12b	101.76 – 101.13	5	
12c	97.21 – 95.22	3	
12d	97.63 – 94.55	4	
12e	107.03 – 105.04	5	
12f	84.98 – 83.87	1	

Trotz der größeren Unsicherheit für den bevorzugten Bindemodus der **12**-er-Ligandenserie werden die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der untersuchten Chinazolin- und Chinazolinonverbindungen nachfolgend unter der Annahme eines bevorzugten invertierten Bindemodus besprochen. Zuvor wird detaillierter auf die Auswahl der Dockingposen eingegangen.

3.3.3 Auswahl der Dockingposen

Aufgrund der engen Scorebereiche musste zusätzlich zum Score und der Platzierung der Pose unter den Top-5-Lösungen ein weiteres Entscheidungskriterium für die Auswahl einer Dockinglösung herangezogen werden. Die Top-Dockinglösung der Chinazolinonverbindungen stellte zumeist eine Dockingpose im invertierten Bindemodus mit einer Wasserstoffbrückendistanz zwischen Carbonyl-Sauerstoffatom und den Wassermolekülen dar (s. Kapitel 10.2.5). In einigen Fällen wurde eine alternative Pose mit besseren Wasserstoffbrückendistanzen (2.6 – 3.2 Å) unter den Top-5-Dockinglösungen ausgewählt. Die so ausgewählten Posen variieren im Vergleich zur Top-Pose um maximal 1.36 Scoreeinheiten und 1.33 Å und befinden sich im gleichen Cluster wie die Top-Pose. In Fällen, in denen der invertierte Bindemodus unter den Top-5-Lösungen nicht auftrat, wurde eine Pose aus den Top-10-Lösungen ausgewählt, oder auch eine Pose mit Distanzen zwischen 2.2 – 2.5 Å (**10f**, **11c**, **12c**, **12d**, **12f**, **13b**, **13c**, **13d**) für die Auswertung herangezogen. Die so ausgewählten Verbindungen variieren um maximal 1.14 Scoreeinheiten und 2.44 Å.

Für die chiralen Verbindungen wurde aus den Top-5-Dockinglösungen die sich im größten Cluster befindliche Pose, zumeist die Top-Pose, im invertierten Bindemodus ausgewählt. Für alle Liganden, außer für die *R*-Enantiomere von **16a**, **19b** und **19c** und die *S*-Enantiomere von **16c**, **17a**, **17c**, **18a**, konnte eine Dockinglösung im invertierten Bindemodus aus den Top-10-Posen identifiziert werden.

Die Häufigkeit des Auftretens des invertierten Bindemodus und die Interaktionen dieser Dockinglösungen in der AChE-Bindetasche werden im folgenden Teil besprochen.

3.3.4 Bevorzugung des invertierten Bindemodus im Docking

Die mit der Funktion GoldScore erhaltenen Dockinglösungen zeigen eine klare Präferenz für den invertierten Bindemodus. Piperidiny substituierte achriale Chinazolinone **10a** – **15a** und **10g** (vergl. Tabelle 3.1) zeigen im Docking unter den Top-5-Dockinglösungen ohne Wassermoleküle zu 69% und im Docking mit Wassermolekülen zu 100% den invertierten Bindemodus (s. Tabelle 10.14 in Kapitel 10). Piperidiny substituierte Verbindungen der Gruppen

I – IV (vergl. Tabelle 3.2) weisen ohne Wassermoleküle zu 64% und mit Wassermolekülen zu 82% den invertierten Bindemodus auf.

Die Top-5-Dockinglösungen aller Piperidinverbindungen zeigen ohne Wassermoleküle zu 66% und mit strukturellen Wassermolekülen zu 87% den invertierten Bindemodus.

Der invertierte Bindemodus ist auch für die übrigen Amins substituenten bevorzugt (Tabelle 3.16 sowie Tabelle 10.15 in Kapitel 10), wohingegen Pyrrolidin- und Imidazolverbindungen etwa zur Hälfte auch den klassischen Bindemodus zeigen. Die nicht konsistente Orientierung in der Bindetasche kann die teilweise relativ schwache Aktivität der Pyrrolidinverbindungen insbesondere von **11c**, **12c**, **15c**, **16c**, **17c** und **19c** erklären. Die Imidazolverbindungen liegen als einzige Verbindungen unter den Assaybedingungen nicht protoniert vor. Daraus kann gefolgert werden, dass ein protonierter Amins substituent die invertierte Bindung in die AChE-Bindetasche begünstigt.

Tabelle 3.16 Prozentuale Häufigkeit des invertierten Bindemodus (i.B.) unter den Top-5-Dockinglösungen sortiert nach den Substituenten.

Amin	Piperidin	Azepan	Pyrrolidin	Diethylamin	Tetrahydroisochinolin	Imidazol
Häufigkeit des i.B./5	87%	87%	57%	83%	97%	53%

Unter den Top-10-Posen der in Tabelle 3.1 gezeigten Chinazolinonverbindungen (ohne **13h**) werden 75% der trizyklischen und 97% der tetrazyklischen Verbindungen mit dem invertierten Bindemodus (Tabelle 3.17) gefunden.

Tabelle 3.17 Auftreten des invertierten Bindemodus unter den Top-10 und Top-5 Dockinglösungen von **10a-15f**.

Invertierter Bindemodus	Top-10		Top-5	
	Anzahl Posen	%	Anzahl Posen	%
Trizyklische Inhibitoren	135 / 180	75	74 / 95	78
Tetrazyklische Inhibitoren	174 / 180	97	89 / 90	99

Unter den Top-5-Posen zeigen sogar mehr Verbindungen, nämlich 78% der trizyklischen und 99% der tetrazyklischen Verbindungen, den invertierten Bindemodus. Dies verdeutlicht, dass der invertierte Bindemodus auf Top-5-Rängen und somit höheren Scores vermehrt auftritt und nicht nur statistisch, sondern auch energetisch begünstigt ist. (Datengrundlage für Top-5, s. Anhang Tabelle 10.14 und 10.15). Unter den Top-5-Dockinglösungen des gesamten Datensatzes (Tabelle 3.1 und 3.2, ohne **13h**) zeigen 80% der tetrazyklischen und 78% der trizyklischen Verbindungen den invertierten Bindemodus.

Ergebnis der Dockingstudien unter Einbeziehung ausschließlich der twist-sesselähnlichen Konformation der Ligandengrundgerüste **12** ist, dass eine energetische Bevorzugung des invertierten Bindemodus für die 54 AChE-Inhibitoren identifiziert wurde. Der invertierte Bindemodus tritt auf den Top-5-Posen gegenüber den Top-10-Rängen vermehrt auf und wird daher als präferierter Bindemodus für die hier untersuchten Chinazolinon- und Chinazolinverbindungen postuliert.

3.3.5 Charakteristika des invertierten Bindemodus

Typische Interaktionen, welche den invertierten Bindemodus charakterisieren, sind exemplarisch anhand der Chinazolinone **10a** und **13a** dargestellt (Abb. 3.11). Der invertierte Bindemodus ist durch die Platzierung des Aminsubstituenten in der CAS gekennzeichnet. Dabei liegt das Amin in einer Kation- π -Distanz von 4.0 Å zur Trp86-Ringebene. Das Carbonyl-Sauerstoffatom des Chinazolinons wird sehr wahrscheinlich durch eine Interaktion mit dem strukturellen Wassermolekül HOH954 stabilisiert (2.5 Å (**10a**), 2.6 Å (**13a**)). Das Ligandengrundgerüst wird zwischen den aromatischen Aminosäuren Trp286 und Tyr341 am Bindetascheneingang platziert. Bei Verbindung **13a** zeigt der ankondensierte Benzolring eine Ring-Ring-Distanz von 3.6 Å zu Trp286, was auf eine Stabilisierung durch hydrophobe π - π -Interaktionen schließen lässt.

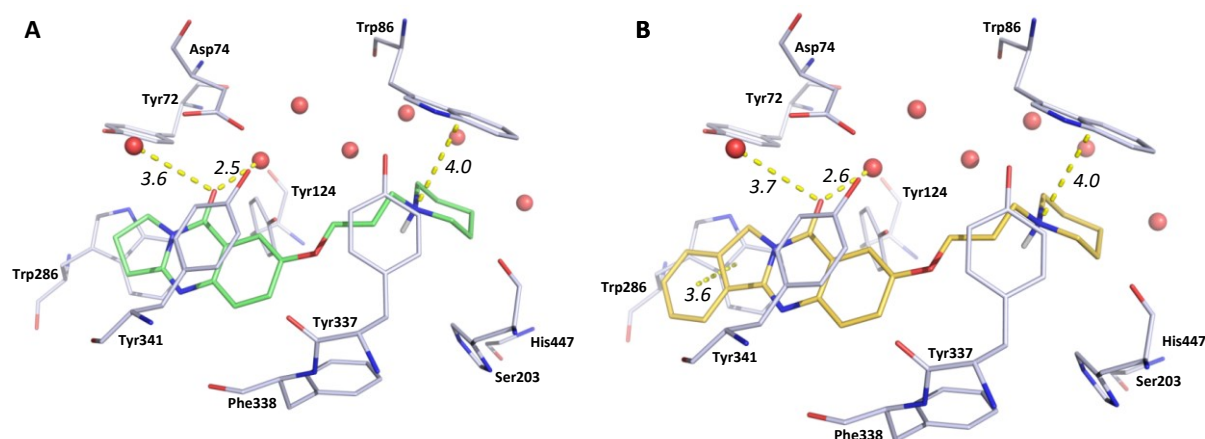


Abbildung 3.11 Charakteristische Interaktionen im invertierten Bindemodus von **10a** (grün, A) und **13a** (gelb, B): Kation- π -Interaktion des Aminsubstituenten zu Trp86, eine Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoffatoms zu den strukturellen Wassermolekülen sowie eine mögliche π - π -Interaktion des Ligandengrundgerüsts zu Trp286. Distanzen sind in kursiven Ziffern und der Einheit Å angegeben. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

Im Folgenden wird dargestellt, wie die Struktur-Aktivitätsbeziehungen anhand der qualitativen Auswertung der Protein-Ligand-Interaktionen im invertierten Bindemodus erklärt werden können.

3.3.6 Ligand-Enzym-Interaktionen: Amins substituent

Die Modulation der Affinität durch den Amins substituenten kann veranschaulicht werden, indem die $pI_{C_{50}}$ -Werte der Chinazolinone aus Tabelle 3.1 (ohne **13h** und **10g**) gegen die berechneten pK_a -Werte für die Amine aufgetragen werden (Abb. 3.12). Demnach gehören Piperidin- und Azepanliganden ($pK_a = 9.71, 9.58$) zur aktivsten Stoffklasse, wobei die Aktivität der geringfügig stärker basischen *N,N*-Diethylamin und Pyrrolidinverbindungen ($pK_a = 9.84$) etwas geringer ist.

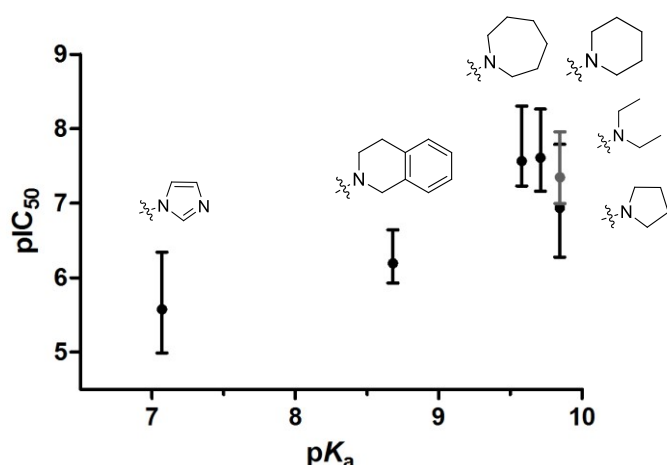


Abbildung 3.12 Auftragung der $pI_{C_{50}}$ -Werte gegen die Basizität (pK_a) des jeweiligen Amins. Die schwarze Linie gibt den $pI_{C_{50}}$ -Bereich und der Punkt den $pI_{C_{50}}$ -Mittelwert an (grau: *N,N*-Diethylamin). Die Verbindungen **16a** – **20g** wurden aufgrund ihrer niedrigen $pI_{C_{50}}$ -Werte zwischen 4.70 – 6.64 nicht in die Abbildung aufgenommen. Die Erstellung des Graphen erfolgte in GraphPad Prism 5.

Demgegenüber stellen die 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin- und Imidazolverbindungen einhergehend mit ihrer geringeren Basizität ($pK_a = 8.68, 7.07$) die am wenigsten aktiven Stoffklassen dar.

Zusätzlich zu dieser Analyse wurden die Kation- π -Wechselwirkungsdistancen der Aminsubstituenten bzw. die π - π -Interaktionsdistancen der Imidazolverbindungen in der Binde tasche vermessen (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18 Distanzen des Stickstoffatoms des jeweiligen Substituenten zur Trp86-Ringebene bzw. des geometrischen Zentrums des Imidazol- oder 1,2,3,4,-Tetrahydroisochinolinrings zu Trp86.

Substituent	Distanz zu Trp86	
	Kation- π [Å]	\emptyset [Å]
Piperidin	3.9 – 4.6	4.1
Azepan	3.9 – 4.4	4.2
<i>N,N</i> -Diethylamin	4.0 – 4.4	4.2
Pyrrolidin	4.1 – 4.3	4.2
1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin	4.5 – 5.5	4.9
	π - π [Å]	\emptyset [Å]
1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin	3.6 – 4.0	3.8
Imidazol	3.2 – 5.3	3.8

Literaturbekannte Distanzen dieser Wechselwirkungen sind 3.4 – 4.0 Å für Kation- π sowie 3.4 – 3.6 Å für parallel zueinander verschobene Ring-ebenen.⁵⁴ Für die Distanzmessungen wurden die invertierten Bindemodi aller Verbindungen herangezogen (Datensatz aus Tabelle 3.1 und 3.2).

Die Dockinglösungen alizyklischer Amine und *N,N*-diethylaminsubstituierter Verbindungen zeigen generell kürzere Distanzen zu Trp86 (4.1 und 4.2 Å) als dies für das sterisch anspruchsvolle 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin mit durchschnittlich 4.9 Å der Fall ist. Bei letzteren Liganden kann das Stickstoffatom aufgrund des ankondensierten Benzolringes nicht in akzeptablen Kation- π -Distanzen zum Trp86 platziert werden (Abb. 3.13, Tabelle 3.18). Die π - π -Distanzen liegen mit durchschnittlich 3.8 Å nur geringfügig über dem literaturbekannten Bereich.

Die Position der Imidazolringe in der CAS ist generell nicht einheitlich, was durch den relativ großen Distanzbereich von 2.1 Å verdeutlicht wird. Die diversen Imidazolplatzierungen können durch die fehlende Ladung am Amins substituenten begründet sein.

Die ermittelten Distanzen des Amins zu Trp86 können dahingehend interpretiert werden, dass das positiv geladene Stickstoffatom der Amins substituenten als Ankergruppe fungiert und für eine richtige Position des Amins in der CAS-Region und somit des gesamten Liganden in der Bindetasche sorgt.

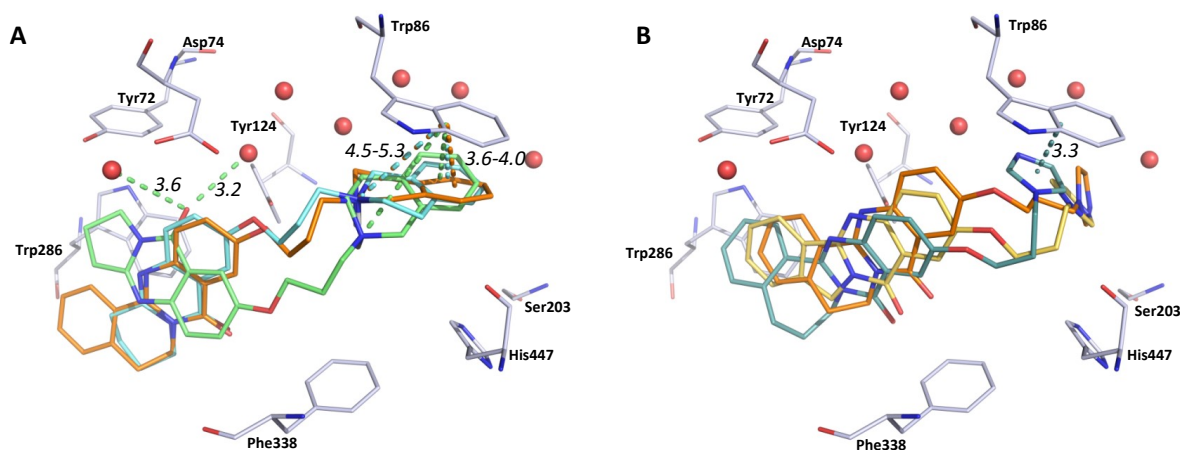


Abbildung 3.13 A) Dockinglösungen für die Chinazolinone **10e** (grün), **11e** (hellblau) und **14e** (orange). Die Lösungen zeigen Kation- π -Distanzen >4.5 Å und π - π -Distanzen zwischen 3.6 – 4.0 Å zur Indolringebene. B) Imidazolverbindungen **13f** (gelb), **14f** (orange) und **15f** (dunkelblau) zeigen keine konservierte Lage des Imidazolringes in der CAS.

Substituenteneffekte können auch durch den per-Atom-Score deutlich gemacht werden. Dabei wird der Score der jeweiligen Dockinglösung durch die Anzahl der schweren Atome (das sind alle Atome außer Wasserstoffatome) dividiert. Der per-Atom-Score gibt dadurch den Beitrag eines jeden Atoms zum Score wieder. Eine deutliche Abstufung lässt sich für die

Chinazolinonverbindungen (aus Tabelle 3.1) erkennen und ist in Tabelle 3.19 zusammengefasst.

Tabelle 3.19 Durchschnittswerte der per-Atom-Scores für die Substituenten **a-d** (**a**: Piperidin, **b**: Azepan, **c**: Pyrrolidin, **d**: *N,N*-Diethylamin) im Vergleich zu den Substituenten **e** und **f** (**e**: 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin, **f**: Imidazol).

Grundgerüst	Ø Per-Atom-Score a-d	Ø Per-Atom-Score e und f	Differenz
10	3.95	3.44	0.51
11	3.89	3.48	0.41
12	3.82	3.49	0.33
13	3.74	3.31	0.43
14	3.63	3.19	0.44
15	3.25	2.95	0.30

Diese Daten zeigen, dass die Beiträge der einzelnen Atome für die Imidazol- (**e**) und 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolinverbindungen (**f**) um ca. 0.30 – 0.52 Einheiten schlechter sind als für die aktiveren Piperidin- (**a**), Pyrrolidin- (**b**), Azepan- (**c**) und *N,N*-Diethylaminverbindungen (**d**). Der per-Atom-Score kann jedoch nicht zur Erklärung der schwächeren Aktivitätswerte (>200 nM) der Pyrrolidinverbindungen, insbesondere von **11c**, **12c** und **15c**, herangezogen werden, da diese Verbindungen jeweils einen ähnlichen per-Atom-Score wie die *N,N*-Diethylaminverbindungen **d** zeigen. Eine Übersicht der per-Atom-Scores aller Verbindungen befindet sich in Tabelle 10.13 im Anhang.

3.3.7 Ligand-Enzym-Interaktionen: Ligandengrundgerüst

Das Ligandengrundgerüst der hier untersuchten Verbindungen wird im invertierten Bindemodus am Bindetascheneingang platziert. Dabei wird der aromatische Teil der tetrazyklischen Verbindungen in π - π -Distanzen zu Trp286 platziert (3.4 – 3.6 Å für parallel zueinander verschobene Ringflächen).

Für **achirale tetrazyklische Chinazolinongrundgerüste 14a – 14f** und **15a – 15f** mit alizyklischem sechs- und siebengliedrigem Ring konnten π - π -Distanzen zur Trp286-Ringfläche identifiziert werden. Diese Distanz war optimiert, wenn das Stickstoffatom in *para*-Position zur Carbonylgruppe anstelle der Carbonylgruppe selbst zu den Wassermolekülen orientiert ist (Abb. 3.14).

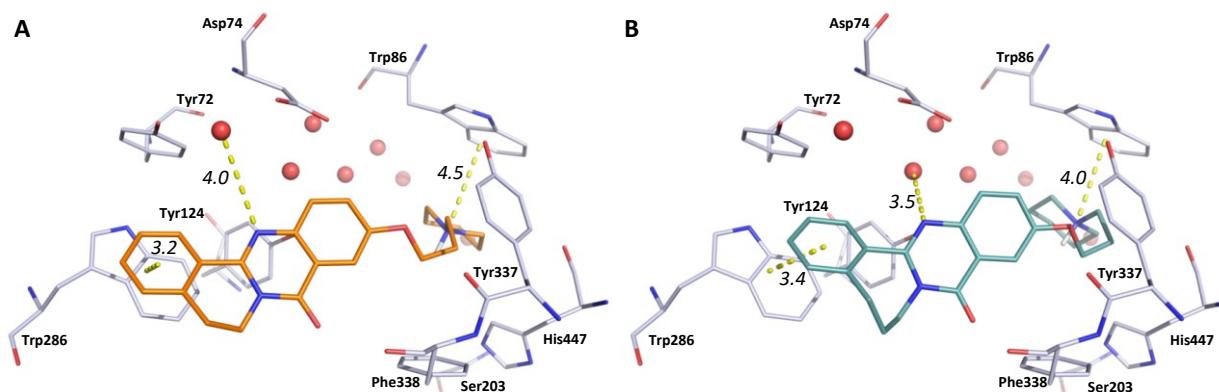


Abbildung 3.14 Aufgrund verbesserter π - π -Interaktionen von ankondensiertem Benzolring und Trp286 ist die Carbonylgruppe der Inhibitoren **14a** (orange, A) und **15a** (blau, B) bezüglich der Wassermoleküle um 180° gedreht. Distanzen sind in kursiven Ziffern und in \AA angegeben. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, Wehle *et al.*¹⁴¹ © 2014 Elsevier.

Die π - π -Interaktionsdistanzen liegen im Mittel (ohne die Imidazol und 1,2,3,4-Tetrahydroisochinoline) bei 3.6 \AA und damit im oberen Bereich der literaturbekannten Werte für parallel zueinander verschobene Ringebenen.⁵⁴ Die Wasserstoffbrücke des C=N-Akzeptors zu HOH954 oder HOH952 ist mit durchschnittlich 3.4 \AA und 3.8 \AA länger als die literaturbekannten Distanzen zwischen $2.6 - 3.2 \text{ \AA}$.⁵⁴

Für die Imidazol- und 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-Verbindungen **13e – 13f**, **14e – 14f** und **15e – 15f** ergeben sich Distanzen des ankondensierten Benzolringes zu Trp286 zwischen $3.5 - 4.4 \text{ \AA}$, wobei der Mittelwert mit 4.1 \AA über den literaturbekannten Distanzen liegt. Die Platzierung des Aminsubstituenten in der CAS beeinflusst die Platzierung des gesamten Ligandengrundgerüsts. Die nicht idealen Wechselwirkungsdistancen im Bereich des Ligandengrundgerüsts von **13e**, **13f**, **14e**, **14f**, **15e** und **15f** dürfte mitverantwortlich für die schwächere Affinität dieser Liganden sein ($IC_{50} = 227 - 10 \cdot 10^3 \text{ nM}$).

Für die **achiralen trizyklischen Chinazolinongrundgerüste 10a – 10f**, **11a – 11d**, **11f**, **12a – 12f** sowie die tetrazyklischen Liganden **13a – 13d** ist das Carbonyl-Sauerstoffatom zu den Wassermolekülen hin orientiert. Die Stabilisierung des Ligandengrundgerüsts kann in diesem Fall auf einer Wasserstoffbrücke zu HOH954 beruhen. Die gemessenen Distanzen liegen im Durchschnitt bei 2.7 \AA . Die **trizyklischen achiralen Chinazoline 20a** und **20g** (Gruppe **V**) zeigen neben der Platzierung des Piperidins in der CAS ebenfalls eine zusätzliche Stabilisierung des Ligandengrundgerüsts (Abb. 3.15). Für die Bindepose von **20a** wird eine Distanz von 4.3 \AA zum Sauerstoffatom von Trp341 identifiziert, zusätzlich kann von einer π - π -Wechselwirkung zur Trp341 Ringebene ausgegangen werden. Diese Distanzen liegen etwas über- bzw. unterhalb der literaturbekannten Werte. Auf Grundlage der IC_{50} -Werte von 66.5 nM (**20a**) und 88.4 nM (**20g**) kann vermutet werden, dass sich diese Distanzen durch Induced-fit-Mechanismen beim tatsächlichen Bindungsereignis optimieren, denn der Ligand zeigt eine vergleichbare Inhibition zu **10a** ($IC_{50} = 69.2 \text{ nM}$). Aufgrund des Hexyl-Linkers

wird das Chinazolingerüst von **20g** näher an Trp286 sowie Tyr72 platziert als **20a**. Das Stickstoffatom in *para*-Position zur Carbonylfunktionalität zeigt eine Wasserstoffbrückendistanz von 3.3 Å zu HOH954 sowie eine Distanz von 3.4 Å zu Tyr72. Ligand **20g** zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 88.4 nM zusammen mit **20a** (IC₅₀ = 66.5 nM) die höchste Affinität der Verbindungen aus Gruppe II, IV und V (vergl. Tabelle 3.2). Es wird angenommen, dass Ligand **20g** durch Interaktionen mit dem Protein gut in der Bindetasche stabilisiert wird. Neben der Möglichkeit der Kation- π -Wechselwirkung mit Trp86 kann das Ligandengerüst vermutlich eine Wasserstoffbrücke zu Tyr72 ausbilden.

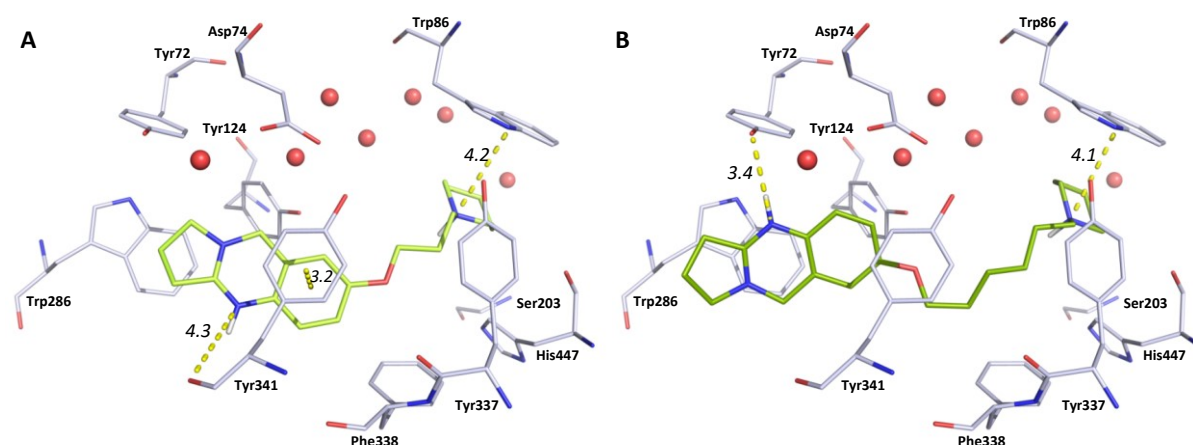


Abbildung 3.15 A) Der trizyklische Ligand **20a** (hellgrün) zeigt eine Kation- π -Distanz von 4.2 Å in der CAS sowie eine vermeintliche Stabilisierung des Chinazolins durch Tyr341. B) Das Chinazolin **20g** (dunkelgrün) kann durch eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen dem protonierten Stickstoffatom und Tyr72 in der Bindetasche stabilisiert werden. Distanzen sind in kursiven Ziffern in Å angegeben. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Darras, *et al.*¹⁴² © 2014 American Chemical Society.

Die achiralen Chinazolinonverbindungen mit gesättigten Amins substituenten zeigen gesamt betrachtet eine Platzierung des Amins in Kation- π -Distanzen zu Trp86 in der Nähe der CAS und zusätzlich dazu eine Stabilisierung des Ligandengerüsts durch π - π -Wechselwirkungen mit Trp286 sowie Wasserstoffbrücken zu den Wassermolekülen HOH954 oder HOH952. Die dadurch mögliche Stabilisierung der Liganden in der Bindetasche kann deren hohe Aktivität in der Inhibition von AChE erklären.

Chirale tetrazyklische Verbindungen der Gruppe I und II (s. Tabelle 3.2) sind nicht planar und verlieren damit die Möglichkeit, eine π - π -Interaktion mit Trp286 am Bindetascheneingang einzugehen. Eine mögliche Stabilisierung dieser Liganden besteht durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und den Wassermolekülen in der Bindetasche. Eine derartige Interaktion erscheint für das *S*-Enantiomer von **16a** und die *R*-Enantiomere von **16b** und **16c** plausibel, denn das Carbonyl-Sauerstoffatom ist in Richtung der Wassermoleküle orientiert (Abb. 3.16).

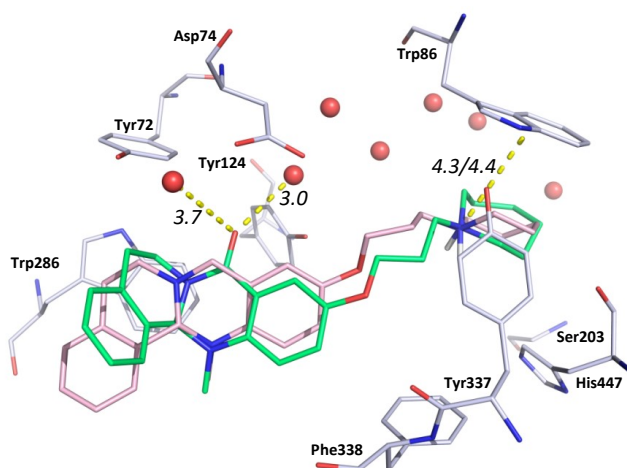


Abbildung 3.16 Interaktionen in der Binde-tasche von **16b** (grün, $IC_{50} = 250$ nM) und **17a** (rosa, $IC_{50} = 530$ nM). Das Liganden-grundgerüst von **16b** wird durch die Wasserstoffbrücke von 3.0 Å stabilisiert. Dies ist für **17a** nicht möglich. Distanzen sind in kursiven Ziffern in der Einheit Å angegeben.

Für diese Enantiomere konnten vermeintliche Wasserstoffbrückendistanzen von 3.6 Å und 3.2 Å zu HOH952 und HOH954 ermittelt werden. Die Verbindungen zeigen zwar eine günstige Position des Aminsubstituenten in der CAS, jedoch kann das Ligandengrundgerüst nicht auf die gleiche Weise wie das der achiralen Chinazolinone stabilisiert werden. Die übrigen Enantiomere zeigen entweder den klassischen Bindemodus (*R*-Enantiomer von **16a**, *S*-Enantiomer von **16c**) oder die Carbonylgruppe ist nicht zu den Wassermolekülen orientiert (*S*-Enantiomer von **16b**).

Die ermittelten strukturellen Merkmale werden so interpretiert, dass neben der Wechselwirkung des Amins in der CAS auch die Stabilisierung des Ligandengrundgerüsts erforderlich ist, um Inhibitoren im hochaffinen nanomolar Bereich zu erhalten. Die chiralen tetra-zyklischen Verbindungen **16a** – **16c** (Gruppe I) zeigen eine Inhibition mit IC_{50} -Werten zwischen 250 und 720 nM, wohingegen die korrespondierenden achiralen Chinazolinone die AChE im Bereich von 5.0 – 91.1 nM inhibieren (Ausnahme **15c**: $IC_{50} = 529$ nM, Tabelle 3.1). Dieser Befund wird auch durch die Inhibitions-werte der chiralen Verbindungen **17a** – **17c** ($IC_{50} = 530$ nM – $19 \cdot 10^3$ nM, Gruppe II) im Vergleich zu den Inhibitions-werten der korrespondierenden Chinazolinonverbindungen **16a** – **16c** ($IC_{50} = 230$ – 720 nM, Gruppe I) gestützt.

Die für die chiralen Verbindungen aus Tabelle 3.2 besprochenen Ergebnisse sollten auch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass das Docking unter der Annahme eines ähnlichen Bindemodus für die beiden Enantiomere ausgewertet wurde. Letztlich kann die schwächere Aktivität der chiralen Verbindungen im Vergleich zu den achiralen ihren Ursprung in der unterschiedlichen Affinität der Enantiomere zu AChE haben. In einem solchen Fall würde der IC_{50} -Wert vermutlich den Mittelwert aus beiden Aktivitäten darstellen.

Für die **trizyklischen chiralen Liganden 18a** und **18g** (Gruppe III, s. Tabelle 3.2) ist mit Ausnahme des *S*-Enantiomers von **18a** der invertierte Bindemodus unter den Top-5-Lösungen

bevorzugt. Die Dockinglösungen zeigen ebenfalls die für den invertierten Bindemodus charakteristischen Protein-Ligand-Interaktionen (Abb. 3.17). Die IC_{50} -Werte für diese Verbindungsklasse liegen hier allerdings im einstellig mikromolaren Bereich (6.9 und 3.3 μM). Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen in der Testung Ausreißer darstellen, da sie alle Kriterien, die bislang für nanomolare Inhibitoren identifiziert wurden, erfüllen (Piperidinylsubstituent, relativ planares Chinazolinongrundgerüst). Aufgrund des trizyklischen Ligandengrundgerüsts bei **18a** und **18g** ändert sich die Ligandengeometrie durch das chirale Zentrum nicht so stark, wie dies bei den tetrazyklischen Verbindungen **16a-g** und **17a-g** beobachtet wurde. Aus diesem Grund sollte das Vorliegen von Verbindung **18a** und **18g** als Racemate keine so große Auswirkung auf den IC_{50} -Wert haben, wie dies für tetrazyklische chirale Verbindungen angeführt wurde.

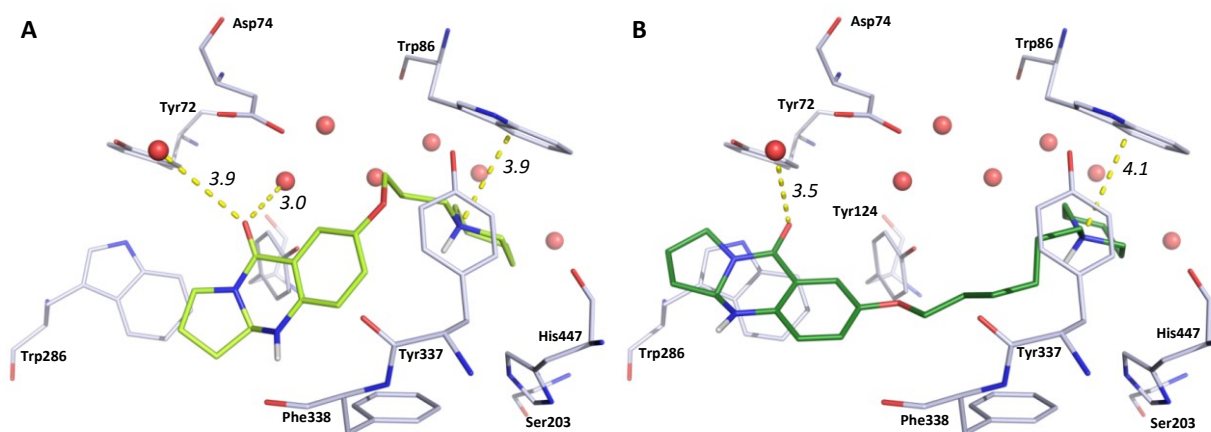


Abbildung 3.17 Im Docking identifizierte invertierte Bindepose der *R*-Enantiomere von **18a** (hellgrün, A) und **18g** (dunkelgrün, B). Das Carbonyl-Sauerstoffatom zeigt putative Wasserstoff-brücken-distanzen zu den Wassermolekülen und der Piperidinylsubstituent liegt in Kation- π -Distanzen zum Trp86. Distanzen sind in kursiven Ziffern in der Einheit Å angegeben.

Für die **chiralen Verbindungen 19a – 19c** (Gruppe IV) wurden relativ schwache IC_{50} -Werte zwischen 510 nM und $8.9 \cdot 10^3$ nM bestimmt. Eine mögliche Ursache für deren schwache Inhibition kann sein, dass die Liganden nicht gut in der Bindetasche stabilisiert werden. Anhand der Dockinglösungen konnten keine Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein identifiziert werden. Die etwas bessere Aktivität ($IC_{50} = 400$ nM) der Verbindung **19g** kann durch eine vermeintliche Wasserstoffbrücke des protonierten Stickstoffs in *para*-Position zur Carbonylgruppe zu HOH952 erklärt werden. Verbindung **19g** besitzt im Gegensatz zu den Liganden **19a – 19c** einen Hexyl-Linker. Die Zusammenhänge zwischen Aktivität und Länge des Linkers werden im folgenden Kapitel dargestellt und diskutiert.

3.3.8 Einfluss der Linkerlänge: Propyl- vs. Hexyl-Linker

Die Inhibitoren **10a**, **16a**, **17a**, **18a**, **19a**, **20a** und **10g**, **16g**, **17g**, **18g**, **19g** sowie **20g** unterscheiden sich in der Linkerlänge (Propyl vs. Hexyl), zeigen aber eine ähnliche Affinität in der Enzymhemmung der AChE (vergl. Tabelle 3.1 und 3.2). Die ähnliche Affinität der Verbindungen mit Propyl- und Hexyl-Linker resultiert vermutlich aus der vergleichbaren Stabilisierung beider Ligandentypen in der Bindetasche. Für Liganden mit Propyl-Linker ist die Distanz zu HOH954 für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke optimiert ($\varnothing = 2.8 \text{ \AA}$ für **10a**, **16a** und **18a**), während die Distanz zu HOH952 direkt am Bindetascheneingang deutlich länger ist ($\varnothing = 3.7 \text{ \AA}$). Für **10a** ergeben sich Distanzen des Carbonyl-Sauerstoffatoms zu HOH952 (3.6 \AA) und HOH954 (2.6 \AA) (Abb. 3.18).

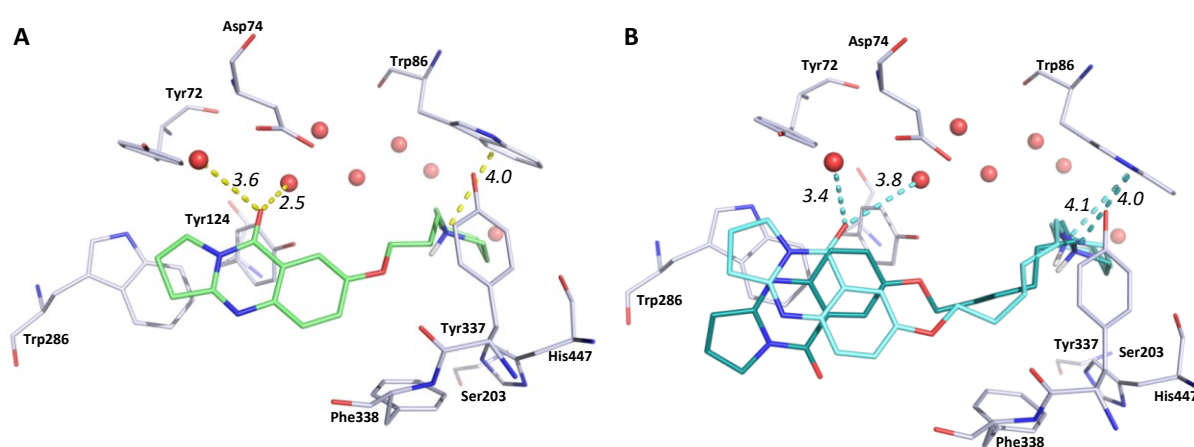


Abbildung 3.18 A) Invertierter Bindemodus des Propyl-Liganden **10a** (hellgrün). B) Invertierter Bindemodus des Hexyl-Linkers **20g** als Top-Pose (dunkelblau) und zweitbeste Pose (hellblau).

Unter den Top-5-Lösungen von **10g** ist der Carbonyl-Sauerstoff nur in einer Lösung zu den Wassermolekülen orientiert. In den übrigen Lösungen wird auch keine C=N \cdots O Wasserstoffbrücke identifiziert.

Die fehlende Stabilisierung des Ligandengrundgerüsts kann den etwas schwächeren IC₅₀-Wert erklären. Die Pose auf dem zweiten Rang zeigt etwas längere Distanz als für Wasserstoffbrücken übliche Werte von 3.4 \AA und 3.8 \AA zu HOH952 und HOH954.

Die Liganden mit Hexyl-Linker zeigen eine optimierte Wasserstoffbrückendistanz zu HOH952: im Mittel ergeben sich Distanzen von 3.1 \AA für **18g**, **19g** und **20g** (**16g**: 3.9 \AA). Die Dockinglösung der Verbindungen **17a** und **17g** zeigt keine Wasserstoffbrückendistanz in der Bindetasche. Die Inhibition dieser Liganden im mittleren dreistellig nanomolaren Bereich ist neben der Kation- π -Wechselwirkung mit Trp86 vermutlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen.

Die vergleichbar gute Affinität sowohl der Verbindungen mit Propyl- als auch Hexyl-Linker verdeutlicht, dass etwaige Entropieverluste durch eingeschränkte Rotations- und Translationsfreiheitsgrade nach der Ligandenassoziation durch enthalpische Beiträge aufgewogen werden. Die vergleichbare Stabilisierung der Liganden in der Bindetasche wird vor allem den beiden am Bindetascheneingang lokalisierten Wassermolekülen (HOH954 und HOH952) zugeschrieben.

Bei den chiralen Verbindungen ist demgegenüber ein unterschiedlicher Beitrag der Enantiomere zur Affinität wahrscheinlich: Für beide Enantiomere von **19a**, das *S*-Enantiomer von **18a** und **17a** sowie das *R*-Enantiomer von **16a** wird entweder keine C=N...O Wasserstoffbrücke, oder nicht der invertierte Bindemodus unter den Top-5-Lösungen identifiziert.

Anhand der Dockinglösungen konnten drei wesentliche Interaktionen der Chinazolin- und Chinazolinoninhibitoren in der AChE-Bindetasche herausgearbeitet werden. Neben der Kation- π -Wechselwirkung der protonierten Aminosubstituenten mit Trp86 in der Nähe der CAS werden die Ligandengrundgerüste am Bindetascheneingang vermutlich durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Planare tetrazyklische Verbindungen zeigen darüber hinaus π - π -Interaktionsdistanzen zu PAS-formenden Aminosäuren, wodurch eine weitere Stabilisierungsmöglichkeit dieser Ligandentypen besteht.

3.4 Fazit zu Strukturmerkmalen hochaffiner Chinazolinoninhibitoren der AChE

Für aminsubstituierte Chinazolinon- und Chinazolinliganden, sowie chiralen Derivaten mit C-N-Einfachbindung, wurde in der AChE-Bindetasche durch die Auswahl von sieben strukturellen Wassermolekülen ein Modell zur Beschreibung eines bevorzugten Bindemodus erstellt. Für diese Liganden stellt der invertierte Bindemodus die bevorzugte Ligandenplatzierung in der AChE-Bindetasche dar. Hauptcharakteristikum des invertierten Bindemodus ist, dass der Aminosubstituent in der Nähe der CAS platziert wird, während das Ligandengrundgerüst am Eingang der Bindetasche lokalisiert ist.

Anhand der Dockinglösungen wurden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Chinazolinon- und Chinazolinliganden in der AChE-Bindetasche durch die qualitative Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen erklärt. Strukturelle Charakteristika für hochaffine ein- bis zweistellig nanomolare Inhibitoren sind:

1) Gesättigte basische Aminosubstituenten ($pK_a > 9$), wobei das protonierte Stickstoffatom in Kation- π -Distanzen zu Trp86 in der Nähe der CAS platziert werden kann (z.B. Piperidin).

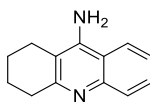
2) Achirale tetrazyklische Chinazolinongrundgerüste. Diese relativ planaren Liganden zeigen eine gute Komplementarität zur AChE-Bindetasche. Das Chinazolinongrundgerüst wird mittels Wasserstoffbrücken des Carbonyl-Sauerstoffatoms, einem Wasserstoffbrücken-Donor, oder des C=N-Wasserstoffbrücken-Akzeptors zu den strukturellen Wassermolekülen stabilisiert. Zusätzlich dazu konnten zwischen dem aromatischen Teil der tetrazyklischen Grundgerüste und Trp286 Distanzen ermittelt werden, die für hydrophobe π - π -Interaktionen bekannt sind. Dadurch kann auf eine zusätzliche Stabilisierung tetrazyklischer Ligandengrundgerüste in der Bindetasche geschlossen werden, die für trizyklische Grundgerüste nicht möglich ist. Einhergehend mit dieser Analyse erweisen sich die Liganden **13a – 13d** und **14a – 14d** als aktivste Inhibitor-Klasse der an AChE getesteten Verbindungen (s. Tabelle 3.1).

4. *In silico* Studien von Bis-Tacrinderivaten in AChE

Tacrin (1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-amin) ist einer der ersten, in der Bundesrepublik Deutschland 1995 zur Behandlung von Morbus Alzheimer zugelassenen Wirkstoffe (Abb. 4.1).¹⁶⁷ Dieser Wirkstoff wurde um 1940 entwickelt und sollte ursprünglich als Antibiotikum im Krieg eingesetzt werden.¹⁶⁸ Der erste klinische Test an Alzheimer Patienten mit Tacrin fand 1986 statt, wobei das Medikament die kognitive Leistung der Patienten verbesserte.¹⁶⁹ Nur wenige Jahre nach der Zulassung musste Tacrin allerdings aufgrund seiner Hepatotoxizität wieder vom Markt genommen werden.⁷⁵

Tacrin inhibiert TcAChE mit einem IC₅₀-Wert von 8.2 nM und hAChE mit einem IC₅₀-Wert von 205 nM.^{170, 171} Aufgrund seiner Bindung an das aktive Zentrum der Bindetasche, die durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt wurde,^{172, 173} stellt Tacrin ein interessantes Pharmakophor zur Untersuchung der Interaktion von Inhibitoren mit der AChE dar.

Nach den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) von 1998 definiert sich ein Pharmakophor als „Ensemble sterischer und elektronischer Eigenschaften, welche eine optimale supramolekulare Interaktion mit einem biologischen Ziel sicherstellen, oder eine biologische Antwort auslösen bzw. verhindern“.¹⁷⁴ Bivalente Liganden mit zwei gleichen (homobivalent)¹⁷⁵ oder zwei unterschiedlichen (heterobivalent) Pharmakophoren sind für den Einsatz an der AChE interessant, da neben der CAS am Ende der 20 Å langen Bindetasche, mit einer passenden Verknüpfungslänge, auch die PAS am Eingang der AChE-Bindetasche adressiert werden kann.



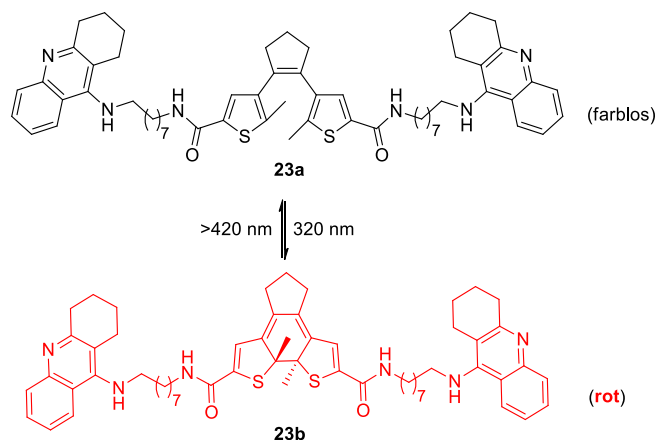
3

Abbildung 4.1 AChE Inhibitor der 1. Generation: Tacrin **3**.

4.1 Bis-Tacrine mit photochromer Einheit

In Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Prof. M. Decker und Prof. B. König (Universität Regensburg) wurden zwei Tacrineinheiten über einen Oktylenlinker durch Amidbindung mit einer photochromen 1,2-Dithienylethen (DTE) Einheit^{176,177} verknüpft und so eine homobivalente Verbindung hergestellt.¹⁷⁸ Merkmal der zentralen photochromen Struktureinheit ist, dass die flexible Ring-geöffnete Form **23a** durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 320 nm in die Ring-geschlossene Form **23b** überführt werden kann (Schema 4.1).¹⁷⁸ Die Bis-Tacrinverbindungen **23a** und **23b** wurden als Inhibitoren der AChE

und BChE getestet. Die Synthese und Messung der IC₅₀-Werte erfolgte von Dr. X. Chen (Universität Regensburg).



Schema 4.1 Bis-Tacrinverbindungen mit photochromer Einheit in der Linkerstruktur.

Sowohl für die homobivalenten Verbindungen **23a** und **23b**, als auch die freien Säuren, die Vorstufen der bivalenten Form darstellen, wurden die IC₅₀-Werte an AChE und BChE bestimmt (Tabelle 4.1). Die homobivalenten Verbindungen **23a** und **23b** zeigen IC₅₀-Werte von 4.3/5.9 und 1.8/7.2 nM an AChE bzw. BChE, wobei die Säuren **24a** und **24b** eine Inhibition der AChE und BChE mit 21.1/10.7 und 20.3/21.5 nM aufweisen.

Trotz der vergleichbaren inhibitorischen Wirksamkeit der Ring-geöffneten und Ring-geschlossenen Bis-Tacrinverbindung **23a** und **23b** zeigen diese Liganden unterschiedliche Hill-Koeffizienten.¹⁷⁸

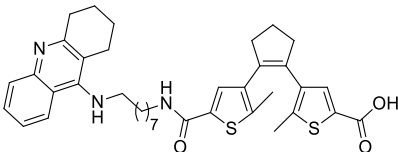
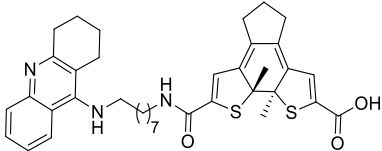
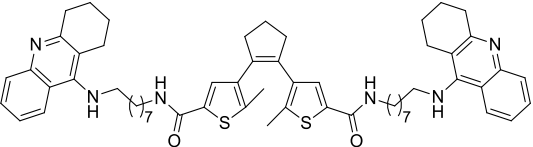
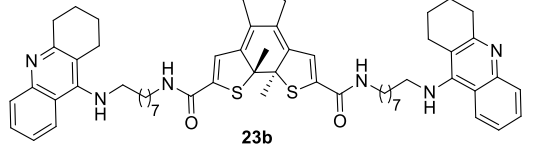
Aus den Konzentrations-Wirkungskurven, bei denen der Logarithmus der Inhibitor-konzentration auf der x-Achse gegen die Enzymaktivität auf der y-Achse aufgetragen wird, kann durch einen nicht-linearen Fit die Steigung und damit der Hill-Koeffizient bestimmt werden.¹⁰¹ Eine weitere Möglichkeit ist die Berechnung über die folgende Formel (4.1), wobei [I] die Inhibitorkonzentration und h der Hill-Koeffizient ist:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{100}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[I]}\right)^h} \quad (4.1)$$

Der Hill-Koeffizient steht in direkter Beziehung mit der Stöchiometrie der Enzym-Inhibitor Interaktion, denn Enzyme liegen auch als Oligomere mit multiplen gleichwertigen katalytischen Zentren vor an welche Liganden binden können. Der Hill-Koeffizient gibt die Kooperativität dieser Bindungszentren an.¹⁷⁹ Kooperativität bedeutet, dass die Bindung eines Liganden an einer Bindestelle die Affinität einer weiteren Bindestelle für diesen Liganden beeinflusst. Dies wurde zum ersten Mal am Beispiel des Hämoglobins, welches vier Sauer-

stoffmoleküle binden kann, erklärt.^{180, 181} Für die Wechselwirkung von Proteinen mit Liganden sind drei verschiedene Situationen möglich: 1) Mit $h = 1$ besitzt das Enzym keine kooperativen Eigenschaften. 2) Beim Vorliegen von $h = n$, mit n entsprechend der Anzahl der Bindungsstellen, zeigt das Enzym ideale kooperative Eigenschaften. 3) Unterschiedliche Stadien der Kooperativität liegen bei $h > 1$ oder $h < 1$ vor. Diese Hill-Koeffizienten können einerseits auf positive bzw. negative Kooperativität hindeuten. Bei positiver Kooperativität ($h > 1$) ist die Bindung eines zweiten Liganden erleichtert, bei negativer Kooperativität ($h < 1$) erschwert. Andererseits können diese Werte auch diagnostisch für eine nicht-ideale Inhibition sein und durch nicht-spezifische Bindungen, z.B. durch Einwirkung von Denaturierungsmitteln oder Mizellenbildung des Liganden, hervorgerufen werden. Weiterhin können Hill-Koeffizienten mit $h > 1$ auch auf das Vorliegen von sog. „tight-binding“ Inhibitoren hindeuten.¹⁸²

Tabelle 4.1 IC_{50} -Werte der photochromen freien Säuren **24a** und **24b** sowie der entsprechenden Bis-Tacrinverbindungen **23a** und **23b**. Tabelle modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

Ligand	IC_{50} (<i>eeAChE</i>) [nM] ($pIC_{50} \pm SEM$)	IC_{50} (<i>eqBChE</i>) [nM] ($pIC_{50} \pm SEM$)	Hill-Koeffizient an AChE
Tacrin·HCl	15.6 (7.81 ± 0.05)	3.3 (8.48 ± 0.05)	0.9
 24a	21.1 (7.68 ± 0.02)	10.7 (7.97 ± 0.02)	2.4
 24b	20.3 (7.69 ± 0.03)	21.5 (7.67 ± 0.02)	2.3
 23a	4.3 (8.37 ± 0.02)	5.9 (8.23 ± 0.07)	2.1
 23b	1.8 (8.74 ± 0.02)	7.2 (8.14 ± 0.06)	1.2

IC_{50} Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Messungen; $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$.

Die Inhibitoren **23a** und **23b** zeigen an der *eeAChE* einen Hill-Koeffizienten von 2.1 bzw. 1.2. Zur Erklärung der unterschiedlichen Hill-Koeffizienten wird die Hypothese aufgestellt, dass

der Inhibitor **23a** einerseits mit der CAS und andererseits mit der PAS wechselwirkt.¹⁷⁸ Für **23b** (Hill-Koeffizient: 1.2) wird vermutet, dass diese Isoform aufgrund der rigiden photochromen Einheit lediglich mit der CAS und nicht mit der PAS interagieren kann.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die CAS und PAS der AChE tatsächlich zwei voneinander unabhängige Bindestellen darstellen, da die beiden Bindestellen Bestandteil desselben Bindetaschentunnels sind. Aufgrund der strukturellen Nähe von CAS und PAS in AChE muss sich ein Inhibitor an der PAS vorbei bewegen, um an der CAS zu binden. Bei der Größe der hier vorliegenden Inhibitoren ist es unwahrscheinlich, dass die PAS gänzlich frei bleiben kann, da der Inhibitor mit dem zweiten Linker und dem zweiten Tacrinsubstituenten sonst aus der Bindetasche in das Solvens hineinreichen müsste.

Zunächst sollte die Hypothese überprüft werden, ob die gleichzeitige Bindung eines Inhibormoleküls in zwei aktiven Zentren im AChE-Dimer oder Tetramer möglich ist und der Hill-Koeffizient dadurch zustande kommt. Das Enzym AChE liegt *in vivo* sowohl als Monomer, Dimer und Tetramer vor, wobei das Tetramer die häufigste Form darstellt.¹⁸³ Bei der Lagerung gelöster AChE kommt es zur Disaggregation, so dass im enzymatischen Assay alle drei Formen der AChE vorliegen können.¹⁸³

Das kristallisierte AChE-Dimer der PDB-ID: 4EY7 (*hAChE*) ist C₂ symmetrisch. Die Bindetascheneingänge der beiden Monomere befinden sich daher an zwei gegenüberliegenden Seiten wodurch die gleichzeitige Bindung eines Konstitutionsisomers **23a** oder **23b** in beide Bindestellen ausgeschlossen ist. Da auch das AChE-Tetramer (PDB-ID: 4A16, *mAChE*) aus zwei C₂-symmetrischen Dimeren besteht, liegen die Bindetaschen zweier Dimereinheiten um 90° verschoben und sind nicht gleichzeitig für die Liganden **23a** oder **23b** zugänglich. **23a** und **23b** wurden in MOE nach der allgemeinen Vorschrift zur Ligandenvorbereitung (Kapitel 3.2.1) mit gestaffelter linearer Orientierung der Alkylketten aufgebaut und weisen in der gestreckten Konformation eine Distanz der beiden Acridin-Stickstoffatome von 34.3 Å bzw. 32.4 Å auf. Für die gleichzeitige Bindung in zwei PAS-Bindestellen zweier Monomere ist eine minimale Distanz von ca. 38.3 Å notwendig, für die Bindung in zwei aktiven Zentren sind mindestens 81.1 Å Länge nötig. Die Distanzen wurden ausgehend von den C α -Atomen der jeweiligen AS bestimmt: 21.4 Å, His447 (CAS) zu Trp286 (PAS); 20.0 Å, Trp286 zu Thr275 (äußerste AS der B-Kette um die sich ein Ligand für eine gleichzeitige Bindung in zwei Bindestellen winden müsste); 18.3 Å, Thr275 zu Trp286 (C-Kette); 21.4 Å, Trp286 zu His447. Die Möglichkeit der gleichzeitigen Bindung eines Bis-Tacrins in zwei Bindetaschen muss aufgrund dieser Analyse nicht weiter berücksichtigt werden.

4.1.1 Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung

Zur experimentellen Verifizierung, inwiefern ein Unterschied in der Interaktion mit der PAS durch den Wechsel von der offenen Form **23a** zur geschlossenen Form **23b** besteht, wurde von Dr. X. Chen die AChE-induzierte Amyloid- β Bildung in einem photometrischen Assay gemessen (Universität Würzburg).

Die Aggregation von Amyloid- β wird durch AChE beschleunigt, da sich die in der Aggregation entstehenden β -Faltblätter an die hydrophoben Aminosäuren (Tyr und Trp) der PAS anlagern.¹⁸⁴ AChE-Inhibitoren, welche an die PAS binden können, hemmen die A β -Fibrillenbildung.^{24, 185} Die Messung der Amyloid- β Bildung beruht auf der charakteristischen Änderung des Fluoreszenzspektrums des Farbstoffs Thioflavin T (ThT) bei dessen Bindung an die A β -Fibrillen. Sowohl das Anregungs- als auch das Emissionsmaximum zeigen bei der Einlagerung von ThT in die A β -Aggregate eine bathochrome Verschiebung ($\lambda_{em.}(ThT) = 445$; $\lambda_{em.}(ThT/A\beta) = 482$).¹⁸⁶

Die literaturbekannte Methode des Fluoreszenz-Assays wurde wie folgt modifiziert:^{186,178}

Dem Phosphatpuffer wurde zur Erhöhung der Ionenstärke Natriumchlorid zugesetzt, was eine schnellere Aggregation des Amyloid- β Peptids bewirken sollte.¹⁸⁵ Der pH-Wert wurde auf 8 eingestellt, da AChE bei diesem pH-Wert die höchste Aktivität bezüglich der Substrathydrolyse zeigt.¹⁸⁷ In dem Assay wurde nur die AChE induzierte Amyloid- β Aggregation gemessen, da diese unter den vorherrschenden Bedingungen schneller ist als die Selbstaggregation des Peptids.²⁴ Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Daten wurde, wie bei der Bestimmung der IC₅₀-Werte, *ee*AChE verwendet.

Die Resultate des Fluoreszenz-Assays sind in Abbildung 4.2 dargestellt und können wie folgt interpretiert werden: Für **23b** wird eine größere Fluoreszenzänderung gemessen. Dies entspricht einer Aggregation von A β ₁₋₄₀ und stellt damit eine geringere Inhibition der AChE-PAS dar.¹⁷⁸

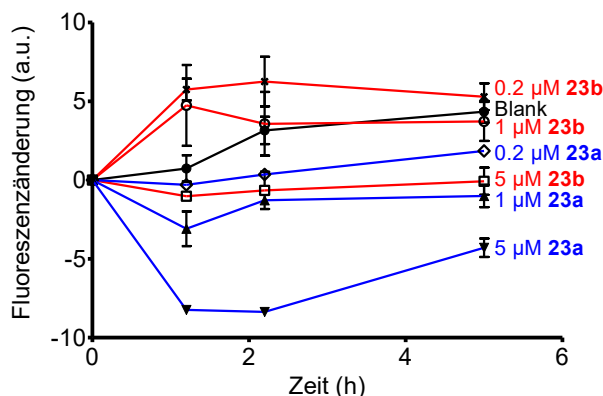


Abbildung 4.2 AChE induzierte Inhibition der Amyloid- β Aggregation mit drei verschiedenen Konzentrationen von **23a** und **23b**. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

Im Vergleich dazu wird bei Verwendung von **23a** eine geringere Fluoreszenzänderung beobachtet, was auf weniger aggregiertes A β ₁₋₄₀ hindeutet und somit einer besseren Inhibition der AChE-PAS, verglichen mit **23b**, entspricht. Im Vergleich zu **23b** und der Vergleichsprobe (Blank, ohne Inhibitor), zeigt die Fluoreszenzänderung bei Verwendung von **23a** auch einen stärkeren konzentrationsabhängigen Effekt.

Die für die Messung des gebundenen ThT erforderlichen Wellenlängen von 450 nm ($\lambda_{exc.}$) und 482 nm ($\lambda_{em.}$) (Anregung und Emission),¹⁸⁶ liegen genau im Wellenlängenbereich (>420 nm) für die Öffnung des Inhibitors **23b**. Aus diesem Grund wurde die Messzeit bzw. die Bestrahlung zeitlich kurzgehalten und die in Abbildung 4.2 gemessenen Fluoreszenzänderungen stellen den Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen über die Zeit dar. Dennoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Prozentsatz der Ringgeschlossenen Inhibitorform **23b** durch die Einstrahlung des UV-Lichtes geöffnet wurde. Ein Farbstoff für einen anderen Wellenlängenbereich wurde jedoch nicht gefunden. Um eine mögliche Verfälschung des Messergebnisses durch die Lichteinstrahlung auszuschließen wurde daher eine Fluoreszenzmessung nach 5 h Inkubationszeit durchgeführt. Dies ergab für **23a** und einer Inhibitorkonzentration von 0.2 μ M eine Inhibition der A β -Fibrillenbildung von 54 bzw. 60% und für **23b** bei der gleichen Inhibitorkonzentration eine Inhibition von 0% (bei 1 μ M ergab sich eine Inhibition der Fibrillenbildung von 0% und 43%; es handelt sich um eine Zweifachmessung, weshalb zwei Werte angegeben sind). Für die Ringgeschlossene Form **23b** ist die Interaktion mit der PAS demzufolge wahrscheinlich schwächer als für die Ringgeöffnete Form **23a**.

Aufgrund der stärker konzentrationsabhängigen Hemmung der A β -Fibrillenbildung von **23a** im Vergleich zu **23b** und der Tatsache, dass die gleichzeitige Bindung eines Bis-Tacrinsmoleküls in zwei Bindetaschen nicht möglich ist, erhärtet sich die Hypothese, dass die Ringgeöffnete Bis-Tacrinverbindung **23a** eine andere Interaktion eines Tacrinsubstituenten mit der PAS eingeht als dies für die Ringgeschlossene Form **23b** möglich ist.

4.2 Dockingstudien der Bis-Tacrinderivate

Molekulare Dockingstudien wurden mit dem Programm GOLD v.5.1¹⁴⁴ durchgeführt, um sich von theoretischer Seite der Frage nach einem Unterschied in der Bindung von **23a** und **23b** zu nähern. Es sollte überprüft werden, ob mit *in silico* Methoden gezeigt werden kann, dass die Ringgeöffnete Form des Inhibitors **23** sowohl an die CAS als auch an die PAS bindet,

wohingegen die Bindung für die Ring-geschlossene Form **23b** an die PAS nicht gleichermaßen möglich ist.

Für die Redocking- und Dockingstudien wurden Kristallstrukturen der AChE aus *Torpedo californica* (kalifornischer Zitterrochen) verwendet, da hier auf viele bereits vorhandene Komplexe heterovalenter und homobivalenter Tacrininhibitoren zurückgegriffen werden kann. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt in diesem Kapitel daher gemäß der TcAChE.

Allgemeine Angaben zur Protein- und Ligandenaufbereitung sowie zu den Dockingeinstellungen befinden sich in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2. Für dieses Dockingprojekt wurden folgende Änderungen vorgenommen: Das Enzym wurde bei pH = 7 protoniert; diese Protonierung entspricht in der Bindetasche auch der Protonierung bei pH = 8. Die Protonierung der (Bis-)Tacrinliganden **23a/23b** und **24a/24b** wurde mittels MoKa¹⁴⁷ berechnet. Dies ergab, dass der Acridin-Stickstoff des Tacrinsubstituenten protoniert und die Säure, sofern vorhanden, deprotoniert vorliegt ($pK_a = 9.30$ und 3.72). Der Aufbau aller Ligandenstrukturen erfolgte in MOE in der gestreckten Konformation.

4.2.1 Redocking und daraus abgeleitete Dockingeinstellungen

Zur Validierung der Docking- und Scoringmethode wurde ein Redocking mit sechs tacrin-substituierten Inhibitoren durchgeführt: Bis-Tacrine **25** und **26**,⁵⁷ sowie die heterovalente Strukturen bestehend aus Tacrin und Chinolinamin **27**,⁵⁷ Tacrin und Hupyridon **28**¹⁸⁸ und Tacrin mit einem Octylaminsubstituenten **29** (Abb. 4.3).⁵⁷

Die kristallisierten Tacrinderivate, wie auch die zu untersuchenden Bis-Tacrine **23a** und **23b**, zeigen allesamt eine Inhibition von AChE im ein- bis zweistellig nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 28$ nM, **25**; $IC_{50} = 1.5$ nM, **26**; $IC_{50} = 8.8$ nM, **27**; $IC_{50} = 8.8$ nM, **28-R/S**, gemessen mit AChE aus Rattenserum und $IC_{50}(eeAChE) = 3.5$ nM, **29**).¹⁸⁹⁻¹⁹² Verbindung **25**, **26** und **27** wurden als di-HCl-Salz gemessen.

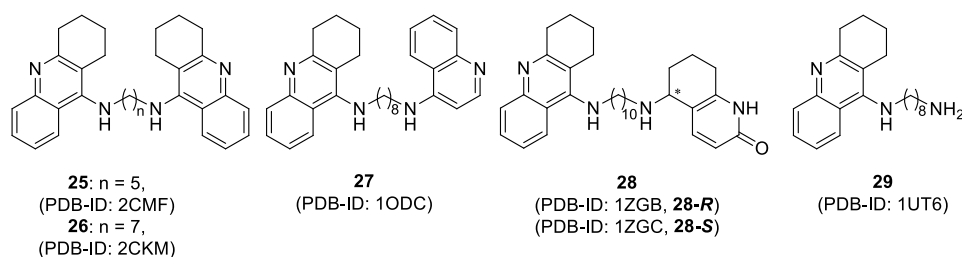


Abbildung 4.3 In TcAChE kristallisierte Tacrinderivate, welche für Redockingstudien ausgewählt wurden.

Die Redockingstudien dienen dem Auffinden einer Scoringfunktion, welche dazu in der Lage ist röntgenstrukturnahe Posen gut zu bewerten. Die Redockingergebnisse werden nachfolgend exemplarisch anhand der Daten für die homobivalenten Bis-Tacrinliganden **25** und **26** aus den Kristallstrukturen 2CMF und 2CKM gezeigt (Tabelle 4.3 und 4.4). Die Redockingdaten der übrigen Liganden befinden sich im Anhang (Kapitel 10.3). Die Redockingstudien erfolgten mit der voreingestellten Anzahl von 100'000 Operationen.

Tabelle 4.3 Redocking von **25** in 2CMF mit den vier Scoringfunktionen im Programm GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	87.56	0.88	8	10	85.61	0.46	ja
ChemScore	65.33	1.21	2	17	60.17	0.63	nein (9)*
GoldScore	103.66	0.72	5	1	103.66	0.72	ja
ChemPLP	138.86	0.84	6	12	131.97	0.59	nein (5)

Anmerkungen: 20 generierte Posen je Scoringfunktion; *die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Tabelle 4.4 Redocking von **26** in 2CKM mit den vier Scoringfunktionen im Programm GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	95.93	1.07	8	2	95.71	0.74	nein (12)*
ChemScore	63.74	1.16	7	18	59.00	0.65	nein (5)
GoldScore	108.20	1.31	7	16	99.00	0.78	Ja
ChemPLP	143.40	1.07	6	14	132.03	0.62	nein (11)

*die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Anhand der Redockingstudien wurde die ASP-Funktion für die nachfolgenden Dockingstudien ausgewählt. Diese Funktion bewertete die Dockingpose mit dem geringsten RMSD zur Originalpose für 2CMF und 2CKM auf Rang zehn und zwei von 50. Generell zeigt ASP die Pose mit dem geringsten RMSD zur Originalpose auf Top-Rängen (je kleiner die Rangziffer, z.B. 1-10, desto besser die Bewertung dieser Pose von 50 Posen insgesamt). GoldScore findet für 2CMF die Pose mit dem geringsten RMSD zur Referenz auf dem ersten Rang, jedoch ist hier der RMSD mit 0.72 Å fast doppelt so hoch wie bei der Pose von ASP mit einem RMSD von 0.46 Å.

Der Cluster der ASP Lösung mit dem geringsten RMSD zur Originalpose ist verglichen mit den übrigen Scoringfunktionen am größten bzw. zweitgrößten (2CKM und 2CMF). Daher kann von einem weitgehend konvergierten Docking ausgegangen werden, wobei strukturell ähnliche Dockinglösungen erhalten wurden. Die geringe absolute Clustergröße mit 8 bzw. 12 Posen (2CMF bzw. 2CKM) von 20 bzw. 50 generierten Posen ist vermutlich den relativ vielen Freiheitsgraden der Ligandenlinker geschuldet.

Beim Redocking wurde darüber hinaus festgestellt, dass die Position des gesättigten und des ungesättigten Ringes des 1,2,3,4-Tetrahydroacridins in der CAS teilweise vertauscht sind (8 von 20 Posen für 2CMF und 15 von 50 Posen für 2CKM mit ASP). Aus diesem Grund wurde für das Docking der Inhibitoren **23** und **24** ein „Scaffold Match Constraint“ verwendet, dessen Anwendung im Folgenden näher erläutert wird.

4.2.2 Angepasste Dockingeinstellungen

Aufgrund der hohen Flexibilität der Inhibitorstruktur **23** und **24** im Vergleich zu den für das Redocking verwendeten Liganden, wurden die Dockingparameter weiter abgeändert. Die Anzahl der Operationen wurde von 100'000 auf 4'000'000 erhöht. Ferner wurde ein „Scaffold Match Constraint“ verwendet, um einen Tacrinsubstituenten in der CAS zu platzieren.^{144, 193} Dadurch wurden energetisch bessere Lösungen (höhere Scores) sowie ein besseres Clustering erhalten.

Der Scaffold Match Constraint wurde verwendet, da das 1,2,3,4-Tetrahydroacridin in den Röntgenstrukturen einen konservierten Bindemodus in der CAS bezüglich der Lage des gesättigten und ungesättigten Ringes zeigt. Nach einer Überlagerung aller für das Redocking verwendeten Röntgenstrukturen zeigen die CAS-bindenden Tacrinsubstituenten nur einen geringen RMSD-Wert von 0.45 Å bis 0.63 Å zu dem Tacrinsubstituenten aus der Struktur 2CKM. Da die IC₅₀-Werte der beiden Inhibitorformen **23a** und **23b** in der gleichen Größenordnung wie jene der bereits kristallisierten Tacrinderivate liegen, wurde auch für diese Inhibitoren ein ähnliches Bindevverhalten der CAS-bindenden Tacrinsubstituenten angenommen (Abb. 4.4).

Für den Scaffold Match Constraint wurde der CAS-bindende Tacrinsubstituent aus dem Liganden der Röntgenstruktur 2CMF extrahiert. Dieses Tacrinfragment stellt das Scaffold und somit das zur Deckung zu bringende Ligandenfragment dar. Die Restriktion des Constraints wird in der „Mapping-“Phase des Dockingprozesses angewendet und bezieht sich auf die Übereinstimmung der Elementtypen (vergl. Kapitel 3.2).

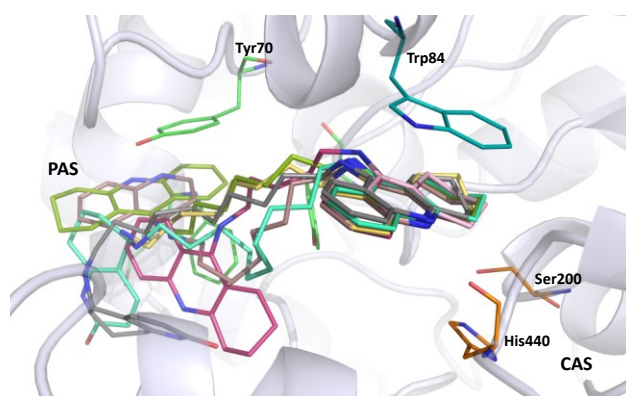


Abbildung 4.4 Auf die C α -Atome von 2CMF überlagerte Tacrin-basierte Liganden zeigen die gleiche räumliche Orientierung in der CAS (orange). Ligand aus 2CMF magenta; 1ACJ rosa; 2CKM grün; 1ODC braun; 1ZGB hellblau; 1ZGC grau; 1UT6 gelb. Zur besseren Sichtbarkeit der CAS-bindenden Tacrinsubstituenten wurde der Loop zwischen Phe423 und Glu434 in dieser Darstellung entfernt.

Der Ligand wird mit der besten Anpassung der Fehlerquadrate (engl. „best least-squares fit“) auf die schweren Atome des Scaffolds gelegt. Dabei werden die Ligandenatome abhängig von der gewählten Gewichtung in ähnliche oder die exakt gleichen Positionen gezwungen. In diesem Fall wurde die Gewichtung bei dem voreingestellten Wert von 5.0 belassen (>5.0 stärkerer Constraint, <5.0 schwächerer Constraint). Die gewählte Gewichtung führte dazu, dass der Scaffold Match Constraint mitunter nicht bei allen Dockinglösungen eingehalten wurde.

Neben der Möglichkeit, einen Scaffold Match Constraint zu setzen, kann auch eine Ähnlichkeitseinschränkung, der sogenannte „Similarity Constraint“, verwendet werden.^{144, 193} Im Similarity Constraint wird die Konformation des gedockten Liganden exakt auf die gegebene Lösung hin ausgerichtet. Dieses Vorgehen kann zu verzerrten Dockinglösungen führen und wurde daher nicht angewendet. Für die Liganden **23** und **24** sollte durch den Scaffold Match Constraint lediglich die erwartete Orientierung der 1,2,3,4-Tetrahydroacridins in der CAS gewährleistet werden.

4.2.3 Dockinglösungen in TcAChE

Zur Auswahl einer geeigneten Röntgenstruktur für die Dockingstudien wurden die beiden Strukturen 2CMF (Auflösung: 2.50 Å, Ligand **25**, Abb. 4.3) und 2CKM (Auflösung: 2.15 Å, Ligand **26**, Abb. 4.3) verglichen, da beide einen Bis-Tacrinliganden enthalten (Abb. 4.5).

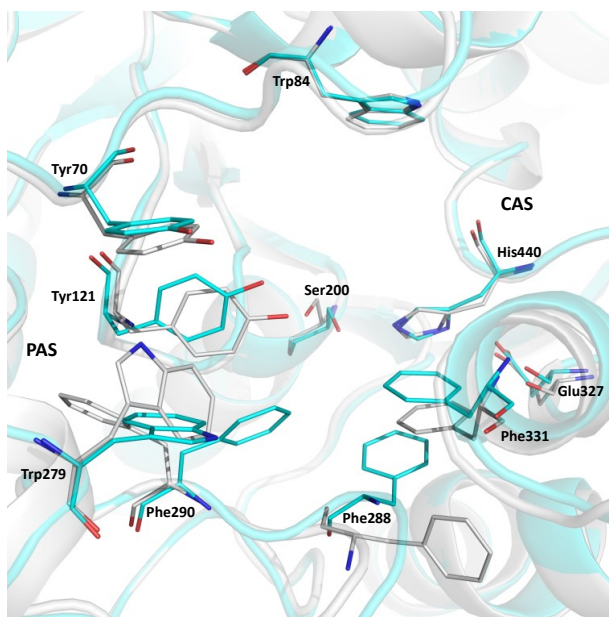


Abbildung 4.5 Vergleich der Orientierung der Aminosäureseitenketten von 2CMF (grau) und 2CKM (hellblau), aligniert auf die α -Atome von 2CMF. Die Größe der Bindetasche wird neben der Orientierung der PAS Aminosäureseitenkette Trp279 auch von der Orientierung von Phe290 und Phe288 bestimmt.

Die Unterschiede der beiden Röntgenstrukturen liegen einerseits in der Orientierung der PAS formenden Aminosäure Trp279 und andererseits in der Orientierung von Phe290 und Phe288, die ebenfalls am Eingang bzw. in der Mitte des Bindetaschentunnels lokalisiert

sind. Durch die Orientierung dieser Phenylalanine wird das Platzangebot in der Bindetasche variiert. In der Struktur 2CMF ragen weder Phe288 noch Phe290 in die Bindetasche hinein und Trp279 flankiert den Eingang der Bindetasche. Für diese Struktur wird der maximal geöffnete Bindetascheneingang festgestellt.

In der Struktur 2CKM dagegen ragt Phe290 in die Bindetasche hinein und Trp279 ist um ca. 90° bezüglich der Orientierung aus 2CMF gedreht. Somit liegt die Indolringebene von Trp279 quasi parallel zur Ringebene von Tyr70. In dieser Struktur bestünde die Möglichkeit für ein π -System zwischen Trp279 und Tyr70 mittels hydrophober π - π -Wechselwirkungen „sandwichartig“ zu binden (Abstand der geometrischen Zentren der Ringebenen: 7.1 Å). Eine solche Bindung wird auch für den PAS-bindenden Tacrinsubstituenten in der Röntgenstruktur 2CKM beobachtet.

Dockingstudien wurden sowohl in 2CMF als auch in 2CKM durchgeführt. Die Top-Scores der freien Säuren **24b** und **24a** sind in beiden Röntgenstrukturen vergleichbar. Für die bivalenten Inhibitoren **23b** und **23a** hingegen wird in 2CKM ein um 33 und 27 Einheiten besserer Top-Score erzielt (Tabelle 4.5). Die in 2CKM erhaltenen Dockinglösungen entsprechen somit energetisch besseren Posen. Die Scores sind vermutlich deshalb in 2CMF schlechter, da der zweite Tacrinsubstituent nicht in der PAS stabilisiert werden kann und stattdessen an der Proteinoberfläche liegt.

Tabelle 4.5 Vergleich der Top-Scores der freien Säuren **24a** und **24b** sowie der bivalenten Inhibitoren **23a** und **23b** gedockt in 2CMF und 2CKM.

Inhibitor	ASP Top-Score in 2CMF	ASP Top-Score in 2CKM
24b	80.96	78.86
24a	86.13	88.16
23b	75.50	108.33
23a	87.10	114.20

Tatsächlich zeigen die Dockinglösungen aus 2CKM, dass der PAS-bindende Tacrinsubstituent zwischen den Ringflächen von Tyr70 und Trp279 lokalisiert ist und dort π - π -Interaktionen eingehen kann. Somit ist das Molekül in der Lage, die Exposition eines Tacrinsubstituenten an der Proteinoberfläche (wie in 2CMF) zu verringern (s. Abb. 4.6, PAS-Aminosäuren sind in grün dargestellt).ⁱ

Für die Ring-geschlossene Form **23b** wurden in den Dockinglösungen des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten und einer CH₂-Gruppe des angrenzenden Linkers zunächst ungünstige

ⁱ In diesem Kapitel wird sich bei Erwähnung der „PAS“ lediglich auf die hydrophobe Bindetasche, welche von Tyr70, Tyr121 sowie Trp279 geformt wird, bezogen.

Kontakte der Wasserstoffatome von 0.8 Å Länge observiert. Diesen ungünstigen Wasserstoffkontakten konnte dadurch begegnet werden, dass die Verbindung **23b** in der Bootkonformation des gesättigten Ringes von 1,2,3,4-Tetrahydroacridin für das Docking verwendet wurde. Dadurch ergaben sich Distanzen von >1.3 Å zwischen den Wasserstoffatomen an den kritischen Stellen. Die Bewertung der Top-5-Posen ist in Tabelle 4.6 zusammengestellt.

Tabelle 4.6 Scores der Top-5 Dockinglösungen für **23b** und **23a** mit den dazugehörigen DSX-Scores. Übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

Rang (GOLD/ASP)	Score (GOLD/ASP)	Rescoring (DSX)	Rescoring Rang (DSX)
23b			
1	108.33	-212.65	2
2	105.79	-241.23	1
3	96.98	-203.07	4
4	96.90	-210.06	3
5	94.97	-197.75	5
23a			
1	114.20	-238.62	2
2	106.91	-253.19	1
3	100.23	-209.64	3
4	98.80	-205.64	4
5	98.74	-199.97	5

Alle Posen wurden nachträglich mit der wissenschaftlichen Funktion DSX unter Verwendung der PDB-Potentiale bewertet.¹⁹⁴ Die distanzabhängigen Paarpotentiale werden auf Grundlage von Protein-Ligand-Komplexen aus der PDB berechnet.⁵ Für den Score von DSX gilt: je größer der Betrag, desto energetisch besser die Bindepose.

Anhand des Redockings zeigt sich, dass sowohl bei **23b** als auch bei **23a** die zweitbeste ASP-Pose von DSX mit Abstand als beste dieser fünf Posen bewertet wird. Die Ring-geschlossene Form **23b** erhält von DSX einen Top-Score von -241.23, der ähnlich gut wieder DSX Top-Score von -253.19 für **23a** ist.

Der Bindemodus, der für beide Formen von **23** in der Röntgenstruktur 2CKM erhalten wurde, ähnelt der Bindung bereits bekannter und kristallisierter Bis-Tacrinverbindungen in AChE (Abb. 4.6). Ein Tacrinsubstituent besetzt die Bindestelle in der CAS, wie dies vom Scaffold Match Constraint vorgegeben wurde. Die Linker beider Inhibitoren durchziehen die Bindetasche von der CAS bis zur PAS, wobei die photochrome Einheit am Eingang der Bindetasche platziert wird und der zweite Tacrinsubstituent in der PAS bindet. Somit bindet nur die Alkylkette zwischen CAS-Tacrinsubstituent und photochromer Einheit komplett in der Bindetasche, wohingegen die zweite Alkylkette am Eingang des Enzyms zu liegen kommt.

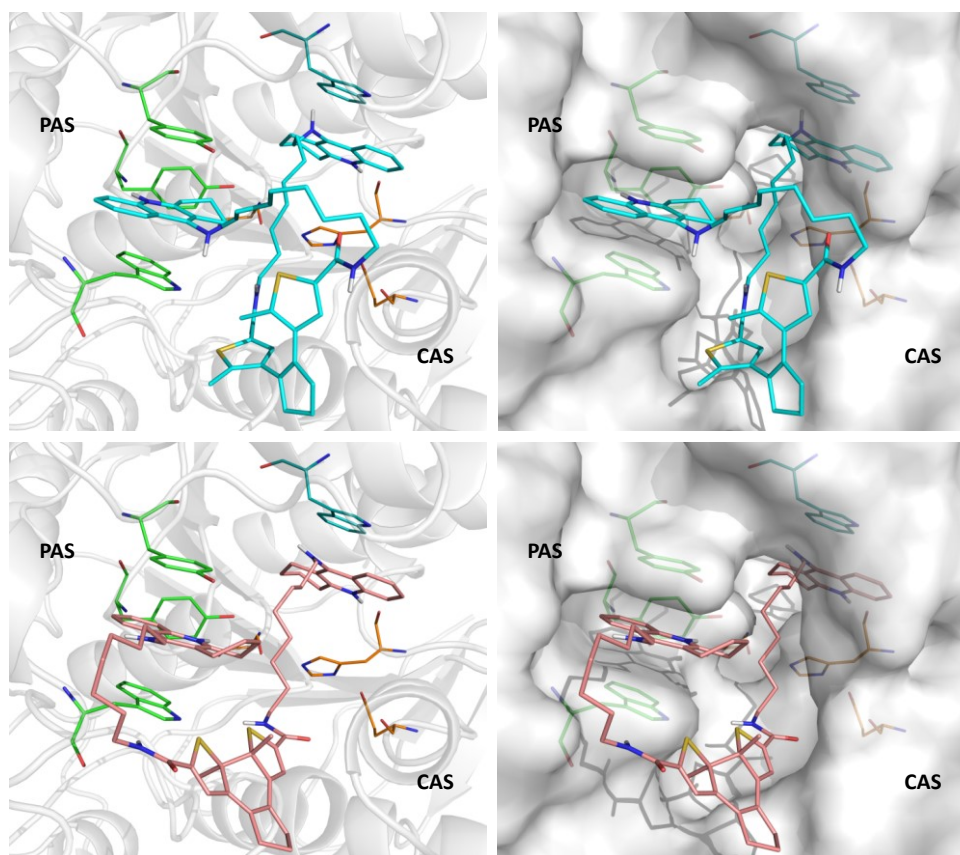


Abbildung 4.6 Dockinglösungen in der Cartoondarstellung (links) und in der Oberflächendarstellung des Enzyms (rechts) für die Ring-geöffnete Form der Bis-Tacrinverbindung **23a** (hellblau, oben) und die Ring-geschlossene Form **23b** (pink, unten). Farbcode: Protein (grau), PAS (grün), Cholinbindestelle (türkis), CAS (orange). Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

In der CAS bindet der Tacrinsubstituent in einer Wasserstoffbrückendistanz von 2.6 Å zum Sauerstoffatom von His440. Das π -System des CAS-bindenden Tacrinsubstituenten liegt in einer π - π Distanz von 4.0 Å zum Trp86 der Cholinbindestelle. Dies stimmt mit literaturbekannten Distanzen von 3.4 – 3.6 Å für π - π -Interaktionen relativ gut überein.⁵⁴ Die Alkylkette durchzieht die Bindetasche ähnlich wie es in der Röntgenstruktur von 2CKM und dessen Bis-Tacrinliganden zu sehen ist. Das PAS-bindende Tacrinfragment beider Inhibitorformen ist zwischen den Ringebenen von Tyr70 und Trp279 eingebettet (3.8 Å zwischen Tyr70, 4.4 Å zwischen Trp279 und dem geometrischen Mittel des 1,2,3,4-Tetrahydroacridin- π -Systems von **23a**; 3.6 Å zwischen Tyr70 bzw. 3.5 Å zwischen Trp279 und dem 1,2,3,4-Tetrahydroacridin- π -System von **23b**).

In einer Überlagerung beider Posen von **23a** und **23b** würden die in der PAS liegenden Tacrinsubstituenten fast rechtwinklig zueinander angeordnet sein. Der Tacrinsubstituent von **23a** bindet von der Bindetasche aus in die PAS Region, wohingegen die geschlossene Form **23b** sich so orientiert, dass der Alkyllinker um Trp279 einen größeren Bogen einnimmt und der Tacrinsubstituent in die PAS von einer distalen Seite bindet. Im Vergleich zur Lage

des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten von **23a** ragt ebendieser im Falle von **23b** weiter in die PAS, in Richtung Tyr121 zeigend, hinein.

Die Dockinglösungen für **23a** und **23b** zeigen wie erwartet eine vergleichbare Interaktion in der CAS-Region der AChE-Bindetasche. Dies war im Hinblick auf die vergleichbaren IC₅₀-Werte von 4.3 nM für **23a** und 1.8 nM für **23b** zu erwarten und durch den Scaffold Match Constraint forciert worden. In der PAS-Region zeigt sich eine leicht unterschiedliche Orientierung der Tacrinsubstituenten für **23a** und **23b**, denn in beiden Dockinglösungen ist die PAS mit dem 1,2,3,4-Tetrahydroacridin-Ringsystem besetzt.

Ausgehend von diesen Dockinglösungen wurden molekulardynamische Simulationen durchgeführt, um eventuell einen Unterschied in der Stabilisierung der PAS-bindenden Tacrinsubstituenten der Komplexe von **23a** und **23b** festzustellen. Damit soll die abweichende Inhibition der A β -Fibrillenbildung von **23a** und **23b** erklärt werden.

4.3 Molekulardynamische Simulationen von Protein-Ligand-Komplexen

Die Bindung eines Liganden an ein Protein findet im biologischen System in wässriger Lösung statt. Durch die Wechselwirkung von Ligand und Protein die über das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen sowie hydrophoben Interaktionen entstehen, kommt es zum Bindungsereignis und zur Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes.¹⁹⁵ Beim Docking eines Liganden in ein Protein wird letzteres fixiert und der Ligand flexibel in das starre Protein eingepasst, wobei Wassermoleküle in der Regel komplett vernachlässigt werden. Dieses Vorgehen begünstigt relativ kurze Rechenzeiten, weil das rechenintensive Durchsuchen (Sampling) der Proteinkonformationen entfällt. Klassische Dockingansätze stellen somit nur eine Näherung und Vereinfachung der Protein-Ligand-Interaktion dar, weil die Flexibilität und Bewegung von Protein und Ligand vernachlässigt wird. In molekulardynamischen (MD) Simulationen wird ein Ensemble von Konformationen über die Zeit erzeugt (Trajektorie). Dieses Vorgehen eröffnet die Möglichkeit Änderungen in der Konformation eines Protein-Ligand-Komplexes zu ermitteln. Ausgehend von den erzeugten Dockinglösungen der AChE-Bis-Tacrin-Komplexe sollte eine MD-Simulation durchgeführt werden, um die Stabilität der Komplexe von 2CKM mit **23a** und **23b** über die Zeit vergleichen zu können.

Auf Grundlage der klassischen Mechanik werden dabei die Kräfte berechnet, die auf die Atome des Systems (Protein-Ligand Komplex) wirken.^{196, 197} Ein quantenmechanischer Ansatz zur Berechnung der atomaren Kräfte ist für biologische Makromoleküle, welche von expliziten Wassermolekülen umgeben sind, zu rechenaufwendig, da diese leicht aus >100'000 Atomen bestehen. Den zentralen Bestandteil einer MD-Simulation stellt deshalb das verwendete Kraftfeld dar, welches ein empirisches Modell ist und dazu dient, atomare Interaktionen zu beschreiben.¹⁹⁶ Kraftfelder enthalten typischerweise Terme für die Beschreibung von Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkeln, das Lennard-Jones-Potential zur Beschreibung von Van-der-Waals Wechselwirkungen und das Coulomb-Gesetz zur Beschreibung elektrostatischer Interaktionen im nicht kovalent-gebundenen Zustand. Es gibt verschiedene Kraftfelder (AMBER,^{198, 199} CHARMM,²⁰⁰ GROMOS²⁰¹ und GROMACS,^{202, 203} um einige Beispiele für biomolekulare Kraftfelder zur Behandlung von Proteinen zu nennen), welche sich in ihrer Parametrisierung unterscheiden. Zu Beginn der MD wird jedem Atom eine Startgeschwindigkeit zugewiesen, die im Mittel der gewünschten Temperatur entspricht. Anschließend wird die auf jedes Atom wirkende Kraft berechnet und für das vorgegebene Zeitintervall mittels der Newton'sche Bewegungsgleichung die nächste Position jedes Atoms berechnet. Die Verfolgung der Bewegung über sehr viele Zeitintervalle hinweg ergibt schließlich eine Trajektorie – die Simulation über den gewünschten Zeitraum.

Für weiterführende Informationen zu MD-Simulationen sei auf die Bücher „Molecular modelling: Principles and applications“ von A. R. Leach sowie „Molekulare Theoretische Chemie“ von L. Zülicke verwiesen.^{196, 204}

4.3.1 Durchführung

Die Durchführung einer MD-Simulation gliedert sich in die folgenden fünf Phasen:

1. Aufbereitung des Proteins

Wie für das Docking wurde auch für die MD-Simulation die Proteinstruktur 2CKM verwendet.⁵⁷ Es wurden vier fehlende Aminosäuren (His486, Ser487, Gln488 und Asn489) zwischen Pro485 und Ser490 in der Nähe des C-terminalen Endes der Aminosäurekette mit Hilfe von Modeller 9.11 hinzugefügt, wobei das Protein starr gehalten wurde.²⁰⁵ Die drei vorhandenen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen (67-94, 254-265 und 402-521) wurden während der MD beibehalten. Alle Histidine, außer His398 und His440, welche aufgrund eines Wasserstoffbrückennetzwerkes in der Bindetasche am $N\delta$ -Atom protoniert wurden,

wurden am $N\epsilon$ -Atom protoniert. In der Kristallstruktur vorhandene Wassermoleküle wurden innerhalb eines Radius von 4 Å um die Aminosäureseitenketten der PAS und CAS (Tyr70, Tyr121, Trp279, Trp84, Ser200, Glu327 und His440) ausgewählt und in die Startstruktur für die MD übernommen. Für das Protein wurde das Amber ff99SB Kraftfeld verwendet.²⁰⁶

2. Aufbereitung der Liganden

Die Liganden wurden mit Modulen von Amber v.12¹⁹⁸ für die Simulation vorbereitet. RESP Ladungen (Restrained Electrostatic Potential) wurden basierend auf den elektrostatischen Potentialen, die mittels HF/6-31G* mit Gaussian v.03^{207, 208} erhalten wurden, zugewiesen. Für die Liganden wurde das General Amber Force Field (GAFF) verwendet; die Atome und Bindungstypen wurden mit Antechamber zugewiesen und fehlende Kraftfeldparameter mit parmchk berechnet.^{209, 210}

3. Minimierung

Zur Relaxation von internen Spannungen wurde eine Energieminimierung (30 Schritte) der Liganden mit starrem Protein vorgenommen. Dies geschah mit implizitem Solvens nach der generalisierten Born Methode, welche im Amber Modul Sander implementiert ist.^{211, 212} Beide Komplexe wurden über 200 Schritte minimiert.

4. Equilibrierung

Nach der Minimierung wurden die Komplexe mit tleap aus Amber in einer rechteckigen TIP3P Wasserbox solvatisiert.²¹³ Dies ergab eine Box der Größe 85 Å x 83 Å x 82 Å. Während der Equilibrierung waren die Wassermoleküle in der Box mit konstantem Volumen frei beweglich, wobei die Temperatur über einen Zeitraum von 20 ps von 100 K auf 300 K erhöht und anschließend in 5 ps auf 100 K abgekühlt wurde. Dabei wurde sowohl der Ligand als auch das Protein starr gehalten. Anschließend wurde das gesamte System ohne Einschränkungen behandelt und über eine Zeitspanne von 25 ps auf 300 K erhitzt. Die daraus erhaltenen Komplexe wurden als Input für die MD-Simulation mit NAMD verwendet.²¹⁴

5. Produktionslauf

Es wurden Trajektorien von insgesamt 18 ns in Zeitschritten (Frames) von 2 fs berechnet. Anhand dieses Zeitintervalls ist es möglich Streckschwingungen, die kurzzeitigsten molekularen Ereignisse in MDs, zu erfassen.

Das System wurde mit periodischen Randbedingungen simuliert. Konstanter Druck wurde durch das Nosé-Hoover Langevin Piston Verfahren sichergestellt und konstante Temperatur durch Verwendung der Langevin Dynamik erreicht.^{215, 216} Für Van-der-Waals Interaktionen wurde ein Cut-off von 12 Å und für alle elektrostatischen Interaktionen die particle-mesh Ewald Methode (PME) angewendet.²¹⁷ Die Trajektorienauswertung wurde mit VMD²¹⁸ und der statistischen Umgebung *R* vorgenommen.^{219, 220}

4.3.2 Resultate

Ausgehend von den ausgewählten Dockinglösungen für **23a** und **23b** (Tabelle 4.6, ASP-Pose auf dem zweiten Rang für beide Konstitutionsisomere) wurden von Dr. B. Merget (Universität Würzburg) die MD-Simulationen durchgeführt, deren Ergebnisse hier besprochen werden. Durch die Simulationen sollte evaluiert werden, ob ein Unterschied in der Stabilität des Bindemodus von **23a** und **23b** festgestellt werden kann.

Die Analyse der Trajektorien zeigte, dass der CAS-bindende Tacrinsubstituent von **23a** im zeitlichen Mittel eine geringere Distanz zum Sauerstoffatom von His440 aufweist als der Tacrinsubstituent von **23b** (2.89 ± 0.17 Å für **23a** und 4.20 ± 0.57 Å für **23b**, gemessen zwischen Acridin-*N* und His440-*O*, Abb. 4.7).

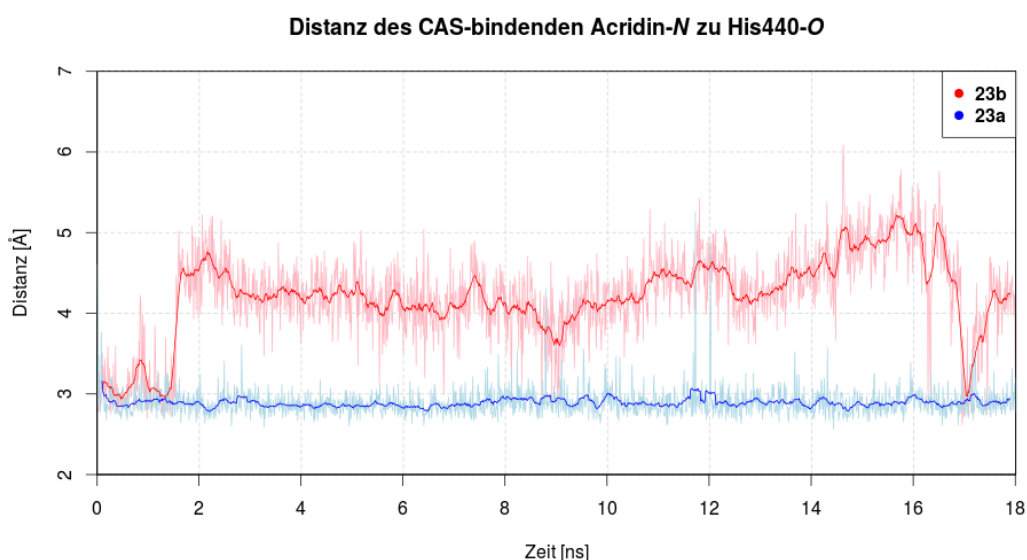


Abbildung 4.7 Distanzänderung zwischen CAS-bindendem Tacrin-*N* und His440-*O* für **23a** (blau) und **23b** (rot) im Verlauf der Trajektorie. Helle Farben geben die RMSD bei jedem Frame wieder ($1 \text{ ns} \cong 100 \text{ Frames}$) und dunkle Farben kennzeichnen den „Moving Average“ (gleitender Mittelwert) mit einer Schrittweite von 20 Frames. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society. Abbildung 4.7 und 4.8 wurden mit Rstudio v.0.99.491 erstellt.²²¹

Während der Simulationszeit kann daher von einer stabileren Bindung des Tacrinsubstituenten von **23a** in der CAS ausgegangen werden. Zusätzlich zu der Wasserstoffbrücke als gerichtete Wechselwirkung interagiert der konjugierte Teil des Tacrinsubstituenten in der CAS über π - π -Wechselwirkungen auch mit dem Indolringsystem von Trp84. Für die hydrophobe Interaktion des CAS-bindenden Tacrinsubstituenten wurde für die Ring-geöffnete Form von **23a** eine geringere mittlere Distanz von 3.73 Å zu Trp84, verglichen mit 3.94 Å für die Ring-geschlossene Form **23b**, über die gesamte Trajektorie ermittelt. Die Distanz zwischen 1,2,3,4-Tetrahydroacridin- π -System und Trp84 der Cholinbindestelle liegt für **23a** daher eher im Bereich der literaturbekannten Werte für π - π Interaktionen von 3.4 – 3.6 Å für parallel zueinander liegende Ringflächen, als dies für **23b** der Fall ist.⁵⁴ Diese Daten deuten darauf hin, dass **23a** während der Simulation in der CAS besser stabilisiert wird als das Konstitutionsisomer **23b**.

Die Interaktionen in der PAS werden durch die RMSD-Werte der Aminosäureseitenketten der PAS (Tyr70, Tyr121 und Trp279) während der Simulation wiedergegeben. Die RMSD-Werte der PAS Aminosäuren für **23b** sind geringer als für **23a** (Abb. 4.8).

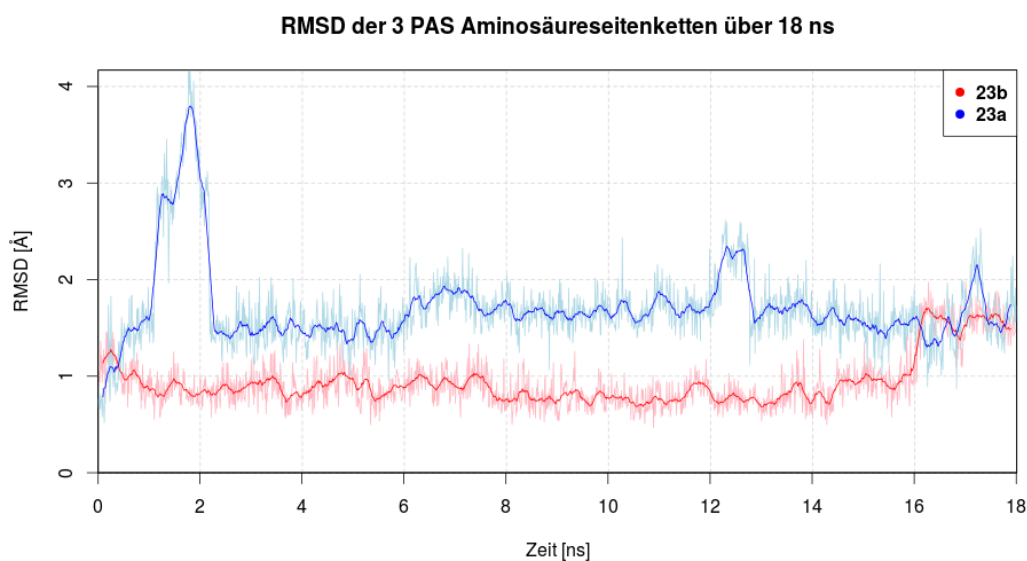


Abbildung 4.8 Bewegung der PAS Aminosäureseitenketten Tyr70, Tyr121 und Trp279 in der MD von **23a** (blau) und **23b** (rot). Bei **23a** ist die Bewegung des Trp279 in dem Peak zu Beginn der Simulation zu erkennen. Helle Farben geben den gemessenen RMSD bei jedem Frame wieder (1 ns \cong 100 Frames), dunkle Farben kennzeichnen den „Moving Average“ über jeweils 20 Frames.

Für **23a** wird ein temporärer RMSD Anstieg zu Beginn der Simulation festgestellt, der auf die Bewegung von Trp279 zurückzuführen ist. Die Aminosäure dreht sich kurzfristig aus ihrer Position heraus, was zur Folge hat, dass Wassermoleküle in einen Hohlraum der PAS einströmen. Nach dem Einstrom der Wassermoleküle kehrt die Aminosäure wieder in ihre ursprüngliche Platzierung zurück und verbleibt bis zum Ende der Simulationszeit dort. Als

Folge des Einstroms der Wassermoleküle wird der Inhibitor **23a**, im Gegensatz zu **23b**, in der PAS durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk von sechs Wassermolekülen stabilisiert.

In Abb. 4.9 ist die Wasserstoffbrückenbesetzung über die gesamte Simulation im Balkendiagramm, sowie eine repräsentative Ligandenpose aus der MD für **23a** und **23b** mit den in der PAS befindlichen Wassermolekülen abgebildet. Zur Identifikation dieser repräsentativen MD-Bindepose wurde anhand einer 2D-RMSD Analyse der gesamten Trajektorie aus der letzten Konformationsfamilie nach Mittelung aller Mitglieder dieser Familie die MD-Pose des Liganden extrahiert, welche am nächsten an der gemittelten Struktur liegt.

Das Acridin-*N* des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten von **23a** wird durch Wasserstoffbrücken zu sechs Wassermolekülen mit einer gesamten Besetzung von 48% während der MD in seiner Lage in der PAS stabilisiert. Ähnliche Interaktionen mit einer geringen Besetzung von lediglich 11% werden für **23b** zu insgesamt neun Wassermolekülen gefunden.

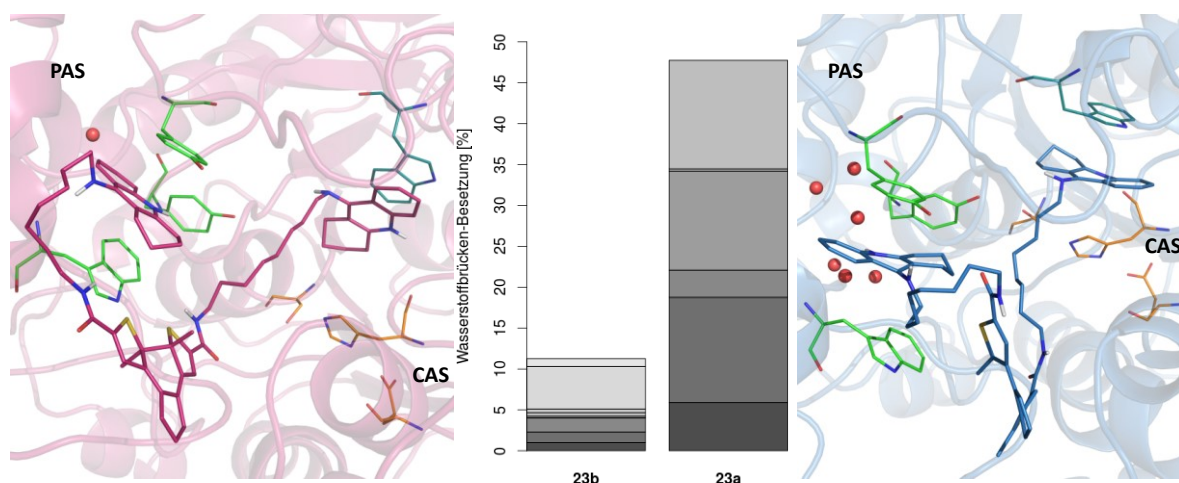


Abbildung 4.9 Darstellung des Wasserstoffbrückennetzwerkes in der repräsentativen Bindepose für **23b** (links, magenta, nach 11.66 ns) und **23a** (rechts, blau, nach 9.61 ns) sowie Darstellung der Wasserstoffbrückenbesetzung des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten von **23b** und **23a** zu den jeweiligen Wassermolekülen über die 18 ns Trajektorie. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

Die bessere Stabilisierung der Tacrinsubstituenten in der Ring-geöffneten Form **23a** verdeutlicht sich im Vergleich der Dockinglösung mit der repräsentativen Ligandenpose aus der MD (Abb. 4.10). Für **23a** zeigt jeder Tacrinsubstituent in der MD den gleichen Bindemodus wie in der Dockinglösung, wobei der RMSD zwischen Dockinglösung und MD-Pose 1.78 Å beträgt (RMSD nur bezogen auf die schweren Atome). Größere Veränderungen der Tacrinsubstituenten, vor allem des CAS-bindenden Tacrinsubstituenten, verglichen mit der Bindepose aus der Dockinglösung, sowie höhere Fluktuationen über die gesamte Trajektorie zeigten sich für **23b**. Die größeren Änderungen der Bindepose resultieren in einem RMSD-Wert zwischen der Dockinglösung und der MD-Pose von 2.09 Å. Der PAS-bindende Tacrinsubstituent von **23b** scheint auch aufgrund der fehlenden Stabilisierung durch Wasserstoff-

brückenbindungen, verglichen mit **23a**, über die gesamte Trajektorie schwächer in der PAS gebunden zu sein und behält dadurch mehr Flexibilität.

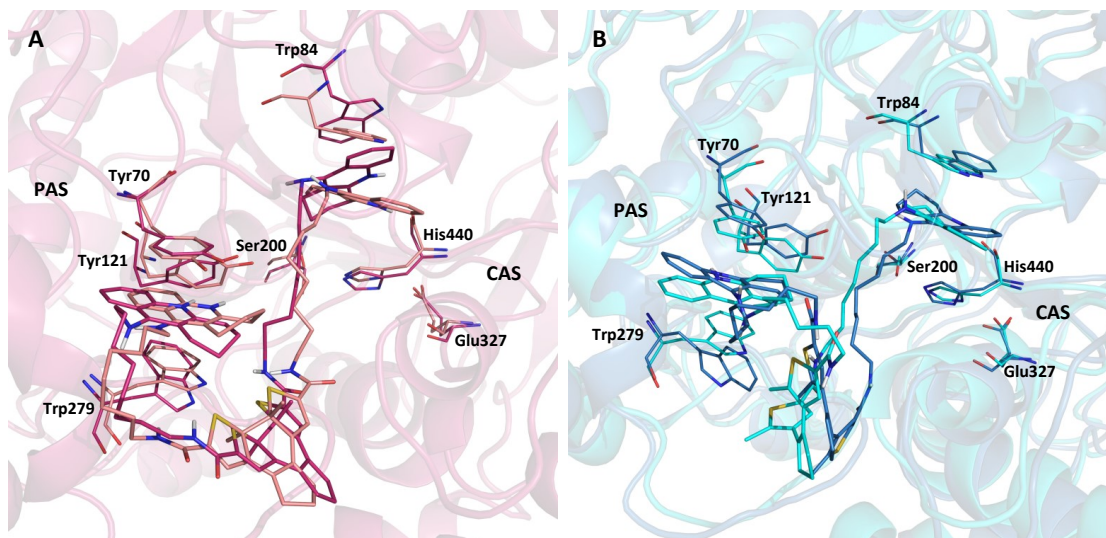


Abbildung 4.10 Vergleich von Dockinglösung und repräsentativer Pose aus der letzten Konformationsfamilie; A) **23b** nach 11.66 ns (magenta) im Vergleich zur Dockinglösung (rosa). B) **23a** nach 9.61 ns (dunkelblau) und Dockinglösung (hellblau). Abbildung mit Genehmigung übernommen von Chen, Wehle *et al.*¹⁷⁸ © 2014 American Chemical Society.

Der Unterschied der Interaktion der beiden Konstitutionsisomere **23a** und **23b** zeigt sich in der MD anhand der unterschiedlichen Stabilisierung der PAS-bindenden Tacrinsubstituenten durch Wasserstoffbrückenbindungen. Durch das Wasserstoffbrückennetzwerk des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten von **23a** ergibt sich eine relativ stabile Bindepose. Der Inhibitor **23b** zeigt insgesamt eine größere Flexibilität verglichen mit **23a**, und der PAS-bindende Tacrinsubstituent wird für **23b** nicht in gleichem Maße über Wasserstoffbrückenbindungen in der PAS fixiert. Dies kann ursächlich für eine schwächere Bindung von **23b** in der AChE-Bindetasche sein und könnte auf biologischer Ebene in der unterschiedlichen Inhibition der Amyloid- β Aggregation resultieren.

4.4 Fazit und Ausblick

Für die untersuchten photochromen Bis-Tacrine wurde durch Dockingstudien mittels einer Kombination von Rescoring und visueller Analyse, über den Vergleich des Bindemodus mit bereits kristallisierter Bis-Tacrine, ein plausibler Bindemodus für die Inhibitorformen **23a** und **23b** in einer geeigneten Kristallstruktur (PDB-ID: 2CKM) gefunden. Durch MD-Simulationen wurde der Unterschied in der Stabilisierung des Protein-Ligand Komplexes für beide

Konstitutionsisomere von **23a** und **23b** aufgrund der Bildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks für **23a** aufgeklärt. Die ausgewählte Pose von **23a** zeigt in der Simulation eine stärkere Stabilisierung durch das Netzwerk von Wassermolekülen, welche während der MD in einen Hohlraum der PAS einströmen. Die Entstehung des Wassernetzwerkes wird vermutlich durch die Lage des Tacrinsubstituenten von **23b** in der PAS begünstigt, da dieses die PAS, aufgrund der größeren Flexibilität der Ring-geöffneten Form, über einen anderen Winkel erreichen kann als das für den PAS-bindenden Tacrinsubstituenten von **23b** möglich ist. Die Rechenzeit der MD könnte für zukünftige Studien weiter verlängert werden, um die unterschiedliche Interaktion von **23a** und **23b** in der PAS differenzierter aufklären zu können.

Die ähnlichen IC_{50} -Werte der beiden Verbindungen können auch über die Bindung des Tacrinsubstituenten in der CAS und andererseits über qualitative Enthalpie-Entropie Kompensation erklärt werden: Die offene Form **23a** zeigt gute enthalpische Interaktionen mit den Wassermolekülen, wodurch es zu einem Verlust an Entropie kommt. Die verbleibende Flexibilität von **23b** reduziert den Entropieverlust, gewinnt aber weniger Enthalpie. Eine Aufklärung des Bindemodus kann letztlich nur durch Röntgenstrukturanalysen, also der Kristallisation beider Inhibitorformen im Enzym, erhalten werden. Jedoch ist die Kristallisation des Inhibitor-Enzym Komplexes, getestet unter der Leitung von Prof. J. L. Sussman am Weizmann Institute of Science in Israel, aufgrund der relativ hydrophoben Inhibitorstruktur keineswegs trivial und verlief bislang erfolglos. Enthalpische sowie entropische Beiträge zur Bindung könnten durch kalorimetrische Experimente zugänglich gemacht werden und dazu dienen, das hier präsentierte Modell zu stützen bzw. zu verbessern.

5. Synthetische Studien von Dehydroevodiamin (DHED) und Benz-DHED als Cholinesteraseinhibitoren

Die Alkaloide Evodiamin, Dehydroevodiamin (DHED) und Rutaecarpin können aus der Chinesischen Heilpflanze *Evodia rutaecarpa* oder aus *Wu-chu-yu-tang*,^{222, 223} einer Mischung aus Pflanzenextrakten die auch *Evodia rutaecarpa* enthält, isoliert werden (Abb. 5.1). In *Wu-chu-yu-tang* stellt DHED mengenmäßig den zweithäufigsten Bestandteil (0.60 mg) nach Rutaecarpin (0.69 mg) bezogen auf 1 g Pflanzenmischung dar.²²³ In *Evodia rutaecarpa* Extrakten kommt DHED mengenmäßig am häufigsten vor: 10.0 mg DHED, 7.6 mg Rutaecarpin und 4.0 mg Evodiamin für 1 g Methanolextrakt sowie 1.2 mg DHED, 0.03 mg Rutaecarpin und 0.04 mg Evodiamin für 1 g wässriges Extrakt.²²⁴

In der traditionellen chinesischen Medizin wird *Evodia rutaecarpa* gegen vielfältige Beschwerden, wie Kopfschmerzen, Unterleibsschmerzen, postpartale Blutungen, Dysmenorrhö, Magen-Darm-Beschwerden sowie Bluthochdruck, eingesetzt.^{225, 226} Die Pflanzenmischung *Wu-chu-yu-tang* wird vor allem kommerziell in Taiwan und Japan vertrieben und gegen Migräne sowie Übelkeit eingesetzt.²²³

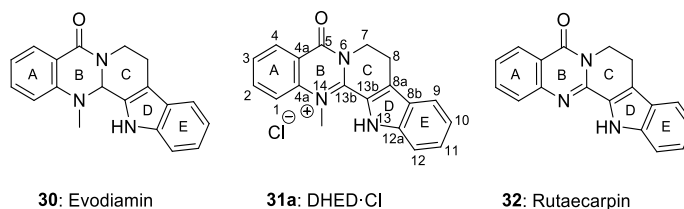


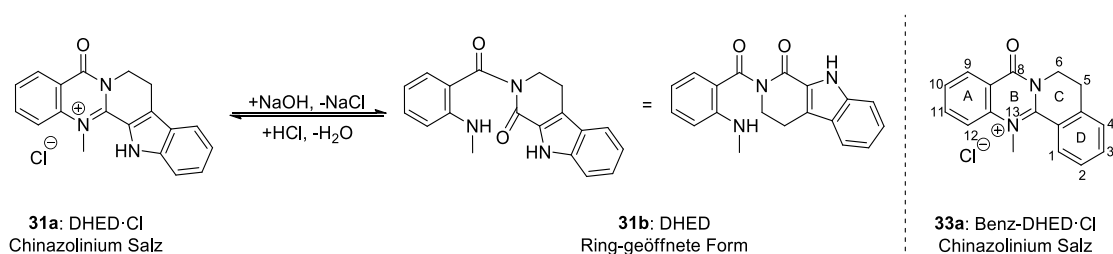
Abbildung 5.1 Die Alkaloide Evodiamin **30**, DHED·Cl **31a** und Rutaecarpin **32** stellen die Hauptbestandteile der chinesischen Heilpflanze *Evodia rutaecarpa* dar.

Neben der Wirkung der Pflanzenextrakte und –mischungen wurden seit den 70er Jahren die pharmakologischen Eigenschaften der Reinsubstanz DHED, sowie deren Extraktionsmethoden aus dem biologischen Material untersucht.²²⁷⁻²³³ Die Bedeutung des Forschungsthemas ergibt sich seit 1960 aus insgesamt 186 Publikationen zum Thema „Dehydroevodiamine“. Allein in den letzten 10 Jahren sind 103 Publikationen zu diesem Thema erschienen (ausgewertet mit SciFinder im März 2016).

Das Alkaloid DHED·Cl **31a** hat ein umfassendes pharmakologisches Wirkprofil für den Einsatz gegen humane Krebszellen (Leukämie),²³⁴ zur Blutdrucksenkung,²³⁵ verbesserten Hirndurchblutung,²³⁶ Wirkung gegen Herzrhythmusstörung²²⁹ und weist entzündungshemmende Eigenschaften auf.²²⁷ Im *in vivo* Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DHED·Cl **31a** Gedächtnisbeeinträchtigungen, depressionsähnliches Verhalten sowie Stress-

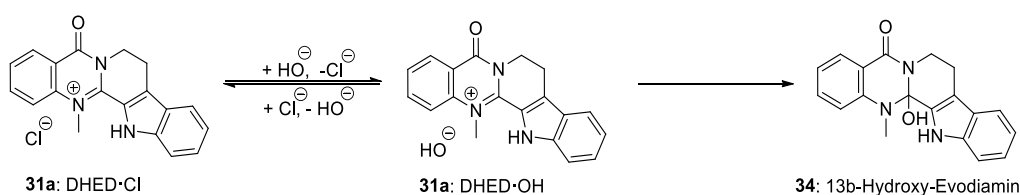
induzierte kognitive Defizite ausgleicht.^{222, 237-239} Darüber hinaus verbessert DHED Amyloid- β ($A\beta$) induzierte Amnesie in Mäusen.²⁴⁰ Dieses pharmakologische Wirkprofil ist besonders im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung bedeutend. Zusätzlich ist DHED ein einstellig mikromolarer Inhibitor von AChE und BChE mit 6.3 und 8.4 μM ,¹³⁹ und stellt somit einen guten Ausgangspunkt für Studien zur Aktivitätssteigerung dar.

Die erste Beschreibung von DHED-Cl **31a** erfolgte 1927 von Asahina und Ohta.²⁴¹ DHED besitzt die Eigenschaft, dass die Verbindung als Chinazoliniumsalz **31a** und durch die Zugabe von Base als Ring-geöffnete Form **31b** vorliegen kann (Schema 5.1). Zunächst wurde die Chinazoliniumform aufgeklärt, aber die Konstitution der Ring-geöffneten Form war lange Zeit umstritten. Ohta postulierte in den 50er Jahren, dass sich durch Zugabe von Base aus dem Chinazoliniumchlorid das Chinazoliniumhydroxid bilde, welches später zu „13b-Hydroxy-Evodiamin“ **34** werde (Schema 5.2).²⁴²



Schema 5.1 Links: Gleichgewicht von DHED; die Chinazoliniumform **31a** kommt im wässrig sauren und die Ring-geöffnete Dicarboxylform **31b** im basischen Medium vor. Dieses Gleichgewicht wird von einem Farbumschlag von schwach gelb für **31a** zu orange-rot für **31b** begleitet.^{139, 243} Rechts: Benz-DHED als Derivat von DHED wobei die Position des Indolringes von einem Benzolring eingenommen wird. Schema mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Erst in den 70er Jahren wurde von Pachter und Suld die Entstehung der Dicarboxylform **31b** in nicht wässrigem Medium vorgeschlagen,²⁴⁵ die durch IR-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zur Chinazoliniumverbindung mit nur einer Carbonylschwingung wurden für die Ring-geöffnete Form **31b** zwei Carbonyl- sowie zwei NH-Schwingungen nachgewiesen. Die Dicarboxylform heißt auch Rhetsinin und wird in weiterer Folge als Ring-geöffnete Verbindung bezeichnet.²⁴³ Die Bezeichnung der Ringe der pentazyklischen Alkaloide wurde von Lin *et al.* übernommen (Abb. 5.1).²³⁰



Schema 5.2 Postulierte Konstitution von DHED in alkalisch wässrigem Medium nach Ohta.²⁴²

Der Austausch des Indolringes durch einen Benzolring führt zum sogenannten Benz-DHED **33a**, welches 2005 zum ersten Mal beschrieben wurde (Schema 5.1).¹³⁹ Benz-DHED existiert ebenfalls als Chinazoliniumsalz und in der Ring-geöffneten Form und zeigt darüber hinaus verglichen mit dem Alkaloid DHED bessere Löslichkeitseigenschaften.

Im Gegensatz zu der in den letzten Jahren gestiegenen Bedeutung von DHED in der Literatur existieren bisher nur fünf Publikationen, die sich mit der Synthese von DHED entweder als Zwischenstufe oder als Endverbindung befassen.^{139, 243, 246-248} Aufgrund moderater IC₅₀-Werte von 6.3 μM (AChE) und 8.4 μM (BChE) stellt DHED einen „Hit“-Struktur dar,¹³⁹ die das Potential der ChE-Hemmung aufweist, bislang synthetisch jedoch kaum charakterisiert ist. Damit diese Substanzklasse als Inhibitorleitstruktur nutzbar gemacht werden kann, sind weitere Forschungen zum chemischen Verhalten dieses Naturstoffes notwendig.

Zunächst sollten die Ausgangsmaterialien DHED und Benz-DHED über die literaturbekannte Synthesemethode dargestellt werden. Aufgrund von niedrigen Ausbeuten insbesondere für Benz-DHED, entstand die Notwendigkeit der Optimierung der Syntheseroute. Es werden drei mögliche Darstellungswege zu DHED bzw. Benz-DHED besprochen. Des Weiteren geht es auch um die systematische Aufklärung des Verhaltens von DHED und Benz-DHED in wässrigen Pufferlösungen mittels UV/Vis-Spektrometrie sowie die pharmakologische Charakterisierung dieser Alkaloide (Neuroprotektion und Neurotoxizität sowie die Hemmung der Aβ-Fibrillenbildung). Danach wird aus den gewonnenen Erkenntnissen eine Syntheseroute zu Carbamat-basierten DHED-Derivaten abgeleitet.

5.1 Synthetische Studien zu DHED und Benz-DHED

Da sehr wenige Informationen zur Darstellung und chemischen Stabilität von DHED und Benz-DHED vorliegen, wurden diese Verbindungen zunächst über die bekannte Syntheseroute dargestellt sowie zusätzlich zwei alternative Syntheserouten getestet. Ferner wurde die chemische Stabilität dieser Verbindungen untersucht.

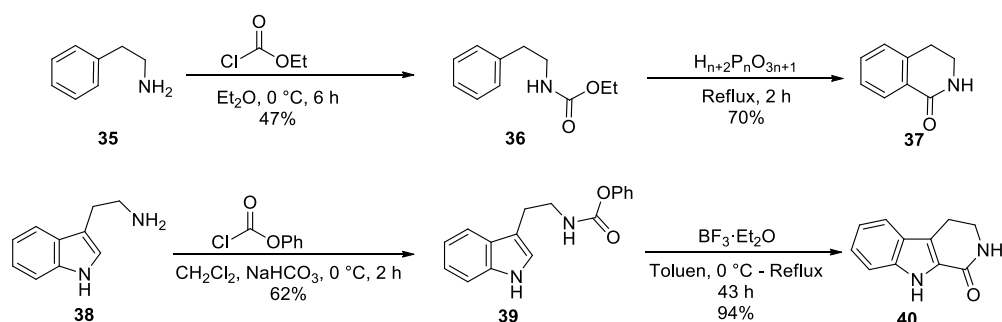
5.1.1 Synthese der Ausgangsmaterialien

Die Synthese von DHED und Benz-DHED ist in der Literatur am häufigsten über die Aktivierung eines Lactams mit Phosphoroxychlorid und der darauffolgenden Kondensation mit ei-

nem Anthranilsäureester beschrieben.^{139, 243, 246, 247} Die literaturbekannten Synthesen unterscheiden sich hauptsächlich in der Wahl des Lösungsmittels (Tetrahydrofuran (THF) oder Toluol) und davon abhängig in der Länge der Reaktionszeit (4 Tage, 2 h) und den eingesetzten Äquivalenten Phosphoroxchlorid (1.2 – 13 äq.).

Zur Herstellung der für diese Arbeit benötigten Mengen an Benz-DHED und DHED wurde die von Nakayama *et al.* beschriebene Synthesemethode durch Kondensation des entsprechenden Lactams mit einem Anthranilsäureester angewendet.²⁴³

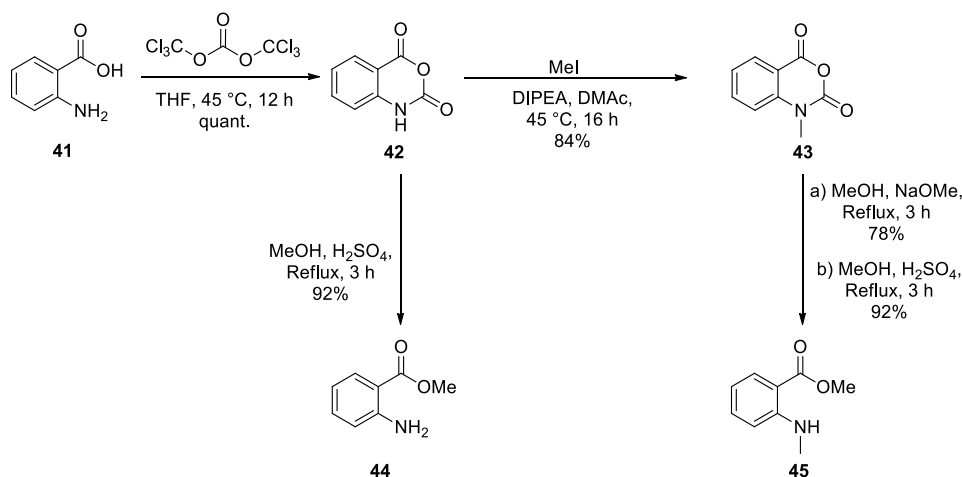
Die Lactame **37** und **40** konnten über zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 51% bzw. 75% dargestellt werden (Schema 5.3).^{139, 243, 249}



Schema 5.3 Darstellung der Lactame **37** und **40** als Vorstufen zur Benz-DHED und DHED Synthese.

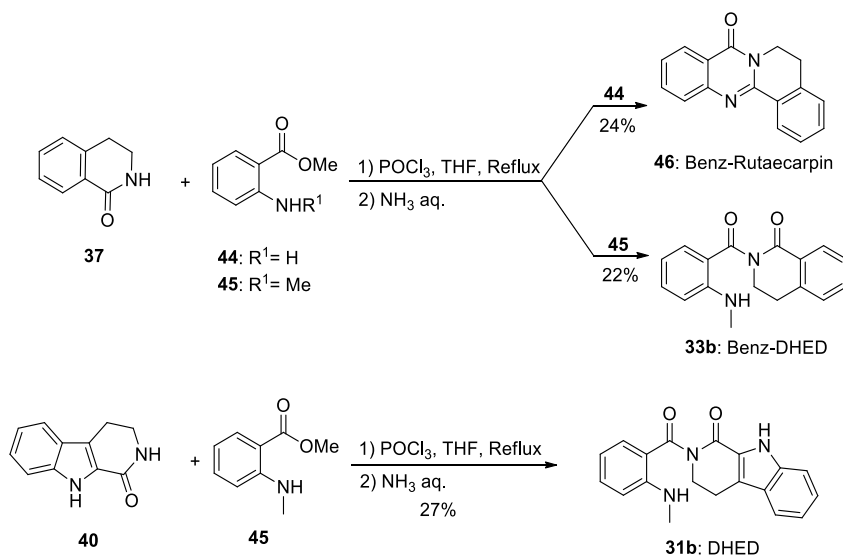
Bei beiden Synthesen stellte der ethylaminsubstituierte Benzolring (2-Phenylethanamin) bzw. Indolring (Tryptamin) den Ausgangspunkt der Synthese dar. 2-Phenylethanamin wurde mit Chlorameisensäureethylester zu dem entsprechenden Carbamat **36** umgesetzt, welches mit Polyphosphorsäure cyclisiert wurde, um das Lactam **37** zu erhalten. Tryptamin wurde mit Phenylchloroformiat ebenfalls zum entsprechenden Carbamat **39** umgesetzt, welches anschließend durch Verwendung der Lewissäure BF_3 zu dem entsprechenden Lactam **40** cyclisiert wurde.

Die Anthranilsäureester wurden ausgehend von Anthranilsäure **41** über die Anhydridbildung mit Triphosgen und sich anschließender *N*-Methylierung mit Methyljodid (MeI), *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in Dimethylacetamid (DMAc) nach bereits publizierten Syntheserouten durchgeführt (Schema 5.4).^{90, 250} Die Darstellung des Methylesters erfolgte durch Erhitzen des Anhydrids **43** in Methanol mit katalytischen Mengen an H_2SO_4 in sehr guten Ausbeuten von 92%. Die Darstellung des Methylesters über Natriummethanolat führte zu schlechteren Ausbeuten (78%), da während der Extraktion Natriumhydroxid (NaOH) entsteht und dies zur Esterverseifung führt.



Schema 5.4 Synthese der Anthranilsäuren **44** und **45** als Vorstufen zur Darstellung von DHED und Benz-DHED.

Die Kondensation des entsprechenden Lactams mit der Anthranilsäure erfolgte nach der Vorschrift von Nakayama *et al.*, wobei die Produktreinigung abgewandelt wurde (Schema 5.5).²⁴³

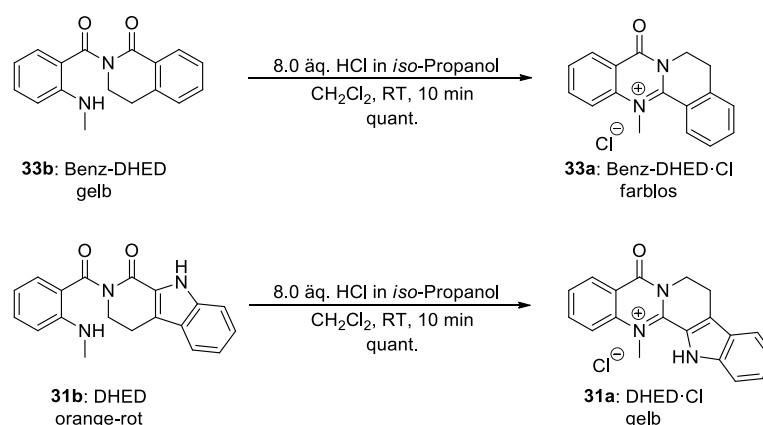


Schema 5.5 Syntheschema zur Darstellung von Benz-Rutaecarpin **46**, Benz-DHED **33b** und DHED **31b**. Schema mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Zuerst wurde das jeweilige Lactam **37** bzw. **40** durch Erhitzen mit Phosphoroxychlorid in trockenem THF zum Imidoylchlorid aktiviert. Danach wurde der Anthranilsäureester **44** bzw. **45** der Reaktionsmischung zu dosiert und die Reaktion 41 bzw. 96 h gerührt, um Benz-DHED **33b** bzw. DHED **31b** zu isolieren. Nach der Extraktion bei pH = 9, wurden Benz-DHED **33b** und DHED **31b** in ihrer Ring-geöffneten Form durch Kristallisation aus dem Rohprodukt isoliert. Die erzielten Ausbeuten liegen mit 22% für Benz-DHED **33b** und 27% für DHED **31b** leicht oberhalb der von Decker¹³⁹ erzielten Ausbeute und unterhalb derselbigen von Nakayama *et al.*²⁴³

Bei der Verwendung des unsubstituierten Anthranilsäureesters wurde Benz-Rutaecarpin **17** erhalten, welches chromatographisch aufgereinigt wurde.

Schema 5.6 zeigt die quantitative Darstellung der Chinazoliniumsalze **33a** und **31a**. Zur Darstellung der Chinazoliniumsalze **33a** und **31a** wurde die Ring-geöffnete Form **33b** bzw. **31b** in Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit 8.0 äq. HCl in *iso*-Propanol versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei RT 10 min lang gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Rotationsverdampfer entfernt.



Schema 5.6 Quantitative Salzbildung aus der Ring-geöffneten Form von Benz-DHED **33b** zu dem Chinazoliniumsalz **33a** und ausgehend von DHED **31b** zu dem Chinazoliniumsalz **31a** mit Salzsäure in *iso*-Propanol.

Die Ring-geöffneten Formen können von den Ring-geschlossenen Salzen optisch leicht unterschieden werden, denn durch den Ringschluss kommt es zu einer Entfärbung (für Benz-DHED von gelb nach farblos und für DHED von orange-rot zu gelb). Die Charakterisierung der Ring-geöffneten und geschlossenen Form erfolgte über ^1H - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektroskopie. Die Spektren wurden in $\text{MeOD-}d_4$ aufgenommen. Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund von 1D und 2D NMR-spektroskopischen Experimenten (COSY, HMQC und HMBC). Generell sind die ^1H -Verschiebungen der Chinazoliniumformen stärker tieffeldverschoben als die ^1H -Verschiebungen der Ring-geöffneten Formen. Tabelle 5.1 gibt anhand der Verschiebung des am stärksten tieffeldverschobenen aromatischen Signals, des letzten hochfeldverschobenen aromatischen Signals sowie anhand der aliphatischen Wasserstoffsignale eine Übersicht der spektroskopischen Unterschiede.

Am deutlichsten ist der Unterschied in der chemischen Verschiebung der *N*-Methylgruppe (CH_3). Deren Protonen sind sowohl bei DHED als auch bei Benz-DHED in der Chinazoliniumform um 1.40 – 1.47 ppm gegenüber der Ring-geöffneten Form verschoben.

Tabelle 5.1 Aufstellung der wesentlichen Unterschiede in den ^1H - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren von **31b** und **31a** sowie **33b** und **33a** zur Aufklärung des spektroskopischen Unterschiedes der Ring-geöffneten Form und des Chinazoliniumsalzes.

^1H -Resonanz von:	31b δ [ppm]	31a δ [ppm]	33b δ [ppm]	33a δ [ppm]
Tiefeld Ar-H	7.95	8.54 – 8.44	7.90	8.53 – 8.45
Hochfeld Ar-H	7.12 – 6.94	7.35	6.97 – 6.93	7.70 – 7.67
NCH_2CH_2	5.06, 3.44 – 3.37	4.69 – 4.58	4.60 – 4.54, 3.42 – 3.36	4.42
NCH_2CH_2	2.97 – 2.95, 2.87	3.50 – 3.40	3.13 – 3.06, 2.95 – 2.88	3.26
CH_3	3.02	4.49	2.95 – 2.88	4.35
^{13}C -Resonanz von:	31b δ [ppm]	31a δ [ppm]	33b δ [ppm]	33a δ [ppm]
C=O	165.31 / 147.95	159.54	164.96 / 148.04	159.92
C=N	-	151.75	-	159.05
CH_3	35.08	41.45	35.48	45.08

Das am tiefsten verschobene aromatische Protonensignal zeigt in der Chinazoliniumverbindung **31a** eine Verschiebung von 8.54 – 8.44 ppm und liegt damit gegenüber dem vergleichbaren Proton für **31b** (7.95 ppm) um fast 0.5 ppm höher. Dies gilt auch für den Unterschied von **33a** und **33b**, hier beträgt der Unterschied 0.6 ppm. In den $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektren finden sich erwartungsgemäß zwei Signale für die Carbonyl-Kohlenstoffe von **31b** und **33b** gegenüber nur einem Signal von **31a** und **33a**. Der abschließende Nachweis der Entstehung des Chinazoliniumsalzes **31a** bzw. **33a** ist schließlich durch die signifikante Tieffeldverschiebung der *N*-Methylgruppe um 12 bzw. 15 ppm gegeben.

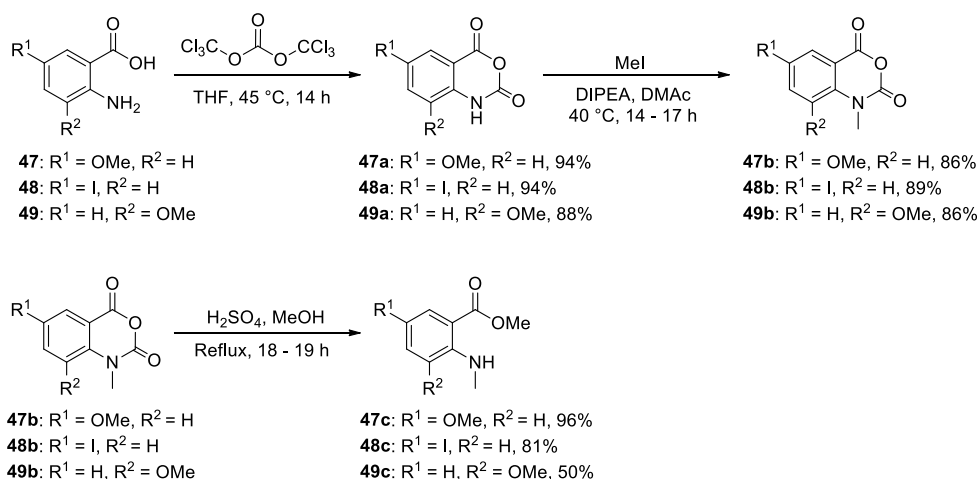
Die Messung der Reinheit erfolgte mittels LC-MS mit 0.1% Ameisensäure als Zusatz in der mobilen Phase. Dies war insbesondere bei der Messung von DHED erforderlich, weil diese Verbindung dazu neigte auf der Säule adsorbiert zu werden. Vermutlich durch Verwendung der Säure in der mobilen Phase oder aufgrund des Durchtretens der Moleküle durch das Hochvakuum auf dem Weg zum Massendetektor wurde, egal welche Ausgangsverbindung vermessen wurde, stets die Masse des Chinazoliniumions detektiert. Für Benz-DHED **33a** wurde die Masse m/z : 263.10 (berechnet für $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$) m/z : 263.12) und für DHED **31a** die Masse m/z : 302.15 (berechnet für $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$) m/z : 302.13) nachgewiesen.

Auch wenn die hier erzielten Ausbeuten im Bereich der bereits publizierten Ausbeuten liegen ist doch auffällig,^{139, 243} dass die Ausbeute insbesondere bei der Darstellung von Benz-DHED generell niedrig ist. Zur Optimierung der Ausbeute wurden die Synthesebedingungen vertiefend untersucht.

5.1.2 Demethylierungsreaktion bei Benz-DHED

Zunächst wurden verschiedene Anthranilsäureesterderivate synthetisiert und der Kondensation mit Lactam **37** unterzogen. Dies geschah, weil verschiedene Benz-DHED Derivate hergestellt werden sollten. Dazu wurden Anthranilsäureester mit Iod und Methoxy-substituenten in *ortho*- und *para*-Position zum anilinischem Stickstoffatom synthetisiert. Die Darstellung der Anthranilsäureester erfolgte ausgehend von drei entsprechend substituierten Anthranilsäuren: 2-Amino-5-Methoxybenzoesäure (**47**), 2-Amino-5-Iodbenzoesäure (**48**) und 2-Amino-3-Methoxybenzoesäure (**49**, Schema 5.7). Die Säuren wurden in sehr guten Ausbeuten (88 – 94%) mittels Triphosgen zu den entsprechenden Anhydriden **47a** – **49a** umgesetzt. Daran schloss sich eine Methylierungsreaktion mit Methyljodid (MeI) an. Die methylierten Produkte **47b** – **49b** konnten in guten Ausbeuten (86% – 89%) isoliert werden. Die Darstellung der Methylester **47c** – **49c** erfolgte in Methanol mit katalytischen Mengen an Schwefelsäure, wobei die Ester in moderaten bis sehr guten Ausbeuten von 50% – 96% erhalten wurden. Die somit erhaltenen Anthranilsäureesterderivate enthalten einen Substituenten mit +I-Effekt am Benzolring, welcher die Elektronendichte am Aromaten erhöht.

Um den Grund für die niedrige Ausbeute in der Benz-DHED Darstellung herauszufinden, wurde die Reaktion zu Benz-DHED mittels LC-MS verfolgt und nach festgelegten Zeitabständen LC-MS-Proben aus der Reaktionslösung entnommen. Vor dem Vermessen der LC-MS-Proben wurde eine Mikroaufarbeitung (Extraktion mit basischem Wasser, pH = 9) durchgeführt.

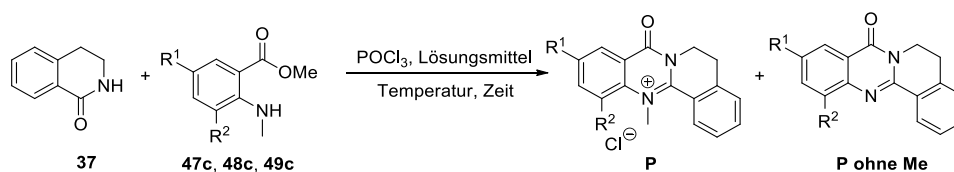


Schema 5.7 Darstellung verschiedener Anthranilsäureesterderivate **47c**, **48c** und **49c** zur Synthese von Benz-DHED Derivaten.

Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht der durchgeführten Reaktionen zum Einfluss von unterschiedlich substituierten Anthranilsäureestern mit den dazugehörigen HPLC-Ausbeuten. Der Anthranilsäureester **47c** wurde mit Lactam **37** versetzt und während 89 h zur Reaktion

gebracht (Eintrag 1, Tabelle 5.2). Nach dieser Zeit konnte nur noch die Masse des demethylierten Benz-DHED's nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass bei langen Reaktionszeiten und moderaten Reaktionstemperaturen (60 °C) die Degradierung von Benz-DHED zum demethylierten Nebenprodukt dominiert. Zur Zurückdrängung der Demethylierung wurde in folgenden Untersuchungen das Syntheseprotokoll von Decker und Unsworth *et al.* übernommen, welches bei höheren Temperaturen und mit kürzeren Reaktionszeiten arbeitet.^{139, 247}

Tabelle 5.2 Durchgeführte Reaktionen, welche die Bildung an demethyliertem Nebenprodukt bei der Synthese zeigen.



Eintrag	POCl ₃ (äq.)	Esterderivat	Lösungsmittel	Temp. [°C]	Zeit [h]	HPLC-Ausbeute	
						P	P ohne Me
1	1.2		THF	60	89	0%	31%
2	6.0		Toluol	110	2	7%	19%
3	6.0		Toluol	110	2	24%	17%
4	5.6		Toluol	110	2	36%	53%

Es wurde festgestellt, dass unabhängig von der Substitution am Anthranilsäureester und unabhängig von der gewählten Reaktionstemperatur und Zeit die Demethylierung eine Nebenreaktion darstellt, die im Falle der Methoxyanthranilsäuremethylester **47c** und **49c** in den Vordergrund tritt (Eintrag 2 und 4, Tabelle 5.2). In der zu Eintrag 3 gehörenden Reaktionslösung waren noch 20% unverbrauchtes Lactam vorhanden. Für alle durchgeführten Reaktionen setzt sich die Differenz zu 100% Ausbeute neben dem im Überschuss eingesetzten Anthranilsäureester auch aus multiplen nicht weiter untersuchten Nebenprodukten zusammen.

Die Reaktionslösung unter Eintrag 2 wurde mittels Extraktion aufgearbeitet. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie konnten 8 mg demethyliertes Produkt (Benz-Rutaecarpin, 2.1% Ausbeute) sowie 3 mg gewünschtes Benz-DHED Produkt (0.7 % Ausbeute) isoliert werden. Die Tatsache, dass die isolierte Ausbeute von 0.7% signifikant unter der durch HPLC bestimmten Ausbeute lag, muss den Bedingungen der Aufarbeitung zugeschrieben werden.

Allerdings betrug die Reinheit auch nach 2-facher präparativer Dünnschichtchromatographie über SiO_2 lediglich 68%.

Es ist bekannt, dass ungeeignete chromatographische Medien unwirksam für die Reinigung von Pflanzenmaterial und deren Extrakten sein können.²⁵¹ Das am weitesten verbreitete stationäre chromatographische Medium ist Silicagel (SiO_2). Dieses kann Naturstoffe kovalent binden oder durch säurekatalysierte Umlagerungen zu Veränderungen der Konstitution führen.²⁵² Es konnten sogar *N*-Demethylierungen beim Einsatz von SiO_2 in der Aufreinigung von Pflanzenextrakten nachgewiesen werden.²⁵³ Vor diesem Hintergrund ist auch die unbefriedigende Reinheit nach wiederholter präparativer Dünnschichtchromatographie einzuordnen. Auch chromatographische Reinigungsversuche über Aluminiumoxid (Al_2O_3) als stationäre Phase lieferten keine besseren Ergebnisse. Von Studien zur verbesserten chromatographischen Reinigung, etwa durch den Einsatz aktivitätsreduzierter stationärer Phasen wurde zugunsten der im Folgenden beschriebenen Arbeiten abgesehen.

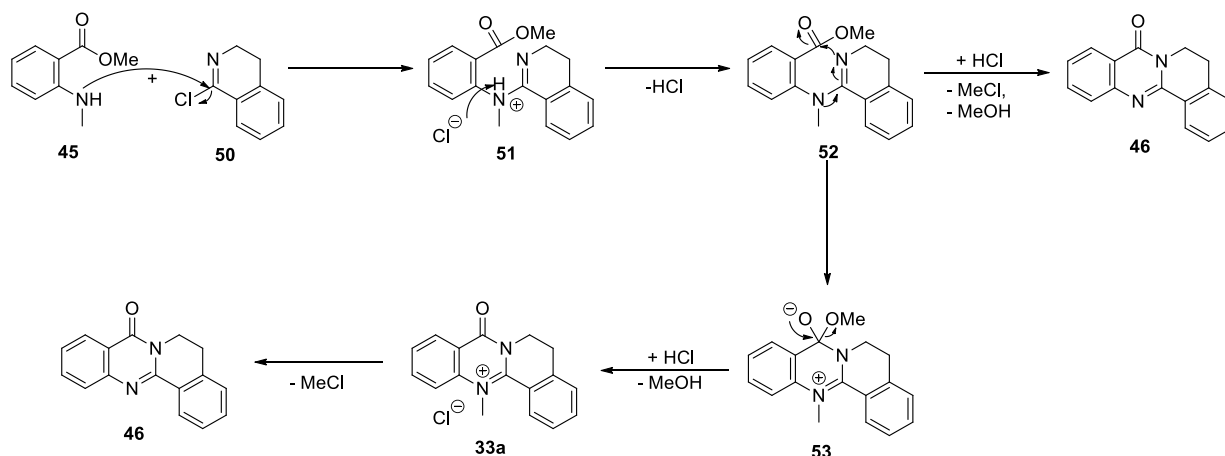
Es sei noch anzumerken, dass alternative Zugangswege zum Zielprodukt ausgehend vom Isatosäureanhydrid anstelle des Esters, sowie mit Natriumhydrid (NaH)²⁵⁴ und *sec*-Butyllithium (*s*-BuLi) als Aktivierungsmittel durchgeführt wurden. Diesen Reaktionen war jedoch gemein, dass die Startmaterialien nicht verbraucht wurden.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Demethylierung die Hauptnebenreaktion in der Synthese von Benz-DHED ist. Im Folgenden werden Versuche zur Aufklärung der Demethylierungsreaktion beschrieben.

Alle Kondensationsreaktionen wurden in inerter Atmosphäre durchgeführt. Die oxidative Demethylierung kann daher aufgrund der angewandten Bedingungen vernachlässigt werden. Die Demethylierung aufgrund von Chloridionen, welche vom Phosphoroxchlorid und *in-situ* generierter Salzsäure stammen, könnte im Sinne einer nucleophilen Demethylierung die beobachtete Benz-Rutaecarpinbildung erklären.

Unter den Bedingungen der Kondensationsreaktion kann die Entstehung von Chloridionen während der Reaktion nicht verhindert werden. Dies verdeutlicht der Reaktionsmechanismus am Beispiel der Bildung von **33a**, welcher in Schema 5.8 gezeigt ist.

Zunächst kommt es zu einem nucleophilen Angriff, wobei das freie Elektronenpaar des anilinischen Stickstoffatoms am Imidoylchlorid angreift. Der Angriff findet an dem Kohlenstoffatom statt, welches das Chloratom gebunden hat. Durch diese Substitutionsreaktion wird ein Chloridanion freigesetzt. Die entstandene positive Ladung am anilinischen Stickstoffatom in Verbindung **51** kann durch die Abspaltung eines Protons durch das zuvor freigesetzte Chloridanion neutralisiert werden.



Schema 5.8 Möglicher Reaktionsmechanismus zu Benz-DHED-Cl **33a** und dem Demethylierungsprodukt Benz-Rutaecarpin **46**. Der Mechanismus erklärt die Entstehung von Salzsäure bzw. Chloridionen im Reaktionsverlauf.

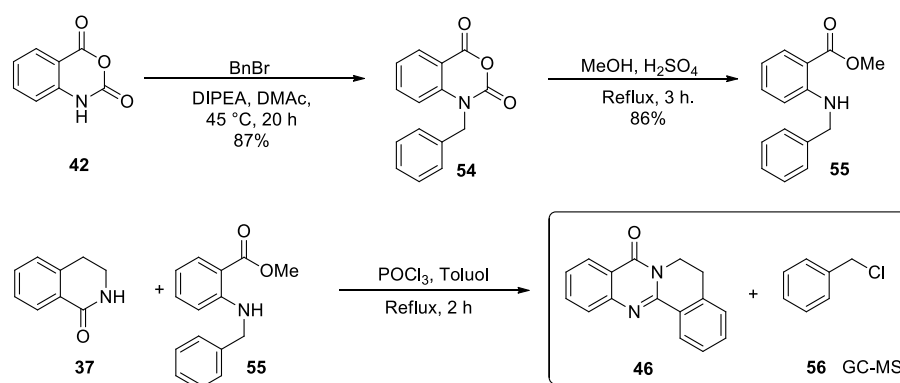
Eine Elektronenpaarverschiebung vom anilinischem Stickstoff zum Stickstoffatom des vormaligen Lactams führt dazu, dass letzteres Stickstoffatom negativ geladen ist und intramolekular nucleophil am Carbonylkohlenstoff der Esterfunktion angreifen kann (vergl. **52**). Dadurch entsteht eine tetraedrische Zwischenstufe mit negativ geladenem Sauerstoffatom der vormaligen Carbonylgruppe in **53**. Durch Rückbildung der C=O-Doppelbindung verlässt Methanolat als Abgangsgruppe das Molekül, wodurch Benz-DHED **33a** wird gebildet. Durch eine Umprotonierung wird aus dem Methanolat und der zuvor entstandenen Salzsäure Methanol gebildet und das Chloridion stellt das Gegenion zum positiv geladenen Chinazoliniumgrundgerüst von **33a** dar.

Eine Demethylierung kann durch Abspaltung von Methylchlorid aus bereits gebildetem Benz-DHED **33a** erfolgen. Denkbar ist jedoch auch eine Bildung direkt ausgehend von einem Intermediat, z.B. **52** (Schema 5.8). Chloridionen können demnach ursächlich für die Bildung von Benz-Rutaecarpin während der Benz-DHED-Synthese sein.

Zur Belegung dieser Hypothese wurden Versuche mit dem *N*-Benzylderivat **55** vorgenommen (Schema 5.9). Hier war in Analogie zur *N*-Demethylierung die Entstehung des leicht detektierbaren Benzylchlorids zu erwarten.

Das Isatosäureanhydrid **42** wurde mit Benzylbromid in DIPEA und DMAc umgesetzt und das *N*-benzylierte Anhydrid **54** in einer Ausbeute von 87% erhalten. Die Darstellung des Methyl-esters durch Erhitzen von **54** in Methanol mit katalytischen Mengen an Schwefelsäure lieferte den *N*-benzylierten Anthranilsäureester **55** in einer Ausbeute von 86%. Dieser Anthranilsäureester **55** wurde mit Lactam **37** in einer Kondensationsreaktion mit POCl₃ in Toluol über 2 h bei 120 °C zur Reaktion gebracht.

Die Reaktionslösung wurde nach 2 h mittels GC-MS nach Mikroaufarbeitung mit basischem Wasser (pH = 9) analysiert: Neben Ionenserien für Benz-Rutaecarpin **46** wurden auch das zu Benzylchlorid **56** passende Fragmentierungsmuster detektiert.



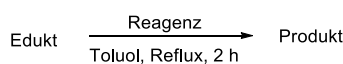
Schema 5.9 Oben: Darstellung des *N*-benzylierten Anthranilsäureesters **55** über zwei Stufen in sehr guten Ausbeuten >85%. Unten: Kondensationsreaktion in Toluol über 2 h. Eine GC-MS-Messung zeigte ein zu Benz-Rutaecarpin **46** und Benzylchlorid **56** passendes Fragmentierungsmuster.

Durch die bisherigen Versuche konnte bestätigt werden, dass Chloridionen an der Abspaltung der Methylgruppe beteiligt sind. Abschließend sollte daher auch die intrinsische Stabilität der Verbindungen Benz-DHED und DHED untersucht werden.

5.1.3 Stabilitätsuntersuchungen von Benz-DHED und DHED

Die Stabilitätstests wurden an Benz-DHED **33b** und DHED **31b** in trockenem Toluol mit Zusätzen von H₂O, HCl in *iso*-Propanol sowie KOH in *iso*-Propanol durchgeführt (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Stabilitätstest von **31b** und **33b** in Toluol mit Säure, Base oder Wasser als Reagenz. In der Tabelle ist das entstandene Produkt angegeben. Tabelle mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.



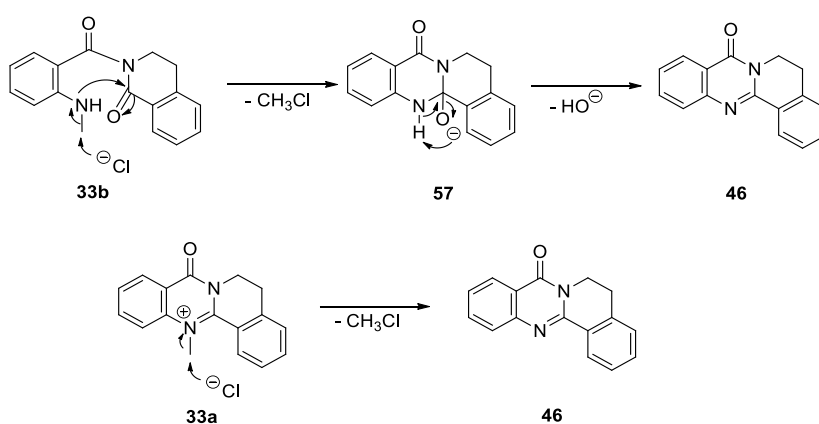
Edukt	Produkt			
	kein Reagenz -	H ₂ O 10.0 äq.	HCl in <i>iso</i> -Propanol 10.0 äq.	KOH in <i>iso</i> -Propanol 10.0 äq.
Benz-DHED (33b)	33b	33b	46	37 und <i>N</i> -Me Anthranilsäure
DHED (31b)	31b	31b	31a	40 und <i>N</i> -Me Anthranilsäure

Das Erhitzen der Verbindungen in Toluol und das Erhitzen mit Zusatz von Wasser führten zu keiner Reaktion, die jeweiligen Edukte wurden zurückgewonnen. Dieser Befund zeigt, dass beide Verbindungen stabil sind und es sich bei der Demethylierung von Benz-DHED nicht um eine spontane Demethylierung aufgrund intrinsischer bzw. thermischer Instabilität handelt.

Die Zugabe von HCl zu der Testlösung zeigte einen Unterschied in der Stabilität beider Verbindungen: Während im Falle von DHED **31b** das Chinazoliniumsalz **31a** gebildet und isoliert wurde, wurde bei Verwendung von Benz-DHED **33b** und HCl die Entstehung von

Benz-Rutaecarpin **46** nachgewiesen. Die Entstehung des Benz-Rutaecarpins zeigt, dass Chloridionen bei Benz-DHED an der Demethylierung beteiligt sind. Die Demethylierung erscheint im Sinne einer nucleophilen Demethylierung ausgehend von der Ring-geöffneten Form **33b** oder der Ring-geschlossenen Form **33a** plausibel, wobei über beide Wege Methylchlorid freigesetzt wird, weshalb vom Methylchloridnachweis abgesehen wurde (Schema 5.10).²⁵⁵

Unter den relativ drastischen Reaktionsbedingungen mit einem 10-fachen Überschuss an Base wurde sowohl DHED **31b**, als auch Benz-DHED **33b** zersetzt und es konnte eine 1:1 Mischung aus dem entsprechenden Lactam und der *N*-methylierten Anthranilsäure nachgewiesen werden.



Schema 5.10 Möglicher Mechanismus für die nucleophile Demethylierung von Benz-DHED **33b** (oben) und **33a** (unten).

Ein weiterer Stabilitätstest wurde mit Benz-DHED durchgeführt, indem die Reaktionslösung mit Diazabicyclooktan (DABCO, 13.0 äq.), einer nicht nucleophilen Base, versetzt wurde. Die Mischung wurde 10 min gerührt, bevor 10.0 äq. HCl hinzugegeben wurden. Dieser Versuch ergab, dass 32% Edukt **33a** erhalten blieben und 63% Benz-Rutaecarpin gebildet wurden (HPLC-Ausbeuten). Dies zeigt, dass die Demethylierung durch die Bindung der Chloridionen an die protonierte Base teilweise verhindert werden kann.

Zur Darstellung von Benz-DHED in besseren Ausbeuten ist den bisherigen Untersuchungen zufolge Syntheseroute ohne Entstehung von Chloridionen notwendig.

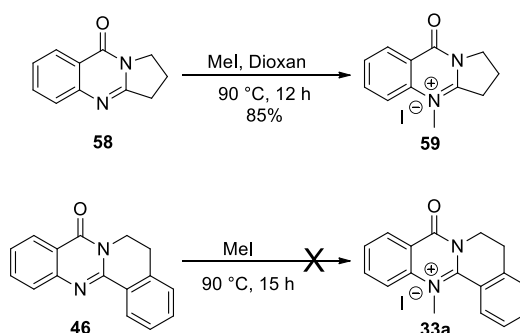
Unter den untersuchten Reaktionsbedingungen wurde für DHED keine Demethylierung festgestellt. Dies kann über eine höhere intrinsische Stabilität von DHED im Gegensatz zu Benz-DHED erklärt werden. Ein Grund dafür können die wegen des Indolringes geänderten elektronischen Verhältnisse im Vergleich zum Benzolring bei Benz-DHED sein. Es kann sein, dass der Indol-Stickstoff mit seiner Elektronendichte die Methylgruppe des Stickstoffatoms

in *para*-Position zur Carbonylgruppe abschirmt, so dass ein nucleophiler Angriff des Chloridions aufgrund der Abstoßung der negativen Ladung nicht möglich ist. Auf der anderen Seite können auch sterische Gründe die Ursache für die höhere Stabilität des pentazyklischen Alkaloids DHED gegenüber dem tetrazyklischen Benz-DHED sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen die Bildung von Chloridionen nicht ausgeschlossen werden kann und somit die Instabilität von Benz-DHED zu geringen Ausbeuten führt. Es sind daher alternative Reaktionswege nötig, welche ohne den Einsatz von POCl_3 auskommen, bzw. die Entstehung von Chloridanionen verhindern. Darüber hinaus liefert die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Kondensationsreaktion des Anthranilsäureesters **45** mit den Lactamen **37** bzw. **40** nur moderate Ausbeuten an Benz-DHED **33b** bzw. DHED **31b**, was die Notwendigkeit eines alternativen synthetischen Zugangs zu diesen Verbindungen zusätzlich offensichtlich macht.

5.1.4 Alternativer Reaktionsweg zu Benz-DHED: Methylierung

Zunächst wurde ausgehend von Benz-Rutaecarpin **46** untersucht, ob die *N*-Methylierung, also die Rückreaktion der Demethylierung mit synthetischen Methoden erzielt werden kann. Die direkte Methylierung von trizyklischen Chinazolinonen funktioniert mit einer guten Ausbeute (85%) mit Methyljodid als Methylierungsreagenz (Schema 5.11).⁹⁰ Für Benz-Rutaecarpin **46** schlugen alle getesteten Reaktionsbedingungen mit Methyljodid und Dimethylsulfat als Methylierungsreagenzien mit Variation in Reaktionszeit, Temperatur und Lösungsmittel fehl, da in jedem Fall das Startmaterial zurückisoliert wurde (s. Anhang Kapitel 10.4.1).



Schema 5.11 Oben: Erfolgreiche Methylierung des trizyklischen Chinazolinons **59**.⁹⁰ Unten: Nicht erfolgreiche Methylierung von Benz-Rutaecarpin **46**. Schema mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Die Methylierung des Benz-Rutaecarpins **46** kann synthetisch mittels der untersuchten Bedingungen nicht erzielt werden. Dieser Befund deckt sich mit dem während der Kondensationsreaktion auftretenden Benz-Rutaecarpin als Nebenprodukt. Es ist davon auszugehen, dass Benz-Rutaecarpin **46** unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine größere Stabilität gegenüber Benz-DHED-Cl **33a** besitzt und deshalb keine Methylierungsreaktion eingeht.

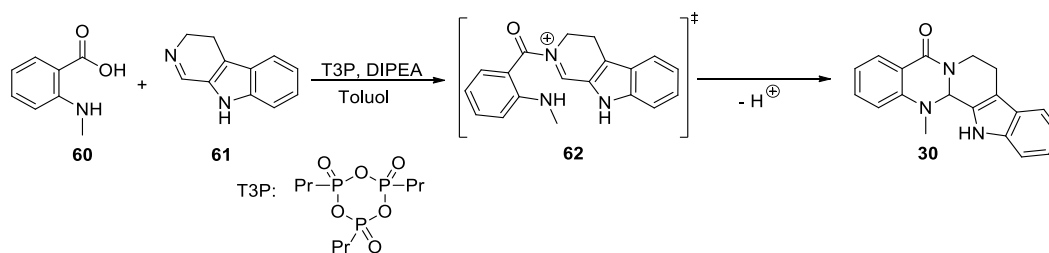
Verglichen mit dem trizyklischen Chinazolinon **58** besteht durch den bei Benz-Rutaecarpin **46** zusätzlichen Benzolring auch eine sterische Abschirmung des C=N-Stickstoffatoms, welcher in dieser Reaktion als Nucleophil fungiert. Dies kann neben der chemischen Stabilität des Produktes ein weiterer Grund für die erschwerte Reaktion sein.

5.1.5 Alternativer Reaktionsweg zu Benz-DHED und DHED: Oxidation

Eine weitere Möglichkeit das DHED-Gerüst aufzubauen, ist die Durchführung einer Oxidation und somit der Generierung der C=N-Doppelbindung während der Reaktion. Die Darstellung von C=N-Doppelbindungen durch oxidative Methoden ist bislang nur für sterisch ungehinderte asymmetrisch substituierte Amine bekannt und kann mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) durchgeführt werden.²⁵⁶ Auch an Metallatome, wie Cu(II) und Ru(II), gebundene aminhaltige bidentate Liganden können spontan im Falle von Cu(II) oder durch O₂ und Ru(II) zu Iminen umgesetzt werden.^{257, 258} Dies setzt natürlich voraus, dass die zu oxidierende Struktur in bidentater Weise an ein Metallatom binden kann und stellt somit keine universelle Oxidationsmethode dar.

Im Zusammenhang mit der Isolierung des Alkaloids Evodiamin berichteten Gopinath *et al.* über dessen Oxidation mit KMnO₄ in Aceton, wobei allerdings keine weiteren Reaktionsbedingungen angegeben wurden.²⁵⁹ Die Oxidation von Evodiamin wurde auch mit anderen Oxidationsmitteln, wie Ti(OAc)₃ (3.0 äq, CH₂Cl₂, RT, 16 h) sowie 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ, 2.0 äq, CCl₄, RT, 24 h) durchgeführt, was zu hohen Ausbeuten von 85 und 67% DHED geführt hat, wobei allerdings keine spektroskopischen Daten angegeben wurden.²⁶⁰ Bei den durchgeführten Oxidationen von Evodiamin **1** und Benz-Evodiamin **34** wurde KMnO₄ der Vorzug gegeben, da dieses Oxidationsmittel im Gegensatz zu Ti(OAc)₃ und DDQ nicht toxisch klassifiziert ist.

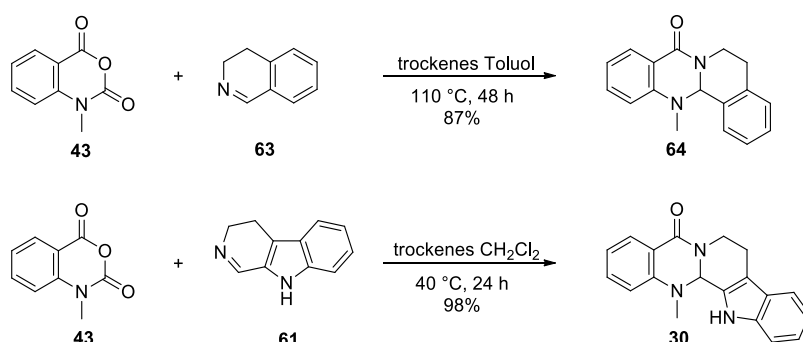
Die Darstellung von Evodiamin **1** kann in sehr guten Ausbeuten (95%) über die direkte Acylierung eines Imins erfolgen (Schema 5.12).²⁶¹ In dieser Reaktion kommen *N*-Methyl Anthranilsäure **31** sowie das Indolderivat **32** zum Einsatz.



Schema 5.12 Darstellung von Evodiamin **30** durch Iminacylierung mittels T3P und DIPEA in Toluol.²⁶¹

Die Reaktion verläuft über ein *in-situ* gebildetes *N*-Acyliminiumion, welches durch intramolekulare Zyklisierung das gewünschte Produkt liefert. Als Kupplungsreagenzien werden Propanphosphonsäureanhydrid (T3P) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) verwendet.

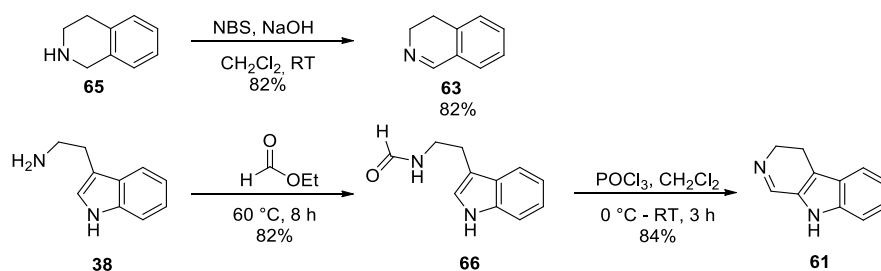
Die gewählte Darstellung von Benz-Evodiamin **64** und Evodiamin **30** erfolgte hier ohne Verwendung von Kupplungsreagenzien ausgehend vom *N*-Methyl Isatosäureanhydrid **43** und dem entsprechenden Isochinolinderivat nach einer bereits publizierten Methode in vergleichbaren Ausbeuten von 87% für Benz-Evodiamin **64** und 98% für Evodiamin **30** (Schema 5.13).^{91, 140}



Schema 5.13 Darstellung von Benz-Evodiamin **64** (oben) und Evodiamin **1** (unten) ausgehend vom methylierten Isatosäureanhydrid **43** und dem entsprechenden Isochinolin **63** bzw. Pyrido-indolderivat **61**.

Das methylierte Isatosäureanhydrid wurde wie bereits beschrieben dargestellt (Schema 5.4). Die Synthese von 3,4-Dihydroisochinolin (**63**) erfolgte ausgehend von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (**65**) über eine *in-situ* Bromierung sowie die Eliminierung des Bromids in einer Ein-Stufen-Reaktion (Schema 5.14).

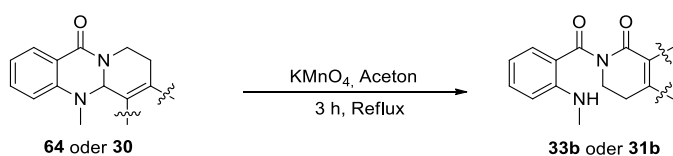
Das Indolderivat zur Herstellung des Evodiamins, 4,9-Dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol (**61**), wurde ausgehend von Tryptamin **38** über zwei Stufen dargestellt. Zunächst wurde die terminale Aminfunktion des Tryptamins mit Ameisensäureethylester zu einem Amid **66** umgesetzt. In der folgenden Reaktion mit Phosphoroxychlorid wurde schließlich durch Zyklisierung das Pyridoindolderivat **61** erhalten.



Schema 5.14 Darstellung des Dihydroisochinolin **63** (oben) in einer Ein-Stufen-Reaktion sowie die Darstellung des Indolderivates **61** über zwei Stufen ausgehend von Tryptamin **38** (unten).

Für die Oxidationen wurden verschiedene Äquivalente des Oxidationsmittels KMnO_4 (1.0 äq., 1.2 äq., 1.5 äq. und 2.0 äq.) für die Reaktion in Aceton unter Rückfluss (56 °C) getestet (Tabelle 5.4). Die Verwendung von 1.0 äq. KMnO_4 zur Oxidation von Benz-DHED **33b** ist aufgrund der Unvollständigkeit der Reaktion nicht ausreichend, da noch 29% Edukt in der Reaktionsmischung enthalten sind (Eintrag 1).

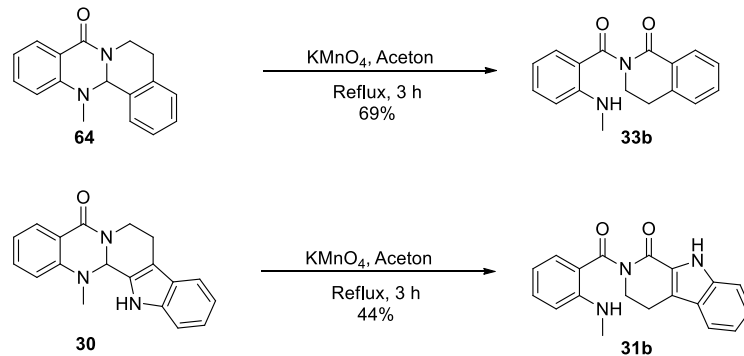
Tabelle 5.4 Getestete Oxidationsbedingungen für Evodiamin **30** und Benz-Evodiamin **64** mit unterschiedlichen Äquivalenten an Oxidationsmittel KMnO_4 .



Eintrag	Edukt	KMnO_4 äq.	HPLC-Ausbeute	
			Produkt	Edukt/Nebenprodukt
1	64	1.0	71%	29% Edukt
2	64	1.2	94%	2% Edukt
3	64	1.5	94%	2% Edukt
4	64	2.0	84%	9% Benz-Rutaecarpin
5	30	0.5	53%	28% Edukt
6	30	1.0	59%	19% Edukt
7	30	2.0	63%	-

Bei 2.0 äq. Oxidationsmittel wurde neben dem Hauptprodukt auch Benz-Rutaecarpin (9%, Eintrag 4) beobachtet. Das beste Ergebnis konnte durch Verwendung von 1.2 oder 1.5 äq. Oxidationsmittel erhalten werden. Bei der Oxidation von Evodiamin **30** ist die Reaktion mit 0.5 äq. und 1.0 äq. KMnO_4 nicht vollständig (Eintrag 5 und 6). Mit 2.0 äq. Oxidationsmittel konnte mit 63% Produktbildung das beste Ergebnis erzielt werden (Eintrag 7). Die übrigen entstandenen Reaktionsprodukte (Differenz zu 100% HPLC-Ausbeute) wurden nicht weiter zugeordnet, enthielten aber weder Edukt, noch demethyliertes Nebenprodukt.

Die Reaktion zu **31b** wurde folglich unter Verwendung von 2.0 äq. KMnO_4 in der Oxidation des Evodiamins **30** durchgeführt. Nach einer Umkristallisation aus MeOH sowie einer Extraktion mit basischem Wasser wurde Verbindung **31b** in einer Ausbeute von 44% als orange/roter Feststoff erhalten (Schema 5.15).

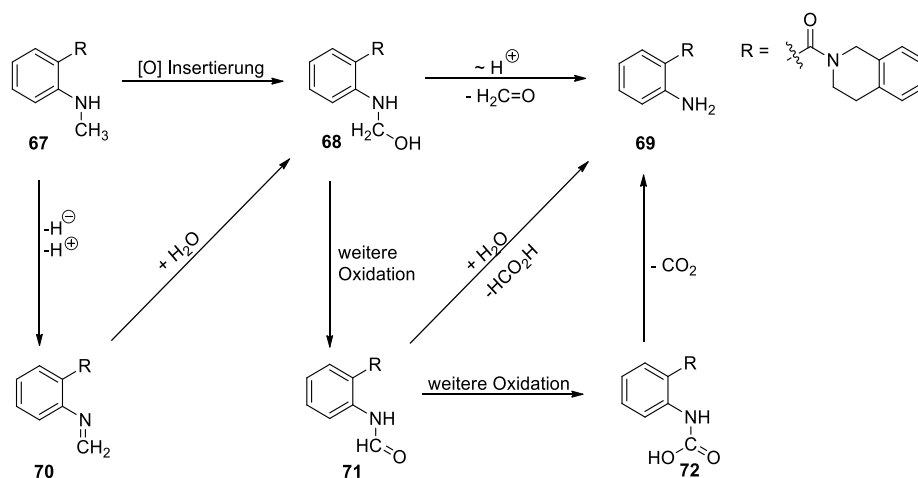


Schema 5.15 Oxidation von Benz-Evodiain **64** und Evodiain **30** zu Benz-DHED **33b** und DHED **31b**, als alternative Reaktionsmöglichkeit, womit die Demethylierung als Nebenreaktion umgangen werden kann. Schema modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Benz-DHED **33b** konnte durch die Oxidation von Benz-Evodiain **64** und der Verwendung von 1.5 äq. KMnO_4 nach Waschen mit einem Gemisch aus Petrolether und Diethylether (2:1) in 69%-iger Ausbeute als gelber Feststoff isoliert werden.

Die Verwendung von 2.0 äq. KMnO_4 in der Oxidation von Benz-Evodiain führte schon zur Bildung von demethyliertem Produkt (9%, HPLC). Deshalb muss auch bei der Oxidation der Benz-Verbindung, welche offensichtlich leichter eine Demethylierung eingeht, die Menge des Oxidationsmittels mit Vorsicht gewählt werden.

Neben der zuvor erwähnten nucleophilen Demethylierung besteht auch die Möglichkeit einer oxidativen Demethylierung (Beispielhaft dargestellt in Schema 5.16).²⁵⁵



Schema 5.16 Mögliche Reaktionswege, welche zur oxidativen Demethylierung führen. Auf radikalische Oxidationswege wurde in der Darstellung verzichtet. Abbildung modifiziert entnommen von Walport *et al.*²⁵⁵

Dieser Prozess kann über die direkte Insertion von Sauerstoff [O], sowie durch die Abspaltung eines Hydridions [H⁻] gestartet werden. In weiterer Folge kommt es zur Abspaltung von Formaldehyd aus dem Halbaminal **68**, Ameisensäure aus dem Formamidderivat **71** oder CO₂ aus der Carbamidsäure **72**, wodurch in diesem Beispiel das Anilinderivat **69** entsteht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Oxidation von Benz-Evodiamin **64** und Evodiamin **30** in einer Ein-Stufen-Reaktion ohne aufwendige Reinigungsschritte zur Darstellung von DHED **31b** und Benz-DHED **33b** führt. Vor allem für Benz-DHED **33b** konnten im Vergleich zur Kondensationsreaktion sehr hohe Ausbeuten erzielt werden (69% vs. 22%). Durch die Oxidation mit KMnO₄ konnte zudem die Reaktionszeit gegenüber der Kondensation von >24 h auf 3 h deutlich verkürzt werden.

5.2 Verhalten von DHED und Benz-DHED in wässrigen Lösungen

DHED wurde bereits erfolgreich auf die Verbesserung der Kognition im *in vivo* Mausmodell getestet.^{222, 237-239} DHED liegt abhängig vom pH-Wert als Chinazoliniumverbindung oder Ring-geöffnete Spezies vor.¹³⁹ Ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Verbindungen wurde bisher allerdings weder untersucht noch berichtet. Aufgrund der Tatsache, dass beide Verbindungen, DHED·Cl **31a** sowie Benz-DHED·Cl **33a**, eine Ringöffnung im Basischen zeigen, ist die Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen diesen beiden Spezies in wässrigen Lösungen verschiedener pH-Werte von Bedeutung. Nicht zuletzt deshalb, weil nur so aufgeklärt werden kann, welche Form der Verbindung sich nach längerer Verweildauer im wässrigen Medium anreichert, und welche Form letztlich das beobachtete *in vivo* Ergebnis und somit die Wirkung zeigt. Diese Studien helfen, um zukünftige Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von DHED, Benz-DHED sowie deren Derivaten abzuleiten.

Aufgrund der Unlöslichkeit der Ring-geöffneten Formen **31b** und **33b** in Wasser wurden die Stammlösungen in Methanol hergestellt. Die Chinazoliniumformen **31a** und **33a** konnte mit Wasser hergestellt werden. Die pH-Werte wurden eingestellt, indem eine 0.1 M H₃PO₄-Lösung mit 0.3 M NaOH-Lösung titriert wurde.

5.2.1 UV/Vis Spektren von DHED

Das Gleichgewicht der Chinazoliniumverbindung **31a** (gelb in Wasser und polaren organischen Lösungsmitteln) sowie der Ring-geöffneten Form von DHED **31b** (orange in organischen Lösungsmitteln) wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie systematisch untersucht (Abb. 5.2).

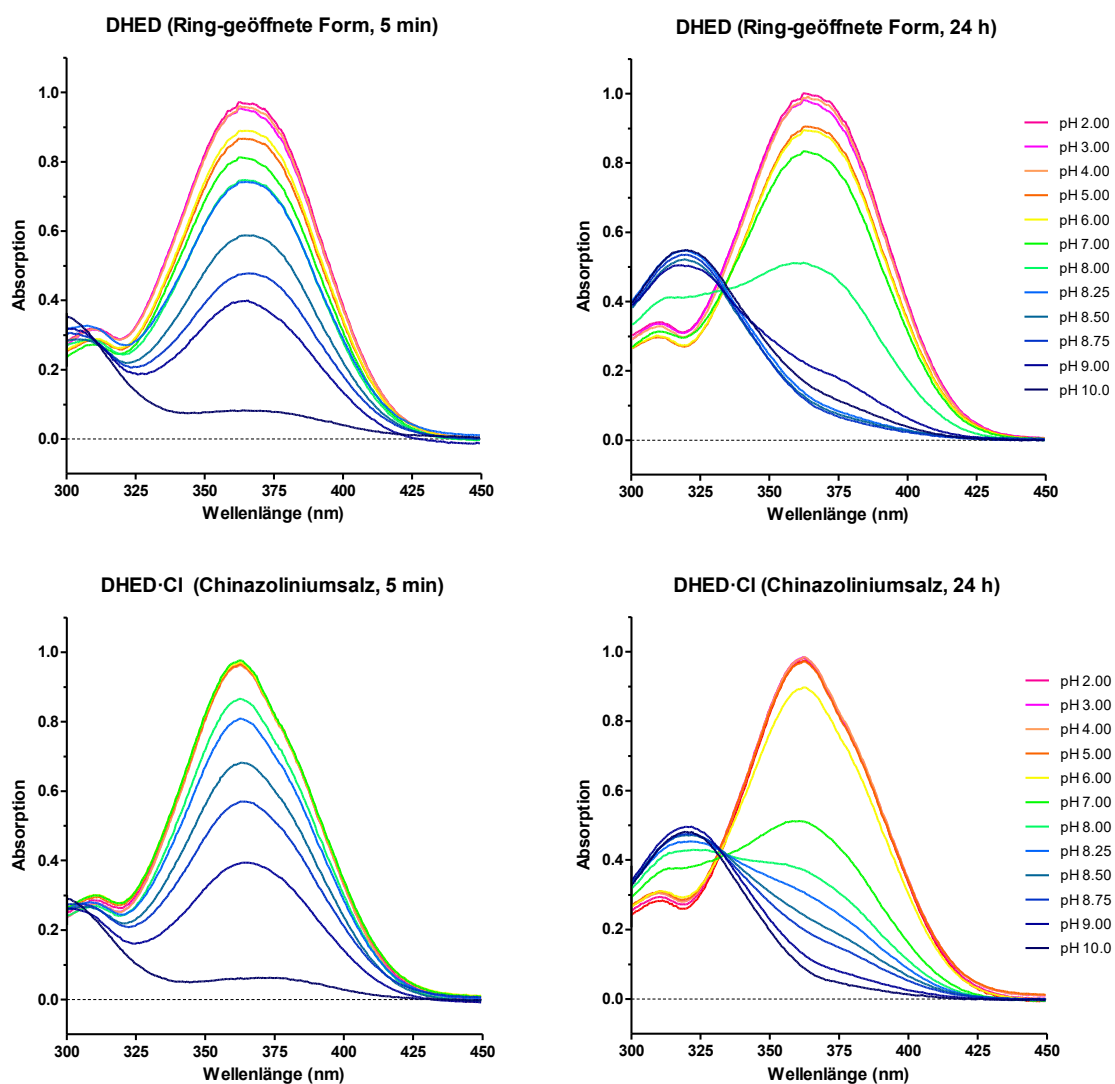


Abbildung 5.2 UV/Vis-Spektren von DHED als Ring-geöffnete Form **31b** (oben) und DHED als Chinazoliniumsalz **31a** (unten) in wässrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 – 10. Messung nach 5 min (links) und nach 24 h (rechts). Die hier gezeigten Graphen, sowie Abb. 5.3, 5.5 und 5.6, wurden mit GraphPad Prism 5 erstellt. Abbildung mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Beide Formen zeigen in den wässrigen pH-Lösungen (pH 2 – 10) die gleichen UV/Vis-Spektren. In sauren Lösungen (pH < 7) zeigt sich die Dominanz einer Spezies mit einem Absorptionsmaximum von 364 nm. Dies wird dem Chinazoliniumsalz, mit seiner schwach gelben Farbe, zugeschrieben. In alkalischen Lösungen (pH > 7) zeigt sich die Abnahme ebendieses Absorptionsmaximums und die Anreicherung eines Absorptionsmaximums bei einer

Wellenlänge von 321 nm. Nach 24 h wurden von den bereits gemessenen Küvetten nochmals UV/Vis-Spektren aufgenommen. In sauren Lösungen bis pH = 6 zeigt sich wie bei der Messung nach 5 min das Absorptionsmaximum von 364 nm. In Lösungen mit einem pH-Wert >7 ist die Akkumulation einer zweiten Spezies zu beobachten. Diese besitzt ein Absorptionsmaximum von 321 nm. Zusätzlich waren die betreffenden Lösungen farblos. Dies war überraschend, denn für die Entstehung der orangenen Ring-geöffneten Form **31b** wurde die Absorption bei einer Wellenlänge >400 nm erwartet.^{245, 262}

Aufgrund dieses Befundes wurden die Küvettenlösungen nach 24 h mittels LC-MS untersucht. Dabei wurden keine Zerfallsprodukte, sondern lediglich das Masse zu Ladungsverhältnis von m/z: 320.15 detektiert: Diese Masse entspricht der Anlagerung von Wasser an die Chinazolinium-Form oder der Masse der Ring-geöffneten Form.

Ungeachtet dessen, ob die UV/Vis-Messungen mit der Ring-geöffneten Form oder dem Chinazoliniumsalz durchgeführt wurden, konnten die gleichen UV/Vis-Spektren erhalten werden. Dies bedeutet, dass es ausgehend von beiden Spezies zur gleichen Gleichgewichtseinstellung im wässrigen Milieu bei den entsprechenden pH-Werten kommt. Ausgehend von der Ring-geöffneten Form wurde die Abnahme der Absorption bei 364 nm und die Anreicherung der Spezies, welche ein Absorptionsmaximum bei 321 nm zeigt, über einen Zeitraum von 24 h stündlich gemessen (Abb. 5.3). Anhand dieses zeitlichen Verlaufes kann abgelesen werden, dass die Umlagerung zur zweiten Spezies nach 18 h quantitativ ist, da sich das Absorptionsmaximum danach kaum noch ändert.

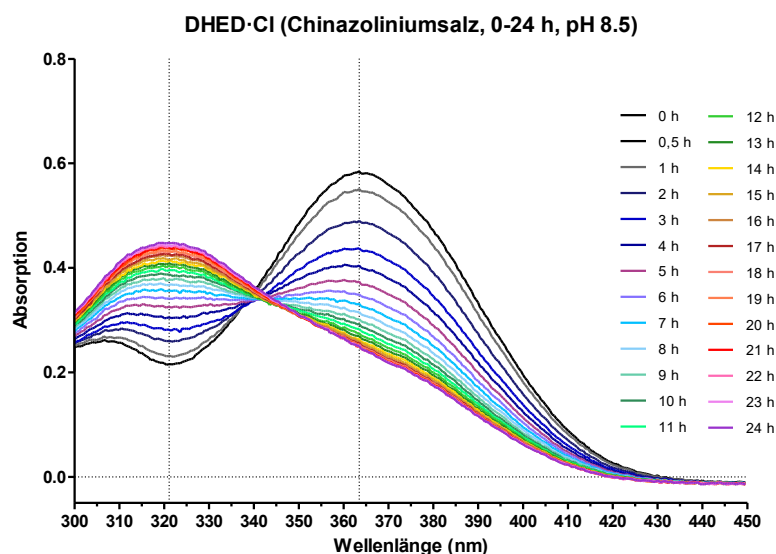


Abbildung 5.3 Änderung des Absorptionsmaximums von DHED **31a** über 24 h in einer Lösung mit pH-Wert = 8.5. Abbildung mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Aus der farblosen alkalischen Lösung von pH = 9 wurde beim Zusatz von CH₂Cl₂ und nach kräftigem Schütteln eine gelb gefärbte Dichlormethanphase erhalten (Probe 3, Abb. 5.4). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass in alkalischen Lösungen eine andere Spezies als die

Ring-geöffnete Form von DHED entsteht. Das Vermessen der Dichlormethanphase mittels LC-MS zeigte die Masse m/z : 302.10, welches der Chinazoliniummasse entspricht und damit auch das Vorhandensein der Ring-geöffneten Form in der Dichlormethanphase erklärt.

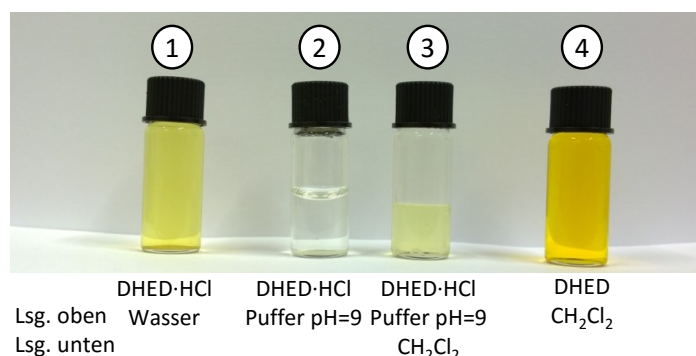
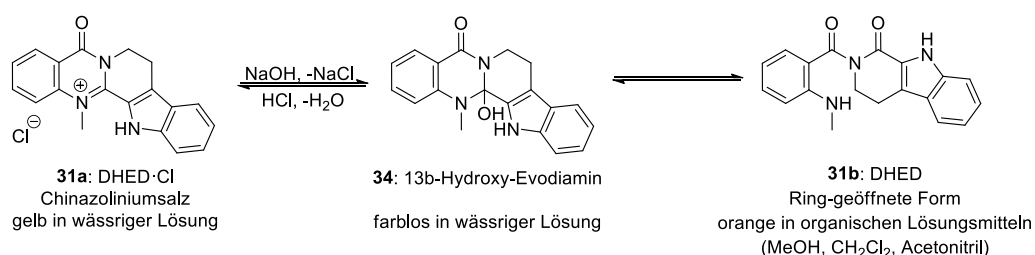


Abbildung 5.4 Darstellung der gefärbten Lösungen mit 3.0 mg Chinazoliniumsalz **31a** in Wasser (1) und **31b** in Dichlormethan (4). In der Mitte ist die farblose Pufferlösung mit 1.0 mg gelöstem Chinazoliniumsalz **31a** (2), sowie dessen Extraktion in Dichlormethan (3) abgebildet.

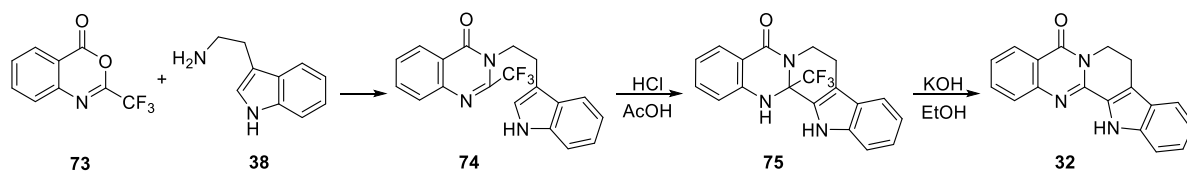
Die Beobachtung des Absorptionsmaximums bei 321 nm nach 24 h und die Extraktion einer farbigen Verbindung in die Dichlormethanphase, lassen die Vermutung zu, dass nicht, wie ursprünglich vermutet, die Ring-geöffnete Form im wässrigen Medium mit dem Chinazoliniumsalz im Gleichgewicht steht, sondern vermutlich eine dritte Spezies. Dies könnte das sog. "13b-Hydroxy-Evodiamin" **34** sein (m/z : 320.14, Schema 5.17). Wie eingangs erwähnt (Kapitel 5.1), wurde die Struktur **34** ursprünglich von Gopinath *et al.* als freie Base beschrieben.²⁵⁹



Schema 5.17 Durch UV/Vis-Spektroskopie aufgeklärtes Gleichgewicht zwischen dem Chinazoliniumsalz **31a** und des 13b-Hydroxy-Evodiamins **34** im wässrigen Medium, wobei nur im organischen Medium die Ring-geöffnete Form **31b** erhalten werden kann. Schema mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Aufgrund der vorliegenden Daten wird angenommen, dass zwischen den Verbindungen **31a** und **34** in wässrigem Medium ein Gleichgewicht besteht, da diese Verbindungen offensichtlich eine bessere Wasserlöslichkeit, verglichen mit **31b** aufweisen. Die Ring-geöffnete Form **31b** kann vermutlich nur in organischen Lösungsmitteln erhalten werden, wie es die Extraktion in die Dichlormethanphase belegt.

Die Verbindung 13b-Hydroxy-Evodiamin **34** kann als eine plausible Zwischenstufe angesehen werden, weil der Position 13b auch in der Synthese zu Rutaecarpin die Schlüsselrolle zukommt.²⁶³ In der Synthese von Bergman *et al.* ist Position 13b mit einer CF₃-Gruppe substituiert, welche durch den Einfluss von Base aufgrund der Ausbildung der C=N-Doppelbindung abgespalten wird (Schema 5.18). Es kann daher angenommen werden, dass Nucleophile bevorzugt in dieser Position angreifen.



Schema 5.18 Darstellung von Rutaecarpin **32** ausgehend von Tryptamin **38** und dem Trifluoromethyloxazinon-Derivat **73**, wobei im letzten Schritt der Synthese unter dem Einfluss von Base durch Abspaltung der 13b-CF₃-Gruppe die C=N Doppelbindung im Alkaloid **32** ausgebildet wird.²⁶³

5.2.2 UV/Vis Spektren von Benz-DHED

Analoge UV/Vis-Spektren wurden auch für Benz-DHED **33a** und **33b** erhalten. Benz-DHED ist als Chinazoliniumsalz farblos und zeigt in der Ring-geöffneten Form in organischen Lösungsmitteln eine gelbe Farbe. Um die Reversibilität des Gleichgewichtes zu testen, wurden die UV/Vis-Spektren wieder ausgehend von der Ring-geöffneten Form einerseits und der Chinazoliniumform andererseits durchgeführt (Abb. 5.5).

Dies ergab vergleichbare UV/Vis-Spektren mit einem Absorptionsmaximum bei 310 nm, wobei bei dieser Verbindung das Absorptionsmaximum im basischen pH-Bereich aus dem UV/Vis-Bereich verschwindet. Alle Küvettenlösungen waren farblos.

Im Gegensatz zu den Messungen von DHED zeigt sich bei Benz-DHED keine so klare Trennung der im Gleichgewicht entstandenen Spezies zwischen pH <7 und pH >7. Nach 24 h scheint sich die Chinazoliniumform in pH-Werten <7 angereichert zu haben. Im Bereich von pH = 7.5 bis 8.0 liegt vermutlich eine andere Zusammensetzung der wässrigen Lösung vor als bei pH >8.25. Diese Grenze ist für die Messung nach 24 h ausgehend von der Ring-geöffneten Form leichter zu ziehen, als dies für die Messung des Chinazoliniumsalzes der Fall ist. Die Absorptionen der Chinazoliniumlösungen in den Pufferlösungen mit pH-Werten von 8.00 und 8.25 liegen näher beieinander, als dies für die Absorption der Ring-geöffneten Form nach 24 h der Fall ist.

Auch bei Benz-DHED wurden LC-MS-Messungen der Küvettenlösungen nach 24 h durchgeführt. In alkalischen Lösungen ab pH = 7 wurde eine Masse korrespondierend mit angelagertem Wasser an das Chinazoliniumsalz gefunden. Die bestimmte Masse ist m/z : 281.15 und entspricht dem "13a-Hydroxy-Benz-Evodiamin" **46** oder auch der Masse der Ring-geöffneten Form. In den Küvettenlösungen der sauren pH-Werte wurde die Masse entsprechend dem Chinazoliniumsalz gemessen.

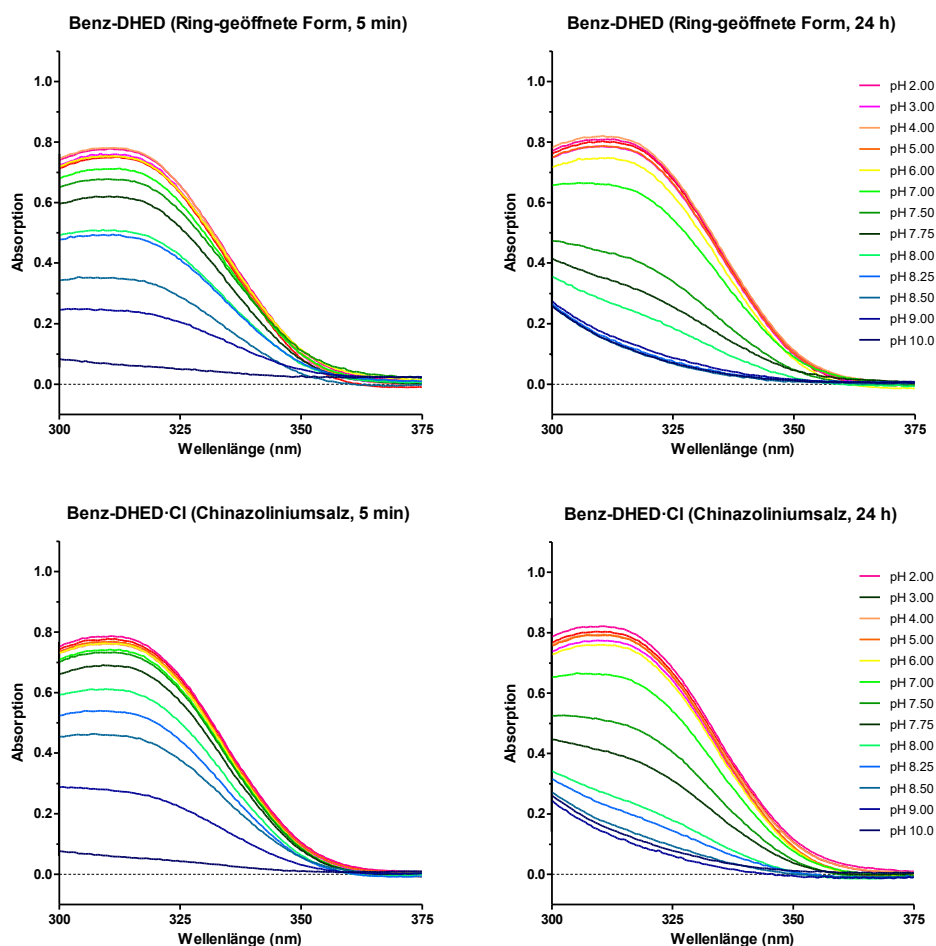
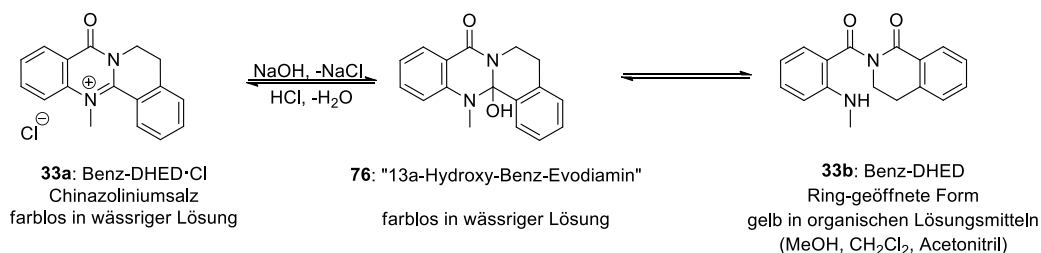


Abbildung 5.5 UV/Vis-Spektren von Benz-DHED als Ring-geöffnete Form **33b** (oben) und des Chinazoliniumsalzes **33a** (unten) in wässrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 – 10. Messung nach 5 min (links) und nach 24 h (rechts). Abbildung mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Es wird daher analog zu DHED auch für Benz-DHED postuliert, dass ein Gleichgewicht zwischen drei Spezies besteht: Im Sauren liegt die Chinazoliniumform **33a** vor, im basisch wässrigen vermutlich das 13a-Hydroxy-Benz-Evodiamin **76** und in organischen Lösungen die Ring-geöffnete Form **33b** (Schema 5.19).

Die Abnahme des Absorptionsmaximums wurde in stündlichen Zeitabständen über 24 h gemessen und ist in Abb. 5.6 dargestellt.



Schema 5.19 Durch UV/Vis-Spektroskopie aufgeklärtes Gleichgewicht zwischen dem Chinazoliniumsalz **33a** und des 13a-Hydroxy-Evodiamins **76** im wässrigen Medium, wobei nur im organischen Medium die Ring-geöffnete Form **33b** erhalten werden kann.

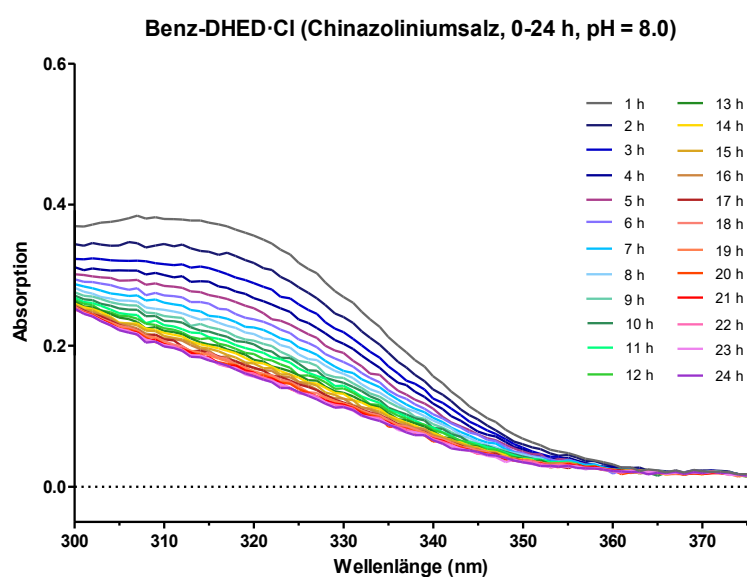


Abbildung 5.6 Änderung des Absorptionsmaximums von Benz-DHED über 24 h in einer Lösung mit pH-Wert = 8.0.

Über den Zeitraum von 24 Stunden nimmt die Absorption um 48% ab (bestimmt bei 310 nm, n = 1 mit n = Anzahl Messungen). Auf Grundlage der in Abb. 5.5 gezeigten Diagramme wurde eine Absorptionsabnahme um 44% (n = 3) für die Ring-geöffneten Form und von 55% (n = 3) für die Salzform bestimmt. Abbildung 5.6 zeigt, dass im Falle des Benz-DHED-Cl's **33a** die Anreicherung, vermutlich zu „13a-Hydroxy-Benz-Evodiamin“ **76** nach etwa 17 h abgeschlossen ist.

5.3 Pharmakologische Untersuchungen von DHED

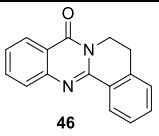
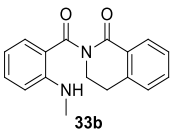
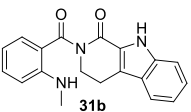
DHED-Cl **31a** wurde bereits *in vivo* an Mäusen getestet und erwies sich wirksam Gedächtnisdefizite, depressionsähnliches Verhalten sowie Stress-induzierte kognitive Defizite ausgleichen.^{222, 237-239} Zusätzlich ist DHED-Cl in der Lage, Amyloid- β induzierte Amnesie in Mäusen zu verbessern.²⁴⁰ Pharmakokinetische Parameter wie Bioverfügbarkeit und Distribution von DHED-Cl im Gehirn von Ratten wurden ebenfalls bereits untersucht.²³⁰ Die Studie ergab, dass die orale Bioverfügbarkeit nach einer Gabe von 100 mg/kg DHED-Cl bei 16.5 % liegt. Die Blut-Hirnschranken-Gängigkeit wurde bisher nur indirekt nachgewiesen, indem die regionale Verteilung von DHED-Cl in Teilen des Gehirns gemessen wurde. Nach einer intravenösen Gabe von 10 mg/kg DHED-Cl wurde eine Konzentration von 0.1 $\mu\text{g/mL}$ im Gehirn und eine Plasmakonzentration von 4.8 $\mu\text{g/mL}$ bestimmt.

Um das pharmakologische Profil von DHED und Benz-DHED zu erweitern, wurden mit Kooperationspartnern neben den IC_{50} -Messungen auch die Neurotoxizität sowie die Neuroprotektion und die Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung bestimmt.

5.3.1 Biologisch aktive Form von Benz-DHED und DHED

Die IC_{50} -Werte wurden mit der Methode des Ellman-Assays von E. Sawatzky (Universität Würzburg) bestimmt und sind in Tabelle 5.5 zusammengestellt.⁹⁹ Benz-Rutaecarpin **46** zeigt nur eine schwache Inhibition im niedrigen dreistellig mikromolaren Bereich von 23 – 38% bei 100 μM an AChE und BChE. Die Inhibitionswerte sind bei der Testung an der *humanen* und *electrophorus electricus* Isoform von AChE vergleichbar.

Tabelle 5.5 Zusammenstellung der gemessenen IC_{50} -Werte und pIC_{50} -Werte mit mittlerer Standardabweichung SEM für die Chinazolinonverbindung **46**, Benz-DHED **33b** sowie DHED **31b**. Tabelle mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Verbindung	$\text{IC}_{50}(\text{hAChE})$	$\text{IC}_{50}(\text{eeAChE})$	$\text{IC}_{50}(\text{eqBChE})$	$\text{IC}_{50}(\text{eeAChE})$	$\text{IC}_{50}(\text{eqBChE})$
	pH = 8	($\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$) pH = 8	($\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$) pH = 8	($\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$) pH = 7	($\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$) pH = 7
 46	23% bei 100 μM *	38% bei 100 μM	38% bei 100 μM	n.b.	n.b.
 33b	76% bei 500 μM *	14.3 μM (4.84 \pm 0.02)	60% bei 500 μM	17.1 μM (4.77 \pm 0.02)	n.b.
 31b	n.b.	6.6 μM (5.18 \pm 0.14)	7.0 μM (5.16 \pm 0.06)	2.4 μM (5.62 \pm 0.07)	6.3 μM (5.20 \pm 0.01)

*: Präzipitation bei 500 μM ; n.b. nicht bestimmt. Alle IC_{50} -Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Das Alkaloid Benz-DHED **33b** hingegen zeigt für *hAChE* eine schwache Aktivität von 76% bei 500 μM und einen IC_{50} -Wert von 14.3 μM an *eeAChE*. Die Aktivität an *BChE* beträgt 60% bei 500 μM . DHED **31b** weist eine ausgeglichene Aktivität an beiden Enzymen mit IC_{50} -Werten von 6.6 μM an *AChE* und 7.0 μM an *BChE* auf. Die IC_{50} -Werte bei $\text{pH} = 8$ stimmen mit bereits publizierten Werten überein.¹³⁹

In den UV/Vis-Messungen ist nach 5 min bei $\text{pH} = 8$ schon ein Abfall im Absorptionsmaximum zu beobachten und es ist davon auszugehen, dass bei diesem pH -Wert keine Reinsubstanz mehr vorliegt. Deshalb wurden die Inhibitionsdaten zusätzlich auch bei $\text{pH} = 7$ gemessen, weil das Absorptionsmaximum in den UV/Vis-Messungen näher an den Maxima von sauren pH -Werten liegt und damit die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass bei $\text{pH} = 7$ eher die Inhibition einer Reinsubstanz gemessen wird. Die Messung für Benz-DHED zeigte für *eeAChE* bei $\text{pH} = 7$ einen vergleichbaren Wert von 17.1 μM gegenüber 14.3 μM bei $\text{pH} = 8$. Bei dem Alkaloid DHED verhält es sich ähnlich. Auch dort liegen die Aktivitäten bei $\text{pH} = 7$ an beiden Enzymen im vergleichbaren mikromolaren Bereich (2.4 μM für $\text{pH} = 7$, 6.6 μM für $\text{pH} = 8$).

Aufgrund dieser Datenlage wird darauf geschlossen, dass bei kurzen Inkubationszeiten (4.5 min), wie sie im Assay verwendet wurden, bei $\text{pH} = 8$ die Inhibition größtenteils von der Chinazoliniumform **31a** bzw. **33a** hervorgerufen wird. Es kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der IC_{50} -Wert nicht doch aufgrund einer Mischung aus Hydroxyspezies und Chinazoliniumform zustande kommt.

Sofern die Inhibition der reinen 13a- oder 13b-Hydroxy-Verbindung im Assay bestimmt werden soll, wird aufgrund der Messung über 24 h empfohlen, die Verbindung im Falle des Benz-DHED's für 17 h bei $\text{pH} = 8.0$ und bei DHED für 18 h bei $\text{pH} = 8.5$ zu inkubieren, um die vollständige Bildung der Hydroxyspezies zu gewährleisten.

Die ermittelten IC_{50} -Werte liegen sowohl für *AChE* (Benz-DHED **33b** und DHED **31b**), als auch *BChE* (DHED **31b**) im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich. Die Inhibitionsdaten zeigen, dass die Alkaloide selbst schon eine Aktivität an den beiden Enzymen haben. Somit legen es diese Daten nahe, dass die Grundgerüste durch Substituenten weiter zu modifizieren, um damit eine Aktivitätssteigerung und Inhibition im nanomolaren Bereich zu erzielen. Für eine Modifikation bietet sich die Einführung eines Carbamates an, da sich diese Art von pseudo-irreversiblen Inhibitoren als sehr potent erwiesen hat (Abb. 5.7).^{91,103} Auf eine mögliche Carbamatsynthese wird in Kapitel 5.4 ausführlicher eingegangen.

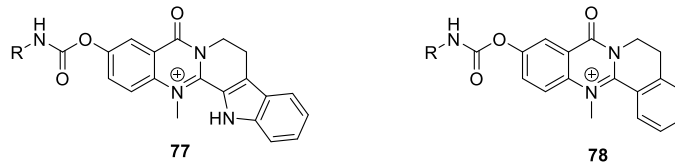


Abbildung 5.7 Carbamat **77** und **78** basierend auf dem DHED- und Benz-DHED-Grundgerüst.

5.3.2 Antioxidative Kapazität (ORAC Assay) von Benz-DHED und DHED

Im ORAC Assay (oxygen radical absorbance capacity) wurde die antioxidative Kapazität der Alkaloide Benz-DHED und DHED getestet.^{264, 265} Der Assay wurde von G. Brunner unter der Leitung von Prof. J. Heilmann im Jahr 2015 am Institut für Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt.

Antioxidantien können den durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) hervorgerufenen Zelltod verhindern. Im Assay wird gemessen, in wie weit eine Verbindung dazu in der Lage ist, die Menge an Peroxidradikalen zu verringern. Die Radikalbildung wird dabei durch den Radikalstarter 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH) hervorgerufen. Die dadurch erzeugten Radikale oxidieren den Farbstoff Fluorescein, welcher danach nicht mehr fluoresziert. Sofern Antioxidantien vorhanden sind, reagieren diese mit den Radikalen und die Fluoreszenz des Fluoresceins bleibt erhalten. Alle Resultate werden in Relation zu der Positivkontrolle namens 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox), einem wasserlöslichen Vitamin-E Derivat, angegeben.

Das Assayergebnis zeigt für DHED 1.44 ± 0.17 und Benz-DHED 0.10 ± 0.03 Trolox Äquivalente. Dies bedeutet, dass DHED etwas bessere antioxidative Kapazität als die Positivkontrolle Trolox besitzt. Demgegenüber steht der Befund, dass Benz-DHED nur 10% der antioxidativen Kapazität von Trolox zeigt.

Zusammenfassend beutet dies, dass der Indolring maßgeblich für die verbesserte antioxidative Kapazität verantwortlich ist, da dieser den einzigen Unterschied in den getesteten Verbindungen darstellt. Dieser Befund deckt sich mit bereits publizierten Daten.^{90, 91}

5.3.3 Neuroprotektion und Neurotoxizität von Benz-DHED und DHED

Neben dem Assay zur antioxidativen Kapazität wurde weiter ermittelt, ob die Alkaloide DHED **31b** und Benz-DHED **33b** glutamatsensitive *murine* hippocampale HT-22 Zellen in einem *in vitro* Assay vor dem Zelltod schützen können (**Neurotoxizität**, Abb. 5.8). Dieser Assay wurde von S. Schwindl unter der Leitung von Prof. J. Heilmann im Jahr 2015 am Institut für Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt.

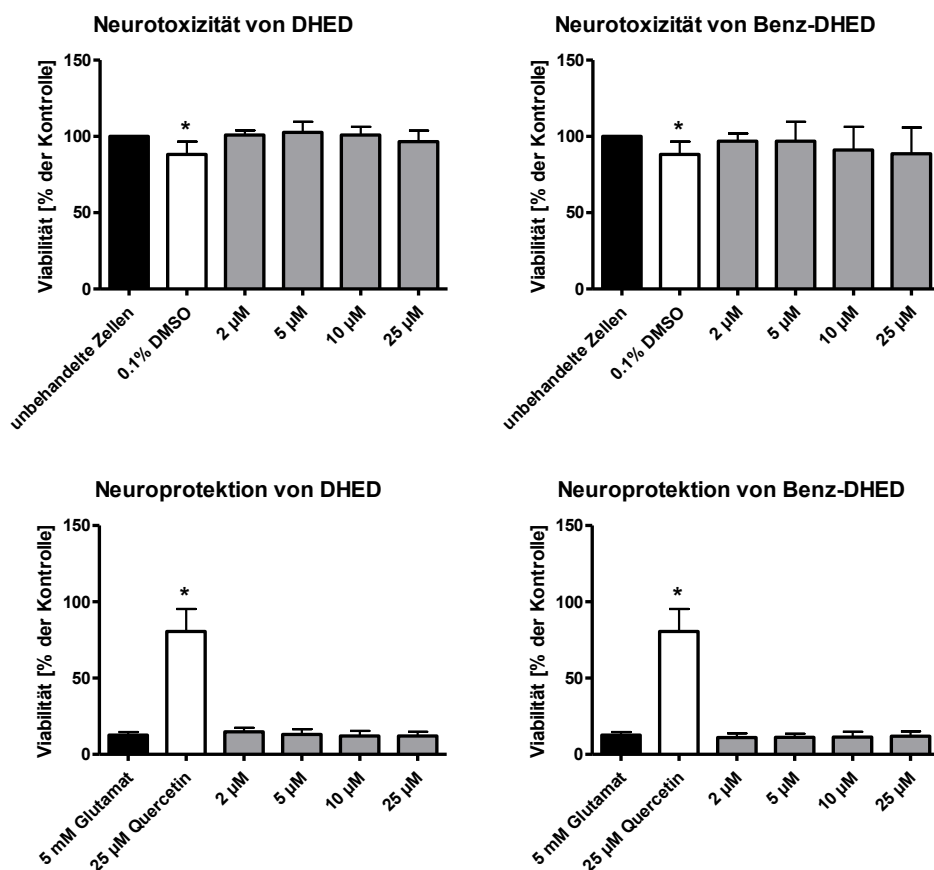


Abbildung 5.8 Oben: Messung der Neurotoxizität. Unten: Test der Neuroprotektion gegen Glutamat-induzierten oxidativen Stress. Beide Assays wurden an HT-22 Zellen durchgeführt. Abbildung mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wird bestimmt, indem der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) durch Reduktion in das blauviolette wasserunlösliche (*E,Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (Formazan) umgewandelt wird.²⁶⁶ Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen und diese Absorption korreliert direkt mit der Anzahl lebendiger Zellen.

Neben diesem Test auf Neurotoxizität wurden die Alkaloide auch auf ihre Fähigkeit der **Neuroprotektion** an HT-22 Zellen mit dem natürlichen Polyphenol Quercetin als antioxidative Referenz getestet (Abb. 5.8).^{90, 91}

Die Zellen wurden mit den Alkaloiden in Konzentrationen zwischen 2 und 25 µM und 5 mM Glutamat für den Test der Neuroprotektion bzw. ohne Glutamat, um die Neurotoxizität der Alkaloide zu testen, versetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 zusammengestellt und die Graphen zeigen keine Neurotoxizität für beide Alkaloide (Abb. 5.8, oben).

Die nicht vorhandene Neurotoxizität ist im Einklang mit den eingangs erwähnten pharmakologischen *in vivo* Modellen.

Die *in vivo* gemessenen Effekte, welche in Kapitel 5.3 ausgeführt wurden, sind daher auf das Alkaloid und nicht auf neurotoxische Effekte zurückzuführen. Eine Neuroprotektion konnte hingegen für beide Verbindungen nicht nachgewiesen werden. Für die Neuroprotektion zeigen hydroxysubstituierte Verbindungen, die der Polyphenolverbindung Quercetin ähnlicher sind, durchweg bessere Ergebnisse als unsubstituierte Verbindungen.^{91, 103}

5.3.4 Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung von Benz-DHED und DHED

Die Inhibition der Amyloid- β Fibrillenbildung wurde für die Alkaloide DEHD **31b** und Benz-DHED **33b** in einem Assay mit Bakterienzellen (*Escherichia coli*, BL21(DE3)) gemessen.^{267, 268} Der Assay wurde von Dr. A. Espargaró unter der Leitung von Prof. R. Sabaté im Jahr 2015 an der Fakultät für Pharmazie an der Universität in Barcelona durchgeführt.

Im Gegensatz zu dem bereits eingeführten Amyloid- β Assay (Kapitel 4.1.1) wurde hier die Inhibition der A β -Selbstaggregation gemessen, denn die Bakterienzellen überexprimieren das A β_{1-42} Peptid. Die Aggregation der A β -Fibrillen wird durch Thioflavin S (ThS) angefärbt.²⁶⁹ Die Bakterienzellen wurden nach 24 h Wachstumszeit und Inkubation mit der zu testenden Verbindung durch Zentrifugierung aufgeschlossen, die überstehende Lösung mit ThS versetzt und die Emission bei 520 nm nach Anregung bei 440 nm gemessen.

Das Experiment ergab, dass sowohl DHED, als auch Benz-DHED in einer Konzentration von 100 μ M nicht signifikant in der Lage sind, die Fibrillenbildung zu inhibieren, da sie Inhibitionswerte <10% zeigten.

Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wird vorgeschlagen, einen Permeabilitätstest der Verbindungen durch die Zellwand durchzuführen sowie zusätzlich dazu die Inhibition der Amyloid- β -Fibrillenbildung im *in vitro* Experiment ohne Bakterienzellen zu testen.

5.4 Synthetische Vorarbeiten zur Carbamatherstellung

Das carbamatsubstituierte Evodiaminderivat **79** weist eine BChE-selektive Inhibition mit einer Affinität von 492 nM für dieses Enzym auf (Abb. 5.9).⁹¹ Von Rutaecarpin gibt es zwar keine Carbamatstrukturen, aber das amidsubstituierte Derivat **80**, welches die AChE selektiv mit einem IC₅₀-Wert von 10.1 nM inhibiert.²⁷⁰ Ähnliche Verbindungen basierend auf dem Benz-DHED-Grundgerüst sind für die Entwicklung neuer Inhibitoren für AChE und BChE ebenfalls von Interesse. Die durchgeführten Experimente zur Carbamatherstellung werden im Folgenden besprochen.

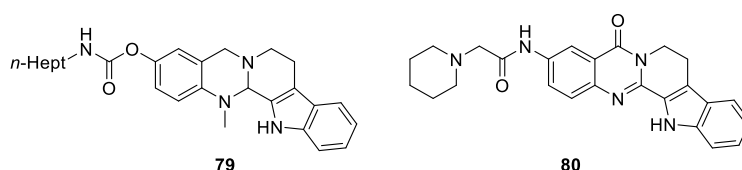
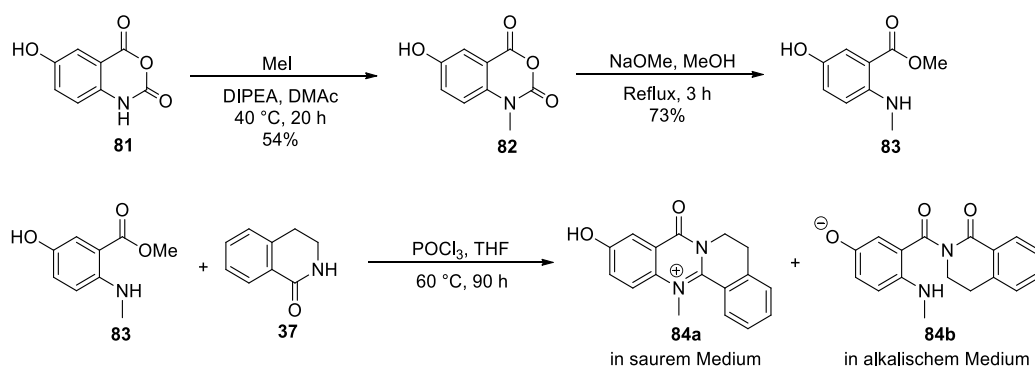


Abbildung 5.9 Carbamatsubstituiertes Evodiaminderivat **79** und Rutaecarpinderivat **80**.

5.4.1 Problemformulierung

Zur Einführung der Carbamatgruppe in *para*-Position zum Stickstoffatom wurde der mit einer Hydroxyfunktion substituierte Anthranilsäureester **83** ausgehend von 6-Hydroxy-iso-tosäureanhydrid **81** über eine *N*-Methylierung zu **82** und die darauffolgende Esterbildung in Methanol dargestellt (Schema 5.20).



Schema 5.20 Darstellung des hydroxysubstituierten Benz-DHEDs **84**.

Die Kondensationsreaktion des hydroxysubstituierten Esters **83** mit Lactam **37** lieferte das Zielprodukt nach Extraktion in einer Rohausbeute von 15% mit einer Reinheit von lediglich 20%. Die Extraktion gestaltete sich aufgrund der verschiedenen Protonierungszustände des Endproduktes **84a** bzw. **84b** schwierig: In saurem Medium liegt das Benz-DHED Grundgerüst als Chinazoliniumsalz **84a** vor und ist damit besser in Wasser als in organischen Lösungs-

mitteln löslich. Die Hydroxyfunktion ist in saurem Medium ungeladen. In alkalischem Medium hingegen liegt die Ring-geöffnete Struktur **84b** vor, welche in organischem Medium besser löslich ist als in wässrigem Medium. Allerdings ist dann die Hydroxyfunktion deprotoniert, was die Wasserlöslichkeit wiederum erhöht. Versuche zur Erhöhung der Extraktionsausbeute durch Einsatz eines NH_4Cl -Puffers wie auch eines Ionenauschers (DOWEX) blieben erfolglos.

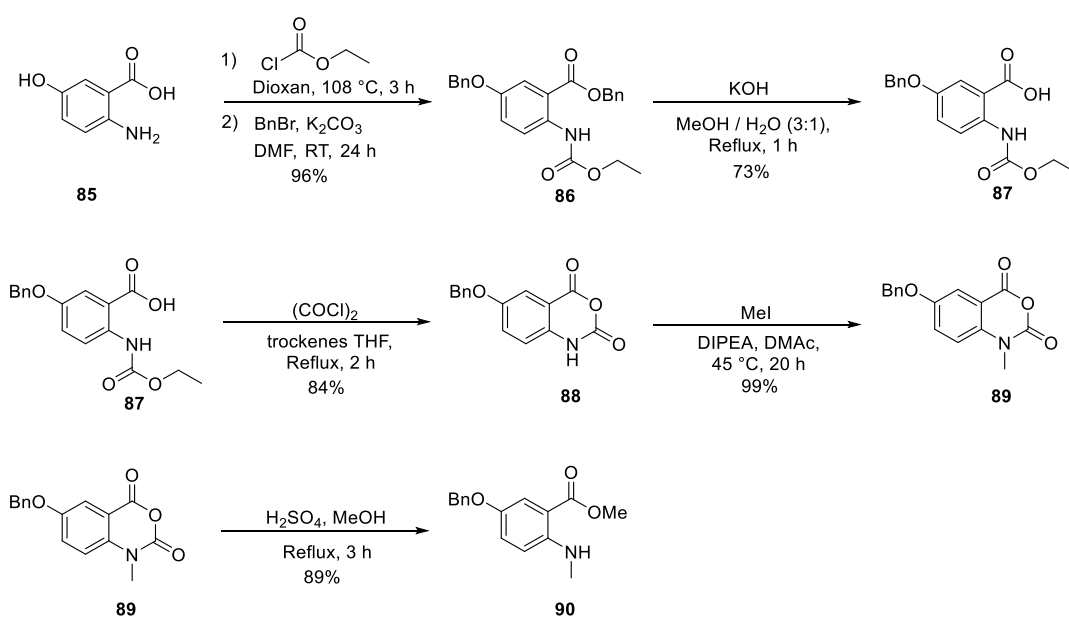
Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde eine Schutzgruppentechnik in der Syntheseroute eingesetzt.

5.4.2 Synthese mittels Schutzgruppentechnik

Ausgehend von dem bereits synthetisierten Iod-Anthranilsäureesters **48c** (s. Schema 5.7) wurde die Strategie verfolgt, den Iodsubstituenten durch einen Hydroxysubstituenten auszutauschen.²⁷¹ Eine Testreaktion mit Iodbenzol war nicht reproduzierbar, denn die Ausbeuten betragen 25 – 0%.

Eine weitere sehr gebräuchliche orthogonale Schutzgruppe stellt die Benzylgruppe dar.^{142, 272-274} Sie kann reduktiv mit 10% Palladium auf Kohle und Wasserstoff abgespalten werden.²⁷⁴ Bei dieser Reaktion ist keine aufwendige Produktreinigung notwendig, denn oftmals ist eine Produktfiltration ausreichend.

Die Einführung der Benzylgruppe erfolgte über fünf Reaktionsschritte, nach einer bekannten Syntheseroute von Huang *et al.*,⁹¹ mit einer Gesamtausbeute von 52% (Schema 5.21).



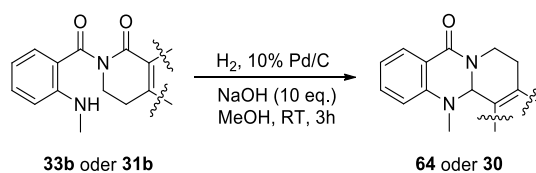
Schema 5.21 Darstellung des benzylgeschützten Anthranilsäureesters **89** über fünf Stufen ausgehend von 2-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**85**).

Die Synthese verlief ausgehend von 2-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**85**) über die Carbamatdarstellung mit anschließender Benzylierung beider freier OH-Gruppen zu **86**. Mittels alkalischer Esterverseifung wurde die Säure **87** erhalten. Daran schloss sich die Anhydridbildung mit Oxalylchlorid zu **88** an, eine Methylierung lieferte das *N*-methylierte Anhydrid **89**, gefolgt von der Öffnung des Anhydrides zum Ester **90**. Diese Reaktionsroute wurde der direkten Benzylierung des *N*-methylierten Anhydrides vorgezogen, da diese nur eine Ausbeute von 14% lieferte.

In der Folge wurde die Kondensation zwischen dem Ester **90** und Lactam **37** durchgeführt. Dabei kam es zur Bildung von Benz-Rutaecarpin **46** als Nebenprodukt, weshalb zunächst die Stabilität von Benz-DHED **33b** und DHED **31b** gegenüber den Hydrierungsbedingungen (Pd/C, H₂-Gas) zur Abspaltung der Schutzgruppe untersucht wurde.

In der Literatur beschriebene Versuche zum Einfluss der Hydrierbedingungen zeigten: DHED kann mit NaBH₃CN, H₂-PtO₂ in Essigsäure oder BH₃ zu Evodiamin umgesetzt werden.^{243, 245} Es ist ferner bekannt, dass benzylgeschütztes Evodiamin, wobei sich die Benzylschutzgruppe in *para*-Position zum Stickstoff befindet, reaktiv abgespalten werden kann und der Heterozyklus dabei intakt bleibt.²⁷⁴

Die Alkaloide Benz-DHED **33b** und DHED **31b** wurden in ihrer Ring-geöffneten Form den Hydrierungsbedingungen ausgesetzt. Die Durchführung der Reaktion im alkalischen Medium (NaOH) sollte das Gleichgewicht während der Reaktion auf der Seite der Ring-geöffneten Form halten, um die Hydrierung der C=N-Doppelbindung zurückzudrängen (Schema 5.22). Aber auch unter den angewendeten basischen Bedingungen wurde die Reduktion der C=N-Doppelbindung beobachtet und es wurden Benz-Evodiamin bzw. Evodiamin als Produkt erhalten. Hydrierungen ohne den Zusatz von Base lieferten wie erwartet die Evodiaminprodukte.

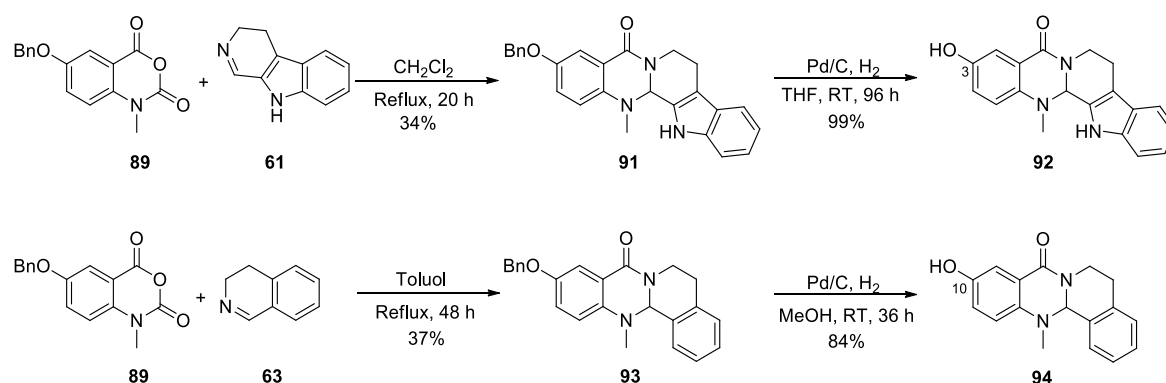


Schema 5.22 Die Hydrierung der Ring-geöffneten Formen von Benz-DHED **33b** und DHED **31b** mit NaOH als Reagenz liefern Benz-Evodiamin **64** bzw. Evodiamin **30**. Schema mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.

Einhergehend mit den UV/Vis-Messungen (Kapitel 5.2) werden die Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass in methanolischer Lösung mit zugefügtem NaOH die Bildung des 13b-Hydroxy-Evodiamins erfolgt, welches reduziert wird, oder, dass auch in diesem Medium ein Gleichgewicht zwischen der Chinazoliniumform und der Ring-geöffneten Form existiert. Die Bildung des Chinazoliniums führt zur Reduktion der C=N-Doppelbindung und liefert Evodiamin bzw. Benz-Evodiamin.

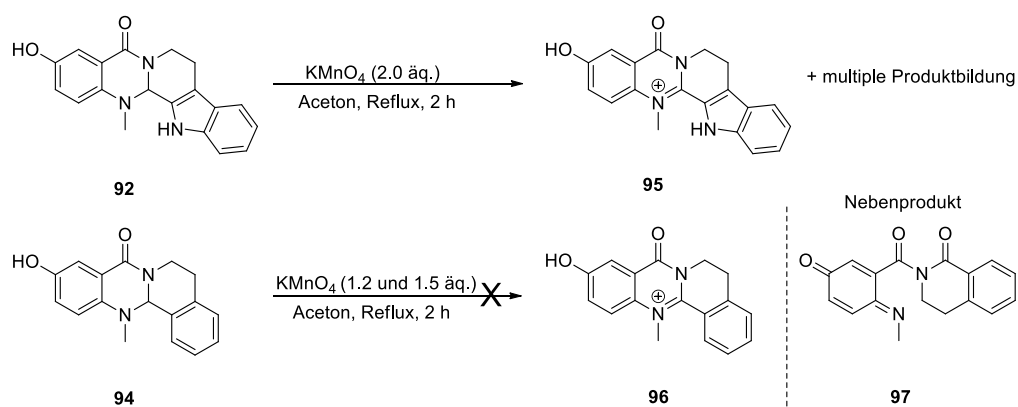
5.4.3 Oxidation von Hydroxy-Benz-DHED und Hydroxy-DHED

Als alternative Reaktionsroute wurde die Oxidationen ausgehend von Evodiamin und Benz-Evodiamin mit entsprechender Hydroxyfunktion in Position 3 und 10, Verbindung **92** bzw. **94** getestet. Die Synthese der entsprechend substituierten Ausgangsverbindungen verlief über das benzylgeschützte *N*-methylierte Anhydrid **89** sowie das Isochinolinderivat **61** bzw. **63** (Schema 5.23). Die erhaltenen Evodiamin- und Benz-Evodiaminderivate **91** bzw. **93** wurden anschließend einer reduktiven Debenzylierung mit 10% Pd/C und Wasserstoff unterzogen. Dadurch wurden die Hydroxyverbindungen **92** bzw. **94** in hohen Ausbeuten von 99% bzw. 84% erhalten.



Schema 5.23 Darstellung von 3-Hydroxy-Evodiamin **92** und 10-Hydroxy-Benz-Evodiamin **94** über zwei Stufen.

Die Alkaloide **92** und **94** wurden einer Oxidation mit KMnO_4 in Aceton unterzogen, wobei für die Verbindung **92** 2.0 äq. KMnO_4 und für **94** 1.2 und 1.5 äq. KMnO_4 verwendet wurden (Schema 5.24).



Schema 5.24 Oxidationsreaktionen der Hydroxy-Verbindungen **92** und **94** zu den Produkten **95** und **96** waren nicht zielführend.

Das LC-Chromatogramm der Reaktionsmischung des Evodiaminderivates **92** zeigte multiple Produktbildung sowie die Masse des vermeintlichen Produktes **95** (1.9%). Die Reaktion von

Hydroxy-Benz-Evodiamin **94** mit 1.2 äq. KMnO_4 zeigte keine Produktbildung und vorwiegend nicht umgesetztes Edukt (77%). Der Versuch mit 1.5 äq. Oxidationsmittel zeigte ebenfalls nicht das gewünschte Produkt, sondern neben anderen Produkten nicht umgesetztes Edukt **94** (22%) sowie das Nebenprodukt **97** (47%).

Die Oxidationsreaktionen ausgehend von den hydroxysubstituierten Evodiamin- und Benz-Evodiamin-Grundgerüsten waren nicht zielführend. In zukünftigen Studien ist es notwendig, die Äquivalente an Oxidationsmittel sowie die Reaktionsbedingungen neu zu evaluieren, um eine Reaktion mit weniger Nebenproduktbildung zu erhalten.

5.4.4 Anforderungen an eine Schutzgruppe für DHED/Benz-DHED

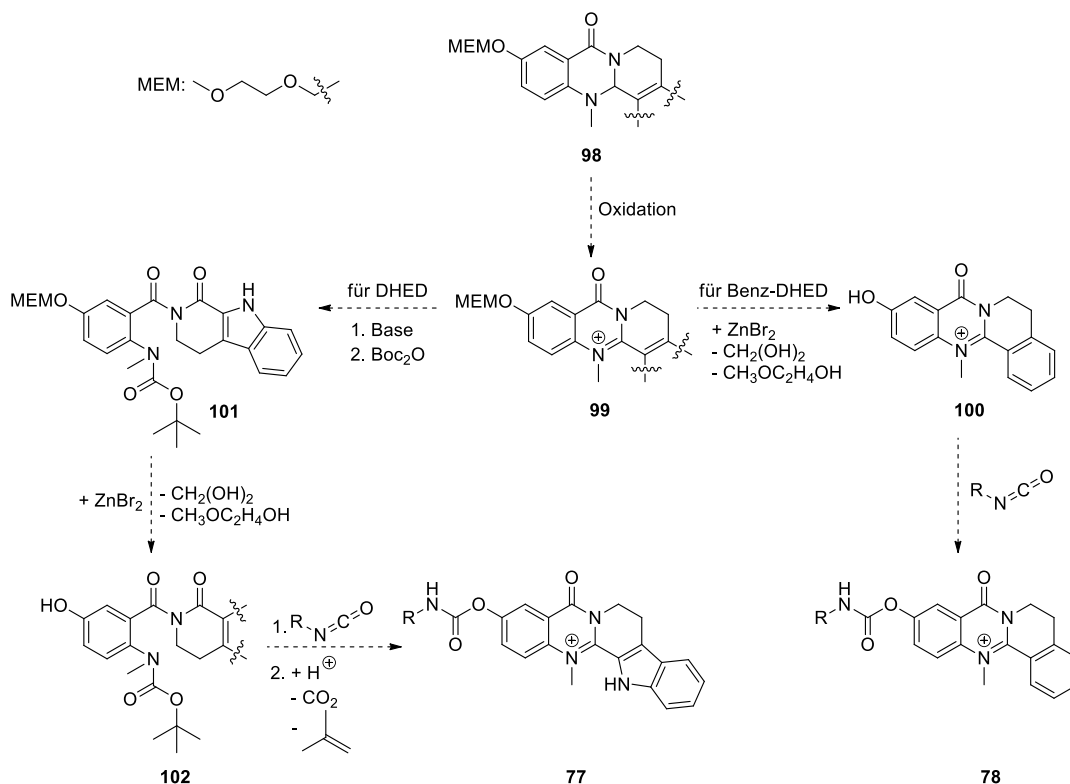
Die durchgeführten Versuche zur Carbamatsynthese waren aufgrund der Instabilität des Heterozyklus' gegenüber den Abspaltungsbedingungen der Schutzgruppe oder der Reaktivität in der Oxidationsreaktion ohne Schutzgruppe nicht zielführend. Aufgrund der in den Kapiteln 5.1.2 – 5.1.5 beschriebenen Untersuchungen zur Reaktivität und Stabilität von Benz-DHED **33b** und DHED **31b** lassen sich folgende Anforderungen für eine Schutzgruppe ableiten:

Für Benz-DHED ist eine geeignete Schutzgruppe weder säure-, noch basenlabil und nicht durch Reduktion oder Oxidation zu entfernen. Für DHED kann die Schutzgruppe auch säurelabil sein, da der Naturstoff im sauren Medium thermostabil ist.

Folglich sollte eine Schutzgruppe zum Einsatz kommen, welche Lewis-Säure labil ist. Eine solche Schutzgruppe ist 2-Methoxyethoxymethylether (MEM-OR).²⁷⁵ Diese Schutzgruppe wird mittels 2-Methoxyethoxymethylchlorid (MEM-Cl) und einer entsprechenden Base zur Deprotonierung der Hydroxygruppe eingeführt. Die Abspaltung erfolgt mittels ZnBr_2 als Lewis-Säure.

Die für die Carbamatdarstellung vorgeschlagene Syntheseroute beginnt mit der Oxidation des entsprechend geschützten Evodiamin- bzw. Benz-Evodiaminderivates (Schema 5.25).

Für Benz-DHED könnte dann nachfolgend die Entfernung der MEM-Schutzgruppe zum Hydroxyderivat **100** sowie die Carbamatsynthese zu **78** mittels des entsprechenden Isocyanatderivates vorgenommen werden. DHED erwies sich in den Stabilitätsuntersuchungen stabil gegenüber Säuren, weshalb eine Schützung des sekundären Amins mittels Butyloxycarbonyl (Boc) vorgenommen werden könnte. Dies würde die Aufreinigung der weiteren Reaktionsschritte vereinfachen, weil die Verbindung durch die Schützung des sekundären Amins nur noch in der Ring-geöffneten Form **101** und nicht mehr als Chinazoliumsalz vorliegen kann.



Schema 5.25 Möglicher Syntheseweg zur Darstellung der Carbamatstrukturen **77** und **78**, basierend auf DHED und Benz-DHED als Heterozyklus. Eine mögliche Schutzgruppe, durch eine Lewis-Säure entfernbar, stellt 2-Methoxyethoxymethylether dar (MEM).

In der Reaktionssequenz zur Darstellung des Carbamates **77** wird zunächst die Entfernung der MEM-Schutzgruppe von **101**, anschließend die Carbamatsynthese mit einem entsprechenden Isocyanatderivat und die folgende Entfernung der Boc-Schutzgruppe im letzten Reaktionsschritt empfohlen.

Es kann zunächst versucht werden die neue Schutzgruppe „MEM“ auf der Stufe des *N*-methylierten Anhydrides einzuführen. Eine mögliche Nebenreaktion stellt dann die Öffnung des Anhydrides dar. In diesem Fall sollte die Schutzgruppe zu Beginn der Synthese des Anthranilsäureesters eingeführt werden.

5.5 Fazit und Ausblick für Studien zu DHED und Benz-DHED

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, stellt DHED einen schon vielfach *in vivo* getesteten Naturstoff dar, über dessen Existenz in der Ring-geöffneten **31a** und Ring-geschlossenen **31b** Form bislang keine Studien vorlagen und dessen Synthese nur in vier Publikationen beschrieben ist.^{139, 243, 246, 247}

Für die Darstellung des Benz-DHED Derivates wurde gezeigt, dass in der Synthese mit Phosphoroxchlorid die Demethylierung eine ernstzunehmende Nebenreaktion darstellt, was zu unbefriedigenden Ausbeuten (<25%) führt.

In Stabilitätsuntersuchungen und UV/Vis-Messungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Benz-DHED, wie auch DHED bei hoher Temperatur (120 °C) sowohl in Toluol wie auch bei Raumtemperatur in wässriger Lösung stabil sind und keine intrinsische Instabilität der Verbindungen vorliegt. Für Benz-DHED wurde die Demethylierung auch unter dem Einfluss von Salzsäure in toluolischer Lösung beobachtet. Daher wird postuliert, dass die nucleophile Demethylierung durch Chloridionen das demethylierte Nebenprodukt (Benz-Rutaecarpin, **46**) entstehen lässt. Durch den Zusatz einer nicht nucleophilen Base, welche die Chloridionen bindet, konnte die Demethylierung teilweise unterbunden werden.

Zur Herstellung der für die Studien benötigten Mengen an DHED **31a/31b** und insbesondere an Benz-DHED **33a/33b** wurde die Synthese über die Oxidation der entsprechenden Evodiaminderivate gewählt. Durch Evaluation der Reaktionsbedingungen sowie der benötigten Äquivalente des Oxidationsmittels KMnO_4 konnte die Ausbeute an DHED auf 44% und die für Benz-DHED auf 69% gesteigert werden. Zukünftige Studien sollten die Anwendung der Oxidation bei substituierten Heterozyklen eingehender untersuchen.

DHED und Benz-DHED können als Chinazoliniumsalz (**31a**, gelb bzw. **33a**, farblos) und als Ring-geöffnete Dicarboxylform durch den Zusatz von Hydroxylionen (**31b**, orange-rot bzw. **33b**, gelb) isoliert werden. Zur Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen den beiden Zuständen der Alkaloide wurden UV/Vis-Spektren im pH-Bereich von 2 - 10 aufgenommen. In sauren Lösungen $\text{pH} < 7$, konnte für DHED ein Absorptionsmaximum bei 364 nm, welches einer gelben Farbe entspricht, detektiert werden. In alkalischen Lösungen verschob sich das Absorptionsmaximum aus dem sichtbaren Bereich nach 24 h auf 321 nm in den UV-Bereich. Massenspektroskopisch konnten keine Zerfallsprodukte detektiert werden. Aufgrund der verschobenen Absorption nach 24 h wird das Auftreten von 13b-Hydroxy-Evodiamin in alkalischen wässrigen Lösungen, anstelle der orange-roten Ring-geöffneten Form **31b**, postuliert. Das Gleichgewicht von DHED wurde damit um eine weitere Form in alkalisch wässrigen Medien erweitert. Analoge Erkenntnisse konnten auch für Benz-DHED gewonnen werden.

Die durchgeführten IC_{50} -Messungen konnten die bereits literaturbekannten Inhibitions-werte bestätigen ($\text{IC}_{50}(\text{AChE}) = 14.3 \mu\text{M}$ für **33b** und $6.6 \mu\text{M}$ für **31b**; $\text{IC}_{50}(\text{BChE}) = 60\%$ bei $500 \mu\text{M}$ für **33b** und $7.0 \mu\text{M}$ für **31b**). Neben dem für den Ellman-Assay üblichen pH-Wert von 8 wurde der Assay auch bei pH 7 durchgeführt. Die damit erhaltenen Werte zeigten keine signifikante Abweichung von den Werten, die bei pH 8 erhalten wurden. Es wird daher

gefolgt, dass der gemessene IC_{50} -Wert hauptsächlich der Chinazoliniumform **31a** bzw. **33a** zuzuschreiben ist.

Der Einsatz der Schutzgruppentechnik für substituierte DHED- und Benz-DHED-Derivate wurde anhand der Benzylschutzgruppe getestet. Jedoch erwies sich diese Schutzgruppe als nicht praktikabel, weil die C=N-Doppelbindung auch bei Zusatz von Base in den Hydrierbedingungen sowohl bei Benz-DHED **33b** als auch bei DHED **31b** reduziert wurde und somit die entsprechenden Evodiaminderivate erhalten wurden. Aus den Stabilitätsstudien sowie beginnenden Studien zum Einsatz von Schutzgruppen wird eine Lewis-Säure-labile Schutzgruppe für die zukünftige Synthese von DHED-basierten Carbamatstrukturen vorgeschlagen.

6. Dockingstudien von Chinazolincarbamat-Inhibitoren in BChE

Ausgehend von den Naturstoffen Evodiamin und Rutaecarpin wurden bereits Carbamat- bzw. Amidstrukturen hergestellt (Abb. 6.1).^{90, 91, 270, 276} Diese modifizierten Inhibitorstrukturen zeigen eine verbesserte Inhibition von BChE bzw. AChE im Vergleich zu den unsubstituierten Grundgerüsten. Basierend auf dem Evodiamin-Grundgerüst konnte durch die Einführung eines Carbamates in *para*-Position zum *N*-Methyl Stickstoffatom und Reduktion der C=O-Doppelbindung Verbindung **79** erhalten und damit die Inhibition von BChE im Vergleich zum Naturstoff **30** verbessert werden. Das Chinazolin **103** zeigt im Vergleich zum Indolo-Chinazolin **79** eine um den Faktor 39 bessere Affinität (K_C) zu BChE. Von Rutaecarpin **32** existieren bislang keine Carbamatderivate. Die potenteste in *para*-Position zum N=C-Stickstoffatom substituierte Verbindung ist das Amid **80**, welches die AChE mit einem IC_{50} -Wert von 10.1 nM inhibiert.

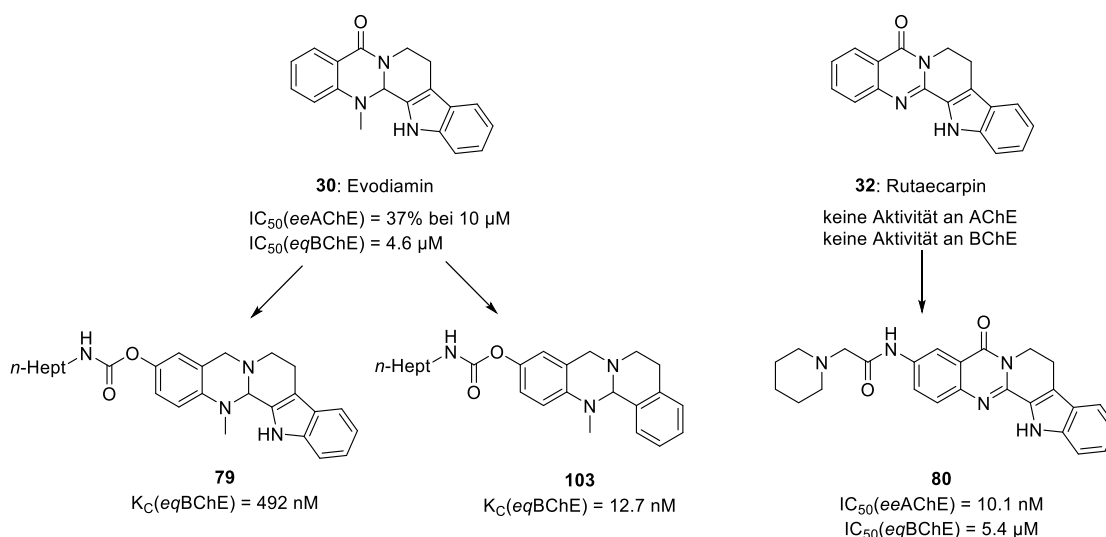


Abbildung 6.1 Carbamate **79** und **103** als Inhibitoren basierend auf Evodiamin **30** bzw. davon abgeleitet, sowie Amid **80** basierend auf dem Grundgerüst von Rutaecarpin **32**.^{90, 91, 270, 276}

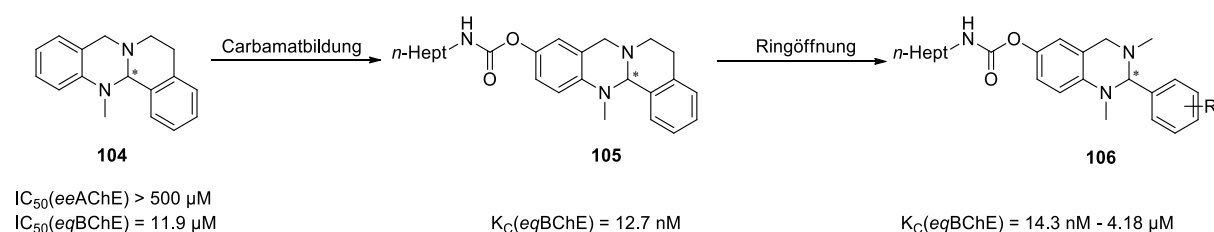
Die Amidverbindung **80** stellt einen reversiblen Inhibitor dar, wohingegen die Carbamatverbindungen pseudo-irreversible Inhibitoren sind. Bei pseudo-irreversiblen Inhibitoren ist der Heterozyklus hauptsächlich dafür verantwortlich, die Carbamatgruppe in der BChE-Bindetasche so zu platzieren, dass es zur Übertragung des Carbamatrestes auf das Serin in der katalytischen Triade und einer irreversiblen Bindung an diese Aminosäure kommt. Durch pseudo-irreversible Inhibitoren wird das Enzym, zeitlich betrachtet, wesentlich länger inhibiert als dies bei einem reinen reversiblen Inhibitor der Fall ist.^{103, 277} Wie der Name „pseudo“ schon suggeriert, wird die Carbamatgruppe nach einem gewissen Zeitraum vom Serin abhydrolysiert und dadurch wieder das funktionsfähige Enzym freigesetzt.^{103, 278}

Das Konzept von pseudo-irreversiblen Inhibitoren ist für Studien zur Lokalisation der BChE im Gehirn interessant. Die Carbamateinheit kann radioaktiv markiert werden und nach der Inhibition des Enzyms kann mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) die Lokalisation der BChE *in vivo* untersucht werden.²⁷⁹

Zum besseren Verständnis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie zur generellen Verbesserung von Leitstrukturen ist es hilfreich, ein Modell der Bindemodi in dem entsprechenden Enzym zu haben. Für einen Datensatz von Carbamatinhibitoren der BChE wurde ein Dockingmodell zur Identifikation bevorzugter Bindemodi entwickelt.

6.1 Carbamat-basierte Chinazolininhibitoren

Der Datensatz der BChE-selektiven Inhibitoren besteht aus racemischen Tetrahydrochinazolin-Verbindungen, welche von Edgar Sawatzky an der Universität Würzburg hergestellt und kinetisch untersucht wurden (Schema 6.1).¹⁰³ Die Entwicklung der Carbamat-Struktur auf welcher der Datensatz basiert, verlief folgendermaßen: Die Chinazolin-Verbindung **104** zeigt schon ohne Substitution eine Selektivität gegenüber BChE.^{90, 103, 140} Die Inhibition der BChE liegt dabei mit 11.9 μM im mikromolaren Bereich. Durch die Einführung eines Carbamates in *para*-Position zum *N*-Methyl Stickstoffatom wurde Verbindung **105** erhalten, welche an BChE eine Affinität (K_C) von 12.7 nM aufweist.⁹⁰ Durch die Entfernung einer Methylengruppe in der tetrazyklischen Verbindung **105** wurde formal die trizyklische Inhibitorgrundstruktur **106** erhalten. Die thiophenylsubstituierte Verbindung **106a** stellt die aktivste Verbindung (K_C -Wert = 14.3 nM) der trizyklischen Verbindungsklasse dar (s. Tabelle 6.1).¹⁰³ Der Datensatz umfasst elf kinetisch bestimmte Inhibitoren.

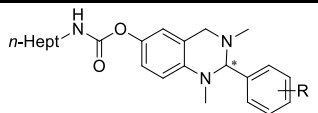
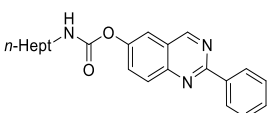


Schema 6.1 Die Carbamatbildung ausgehend von **104** liefert den selektiven pseudo-irreversiblen BChE Inhibitor **105**. Durch die formale Entfernung einer Methylengruppe wird die trizyklische Struktur **106** erhalten, auf deren Grundlage eine Inhibitorbibliothek synthetisiert wurde. Schema modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.

Bei pseudo-irreversiblen Liganden wird auf die Angabe des IC₅₀-Wertes verzichtet. Die IC₅₀-Werte vereinen sowohl die Affinität des Liganden zur BChE-Bindetasche, als auch die Inhibition des carbamoylierten Enzymes und sind daher für die Beschreibung des hier vorliegenden komplexen sowie zeitabhängigen Inhibitionsmechanismus nicht präzise genug.²⁸⁰ Für die Beschreibung der Affinität des Liganden zum Enzym wird der kinetisch ermittelte K_C-Wert und für die Angabe der Übertragungsrate des Carbamates auf das Serin der katalytischen Triade der k₃-Wert herangezogen.

Die Thiophenylverbindung **106a** zeigt sowohl für *eq*BChE, als auch *h*BChE einen vergleichbaren K_C-Wert von 14.3 bzw. 19.7 nM (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1 Kinetisch bestimmte Werte (Affinität K_C und Übertragungsrate k₃) für Carbamat-basierte Inhibitoren an *eq*BChE. Tabelle modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.

 R		K _C (<i>eq</i> BChE) [nM]	k ₃ (<i>eq</i> BChE) [min ⁻¹]
106a	2-thiophenyl-	14.3 ± 6.2 19.7 ± 0.9 ^a	0.14 ± 0.04 0.32 ± 0.01 ^a
106b	1-naphthyl-	15.6 ± 17.6 ^b	0.03 ± 0.002 ^b
106c	4-F-Ph-	24.5 ± 12.7	0.14 ± 0.04
106d	Ph-	226 ± 82.8	0.13 ± 0.04
106e	3-Cl-Ph-	227 ± 121	0.16 ± 0.05
106f	3-MeO-Ph-	622 ± 235	0.18 ± 0.05
106g	4-CF ₃ -Ph-	757 ± 252 ^b	0.05 ± 0.01 ^b
106h	4-MeO-Ph-	1.2·10 ³ ± 119	0.24 ± 0.01
106i	2,6-Cl-Ph	4.1·10 ³ ± 1.2·10 ³	0.23 ± 0.06
107	 Physostigmin	1.1·10 ³ ± 578 ^b	0.14 ± 0.06 ^b
	Physostigmin	280 ± 130	0.3 ± 0.1

^a Gemessen an *h*BChE. ^b Die Werte wurden unter der Annahme einer pseudo-irreversiblen Inhibition berechnet. Aufgrund von Abweichungen in den kinetischen Daten kann es sich bei den markierten Inhibitoren auch um einen anderen Inhibitionsmodus handeln. Die Werte in der Tabelle sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Obwohl ein Phenylring ein Bioisoster des Thiophens ist,²⁸¹ zeigt die Phenylverbindung **106d** eine etwas schlechtere Affinität im dreistellig nanomolaren Bereich ($K_C = 226$ nM). Ausgehend davon scheinen sterisch kleine Substituenten, wie ein *para*-Fluoratom in **106c**, toleriert zu werden (K_C -Wert = 24.5 nM). Die Verbindung **106e** mit *meta*-Chlorsubstituent zeigt im Rahmen der Messunsicherheit eine vergleichbare Inhibition wie **106f** mit einem *meta*-Methoxysubstituenten. Die Toleranz gegenüber einem *meta*-Methoxysubstituenten ($K_C = 622$ nM) ist im Vergleich zu einem *para*-Methoxysubstituenten in **106h** ($K_C = 1.2 \cdot 10^3$ nM) größer. Die Verbindungen **106g**, **106b** und **107**, zeigen in den kinetischen Messungen eine Abweichung vom Verhalten der übrigen Verbindungen und können daher nicht gleichermaßen im Dockingmodell diskutiert werden. Die *ortho*-substituierte Dichloro-verbindung weist mit $4.1 \cdot 10^3$ nM die geringste Affinität der getesteten Verbindungen auf. Die Syntheseidee zu dieser Verbindung entstand im Docking-Prozess. Verbindung **106i** diente als Testsubstanz, um aufzuklären wie der Arylring in Bezug auf den Tetrahydrochinazolinbicyklus orientiert ist (s. Kapitel 6.2.3).

Die Unterschiede der Affinität spiegeln sich nicht in der Übertragungsrate des Carbamates wieder. Diese liegt mit Ausnahme der Naphthylverbindung **106b** sowie der CF_3 -Verbindung **106g** zwischen 0.13 und 0.24 min^{-1} . Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die ähnlichen Übertragungsraten ihren Ursprung in einer vergleichbaren Orientierung des Carbamates in der BChE-Bindetasche haben. Für die Verbindungen wird deswegen ein konservierter Bindemodus bezüglich der Lage des Carbamates in der BChE-Bindetasche angenommen.

Die Verbindungen **106b**, **106g** und **107** zeigen im Vergleich mit den übrigen Verbindungen andere Aktivitäts-Zeitkurven. In der kinetischen Messung der Thiophenverbindung **106a** sind die Kurven stark aufgefächert und zeigen einen konzentrationsabhängigen Verlauf (Abb. 6.2).

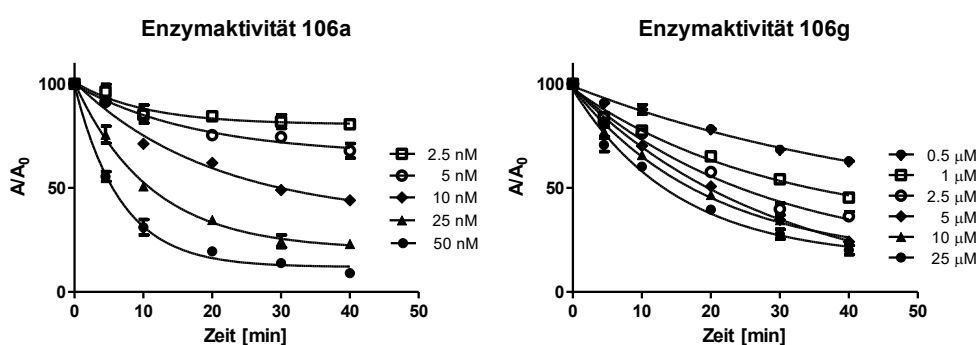


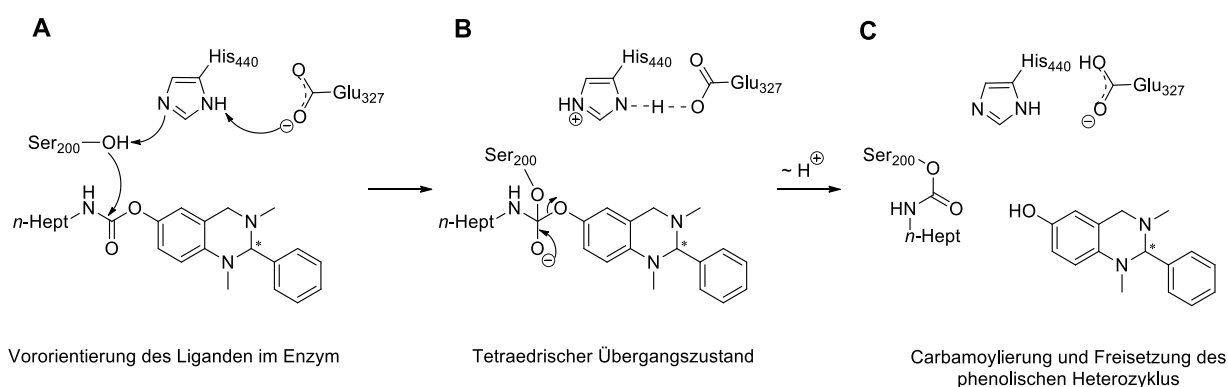
Abbildung 6.2 Aktivitäts-Zeitkurven in der kinetischen Messung von **106a** und **106g** an *eq*BChE. Für **106a** zeigen die Kurven einen konzentrationsabhängigen Verlauf, der für **106g** nicht beobachtet wird. Graphen erstellt mit GraphPad Prism 5.

Ein solcher Verlauf wurde für die drei eingangs genannten Verbindungen nicht beobachtet und ist anhand Verbindung **106g** exemplarisch dargestellt. Für **106g** fällt die Enzymaktivität bei der höchsten gemessenen Konzentration nicht so stark ab, wie dies für **106a** der Fall ist. Generell liegen die Kurven enger zusammen, obwohl für **106g** ein 2.5-fach größerer Konzentrationsbereich abgedeckt wurde.

Aus den genannten Gründen zeigen die Verbindungen **106b**, **106g** und **107** Auffälligkeiten in der kinetischen Messung, weshalb sie im *in silico* Modell nicht gleichberechtigt mit den übrigen Verbindungen **106a**, **106c-f** und **106h-i** besprochen werden.

6.2 Vorgehensweise im Docking

Durch klassische Dockingmethoden können für pseudo-irreversible Inhibitoren drei verschiedene Interaktionszustände mit dem Protein beschrieben werden (Schema 6.2). Die erste Möglichkeit besteht darin, ein kovalentes Docking durchzuführen. Dadurch wird der Zustand des carbamoylierten Serins abgebildet. Dieses Vorgehen bietet sich allerdings nur an, wenn die Variation der Liganden im zu übertragenden Carbamatrest liegt (C, Schema 6.2).



Schema 6.2 Mögliche Interaktionen zwischen einem Carbamat-basierten Liganden und dem BChE-Enzym (*hBChE* Nummerierung). Abbildung modifiziert nach Luo *et al.*²⁸²

Ein weiterer kovalenter Dockingansatz besteht darin, den tetraedrischen Übergangszustand, welcher während der Carbamoylierung entsteht, zu simulieren (B, Schema 6.2). Dieses Vorgehen wurde von Carolan *et al.* bereits auf Carbamatstrukturen angewendet und auch für den hier vorliegenden Datensatz genutzt.⁸⁵ Für das Docking wurde die Röntgenstruktur 1P0I, alle in Tabelle 6.1 gezeigten chiralen Liganden sowie Ligand **105** im Programm

GOLD v.5.2.2 verwendet.⁴² Die Struktur 1POI wurde aufgrund ihrer guten Auflösung von 2.0 Å ausgewählt. Außerdem ist das Serin der katalytischen Triade kovalent an eine Butansäure gebunden, sodass sich diese Struktur zum Docking von kovalenten Inhibitoren eignet. Das kovalente Docking lieferte drei energetisch entartete Orientierungen der Liganden in der Bindetasche. Ein bevorzugter Bindemodus konnte aber aufgrund fehlender gerichteter Wechselwirkungen nicht identifiziert werden.

Als dritte Option kann ein reversibles Docking des Liganden in der Enzymbindetasche vorgenommen werden. Damit wird die Vororientierung des Liganden in der Bindetasche (Anlagerungskomplex) *in silico* abgebildet und der Score kann mit dem K_C -Wert korreliert werden (A, Schema 6.2). Ein solches reversible Docking wurde auch für die hier zu untersuchenden Liganden durchgeführt. Die Methodenentwicklung sowie die Resultate werden im Folgenden besprochen.

6.2.1 Redocking- und Dockingstudien für Carbamat-basierte Inhibitoren

Die Durchführung eines Redockings gestaltete sich aufgrund fehlender Röntgenstrukturen der BChE mit reversiblen Liganden schwierig. Von den 37 in der PDB hinterlegten *hBChE* Röntgenstrukturen eignen sich 25 mit einer Auflösung <2.5 Å für Dockingstudien (Zugriff: Januar 2015). Davon enthalten zwei Röntgenstrukturen entweder Tacrin oder Cholin als reversiblen Liganden. In den übrigen Röntgenstrukturen ist das Serin der katalytischen Triade phosphoryliert. Andere Forschungsgruppen haben entweder gar kein Redocking^{84, 85, 283, 284} oder ein Redocking mit einem ähnlichen Liganden in der AChE-Bindetasche durchgeführt.²⁸⁵

Für die Validierung einer Scoringfunktion wurde deshalb lediglich ein Redocking in der Röntgenstruktur mit PDB-ID: 4BDS¹⁷³ mit Tacrin als reversiblen Liganden (Auflösung: 2.10 Å) durchgeführt. Tacrin wurde am Acridin-Stickstoffatom protoniert. Dieser Protonierungszustand wurde für pH = 8 mit MoKa berechnet.¹⁴⁷ Die Aufbereitung des Proteins sowie der Liganden erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 angegeben. Die Operationenzahl wurde auf 1 Million gesetzt und der Suchraum auf die bindetaschenformenden Aminosäuren von *hBChE* begrenzt: Asn68, Asp70, Ser79, Trp82, Asn83, Gly115, Gly116, Gly117, Gln119, Thr120, Gly121, Thr122, Leu125, Tyr128, Glu197, Ser198, Ala199, Trp231, Leu286, Val288, Glu325, Ala328, Phe329, Tyr332, Trp430, His438, Gly439, Tyr440 und Ile442.

Die Funktion GoldScore^{112, 113} war in der Lage die Pose mit geringstem RMSD-Wert (0.45 Å) zur Originalpose auf einem niedrigen Rang (Rang 14) zu finden, wobei die Clustergröße 21 betrug (Cut-off: 1.5 Å). Die Top-Pose lag in einem Cluster mit 27 Posen und wies einen RMSD von 0.76 Å zur Originalpose auf. Für die übrigen Scoringfunktionen war der geringste

RMSD zur Originalpose größer als 0.45 Å und die betreffende Pose wurde auf ungünstigen Rängen >40 platziert. Eine geringere Operationenzahl (500'000) führte dazu, dass auch GoldScore die Pose mit dem geringsten RMSD-Wert erst auf dem 31. Rang einordnete.

Die Scoringfunktion GoldScore konnte auch für bereits beschriebene Studien erfolgreich eingesetzt werden (siehe Kapitel 3), was deren Verwendung ebenfalls rechtfertigt (Für die Redockingdaten siehe Kapitel 10.5 im Anhang).^{141, 142}

Das Docking wurde mit den im Redocking definierten Einstellungen (Operationenzahl = 1 Million, GoldScore als Scoringfunktion) zunächst für beide Enantiomere des Liganden **105** in der hBChE-Bindetasche der Röntgenstruktur 1POI durchgeführt.

Die Scores der Top-5-Lösungen von **105** liegen sehr nah beieinander und weichen nur um 1 –3.5% voneinander ab (Tabelle 6.2). Ein Rescoring mit DSX¹⁹⁴ unter Verwendung der CSD-Potentiale²⁸⁶ zeigte eine bessere Diskriminierung zwischen den verschiedenen Dockinglösungen (Unterschied der Top-5 GoldScore Lösungen: 25 – 39%). Der GoldScore ist die negative Summe der Energieterme für die Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Je größer positiv der Score, desto niedriger daher die Energie des Komplexes. Die DSX-Scores sind die negative Summe der statistischen Potentiale, die die Protein-Ligand-Interaktion beschreiben. Hierfür gilt: Je größer der Betrag des Scores, desto niedriger die Energie der Dockinglösung.

Tabelle 6.2 Scores der Top-5 Dockinglösungen für **105** als *S*- und *R*-Enantiomer mit den dazugehörigen DSX-Scores sowie dem dazugehörigen Rang. Die ausgewählte repräsentative Bindepose ist fettgedruckt dargestellt.

Rang (GOLD/Gold-Score)	Score (GOLD/Gold-Score)	Rescoring (DSX)	Rescoring Rang (DSX)
105 R-Enantiomer			
1	65.51	-67.96	5
2	65.11	-111.50	1
3	64.97	-79.91	2
4	64.91	-75.68	4
5	64.89	-78.40	3
105 S-Enantiomer			
1	61.60	-97.70	2
2	61.44	-79.69	4
3	59.95	-104.22	1
4	59.474	-83.83	3
5	59.469	-78.05	5

Die CSD-Potentiale wurden aus der „Cambridge Structural Database“ (CSD) abgeleitet.²⁸⁶ Diese Datenbank enthält hoch aufgelöste Röntgenstrukturen von kleinen organischen und

metallorganischen Verbindungen. Die daraus erhaltenen distanzabhängigen Paarpotentiale sind im Vergleich zu den Potentialen, welche auf Grundlage von Protein-Ligand-Komplexen berechnet werden (PDB-Potentiale), präziser. Des Weiteren kommen Heteroatome wie etwa Halogenatome in der CSD häufiger vor. Mit der Verwendung der CSD-Potentiale sollte auch die korrekte Bewertung der Fluoratome der CF_3 -Verbindung **106g** sichergestellt werden.

Die Dockingposen wurden zusätzlich visuell dahingehend bewertet, ob die Ligandenorientierung in der BChE-Bindetasche dahingehend plausibel erscheint, dass eine Übertragung des Carbamates auf das Serin der katalytischen Triade möglich ist. Damit die Carbamoylierung stattfindet, greift das Serin-OH den Carbamat-Kohlenstoff nucleophil an, weshalb in der Dockinglösung eine räumliche Nähe dieser Reaktionszentren gegeben sein sollte. Des Weiteren sollte die Carbonylgruppe zur sog. Oxyanion-Vertiefung hin orientiert sein (Gly116, Gly117, Ala199; *h*BChE Nummerierung für Aminosäuren in diesem Kapitel). Die negative Ladung des Übergangszustandes, welche am intermediär entstehenden negativ geladenen Sauerstoffatom der vormaligen Carbonylgruppe lokalisiert ist, wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Oxyanion-Vertiefung stabilisiert.²⁸⁷ Eine Dockingpose mit einer räumlichen Nähe zwischen Carbamatgruppe und Serin-OH sowie der Carbonylgruppe in der Oxyanion-Vertiefung wird daher als repräsentative Bindepose bezeichnet.

Für das *R*-Enantiomer von **105** wurde die für eine Carbamat-Übertragung angenommene Orientierung auf dem zweiten Rang identifiziert (Tabelle 6.2, Abb. 6.3).

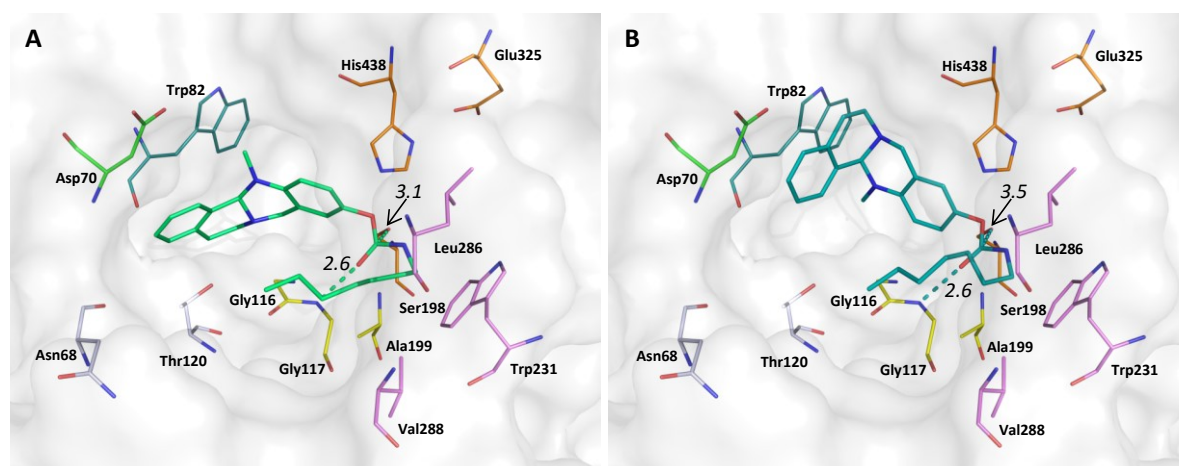


Abbildung 6.3 Ausgewählte repräsentative Dockinglösung für das *R*-Enantiomer des Liganden **105** (grün, A) und für das *S*-Enantiomer von **105** (dunkelblau, B). Die Distanzen sind in kursiven Zahlen in der Einheit Å angegeben. Farbcode in diesem Kapitel: Protein (grau), Acyl-Bindestelle (pink), CAS (orange), Oxyanion-Vertiefung (gelb), Cholinbindestelle (türkis), PAS (grün) und ausgewählte Aminosäuren der Seitentasche (grau).

Im Rescoring wurde diese Pose als beste unter den Top-5 GoldScore Lösungen identifiziert. Die Carbonylgruppe der Top-GoldScore-Pose zeigte nicht zur Oxyanion-Vertiefung und wurde daher nicht als repräsentative Bindepose ausgewählt. Die ähnlichste Dockinglösung des *S*-Enantiomers zur repräsentativen Pose des *R*-Enantiomers konnte auf dem Top-Rang identifiziert werden. Diese Pose wird im Rescoring von DSX auf dem zweiten Rang platziert. Die Pose mit dem besten DSX-Score von -104.22 stellt keine repräsentative Bindepose dar, weil dabei statt des Carbamates die CH_3 -Gruppe der Heptylkette in der Nähe des Serins platziert wird.

Die ausgewählten Bindeposen für Ligand **105** zeigen eine Distanz von 2.6 \AA zwischen dem Carbonylsauerstoff und Gly117-NH (Abb. 6.3). Dieser Abstand liegt im literaturbekannten Bereich für eine Wasserstoffbrückenbindung.⁵⁴ Für die hier vorliegenden Dockinglösungen kann eine Stabilisierung des Liganden in der Bindetasche resultierend aus der Wasserstoffbrücke angenommen werden. Bei den ausgewählten Dockinglösungen wird die Heptylkette in der Acyltasche platziert und der an das Ligandengerüst ankondensierte Arylring liegt zwischen dem Rückgrat von Trp82 sowie Asp70 und Thr120.

6.2.2 Modelling-Ansatz für Carbamat-basierte Inhibitoren in hBChE

Im Docking der Liganden **106a-i** ergaben sich bedingt durch die relativ große BChE-Bindetasche verglichen mit dem Raumangebot in AChE und der größeren Flexibilität der Liganden im Vergleich zu Ligand **105** energetisch entartete Lösungen. Dies bedeutet, dass aufgrund des Scores keine Diskriminierung der Posen hinsichtlich eines bevorzugten Bindemodus (Carbamatgruppe in Nähe zu Ser198, Carbonylfunktion zur Oxyanion-Vertiefung orientiert) möglich war. Posen einer angenommenen günstigen Orientierung der Carbonylgruppe traten unter den Dockinglösungen entweder gar nicht auf oder wurden von der Scoringfunktion schlecht bewertet.

Aufgrund der ähnlichen Übertragungsraten zwischen $0.13 - 0.24 \text{ min}^{-1}$ besteht die Hypothese, dass die Verbindungen **106a-i** mit einer vergleichbaren Orientierung des Carbamates in der Bindetasche lokalisiert sind. Um für alle Verbindungen einen konsistenten Bindemodus zu erhalten, wurde deshalb ein Modelling-Ansatz gewählt. Die repräsentativen Bindeposen von Ligand **105** wurden nach einer lokalen Minimierung mit MiniMuDs²⁸⁸ mit der Scoringfunktion DSX und CSD-Potentialen dazu verwendet, die übrigen Liganden in der Bindetasche aufzubauen. Ligand **105** eignet sich als Ausgangspunkt für den Modelling-Ansatz, da für diese Verbindung ein zu **106a-i** vergleichbare Übertragungsrate von 0.15 min^{-1} bestimmt wurde.⁹⁰

Die Minimierung von Dockinglösungen in der Enzymbindetasche mit MiniMuDs verläuft solange, bis sich bei 10 aufeinanderfolgenden Iterationen keine Verbesserung des Scores ergibt.²⁸⁸ Zusätzlich dazu wird die Optimierung auch terminiert, wenn in fünf aufeinanderfolgenden Schritten das neu gefundene Optimum nur um 0.1 Å (RMSD) in Bezug auf das bisherige Optimum abweicht. Generell ist diese Optimierung abhängig von der Komplexität des Problems, in diesem Fall also vom Liganden und der Proteinumgebung.

Diese lokale Minimierung führt, angewendet auf das *S*-Enantiomer **105** dazu, dass die Wasserstoffbrückendistanz nach der Minimierung 2.7 Å und die Distanz zwischen Carbamat-Kohlenstoffes und Serin-OH 3.8 Å beträgt (RMSD zur Dockinglösung: 0.46 Å, Abb. 6.4, B). Die Pose des *R*-Enantiomers zeigt nach der lokalen Minimierung einen größeren RMSD von 0.79 Å zur Dockingpose (Abb. 6.4, A). Dieser RMSD kommt vor allem durch die Varianz in der Heptylkette zustande, da die Wasserstoffbrückendistanz nur leicht auf 2.8 Å vergrößert und die Distanz zwischen dem Serin-OH zum Carbamat-Kohlenstoff mit 3.0 Å fast gleichbleibt. Der RMSD des *S*-Enantiomers ohne Heptylkette, einschließlich des Carbamat-Stickstoffatoms, beträgt 0.33 Å und für das *R*-Enantiomer berechnet sich analog ein RMSD von 0.53 Å.

Nach der lokalen Minimierung verbessert sich der DSX-Score für das *R*-Enantiomer von -111.50 um gut 20 Einheiten auf -133.19 und der Score für das *S*-Enantiomer wird von -97.70 auf -116.05 verbessert. Der schlechtere Score des *S*-Enantiomers ist hauptsächlich auf ungünstig bewertete Distanzen zwischen Kohlenstoffatomen der Heptylkette und Leu286 zurückzuführen (5 Distanzen zwischen 3.3 – 3.4 Å, eine Distanz 2.9 Å).

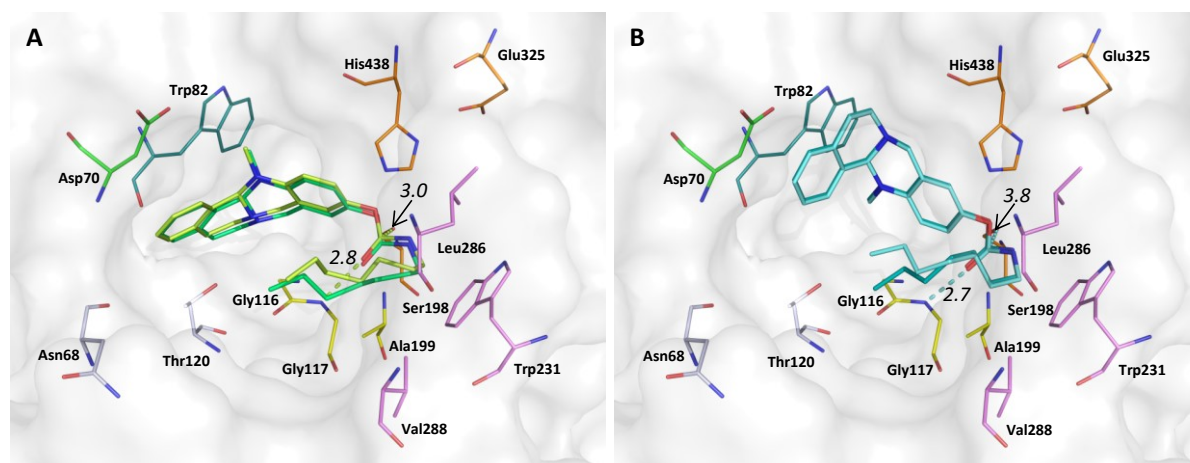


Abbildung 6.4 A) Lokal minimierte repräsentative Dockinglösung für das *R*-Enantiomer des Liganden **105** (hellgrün) im Vergleich zur Dockinglösung (dunkelgrün). B) Lokal minimierte repräsentative Dockinglösung des *S*-Enantiomers von **105** (hellblau) im Vergleich zur Dockinglösung (dunkelblau). Die Distanzen sind in kursiven Zahlen in der Einheit Å angegeben.

Aufgrund der Platzierung der Heptylkette zwischen dem Bindetascheneingang und der katalytischen Triade im Bereich der Acyltasche, die ein genügend großes Raumangebot bietet, wird das Auftreten ungünstig bewerteter Distanzen der Bindepose nicht kritisch gesehen. Im biologischen System, nämlich dem in Lösung befindlichen Protein-Ligand-Komplex, wird die Relaxation dieser Distanzen durch Rotationsbewegungen der Heptylkette erwartet.

Ausgehend von diesen lokal minimierten Dockinglösungen wurden die entsprechenden in Tabelle 6.1 gezeigten Inhibitorstrukturen aufgebaut. Dazu wurde die Methylenbrücke des Tetrazyklus' von Verbindung **105** mit dem Programm MOE 2014.09²⁸⁹ entfernt und die entsprechenden Substituenten dem Arylring hinzugefügt bzw. der Arylring durch einen Thiophenylring ersetzt. Die so erhaltenen Bindeposen wurden in der Bindetasche lokal mit MiniMuDs minimiert und mit DSX unter Verwendung der CSD-Potentiale bewertet. Berechnungen des pK_a -Wertes aller Verbindungen mit MoKa ergaben,¹⁴⁷ dass die Verbindungen bei pH 8 neutral vorliegen. Für das *N*-methylierte Stickstoffatom in benzylicher Position wird ein pK_a -Wert zwischen 4.20 und 5.57 berechnet.

6.2.3 Evaluation der Arylring- und Methylgruppenposition

Das Vorliegen der Inhibitorstrukturen als Racemate macht es erforderlich, dass beide Enantiomere gedockt werden. Für den Erhalt einer enantiomerenreinen Struktur wurde die durchkonjugierte Verbindung **107** synthetisiert. Diese Verbindung gehört jedoch auch zu den eingangs als auffällig beschriebenen Verbindungen (vergl. Kapitel 6.1).

Die Testung der reinen Enantiomere von **106a** war nicht möglich, da die getrennten Enantiomere beim Entfernen des Lösungsmittels wieder racemisierten (Trennung durchgeführt von J. Wendrich und Prof. G. Bringmann an der Universität Würzburg). Zur Erstellung des *in silico* Modells wurde daher angenommen, dass beide Enantiomere, wie dies für Ligand **105** im Docking gesehen wurde, in einer ähnlichen Weise an die BChE binden.

Während des Modellings der Enantiomere ausgehend von Ligand **105** fielen zwei strukturelle Unsicherheiten der Verbindungen auf. Diese Unsicherheiten betreffen 1) die Stellung des Arylringes bezüglich der Bizyklenebene sowie 2) die Orientierung der Methylgruppe am benzylichen Stickstoffatom.

Aufgrund der Mutation der Dockingpose von **105** zu den entsprechenden Verbindungen **106a** – **106i** wurde festgestellt, dass der Arylring bei diesem Vorgehen quasi in der Ebene mit dem Tetrahydrochinazolinbicyclus liegt (Abb. 6.5, links). Die Bindung zwischen dem

Tetrahydrochinazolin und dem Arylring zeigt einen Diederwinkel von ca. 0° . Diese Orientierung ist strukturell nicht allgemeingültig, denn die quasi orthogonale Stellung zwischen Arylring und Bicyklus ist energetisch aufgrund geringerer intramolekularer Spannungen bevorzugt (Abb. 6.5, rechts; vergl. auch stochastische Konformationsuche weiter unten im Text).

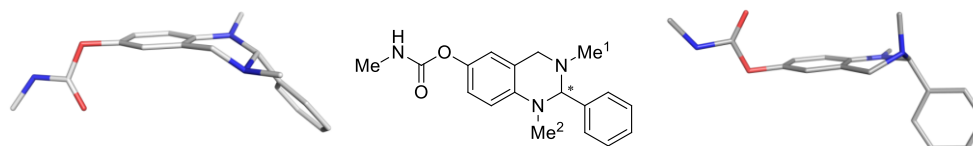


Abbildung 6.5 Der Arylring befindet sich quasi in der Bicyklenebene (hellgrau, links), oder ist bezüglich der Bicyklenebene um 90° gedreht (grau, rechts). Am Beispiel von Ligand **106b** als *R*-Enantiomer dargestellt.

Eine solche Konformation mit einem Diederwinkel von ca. 90° wird auch bei *ortho*-bzw. *di-ortho*-substituierten Biarylen beobachtet.²⁹⁰ Um die tatsächliche Orientierung des Arylringes zu testen, wurde die 2,6-Dichlorverbindung dargestellt. Aufgrund der *di-ortho*-Substitution muss sich der Arylring orthogonal zum Bicyklus orientieren, weil die Ausrichtung in der gleichen Ebene aufgrund der sterischen Abstoßung von Chlorsubstituent und Methylgruppe nicht möglich ist. Verbindung **106i** zeigt im Vergleich zu den übrigen Verbindungen den mit Abstand schlechtesten K_C -Wert von $4.1 \cdot 10^3$ nM. Der Abfall in der inhibitorischen Aktivität kann somit vermutlich auf den Diederwinkel von ca. 90° zurückgeführt werden. Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die Bindung von **106i** aufgrund der durch die Chlorsubstituenten geänderten elektronischen Umgebung dahingehend gestört sein kann, dass es auch zu Abstoßungen mit der Proteinumgebung in der Arylbindetasche kommt.

Eine weitere Unsicherheit stellt die Orientierung der Methylgruppe am Stickstoffatom in benzylicher Position dar. Auch wenn der Alkylring an einen Aromaten kondensiert ist, kann dieser dennoch eine zur Sesselkonformation ähnliche Konformation einnehmen. Demzufolge kann sich die Methylgruppe am benzylichen Stickstoffatom in quasi-„axialer“ oder quasi-„äquatorialer“ Position befinden (Abb. 6.6).

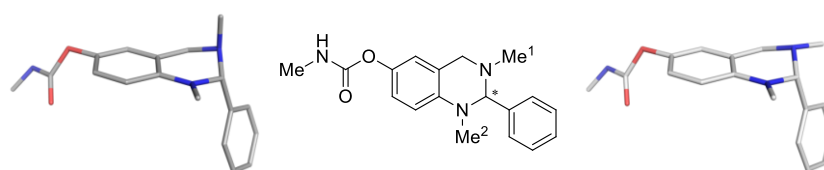


Abbildung 6.6 Mögliche Orientierung der Methylgruppe Me^1 am benzylichen Stickstoffatom von Ligand **106b** als *S*-Enantiomer quasi axial (grau, links) oder quasi äquatorial als *S*-Enantiomer (hellgrau, rechts).

Um die für die Bindung in der BChE-Bindetasche bevorzugte Orientierung der Methylgruppe aufzuklären, wurde die Spannungsenergie ΔE als Differenz der Kraftfeldenergie der Bindepose sowie einer Minimumskonformation des ungebundenen Liganden berechnet und dadurch die Methylgruppenorientierung abgeschätzt.

Zunächst wurde eine stochastische Konformationsuche durchgeführt, um ein globales Energieminimum der jeweiligen Verbindung zu erhalten. Die zu berechnende Verbindung wurde in MOE aufgebaut und lokal mit einem RMS-Gradienten von 0.001 kcal/mol-Å energieminiert. Zur Einschränkung des Suchraumes wurde die Heptylkette durch eine Methylgruppe ersetzt. Die Konformationsuche wurde in MOE mit dem Kraftfeld MMFF94s und einer Dielektrizitätskonstante von 4 durchgeführt.^{197, 291} Weitere von den Voreinstellungen abweichenden Parameter sind: 10'000 Iterationen und 10'000 Ablehnungen, MM Iterationen Limit von 1'000, Optimierung der Konformere zu einem RMS-Gradienten von 0.01 kcal/mol-Å, Energiefenster von 100 kJ/mol. Aufgrund der durchgeführten stochastischen Suche stellt das Konformer mit der niedrigsten Energie ein lokales Minimum dar. Eine Übersicht über die gesamten Einstellungen befindet sich im Anhang (Kapitel 10.2.4). Damit das lokale Energieminimum mit der Energie der Bindepose verglichen werden kann, muss eine Energieminimierung der Bindepose mit dem gleichen Kraftfeld durchgeführt werden. Dazu wurde ohne Berücksichtigung der Proteinumgebung eine Minimierung über 10 Schritte mit dem verkürzten Newton-Verfahren (engl. Truncated Newton) in MOE mit dem gleichen Kraftfeld (MMFF94s) und einer Dielektrizitätskonstante von 4 durchgeführt. Der RMSD-Wert der ursprünglichen Bindepose zur minimierten Pose lag zwischen 0.3 und 0.8 Å. Die Schrittweite von 10 wurde gewählt, weil sich die Energie für die Mehrheit der Verbindungen bis zum 7. oder 8. Minimierungsschritt >1 kcal/mol änderte. Danach betrug die Energieänderung <1 kcal/mol. Mit 10 Schritten sollte daher sichergestellt werden, dass ein lokales Minimum erreicht wird.

Die Spannungsenergie ΔE der Bindepose lässt sich aus der Differenz der Konformationsenergie der minimierten Bindepose und der stochastisch bestimmten lokalen Minimumsenergie berechnen. Für die Referenzverbindung **105** wurde für das *R*-Enantiomer eine Spannungsenergie von 3.67 kcal/mol und 0.38 kcal/mol für das *S*-Enantiomer berechnet. Die niedrigere Energie des *S*-Enantiomers resultiert daraus, dass sich die beiden lokalen Minimumsposen nur aufgrund der Orientierung des Carbamates, welches quasi an der Ebene des Aromaten gespiegelt wurde, unterscheiden. In der Pose, welche die Minimumsenergie repräsentiert, ist das Carbamat bezüglich der Ebene des Aromaten entgegengesetzt zum Bizyklus orientiert. Eine solche Orientierung ist für die Dockinglösung nicht möglich, denn in dieser liegt das Carbamat bezogen auf die Bizyklenebene auf der gleichen

Seite wie der Arylring. Das *R*-Enantiomer zeigt eine höhere Energie, da zusätzlich zur abweichenden Carbamatposition bezogen auf die Aromatenebene der benzyliche Stickstoff der stochastisch bestimmten lokalen Minimumspose in Bezug auf die Dockingpose invertiert vorliegt. Diese Berechnung sowie die NMR-Spektren, die keine doppelten Signale zeigten, deuten darauf hin, dass der benzyliche Stickstoff eine Inversion eingehen kann und somit die Lage des freien Elektronenpaares und der Methylgruppe in Lösung nicht konserviert ist und dieses Stickstoffatom daher kein zusätzliches Chiralitätszentrum darstellt.

Die Spannungsenergien ΔE sind zusammen mit dem zur Dockinglösung gehörenden Score in Tabelle 6.3 aufgelistet. Die Pose, die dem lokalen Minimum entspricht, weist bei beiden Enantiomeren eine „axiale“ Methylgruppe, sowie eine orthogonale Position des Arylrings bezüglich der Bicyklenebene auf, wobei die Carbamatgruppe entgegengesetzt zum Arylring ausgerichtet ist (Abb. 6.7).

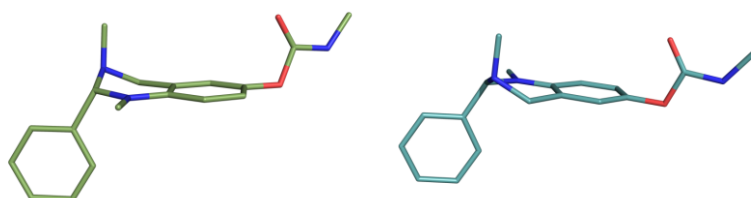
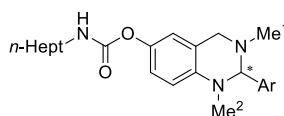


Abbildung 6.7 Repräsentation der Pose entsprechend der Minimumsenergie in der stochastischen Konformationsanalyse. Beispielhaft darstellt anhand Ligand **106d** als *R*-Enantiomer (grün, links) und als *S*-Enantiomer (blau, rechts).

Tabelle 6.3 Gegenüberstellung von DSX-Score und dem berechneten Energieunterschied für die Enantiomere in Abhängigkeit der Positionierung der Methylgruppe am benzylichen Stickstoffatom sowie dem gemittelten Score bzw. Energieunterschied in der letzten Zeile. Tabelle modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.



Verbindung	<i>R</i> -Enantiomer Me ¹ „axial“		<i>R</i> -Enantiomer Me ¹ „äquatorial“		<i>S</i> -Enantiomer Me ¹ „axial“		<i>S</i> -Enantiomer Me ¹ „äquatorial“	
	DSX	ΔE [kcal/mol]	DSX	ΔE [kcal/mol]	DSX	ΔE [kcal/mol]	DSX	ΔE [kcal/mol]
78a	-99	7.80	-110	4.34	-108	3.30	-105	4.90
78c	-119	5.73	-125	6.56	-121	2.91	-114	11.95
78d	-110	6.25	-125	4.38	-120	2.37	-113	11.97
78e	-108	5.92	-118	7.60	-101	1.78	-115	12.37
78f	-110	5.72	-127	8.16	-100	3.60	-122	12.84
78h	-117	6.62	-121	10.70	-127	1.42	-124	12.92
\emptyset	-111	6.34	-121	6.96	-113	2.56	-116	11.58

Die Carbamatgruppe aller Bindeposen zeigt auf die gleiche Seite wie der Arylring. Die unterschiedliche Carbamatorientierung zwischen Minimum und Bindepose spiegelt sich in den Energien der *S*-Enantiomere mit „axialer“ Methylgruppe wieder.

Im Vergleich dazu sind die gemittelten Energiewerte mit „äquatorialer“ Methylgruppe um ca. 9 kcal/mol höher. Hierbei weicht neben der Orientierung des Arylrings und der Carbamatgruppe auch die Methylgruppenorientierung von den stochastisch ermittelten Minimumsposen ab.

Bei den Spannungsenergien der *S*-Enantiomere mit „äquatorialer“ Methylgruppe zeigt die Thiophenylverbindung **106a** mit 4.90 kcal/mol eine auffällig geringe Energie. Dies ist dadurch bedingt, dass der Thiophenylring nach der 10-Schritt-Minimierung fast orthogonal zum Bizyklus orientiert ist.

Die relativ hohe Energie von 10.70 kcal/mol von Verbindung **106h** (*R*-Enantiomer mit Me¹ „äquatorial“) stellt ein Artefakt dar. Bei der 10-Schritt-Minimierung konnte kein lokales Minimum gefunden werden, da sich die Energie noch im letzten Schritt um 3.2 kcal/mol ändert.

Zur Aufklärung der bevorzugten Stellung der Methylgruppe in der Bindepose wurden die Mittelwerte der Spannungsenergien der Enantiomere mit quasi-„axialer“ und quasi-„äquatorialer“ Methylgruppe verglichen. Die im Mittel um 10 Einheiten höheren DSX-Scores der *R*-Enantiomere lassen auf eine günstigere äquatoriale Orientierung der Methylgruppe schließen. Der Score mit der Methylgruppe in axialer Position ist für die *R*-Enantiomere schlechter, da es in dieser Konfiguration zu ungünstigen Distanzen von 2.1 Å – 2.4 Å zwischen der Methylgruppe und Gly116-Cα kommt. Die gemittelten Energiewerte zeigen hingegen kaum einen Unterschied in Abhängigkeit der Positionierung der Methylgruppe (6.34 und 6.96 kcal/mol). Für die *R*-Enantiomere wurden daher die Posen mit äquatorialer Methylgruppe als repräsentative Bindeposen ausgewählt.

Bei den *S*-Enantiomeren zeigt der Score keine Abhängigkeit von der Positionierung der Methylgruppe und ist für beide Enantiomere ungefähr gleich groß. Die Methylgruppe zeigt bei axialer Stellung in eine Vertiefung der Proteintasche zwischen Trp82 und His438 und hat auch in der äquatorialen Position genug Platz, weshalb sich nur für einzelne Verbindungen Unterschiede im Score zeigen (Δ Score >10: **106e**, **106f**). Aufgrund der günstigeren Energie wurden für die *S*-Enantiomere die Verbindungen mit axialer Methylgruppe als repräsentative Bindeposen ausgewählt.

Anhand der berechneten Energiewerte kann auch der Beitrag der Enantiomere zur Affinität diskutiert werden. Im Durchschnitt ist die Spannungsenergie der *R*-Enantiomere (Methylgruppe ist quasi-äquatorial) um ca. 4 kcal/mol höher als für die *S*-Enantiomere

(quasi-axiale Methylgruppe). Die weniger bevorzugte Konformationsenergie der *R*-Enantiomere kann nicht durch den offensichtlich höheren Betrag des DSX-Scores kompensiert werden. Der durchschnittliche Unterschied von 8 Score-Einheiten ist nicht signifikant genug, um auf eine Kompensation für verbesserte intramolekulare Wechselwirkungen zu schließen. Selbst in Dockingstudien von Ligand **105** zeigten DSX-Scores von Verbindungen, welche im gleichen Cluster liegen (RMSD <1.5 Å), eine Varianz von 10 Einheiten im Score. Aufgrund der niedrigeren Energien für die *S*-Enantiomere mit axialer Methylgruppe kann darauf geschlossen werden, dass die *S*-Enantiomere für eine Bindung an BChE bevorzugt sind. Beiträge zu den kinetischen Messdaten von den *R*-Enantiomeren können aufgrund dieser Berechnung jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies gilt vor allem für die Liganden **106c** und **106d**, für welche geringe Spannungsenergien berechnet wurden und der Score über dem Mittelwert liegt.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Energiewerte stellen keine absoluten Energiewerte der Bindeposen dar. Die Berechnungen dienen dazu, einen Anhaltspunkt für die Präferenz der Methylgruppenorientierung der Bindeposen zu finden. Energiewerte für globale Minima der Verbindungen können einerseits durch eine rechenauffwendigere kraftfeldbasierte systematische Konformationsanalyse erhalten werden, indem die Torsionswinkel systematisch simuliert werden. Absolute Energiewerte können nur über quantenmechanischen Berechnungen erhalten werden. Im Rahmen der 10-Schritt Minimierung wurde auf die Einbeziehung der Proteinumgebung während der Minimierung verzichtet, da eine solche Minimierung jede Dockinglösung auf unterschiedliche Weise beeinflussen kann.

6.3 Diskussion der Dockingposen

Der Bindemodus der Carbamat-basierten Inhibitoren ist zu Zwecken der Übersichtlichkeit exemplarisch für die Thiophenylverbindung **106a** abgebildet und charakterisiert sich wie folgt: Die *n*-Heptylkette liegt neben der Acyl-Bindestelle, welche durch Trp231, Leu286 und Val288 gebildet wird (pink, Abb. 6.8).

Die Carbamat-Gruppe liegt in der Nähe von His438 und Ser198 der katalytischen Triade. Der Carbamat-Kohlenstoff und der Serin-Sauerstoff weisen eine Distanz von 2.9 – 3.0 Å bei den *R*-Enantiomeren und 3.6 – 4.1 Å bei den *S*-Enantiomeren auf. Das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe ist zum Gly117-NH der Oxyanion-Vertiefung ausgerichtet. Für diesen Abstand wurden Distanzen zwischen 2.6 – 2.9 Å und 2.6 – 3.0 Å für die *R*- und *S*-Enantiomere gemessen. Der Tetrahydrochinazolin-Bizyklus ist oberhalb der Oxyanion-Vertiefung

platziert und liegt in π - π -Distanzen von 3.4 Å und 3.8 Å zu His438 (gemessen für **106a**). Die Arylringe (R, Tabelle 6.1) liegen in einer Vertiefung unterhalb der Cholinbindestelle Trp82, welche unter anderem von Asn68, Asp70 und Thr120 gebildet wird. Die Distanz des Thiophenylringes zum Trp82-C β -Atom beträgt für das *R*-Enantiomer 3.2 Å und für das *S*-Enantiomer 3.6 Å.

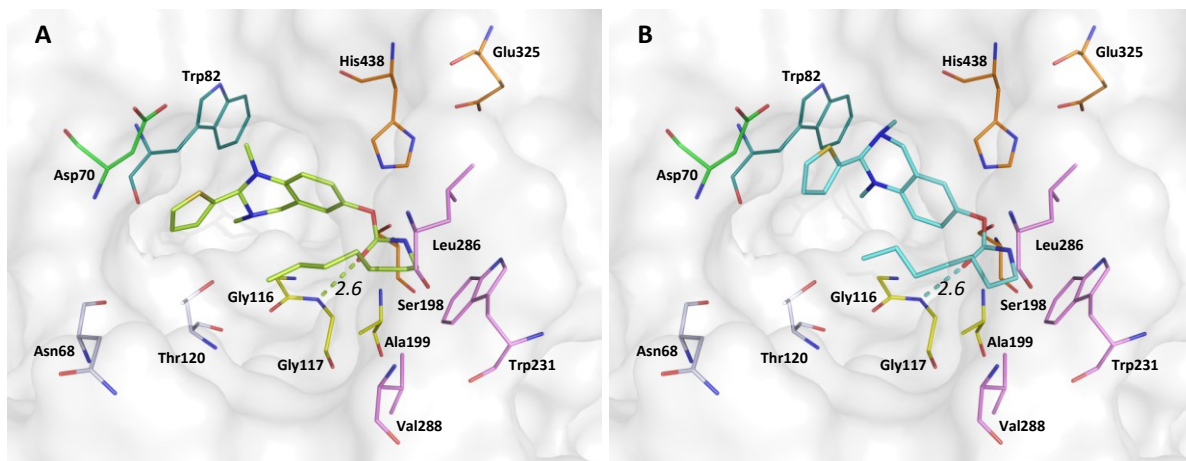


Abbildung 6.8 A) Bindemodus der Thiophenylverbindung **106a** als *R*-Enantiomer (hellgrün) und B) als *S*-Enantiomer (hellblau). Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.

Tabelle 6.4 gibt eine Übersicht über die Distanzen der Carbamatgruppe zu Gly117-NH und zu Serin-OH in der BChE-Bindetasche. Anhand der Distanzen und Abb. 6.9 wird deutlich, wie ähnlich sich die Bindepesen aufgrund des Modelling-Ansatzes sind.

In der Seitentasche unterhalb von Trp82, welche als Bindungsort des Thiophenylringes bzw. der substituierten Arylringe identifiziert wurde, konnten keine gerichteten Wechselwirkungen, z.B. in Form von Wasserstoffbrücken für methoxysubstituierte Verbindungen, beobachtet werden.

Tabelle 6.4 Gemessene Distanzen der modellierten Bindepesen vom Carbamatkohlenstoff zum Serin-OH sowie vom Carbonylsauerstoff zum Gly117N.

Ligand	Distanz <i>R</i> -Enantiomer [Å]		Distanz <i>S</i> -Enantiomer [Å]	
	Carbamat-C zu Ser-OH	C=O zu Gly117N	Carbamat-C zu Ser-OH	C=O zu Gly117N
106a	3.0	2.7	3.6	2.6
106c	2.9	2.6	3.8	2.7
106d	3.0	2.7	3.8	2.7
106e	2.9	2.8	3.9	2.7
106f	3.0	2.7	4.1	3.0
106h	3.0	2.9	3.8	2.7

Als hydrophobe Wechselwirkung kann eine CH₂- π Interaktion zwischen den Arylringen und dem Trp82-C β -Atom der Länge 3.6 – 3.8 Å für die *R*- und 3.3 – 3.6 Å (2.9 Å für **106f**) für die

S-Enantiomere gemessen werden (Alle Bindepasen der in Tabelle 6.4 dargestellten Liganden wurden für die Messung herangezogen). Literaturbekannte Distanzen für diese Interaktion liegen zwischen 3.6 und 4.2 Å.⁵⁴ Die Distanzen der S-Enantiomerbindepasen liegen etwas unterhalb dieses Distanzbereiches, wohingegen die gemessenen Distanzen für die R-Enantiomere die literaturbekannten Distanzen bestätigen.

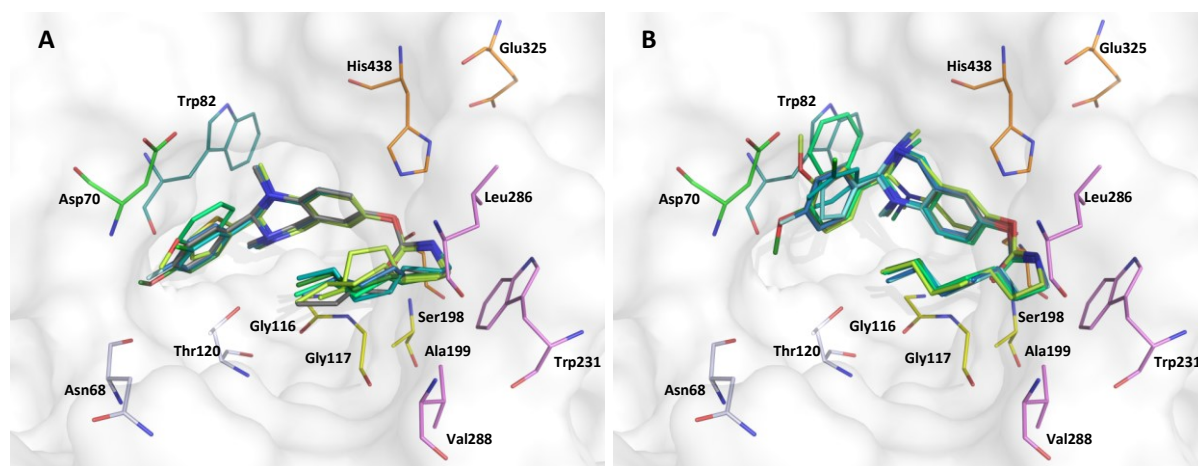


Abbildung 6.9 Überlagerung der Bindepasen der Carbamatliganden **106a-f** und **106h** in der BChE-Bindetasche von 1P0I. A) R-Enantiomere und B) S-Enantiomere.

Die im kinetischen Modell auffälligen Verbindungen **106b** und **107** sind auch im entwickelten Bindemodell kritisch zu betrachten. Wird der CF₃-Verbindung **106g** der für die Carbamate entwickelte Bindemodus aufgezwungen, so werden insbesondere für das R-Enantiomer sehr kurze Distanzen <3.0 Å zwischen den Fluoratomen und den angrenzenden Aminosäureseitenketten (Asn68, Asn83, Pro84 und Thr120) beobachtet (Abb. 6.10).

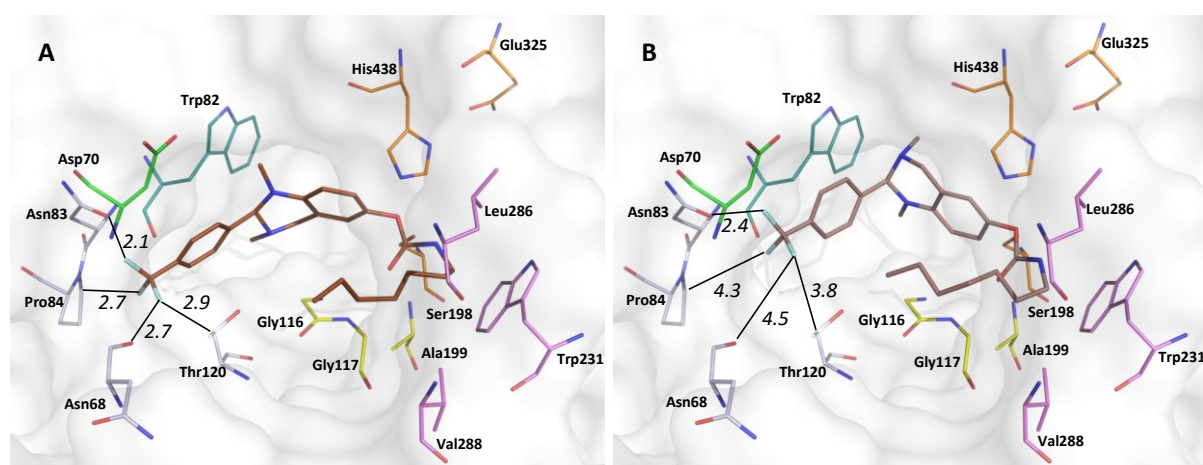


Abbildung 6.10 A) Verbindung **106g** als R-Enantiomer (dunkelbraun) und B) Verbindung **106g** als S-Enantiomer (hellbraun), wenn diese Verbindung gleichwertig wie die übrigen Verbindungen aus Tabelle 6.1, außer **106b** und **107**, behandelt wird. Abbildung modifiziert und mit Genehmigung übernommen von Sawatzky, Wehle *et al.*¹⁰³ © 2016 American Chemical Society.

Für das *S*-Enantiomer hingegen wird lediglich eine Distanz $<3.0 \text{ \AA}$ zwischen einem Fluoratom und Asn83 beobachtet. Aufgrund der Van-der-Waals Radii von 1.35 \AA für Fluor und 1.85 \AA für Kohlenstoff sollte der Abstand dieser beiden Atome mindestens 3.2 \AA betragen.²⁹²

Dieser Befund kann auch damit zusammenhängen, dass das *S*-Enantiomer in der Ausgangsstruktur der starren Verbindung **105** mit 3.8 \AA eine längere Distanz zwischen Carbamat-Kohlenstoff und Serin-OH aufweist. Dadurch liegt die Bindepose des *S*-Enantiomers, verglichen mit der Bindepose des *R*-Enantiomers weniger tief in der Bindetasche und kann somit ungünstige Distanzen zwischen Atomen des Liganden und den angrenzenden Aminosäureseitenketten vermeiden.

Die Naphthylverbindung **106b** zeigt keine Auffälligkeiten im Score (Tabelle 6.3) und kann aus sterischen Gründen einen zu dem Modell passenden Bindemodus einnehmen. Es wird daher vermutet, dass die auffällig langsame Übertragungsrate von 0.03 min^{-1} aufgrund sterischer Effekte und einer damit verbundenen verlangsamten Anlagerung und Orientierung in der Bindetasche zustande kommen kann.

Die durchkonjugierte Verbindung **107** ist zu starr, um einen zu den Carbamaten ähnlichen Bindemodus einnehmen zu können. Wird dieser Verbindung der bisher besprochene Bindemodus aufgezwungen, kommt es zu einer Kollision im Sinne einer Überlagerung der Van-der-Waals Radii zwischen einem Kohlenstoffatom des Arylringes und dem Trp82-C β -Atom.

6.4 Fazit des Carbamat-Modelling-Ansatzes

Aufgrund vergleichbarer Übertragungsraten der Carbamat-basierten Inhibitoren auf das Serin der katalytischen Triade wurde ein ähnlicher Bindemodus dieser Inhibitoren im Docking vorausgesetzt. Wegen der relativ vielen Freiheitsgrade der Inhibitorstrukturen, welche vor allem im Bereich der Heptylkette zu finden sind, und daraus resultierenden diversen entarteten Dockinglösungen, wurde auf einen Modelling-Ansatz zurückgegriffen. Dabei wurde ausgehend von einem strukturell verwandten relativ starren Carbamatliganden eine repräsentative Bindepose identifiziert, für welche ein nucleophiler Angriff der Carbamatgruppe durch das Serin in der katalytischen Triade plausibel erscheint. Diese repräsentative Pose wurde so modifiziert, dass sie den Inhibitorstrukturen entsprach (Modelling). Derart erhaltene Strukturen wurden anschließend lokal in der Bindetasche minimiert.

Strukturellen Unsicherheiten wurde durch die Synthese einer geeigneten Testverbindung (Dichloroverbindung **106i**) sowie das Berechnen der Spannungsenergie begegnet. Auffällige Verbindungen, welche im enzymkinetischen Modell identifiziert wurden, zeigten auch nach Anwendung des Docking-/Modellingmodells keine plausiblen Bindemodi. Das Aufzwängen des identifizierten Bindemodus für Carbamatinhibitoren resultierte in ungünstigen Abständen zwischen Ligand und Protein für die Verbindungen **106g** und **107**, die im Assay andere Aktivitäts-Zeitkurven aufwiesen.

Neben einer ähnlichen Übertragungsrates zeigen die Carbamatstrukturen in Abhängigkeit des substituierten Arylringes eine modifizierte Affinität zum Enzym. Von einer Korrelation zwischen Score und K_C -Wert wurde jedoch abgesehen. Durch die enzymkinetische Bestimmung kann nicht geklärt werden, ob für beide Enantiomere tatsächlich der gleiche Bindemodus angenommen werden kann, weswegen unklar bleibt, welcher Score für eine etwaige Korrelation herangezogen werden sollte. Darüberhinaus stellt die Schwankungsbreite des K_C -Wertes eine zusätzliche Unsicherheit dar.

Im Bereich der Arylringe konnte bis auf die hydrophobe Wechselwirkung der Arylringebene zum Trp82-C β -Atom keine weitere Wechselwirkung identifiziert werden. Die unterschiedlichen Affinitäten können daher eventuell auch auf rein sterische Effekte im Zuge der Anlagerung und Vororientierung im Sinne eines Induced-fit-Mechanismus des Liganden in der Bindetasche zurückzuführen sein.

Weitere Studien sind nötig, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen besser verstehen und ausführlicher diskutieren zu können. Dazu könnte die Stabilität eines jeden Enzym-Inhibitor-komplexes der hier modellierten Verbindungen mit MD-Simulationen berechnet werden, um so eine größere Datengrundlage zum Besprechen etwaiger Gründe für die Affinitätsunterschiede zu schaffen.

Für zukünftige Dockingstudien zu Verbindungen basierend auf dem DHED- oder Benz-DHED-Grundgerüst wird aufgrund der Studien zur Aufklärung der biologisch aktiven Form (Kapitel 5.2 und 5.3.1) vorgeschlagen, die Chinazoliniumform heranzuziehen.

Exemplarisch wurde Benz-DHED in der Chinazoliniumform als Heptylcarbammat nach dem für Carbamatstrukturen entwickelten Modelling-Ansatz behandelt (Verbindung **108**, Abb. 6.11). In MOE wurde dem *R*-Enantiomer von Ligand **105** die C=N-Doppelbindung sowie die Carbonylgruppe hinzugefügt. Um die Planarität der Amidgruppe und der C=N-Doppelbindung zu gewährleisten, wurden diese Teile des Liganden lokal mit dem Kraftfeld MMFF94x zu einem RMS-Gradienten von 0.01 kcal/mol·Å minimiert. Die so aufgebaute Ligandenstruktur von **108** ergab nach Minimierung mit MinMuDS einen DSX-Score von -120. Dieser Score liegt in der gleichen Größenordnung wie der Score der in diesem Kapitel behandelten Carbamatstrukturen.

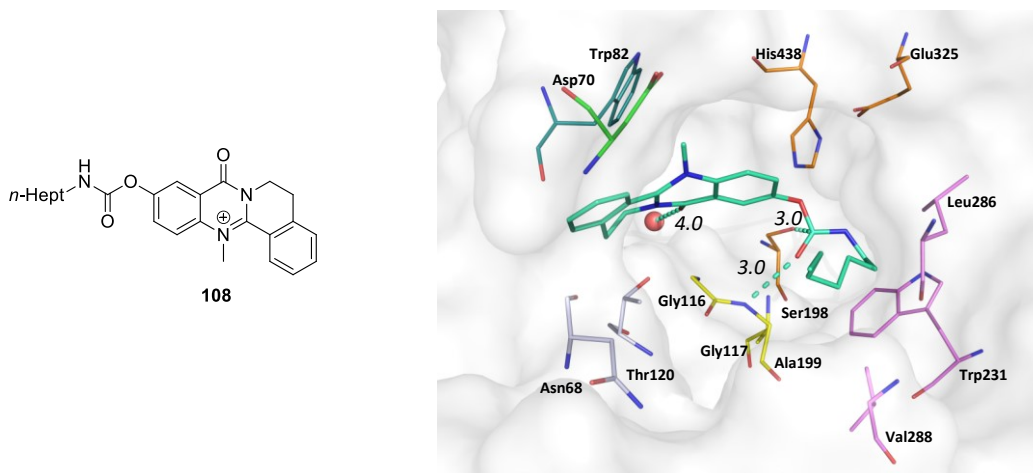


Abbildung 6.11 Benz-DHED als Heptylcarbamat **108** nach dem Modelling-Ansatz behandelt. Die Distanzen der Carbamatgruppe zum Protein sind im Einklang mit bereits beschriebenen Abständen. Distanzen sind in kursiven Ziffern in der Einheit Å angegeben.

Die Bindepose zeigt Distanzen von 3.0 Å zwischen dem Carbamatkohlenstoff und dem Serin-OH sowie von der Carbamat-Carbonylgruppe zum Gly117NH ermittelt (Abb. 6.11). Die Carbonylgruppe von **108** zeigt in eine Vertiefung nahe der katalytischen Triade. Aus der Überlagerung dieser Dockingpose mit der Original 1P0I Röntgenstruktur konnte ein Wassermolekül in dieser Vertiefung identifiziert werden. Es besteht somit die Möglichkeit der Stabilisierung der Carbonylgruppe durch wasservermittelte Wasserstoffbrücken zum Protein. Der nicht optimierte Abstand zwischen der Carbonylgruppe und dem Wassermolekül beträgt 4.0 Å.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der Modelling-Ansatz speziell für BChE-selektive Carbamatstrukturen mit Chinazolingrundgerüst entwickelt wurde. Ob auch Carbamate basierend auf dem Benz-DHED Heterozyklus diese Selektivität zeigen, kann nur durch die Synthese mit anschließender Bestimmung der IC_{50} -Werte an AChE und BChE ermittelt werden.

In Folgestudien für einen neuen Datensatz an Carbamatstrukturen kann die in Kapitel 6 beschriebene Vorgehensweise angewendet werden. Sofern durch das Docking keine plausiblen Bindemodi identifiziert werden, sollte ausgehend von einer durch Scoring/Rescoring sowie rationalen Bewertung gefundenen Dockinglösung eine Modifikation zu den entsprechenden Inhibitoren im Sinne des Modelling-Ansatzes vorgenommen werden.

7. Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Erkrankung wird derzeit durch die Gabe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChEI) symptomatisch behandelt. Durch die AChE-Hemmung steht mehr Acetylcholin (ACh) für die Neurotransmission zur Verfügung. Bei Progression der Erkrankung nimmt der Anteil an AChE drastisch ab, so dass die Enzymisoform Butyrylcholinesterase (BChE) die Hydrolyse des Neurotransmitters ACh übernimmt. In späten Phasen der Alzheimer'schen Erkrankung ist daher der Einsatz selektiver BChE-Hemmer erfolgsversprechend.

Inhibitoren können verschiedene Bindestellen in der Cholinesterase-Bindetasche adressieren und dadurch in dieser stabilisiert werden. Zu den Bindestellen zählen die katalytisch aktive Stelle (CAS) am Ende eines 20 Å langen Bindetaschentunnels, die Oxyanion-Vertiefung, die Cholinbindestelle, sowie die periphere anionische Bindestelle (PAS), welche am Bindetascheneingang lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch *in silico* Dockingstudien gezielt Protein-Ligand-Interaktionen untersucht, um Strukturmerkmale hochaffiner Inhibitoren von Cholinesterasen zu identifizieren. Damit soll die zukünftige Entwicklung von Cholinesteraseinhibitoren hinsichtlich der Affinität zum Enzym verbessert werden. Ferner dienten synthetische Untersuchungen eines Naturstoffes dazu, Chinazoliniumverbindungen als Leitstruktur für die Inhibition der Cholinesterasen zu etablieren.

Für hochaffine tri- und tetrazyklische aminsUBstituierte AChE-selektive Chinazolin- und Chinazolinoninhibitoren sollte die bevorzugte Orientierung der Liganden in der Bindetasche ermittelt werden. Hierfür ist die Lokalisation des AminsUBstituenten in der CAS (invertierter Bindemodus) oder die dortige Bindung des Chinazolin-/ChinazolinongerüSTes (klassischer Bindemodus) denkbar. Anhand eines präferierten einheitlichen Bindemodus sollten die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erklärt werden.

Dockingstudien zeigten die klare Präferenz für den invertierten Bindemodus, bei dem der AminsUBstituent in der Nähe der CAS platziert wird. Ein strukturelles Merkmal für hochaffine Inhibitoren ist ein unter Assaybedingungen protoniertes Amin, welches eine Kation- π -Wechselwirkung zu dem Indolringsystem des Tryptophans der Cholinbindestelle eingehen kann. Für das Ligandengrundgerüst wurde lediglich für tetrazyklische Verbindungen eine π - π -Interaktion mit der peripheren Bindestelle (PAS) am Bindetascheneingang identifiziert. Der Datensatz umfasste auch chirale Chinazolinon- und Chinazolinderivate mit hydrierter C=N-Doppelbindung, die eine schwächere Affinität zu AChE zeigten. Diese ist vermutlich auf

das nicht-planare Ligandengrundgerüst zurückzuführen, da vor allem für tetrazyklische chirale Verbindungen die Stabilisierung des Ligandengrundgerüsts durch π - π -Interaktionen am Bindetascheneingang aufgrund der Sterik entweder gar nicht, oder nur für ein Enantiomer möglich ist.

Aufgrund der nanomolaren Affinität der achiralen Chinazolin- und Chinazolinonverbindungen wurden weitere gerichtete Wechselwirkungen in der Bindetasche erwartet. Derartige Wechselwirkungen konnten in Form von Wasserstoffbrücken durch die Verwendung von sieben ausgewählten strukturellen Wassermolekülen im Docking identifiziert werden. Durch diese Wassermoleküle werden Wasserstoffbrücken vom Ligandengrundgerüst zum Protein vermittelt. Diese Wechselwirkungen scheinen essentiell für die Stabilisierung hochaffiner Chinazolin- und Chinazolinoninhibitoren in der AChE-Bindetasche zu sein.

Zwei photochrome Bis-Tacrin-Konstitutionsisomere (Ring-geöffnete und Ring-geschlossene Form) inhibieren die AChE und zeigen einen unterschiedlichen Effekt in der Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung. Die Fibrillenbildung wird durch eine unbesetzte periphere Bindestelle (PAS) am Eingang der AChE-Bindetasche katalysiert, weshalb eine unterschiedliche Interaktion der Liganden mit ebendieser Bindestelle vermutet wird.

Dockingstudien lieferten für beide Konstitutionsisomere einen ähnlichen Bindemodus, der vor dem Hintergrund der ähnlichen IC_{50} -Werte von 4.3 und 1.8 nM für die Ring-geöffnete und Ring-geschlossene Form plausibel erscheint. Durch die Auswahl einer geeigneten Röntgenstruktur wurden Dockinglösungen erhalten, bei denen ein Tacrinsubstituent in der PAS bindet und dort π - π -Interaktionen mit einem Tryptophan und einem Tyrosin eingeht. Eine solche Lage des PAS-bindenden Tacrinsubstituenten ist energetisch bevorzugt und drückt sich durch bessere Scores gegenüber Dockinglösungen, bei denen dieser auf der Proteinoberfläche lokalisiert ist, aus. Der andere Tacrinsubstituent bindet in der CAS wie dies von bereits kristallisierten Tacrinderivaten bekannt ist. Mittels molekulardynamischer Simulationen wurde die Stabilität der Protein-Dockinglösungs-Komplexe beider Konstitutionsisomere verglichen. Dabei wurde die bessere Stabilisierung des CAS-bindenden Tacrinsubstituenten für die Ring-geöffnete Form des Liganden ermittelt. Ferner zeigt sich für die Ring-geöffnete Inhibitorform während der Simulation der Einstrom von sechs Wassermolekülen in einen Hohlraum der PAS. Dies hat zur Folge, dass der PAS-bindende Tacrinsubstituent während der Hälfte der Simulationszeit durch Wasserstoffbrücken in der PAS stabilisiert wird. Ein Wasserstoffbrückennetzwerk dieses Ausmaßes kann für die Ring-geschlossene Inhibitorform nicht ermittelt werden. Die bessere Hemmung der Amyloid- β Fibrillenbildung der Ring-geöffneten Inhibitorform wird daher auf die bessere Stabilisierung des Liganden durch Wasserstoffbrücken in der AChE-Bindetasche zurückgeführt.

Für carbamatsubstituierte Tetrahydrochinazolinverbindungen sollten die bevorzugten Interaktionen in der BChE-Bindetasche ermittelt werden. Die Carbamatverbindungen sind pseudo-irreversible Inhibitoren und zeigen eine zeitabhängige Hemmung mit diversen Interaktionszuständen zwischen Protein und Ligand. Darüber hinaus stellen Dockingstudien in der BChE bislang eine Herausforderung dar, da es derzeit nur zwei Röntgenstrukturen dieses Enzyms mit reversiblen Liganden gibt, weshalb kaum Studien zur Identifikation einer geeigneten Bewertungsfunktion durchgeführt werden können.

Im Docking wurde sich für die Analyse des reversiblen Anlagerungskomplexes entschieden, da das Docking des tetraedrischen Übergangszustandes energetisch entartete Dockinglösungen lieferte. Eine weitere Herausforderung stellte die Größe der BChE-Bindetasche dar, die auch im reversiblen Docking entartete Dockinglösungen lieferte. Aufgrund einer ähnlichen Übertragungsrates aller getesteten Inhibitoren wurde eine konservierte Lage des Carbamates in der Bindetasche angenommen. Deshalb wurde eine repräsentative Dockinglösung einer Referenzverbindung als Ausgangspose für einen Modelling-Ansatz gewählt, die hinsichtlich der Interaktionen in der Bindetasche ausgewählt wurde. Diese Interaktionen sind: 1) Eine Wasserstoffbrückendistanz zwischen der Carbamat-Carbonylgruppe und der Oxyanion-Vertiefung sowie 2) eine Distanz, die den nucleophilen Angriff des Serins auf den Carbamatkohlenstoff erlaubt. Im Modelling-Ansatz wurde die repräsentative Bindepose dazu verwendet die entsprechenden Inhibitoren in der Bindetasche aufzubauen. Die bevorzugte Position der *N*-Methylgruppe wurde für beide Enantiomere über die berechneten Spannungsenergien der Bindeposen abgeschätzt. Für die *S*-Enantiomere ergab sich die präferierte Bindung mit quasi-„axialer“ Methylgruppe und für die *R*-Enantiomere mit quasi-„äquatorialer“ Stellung dieser. Die Carbamatstrukturen liegen somit mit der Heptylkette in der Acyltasche und die Ligandengrundgerüste werden in einer Seitentasche der BChE-Bindetasche platziert, in der hydrophobe Wechselwirkungen dominieren.

Zusätzlich zu den hochaffinen Chinazolinonverbindungen sollten artverwandte Chinazoliumverbindungen als Leitstruktur für Cholinesteraseinhibitoren untersucht werden.

Zunächst erfolgten Studien zur chemischen Reaktivität und Stabilität des Naturstoffes Dehydroevodiamin (DHED) sowie seines Benz-Derivates (Benz-DHED). Insbesondere Benz-DHED war unter den bisher verwendeten und in der Literatur beschriebenen Synthesemethoden instabil. Die Untersuchungen erforderten daher zunächst die Einführung einer geeigneten Syntheseroute, in diesem Fall die Oxidation mit KMnO_4 , einhergehend mit der Verbesserung der Ausbeute und ohne Nebenproduktbildung. Für die zukünftige Synthese von Derivaten wurde die Verwendung einer geeigneten Lewis-Säure-labilen Schutzgruppe herausgearbeitet.

Die untersuchten Chinazoliniumverbindungen zeigen die Eigenschaft, dass sie in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen in zwei Formen (Ring-geöffnet und Ring-geschlossen = Chinazoliniumsalz) isoliert werden können. Mittels UV/Vis-Untersuchungen wurde das Gleichgewicht dieser Spezies aufgeklärt und in wässrigen alkalischen Lösungen die Anreicherung einer dritten, bislang nicht in diesem Zusammenhang beschriebenen, Spezies beobachtet. Als biologisch aktive Spezies konnte die Chinazoliniumform identifiziert werden. In Dockingstudien der Chinazoliniumform von Benz-DHED, nach dem für Carbamatverbindungen entwickelten Modelling-Ansatz, konnte auch hierfür die Stabilisierung der Dockinglösung über eine Wasserstoffbrücke in der BChE-Bindetasche zu einem strukturellen Wassermolekül identifiziert werden. Dies verdeutlicht erneut, dass die Berücksichtigung von Wassermolekülen in Dockingstudien dazu dienen kann zusätzliche Protein-Ligand-Interaktionen festzustellen.

Auf Grundlage der Forschung zu Chinazoliniumverbindungen kann die zukünftige Inhibitorentwicklung von Strukturen basierend auf dieser Substanzklasse erfolgen.

Die durchgeführten synthetischen und theoretischen Studien liefern wichtige Beiträge zum Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Inhibitoren und Cholinesterasen, die in der zukünftigen Inhibitorentwicklung Anwendung finden können.

8. Summary

Alzheimer's disease is currently treated symptomatically by the administration of acetylcholinesterase inhibitors (AChEI). By AChE inhibition more acetylcholine (ACh) is available for neurotransmission. During disease progression the amount of AChE drastically decreases, so that the enzyme butyrylcholinesterase (BChE) takes over hydrolysis of this neurotransmitter. In late stages of Alzheimer's disease, the use of selective BChE inhibitors may therefore be advantageous.

Inhibitors can address different binding sites in the cholinesterase binding pocket. The binding sites include the catalytic active site (CAS), which is located at the end of a 20 Å long binding gorge, the oxyanion hole, the choline binding site and the peripheral anionic site (PAS), located at the entrance of the binding gorge.

In the present study, specific protein-ligand interactions were investigated by means of *in silico* docking studies to identify structural features of high-affinity inhibitors of cholinesterases. Thereby the aim is to improve the affinity of newly developed cholinesterase-inhibitors. Furthermore, synthetic studies of a natural product served to establish a new lead compound for cholinesterase inhibitors.

For high affinity tri- and tetracyclic amine substituted AChE-selective quinazoline and quinazolinone inhibitors, the aim was to determine the preferred ligand orientation in the binding site. To this end, the localization of the amine substituents in the CAS (inverted binding mode) or the binding of the quinazoline-/quinazolinone moiety there (classical binding mode) is conceivable. The aim was to explain structure-activity-relationships by the identified preferred and consistent binding mode.

Docking studies showed a clear preference for the inverted binding mode in which the amine substituent is placed in the vicinity of the CAS. A structural characteristic of high affinity inhibitors is a protonated amine which can form a cation- π -interaction to the tryptophan indole ring system of the choline binding site. Furthermore, a π - π -interaction with the peripheral binding site (PAS) has been identified for the ligand backbone of tetracyclic inhibitors. The data set also included chiral quinazolinone- and quinazoline derivatives with hydrogenated C=N-double bond, which showed weaker affinity to AChE compared to non chiral compounds. The weaker affinity is probably due to the non-planar ligand backbone. Due to steric reasons, especially for tetracyclic chiral compounds, stabilisation of the ligand backbone through π - π interactions is either not possible at all, or possible only for one enantiomeric form.

Due to the nanomolar affinity of non chiral quinazoline and quinazolinone compounds, other directional interactions between protein and ligand were expected. Several interactions were identified in form of hydrogen bonds through the use of conserved water molecules in docking. These water molecules mediate hydrogen bonds from the ligand backbone to the protein. These interactions seem to be essential for the stabilization of high affinity quinazoline and quinazolinone inhibitors in the AChE binding site.

Two photochromic bis-tacrine constitutional isomers (ring-open and ring-closed form) inhibit AChE and show a different effect with regard to the inhibition of amyloid- β fibril formation. Fibril formation is catalyzed by an unoccupied peripheral site (PAS) at the entrance of the AChE-binding pocket, which is why a different interaction of the ligands is expected with this binding site.

Docking studies provided a similar binding mode for both constitutional isomers, which appears plausible for the ring-open and ring-closed form in the light of similar IC_{50} -values of 4.3 and 1.8 nM. By selecting a suitable crystal structure, docking solutions were obtained in which one tacrine substituent is placed in the PAS and undergoes π - π -interactions with a tryptophan and a tyrosine. This placement of the PAS-binding tacrine-substituent is energetically favored which is expressed through better scores, compared to docking solutions where the tacrine-substituent is placed on the protein surface. The other tacrine substituent binds in the CAS in a manner which is known from other already crystalized tacrines. Molecular dynamic simulations were subsequently used for stability comparison of the protein-docking solution-complex of both isomers. Here, the better stabilization of the CAS-binding tacrine-substituent for the ring-open form was determined. The complex with the ring-open form shows the influx of six water molecules in a cavity of the PAS at the beginning of the simulation. As a consequence, the PAS-binding tacrine substituent is stabilized by hydrogen bonds to these water molecules during half of the simulation time. A hydrogen bond network of this magnitude was not observed for the ring-closed form of the inhibitor. The better inhibition of amyloid- β fibril formation by the ring-open form may be due to better stabilization of this ligand through hydrogen bonds in the AChE-binding site, which is not observed for the ring-closed form.

Preferred interactions could also be identified for carbamate-based quinazoline inhibitors in the BChE-binding site. These carbamate compounds are pseudo-irreversible inhibitors and show a time-dependent inhibition with several interaction possibilities between protein and ligand. Docking studies in the BChE are challenging, as there currently exist only

two X-ray structures of this enzyme with reversible ligands. Therefore, it is difficult to identify a suitable scoring function for the data set under investigation.

Docking of the tetrahedral transition state delivered energetically degenerate docking solutions wherefore the aim was to investigate the reversible attachment complex in more detail. Thereby the challenge was the size of the BChE-binding pocket, which also supplied degenerate docking solutions in the reversible docking. Due to a similar carbamoylation rate of all the inhibitors tested, a conserved position of the carbamate moiety in the binding pocket was presumed. Therefore, a representative docking solution of a reference compound, which was selected in the binding pocket in terms of interactions, was chosen for a modeling approach. These interactions are 1) A hydrogen bond distance between the carbamate carbonyl and the oxyanion hole and 2) a distance between the carbamate carbon and the serine which allows for a nucleophilic attack and thus the transfer of the carbamate moiety onto the enzyme. For the modeling approach, the representative binding pose was used to construct the appropriate inhibitor structures.

The preferred position of the *N*-methyl group was calculated for both enantiomers via the tension energy of the corresponding binding poses. For *S*-enantiomers the preferred position of the methyl group is quasi-"axial" and for *R*-enantiomers quasi-"equatorial". The conserved binding mode thus is characterized by the heptyl chain being placed in the acyl pocket and the ligand scaffold in a side pocket of the BChE-binding site where hydrophobic interactions dominate.

In addition to high affinity quinazoline and quinazolinone inhibitors, it was intended to make quinazolinium compounds accessible as lead compounds for future cholinesterase inhibitors.

Synthetic studies initially focused on chemical reactivity and stability of the natural product dehydroevodiamine (DHED) and its benz-derivative (benz-DHED). In particular, benz-DHED was unstable under the synthesis conditions applied so far and described in the literature. The investigations therefore required introduction of a suitable synthetic route, in this case oxidation with KMnO_4 , accompanied by improvement of yield and no by-product formation. For future syntheses of derivatives, the use of a Lewis-acid-labile protecting group is suggested.

Depending on the reaction conditions, the quinazolinium compounds can be isolated in two forms (ring-opened and ring-closed = quinazolinium-salt). By means of UV/Vis-studies, the equilibrium of these two forms was elucidated. In aqueous alkaline solutions the enrichment of a third, hitherto in this context undescribed species, was observed. These studies helped in identification of the quinazolinium-form as biologically active species. Docking studies of this form, using the modeling-approach which was evolved for carbamates,

showed a possible stabilization of this compound via a hydrogen bond mediated by a structural water molecule in the BChE-binding site. The role of water here again shows that consideration of water molecules in docking studies might be able to describe preferred binding modes by means of additional protein-ligand-interactions better, compared to docking studies without explicit water molecule consideration.

Based on the basic research carried out for quinazolinium compounds, future inhibitor development based on this substance class can be performed.

Finally, the herein conducted synthetic and theoretical studies provide important contributions to the understanding of the interaction between inhibitors and cholinesterases, which can be used for future inhibitor development.

9. Experimental Part

Due to communication with colleagues from foreign countries this part is written in English.

9.1 General

9.1.1 Working techniques and chemicals

Dry solvents were obtained via storage over Na and refluxing prior to use. For reactions under the exclusion of oxygen the reaction apparatus was heated three times under vacuum and flushed with argon, when the glass reached rt. The reaction flask was filled with starting material in argon flush and afterwards an argon balloon was attached to the apparatus during the reaction time.

Purifications by chromatography were carried out under atmospheric pressure with silica gel 60 (SiO₂) of *Merck* (particle size 63 – 200 nm). The solvents used for this purpose as well as for extraction purposes were purchased in technical grade and purified by distillation prior to use. The eluent mixtures are expressed as volume fractions. The fractions (F) are, unless otherwise specified, a volume of 20 mL. The solvents were generally removed on a rotary evaporator at 40 °C water bath temperature.

Commercially available starting materials were purchased from *Acros*, *Fluka* or *Aldrich*. These were used directly without purification. The deuterated solvents were purchased from *Aldrich* or *Deutero* and used directly.

9.1.2 Analytical methods

NMR-spectroscopy (NMR): NMR spectra were measured on an Advance 400 of *Bruker*. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the standard. ^1H -NMR spectra were calibrated with the residual hydrogen signal of the solvent (CDCl_3 -*d*, 7.26 ppm; $\text{DMSO-}d_6$, 2.50 ppm; $\text{MeOD-}d_4$, 3.31 ppm) and the same calibration procedure was applied for $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR spectra (CDCl_3 -*d*, 77.16 ppm; $\text{DMSO-}d_6$, 39.52 ppm; $\text{MeOD-}d_4$, 49.00 ppm). The assignment of the signals was carried out with help of DEPT135-experiments and two-dimensional correlation spectra (COSY, NOSY, HMQC, and HMBC). Spin multiplicities were abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br = broad signal. *J* is the coupling constant given in Hertz [s^{-1}].

Infrared spectroscopy (IR): Infrared spectra were measured on an FT/IR-6100 from *Jasco*. The compounds were measured as pure substances via specac ATR attachment. The position of absorption bands is given in wavelength ($\tilde{\nu}$) with the unit cm^{-1} . Intensities of absorption bands are characterized using strong (s), middle (m) and weak (w), in case the signal is broad (br).

Melting point (mp): Melting points were measured with a *Büchi* B-540 without further correction.

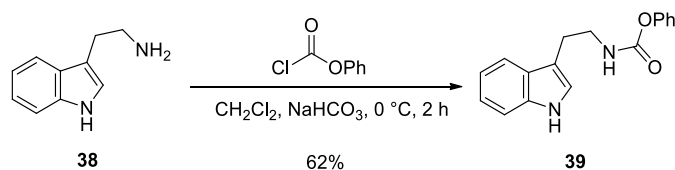
Liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS): Analytic measurements were performed on an LCMS system from *Shimadzu*, consisting of a controller DGU-20A3R, a pump LC-20AB, a degasser DGU-20A, a SPD-20A UV/Vis detector and an LCMS-2020 Single Quadrupol Mass Spectrometer with ESI and DUIS Ionisation units. Stationary phase was a Synergi 4U fusion-RP (150 x 4.6 mm) column. As mobile phase, gradient MeOH / water (phase A / phase B) were used.

Thin layer chromatography (TLC): Analytical thin layer chromatography was performed using pre-coated silica gel sheets from *Machery-Nagel* (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄). Visualization of compounds was performed using UV-light ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 366 nm). Compositions of the eluent mixtures are given in volume ratios (v:v).

UV/Vis spectroscopy (UV/Vis): UV-Vis spectra were recorded at room temperature ($23 \text{ }^\circ\text{C}$) in 1 cm cells on a *Varian* Cary 50 Bio UV-Visible spectrophotometer with 0.5 nm resolution in the range from 200 to 800 nm.

9.2 Syntheses of lactam intermediates

Phenyl (2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)carbamate (39)



Tryptamine (2.04 g, 12.7 mmol, 1.0 eq) was added to a suspension of CH_2Cl_2 (60 mL) and 5% aqueous NaHCO_3 solution (40 mL) and cooled to 0 °C. Then phenyl chloroformate (1.88 mL, 15.0 mmol, 1.2 eq) was added dropwise over 5 min time period. The mixture was stirred vigorously at 0 °C for 2 h. The reaction mixture was warmed to rt by removing the cooling bath and then extracted from CH_2Cl_2 (3 x 60 mL). Combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and the solvent was evaporated. The crude product was obtained as dark red oil (4.06 g). A fraction of 0.68 g of the crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , 29 x 3.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 2:1, F 21-30) to yield the title compound as light brown oil (0.42 g, 1.51 mmol, 62%).

Analytical Data:

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ (280.32 g/mol):

$R_f = 0.50$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 8.19$ (s, 1H, $\text{NH}_{\text{indole}}$), 7.67 – 7.60 (m, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.31 (m, 3H, Ar-*H*), 7.25 – 7.16 (m, 2H, Ar-*H*), 7.16 – 7.08 (m, 3H, Ar-*H*), 7.04 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, Ar-*H}_{\text{indole}}), 5.15 (s, 1H, NHC(=O)), 3.64 – 3.59 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.17 – 2.97 (m, 2H, NCH_2CH_2).*

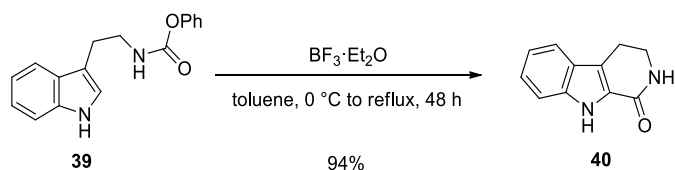
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 154.79$ (s, C=O), 151.18 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 136.57 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 129.38 (s, 2C, Ar-C), 127.42 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.36 (s, Ar-C), 122.32 (s, 2C, Ar-C), 122.28 (s, Ar-C), 121.74 (s, 2C, Ar-C), 119.62 (s, Ar-C), 118.83 (s, Ar-C), 112.75 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 111.41 (s, Ar-C), 60.52 (s, NCH_2CH_2) 41.61 (s, NCH_2CH_2) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3397w, 3341w, 2923w, 2852w, 2372w, 1714s, 1594w, 1519m, 1488m, 1456m, 1373w, 1338w, 1244m, 1200s, 1163m, 1127w, 1094m, 1070w, 1042m, 1009w, 944w, 906s, 812w, 735s, 689m cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Nakayama, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Straightforward asymmetric total synthesis of (+)-evodiamine, a major indole alkaloid in herbal medicine “Wu Zhu Yu”. *Heterocycles* **2008**, *76*, 861-865.

2,3,4,9-Tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-1-one (40)



$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (230 μL , 1.81 mmol, 1.2 eq) was added dropwise to a solution of phenyl(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)carbamate (**39**) (420 mg, 1.51 mmol, 1.0 eq) in dry toluene (25 mL) under Ar atmosphere at 0 °C. Then the cooling bath was removed and the reaction mixture was heated to 120 °C for 43 h. The mixture was quenched with chilled water (40 mL) and saturated aqueous NaHCO_3 solution (30 mL). Then the product was extracted from ethyl acetate (3 x 40 mL), washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated yielding 400 mg of crude product. This was further purified by column chromatography (SiO_2 , 21 x 3.5 cm, ethyl acetate 100%, F 17-30) to yield the title compound as pale yellow needles (260 mg, 1.41 mmol, 94%).

Analytical Data:

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (186.21 g/mol):

$R_f = 0.50$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

mp = 185.6 – 186.9 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 10.00$ (brs, 1H, $\text{NH}_{\text{indole}}$), 7.61 – 7.58 (m, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.48 (m, 1H, Ar-*H*), 7.32 – 7.28 (m, 1H, Ar-*H*), 7.16 – 7.12 (m, 1H, Ar-*H*), 6.29 (brs, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.73 (td, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.09 – 3.06 (m, 2H, NCH_2CH_2) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 163.55$ (s, C=O), 137.62 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.49 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.44 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.27 (s, Ar-C), 120.42 (s, Ar-C), 120.37 (s, Ar-C), 120.00 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 112.77 (s, Ar-C), 42.35 (s, NCH_2CH_2), 21.19 (s, NCH_2CH_2) ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 7.59$ -7.57 (m, 1H, Ar-*H*), 7.45 – 7.42 (m, 1H, Ar-*H*), 7.25 (ddd, $J = 8.3, 7.0, 1.2$ Hz, 1H, Ar-*H*), 7.08 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.0$ Hz, 1H, Ar-*H*), 3.64 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.03 – 2.99 (m, 2H, NCH_2CH_2) ppm.

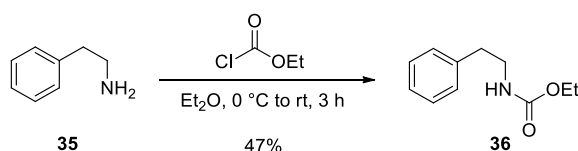
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 165.01$ (s, C=O), 139.20 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 127.47 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.47 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.90 (s, 2C, Ar-C), 121.16 (s, Ar-C), 120.96 (s, Ar-C), 113.43 (s, Ar-C), 42.81 (s, NCH_2CH_2), 21.56 (s, NCH_2CH_2) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3216m, 3168m, 3065m, 2974m, 2935m, 2386w, 2349w, 1728s, 1641s, 1618s, 1543m, 1517m, 1490m, 1458m, 1429m, 1371m, 1356w, 1330s, 1294m, 1244s, 1197m, 1152m, 1136m, 1114w, 1042m, 1003w, 959w, 935m, 893w, 851w, 824m, 792m, 767m, 751s, 678m cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Nakayama, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Straightforward asymmetric total synthesis of (+)-evodiamine, a major indole alkaloid in herbal medicine “Wu Zhu Yu”. *Heterocycles* **2008**, *76*, 861-865.

Ethyl phenethylcarbamate (36)



2-Phenylethanamine (1.56 mL, 1.50 g, 12.4 mmol, 1.0 eq) was dissolved in diethyl ether (6.0 mL) and cooled with an ice bath. Then a solution of ethyl carbonochloridate (590 μL , 670 mg, 6.2 mmol, 0.5 eq) in diethyl ether (4.0 mL) was added dropwise and the mixture was stirred for 3 h. A white solid was formed immediately (hydrochloride of the amine). The solid was filtered off and the solvent was removed, yielding a colorless oil (1.13 g, 5.8 mmol, 47%). The product was obtained as mixture of rotamers. (The ratio could not be detected because the rotamers were only seen in the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -spectra and not in the ^1H -NMR-spectra.)

Analytical Data:

$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ (193.24 g/mol):

$R_f = 0.72$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -d, 300 K): $\delta = 7.33 - 7.29$ (m, 2H, Ar-H), 7.25 – 7.17 (m, 3H, Ar-H), 4.70 (s, 1H, NH), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.47 – 3.41 (m, 2H, NCH_2CH_2), 2.86 – 2.65 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3) ppm.

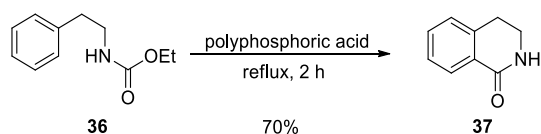
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3 -d, 300 K): $\delta = 156.72$ (s, C=O), 138.97 (s, $C_{\text{quart.}}$), 128.97 (s, Ar-C, minor), 128.91 (s, Ar-C, major), 128.74 (s, Ar-C, major), 128.59 (s, Ar-C, minor), 126.61 (s, Ar-C, major), 126.28 (s, Ar-C, minor), 60.85 (s, OCH_2CH_2), 42.24 (s, NCH_2CH_2), 36.33 (s, NCH_2CH_2), 14.78 (s, OCH_2CH_3) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3330w, 3028w, 2979w, 2932w, 1691s, 1603w, 1523m, 1496m, 1480w, 1454m, 1381w, 1331w, 1245s, 1200w, 1172w, 1139m, 1086w, 1032s, 953w, 908w, 876w, 777m, 747m, 698s cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.

3,4-Dihydroquinolin-1(2H)-one (37)



Ethyl phenethylcarbamate (1.41 g, 7.30 mmol, 1.0 eq.) was mixed with poly phosphoric acid (14 g) and heated to reflux temperature for 2 h. The reaction was quenched with ice water and neutralized with NaHCO₃ solution. The product was extracted from ethyl acetate (4 x 100 mL). Combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. Purification by column chromatography (SiO₂, 32 x 3.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 1:20, F 26-49) yielded the title compound as colorless crystals (832 mg, 5.10 mmol, 70%, reaction performed by P. Stadtmüller, purification performed by S. Wehle).

Analytical Data:

C₉H₉NO (147.17 g/mol):

R_f = 0.45 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:20)

mp = 58.4 – 59.4 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.07 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, Ar-8-H), 7.45 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-7-H), 7.40 – 7.33 (m, 1H, Ar-6-H), 7.22 (ddd, *J* = 7.5, 1.4, 0.7 Hz, 1H, Ar-5-H), 6.68 (brs, 1H, NH), 3.58 (m, 2.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.01 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 166.44 (s, C=O), 138.85 (s, (C=O)C_{quart.}), 132.14 (s, Ar-C), 128.93 (s, C_{quart.}), 127.89 (s, Ar-C), 127.23 (s, Ar-C), 127.06 (s, Ar-C), 40.21 (s, NCH₂CH₂), 28.34 (s, NCH₂CH₂) ppm.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 7.93 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, Ar-8-H), 7.48 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, Ar-7-H), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-6-H), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-5-H), 3.49 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.98 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 168.30 (s, C=O), 140.89 (s, (C=O)C_{quart.}), 133.53 (s, Ar-C), 129.88 (s, C_{quart.}), 128.58 (s, Ar-C), 128.46 (s, Ar-C), 128.01 (s, Ar-C), 40.82 (s, NCH₂CH₂), 29.00 (s, NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3189m, 3032m, 2875m, 2375w, 2349w, 1658s, 1601s, 1577m, 1478m, 1456m, 1405s, 1334s, 1305m, 1267m, 1233w, 1201w, 1164m, 1102w, 1065m, 1032m, 955w, 919w, 877w, 818m, 789m, 741s, 716m, 688m cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 4.588 min, purity = 96.45%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₉H₁₀NO) requires m/z: 148.08; found: 148.30 ([M+H]⁺); 317.15 ([M₂+Na]⁺).

Spectral data is in accordance with literature data:

Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.

9.3 Anthranilic ester intermediate

General procedure for anhydride synthesis (method A)

The acid was dissolved in dry THF and then triphosgene (0.3 eq) was added to the reaction mixture. The mixture was heated overnight at 45 °C. Unless specified otherwise, removal of the solvent *in vacuo* yielded the product.

General procedure for *N*-alkylation (method B)

N,N-Diisopropylethylamine was added to a solution of the anhydride in *N*-dimethylacetamide (DMAc) and the solution was stirred for 10 min prior to the addition of the alkylating agent. The solution was heated overnight at 45 °C or 40 °C (stated in the respective reaction scheme). After that the mixture was cooled to rt, water was added and the mixture was stirred vigorously for 30 min. The solid was filtered off and washed twice with water and *n*-hexane prior to drying in the desiccator.

General procedure for methyl ester formation (method C)

Method C-1

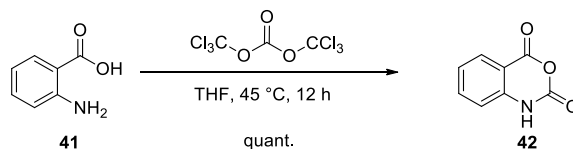
Sodium was dissolved in MeOH. Then the anhydride was added and the mixture was heated to reflux temperature for 3 h. The solution was cooled to rt and the solvent evaporated. An extraction was performed using CH₂Cl₂ and water. Combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed to yield the product.

Method C-2

The anhydride was dissolved in MeOH, conc. H₂SO₄ was added and the mixture was heated to reflux temperature for 3 h. Solvent evaporation was followed by extraction with CH₂Cl₂ and water. Combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄. Evaporation of solvent yielded the product.

9.3.1 Syntheses of anhydrides

1*H*-Benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dion (42)



The reaction was carried out according to **method A** with 2-aminobenzoic acid (1.00 g, 7.29 mmol, 1.0 eq), dry THF (15 mL) and triphosgene (740 mg, 2.48 mmol, 0.3 eq). An off-white solid was obtained in quantitative yield.

Analytical Data:

C₈H₅NO₃ (163.13 g/mol):

R_f = 0.47 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1, 2 drops triethylamine)

mp = 176.6 – 179.2 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 11.76 (s, 1H, NH), 7.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-6-*H* o. Ar-3-*H*), 7.83 – 7.73 (m, 1H, Ar-4-*H* o. Ar-5-*H*), 7.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-5-*H* o. Ar-4-*H*), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-6-*H* o. Ar-3-*H*) ppm.

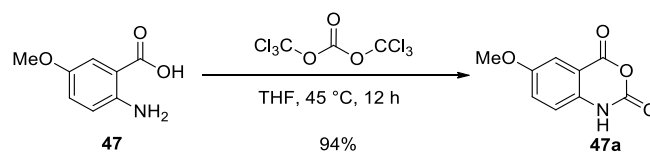
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 161.03 (s, (C=O)NH), 148.27 (s, (C=O)O), 142.60 (s, C_{quart.}), 138.11 (s, Ar-C), 130.13 (s, Ar-C), 124.69 (s, Ar-C), 116.54 (s, Ar-C), 111.43 (s, C_{quart.}) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 2358w, 1766s, 1715s, 1604s, 1473s, 1424m, 1358s, 1336m, 1323s, 1311s, 1255s, 1240s, 1184w, 1143m, 1122m, 1069m, 1021s, 967m, 875m, 788m, 760s, 741s, 694w, 684s, 679s, 668s cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Lygin, A. V.; De Meijere, A. Reactions of ortho-lithiophenyl (-hetaryl) isocyanides with carbonyl compounds: rearrangements of 2-metalated 4*H*-3,1-benzoxazines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4554-4559.

Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective tri- and tetracyclic BChE inhibitors releasing reversible inhibitors upon carbamate transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914-919.

6-Methoxy-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (47a)

The reaction was carried out according to **method A** with 2-amino-5-methoxybenzoic acid (2.00 g, 11.96 mmol, 1.0 eq), dry THF (15 mL) and triphosgene (1.21 g, 4.07 mmol, 0.34 eq). The colorless solid was filtered off and washed with *n*-hexane (5.0 mL) to obtain the first product batch (1.88 g, 9.71 mmol, 81%). The solvent of the filtrate was removed, the brown residue was washed with *n*-hexane (20 mL) to yield the second batch (310 mg, 1.60 mmol, 13%).

Analytical Data:

$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_4$ (193.16 g/mol):

$R_f = 0.44$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 1:1, 2 drops triethylamine)

mp = 242.9 – 244.1 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K): $\delta = 11.60$ (s, 1H, NH), 7.40-7.35 (m, 2H, Ar-H), 7.13 – 7.11 (m, 1 H, Ar-H), 3.81 (s, 3 H, CH_3) ppm.

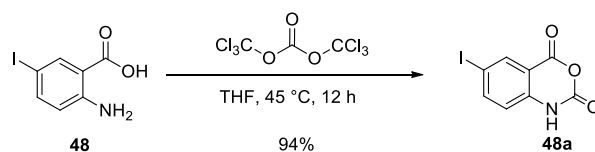
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K): $\delta = 159.83$ (s, (C=O)NH), 155.17 (s, (C=O)O), 146.91 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 135.48 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.69 (s, Ar-CH), 116.93 (s, Ar-CH), 110.65 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 109.85 (s, Ar-CH), 55.73 (s, CH_3) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3161w, 3091w, 2985w, 2920w, 2841w, 1782s, 1714s, 1626s, 1497s, 1468s, 1432s, 1343m, 1318m, 1282m, 1263s, 1235s, 1190m, 1156m, 1138s, 1032m, 994s, 957s, 917m, 903m, 833s, 784w, 750m, 735s, 690w, 665s cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Carter, M. C.; Alber, D. G.; Baxter, R.C.; Bithell, S. K.; Budworth, J.; Chubb, A.; Cockerill, G. S.; Dowdell, V. C.; Henderson, E. A.; Keegan, S. J.; Kelsey, R. D.; Lockyer, M. J.; Stables, J. N.; Wilson, L. J.; Powell, K. L. 1,4-Benzodiazepines as inhibitors of respiratory syncytial virus. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2311-2319.

6-Iodo-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (48a)



The reaction was carried out according to **method A** with 2-amino-5-iodobenzoic acid (2.00 g, 7.60 mmol, 1.0 eq), dry THF (30 mL) and triphosgene (690 mg, 2.28 mmol, 0.3 eq). The colorless product was filtered off and washed with *n*-hexane (10 mL). Solvent was removed from the liquid layer and the residue was washed with *n*-hexane and filtered off, to yield a pink solid product (2.06 g, 7.12 mmol, 94%).

Analytical Data:

C₈H₄INO₃ (289.03 g/mol):

R_f = 0.45 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1, 2 drops triethylamine)

mp = >220 °C (decomposition)

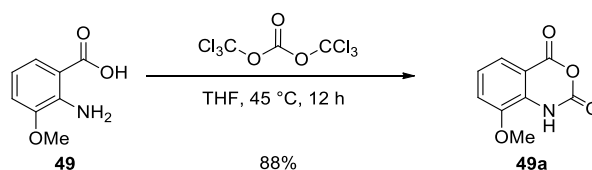
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 11.83 (s, 1H, NH), 8.1 (s, 1H, Ar-1-*H*), 8.03 – 8.00 (m, 1H, Ar-*H*), 6.97 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H, Ar-*H*) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 158.66 (s, (C=O)NH), 146.73 (s, (C=O)O), 144.78 (s, Ar-CH), 140.95 (s, Ar-2-C), 136.41 (s, Ar-CH), 117.60 (s, Ar-CH), 112.63 (s, Ar-1-C), 85.99 (s, Ar-6-C) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3905w, 3856w, 3235-2338brm, 1818w, 1756s, 1696s, 1611m, 1597m, 1489m, 1468m, 1412s, 1334s, 1270s, 1246s, 1181m, 1139m, 1109m, 1071w, 1031s, 994m, 902m, 839s, 794m, 761m, 748s, 695w, 682m, 655m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Tdedesco, R.; Shaw, A.N.; Bambal, R.; Chai, D.; Concha, N.O.; Darcy, M.G.; Dhanak, D.; Fitch, D.M.; Gates, A., Gerhardt, W.G.; Haleboua, D.L.; Han, C.; Hofmann, G.A.; Johnston, V.K.; Kaura, A.C.; Liu, N.; Keenan, R.M.; Lin-Goerke, J.; Sarisky, R.T.; Wiggall, K.J.; Zimmerman, M.N.; Duffy, K.J. 3-(1,1-Dioxo-2*H*-(1,2,4)-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1*H*)-quinolones, potent inhibitors of Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 971-983.

8-Methoxy-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (49a)

The reaction was carried out according to **method A** with 2-amino-3-methoxybenzoic acid (847 mg, 5.07 mmol, 1.0 eq), dry THF (15 mL) and triphosgene (530 mg, 1.77 mmol, 0.35 eq). The colorless product was filtered off and washed with *n*-hexane (10 mL). Solvent was removed from the liquid layer and the pink residue was washed with *n*-hexane and filtered off, to yield **49a** (861 mg, 4.46 mmol, 88%).

Analytical Data:

C₉H₇NO₄ (193.16 g/mol):

R_f = 0.35 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = >220 °C (decomposition)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 11.25 (s, 1H, NH), 7.48 (m, 1H, Ar-5-H), 7.40 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H, Ar-6-H), 7.20 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-8-H), 3.89 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 159.78 (s, (C=O)NH), 146.81 (s, (C=O)O), 146.23 (s, C_{quart.}), 131.57 (s, C_{quart.}), 123.39 (Ar-C), 119.61 (Ar-C), 117.48 (Ar-C), 110.83 (C_{quart.}), 56.37 (s, CH₃) ppm.

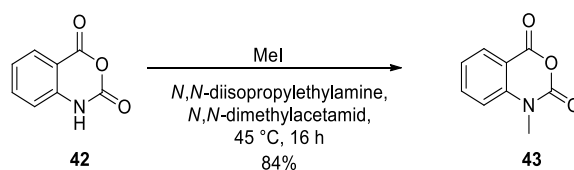
IR: ($\tilde{\nu}$) = 3109w, 3019w, 2990w, 2945w, 1765m, 1711s, 1605m, 1508m, 1474m, 1448m, 1422w, 1358m, 1343s, 1270s, 1254s, 1221m, 1187m, 1165m, 1092m, 997s, 917m, 899w, 849w, 805m, 778m, 738s, 712s, 657w cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Verma, C.; Sharma, S.; Pathak, A. A phosgene and peroxide-free one-pot tandem synthesis of isatoic anhydrides involving anthranilic acid, Boc anhydride, and 2-chloro-*N*-methyl pyridinium iodide. *Tett. Lett.* **2013**, *54*, 6897-6899.

9.3.2 N-alkylation reactions

1-Methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (**43**)



The reaction was carried out according to **method B** with isatoic anhydride **43** (637 mg, 3.90 mmol, 1.0 eq), DMAc (2.0 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (1.30 mL, 7.80 mmol, 2.0 eq) and methyl iodide (500 μ L, 8.00 mmol, 2.0 eq). The product was obtained as an off-white solid (580 mg, 3.27 mmol, 84%).

Analytical Data:

$C_9H_7NO_3$ (177.16 g/mol):

R_f = 0.43 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 176.5 – 178.0 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 7.87 – 7.83 (m, 1H, Ar-*H*), 7.29 – 7.23 (m, 1H, Ar-*H*), 6.69 – 6.60 (m, 2H, Ar-*H*), 3.87 (s, 3H, CH₃) ppm.

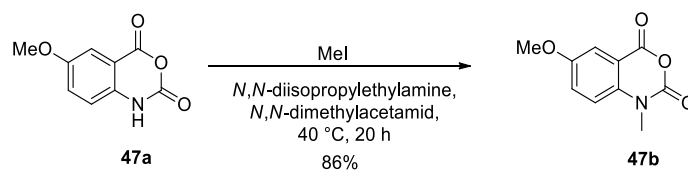
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 168.91 (s, C=O), 150.77 (s, C=O), 134.42 (s, Ar-C), 131.56 (s, Ar-C), 117.00 (s, Ar-C), 116.62 (s, Ar-C), 111.13 (s, C_{quart.}), 60.73 (s, C_{quart.}), 51.84 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3125w, 3087w, 2950w, 2380w, 2349w, 1767s, 1714s, 1604s, 1474s, 1423m, 1358s, 1336m, 1311s, 1255m, 1240s, 1184w, 1144m, 1121m, 1069m, 1020s, 875w, 788m, 760s, 741s, 680s, 667s cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

D'Souza, A. M.; Spiccia, N.; Basutto, J.; Jokisz, P.; Wong, L. S.-M.; Meyer, A. G.; Holmes, A. B.; White, J. M.; Ryan, J. H. 1,3-Dipolar cycloaddition-decarboxylation reactions of an azomethine ylide with isatoic anhydrides: formation of novel benzodiazepinones. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 486-489.

Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective tri- and tetracyclic BChE inhibitors releasing reversible inhibitors upon carbamate transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914-919.

6-Methoxy-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (47b)

The reaction was carried out according to **method B** with 6-methoxy-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (2.11 g, 10.9 mmol, 1.0 eq), DMAc (25 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (3.80 mL, 2.89 g, 22.3 mmol, 2.1 eq) and methyl iodide (1.80 mL, 3.95 g, 27.9 mmol, 2.6 eq). This yielded a beige solid as product (1.96 g, 9.4 mmol, 86%).

Analytical Data:

$C_{10}H_9NO_4$ (207.18 g/mol):

$R_f = 0.38$ (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1, 2 drops triethylamine)

mp = 234.0 – 235.0 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 7.49 – 7.38 (m, 3H, Ar-H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (s, 3H, NCH₃) ppm.

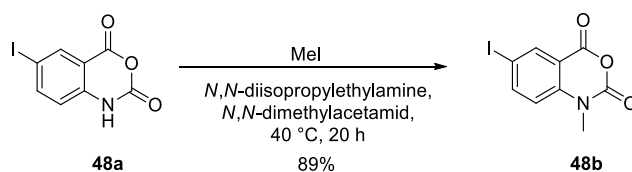
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 158.88 (s, C=O), 155.17 (s, C=O), 147.54 (s, C_{quart.}), 136.32 (s, C_{quart.}), 125.01 (s, Ar-C), 116.57 (s, Ar-C), 112.15 (s, C_{quart.}), 110.82 (s, Ar-C), 55.81 (s, OCH₃), 31.74 (s, NCH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3073w, 2957w, 1761s, 1706s, 1623w, 1598m, 1505s, 1479s, 1460m, 1439m, 1424m, 1360m, 1348m, 1307s, 1280m, 1247s, 1213m, 1190m, 1166m, 1122m, 1069w, 1026s, 970m, 917m, 889m, 840s, 768m, 739s, 704w, 695w, 670m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Beutner, G. L.; Kuethe, J. T.; Yasuda N. A practical method for preparation of 4-hydroxyquinolinone esters. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7058-7061.

6-Iodo-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (48b)



The reaction was carried out according to **method B** with 6-iodo-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (1.66 g, 5.74 mmol, 1.0 eq), DMAc (20 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (1.95 mL, 1.48 g, 11.5 mmol, 2.0 eq) and afterwards methyl iodide (720 μ L, 1.63 g, 11.5 mmol, 2.0 eq) was added. A beige solid was yielded as product (1.49 g, 4.91 mmol, 89%).

Analytical Data:

$C_9H_6INO_3$ (303.05 g/mol):

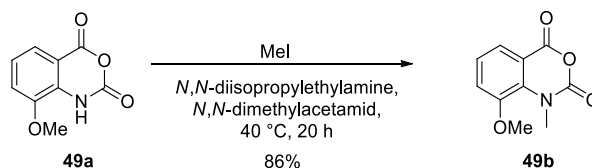
R_f = 0.46 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1, 2 drops triethylamine)

mp = decomposition >170 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 8.20 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-1-*H*), 8.13 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H, Ar-5-*H*), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-4-*H*), 3.43 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 157.78 (s, (C=O)NH), 147.41 (s, (C=O)O), 144.95 (s, Ar-1-C), 141.87 (s, C_{quart.}), 136.70 (s, Ar-5-C), 117.25 (s, Ar-4-C), 113.79 (s, C_{quart.}), 86.62 (s, C_{quart.}), 31.75 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3056w, 2357s, 1783s, 1703s, 1482s, 1466s, 1422s, 1325s, 1290s, 1256m, 1226s, 1160m, 1127m, 1085m, 1067m, 1021s, 959m, 926m, 861m, 816s, 769m, 740s, 684m, 667m cm⁻¹.

8-Methoxy-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (49b)

The reaction was carried out according to **method B** with 8-methoxy-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (800 mg, 4.14 mmol, 1.0 eq), DMAc (10 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (1.32 mL, 1.00 g, 7.76 mmol, 1.9 eq) and methyl iodide (480 μ L, 1.10 g, 7.76 mmol, 1.9 eq). This yielded a beige solid as product (740 mg, 3.55 mmol, 86%).

Analytical Data:

$C_{10}H_9NO_4$ (207.18 g/mol):

$R_f = 0.52$ (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = >170 °C (decomposition)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): $\delta = 7.60$ (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H, Ar-5-*H*), 7.53 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H, Ar-6-*H*), 7.33 – 7.27 (m, 1H, Ar-7-*H*), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (s, 3H, NCH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): $\delta = 159.09$ (s, (C=O)NH), 148.62 (s, (C=O)O), 148.08 (s, C_{quart.}), 132.39 (s, C_{quart.}), 124.75 (s, Ar-C), 121.02 (s, Ar-C), 120.83 (s, Ar-C), 114.19 (s, C_{quart.}), 57.00 (s, OCH₃), 36.95 (s, NCH₃) ppm.

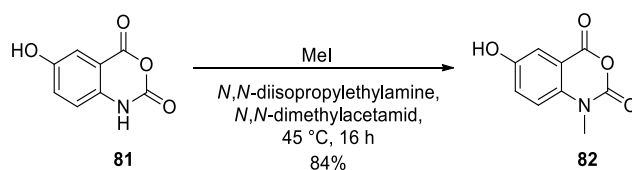
IR: ($\tilde{\nu}$) = 1766s, 1712s, 1602m, 1496m, 1475m, 1459m, 1441m, 1420w, 1353s, 1306m, 1270m, 1231m, 1196m, 1159w, 1076m, 1061m, 1034s, 963w, 903w, 814w, 753m, 739s, 712m, 687m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Coppola, G. M. The chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)-dione (isatoic anhydride). 10. Reactions with ester enolates. Synthesis of 4-hydroxy-1-methyl-3-prenyl-2(1H)-quinolinones, crucial intermediates in the synthesis of quinoline alkaloids. *J. Heterocyclic Chem.* **1983**, 20, 1217-1221.

D'Souza, A.; Spiccia, N.; Basutto, J.; Jokisz, P.; Wong, L. S.-M.; Meyer, A. G.; Homes, A. B.; White, J. M.; Ryan, J. H. 1,3-Dipolar cycloaddition-decarboxylation reactions of an azomethine ylide with isatoic anhydrides: Formation of novel benzodiazepinones. *Org. Lett.* **2011**, 13, 486-489.

6-Hydroxy-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (82)



The reaction was carried out according to **method B** with 6-hydroxy-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (10.2 g, 56.9 mmol, 1.0 eq), DMAc (150 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (20.0 mL, 118 mmol, 2.0 eq) and methyl iodide (7.00 mL, 112 mmol, 2.0 eq). The product was obtained as light brown solid (5.96 g, 30.9 mmol, 54%).

Analytical Data:

C₉H₇NO₄ (193.16 g/mol):

R_f = 0.16 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 232.8 – 234.3 °C

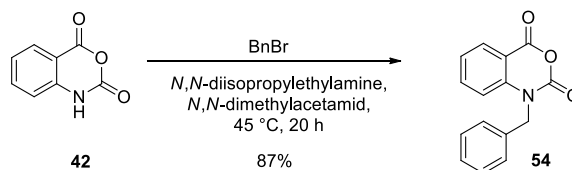
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 9.99 (s, 1H, OH), 7.32 – 7.26 (m, 3H, Ar-H), 3.43 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 159.42 (s, NC=O), 153.90 (s, C_{quart.}-OH), 148.02 (s, OC=O), 135.36 (s, C_{quart.}), 125.66 (s, Ar-C), 116.89 (s, Ar-C), 113.63 (s, Ar-C), 112.64 (s, C_{quart.}), 32.11 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3243w, 2370w, 2356w, 1766s, 1679s, 1599m, 1498s, 1415m, 1411m, 1375m, 1322m, 1299s, 1250s, 1163m, 1115m, 1076m, 1032s, 978m, 927m, 876m, 829s, 785w, 764m, 733s, 710m, 673m, 666m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective tri- and tetracyclic BChE inhibitors releasing reversible inhibitors upon carbamate transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914-919.

1-Benzyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (54)

The reaction was carried out according to **method B** with isatoic anhydride (1.62 g, 10.0 mmol, 1.0 eq), DMAc (30 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (3.40 mL, 20.0 mmol, 2.0 eq) and benzyl bromide (2.40 mL, 20.0 mmol, 2.0 eq). A beige solid was obtained as product (2.21 g, 8.72 mmol, 87%).

Analytical Data:

C₁₅H₁₁NO₃ (253.25 g/mol):

R_f = 0.71 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 138.3 – 139.0 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 8.04 (m, 1H, Ar-*H*), 7.73 (m, 1H, Ar-*H*), 7.47 – 7.38 (m, 2H, Ar-*H*), 7.38 – 7.22 (m, 5H, Ar-*H*), 5.29 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 158.88 (s, C=O), 148.33 (s, C=O), 141.36 (s, C_{quart.}), 137.00 (s, Ar-C), 135.32 (s, C_{quart.}), 129.55 (s, Ar-C), 128.66 (s, 2C, Ar-C), 127.43 (s, Ar-C), 126.58 (s, 2C, Ar-C), 123.75 (s, Ar-C), 115.14 (s, Ar-C), 112.08 (s, C_{quart.}), 47.58 (s, CH₂) ppm.

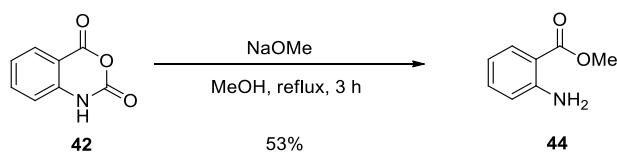
IR: ($\tilde{\nu}$) = 1776s, 1715s, 1605s, 1491m, 1473s, 1452s, 1378m, 1363m, 1310s, 1264m, 1243m, 1192m, 1160m, 1025s, 1005m, 793m, 758s, 741s, 706s, 684s, 666m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Verma, C.; Sharma, S.; Pathak, A. A phosgene and peroxide-free one-pot tandem synthesis of isatoic anhydrides involving anthranilic acid, Boc anhydride, and 2-chloro-*N*-methyl pyridinium iodide. *Tett. Lett.* **2013**, *54*, 6897-6899.

9.3.3 Formation of methyl esters

Methyl 2-aminobenzoate (44)



The reaction was carried out according to **method C-1** with sodium (109 mg, 4.74 mmol, 3.8 eq), MeOH (4.0 mL) and 1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (204 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq). A yellowish oil was obtained as product (100 mg, 0.66 mmol, 53%).

Analytical Data:

C₈H₉NO₂ (151.16 g/mol):

R_f = 0.43 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 7.85 (ddd, *J* = 8.0, 1.6, 0.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.29 – 7.23 (m, 1H, Ar-*H*), 6.69 – 6.60 (m, 2H, Ar-*H*), 5.73 (brs, 2H, NH₂), 3.87 (s, 3H, CH₃) ppm.

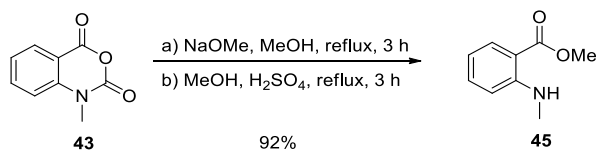
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 168.91 (s, C=O), 150.77 (s, Ar-C), 134.42 (s, Ar-C), 131.56 (s, Ar-C), 117.00 (s, Ar-C), 116.62 (s, Ar-C), 111.13 (s, Ar-C), 51.84 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3480m, 3371m, 2951w, 1687s, 1614s, 1587s, 1561m, 1487m, 1455m, 1435m, 1369w, 1292m, 1242s, 1190m, 1160s, 1101s, 1030m, 965w, 849m, 797w, 748s, 702s, 665m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Rahaim, R. J. Jr.; Maleczka, R. E. Jr. Pd-catalyzed silicon hydride reductions of aromatic and aliphatic nitro groups. *J. Org. Lett.* **2005**, *7*, 5087-5090.

Zhao, J.; Larock, R. C. Synthesis of xanthenes, thioxanthenes, and acridones by the coupling of arynes and substituted benzoates. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 583-588.

Methyl 2-(methylamino)benzoate (45)

The reaction was carried out according to **method C-1** with sodium (113 mg, 4.92 mmol, 2.9 eq), MeOH (4.0 mL) and 1-methyl-1*H*-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (302 mg, 1.69 mmol, 1.0 eq). A volatile yellowish oil was obtained as product (280 mg, 1.68 mmol, >99%).

The reaction was carried out according to **method C-2** with 1-methyl-1*H*-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (346 mg, 1.95 mmol, 1.0 eq), MeOH (10 mL) and 11 drops of conc. H₂SO₄. A brownish oil was obtained as product (297 mg, 1.80 mmol, 92%).

Analytical Data:

C₉H₁₁NO₂ (165.19 g/mol):

R_f = 0.97 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 7.91 – 7.88 (m, 1H, Ar-*H*), 7.62 (brs, 1H, NH), 7.40 – 7.36 (m, 1H, Ar-*H*), 6.67 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.59 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.91 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, NCH₃) ppm.

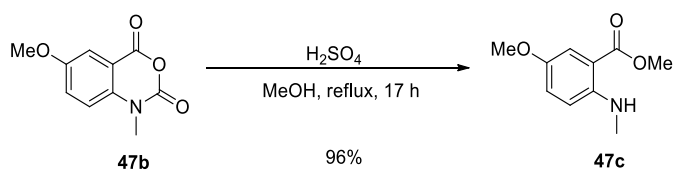
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 169.05 (s, C=O), 152.00 (s, C_{quart.}), 134.61 (s, Ar-C), 131.54 (s, Ar-C), 114.31 (s, Ar-C), 110.69 (s, Ar-C), 109.87 (s, C_{quart.}), 51.40 (s, OCH₃), 29.54 (s, NCH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3901-3568brw, 3381w, 2949w, 1553w, 2360s, 2337s, 2160m, 1973m, 1869w, 1846w, 1828w, 1734w, 1716w, 1680s, 1653m, 1606w, 1576m, 1560w, 1541w, 1518s, 1473w, 1458w, 1433m, 1323w, 1232s, 1187m, 1169s, 1124s, 1086s, 1063m, 1039m, 831w, 795w, 746s, 700m.

Spectral data is in accordance with literature data:

Zhao, J.; Larock, R. C. Synthesis of xanthenes, thioxanthenes, and acridones by the coupling of arynes and substituted benzoates. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 583-588.

Methyl 5-methoxy-2-(methylamino)benzoate (47c)



The reaction was carried out according to **method C-2** with 6-methoxy-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (1.03 g, 4.97 mmol, 1.0 eq), MeOH (16 mL) and 21 drops of conc. H₂SO₄. A yellow solid was obtained as product (930 mg, 4.75 mmol, 96%).

Analytical Data:

C₁₀H₁₃NO₃ (195.22 g/mol):

R_f = 0.85 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 65.8 – 66.7 °C

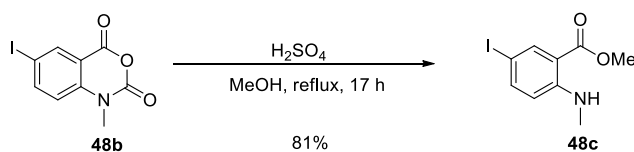
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 7.43 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.08 – 7.05 (m, 1H, Ar-*H*), 6.65 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 4.73 – 7.72 (m, 1H, NH), 3.86 (s, 3H, (C=O)OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.89 (s, 3H, NCH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 168.85 (s, C=O), 149.40 (s, C_{quart.}), 147.43 (s, C_{quart.}), 123.60 (s, Ar-C), 114.50 (s, Ar-C), 112.44 (s, Ar-C), 109.86 (s, C_{quart.}), 56.19 (s, (C=O)OCH₃), 51.66 (s, OCH₃), 30.21 (s, NCH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3402m, 2993w, 2949m, 2908m, 2835m, 1677s, 1614w, 1586m, 1574m, 1518s, 1456m, 1433s, 1407m, 1324w, 1310m, 1239s, 1204s, 1174s, 1125s, 1086s, 1062s, 1033s, 893w, 881m, 803s, 786s, 747m, 698w, 685m cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 7.782 min, purity = 96.64%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₀H₁₄NO₃) requires m/z: 196.10, found: 196.10.

Methyl 5-iodo-2-(methylamino)benzoate (48c)

The reaction was performed according to **method C-2** with 6-iodo-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (360 mg, 1.19 mmol, 1.0 eq), MeOH (12 mL) and 13 drops of conc. H₂SO₄. A dark red oil was obtained as crude product (350 mg, 1.21 mmol, >99%). Purification was performed with column chromatography (SiO₂, 29 x 2.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 10:1, F 6-13). The product was obtained as orange solid (282 mg, 0.97 mmol, 81%).

Analytical Data:

C₉H₁₀IINO₂ (291.09 g/mol):

R_f = 0.91 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.16 – 8.15 (m, 1H, Ar-6-*H*), 7.59 – 7.56 (m, 1H, Ar-4-*H*), 6.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-3-*H*), 3.86 (s, 1H, NH), 3.85 (s, 3H, (C=O)OCH₃), 2.88 (s, 3H, NCH₃) ppm.

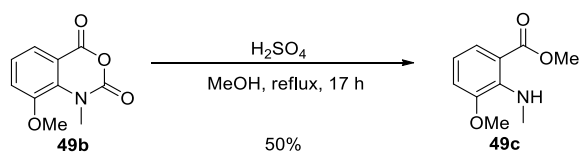
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 167.99 (s, C=O), 151.39 (s, C_{quart.}), 142.82 (s, Ar-C), 139.84 (s, Ar-C), 134.85 (s, C_{quart.}), 131.73 (s, C_{quart.}), 113.34 (s, Ar-C), 51.81 (s, OCH₃), 29.67 (s, NCH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3366w, 2945w, 1683m, 1594m, 1569m, 1507m, 1435m, 1396w, 1314w, 1255m, 1230s, 1176s, 1135m, 1090m, 965w, 901w, 807m, 786w, 686w cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 8.152 min, purity = 96.51%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₉H₁₁IINO₂) requires m/z: 291.98, found: 292.00.

Methyl 3-methoxy-2-(methylamino)benzoate (49c)



The reaction was performed according to **method C-2** with 8-methoxy-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (410 mg, 1.98 mmol, 1.0 eq), MeOH (12 mL) and 20 drops of conc. H₂SO₄. This yielded damascening **49c** as brown oil (190 mg, 0.99 mmol, 50%).

Analytical Data:

C₁₀H₁₃NO₃ (195.22 g/mol):

R_f = 0.81 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

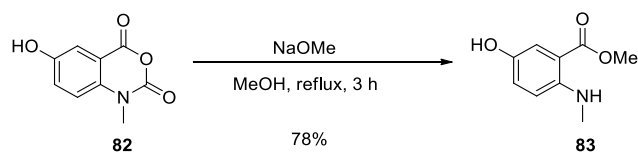
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 7.51 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.93 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.66 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 3.87 (s, 1 H, NH), 3.86 (s, 3H, (C=O)OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.05 (s, 3H, NCH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 169.19 (s, C=O), 150.59 (s, C_{quart.}), 144.88 (s, C_{quart.}), 123.67 (s, Ar-C), 116.75 (s, Ar-C), 116.45 (s, Ar-C), 114.50 (s, C_{quart.}), 56.22 (s, (C=O)OCH₃), 51.82 (s, OCH₃), 34.21 (s, NCH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3349w, 2950w, 2835w, 1681s, 1591w, 1516m, 1474m, 1435m, 1413m, 1336w, 1297w, 1231s, 1185s, 1128s, 1099m, 1056s, 986w, 876w, 814w, 743s cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (5-90%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 8.885 min, purity = > 99%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₀H₁₄NO₃) requires *m/z*: 196.10, found: 196.15.

Methyl 5-hydroxy-2-(methylamino)benzoate (83)

The reaction was carried out according to **method C-1** with sodium (115 mg, 5.00 mmol, 5.0 eq), MeOH (4.0 mL) and 6-hydroxy-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione **82** (194 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq). The product was obtained as brown solid (147 mg, 0.81 mmol, 78%).

Analytical Data:

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (181.19 g/mol):

$R_f = 0.59$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

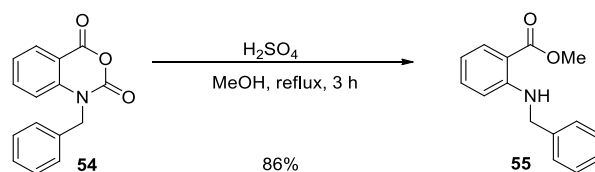
mp = 121.6 – 122.8 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 7.39$ (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, Ar-6-*H*), 7.00 (dd, $J = 8.9, 3.1$ Hz, 1H, Ar-4-*H*), 6.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar-3-*H*), 3.86 – 3.84 (s, 1H, *NH*), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 2.87 (s, 3H, NCH_3) ppm. (*OH* not observed)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 168.75$ (s, $\text{C}=\text{O}$), 147.25 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 144.83 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 123.57 (s, Ar-C), 116.93 (s, Ar-C), 112.33 (s, Ar-C), 110.09 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 51.70 (s, OCH_3), 30.07 (s, NCH_3) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3396m, 3293w, 2954m, 2916m, 2820w, 2359w, 1675s, 1620w, 1586m, 1527s, 1498m, 1458m, 1434s, 1425s, 1373w, 1324m, 1299m, 1254m, 1221s, 1201s, 1166s, 1123m, 1084m, 1055m, 1013m, 980m, 912m, 880m, 810s, 786s, 762m, 699w, 684m, 664w cm^{-1} .

Methyl 2-(benzylamino)benzoate (55)



The reaction was performed according to **method C-2** with 1-benzyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (354 mg, 1.40 mmol, 1.0 eq), MeOH (7.0 mL) and 7 drops of conc. H₂SO₄. Evaporation of solvent yielded a brown oil (340 mg). Purification was performed using column chromatography (SiO₂, 23 x 2.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 10:1, F 5-10). The solvent was evaporated and a light yellow oil was obtained as product (292 mg, 1.21 mmol, 86%).

Analytical Data:

C₁₅H₁₅NO₂ (241.29 g/mol):

R_f = 0.56 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 10:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.09 (brs, 1H, NH), 7.85 – 7.82 (m, 1H, Ar-H), 7.32 – 7.11 (m, 6H, Ar-H), 6.60 – 6.44 (m, 2H, Ar-H), 4.36 (s, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 169.08 (s, C=O), 150.87 (s, C_{quart.}), 138.80 (s, C_{quart.}), 134.58 (s, Ar-C), 131.60 (s, Ar-C), 128.66 (s, 2C, Ar-C), 127.13 (s, Ar-C), 127.07 (s, 2C, Ar-C), 114.92 (s, Ar-C), 111.72 (s, Ar-C), 110.25 (s, C_{quart.}), 51.49 (s, CH₃), 47.04 (s, CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3364w, 3029w, 2950w, 2845w, 1679s, 1604m, 1577s, 1515s, 1451m, 1436s, 1362w, 1324m, 1256s, 1222s, 1188s, 1163s, 1146s, 1098s, 1077s, 1047w, 1027w, 966w, 833w, 794s, 746s, 731s, 695s, 664w cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

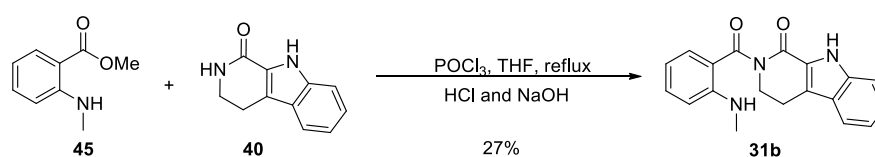
Roussaki, M.; Hall, B.; Lima, S. C.; da Silva, A. C.; Wilkinson, S.; Detsi, A. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone-chalcone series. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6436-6441.

9.4 Condensation reactions

General procedure for condensation reactions (method D)

To a stirred solution of the respective lactame in dry THF, POCl₃ was added and the mixture was stirred under argon atmosphere at 60 °C for 90 min. Afterwards the anthranilic ester, predissolved in dry THF, was added dropwise to the reaction mixture and stirred at 75 °C until total lactame consumption. Then the reaction mixture was cooled to rt, CH₂Cl₂ and aqueous NH₃ solution was added until pH = 9 was reached. The water layer was removed and the remaining colored organic layer was acidified with 2M HCl (pH = 3). By this the color of the organic layer disappeared. The organic layer was removed and aqueous NH₃ solution was added to the water phase. The water phase was extracted three times from CH₂Cl₂ (3 x 30 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated and the remaining oil was kept in the freezer. For compound purification please refer to the specific reaction which are described below.

2-(2-(Methylamino)benzoyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-one (31b)



The reaction was carried out according to **method D** with 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-one (**40**) (190 mg, 1.01 mmol, 1.0 eq), dry THF (15 mL), POCl₃ (130 μL, 1.42 mmol, 1.4 eq) and *N*-methylantranilate (**45**) (280 mg, 1.69 mmol, 1.7 eq). The mixture was stirred for 96 h. The workup was performed with 2M NaOH instead of aqueous NH₃ solution. While warming the crude product to rt crystals were formed. These crystals were filtered off and washed three times with diethyl ether to obtain an orange solid as product (89.4 mg, 280 μmol, 27%).

Analytical Data:

C₁₉H₁₇N₃O₂ (319.36 g/mol):

R_f = 0.20 (SiO₂, 100% ethyl acetate)

mp = 170.7 – 173.0 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 10.12 (s, 1H, NH_{indole}), 7.63 – 7.61 (m, 1H, Ar-H_{E-ring}), 7.44 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-H_{A-ring}), 7.38 – 7.34 (m, 1H, Ar-H_{A-ring}), 7.30 – 7.23 (m, 1H, Ar-H_{E-ring}), 7.19 (d, J = 5.1 Hz, 1H, NHCH₃) 7.17 – 7.13 (m, 1H, Ar-H_{E-ring}),

7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar- $H_{E\text{-ring}}$), 6.77 (dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, 1H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$), 6.53 – 6.49 (m, 1H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$), 4.19 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.20 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 2.95 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d$, 300 K): $\delta = 175.98$ (s, C=O), 162.27 (s, C=O), 151.15 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 151.05 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 138.70 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 134.66 (s, Ar-C), 132.50 (s, Ar-C), 126.24 (s, Ar-C), 124.83 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 122.94 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 120.71 (s, Ar-C), 120.67 (s, Ar-C), 115.90 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 114.73 (s, Ar-C), 113.16 (s, Ar-C), 111.22 (s, Ar-C), 47.64 (s, NCH_2CH_2), 29.89 (s, CH_3), 21.29 (s, NCH_2CH_2) ppm.

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K): $\delta = 11.73$ (s, 1H, $\text{NH}_{\text{indole}}$), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar- H), 7.45 – 7.40 (m, 1H, Ar- H), 7.35 – 7.27 (m, 2H, Ar- H), 7.12 (ddd, $J = 8.1, 6.9, 1.0$ Hz, 1H, Ar- H), 6.89 (m, 1H, NHCH_3), 6.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar- H), 6.49 (ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.1$ Hz, 1H, Ar- H), 4.11 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.20 – 3.17 (m, 2H, NCH_2CH_2), 2.82 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K): $\delta = 174.65$ (s, C=O), 161.01 (s, C=O), 149.69 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 138.38 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 133.45 (s, Ar-C), 131.42 (s, Ar-C), 126.00 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 125.60 (s, Ar-C), 124.43 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 122.47 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 120.85 (s, Ar-C), 119.99 (s, Ar-C), 116.96 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 114.17 (s, Ar-C), 112.75 (s, Ar-C), 110.85 (s, Ar-C), 46.85 (s, NCH_2CH_2), 29.52 (s, CH_3), 20.52 (s, NCH_2CH_2) ppm.

^1H -NMR (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 7.95$ (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, Ar- $H_{E\text{-ring}}$), 7.58 – 7.56 (m, 1H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$), 7.53 – 7.49 (m, 2H, Ar- $H_{E\text{-ring}}$), 7.46 – 7.44 (m, 1H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$), 7.21 (ddd, $J = 8.3, 7.1, 1.2$ Hz, 1H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$), 7.12 – 6.94 (m, 3H, Ar- $H_{A\text{-ring}}$ and Ar- $H_{E\text{-ring}}$), 5.06 (ddd, $J = 12.8, 5.1, 1.7$ Hz, 1H, NCHHCH_2), 3.44 – 3.37 (m, 1H, NCHHCH_2), 3.02 (s, 3H, CH_3), 2.97 – 2.95 (m, 1H, NCH_2CHH), 2.87 (ddd, $J = 15.5, 12.1, 5.1$ Hz, 1H, NCH_2CHH) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 165.31$ (s, C=O), 147.95 (s, C=O), 138.40 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 135.23 (s, Ar-C), 129.41 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 128.95 (s, Ar-C), 126.73 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 124.23 (s, Ar-C), 120.65 (s, Ar-C), 120.57 (s, Ar-C), 119.93 (s, Ar-C), 118.46 (s, 2C, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 116.17 (s, Ar-C), 112.84 (s, Ar-C), 98.27 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 42.33 (s, NCH_2CH_2), 35.08 (s, CH_3), 21.62 (s, NCH_2CH_2) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3403w, 3264m, 2811w, 2371w, 2357w, 2349w, 1662s, 1605m, 1574m, 1551m, 1511m, 1487m, 1424w, 1395m, 1368w, 1321m, 1287m, 1265w, 1243w, 1231m, 1202m, 1174m, 1128w, 1107w, 1093w, 1067w, 1047m, 1003w, 993w, 980w, 946m, 892m, 851w, 803w, 776w, 768m, 747s, 740s, 712m, 676w, 659m cm^{-1} .

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, $t_R = 4.537$ min, purity = 95.30%.

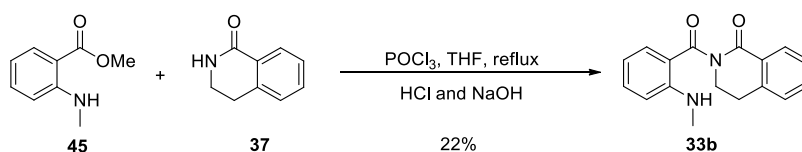
Mass: calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$) requires m/z : 319.13 (open), 302.13 (closed); found: 302.20.

Spectral data is in accordance with literature data:

Nakayama, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Straightforward asymmetric total synthesis of (+)-evodiamine, a major indole alkaloid in herbal medicine “Wu Zhu Yu”. *Heterocycles* **2008**, *76*, 861-865.

Unsworth, W. P.; Kitsiou, C.; Taylor, J. K. An expedient protection-group-free total synthesis of (±)-dievodiamine. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3302-3305.

2-(2-(Methylamino)benzoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (**33b**)



The reaction was carried out according to **method D** with 3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one (**37**) (170 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq), dry THF (12 mL), POCl₃ (180 μL, 1.75 mmol, 1.5 eq) and methyl 2-(methylamino)benzoate (**45**) (300 mg, 1.79 mmol, 1.5 eq) predissolved in dry THF (3.5 mL). The reaction mixture was stirred for 41 h. Crystallization of the title compound was performed by addition of MeOH/CH₂Cl₂/NH₃ (25% aq-solution) 10:1:0.1%. The crystals were filtered off and washed three times with petroleum ether until the organic layer remained colorless. The solvent was removed to yield light-yellowish crystals as product (71.7 mg, 260 μmol, 22%).

Analytical Data:

C₁₇H₁₆N₂O₂ (280.32 g/mol):

R_f = 0.23 – 0.72 (tailing) (SiO₂, methanol/dichloromethane/NH₃ (25% aq-solution) 10:1:0.1%)

mp = 136.5 – 137.0 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.13 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, C(NH)-CH_A-ring), 7.52 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, Ar-H_D-ring), 7.43 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-H_D-ring), 7.39 – 7.35 (m, 2H, Ar-H_A-ring), 7.32 – 7.27 (m, 2H, NH and Ar-H_D-ring), 6.73 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, C_{quart.}-CH_A-ring), 6.55 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-H_D-ring), 4.01 – 3.98 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.18 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.94 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 176.61 (s, C=O), 165.51 (s, C=O), 151.37 (s, C_{quart.}), 139.92 (s, C_{quart.}), 134.87 (s, Ar-C_A-ring), 133.32 (s, Ar-C_D-ring), 132.64 (Ar-C_D-ring), 129.76 (s, C(NH)-CH_A-ring), 128.69 (s, C_{quart.}), 127.63 (s, Ar-C_D-ring), 127.44 (s, Ar-C_A-ring),

115.21 (s, C_{quart.}), 114.64 (s, Ar-C_{D-ring}), 111.41 (s, Ar-C_{A-ring}), 45.11 (s, NCH₂CH₂), 29.82 (s, CH₃), 28.65 (s, NCH₂CH₂) ppm.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 7.90 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.53 – 7.48 (m, 2H, Ar-*H*), 7.42 – 7.35 (m, 1H, Ar-*H*), 7.35 – 7.30 (m, 2H, Ar-*H*), 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.97 – 6.93 (m, 1H, Ar-*H*), 4.60 – 4.54 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.42 – 3.36 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.13 – 3.06 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.95 – 2.88 (m, 4H, CH₃, NCH₂CHH) ppm. (NH not seen)

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 164.96 (s, C=O), 148.04 (s, C=O), 139.29 (s, C_{quart.}), 135.58 (s, C_{quart.}), 135.35 (s, Ar-C), 130.66 (s, Ar-C), 129.79 (s, Ar-C), 128.73 (s, Ar-C), 127.75 (s, Ar-C), 127.63 (s, Ar-C), 120.29 (s, Ar-C), 117.42 (s, C_{quart.}), 115.58 (s, Ar-C), 99.89 (s, C_{quart.}), 41.52 (s, NCH₂CH₂), 35.48 (s, CH₃), 29.44 (s, NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3370m, 2898w, 2822w, 2372w, 2350w, 1688s, 1640s, 1603m, 1569m, 1516m, 1470m, 1422m, 1374m, 1335m, 1303s, 1265s, 1223s, 1176m, 1140s, 1089m, 1043m, 1006m, 960m, 905m, 848m, 797m, 786m, 742s, 716m, 691m, 653m cm⁻¹.

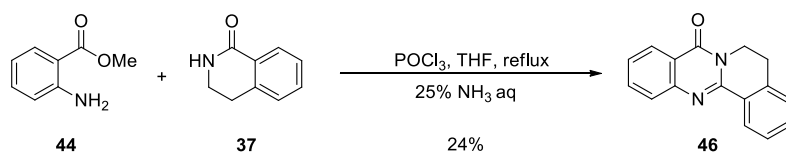
HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (10-80%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t*_R = 4.916 min, purity = >99.99%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₇H₁₇N₂O₂) requires *m/z*: 281.13 (open), 263.12 (closed); found: 263.15.

Spectral data is in accordance with literature data:

Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.

5*H*-Isoquinolino[1,2-*b*]quinazolin-8(6*H*)-one (46)



The reaction was carried out according to **method D** with 3,4-dihydroisoquinolin-1(2*H*)-one (**37**) (190 mg, 1.28 mmol, 1.0 eq), dry THF (15 mL), POCl₃ (150 μL, 1.54 mmol, 1.2 eq) and methyl 2-aminobenzoate (**44**) (340 mg, 2.25 mmol, 1.8 eq) predissolved in dry THF (3.0 mL). The reaction mixture was stirred for 113 h.

The extraction yielded 0.38 g of crude product which was purified by column chromatography (SiO₂, 27 x 3 cm, petroleum ether/ethyl acetate 2:1, F 11-16) to obtain off-white crystals (84.7 mg, 302 μmol, 24%).

Analytical Data:

C₁₆H₁₂N₂O (248.28 g/mol):

R_f = 0.50 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

mp = 158.0 – 158.7 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.56 – 8.41 (m, 1H, Ar-H_D-ring), 8.42 – 8.24 (m, 1H, Ar-H_A-ring), 7.86 – 7.63 (m, 2H, Ar-H_A-ring), 7.54 – 7.41 (m, 3H, Ar-H_D-ring (2H) and Ar-H_A-ring (1H)), 7.33 – 7.25 (m, 1H, Ar-H_D-ring), 4.47 – 4.37 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.11 (t, J = 6.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 161.85 (s, C=O), 149.51 (s, C_{quart.}), 147.97 (s, C=N), 137.19 (s, 2C, C_{quart.}), 134.35 (Ar-C_A-ring), 131.84 (Ar-C_A-ring), 129.74 (s, C_{quart.}), 128.18 (Ar-C_D-ring), 127.77 (2 Ar-C_A-ring), 127.64 (Ar-C_D-ring), 127.01 (Ar-C_D-ring), 126.66 (Ar-C_D-ring), 120.91 (s, C_{quart.}), 39.76 (s, NCH₂CH₂), 27.63 (s, NCH₂CH₂) ppm.

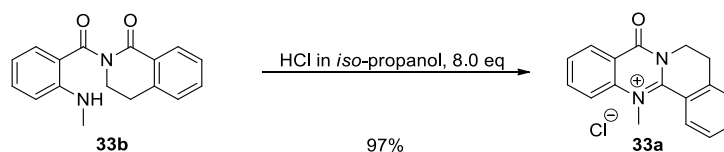
IR: (ν̄) = 3070w, 3031w, 2928w, 2901w, 2850w, 2359w, 2120w, 1921w, 1668s, 1608m, 1589s, 1557s, 1470s, 1457s, 1395s, 1334s, 1308m, 1265m, 1253m, 1173m, 1149s, 1108m, 1065w, 1030w, 1013w, 980m, 958w, 947m, 905m, 876m, 840m, 795w, 760s, 737s, 705s, 691s, 669m cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.917 min, purity = >99.99%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₆H₁₃N₂O) requires m/z: 248.11; found: 249.05.

Spectral data is in accordance with literature data:

Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.

13-Methyl-8-oxo-6,8-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-13-ium chloride (33a)

Compound **33b** (8.1 mg, 29 μmol , 1.0 eq) was dissolved in CH_2Cl_2 and 1 M HCl in *iso*-propanol (230 μL , 230 μmol , 8.0 eq) was added. The mixture discolored immediately and was stirred for 15 min at rt prior to removal of the solvent *in vacuo* to yield the quinazolinium salt **33a** as a colorless solid (8.3 mg, 28 μmol , 97%).

Analytical Data:

$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$ (298.77 g/mol):

$R_f = 0.11 - 0.39$ (tailing) (SiO_2 , dichloromethane/methanol/ NH_3 (25% aq-solution) 10:1:0.1%)

mp = 237 – 239 $^\circ\text{C}$ (decomposition)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 8.53 - 8.45$ (m, 1H, Ar-H), 8.23 – 8.12 (m, 3H, Ar-H), 7.91 – 7.82 (m, 2H, Ar-H), 7.70 – 7.67 (m, 2H, Ar-H), 4.42 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 4.35 (s, 3H, CH_3), 3.26 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, NCH_2CH_2) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, 300 K): $\delta = 159.92$ (s, C=O), 159.05 (s, C=N), 144.27 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 141.67 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 138.12 (s, Ar-C), 137.32 (s, Ar-C), 133.48 (s, Ar-C), 130.66 (s, Ar-C), 129.84 (s, Ar-C), 129.32 (s, Ar-C), 128.63 (s, Ar-C), 124.12 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 120.44 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 120.22 (s, Ar-C), 45.08 (s, CH_3), 42.85 (s, NCH_2CH_2), 28.03 (s, NCH_2CH_2) ppm.

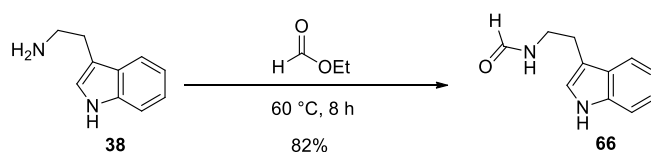
IR: ($\tilde{\nu}$) = 3353brw, 1693s, 1615s, 1600s, 1578w, 1545s, 1490s, 1461m, 1422s, 1334m, 1307m, 1282s, 1248m, 1213w, 1149m, 1102m, 1040w, 1000m, 977w, 953w, 903w, 815w, 791w, 763s, 745m, 687m, 666w cm^{-1} .

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 $^\circ\text{C}$, $t_R = 2.454$ min, purity= 98.27%.

Mass: calc. for $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$) requires m/z: 263.12; found: 263.10.

9.6 Syntheses of evodiamine, benz-evodiamine and hydroxy-derivatives

N-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)formamide (**66**)



Tryptamine **38** (1.99 g, 12.5 mmol, 1.0 eq) was suspended in ethyl formate (8.00 mL, 7.41 g, 100 mmol, 8.0 eq) and heated to reflux temperature for 8 h. Excessive ethyl formate was removed *in vacuo* to yield the crude product as a brown oil (2.7 g). Purification was performed using column chromatography (SiO₂, 37 x 3.0 cm, CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.1, F 11-17) to obtain the title compound as a brown oil (1.93 g, 10.2 mmol, 82%).

Analytical Data:

C₁₁H₁₂N₂O (188.23 g/mol):

R_f = 0.43 (SiO₂, dichloromethane/methanol/NH₃ 10:1:0.1)

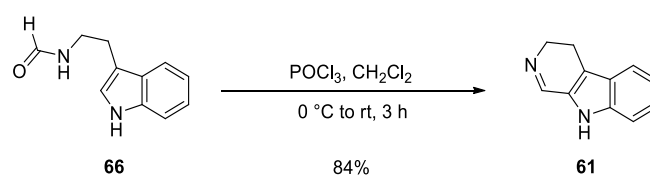
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.15 – 8.09 (m, 1H, HC=O), 7.62 – 7.59 (m, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.37 (m, 1H, Ar-*H*), 7.22 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.3 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.14 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.05 (s, 1H, Ar-*H*), 5.63 (s, 1H, NHCH₂CH₂), 3.66 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.01 (td, *J* = 6.8, 0.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂) ppm. NH of indole not seen.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 161.48 (s, C=O), 127.31 (s, C_{quart.}), 122.28 (s, Ar-C), 119.56 (s, Ar-C), 118.69 (s, Ar-C), 118.41 (s, Ar-C), 112.44 (s, C_{quart.}), 111.55 (s, C_{quart.}), 111.42 (s, Ar-C), 38.39 (s, NCH₂CH₂), 25.22 (NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3390w, 3267w, 3052w, 2868w, 1655s, 1514m, 1456m, 1434m, 1384m, 1338m, 1264w, 1227m, 1126w, 1094w, 1010w, 810w, 738s cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

González-Gómez, Á.; Domínguez, G.; Pérez-Castells, J. Novel chemistry of β-carbolines. Expedient synthesis of polycyclic scaffolds. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3378-3391.

4,9-Dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indole (61)

N-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)formamide (1.90 g, 10.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (6.0 mL) and cooled to 0 °C in an ice bath. Then POCl₃ (2.30 mL, 3.83 g, 25.3 mmol, 2.5 eq) was added dropwise over 5 min period. The reaction mixture was stirred in the ice bath for 1 h and at rt under Ar atmosphere for 2 h. Then POCl₃ and CH₂Cl₂ were removed *in vacuo*. The brown residue was dissolved in ethyl acetate (60 mL) and extracted from 10% acetic acid in water (6 x 30 mL). Combined water extracts were basified with aq. NH₃ solution until pH 10 was reached. The title compound was extracted from CH₂Cl₂ (6 x 30 mL), combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄. After removal of solvent *in vacuo* the title compound was obtained as orange foam (1.45 g, 8.5 mmol, 84%).

Analytical Data:

C₁₁H₁₀N₂ (170.21 g/mol):

R_f = 0.48 (SiO₂, dichloromethane/methanol/NH₃ 10:1:0.1)

mp = 93.5 – 95 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.76 (s, 1H, N=CH), 8.38 (s, 1H, NH), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.36 – 7.29 (m, 1H, Ar-*H*), 7.29 – 7.21 (m, 1H, Ar-*H*), 7.21 – 7.08 (m, 1H, Ar-*H*), 4.02 – 3.73 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.93 – 2.74 (m, 2H, NCH₂CH₂) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 171.20 (s, C=N), 151.74 (s, C_{quart.}), 136.89 (s, Ar-C), 128.26 (s, C_{quart.}), 124.63 (s, C_{quart.}), 120.22 (s, Ar-C), 119.90 (s, Ar-C), 116.16 (s, C_{quart.}), 112.06 (s, Ar-C), 60.43 (NCH₂CH₂), 21.07 (NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3397w, 3053w, 2839w, 2360w, 1720m, 1623w, 1601w, 1571w, 1550m, 1449m, 1371m, 1322m, 1302m, 1248w, 1164m, 1141m, 1113m, 1080w, 1039m, 1010w, 983w, 948w, 913w, 866w, 818w, 788w, 737s, 665w cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 5.571 min, purity = 97.82%.

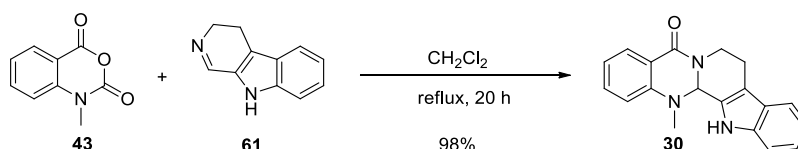
Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₁H₁₁N₂) requires *m/z*: 171.09; found: 171.10.

Spectral data is in accordance with literature data:

Whittaker, N. The synthesis of emetine and related compounds. Part VI. Improvements in the synthesis of 3-alkyl-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-9,10-dimethoxybenzo[*a*]quinolizin-2-ones

and 3-alkyl-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-2-ones. Formation of some related diazabicyclo[3,3,1]nonanes. *J. Chem. Soc. C.* **1969**, 85-89.

14-Methyl-7,8,13b,14-tetrahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-*b*]quinazolin-5(13*H*)-one (30)



1-Methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (820 mg, 4.61 mmol, 1.0 eq) and 4,9-dihydro-3*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (800 mg, 4.7 mmol, 1.02 eq) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (15 mL) and refluxed for 24 h. The title compound was obtained after removal of the solvent *in vacuo* and washing with Et₂O as a beige solid (1.37 g, 4.52 mmol, 98%).

Analytical Data:

C₁₉H₁₇N₃O (303.36 g/mol):

R_f = 0.70 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1).

mp = 254 – 256 °C (decomposition)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 11.05 (s, 1H, NH), 7.79 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.45 (m, 2H, Ar-*H*), 7.38 – 7.35 (m, 1H, Ar-*H*), 7.14 – 6.87 (m, 4H, Ar-*H*), 6.12 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, C_{tert.}-*H*), 4.65 – 4.61 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.24 – 3.17 (m, 1H, NCHHCH₂), 2.97 – 2.89 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.88 (s, 3H, CH₃), 2.84 – 2.75 (m, 1H, NCH₂CHH) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 164.28 (s, C=O), 148.78 (s, C_{quart.}), 136.50 (s, C_{quart.}), 133.48 (s, Ar-C), 130.63 (s, C_{quart.}), 128.01 (s, Ar-C), 125.98 (s, C_{quart.}), 121.88 (s, Ar-C), 120.29 (s, Ar-C), 119.24 (s, C_{quart.}), 118.93 (s, Ar-C), 118.24 (s, Ar-C), 117.46 (s, Ar-C), 111.68 (s, Ar-C), 111.53 (s, C_{quart.}), 69.80 (C_{tert.}-H), 40.92 (NCH₂CH₂), 36.47 (CH₃), 19.51 (NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3211w, 2943w, 2914w, 2845w, 1627s, 1604s, 1508m, 1494w, 1472w, 1447m, 1406w, 1389m, 1343w, 1323w, 1308m, 1280m, 1262m, 1227m, 1201w, 1164m, 1145w, 1129w, 1109w, 1028w, 1011w, 941w, 879w, 844w, 745s, 733s, 689m cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.965 min, purity = 94.44%.

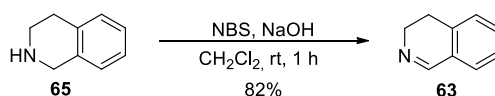
Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₉H₁₈N₃O) requires *m/z*: 304.14; found: 304.10.

Spectral data is in accordance with literature data:

Unsworth, W. P.; Kitsiou, C.; Taylor, R. J. K. Direct imine acylation: Rapid access to diverse heterocyclic scaffolds. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 258-261.

Huang, G.; Kling, B.; Darras, F. H.; Heilmann, J.; Decker, M. Identification of a neuroprotective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 15-21.

3,4-Dihydroisoquinoline (63)



Tetrahydroisoquinoline (200 mg, 1.5 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (9.0 mL) and *N*-bromosuccinimide (NBS, 295 mg, 1.65 mmol, 1.1 eq) was added over a 10 min period. The mixture was stirred at rt for 1 h. Then 1 M NaOH solution (3.0 mL) was added and the title compound was extracted from ethyl acetate (4 x 20 mL). Combined organic layers were washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The title compound was obtained as pale yellow oil after removal of the solvent *in vacuo* (162 mg, 1.23 mmol, 82%).

Analytical Data:

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}$ (131.17 g/mol):

$R_f = 0.26$ (SiO_2 , 100% ethyl acetate).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 8.34 - 8.33$ (m, 1H, $\text{HC}=\text{N}$), 7.39 – 7.24 (m, 3H, Ar-*H*), 7.18 – 7.13 (m, 1H, Ar-*H*), 3.84 – 3.72 (m, 2H, NCH_2CH_2), 2.79 – 2.69 (m, 2H, NCH_2CH_2) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): $\delta = 160.49$ (s, $\text{C}=\text{N}$), 136.44 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 131.23 (s, Ar-*C*), 128.55 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 127.53 (s, Ar-*C*), 127.38 (s, Ar-*C*), 127.20 (s, Ar-*C*), 47.42 (s, NCH_2CH_2), 25.13 (s, NCH_2CH_2) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3377w, 3020w, 2934w, 2896w, 2846w, 1625m, 1576w, 1488w, 1455w, 1425w, 1390w, 1361w, 1327w, 1298w, 1276w, 1228w, 1208m, 1196w, 1178w, 1141w, 1115w, 1075w, 1052w, 1032w, 1004m, 957w, 930w, 877m, 805w, 749s, 731w, 691m cm^{-1} .

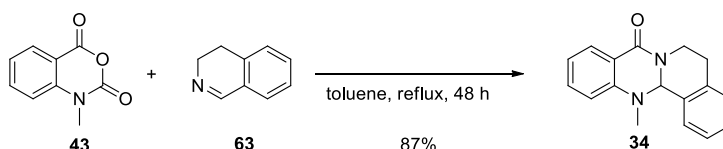
HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, $t_R = 2.428$ min, purity = 96.51%.

Mass: calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}$) requires m/z : 132.08; found: 132.15.

Spectral data is in accordance with literature data:

Marui, K.; Nomoto, A.; Akashi, H.; Ogawa, A. Green oxidation of amines to imines based on the development of novel catalytic systems using molecular oxygen or hydrogen peroxide. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* **2016**, *48*, 31-42.

13-methyl-13,13a-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-8(6H)-one (64)



1-Methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (320 mg, 1.15 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dry toluene (10 mL) and 3,4-dihydroisoquinoline (210 mg, 1.18 mmol, 1.02 eq) was added dropwise to the reaction mixture. The mixture was refluxed for 48 h until TLC indicated total consumption of the anhydride. The solvent was removed *in vacuo* yielding 1.55 g of crude compound. Purification was performed by column chromatography (SiO₂, 39 x 3.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 3:1 (1 L) then 2:1 (800 mL), F 72-84) to obtain the title compound as a pale yellow solid (1.04 g, 3.93 mmol, 87%).

Analytical Data:

C₁₇H₁₆N₂O (264.32 g/mol):

R_f = 0.39 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 3:1)

mp = 128.2 – 129.6 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.07 – 8.04 (m, 1H, Ar-H_D-ring), 7.48 – 7.39 (m, 1H, Ar-H_A-ring), 7.42 – 7.37 (m, 1H, Ar-H_A-ring), 7.31 – 7.29 (m, 2H, Ar-H_A-ring and Ar-H_D-ring), 7.23 – 7.21 (m, 1H, Ar-H_D-ring), 7.13 – 7.05 (m, 2H, Ar-H_A-ring and Ar-H_D-ring), 5.76 (s, 1H, NCHN), 4.69 – 4.64 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.28 – 3.21 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.08 – 2.97 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.88 – 2.82 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.59 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 164.39 (s, C=O), 150.55 (s, C_{quart.}), 137.15 (s, C_{quart.}), 133.20 (s, Ar-C_A-ring), 132.49 (s, C_{quart.}), 128.99 (s, Ar-C_D-ring), 128.84 (s, Ar-C_A-ring), 128.51 (s, Ar-C_D-ring), 128.06 (s, Ar-C_A-ring or Ar-C_D-ring), 127.04 (s, Ar-C_A-ring or Ar-C_D-ring), 122.35 (s, Ar-C_A-ring or Ar-C_D-ring), 122.06 (s, C_{quart.}), 119.87 (s, Ar-C_A-ring or Ar-C_D-ring), 72.06 (s, NCHN), 39.36 (s, NCH₂CH₂), 36.45 (s, CH₃), 28.62 (s, NCH₂CH₂), ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 2865w, 1649s, 1601m, 1465m, 1451m, 1418m, 1402m, 1364w, 1341m, 1302m, 1285m, 1240w, 1167m, 1144m, 1119m, 1076m, 1051w, 1031m, 955m, 928m, 905w, 876w, 858w, 807w, 796w, 781s, 761s, 702s, 661w, 651w cm⁻¹.

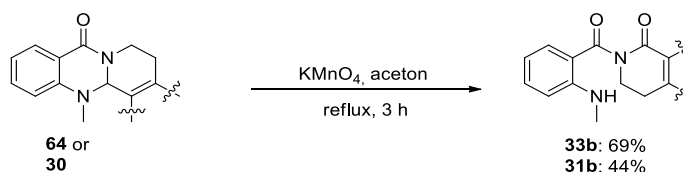
HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.870 min, purity >99.99%.

Mass: calc. for $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{17}N_2O$) requires m/z : 265.13; found: 265.10.

Spectral data is in accordance with literature data:

Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective tri- and tetracyclic BChE inhibitors releasing reversible inhibitors upon carbamate transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914-919.

9.7 Oxidation of evodiamine and benz-evodiamine



Benz-evodiamine **64** or evodiamine **30**, respectively, were dissolved in acetone and KMnO₄ (2.0 eq. for evodiamine and 1.5 eq. for benz-evodiamine) was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at 60 °C for 3 h. Precipitated MnO₂ was filtered off and the remaining solution was concentrated *in vacuo*. For benz-evodiamine oxidation a yellow oil was obtained. From this the benz-DHED crystallized upon standing at rt over night. The formed crystals of **33b** were washed with petroleum ether/diethyl ether 2:1 three times to obtain the product. For evodiamine oxidation an orange solid was formed which was purified by the addition of MeOH and the crystals were filtered off. Extraction with basified water and CH₂Cl₂ yielded the free base **31b**.

31b by oxidative preparation:

The reaction was carried out with evodiamine **30** (194 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq.), KMnO₄ (200 mg, 1.27 mmol, 2.0 eq.) and acetone (10 mL). An orange solid was obtained (88.7 mg, 0.28 mmol, 44%).

Analytical Data:

C₁₉H₁₇N₃O₂ (319.36 g/mol):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 9.57 (s, 1H, NH_{indole}), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.44 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.35 (m, 1H, Ar-*H*), 7.32 – 7.27 (m, 1H, Ar-*H*), 7.21 – 7.16 (m, 1H, Ar-*H*), 7.16 – 7.10 (m, 1H, Ar-*H*), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.54 – 6.50 (m, 1H, Ar-*H*), 4.21 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.22 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.96 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, CH₃) ppm. (NH_{indole} not observed)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 175.91 (s, C=O), 162.07 (s, C=O), 151.14 (s, C_{quart.}), 151.00 (s, C_{quart.}), 138.52 (s, C_{quart.}), 134.67 (s, Ar-C), 132.48 (s, Ar-C), 126.35 (s, Ar-C), 125.01 (s, C_{quart.}), 122.92 (s, C_{quart.}), 120.83 (s, Ar-C), 120.00 (s, Ar-C), 115.94 (s, C_{quart.}), 114.72 (s, Ar-C), 113.06 (s, Ar-C), 111.28 (s, Ar-C), 47.58 (s, NCH₂CH₂), 29.93 (s, CH₃), 21.35 (s, NCH₂CH₂) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 4.581 min, purity = 96.47%.

Mass: calc. for [M]⁺ (C₁₉H₁₆N₃O) requires *m/z*: 302.13; found: 302.10.

33b by oxidative preparation:

The reaction was carried out with benz-evodiamine (190 mg, 0.72 mmol, 1.0 eq), KMnO₄ (170 mg, 1.07 mmol, 1.5 eq) and acetone (10 mL). A yellow solid was obtained (140 mg, 0.49 mmol, 69%).

Analytical Data:

C₁₇H₁₆N₂O₂ (280.32 g/mol):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.13 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.54 – 7.50 (m, 1H, Ar-*H*), 7.42 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.35 (m, 2H, Ar-*H*), 7.31 – 7.28 (m, 2H, Ar-*H*), 6.73 (dd, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.54 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 4.00 (dd, *J* = 6.8, 5.8 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.18 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.94 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 176.62 (s, C=O), 165.53 (s, C=O), 151.38 (s, C_{quart.}), 139.93 (s, C_{quart.}), 134.88 (s, Ar-C_{A-ring}), 133.33 (s, Ar-C_{D-ring}), 132.64 (s, Ar-C_{D-ring}), 129.78 (s, C(NH)-CH_{A-ring}), 128.70 (s, C_{quart.}), 127.64 (s, Ar-C_{D-ring}), 127.45 (s, Ar-C_{A-ring}), 115.22 (s, C_{quart.}), 114.66 (s, Ar-C_{D-ring}), 111.42 (s, Ar-C_{A-ring}), 45.12 (s, NCH₂CH₂), 29.84 (s, CH₃), 28.67 (s, NCH₂CH₂) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (10-95%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 4.647 min, purity = 94.91%.

Mass: calc. for [M]⁺ (C₁₇H₁₅N₂O) requires *m/z*: 263.12; found: 263.10.

Spectral data is in accordance with **31b** and **33b** prepared by the fusion of the corresponding lactame and anthranilic ester.

9.8 Stability tests of DHED and benz-DHED

For stability tests compounds **31b** and **33b** (15 μmol) were dissolved in dry toluene (3.0 mL) and the reagent (10.0 eq HCl, 10.0 eq KOH or 10.0 eq water) was added. For the DABCO experiment, benz-DHED **33b** and 13.0 eq diazabicyclooctane (DABCO) were dissolved in toluene and after 10 min of stirring 10.0 eq HCl were added.

The reaction mixture was heated to 115 °C oil bath temperature for 2 h. The products were obtained through solvent removal. Only for the reaction where KOH was used as a reagent an extraction protocol (acidified water (pH = 5, 10 mL) and CH_2Cl_2 (3 x 10 mL)) was performed. Reaction products were analyzed by LCMS as fast and simple detection method and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy.

33b in toluene shows the same spectral data as compound **33b**.

Yellow solid, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 8.13 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.51 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.42 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.35 (m, 2H, Ar-*H*), 7.29 (ddd, J = 7.6, 1.3, 0.7 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.73 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.54 (ddd, J = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 4.00 (dd, J = 6.8, 5.8 Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.18 (t, J = 6.2 Hz, 2H, NCH_2CH_2), 2.93 (s, 3H, CH_3) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 2.743 min, purity = 89.82%.

Mass: calc. for $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$) requires m/z : 263.12; found: 263.15.

33b in toluene and 10.0 eq water shows the same spectral data as compound **33b**.

Yellow solid, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 8.12 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.52 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.42 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.39 – 7.35 (m, 2H, Ar-*H*), 7.31 – 7.27 (m, 2H, Ar-*H* and NH), 6.73 (dd, J = 8.6, 1.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.54 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-*H*), 4.01 – 3.98 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.18 (t, J = 6.3 Hz, 2H, NCH_2CH_2), 2.94 (s, 3H, CH_3) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 2.737 min, purity = 89.16%.

Mass: calc. for $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$) requires m/z : 263.12; found: 263.10.

33b in toluene and 10.0 eq HCl shows the same spectral data as compound **46**.

Colorless solid, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.55 – 8.48 (m, 1H, Ar-H), 8.37 – 8.28 (m, 1H, Ar-H), 7.82 – 7.71 (m, 2H, Ar-H), 7.53 – 7.42 (m, 3H, Ar-H), 7.30 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 4.50 – 4.37 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH₂CH₂) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (25 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 7.638 min, purity = 98.86%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₆H₁₃N₂O) requires *m/z*: 249.10; found: 249.15.

33b in toluene and 10.0 eq KOH shows the same spectral data as compound **37** and *N*-methyl anthranilic acid **60**.

Yellow oil, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.12 – 8.04 (m, 1H, Ar-H, **37**), 7.98 (ddd, *J* = 8.0, 1.8, 0.4 Hz, 1H, Ar-H, **60**), 7.48 – 7.44 (m, 1H, Ar-H, **37**), 7.44 – 7.40 (m, 1H, Ar-H, **60**), 7.40 – 7.33 (m, 1H, Ar-H, **37**), 7.23 (ddd, *J* = 7.6, 1.4, 0.7 Hz, 1H, Ar-H, **37**), 6.86 (brs, 1H, NH, **37**), 6.72 – 6.65 (m, 1H, Ar-H, **60**), 6.62 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-H, **60**), 3.61 – 3.57 (m, 2H, NCH₂CH₂, **8**), 3.01 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂, **37**), 2.93 (s, 3H, N-CH₃, **60**) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 6.196 min / 8.087 min, AUC = 35.84% / 56.45%.

Mass: calc. for [**37**+H]⁺ (C₉H₁₀NO) requires *m/z*: 148.08; found: 148.10; calc. for [**60**+H]⁺ (C₈H₁₀NO₂) requires *m/z*: 152.07; found 152.05.

33b in toluene with 13.0 eq DABCO and 10.0 eq HCl showed a mixture of benz-DHED **33b** and benz-rutaecarpine **46**.

Yellow solid, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 8.50 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, Ar-H, **17**), 8.33 – 8.31 (m, 1H, Ar-H, **46**), 8.12 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, Ar-H, **33b**), 7.84 – 7.69 (m, 2H, Ar-H, **46**), 7.54 – 7.41 (m, 5H, Ar-H, **46**, **33b**), 7.39 – 7.34 (m, 2H, Ar-H, **33b**), 7.32 – 7.27 (m, 2H, Ar-H, **46**, **33b**), 6.74 – 6.72 (m, 1H, Ar-H, **33b**), 6.56 – 6.52 (m, 1H, Ar-H, **33b**), 4.48 – 4.37 (m, 2H, NCH₂CH₂, **46**), 4.01 – 3.98 (m, 2H, NCH₂CH₂, **33b**), 3.18 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, NCH₂CH₂, **46**), 3.11 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂, **33b**), 2.93 (s, 3H, CH₃, **33b**) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 2.633 min / 10.202 min, AUC = 32.34% / 63.10%.

Mass: calc. for [**33a**]⁺ (C₁₇H₁₅N₂O) requires *m/z*: 263.12; found: 263.15; calc. for [**46**+H]⁺ (C₁₆H₁₃N₂O) requires *m/z*: 249.10; found 249.10.

31b in toluene shows the same spectral data as compound **31b**.

Orange solid, **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 9.37 (s, 1H, NH), 7.68 – 7.61 (m, 1H, Ar-H), 7.43 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.39 – 7.34 (m, 1H, Ar-H), 7.34 – 7.29 (m, 1H, Ar-H), 7.23 – 7.14 (m, 3H, Ar-H), 6.77 (dd, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.53 (ddd, *J* = 8.0, 7.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 4.21 (dd, *J* = 6.8, 6.1 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.22 (dd, *J* = 6.8, 6.1 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.95 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, CH₃) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 4.620 min, purity = 83.32%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₉H₁₆N₃O) requires *m/z*: 302.13; found: 302.10.

31b in toluene and 10.0 eq water shows the same spectral data as compound **31b**.

Orange solid, **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 9.29 (s, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.39 – 7.33 (m, 1H, Ar-H), 7.33 – 7.30 (m, 1H, Ar-H), 7.24 – 7.21 (m, 2H, Ar-H), 7.20 – 7.16 (m, 1H, Ar-H), 6.80 – 6.73 (m, 1H, Ar-H), 6.52 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.25 – 4.15 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.22 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.95 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, CH₃) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 4.592 min, purity = 83.84%.

Mass: calc. for [M]⁺ (C₁₉H₁₆N₃O) requires *m/z*: 302.13; found: 302.10.

31b in toluene and 10.0 eq HCl shows the same spectral data as compound **31a**.

Yellow solid, **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 12.72 (s, 1H, NH), 8.35 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.23 – 8.06 (m, 2H, Ar-H), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 – 7.79 (m, 1H, Ar-H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (ddd, *J* = 8.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 4.51 – 4.43 (m, 2H, NCH₂CH₂), 4.40 (s, 3H, CH₃), 3.34 – 3.39 (m, 2H, NCH₂CH₂ only seen in MeOD-*d*₄) ppm.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 8.44 (ddd, *J* = 8.0, 1.5, 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 – 8.03 (m, 2H, Ar-H), 7.90 – 7.83 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (ddd, *J* = 8.0, 6.8, 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 – 7.64 (m, 1H, Ar-H), 7.55 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 4.66 – 4.55 (m, 2H, NCH₂CH₂), 4.45 (s, 3H, CH₃), 3.49 – 3.37 (m, 2H, NCH₂CH₂) ppm. (NH not seen in MeOD-*d*₄)

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 4.567 min, purity = 96.08%.

Mass: calc. for [M]⁺ (C₁₉H₁₆N₃O) requires *m/z*: 302.13; found: 302.15.

31b in toluene and 10.0 eq KOH shows the same spectral data as compound **40** and *N*-methyl anthranilic acid **60**:

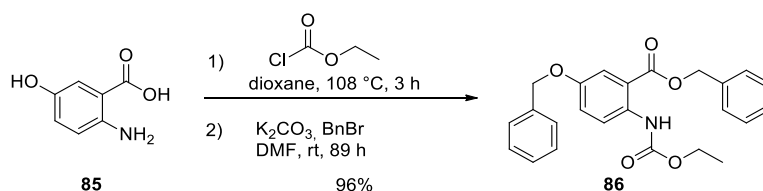
Yellow oil, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 9.55 (s, 1H, NH, **40**), 7.98 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, Ar-H, **60**), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H, **40**), 7.46 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H, **40**), 7.44 – 7.36 (m, 1H, Ar-H, **60**), 7.32 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.1 Hz, 1H, Ar-H, **40**), 7.16 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H, Ar-H, **40**), 6.69 – 6.67 (m, 1H, Ar-H, **60**), 6.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH, **40**), 3.74 (td, *J* = 7.0, 2.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂, **40**), 3.08 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, NCH₂CH₂, **40**), 2.94 (s, 3H, N-CH₃, **60**) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, *t_R* = 7.831 min / 8.023 min, AUC = 40.43% / 44.72%.

Mass: calc. for [**40**+H]⁺ (C₁₁H₁₁N₂O) requires *m/z*: 187.09; found: 187.10; calc. for [**60**+H]⁺ (C₈H₁₀NO₂) requires *m/z*: 152.07; found 152.10.

9.9 Syntheses to benzyloxy substituted anthranilic acid derivative

Benzyl 5-(benzyloxy)-2-((ethoxycarbonyl)amino)benzoate (**86**)



2-Amino-5-hydroxybenzoic acid (9.04 g, 59.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dry dioxane (130 mL) and ethyl carbonochloridate (8.4 mL, 9.61 g, 89.0 mmol, 1.5 eq) was added. The mixture was heated under argon atmosphere at 108 °C for 2 h. TLC showed remaining starting material, therefore ethyl carbonochloridate (2.5 mL, 2.85 g, 26.3 mmol, 0.5 eq) was added and the mixture was heated for 1 h. TLC indicated total conversion of the starting material. Evaporation of the solvent yielded a solid which was dissolved in dry DMF (60 mL). Freshly crushed K₂CO₃ (45 g, 323 mmol, 5.5 eq) and benzyl bromide (23.0 mL, 32.5 g, 190 mmol, 3.2 eq) were added and the mixture was stirred under argon atmosphere at rt over night. The mixture was poured on ice (400 g) and was stirred until the ice was melted. The solid was filtered off and dried in the desiccator. A beige solid was obtained as product (23.0 g, 56.8 mmol, 96%).

Analytical Data:

$C_{24}H_{23}NO_5$ (405.44 g/mol):

$R_f = 0.63$ (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 5:1)

mp = 62.7 – 63.4 °C

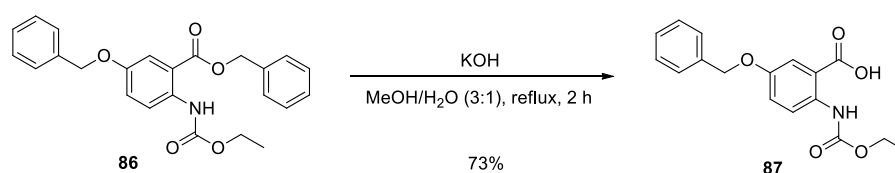
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ -*d*, 300 K): δ = 10.16 (s, 1H, NH), 8.37 (d, J = 9.2 Hz, 1H, Ar-4-*H*), 7.63 (s, 1H, Ar-6-*H*), 7.45 – 7.29 (m, 10H, BnAr-*H*), 7.19 (dd, J = 9.3, 3.1 Hz, 1H, Ar-3-*H*), 5.35 (s, 2H, (CO)OCH₂), 5.05 (s, 2H, OCH₂Ar), 4.22 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$ -*d*, 300 K): δ = 167.55 (s, C=O), 153.95 (s, C_{quart.}), 153.00 (s, C=O), 136.77 (s, C_{quart.}), 136.03 (s, C_{quart.}), 135.61 (s, C_{quart.}), 128.82 (s, 2C, BnAr-C), 128.75 (s, 2C, BnAr-C), 128.60 (s, BnAr-C), 128.33 (s, 2C, BnAr-C), 128.21 (s, BnAr-C), 127.70 (s, 2C, BnAr-C), 122.11 (s, Ar-C), 120.56 (s, Ar-C), 116.34 (s, Ar-C), 115.54 (C_{quart.}), 70.69 (s, OCH₂Ar), 67.13 (s, (CO)OCH₂), 61.21 (s, OCH₂), 14.69 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3290m, 3087w, 3059w, 3034w, 2981w, 2358w, 1814w, 1725s, 1681s, 1615m, 1593m, 1530s, 1469w, 1446m, 1421m, 1387m, 1301m, 1278m, 1236s, 1202s, 1086s, 1058s, 1021s, 990m, 954m, 893m, 877m, 863w, 834m, 824m, 786m, 768w, 729s, 690s cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Roos, G. H. P.; Dastlik, K. A. Approach to the synthesis of (+)-ifforesine. Model studies directed at the tetracyclic framework. *Heterocycles* **2003**, *60*, 2023-2044.

5-(Benzyloxy)-2-((ethoxycarbonyl)amino)benzoic acid (87)

Benzyloxy)-2-((ethoxycarbonyl)amino)benzoate (5.59 g, 13.8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (75 mL). KOH (5.60 g, 99.8 mmol, 7.2 eq) was predissolved in water (25 mL) and added to the methanol mixture. The reaction mixture was refluxed for 2 h at 95 °C. The mixture was cooled with an ice bath upon addition of 2 M aq. HCl solution (50 mL). A precipitate was formed and filtered off, washed twice with water and Et₂O and dried in a desiccator. The title compound was obtained as a colorless solid (2.64 g, 8.37 mmol, 60%).

Analytical Data:

C₁₇H₁₇NO₅ (315.32 g/mol):

R_f = 0.00 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 10:1)

mp = 158.0 – 159.5 °C

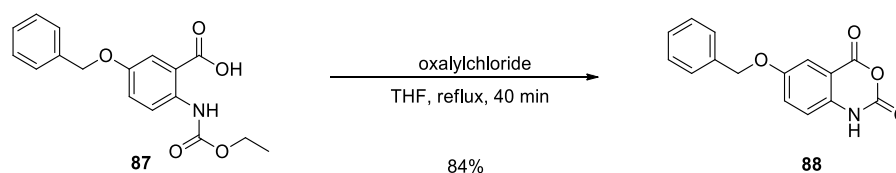
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 13.80 (brs, 1H, OH), 10.49 – 10.45 (m, 1H, Ar-H), 8.27 (dd, *J* = 9.2, 6.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 – 7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.54 – 7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.48 – 7.38 (m, 2H, Ar-H), 5.23 (s, 2H, OCH₂), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, OCH₂CH₃), 3.80 (s, 1H, NH), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃) ppm.

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 170.42 (s, C=O), 154.65 (s, C=O_{carbamate}), 154.19 (s, C_{quart.}), 153.94 (s, C_{quart.}), 153.87 (s, C_{quart.}), 138.08 (s, C_{quart.}), 129.64 (s, Ar-C), 129.07 (s, Ar-C), 128.87 (s, 2C, Ar-C), 122.72 (s, Ar-C), 121.32 (s, Ar-C), 117.18 (s, Ar-C), 70.81 (OCH₂Ar), 61.87 (s, Ar-C), 53.25 (s, OCH₂), 15.64 (s, CH₃) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3334w, 3122-2540w_{broad}, 1726s, 1670s, 1616m, 1587m, 1533s, 1402m, 1248s, 1215s, 1090m, 1059m, 1045m, 926w, 883m, 835m, 768m, 735s, 679m cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Roos, G. H. P.; Dastlik, K. A. Approach to the synthesis of (+)-ifforestine. Model studies directed at the tetracyclic framework. *Heterocycles* **2003**, *60*, 2023-2044.

6-(Benzyloxy)-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (88)

5-(Benzyloxy)-2-((ethoxycarbonyl)amino)benzoic acid (2.40 g, 7.61 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dry THF (40 mL) and oxalylchloride (5.20 mL, 7.72 g, 60.8 mmol, 8.0 eq) was added. The reaction mixture was refluxed at 85 °C for 40 min. Solvent evaporation yielded an off-white solid which was washed with Et₂O (20 mL). The crystals were filtered off and dried in the desiccator. The title compound was obtained as white cotton like crystals (1.72 g, 6.39 mmol, 84%).

Analytical Data:

C₁₅H₁₁NO₄ (269.25 g/mol):

R_f = 0.56 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 224.4 – 225.7 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 11.60 (s, 1H, NH), 7.49 – 7.31 (m, 7H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 5.17 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, OCH₂Ar) ppm.

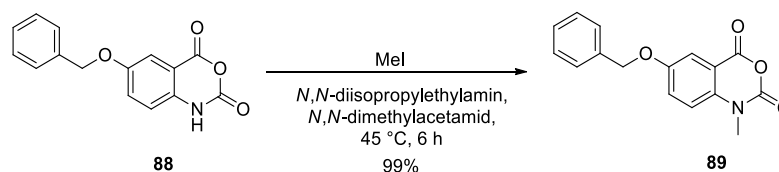
¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 159.78 (s, C=O), 154.13 (s, C=O), 146.89 (s, C_{quart.}), 136.54 (s, C_{quart.}), 135.62 (s, C_{quart.}), 128.44 (s, 2C, Ar-C), 127.92 (s, Ar-C), 127.65 (s, 2C, Ar-C), 126.34 (s, Ar-C), 116.93 (s, Ar-C), 111.16 (s, Ar-C), 110.64 (s, C_{quart.}), 69.80 (s, CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3235w, 3181w, 2359w, 1778m, 1746s, 1692s, 1631w, 1516m, 1454w, 1426m, 1389m, 1344s, 1276m, 1260s, 1233s, 1160m, 1115w, 1047s, 1025s, 1008m, 932m, 864w, 845s, 748s, 731m, 693s, 677s cm⁻¹.

Spectral data is in accordance with literature data:

Roos, G. H. P.; Dastlik, K. A. Approach to the synthesis of (+)-ifforestine. Model studies directed at the tetracyclic framework. *Heterocycles* **2003**, *60*, 2023-2044.

6-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (89)



The reaction was carried out according to **method B** with 6-(benzyloxy)-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (1.71 g, 6.36 mmol, 1.0 eq), DMAc (10 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (2.20 mL, 1.67 g, 12.6 mmol, 2.0 eq) and methyl iodide (800 μL, 1.83 g, 12.9 mmol, 2.0 eq). The reaction time was 6 h. The product was obtained as off-white solid (1.79 g, 6.32 mmol, 99%).

Analytical Data:

C₁₆H₁₃NO₄ (283.28 g/mol):

R_f = 0.47 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 168.5 – 169.9 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K): δ = 7.59 – 7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.50 – 7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.42 – 7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.36 – 7.28 (m, 1H, Ar-H), 5.21 (s, 2H, CH₂), 3.44 (s, 3H, CH₃) ppm.

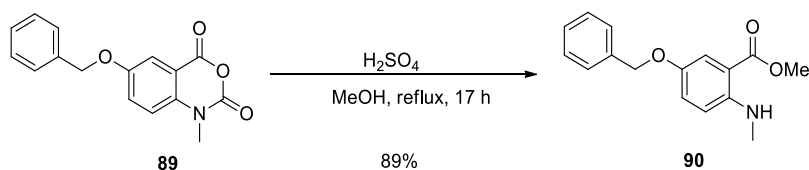
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 158.83 (s, C=O), 154.10 (s, C=O), 147.52 (s, $C_{\text{quart.}}$), 136.49 (s, $C_{\text{quart.}}$), 136.46 (s, $C_{\text{quart.}}$), 128.45 (s, 2C, Ar-C), 127.93 (s, Ar-C), 127.63 (s, 2C, Ar-C), 125.68 (s, Ar-C), 116.58 (s, Ar-C), 112.16 (s, Ar-C), 112.15 (s, $C_{\text{quart.}}$), 69.80 (s, CH_2), 31.73 (s, CH_3) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3291w, 3078w, 3037w, 2980w, 2878w, 2684w, 1760s, 1722s, 1619m, 1591m, 1506s, 1454m, 1425m, 1385m, 1355w, 1327m, 1305m, 1284s, 1245m, 1200m, 1121w, 1066m, 1040m, 1009s, 963m, 926w, 908w, 892m, 841s, 785m, 768m, 738s, 711m, 696s, 675m cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Huang, G.; Kling, B.; Darras, F. H.; Heilmann, J.; Decker, M. Identification of a neuro-protective and selective Butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 15-21.

Methyl 5-(benzyloxy)-2-(methylamino)benzoate (90)



The reaction was carried out according to **method C-2** with 6-(Benzyloxy)-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (398 mg, 1.41 mmol, 1.0 eq), MeOH (15 mL) and 5 drops of conc. H_2SO_4 . The mixture was refluxed for 17 h. Then the solvent was evaporated and CH_2Cl_2 and water (20 mL each) were added. The product was extracted from CH_2Cl_2 (2 x 20 mL), washed with brine (25 mL) and dried over Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent yielded a yellow solid (340 mg, 1.25 mmol, 89%).

Analytical Data:

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (271.31 g/mol):

R_f = 0.85 (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

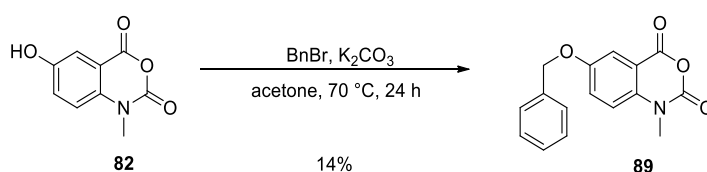
mp = 91.2 – 93 °C

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 - d , 300 K): δ = 7.54 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.48 – 7.28 (m, 6H, Ar-H, NH), 7.13 (dd, J = 9.1, 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.63 (d, J = 9.1 Hz, 1H, Ar-H), 5.00 (s, 2H, CH_2), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.89 (d, J = 2.1 Hz, 3H, NCH_3) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 168.83 (s, C=O), 148.65 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 147.41 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 137.44 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 128.65 (s, 2C, Ar-C), 128.02 (s, Ar-C), 127.74 (s, 2C, Ar-C), 124.40 (s, Ar-C), 116.34 (s, Ar-C), 112.50 (s, Ar-C), 110.05 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 71.32 (s, CH_2), 51.69 (s, OCH_3), 30.29 (s, NCH_3) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3386w, 2909w, 2359w, 1676s, 1577m, 1515s, 1439m, 1408m, 1383m, 1347w, 1309w, 1261w, 1222s, 1206s, 1168s, 1130w, 1087m, 1055w, 1013s, 926w, 871w, 818m, 785m, 741m, 693m cm^{-1} .

6-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (89)



6-Hydroxy-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (100 mg, 0.51 mmol, 1.0 eq) was dissolved in acetone (12 mL), K_2CO_3 (199 mg, 1.30 mmol, 2.5 eq) and benzyl bromide (93 μL , 134 mg, 0.78 mmol, 1.5 eq) were added at rt. The mixture was heated at 70 $^\circ\text{C}$ for 24 h. The solvent was evaporated, water (20 mL) was added and the product was extracted from ethyl acetate (4 x 40 mL). Combined organic phases were washed with brine and dried over Na_2SO_4 . Solvent evaporation yielded 157 mg crude product. This was purified by column chromatography (SiO_2 , 27 x 2.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 40:1 (900 mL) then 5:1, F 65-80) to yield the title compound as yellowish oil (19.8 mg, 0.07 mmol, 14%).

Analytical Data:

$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (283.28 g/mol):

R_f = 0.37 (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 40:1)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 7.52 – 7.26 (m, 7H, Ar-*H*), 7.25 – 7.14 (m, 1H, Ar-*H*), 5.33 (s, 2H, CH_2), 2.06 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): 171.37 (s, C=O), 167.70 (s, C=O), 138.47 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 128.57 (s, BnAr-C), 128.45 (s, BnAr-C), 128.40 (s, BnAr-C), 128.23 (s, BnAr-C), 127.72 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 127.53 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 126.97 (s, BnAr-C), 126.47 (s, $\text{C}_{\text{quart.}}$), 122.14 (s, Ar-C), 119.29 (s, Ar-C), 117.16 (s, Ar-C), 66.93 (s, CH_2), 21.06 (s, CH_3) ppm.

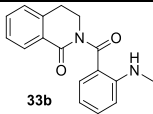
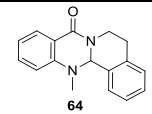
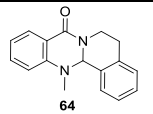
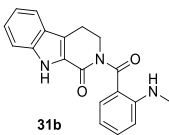
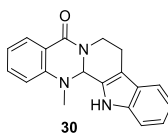
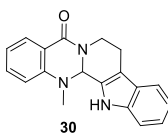
IR: ($\tilde{\nu}$) = 3393m, 3037w, 2923w, 2794w, 1761m, 1686s, 1617m, 1588m, 1505s, 1453s, 1384w, 1287s, 1199s, 1168s, 1121m, 1066m, 1030m, 1011m, 962m, 907m, 892m, 841m, 815m, 785m, 768m, 736s, 695s, 675m cm^{-1} .

Spectral data is in accordance with literature data:

Roos, G. H. P.; Dastlik, K. A. Approach to the synthesis of (+)-ifforestine. Model studies directed at the tetracyclic framework. *Heterocycles* **2003**, *60*, 2023-2044.

9.10 Hydrogenations of DHED and benz-DHED

To the dissolved alkaloid (usually 15 μmol) in MeOH (2.0 mL) a solution of NaOH (10.0 eq) in MeOH (1.0 mL) was added. Under Ar atmosphere 10% Pd/C was added, the flask was flushed with H₂ three times and stirred at rt for 3 h. The catalyst was filtered through a paper filter and the solvent was removed *in vacuo* to obtain the target compound. The hydrogenations were also tested without the addition of base, which yielded evodiamine and benz-evodiamine, respectively.

Starting Material	Product	Product
	-	NaOH (10.0 eq)
 33b	 64	 64
 31b	 30	 30

The product of the hydrogenation of **33b** yielded a colorless solid and showed the same spectroscopic data as compound **64** (benz-evodiamine).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.08 – 7.99 (m, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.34 (m, 2H, Ar-*H*), 7.34 – 7.28 (m, 2H, Ar-*H*), 7.24 – 7.17 (m, 1H, Ar-*H*), 7.15 – 6.95 (m, 2H, Ar-*H*), 5.75 (s, 1H, NCHN), 4.68 – 4.65 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.29 – 3.22 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.09 – 2.92 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.90 – 2.80 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.59 (s, 3H, CH₃) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.936 min, purity = 37.24%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₇H₁₇N₂O) requires m/z : 265.13; found: 265.10.

The product of the hydrogenation of **33b** without addition of base yielded a colorless solid and showed the same spectroscopic data as compound **64** (benz-evodiamine).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.08 – 8.05 (m, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.44 (m, 1H, Ar-*H*), 7.43 – 7.40 (m, 1H, Ar-*H*), 7.33 – 7.29 (m, 2H, Ar-*H*), 7.24 – 7.22 (m, 1H, Ar-*H*), 7.13 – 7.10 (m, 2H, Ar-*H*), 5.78 (s, 1H, NCHN), 4.70 – 4.65 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.29 – 3.22 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.07 – 2.99 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.89 – 2.83 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.59 (s, 3H, CH₃) ppm.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.825 min, purity = 43.56%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₇H₁₇N₂O) requires m/z : 265.13; found: 265.15.

The product of the hydrogenation of **31b** yielded a yellow solid and showed the same spectroscopic data as compound **30** (evodiamine).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.13 – 8.11 (m, 1H, Ar-*H*), 7.61– 7.59 (m, 1H, Ar-*H*), 7.52 – 7.46 (m, 2H, Ar-*H*), 7.43 – 7.40 (m, 1H, Ar-*H*), 7.24 – 7.12 (m, 3H, Ar-*H*), 5.92 (s, 1H, C_{tert.}-*H*), 4.90 – 4.85 (m, 1H, NCHHCH₂), 4.15 – 4.10 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.33 – 3.26 (m, 1H, NCH₂CHH), 3.01 – 2.93 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.51 (s, 3H, CH₃) ppm. (NH_{indole} not observed)

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 8.199 min, purity = 95.6%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₉H₁₈N₃O) requires m/z : 304.14; found: 304.15.

The product of the hydrogenation of **31b** without the addition of base yielded a yellowish solid and showed the same spectroscopic data as compound **30** (evodiamine).

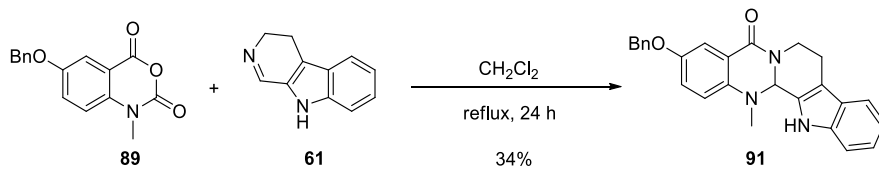
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*, 300 K): δ = 8.08 – 8.05 (m, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.44 (m, 1H, Ar-*H*), 7.43 – 7.41 (m, 1H, Ar-*H*), 7.33 – 7.30 (m, 2H, Ar-*H*), 7.24 – 7.22 (m, 1H, Ar-*H*), 7.13 – 7.09 (m, 2H, Ar-*H*), 5.78 (s, 1H, C_{tert.}-*H*), 4.70 – 4.65 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.29 – 3.22 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.07 – 2.99 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.89 – 2.83 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.59 (s, 3H, CH₃) ppm. (NH missing)

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 10.015 min, purity = 67.60% (27.20% is starting material).

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₉H₁₈N₃O) requires m/z : 304.14; found: 304.10.

9.11 Syntheses of hydroxy-evodiamine and hydroxy-benz-evodiamine

3-(Benzyloxy)-14-methyl-7,8,13b,14-tetrahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-*b*]quinazolin-5(13*H*)-one (91)



6-(Benzyloxy)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4-dione (600 mg, 2.12 mmol, 1.0 eq) and 4,9-dihydro-3*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (**61**) (368 mg, 2.16 mmol, 1.02 eq) were dissolved in dry CH_2Cl_2 (20 mL) and refluxed for 24 h. Removal of the solvent *in vacuo* yielded the crude compound (895 mg). Purification was performed by column chromatography (SiO_2 , 42 x 3.5cm, petroleum ether/ethyl acetate 2:1, F 34-46) to obtain a yellow solid (292 mg, 0.71 mmol, 34%).

Analytical Data:

$\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ (409.48 g/mol):

R_f = 0.66 (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 1:1)

mp = 90 – 91.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 8.35 (s, 1H, NH), 7.72 – 7.68 (m, 1H, Ar-*H*), 7.59 (dt, J = 7.9, 0.9 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.50 – 7.36 (m, 5H, Ar-*H*), 7.36 – 7.30 (m, 1H, Ar-*H*), 7.30 – 7.23 (m, 1H, Ar-*H*), 7.21 – 7.11 (m, 3H, Ar-*H*), 5.90 (s, 1H, NCH), 5.21 – 5.01 (m, 2H, OCH₂), 4.91 – 4.85 (m, 1H, NCH₂), 3.34 – 3.26 (m, 1H, NCH₂), 3.07 – 2.85 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (101 MHz, CDCl_3 -*d*, 300 K): δ = 164.61 (s, C=O), 155.88 (s, $C_{\text{quart.}}$), 144.63 (s, $C_{\text{quart.}}$), 136.91 (s, $C_{\text{quart.}}$), 136.81 (s, $C_{\text{quart.}}$), 128.76 (s, 2C, Ar-C), 128.22 (s, Ar-C), 127.85 (s, $C_{\text{quart.}}$), 127.76 (s, 2C, Ar-C), 126.35 (s, $C_{\text{quart.}}$), 125.10 (s, $C_{\text{quart.}}$), 124.71 (s, Ar-C), 123.24 (s, Ar-C), 122.10 (s, Ar-C), 120.17 (s, Ar-C), 119.05 (s, Ar-C), 113.61 (s, $C_{\text{quart.}}$), 112.31 (s, Ar-C), 111.54 (s, Ar-C), 70.63 (s, OCH₂), 69.31 (s, NCH), 39.61 (s, NCH₂CH₂), 37.52 (s, CH₃), 20.31 (s, NCH₂CH₂) ppm.

IR : ($\tilde{\nu}$) = 3224w, 2921w, 2853w, 1631s, 1607s, 1490s, 1444s, 1421m, 1375m, 1350m, 1321m, 1306m, 1262s, 1224s, 1158m, 1129m, 1109m, 1074m, 1016s, 930m, 861w, 839w, 822w, 798w, 786w, 755m, 726s, 711s, 696s cm^{-1} .

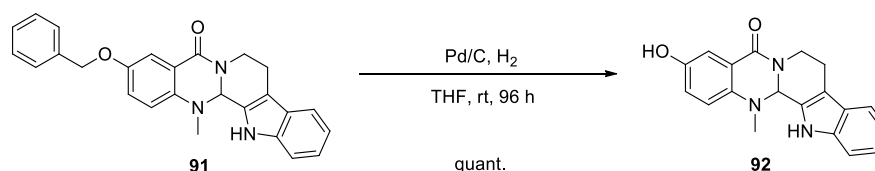
HPLC : Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-90%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 12.235 min, purity = 93.64%.

Mass : calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$) requires m/z : 410.19; found: 410.20.

Spectral data is in accordance with literature data:

Huang, G.; Kling, B.; Darras, F. H.; Heilmann, J.; Decker, M. Identification of a neuro-protective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 15-21.

10-Hydroxy-13-methyl-13,13a-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-8(6H)-one (92)



3-(Benzyloxy)-14-methyl-7,8,13b,14-tetrahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-b]quinazolin-5(13H)-one (136 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) was dissolved in THF (7.0 mL), Pd/C (23 mg, 10%) was added and the flask was purged with H₂. The reaction was completed after stirring at ambient temperature for 96 h. Filtration and solvent removal yielded a yellow solid (105 mg, 0.33 mmol, >99%).

Analytical Data:

C₁₉H₁₇N₃O₂ (319.36 g/mol):

R_f = 0.31 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 7.54 – 7.51 (m, 1H, Ar-H), 7.41 – 7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.19 – 7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.07 – 7.03 (m, 1H, Ar-H), 7.01 – 6.99 (m, 1H, Ar-H), 5.91 (s, 1H, NCHN), 4.80 – 4.74 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.29 – 3.21 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.01 – 2.96 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.94 – 2.82 (m, 1H, NCHHCH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 1H, OH) ppm. (NH_{indole} not observed)

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄, 300 K): δ = 166.59 (s, C=O), 155.39 (s, C_{quart.}), 145.06 (s, C_{quart.}), 139.16 (s, C_{quart.}), 138.72 (s, C_{quart.}), 129.56 (s, C_{quart.}), 127.34 (s, C_{quart.}), 126.11 (s, Ar-C), 125.58 (s, C_{quart.}), 125.54 (s, Ar-C), 123.39 (s, Ar-C), 122.35 (s, Ar-C), 120.24 (s, Ar-C), 119.40 (s, Ar-C), 112.44 (s, Ar-C), 70.70 (s, NCN), 40.71 (s, NCH₂CH₂), 37.27 (s, CH₃), 19.72 (s, NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3993w, 3855w, 3800w, 3745w, 3734w, 3648w, 2921m, 2425s, 2363s, 2340s, 1627m, 1590s, 1569s, 1487s, 1450s, 1421s, 1364w, 1337w, 1306s, 1279s, 1233m, 1217m, 1156w, 1121w, 1026w, 971m, 931w, 894w, 869m, 851w, 833m, 798w, 778w, 740s, 711s cm⁻¹.

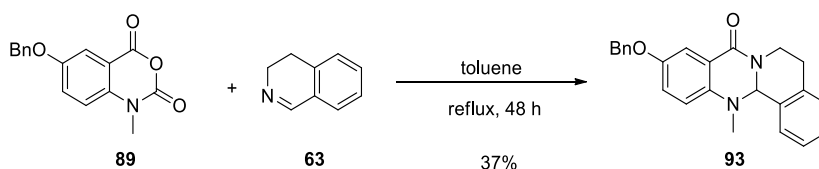
HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.306 min, purity = 90.85%.

Mass: calc. for $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{18}N_3O_2$) requires m/z : 320.14; found: 320.15.

Spectral data is in accordance with literature data:

Huang, G.; Kling, B.; Darras, F. H.; Heilmann, J.; Decker, M. Identification of a neuroprotective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 15-21.

10-(Benzyloxy)-13-methyl-13,13a-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-8(6H)-one (93)



6-(Benzyloxy)-1-methyl-1H-benzo[d][1,3]oxazine-2,4-dione (469 mg, 1.66 mmol, 1.0 eq) and 3,4-dihydroisoquinoline (349 mg, 2.66 mmol, 1.60 eq) were dissolved in dry toluene (15 mL) and refluxed for 48 h. Removal of the solvent *in vacuo* yielded 827 mg of crude compound. Parts of this (440 mg) were purified by column chromatography (SiO_2 , 40 x 3.5 cm, petroleum ether/ethyl acetate 4:1 (600 mL) \rightarrow 3.8:1 (400 mL) \rightarrow 3.5:1 (400 mL) then 3:1, F 26-35) to obtain the title compound as pale yellow oil (113 mg, 0.31 mmol, 37% based on purified amount of crude product).

Analytical Data:

$C_{24}H_{22}N_2O_2$ (370.44 g/mol):

R_f = 0.31 (SiO_2 , petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ -d, 300 K): δ = 7.67 (d, J = 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.50 – 7.44 (m, 3H, Ar-H), 7.39 (ddd, J = 8.0, 6.9, 1.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.33 (t, J = 6.4, 1.7 Hz, 3H, Ar-H), 7.23 (dd, J = 6.7, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (dd, J = 8.8, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 5.30 (s, 1H, NCH), 5.20 – 5.04 (m, 2H, OCH_2), 4.68 – 4.63 (m, 1H, NCH_2CH_2), 3.30 – 3.23 (m, 1H, NCH_2CH_2), 3.03 – 2.95 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.88 – 2.83 (m, 1H, NCH_2CH_2), 2.38 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (101 MHz, $CDCl_3$ -d, 300 K): δ = 164.25 (s, C=O), 155.18 (s, $C_{quart.}$), 145.45 (s, $C_{quart.}$), 137.06 (s, $C_{quart.}$), 137.01 (s, $C_{quart.}$), 132.19 (s, $C_{quart.}$), 128.73 (s, 2C, Ar-C), 128.68 (s,

Ar-C), 128.53 (s, Ar-C), 128.35 (s, Ar-C), 128.14 (s, Ar-C), 127.76 (s, 2C, Ar-C), 127.22 (s, Ar-C), 124.25 (s, $C_{quart.}$), 123.73 (s, Ar-C), 122.18 (s, Ar-C), 112.01 (s, Ar-C), 71.97 (s, OCH₂), 70.64 (s, NCH), 38.98 (s, NCH₂CH₂), 36.42 (s, CH₃), 28.87 (s, NCH₂CH₂) ppm.

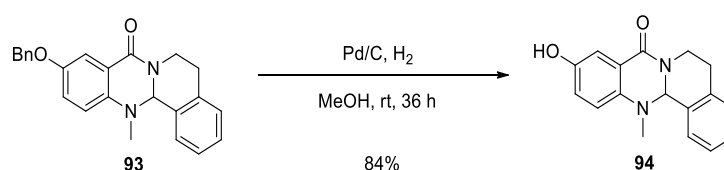
HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 12.439 min, purity= 96.47%.

Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₂₄H₂₃N₂O₂) requires m/z: 371.18; found: 371.05.

Spectral data is in accordance with literature data:

Darras, F. H.; Pockes, S.; Huang, G.; Wehle, S.; Strasser, A.; Wittmann, H.-J., Nimczick, M.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH₃ receptor antagonists. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 225-242.

10-Hydroxy-13-methyl-13,13a-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-8(6H)-one (94)



10-(Benzyloxy)-13-methyl-13,13a-dihydro-5H-isoquinolino[1,2-b]quinazolin-8(6H)-one (113 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (5.0 mL), Pd/C (12 mg, 10%) was added and the flask was purged with H₂. The reaction was completed after stirring at ambient temperature for 36 h. Filtration and removal of the solvent yielded a brownish foam (73 mg, 0.26 mmol, 84%).

Analytical Data:

C₁₇H₁₆N₂O₂ (280.32 g/mol):

R_f = 0.31 (SiO₂, petroleum ether/ethyl acetate 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 7.88 – 7.87 (m, 1H, Ar-H), 7.51 – 7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.37 – 7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.23 – 7.21 (m, 1H, Ar-H), 7.08 – 7.04 (m, 2H, Ar-H), 5.74 (s, 1H, NCHN), 4.67 – 4.62 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.33 – 3.26 (m, 1H, NCHHCH₂), 3.08 – 2.92 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.91 – 2.79 (m, 1H, NCH₂CHH), 2.34 (s, 3H, CH₃) ppm. (OH not seen)

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, CDCl₃-d, 300 K): δ = 164.69 (s, C=O), 153.38 (s, $C_{quart.}$), 144.63 (s, $C_{quart.}$), 136.87 (s, $C_{quart.}$), 131.94 (s, $C_{quart.}$), 128.62 (s, 2C, Ar-C), 128.40 (s, Ar-C), 127.31 (s,

Ar-C), 123.97 (s, $C_{quart.}$), 123.94 (s, Ar-C), 121.80 (s, Ar-C), 114.41 (s, Ar-C), 72.13 (s, NCN), 39.13 (s, NCH₂CH₂), 36.44 (s, CH₃), 28.82 (s, NCH₂CH₂) ppm.

IR: ($\tilde{\nu}$) = 3992w, 3823w, 3733w, 3649w, 3170brw, 2361w, 2318w, 1710w, 1604s, 1494s, 1454s, 1423s, 1336m, 1285m, 1219m, 1137m, 1039w, 950w, 921w, 883w, 830w, 788w, 776w, 730s cm⁻¹.

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 0.1% formic acid, 1.00 mL/min, 20 °C, t_R = 9.158 min, purity = 89.37%.

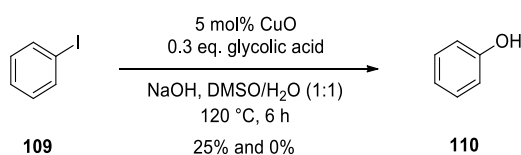
Mass: calc. for [M+H]⁺ (C₁₇H₁₇N₂O₂) requires m/z: 281.13; found: 281.15.

Spectral data is in accordance with literature data:

Darras, F. H.; Pockes, S.; Huang, G.; Wehle, S.; Strasser, A.; Wittmann, H.-J., Nimczick, M.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH₃ receptor antagonists. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 225-242.

9.12 Synthesis of phenol

Phenol (110)



The conversion of iodobenzene to phenol was tested according to a procedure described by Xiao *et al.* Glycolic acid (24.2 mg, 0.32 mmol, 0.3 eq), DMSO (1.5 mL), iodobenzene (110 μ L, 210 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), CuO (4.00 mg, 5 mol%) and a NaOH solution (Sodium-hydroxide (240 mg, 6.00 mmol, 6.0 eq) in water (1.5 ml) were filled in a flask. The mixture was refluxed under Ar atmosphere at 120 °C over night. The orange reaction mixture was cooled to rt, poured into water (20 mL) and the pH-value was adjusted to pH = 1 with 2 M HCl. The water layer was extracted from ethyl acetate (3 x 20 mL). Combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and the removal of solvent yielded an orange oil (236 mg, 0.25 mmol, 25%). This contains still a mixture of iodobenzene and phenol, as seen by LC-MS analysis.

A repetition of this experiment did not yield any product (0%), but led to recovery of starting material.

Xiao, Y.; Xu, Y.; Cheon, H.-S.; Chae, J. Copper(II)-catalyzed hydroxylation of aryl halides using glycolic acid as a ligand. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5804-5809.

Analytical Data:

C₆H₆O (94.11 g/mol):

HPLC: Synergi 4U fusion-RP (15 x 0.46 cm), water/methanol (30-95%), 1.00 mL/min, 20 °C, t_R= 5.535 min (phenol)/9.441 min (iodobenzene), AUC= 37.92% (phenol)/62.08% (iodobenzene).

9.13 UV/Vis measurements

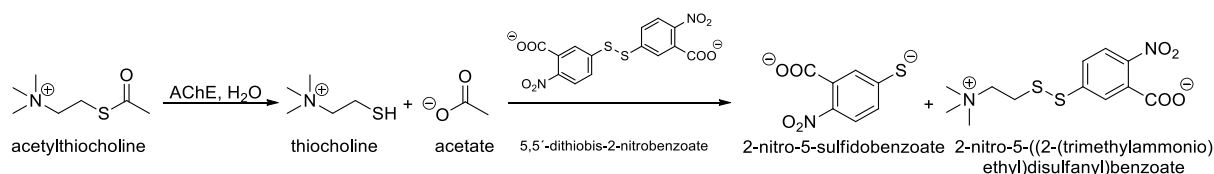
UV/Vis spectra were recorded at room temperature (23 °C) in 1 cm cuvettes on a *Varian Cary 50 Bio UV-Visible* spectrophotometer with 0.5 nm resolution in the range from 200 to 800 nm.

The pH-values were adjusted by titration of 1.0 M H₃PO₄ with 0.3 M NaOH to a pH value ranging from 2 – 10 ± 0.1. A stock solution of the sample was prepared which contained 0.2 mg/mL. In the cuvette 1.0 mL of buffer and 75 µL of stock solution were mixed and measured after 5 min of incubation at rt (23 °C) or 24 h of incubation, respectively. From the measured UV/Vis spectra the blank was subtracted. For blank measurements 1.0 mL of buffer solution was mixed with either 75 µL of water (when the quinazo-liniumsalt was measured), or 75 µL of methanol (for measurements of the ring-open form). All presented curves are the average of three independent measurements. All solutions were prepared with millipore water (Millipak® Express 20 filters purchased from Merck Millipore with a membrane pore size of 0.22 µm).

9.14 IC₅₀-measurements

In the IC₅₀-measurement the residual enzyme hydrolysis activity is measured. This is done by indirectly measuring the concentration change of thiocholine over time. Thiocholine does not possess a chromophore wherefore 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) is added to the assay. The reaction of thiocholine with DTNB yields the disulfide compound 2-

nitro-5-((2-(trimethylammonio)ethyl)dithio)benzoate and 2-nitro-5-sulfidobenzoate. The absorption of the latter compound can be measured at 412 nm. As the stoichiometry is one to one, the concentration of 2-nitro-5-sulfidobenzoate directly corresponds to the concentration of thiocholine which also represents the amount of hydrolysed acetylthiocholine. For determination of BChE inhibition butyrylthiocholine instead of acetylthiocholine was used.



Scheme 9.1 Ellman-assay reaction scheme.

The IC_{50} -measurements were carried out by Edgar Sawatzky at the University of Würzburg according to the following procedure: AChE (E.C.3.1.1.7, from human erythrocytes or electric eel) and BChE (E.C.3.1.1.8, from equine serum) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). DTNB (Ellman's reagent), ATC and BTC iodides were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). The stock solutions of the test compounds were prepared in ethanol with a concentration of $3.33 \cdot 10^{-2}$ M (1 mM in assay) and stepwise diluted with ethanol to a concentration at $3.33 \cdot 10^{-8}$ M (1 nM in assay). For assay buffer preparation, 3.12 g of potassium dihydrogen phosphate were dissolved in 500 mL of water and adjusted with a NaOH-solution (0.2 M) to pH = 8.0. The pH = 7.0 buffer was prepared by titration of 1.0 M H_3PO_4 with 0.3 M NaOH. Enzyme solutions were prepared with buffer to give 2.5 units/mL and stabilized with 2 mg albumin bovine (SERVA, Heidelberg, Germany) per mL of enzyme solution. DTNB (0.396 g) was dissolved in 100 mL of buffer to give a 0.01 M solution (0.3 mM in assay). ATC and BTC solutions were prepared in buffer with a concentration of 0.075 M (452 μ M in assay). The assay was performed at 25 °C: A cuvette containing 1.5 mL of buffer, 50 μ L of the respective enzyme and 50 μ L of DTNB solution was mixed with 50 μ L of the test compound solution. The mixture was incubated for 4.5 min, before 10 μ L of ATC or BTC (depending on the enzyme) were added. The mixture was incubated for further 2.5 min before the absorption at 412 nm was determined with a Shimadzu UVmini-1240 spectrophotometer. To measure full enzyme activity, the compound solution was replaced by ethanol. Each compound concentration was tested three times. The enzyme activity in percentage was plotted against the logarithm of the compound concentrations from which the IC_{50} values were calculated by the software GraphPad Prism.

10. Anhang

10.1 Anhang zu Kapitel 1

Sequenzvergleich

Das kostengünstigere Enzym *eeAChE* wird aufgrund seiner hohen Identität (88%) und Ähnlichkeit (93%) in kinetischen Messungen als Ersatz für *hAChE* eingesetzt. Die Isoform *TcAChE* zeigt eine ähnliche Identität von 57% bzw. 73% zu *eeAChE* und *hAChE*. Für Dockingstudien ist hauptsächlich die Homologie der Isoformen bezogen auf die Bindetasche von Bedeutung. Die Aminosäuren der Bindetasche sind bis auf eine Ausnahme hoch konserviert. Tyr337 der *hAChE* entspricht einem Phenylalanin in *eeAChE* und *TcAChE*.

Tabelle 10.1 Sequenzvergleich von *Electrophorus electricus*, *Torpedo californica* und humaner AChE Sequenz hinsichtlich Identität (links) und Ähnlichkeit (rechts).

	Identität [%]			Ähnlichkeit [%]		
	<i>TcAChE</i>	<i>eeAChE</i>	<i>hAChE</i>	<i>TcAChE</i>	<i>eeAChE</i>	<i>hAChE</i>
<i>TcAChE</i>	100	57.7	56.5	100	73.4	73.8
<i>eeAChE</i>	-	100	88.0	-	100	93.0
<i>hAChE</i>	-	-	100	-	-	100

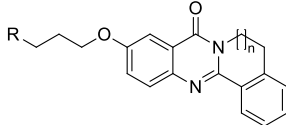
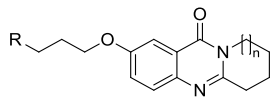

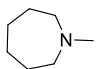


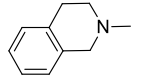

Methode

Der paarweise Sequenzvergleich wurde mit dem Programm Needle unter Verwendung der EBLOSUM62 Matrix von EMBOSS v.6.3.1 durchgeführt.²⁹³ Dazu wurden die folgenden Sequenzen für den Vergleich herangezogen: Die PDB-ID 4EY7 (*hAChE*),¹⁵¹ 1C2O (*eeAChE*)²⁹⁴ and 2CKM (*TcAChE*).⁵⁷

10.2 Anhang zu Kapitel 3

10.2.1 IC₅₀-Werte der Chinazolinonverbindungen

Tabelle 10.2 Übersicht über die IC₅₀-Werte des Chinazolinondatensatzes sortiert nach dem Aminsubstituenten. Die Daten sind aus Tabelle 3.1.

IC ₅₀ eeAChE [nM]						
	R	n = 0	n = 1	n = 2	n = 0	n = 1
	6.9	5.5	57	69	33	43
	5.0	13	53	50	59	39
	16	91	529	50	210	295
	11	48	72	101	43	51
	227	625	1.2·10 ³	868	723	653
	454	2.4·10 ³	10·10 ³	1.9·10 ³	4.2·10 ³	4.0·10 ³

10.2.2 Redockingergebnisse: ChemScore und ASP

Tabelle 10.3 Redockingergebnisse mit der ChemScore Funktion und einer Operationenzahl von 500'000 bzw. 100'000 (letzte Einstellung gekennzeichnet durch GA100'000).

PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7 GA100'000	49.62	1.47	17	38	47.75	0.36	nein (24)
1EVE GA100'000	44.80	2.09	8	44	42.84	0.98	nein (41)
4EY5	39.14	1.32	48	12	38.27	0.60	ja
4EY7	49.69	1.43	29	37	48.39	0.45	nein (21)
1EVE	45.09	2.13	11	48	41.46	0.66	nein (36)*
1W4L	58.32	1.57	5	17	55.80	0.76	ja

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Tabelle 10.4 Redockingergebnisse mit der ASP Funktion und einer Operationenzahl von 500'000 bzw. 100'000 (letzte Einstellung gekennzeichnet durch GA100'000).

PDB-ID	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
4EY7 GA100'000	67.66	0.70	50	22	66.36	0.19	ja
1EVE GA100'000	59.34	0.68	39	28	57.31	0.50	ja
4EY5	40.67	0.52	50	46	39.68	0.22	ja
4EY7	67.42	0.33	50	15	66.81	0.25	ja
1EVE	59.37	0.64	42	36	57.42	0.45	ja
1W4L	78.46	0.93	5	18	73.54	0.61	nein (8)*

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

10.2.3 Zusatzinformationen zur strukturellen Wasserauswahl

Tabelle 10.5 Bezifferung der sich entsprechenden Wassermoleküle im dazugehörigen PDB-Eintrag.

	4EY7	4EY4	1W4L	1EVE
722	772	2097	1163	
729	707	2098	1164	
731	752	2054	1157	
737	784	2087	1158	
881	786	2056	1235	
952	-	2308	1347	
954	869	2086	1236	

Von den sieben im Docking verwendeten Wassermolekülen werden fünf in der Relibase als Bestandteil eines Wasser-Clusters klassifiziert (Tabelle 10.6 im diesem Anhang). Die Wassermoleküle HOH729 und HOH952, welche für das Docking in 4EY7 ausgewählt wurden, gehören laut Relibase nicht zum Cluster. Das Wassermolekül 801 wurde nicht in den Dockingprozess mit einbezogen. Es liegt zwischen Protein und dem Wassermolekül 881 und kann daher nicht direkt mit dem Liganden interagieren.

Tabelle 10.6 Wasser-Cluster Analyse (Relibase) für 4EY7 mit den im Docking verwendeten Wassermolekülen.

Wassermolekül	Anzahl polarer Kontakte zu			Besetzung
	Protein	Wasser	Ligand	
722	2	1	0	1.00
729*	3	0	0	1.00
731	1	2	0	1.00
737	1	2	0	0.96
881	1	3	0	1.00
801	2	1	0	0.86
954	1	1	0	0.82
952	2	0	0	0.88

Tabelle 10.7 Vergleich der Besetzung (Occupancy) der sieben ausgewählten Wassermoleküle in den vier verwendeten Strukturen (HOH722 in der CAS und HOH954 am Bindetascheneingang (PAS)).

Wassermolekül (Benennung aus 4EY7)	4EY7	4EY4 (apo-Form)	1W4L	1EVE
722	1.00	1.00	1.00	1.00
729	1.00	1.00	1.00	1.00
731	1.00	1.00	1.00	1.00
737	0.96	1.00	1.00	1.00
881	1.00	1.00	1.00	1.00
952	0.88	-	1.00	1.00
954	0.82	1.00	1.00	1.00

Die Berechnung der normalisierten B-Faktoren erfolgte anhand der aus den PDB-Einträgen extrahierten B-Faktoren der Wassermoleküle (Tabelle 10.8) sowie der Mittelwerte und Standardabweichung der Protein B-Faktoren (Tabelle 10.9). Für die Berechnung der Protein B-Faktoren wurde jeweils nur die Kette A herangezogen und die Berechnung erfolgte ohne Wassermoleküle und ohne Liganden.

Tabelle 10.8 Vergleich der B-Faktoren der sieben rational ausgewählten Wassermoleküle der vier verwendeten Strukturen.

Wassermolekül (Benennung aus 4EY7)	4EY7 [\AA^2]	4EY4 [\AA^2]	1W4L [\AA^2]	1EVE [\AA^2]
722	22.25	30.67	24.97	11.91
729	17.57	39.40	18.95	6.85
731	20.27	38.39	25.64	15.31
737	21.84	43.40	24.22	14.26
881	29.93	44.35	23.11	14.63
952	33.30	-	35.02	27.39
954	24.27	62.97	34.57	24.89

Tabelle 10.9 Mittelwerte und Standardabweichung der B-Faktoren der vier Kristallstrukturen 4EY7, 4EY4, 1W4L sowie 1EVE, berechnet mit der Statistik-Umgebung R. (R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>)

	4EY7	4EY4	1W4L	1EVE
Mittelwert \bar{B}	31.48	50.73	32.13	27.96
Standardabweichung σB	10.19	10.95	7.43	12.45

Tabelle 10.10 Distanz zwischen den Wassermolekülen von 4EY7 zu den kristallisierten Wassern in 1EVE, 4EY4 und 1W4L in Å (gemessen in PyMol).

Wassermolekül	Distanz [Å] zu entsprechendem 4EY7-Wassermolekül			
	4EY7	4EY4	1W4L	1EVE
722	0.3	0.2	0.3	0.3
729	0.2	0.3	0.1	0.1
731	0.1	0.2	0.1	0.1
737	0.1	0.5	0.2	0.2
881	0.3	0.7	0.5	0.5
952	-	1.1	0.9	0.9
954	0.5	1.8	0.5	0.5

Tabelle 10.11 Vergleich von Score und per-Atom-Score (Score dividiert durch die Anzahl schwerer Atome) für die sukzessive Erhöhung der Anzahl der Wassermoleküle in der hAChE-Bindetasche beginnend bei HOH729 für das piperidinylsubstituierte Chinazolinon **4a**.

Anzahl Wassermoleküle	ChemPLP Score ^[Rang]	Anzahl schwere Atome	per-Atom-Score
0	91.70 ^[1]	24	3.82
1	100.96 ^[1]	25	4.04
2	106.62 ^[1]	26	4.10
3	112.38 ^[1]	27	4.16
4	118.00 ^[11]	28	4.21
5	120.31 ^[9]	29	4.15
6	124.08 ^[8]	30	4.14
7	129.75 ^[1]	31	4.19

Die Dockinglösungen die mit vier, fünf und sechs Wassermolekülen erzeugt wurden, zeigten den klassischen Bindemodus auf den Top-Rängen. Für den Vergleich eines analogen Bindemodus wurde die jeweils am besten bewertete Dockingpose im invertierten Bindemodus ausgewählt.

10.2.4 Einstellungen der stochastischen Konformationsuche

Es sind alle Parameter der stochastischen Konformationsuche mit dem Modul „Conformational Search“ in MOE 2012.10 angegeben. Die gekennzeichneten Parameter (*) wurden verändert.

*Method: stochastic (Monte-Carlo)

*Rejection Limit: 10'000

Iteration Limit: 10'000

*RMS Gradient: 0.001 kcal/mol·Å

*MM Iteration Limit: 1'000

*RMSD Limit: 0.01 Å

*Energy Window: 100 kcal/mol

Conformation Limit: 10'000

Separate strain energy by stereo class was activated

Das Ablehnungskriterium (Rejection Limit) gibt an, wie viele fortlaufende Versuche für die Generierung einer neuen Konformation unternommen werden, bevor die Suche abgebrochen wird. Diese Anzahl wurde um den Faktor 100 gegenüber der Voreinstellung erhöht. Über das Wiederholungskriterium (Iteration Limit) wird definiert, wie viele Versuche insgesamt zur Generierung neuer Konformationen durchgeführt werden. Die Energieminimierung wird abgebrochen, wenn der RMS-Gradient unter den spezifizierten Wert fällt. Die Energieminimierungsschritte (MM Iteration Limit) für jedes Konformer wurden auf maximal 1000 gesetzt. Der RMSD Grenzwert (Limit) gibt an, ab wann zwei Konformere als Duplikate angesehen werden, nämlich dann, wenn ihr RMSD unterhalb des angegebenen Wertes liegt. Das Energiefenster (Energy Window) definiert ab welchem Energiewert eine Konformation nicht mehr berücksichtigt wird. Dabei berechnet sich der Energiewert als Summe der geringsten Energie der Konformere und dem spezifizierten Wert. Das Konformationslimit (Conformational Limit) schließlich begrenzt die erhaltene Anzahl Konformere. In diesem Fall wurde diese Angabe nicht modifiziert, weil weniger Konformere erwartet wurden.

Tabelle 10.12 Rang und Häufigkeit des invertierten Bindemodus (i.B.) unter 50 Posen für die jeweiligen Ligandenkonformere.

Ligand	12a		12c		12d	
	bester Rang für i.B.	Anzahl Posen im i.B.	bester Rang für i.B.	Anzahl Posen im i.B.	bester Rang für i.B.	Anzahl Posen im i.B.
10	3	2	-	0	-	0
7	8	4	49	2	42	5
14	20	5	4	2	21	4
17	1	35	1	41	1	25
1	10	12	34	6	34	5
8	42	4	48	2	41	2

10.2.5 Dockinglösungen der Chinazolin- und Chinazolinonliganden

Tabelle 10.13 Ausgewählte Chinazolin- und Chinazolinon Bindeposen mit Score, Rang und per-Atom-Score.

Verbindung	IC ₅₀ (eeAChE) [nM]	schwere Atome	GoldScore	Rang	per-Atom-Score
10a	69.2	24	95.27	3	3.97
10b	50.2	25	94.90	1	3.80
10c	50.0	23	93.37	1	4.06
10d	101	23	91.05	5	3.96
10e	868	28	92.49	1	3.30
10f	1.9·10 ³	23	82.01	8	3.57
10g	390	27	101.60	1	3.76
11a	33.3	25	95.63	1	3.83
11b	58.5	26	100.69	1	3.87
11c	210	24	96.04	1	4.00
11d	43.0	24	92.96	5	3.87
11e	723	29	103.48	1	3.57
11f	4.2·10 ³	24	81.47	9	3.39
12a	43.0	26	98.07	1	3.77
12b	39.2	27	101.76	1	3.77
12c	295	25	97.21	1	3.89
12d	50.6	25	96.49	2	3.86
12e	653	30	107.03	1	3.57
12f	4.0·10 ³	25	84.98	1	3.40
13a	6.90	28	103.06	2	3.68
13b	5.00	29	108.65	1	3.75
13c	16.2	27	101.18	3	3.75
13d	11.0	27	102.20	4	3.79
13e	227	32	104.20	1	3.26
13f	454	27	90.42	3	3.35
14a	5.50	29	105.23	1	3.63
14b	13.0	30	108.70	1	3.62
14c	91.1	28	102.36	1	3.66
14d	47.5	28	101.27	3	3.62
14e	625	33	103.48	1	3.14
14f	2.4·10 ³	28	90.67	2	3.24
15a	57.1	30	96.14	1	3.20
15b	53.4	32	99.53	1	3.11
15c	529	29	97.64	1	3.37
15d	72.1	29	95.92	1	3.31
15e	1.2·10 ³	34	95.94	1	2.82
15f	10·10 ³	29	89.28	1	3.08
16a_R			-	-	-
16a_S	550	30	99.40	1	3.31
16b_R			103.87	1	3.35
16b_S	250	31	101.60	2	3.28
16c_R			92.75	5	3.20
16c_S	720	29	-	-	-
16g_R			106.63	1	3.14
16g_S	230	34	108.04	1	3.18

Fortsetzung von **Tabelle 10.13**

Verbindung	IC ₅₀ (eeAChE) [nM]	schwere Atome	GoldScore	Rang	per-Atom-Score
17a_R	530	29	98.67	1	3.40
17a_S			-	-	-
17b_R	6.8·10 ³	30	99.30	1	3.31
17b_S			99.36	1	3.31
17c_R	20·10 ³	28	-	-	-
17c_S			-	-	-
17g_R	570	33	103.73	1	3.14
17g_S			107.19	1	3.25
18a_R	6.9·10 ³	24	96.68	4	4.03
18a_S			-	-	-
18g_R	3.3·10 ³	28	102.57	1	3.66
18g_S			103.67	1	3.70
19a_R	510	23	107.13	1	4.66
19a_S			100.78	1	4.38
19b_R	4.8·10 ³	24	-	-	-
19b_S			104.79	1	4.37
19c_R	8.9·10 ³	22	-	-	-
19c_S			98.91	1	4.50
19g_R	400	27	107.28	1	3.97
19g_S			112.53	1	4.17
20a	66.5	23	94.50	1	4.58
20g	88.4	27	105.29	1	3.50

10.2.6 Chinazolinon- und Chinazolin-Platzierung im invertierten Bindemodus

Tabelle 10.14 Übersicht über das Auftreten des invertierten Bindemodus unter den Top-fünf-Lösungen aller Piperidinverbindungen (s. Tabelle 3.1 und 3.2). Tetrazyklische Verbindungen (Verb.) oben, trizyklische unten. Die Bezeichnung 7HOH bedeutet, dass das Docking mit den sieben ausgewählten strukturellen Wassermolekülen erfolgte.

Verb.	Anzahl Posen im i.B./5		Verb.	Anzahl Posen im i.B./5		Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	
	7 HOH	kein HOH		7 HOH	kein HOH		7 HOH	kein HOH
13a	5	5	16g_R	5	5	16g_S	5	3
14a	5	5	16a_R	0	0	16a_S	5	0
15a	5	5	17g_S	4	0	17g_R	5	4
-	-	-	17a_S	0	0	17a_R	5	5
10g	5	4	19g_R	5	5	19g_S	5	5
10a	5	2	19a_R	5	5	19a_S	5	5
11a	5	3	18a_R	5	5	18a_S	0	2
12a	5	0	18g_R	5	3	18g_S	5	5
-	-	-	20a	5	1	-	-	-
-	-	-	20g	5	5	-	-	-

Tabelle 10.15 Übersicht über das Auftreten des invertierten Bindemodus (i.B.) unter den Top-fünf Lösungen, beim Docking mit Wassermolekülen, sortiert nach dem jeweiligen Substituenten. Tetrazyklische Verbindungen oben, trizyklische unten.

Azepan Substituent				Pyrrolidin Substituent			
Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	Verb.	Anzahl Posen im i.B./5
16b_R	5	16b_S	2	16c_R	1	16c_S	0
17b_R	5	17b_S	5	17c_R	0	17c_S	0
13b	5	-	-	13c	5	-	-
14b	5	-	-	14c	5	-	-
15b	5	-	-	15c	5	-	-
19b_R	0	19b_S	5	19c_R	0	19c_S	5
10b	5	-	-	10c	5	-	-
11b	5	-	-	11c	5	-	-
12b	5	-	-	12c	3	-	-

Diethylamin Substituent		Tetrahydroisochinolin Substituent		Imidazol Substituent	
Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	Verb.	Anzahl Posen im i.B./5	Verb.	Anzahl Posen im i.B./5
13d	5	13e	5	13f	5
14d	5	14e	5	14f	5
15d	5	15e	4	15f	5
10d	2	10e	5	10f	0
11d	4	11e	5	11f	0
12d	4	12e	5	12f	1

10.3 Anhang zu Kapitel 4

10.3.1 Redockingergebnisse

Tabelle 10.16 Redockingergebnisse für Ligand **27** (PDB-ID: 1ODC) in GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	94.82	0.95	5	12	92.92	0.89	ja
ChemScore	57.22	1.58	2	5	56.95	1.10	nein (10)*
ChemPLP	131.30	1.70	5	8	125.01	0.79	nein (2)
GoldScore	105.32	1.67	11	2	104.50	1.55	ja

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Tabelle 10.17 Redockingergebnisse für Ligand **28-S** (PDB-ID: 1ZGC) in GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	76.23	1.82	2	1	76.23	1.82	ja
ChemScore	55.72	3.54	3	37	47.40	1.67	nein (1)*
ChemPLP	120.71	12.80	2	3	112.29	1.13	ja
GoldScore	85.23	11.04	1	3	84.05	1.59	nein (2)

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Tabelle 10.18 Redockingergebnisse für Ligand **28-R** (PDB-ID: 1ZGB) in GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	78.39	2.92	1	17	73.55	1.37	ja
ChemScore	55.36	11.90	1	27	49.90	1.10	nein (2)*
ChemPLP	119.36	1.88	2	1	119.36	1.88	ja
GoldScore	91.08	3.28	2	30	77.41	1.87	ja

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Tabelle 10.19 Redockingergebnisse für Ligand **29** (PDB-ID: 1UT6) in GOLD.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	64.31	1.51	27	28	62.78	0.79	ja
ChemScore	48.10	2.63	9	41	44.00	1.00	nein (5)*
ChemPLP	101.65	0.96	24	34	96.50	0.76	ja
GoldScore	78.98	0.97	27	40	73.20	0.78	ja

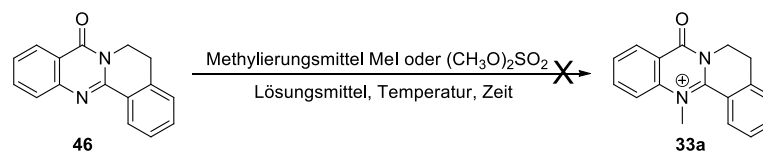
* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

Die Top-Posen, welche mit ASP erhalten wurden, zeigen außer für die Röntgenstruktur 1ZGB kristallnahe Posen mit einem RMSD <2.0 Å. Ferner ist ASP in der Lage die zur Originalpose ähnlichste Pose generell auf den höchsten Rängen mit den kleinsten RMSD Werten zu finden.

10.4 Anhang zu Kapitel 5

10.4.1 Methylierungsreaktionen an Benz-Rutaecarpin

Tabelle 10.20 Zusammenfassung der getesteten Reaktionsbedingungen für die direkte Methylierung von Benz-Rutaecarpin, welche nicht das Benz-DHED **33a** lieferten. Tabelle mit Genehmigung übernommen von Wehle *et al.*²⁴⁴ © 2016 Elsevier.



Lösungsmittel	Mel	Temperatur	Zeit	Bedingungen
Dioxan	2.0 äq.	90 °C	15 h	-
Dioxan	10 äq.	90 °C	16 h	Septum verschlossener Kolben
-	20 äq.	45 °C	15 h	Septum verschlossener Kolben
DMF	4.0 äq.	120 °C	1 h	Mikrowelle
Lösungsmittel	(CH ₃ O) ₂ SO ₂	Temperatur	Zeit	Bedingungen
THF	1.0 äq.	RT	24 h	Septum verschlossener Kolben, Ar-Atmosphäre
Toluol	2.0 äq.	RT	12 h	Septum verschlossener Kolben, Ar-Atmosphäre

10.5 Anhang zu Kapitel 6

10.5.1 Redockingdaten von 4BDS

Tabelle 10.21 Redockingergebnisse für Tacrin **3** (PDB-ID: 4BDS) mit 1'000'000 als Operationenzahl.

Scoringfunktion	Top-Pose			Pose mit geringstem RMSD zur Originalpose			
	Score	RMSD [Å]	Clustergröße	Rang	Score	RMSD [Å]	Cluster wie Top-Pose
ASP	35.99	0.79	48	44	35.29	0.60	ja
ChemPLP	56.30	0.49	49	40	56.20	0.46	ja
ChemScore	32.36	0.86	42	49	31.89	0.69	nein (8)*
GoldScore	49.25	0.73	27	14	49.19	0.45	nein (21)
GoldScore GA500'000	49.27	0.69	31	31	48.99	0.41	ja

* die Zahl in Klammern gibt die Clustergröße an.

10.6 Übersicht der verwendeten Dockingeinstellungen

Tabelle 10.22 Übersicht über die verwendeten Dockingeinstellungen zur Erzeugung der finalen Dockinglösungen in GOLD.

Einstellungen	Kapitel 3	Kapitel 4	Kapitel 6
Röntgenstruktur PDB-ID:	4EY7 (<i>hAChE</i>)	2CKM (<i>TcAChE</i>)	1POI (<i>hBChE</i>)
Auflösung	2.35 Å	2.15 Å	2.00 Å
Ligandensubstanzklasse	aminsubstituierte Chinazoline und Chinazolinone	Photoschaltbare Bis-Tacrine	Chinazolin-carbamate
Anzahl untersuchter Lig.	54	2	11
Strukturen für Redocking	4EY5, 4EY7 (<i>hAChE</i>) 1EVE, 1W4L (<i>TcAChE</i>)	2CMF, 2CKM, 1ODC, 1ZGB, 1ZGC, 1UT6 (<i>TcAChE</i>)	4BDS (<i>hBChE</i>)
GOLD Version	5.1 und 5.2	5.1	5.2.2
Scoringfunktion	GoldScore	ASP	GoldScore
Operationenzahl	500'000	4'000'000	1'000'000
Anzahl generierter Posen	50	50	50
Ligandenprotonierung pH =	8	8	8
Enzymprotonierung pH =	8	7	8
Rescoring	-	DSX ^{PDB} -Potentiale	DSX ^{CSD} -Potentiale
Besonderheiten	Docking inkl. sieben Wassermolekülen	Scaffold-Match-Constraint für CAS-bindenden Tacrin-substituenten	Modelling-Ansatz mit lokaler Minimierung der Liganden in der Bindetasche

Die Bindetasche wurde wie folgt definiert:

hAChE: Tyr72, Asp74, Trp86, Asn87, Gly120, Gly121, Tyr124, Ser125, Gly126, Ala127, Tyr133, Glu202, Ser203, Trp236, Trp286, Phe295, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, Tyr341, His447, Gly448 und Tyr449.

TcAChE: Tyr70, Asp72, Trp84, Asn85, Gly117, Gly118, Gly119, Tyr121, Glu199, Ser200, Trp279, Phe288, Phe290, Glu327, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432, Met436, Ile439, His440 und Tyr442.

hBChE: Asn68, Asp70, Ser79, Trp82, Asn83, Gly115, Gly116, Gly117, Gln119, Thr120, Gly121, Thr122, Leu125, Tyr128, Glu197, Ser198, Ala199, Trp231, Leu286, Val288, Glu325, Ala328, Phe329, Tyr332, Trp430, His438, Gly439, Tyr440 und Ile442.

11. Literaturverzeichnis

1. Ferreira, L. G.; dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384-13421.
2. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1239-1249.
3. Klebe, G. Pharmakophorhypothesen, Molekülvergleiche und Datenbanksuchen. In: Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**, Auflage 2, Kapitel 17, 249-264.
4. Klebe, G. Proteinmodellierung und strukturbasiertes Wirkstoffdesign. In: Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**, Auflage 2, Kapitel 20, 303-315.
5. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. N. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242 (www.rcsb.org).
6. Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit. <https://www.deutsche-alzheimer.de/die-krankheit/die-alzheimer-krankheit.html> (letzter Zugriff: 25.05.2016).
7. Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G.-C.; Wu, Y.-T.; Prina, M. *World Alzheimer Report 2015*; Alzheimer's Disease International: London, **2015**, 1-82.
8. Wenk, G. L. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* **2003**, *64*, 7-10.
9. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. Neurodegenerative diseases. In: *Pharmacology*. Elsevier, Edinburgh, **2012**, Auflage 7, Kapitel 39, 476-491.
10. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
11. Davies, P.; Maloney, A. J. F. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet* **1976**, *2*, 1403.
12. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, *217*, 408-417.
13. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 137-147.
14. Bowen, D. M.; Smith, C. B.; White, P.; Davison, A. N. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **1976**, *99*, 459-496.
15. Rylett, R. J.; Ball, M. J.; Colhoun, E. H. Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1983**, *289*, 169-175.
16. Nilsson, L.; Nordberg, A.; Hardy, J.; Wester, P.; Winblad, B. Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J. Neural Transm.* **1986**, *67*, 275-285.
17. Citron, M. Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 387-398.
18. Jarret, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. J. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
19. Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 837-842.
20. Lesné, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **2006**, *440*, 352-357.
21. Haass, C.; Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101-112.
22. Wright, A. L.; Zinn, R.; Hohensinn, B.; Konen, L. M.; Beynon, S. B.; Tan, R. P.; Clark, I. A.; Abdipranoto, A.; Vissel, B. Neuroinflammation and neuronal loss precede A β plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59586-e59586.

-
23. 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*, 10447-10457.
 24. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-416.
 25. Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Belluti, F.; Cavalli, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Valenti, P.; Recanatini, M. 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation: A dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2279-2282.
 26. Iqbal, K.; Alonso, A. C.; Chen, S.; Chohan, O. M.; El-Akkad, E.; Gong, C.-X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1739*, 198-210.
 27. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329-344.
 28. Silveyra, M.-X.; Gracia-Ayllón, M.-S.; de Barreda, E. G.; Small, D. H.; Martínez, S.; Avila, J.; Sáez-Valero, J. Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 624.e23-624.e34.
 29. Bertram, L.; Tanzi, R. E. Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, R137-R145.
 30. Van Cauwenbergh, C.; Van Broeckhoven, C.; Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet. Med.* **2016**, *18*, 421-430.
 31. Perry, G.; Cash, A. D.; Smith, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol.* **2002**, *2*, 120-123.
 32. Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Are we connecting the dots? *J. Med. Chem.* **2013**, *57*, 2821-2831.
 33. Axelsen, P. H.; Komatsu, H.; Murray, I. V. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Physiol.* **2011**, *26*, 54-69.
 34. Barage, S. H.; Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **2015**, *52*, 1-18.
 35. Selkoe, D. J.; Schenk, D. Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 545-584.
 36. Karran, E.; Mercken, M.; De Strooper, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 698-712.
 37. Bolognesi, M. L.; Gandini, A.; Prati, F.; Uliassi, E. From companion diagnostics to theranostics: A new avenue for Alzheimer's Disease? *J. Med. Chem.* **2016**, DOI 10.1021/acs.jmedchem.1026b00151.
 38. Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: Serine hydrolases as a case study. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11051-11055.
 39. Lushington, G. H.; Guo, J.-X.; Hurley, M. M. Acetylcholinesterase: Molecular modeling with the whole toolkit. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 57-73.
 40. Massoulié, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F.-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **1993**, *41*, 31-91.
 41. Chatonnet, A.; Lockridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625-634.
 42. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141-41147.
 43. Brimijoin, S.; Hammond, P. Butyrylcholinesterase in human brain and acetylcholinesterase in human plasma: Trace enzymes measured by two-site immunoassay. *J. Neurochem.* **1988**, *51*, 1227-1231.
 44. Zhan, C.-G.; Zheng, F.; Landry, D. W. Fundamental reaction mechanism for cocaine hydrolysis in human butyrylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2462-2474.

45. Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 955-979.
46. Rosenberry, T. L. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**, *43*, 103-218.
47. Davis, A. M.; Teague, S. J.; Kleywegt, G. J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2718-2736.
48. Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1-21.
49. Klebe, G. Experimentelle Methoden zur Strukturaufklärung. In: Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**, Auflage 2, Kapitel 13, 189-205.
50. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholin-binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872-879.
51. Gao, D.; Zhan, C.-G. Modeling effects of oxyanion hole of ester hydrolysis catalyzed by human cholinesterases. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23070-23076.
52. Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572-10577.
53. The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC (www.pymol.org).
54. Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061-5084.
55. Bourne, Y.; C., K. H.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 1449-1454.
56. Bourne, Y.; Taylor, P.; Marchot, P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. *Cell* **1995**, *83*, 503-512.
57. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500.
58. Colletier, J.-P. F., D.; Greenblatt, H.M.; Stojan, J.; Sussman, J.L.; Zaccari, G.; Silman, I.; Weik, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal* **2006**, *25*, 2746-2756.
59. Saxena, A.; Redman, A. M. G.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, B. P. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14642-14651.
60. Saxena, A.; Fedorko, J. M.; Vinayaka, C. R.; Medhekar, R.; Radic, Z.; Taylor, P.; Lockridge, O.; Doctor, B. P. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept®) to cholinesterases. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4447-4458.
61. Dickerson, T. J.; Beuscher IV, A. E.; Rogers, C. J.; Hixon, M. S.; Yamamoto, N.; Xu, Y.; Olson, A. J.; Janda, K. D. Discovery of acetylcholinesterase peripheral anionic site ligands through computational refinement of a directed library. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14845-14853.
62. Macdonald, I. R.; Martin, E.; Rosenberry, T. L.; Darvesh, S. Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **2012**, *51*, 7046-7053.
63. Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. Cation- π interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9459-9464.
64. Klebe, G. Protein-Ligand-Wechselwirkungen als Grundlage der Arzneistoffwirkung. In: Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**, Auflage 2, Kapitel 4, 49-67.
65. Huggins, D. J.; Tidor, B. Systematic placement of structural water molecules for improved scoring of protein-ligand interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **2011**, *24*, 1-13.
66. Bembenek, S. D.; Keith, J. M.; Letavic, M. A.; Apodaca, R.; Barbier, A. J.; Dvorak, L.; Aluisio, L.; Miller, K. L.; Lovenberg, T. W.; Carruthers, N. I. Lead identification of acetylcholinesterase

-
- inhibitors-histamine H3 receptor antagonists from molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2968-2973.
67. Marshall, M. S.; Steele, R. P.; Thanthiriwatte, K. S.; Sherrill, C. D. Potential energy curves for cation- π interactions: Off-axis configurations are also attractive. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13628-13632.
 68. Maryott, A. A.; Smith, E. R. Table of dielectric constants of pure liquids. *Natl. Bureau Stand.* **1951**, *Circular 514*, 1-40.
 69. Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. A computational study of cation- π interactions vs salt bridges in aqueous media: Implications for protein engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 870-874.
 70. Desiraju, G. R. Hydrogen bridges in crystal engineering: Interactions without borders. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 565-573.
 71. Kawakami, Y.; Inoue, A.; Kawai, T.; Wakita, M.; Sugimoto, H.; Hopfinger, A. J. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1429-1446.
 72. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept[®]): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **1999**, *7*, 297-307.
 73. Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guenard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L. The complex of a bivalent derivative of galanthamine with *Torpedo* acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active site gorge: Implications for structure-based drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15405-15411.
 74. Bar-On, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3555-3564.
 75. Schweiger, H.-D. Antidementiva gegen den schleichenden Abbau. *Pharmazeutische Zeitung* **2008**. www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=6531 (letzter Zugriff: 05.12.2015)
 76. Arendt, T.; Brückner, M. K.; Lange, M.; Bigl, V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development - a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* **1992**, *21*, 381-396.
 77. Giacobini, E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2003**, *18*, S1-S5.
 78. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159-165.
 79. Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A.; Veroff, A. E.; Cutler, N. R. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: Correlation with cognitive benefit. *J. Neural Transm.* **2002**, *109*, 1053-1065.
 80. Mesulam, M.-M.; Guillozet, A.; Shaw, P.; Levey, A.; Duysen, E. G.; Lockridge, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholin. *Neuroscience* **2002**, *110*, 627-639.
 81. Giacobini, E. Treatment of dementias, a new generation of progress In: *Adv. Behav. Biol. Plenum Press, New York*, **1992**, Auflage 40, 19-34.
 82. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q. S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17213-17218.
 83. Maurice, T.; Strehaiano, M.; Siméon, N.; Bertrand, C.; Chatonnet, A. Learning performances and vulnerability to amyloid toxicity in the butyrylcholinesterase knockout mouse. *Behav. Brain Res.* **2016**, *296*, 351-360.
 84. Carolan, C. G.; Dillon, G. P.; Gaynor, J. M.; Reidy, S.; Ryder, S. A.; Khan, D.; Marquez, J. F.; Gilmer, J. F. Isosorbide-2-carbamate esters: Potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6400-6409.
 85. Carolan, C. G.; Dillon, G. P.; Khan, D.; Ryder, S. A.; Gaynor, J. M.; Reidy, S.; Marquez, J. F.; Jones, M.; Holland, V.; Gilmer, J. F. Isosorbide-2-benzyl carbamate-5-salicylate, a peripheral anionic

- site binding subnanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1190-1199.
86. Gosh, A. K.; Brindisi, M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2895-2940.
87. Darvesh, S. Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 354-357.
88. Darvesh, S.; Darvesh, K. V.; McDonald, R. S.; Mataija, D.; Walsh, R.; Mothana, S.; Lockridge, O.; Martin, E. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4200-4212.
89. Takahashi, J.; Hijikuro, I.; Kihara, T.; Muruges, M. G.; Fuse, S.; Tsumura, Y.; Akaike, A.; Niidome, T.; Takahashi, T.; Sugimoto, H. Design, synthesis and evaluation of carbamate-modified (–)-N¹-phenethylmorphysostigmine derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1721-1723.
90. Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective tri- and tetracyclic BChE inhibitors releasing reversible inhibitors upon carbamate transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914-919.
91. Huang, G.; Kling, B.; Darras, F. H.; Heilmann, J.; Decker, M. Identification of a neuroprotective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 15-21.
92. Herholz, K. Perfusion SPECT and FDG-PET. *Int. Psychogeriatr.* **2011**, *23*, S25-S31.
93. Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Valgimigli, L.; Bartolini, M.; Rosini, M.; Andrisano, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-directed drug design strategy: From a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6446-6449.
94. Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont, D. W.; Tarozzi, A.; Bolgnesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Mellor, I. R.; Melchiorre, C. Inhibition of acetylcholinesterase, β -amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: A promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381-4384.
95. Silva, D.; Chioua, M.; Samadi, A.; Agostinho, P.; Garcao, P.; Lajarin-Cuesta, R.; de Los Rios, C.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Gonzalez-Lafuente, L.; Mendes, E.; Perez, C.; Rodriguez-Franco, M. I.; Marco-Contelles, J.; Carmo Carreiras, M. Synthesis, pharmacological assessment, and molecular modeling of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitors: Effect against amyloid- β -induced neurotoxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 547-565.
96. de Aquino, R. A.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Fatima, A. Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8395-8409.
97. Bolognesi, M. L.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. Alzheimer's disease: New approaches to drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 303-308.
98. Pisani; Farina, R.; Soto-Otero, R.; Denora, N.; Mangiatordi, G. F.; Nicolotti, O.; Mendez-Alvarez, E.; Altomare, C. D.; Catto, M.; Carotti, A. Searching for multi-target neurotherapeutics against Alzheimer's: Discovery of potent AChE-MAO B inhibitors through the decoration of the 2H-Chromen-2-one structural motif. *Molecules* **2016**, *21*, 362-377.
99. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
100. Copeland, A. R. Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes. In: Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, **2013**, Auflage 2, Kapitel 3, 57-121.
101. Copeland, A. R. Lead optimization and structure-activity relationships for reversible inhibitors. In: Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, **2013**, Auflage 2, Kapitel 5, 176-178.
102. Bisswanger, H. Enzymhemmung In: Enzyme. Struktur, Kinetik und Anwendungen. *WILEY-VCH*, Weinheim, Deutschland, **2015**, Auflage 1, Kapitel 9, 199-221.

-
103. Sawatzky, E.; Wehle, S.; Kling, B.; Heilmann, J.; Sotriffer, C.; Decker, M. Identification of highly selective nanomolar carbamate-based butyrylcholinesterase inhibitors by rational investigation into their inhibition mode. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2067-2082.
 104. Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V. Characterization of reversible and pseudo-reversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1144*, 102-110.
 105. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
 106. Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 335-337.
 107. Cheng, T.; Li, X.; Yan, L.; Liu, Z.; Wang, R. Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1079-1093.
 108. Li, Y.; Han, L.; Liu, Z.; Wang, R. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 2. Evaluation methods and general results. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1717-1736.
 109. Höltje, H.-D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. Virtual screening and docking. In: *Molecular Modeling. Wiley-VCH, Weinheim*, **2008**, Auflage 3, Kapitel 5, 181-215.
 110. Sotriffer, C. Scoring functions for protein-ligand interactions. In: *Protein-Ligand Interactions. Wiley-VCH, Weinheim*, **2012**, Auflage 1, Kapitel 12, 237-263.
 111. Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 12899-12908.
 112. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
 113. 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*, 727-748.
 114. Hartshorn, M. J.; Verdonk, M. L.; Chessari, G.; Brewerton, S. C.; Mooij, W. T. M.; Mortenson, P. N.; Murray, C. W. Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 726-741.
 115. Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84-96.
 116. Mooij, W. T.; Verdonk, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins* **2005**, *61*, 272-287.
 117. Kirtay, C. K.; Mitchell, J. B. O.; Lumley, J. A. Knowledge based potentials: The reverse boltzmann methodology, virtual screening and molecular weight dependence. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 527-536.
 118. Allen, F. H. The cambridge structural database: A quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst.* **2002**, *B58*, 380-388.
 119. Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The cambridge structural database. *Acta Cryst.* **2016**, *B72*, 171-179.
 120. Merz, J. K. M. Limits of free energy computation for protein-ligand interactions. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1769-1776.
 121. Ballester, P. J.; Mitchell, J. B. A machine learning approach to predicting protein-ligand binding affinity with applications to molecular docking. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1169-1175.
 122. Zilian, D.; Sotriffer, C. A. SFCscoreRF: A random forest-based scoring function for improved affinity prediction of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1923-1933.
 123. Moitessier, N.; Englebienne, P.; Lee, D.; Lawandi, J.; Corbeil, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: A long way to go. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, S7-S26.
 124. Kim, R.; Skolnick, J. Assessment of programs for ligand binding affinity prediction. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1316-1331.
 125. Enyedy, I. J.; Egan, W. J. Can we use docking and scoring for hit-to-lead optimization? *J. Comput.-Aided. Mol. Des.* **2008**, *22*, 161-168.

126. Connolly, D. J.; Cusack, D.; O'Sullivan, T. P.; Guiry, P. J. Synthesis of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10153-10202.
127. Mhaske, S. B.; Argade, N. P. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9787-9826.
128. Khan, I.; Ibrar, A.; Abbas, N.; Saeed, A. Recent advances in the structural library of functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds: Synthetic approaches and multifarious applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 193-244.
129. Khan, I.; Ibrar, A.; Ahmed, W.; Saeed, A. Synthetic approaches, functionalization and therapeutic potential of quinazoline and quinazolinone skeletons: The advances continue. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 124-169.
130. Khan, I.; Zaib, S.; Batool, S.; Abbas, N.; Ashraf, Z.; Iqbal, J.; Saeed, A. Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2361-2381.
131. Shallal, H. M.; Russu, W. A. Discovery, synthesis, and investigation of the antitumor activity of novel piperazinympyrimidine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2043-2057.
132. Verhaeghe, P.; Azas, N.; Gasquet, M.; Hutter, S.; Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P. Synthesis and antiplasmodial activity of new 4-aryl-2-trichloromethylquinazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 396-401.
133. Malamas, M. S.; Millen, J. Quinazolineacetic acids and related analogues as aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1492-1503.
134. Abbas, S. E.; Awadallah, F. M.; Ibrahim, N. A.; Said, E. G.; Kamel, G. M. New quinazolinonepyrimidine hybrids: Synthesis, anti-inflammatory, and ulcerogenicity studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 141-149.
135. Ismail, M. A. H.; Barker, S.; Abou El Ella, D. A.; Abouzid, K. A. M.; Toubar, R. A.; Todd, M. H. Design and synthesis of new tetrazolyl- and carboxy-biphenylmethyl-quinazolin-4-one derivatives as angiotensin II AT1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1526-1535.
136. El-Azab, A. S.; Abdel-Hamide, S. G.; Sayed-Ahmed, M. M.; Hassan, G. S.; El-Hadiyah, T. M.; Al-Shabanah, O. A.; Al-Deeb, O. A.; El-Subbagh, H. I. Novel 4(3H)-quinazolinone analogs: Synthesis and anticonvulsant activity. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 2815-2827.
137. Grover, G.; Kini, S. G. Synthesis and evaluation of new quinazolone derivatives of nalidixic acid as potential antibacterial and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 256-262.
138. Garofalo, A.; Goossens, L.; Lemoine, A.; Ravez, S.; Six, P.; Howsam, M.; Farce, A.; Depreux, P. [4-(6,7-Disubstituted quinazolin-4-ylamino)phenyl] carbamic acid esters: A novel series of dual EGFR/VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors. *Med. Chem. Comm.* **2011**, *2*, 65-72.
139. Decker, M. Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 305-313.
140. Decker, M.; Krauth, F.; Lehmann, J. Novel tricyclic quinazolinimines and related tetracyclic nitrogen bridgehead compounds as cholinesterase inhibitors with selectivity towards butyrylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1966-1977.
141. Darras, F. H.; Wehle, S.; Huang, G.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Amine substitution of quinazolinones leads to selective nanomolar AChE inhibitors with 'inverted' binding mode. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4867-4881.
142. Darras, F. H.; Pockes, S.; Huang, G.; Wehle, S.; Strasser, A.; Wittmann, H. J.; Nimczick, M.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH3 receptor antagonists. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 225-242.
143. Khan, N.; Saad, A.; Nurulain, S. M.; Darras, F. H.; Decker, M.; Sadek, B. The dual-acting H3 receptor antagonist and AChE inhibitor UV-MD-17 dose-dependently enhances memory retrieval and reverses dizocilpine-induced memory impairment in rats. *Behav. Brain Res.* **2016**, *297*, 155-164.
144. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Protein Struct. Funct. Genet.* **2003**, *52*, 609-623.

-
145. Li, Y.; Liu, Z.; Li, J.; Han, L.; Liu, J.; Zhao, Z.; Wang, R. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. Compilation of the test set. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1700-1716.
146. Molecular Operating Environment (MOE), 2011.10; *Chemical Computing Group Inc.*, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2011**.
147. Milletti, F.; Storchi, L.; Sforza, G.; Cruciani, G. New and original pK_a prediction method using grid molecular interaction fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2172-2181.
148. Dewick, P. M. Heterocycles. In: *Essentials of organic chemistry. John Wiley & Sons, Ltd.*, West Sussex, **2006**, Auflage 1, Kapitel 11.
149. Neudert, G.; Klebe, G. fconv: Format conversion, manipulation, and feature computation of molecular data. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1021-1022.
150. Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57-63.
151. Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282-10286.
152. Wang, R.; Yan, H.; Tang, X.-C. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 1-26.
153. Sugimoto, H.; Iimura, Y.; Yamanishi, Y.; Yamatsu, K. Synthesis and structure-activity-relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-Benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4821-4829.
154. Verdonk, M. L.; Chessari, G.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. D.; Taylor, R. Modeling water molecules in protein-ligand docking with GOLD. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6504-6515.
155. Kirchmair, J.; Spitzer, G. M.; Liedl, K. R. Consideration of water and solvation effects in virtual screening. In: *Virtual screening - principles, challenges, and practical guidelines. Wiley-VCH, Weinheim, Germany*, **2011**, Kapitel 10, Vol. 48, 263-289.
156. Berg, L.; Andersson, C. D.; Artursson, E.; Hornberg, A.; Tunemalm, A. K.; Linusson, A.; Ekstrom, F. Targeting acetylcholinesterase: Identification of chemical leads by high throughput screening, structure determination and molecular modeling. *PloS One* **2011**, *6*, e26039.1-e26039.12.
157. Hendlich, M.; Bergner, A.; Günther, J.; Klebe, G. Relibase: Design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 607-620.
158. Lu, Y.; Wang, R.; Yang, C.-Y.; Wang, S. Analysis of ligand-bound water molecules in high-resolution crystal structures of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 668-675.
159. Tronrud, D. E. Knowledge-based B-factor restraints for the refinement of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, *29*, 100-104.
160. Klebe, G. Konformationsanalyse. In: *Wirkstoffdesign. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, **2009**, Auflage 2, Kapitel 16, 240-245.
161. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; *Chemical Computing Group Inc.*, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2013**.
162. Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720-729.
163. Bocian, D. F.; Pickett, H. M.; Rounds, T. C.; Strauss, H. L. Conformations of cycloheptane. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 687-695.
164. Zschunke, A. Kombinierte Rotation und Inversion an Ringverbindungen. In: *Molekülstruktur: Form, Dynamik, Funktionalität. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, **1993**, Kapitel 3.5.1.3, 118-136.

165. Favini, G.; Buemi, G.; Raimondi, M. Molecular conformation of cyclenes. I. Cyclohexene, cycloheptene, *cis*- and *trans*-cyclooctene, *cis*- and *trans*-cyclononene. *J. Mol. Struct.* **1968**, *2*, 137-148.
166. Leong, M. K.; Mastryukov, V. S.; Boggs, J. E. Structure and conformation of cyclopentene, cycloheptene and *trans*-cyclooctene. *J. Mol. Struct.* **1998**, *445*, 149-160.
167. Hampel, H.; Möller, H.-J. Cholinesterasehemmer. Tacrin. In: Neuro-Psychopharmaka. Ein Therapiehandbuch. *Springer-Verlag*, Wien, **1999**, Auflage 2, Kapitel 12, 705-713.
168. Albert, A. The utilization of acridines in clinical medicine. General review. Antibacterials. Antimalarials. Anthelmintics. Anti-immune substances. Analeptics, and morphine antagonists. In: The acridines: Their preparation, physical, chemical and biological properties and uses. *Edward Arnold & Co*, New York, **1966**, Auflage 2, Kapitel 19, 403-433.
169. Summers, W.; Majovski, L.; Marsh, G.; Tachiki, K.; Kling, A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 1241-1245.
170. Doucet-Personeni, C.; Bentley, P. D.; Fletcher, R. J.; Kinkaid, A.; Kryger, G.; Pirard, B.; Taylor, A.; Taylor, J.; Viner, R.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Greenblatt, H. M.; Lewis, T. A structure-based design approach to the development of novel, reversible AChE inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3203-3215.
171. Camps, P.; El Achab, R.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): Highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2010**, *43*, 4657-4666.
172. 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*, 9031-9035.
173. Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; P.-Y., R. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. *Biochem. J.* **2013**, *453*, 393-399.
174. Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129-1143.
175. Dietis, N.; Guerrini, R.; Calo, G.; Salvadori, S.; Rowbotham, D. J.; Lambert, D. G. Simultaneous targeting of multiple opioid receptors: A strategy to improve side-effect profile. *Br. J. Anaesth.* **2009**, *103*, 38-49.
176. Vomasta, D.; Hogner, C.; Branda, N. R.; König, B. Regulation of human carbonic anhydrase I (hCAI) activity by using a photochromic inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644-7647.
177. Katsonis, N.; Lubomska, M.; Pollard, M.; Feringa, B.; Rudolf, P. Synthetic light-activated molecular switches and motors on surfaces. *Prog. Surf. Sci.* **2007**, *82*, 407-434.
178. Chen, X.; Wehle, S.; Kuzmanovic, N.; Merget, B.; Holzgrabe, U.; König, B.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of β -amyloid aggregation. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 377-389.
179. Kühhorn, J.; Hubner, H.; Gmeiner, P. Bivalent dopamine D2 receptor ligands: Synthesis and binding properties. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4896-4903.
180. Ciaccio, C.; Coletta, A.; De Sanctis, G.; Marini, S.; Coletta, M. Cooperativity and allostery in haemoglobin function. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 112-123.
181. Copeland, A. R. Cooperativity in enzyme catalysis. In: Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, **2000**, Auflage 2, Kapitel 12, 367-384.
182. Copeland, A. R. Tight binding inhibition. In: Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, **2013**, Auflage 2, Kapitel 7, 245-285.
183. Atack, J. R.; Perry, E. K.; Bonham, J. R.; Candy, J. M.; Perry, R. H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.* **1986**, *47*, 263-277.

-
184. Inestrosa, N. C.; Alavarez, A.; Pérez, 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 anionic site of the enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891.
185. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V. Insight into the kinetic of amyloid β (1-42) peptide self-aggregation: Elucidation of inhibitors' mechanism of action. *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 2152-2161.
186. LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404-410.
187. Galdeano, C.; Viayna, E.; Sola, I.; Formosa, X.; Camps, P.; Badia, A.; Clos, M. V.; Relat, J.; Ratia, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Salmona, M.; Minguillon, C.; Gonzalez-Munoz, G. C.; Rodriguez-Franco, M. I.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J.; Munoz-Torrero, D. Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 661-669.
188. Haviv, H.; Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Crystal packing mediates enantioselective ligand recognition at the peripheral site of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11029-11036.
189. Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Chow, E. S.-H.; Li, C. P.-L.; Wang, H.; Lieu, T. X.; Wong, H. S.; Pang, Y.-P. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 351-357.
190. Carlier, P. R.; Chow, E. S.-H.; Han, Y.; Liu, J.; Yazal, J. E.; Pang, Y.-P. Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: Investigating ligand-peripheral site interactions. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225-4231.
191. Carlier, P. R.; Du, D.-M.; Han, Y.; Liu, J.; Pang, Y.-P. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2335-2338.
192. Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y.; Decker, M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2905-2909.
193. *GOLDSUITE 5.1*, CCDC Software, www.ccdc.cam.ac.uk.
194. Neudert, G.; Klebe, G. DSX: A knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2731-2745.
195. Koshland Jr, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 98-104.
196. Leach, A. R. Molecular modelling: Principles and applications. *Pearson Education*, Essex, England, **2001**, Auflage 2.
197. Klebe, G. Molecular Modelling. In: Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**, Auflage 2, Kapitel 15, 225-237.
198. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E., III.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. AMBER 12, *University of California*, San Francisco, **2012**.
199. Case, D. A.; Cheatham, T. E., III.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
200. Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
201. Christen, M.; Hünenberger, P. H.; Bakowies, D.; Baron, R.; Bürgi, R.; Geerke, D. P.; Heinz, T. N.; Kastenholz, M. A.; Kräutler, V.; Oostenbrink, C.; Peter, C.; Trzesniak, D.; Van Gunsteren, W. F. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1719-1751.

202. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43-56.
203. Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19-25.
204. Zülicke, L. Molekulare Theoretische Chemie. *Springer Spektrum*, Wiesbaden, **2015**, Auflage 1.
205. Šali, A.; Blundell, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779-815.
206. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; O., D. R.; Shaw, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* **2010**, *78*, 1950-1958.
207. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
208. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision D.01, *Gaussian, Inc.*, Wallingford, CT, **2004**.
209. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
210. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247-260.
211. Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
212. Srinivasan, J.; Trevathan, M. W.; Case, D. Application of a pairwise generalized Born model to proteins and nucleic acids: Inclusion of salt effects. *Theor. Chim. Acta* **1999**, *101*, 426-434.
213. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
214. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781-1802.
215. Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4177-4189.
216. Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant-pressure molecular-dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4613-4621.
217. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N-Log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
218. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 33-38.
219. RCoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, **2013**.
220. Sarkar, D. Lattice: Multivariate data visualization with R. *Springer*, New York, **2008**.
221. RStudioTeam. RStudio: Integrated development for R, *RStudio, Inc.*, Boston, MA, **2015**, <http://www.rstudio.com/>.

-
222. Park, C. H.; Kim, S.-H.; Choi, W.; Lee, C.-J.; Kim, J. S.; Kang, S. S.; Suh, Y.-H. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 405-409.
223. Ueng, Y. F.; Don, M. J.; Peng, H. C.; Wang, S. Y.; Wang, J. J.; Chen, C. F. Effects of *Wu-chu-yu-tang* and its component herbs on drug-metabolizing enzymes. *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, *89*, 267-273.
224. Ueng, Y. F.; Ko, H. C.; Chen, C. F.; Wang, J. J.; Chen, K. T. Modulation of drug-metabolizing enzymes by extracts of a herbal medicine *Evodia rutaecarpa* in C57BL/6J mice. *Life Sci.* **2002**, *71*, 1267-1277.
225. Lee, S. H.; Son, J. K.; Jeong, B. S.; Jeong, T. C.; Chang, H. W.; Lee, E. S.; Jahng, Y. Progress in the studies on rutaecarpine. *Molecules* **2008**, *13*, 272-300.
226. Wang, G. J.; Wu, X. C.; Chen, C. F.; Lin, L. C.; Huang, Y. T.; Shan, J.; Pang, P. K. Vasorelaxing action of rutaecarpine: Effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1237-1244.
227. Noh, E. J.; Ahn, K. S.; Shin, E. M.; Jung, S. H.; Kim, Y. S. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression by dehydroevodiamine through suppression of NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* **2006**, *79*, 695-701.
228. Peng, J.-H.; Zhang, C.-E.; Wei, W.; Hong, X.-P.; Pan, X.-P.; Wang, J.-Z. Dehydroevodiamine attenuates tau hyperphosphorylation and spatial memory deficit induced by activation of glycogen synthase kinase-3 in rats. *Neuropharmacol.* **2007**, *52*, 1521-1527.
229. Loh, S. H.; Tsai, Y. T.; Lee, C. Y.; Chang, C. Y.; Tsai, C. S.; Cheng, T. H.; Lin, C. I. Antiarrhythmic effects of dehydroevodiamine in isolated human myocardium and cardiomyocytes. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *153*, 753-762.
230. Lin, L. C.; Li, S. H.; Wu, Y. T.; Kuo, K. L.; Tsai, T. H. Pharmacokinetics and urine metabolite identification of dehydroevodiamine in the rat. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1595-1604.
231. Wong, K. K. Lack of calcium-antagonizing activity of dehydroevodiamine on the chronotropic and ionotropic activities of mouse isolated atria. *Planta Med.* **1996**, *62*, 246-249.
232. Ahn, S.-H.; Jeon, S.-H.; Tsuruo, T.; Shim, C.-K.; Chung, S.-J. Pharmacokinetic characterization of dehydroevodiamine in the rat brain. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 283-292.
233. Zhao, Y.; Zhao, Y.; Zhou, X.; Gong, X. Development and validation of an UPLC-ESI-MS/MS method for determination of dehydroevodiamine, limonin, evodiamine, and rutaecarpine in *Evodiae Fructus*. *Pharmacogn. Mag.* **2014**, *10*, 374-383.
234. Zhao, N.; Li, Z.-L.; Li, D.-H.; Sun, Y.-T.; Shan, D.-T.; Bai, J.; Pei, Y.-H.; Jing, Y.-K.; Hua, H.-M. Quinolone and indole alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cytotoxicity against two human cancer cell lines. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 133-139.
235. Yang, M. C. M.; Wu, S.-L.; Kuo, J.-S.; Chen, C.-F. The hypotensive and negative chronotropic effect of dehydroevodiamine. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *182*, 537-542.
236. Haji, A.; Momose, Y.; Takeda, R.; Nakanishi, S. Increased feline cerebral blood flow induced by dehydroevodiamine hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 387-389.
237. Kim, H. J.; Shin, K. Y.; Chang, K.-A.; Ahn, S.; Choi, H. S.; Kim, H.-S.; Suh, Y.-H. Dehydroevodiamine-HCl improves stress-induced memory impairments and depression-like behavior in rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *18*, 55-59.
238. Park, E.-J.; Suh, Y.-H.; Kim, J.-Y.; Choi, S.; Lee, C.-J. Long-lasting facilitation by dehydroevodiamine-HCl of synaptic responses evoked in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroreport* **2003**, *14*, 399-403.
239. Park, C. H.; Lee, Y.-J.; Lee, S. H.; Choi, S. H.; Kim, H.-S.; Jeong, S.-J.; Kim, S. S.; Suh, Y. H. Dehydroevodiamine-HCl prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in rat models of cognitive disturbance. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 244-253.
240. Wang, H.-H.; Chou, C.-J.; Liao, J.-F.; Chen, C.-F. Dehydroevodiamine attenuates β -amyloid peptide-induced amnesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *413*, 221-225.
241. Asahina, Y.; Ohta, T. Überführung des Evodiamins in Rutaecarpin. *J. Pharm. Soc. Japan* **1926**, *530*, 293-299.

242. Ohta, T. 121. Supplement to the reseach of transferring evodiamine to rutaecarpine. *J. Pharm. Soc. Japan* **1945**, *65B*, 89-91.
243. Nakayama, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Straightforward asymmetric total synthesis of (+)-evodiamine, a major indole alkaloid in herbal medicine „Wu Zhu Yu“. *Heterocycles* **2008**, *76*, 861-865.
244. Wehle, S.; Espargaró, A.; Sabaté, R.; Decker, M. Investigation into the stability and reactivity of the pentacyclic alkaloid dehydroevodiamine and the benz-analog thereof. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 2535-2543.
245. Pachter, I. J.; Suld, G. The structure and synthesis of rhetsinine (hydroxyevodiamine). *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1680-1683.
246. Dong, G.; Wang, S.; Miao, Z.; Yao, J.; Zhang, Y.; Guo, Z.; Zhang, W.; Sheng, C. New tricks for an old natural product: Discovery of highly potent evodiamine derivatives as novel antitumor agents by systemic structure-activity relationship analysis and biological evaluations. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7593-7613.
247. Unsworth, W. P.; Kitsiou, C.; Taylor, R. J. K. An expedient protecting-group-free total synthesis of (\pm)-dievodiamine. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3302-3305.
248. Wang, S.; Fang, K.; Dong, G.; Chen, S.; Liu, N.; Miao, Z.; Yao, J.; Li, J.; Zhang, W.; Sheng, C. Scaffold diversity inspired by the natural product evodiamine: Discovery of highly potent and multitargeting antitumor agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6678-6696.
249. Whittaker, N. The synthesis of emetine and related compounds. Part VI. Improvements in the synthesis of 3-alkyl-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-9,10-dimethoxybenzo[a]quinolizin-2-ones and 3-alkyl-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydroindolo[2,3-a]quinolizin-2-ones. Formation of some related diazabicyclo[3,3,1]nonanes. *J. Chem. Soc. C.* **1969**, 85-89.
250. Beutner, G. L.; Kuethe, J. T.; Yasuda, N. A practical method for preparation of 4-hydroxyquinolinone esters. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7058-7061.
251. Datta, S.; Zhou, Y.-D.; Nagle, D. G. Comparative study of chromatographic medium-associated mass and potential antitumor activity loss with bioactive extracts. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 642-647.
252. Shamma, M.; Rahimizadeh, M. The identity of chileninone with berberrubine. The problem of true natural products vs. artifacts of isolation. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 398-405.
253. Guinaudeau, H.; Shamma, M. 4,5,6,6a-Tetrahydro-N-methyl-7-oxoaporphiniums salts. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1981**, *21*, 1118-1119.
254. Pin, F.; Comesse, S.; Sanselme, M.; Daïch, A. A domino N-amidoacylation/aldol type condensation approach to the synthesis of the topo-I inhibitor rosetacin and derivatives. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1975-1978.
255. Walport, L. J.; Hopkinson, R. J.; Schofield, C. J. Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 525-534.
256. Nicolaou, K. C.; Mathison, C. J. N.; Montagnon, T. New reactions of IBX: Oxidation of nitrogen and sulfur-containing substrates to afford useful synthetic intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4077-4082.
257. Christian, G. J.; Lobet, A.; Maseras, F. Mechanistic study of amine to imine oxidation in a dinuclear Cu(II) complex containing an octaaza dinucleating ligand. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 5977-5985.
258. Gómez, J.; García-Herbosa, G.; Cuevas, J. V.; Arnáiz, A.; Carbayo, A.; Munoz, A.; Falello, L.; Fanwick, P. E. Diastereospecific and diastereoselective syntheses of Ruthenium(II) complexes using N,N' bidentate ligands aryl-pyridin-2-ylmethyl-amine ArNH-CH₂-2-C₅H₄N and their oxidation to imine ligands. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 2483-2493.
259. Gopinath, K. W.; Govindachari, T. R.; Ramadas Rao, U. The alkaloids of *Zanthoxylum Rhetsa* DC. *Tetrahedron* **1960**, *8*, 293-295.
260. Danieli, B.; Palmisano, G. A new approach to quinazolinocarboline alkaloids: Synthesis of (+)-evodiamine, rutaecarpine and dehydroevodiamine. *Heterocycles* **1978**, *9*, 803-806.
261. Unsworth, W. P.; Kitsiou, C.; Taylor, R. J. K. Direct imine acylation: Rapid access to diverse heterocyclic scaffolds. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 258-261.

-
262. Bléger, D.; Schwarz, J.; Brouwer, A. M.; S., H. *o*-Fluoroazobenzenes as readily synthesized photoswitches offering nearly quantitative two-way isomerization with visible light. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20597-20600.
263. Bergman, J.; Bergman, S. Studies of rutaecarpine and related quinazolinocarboline alkaloids. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1246-1255.
264. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619-4626.
265. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *52*, 48-54.
266. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
267. Viayna, E.; Sola, I.; Bartolini, M.; De Simon, A.; Tapia-Rojas, C.; Serrano, F. G.; Sabaté, R.; Juárez-Jiménez, J.; Pérez, B.; Luque, F. J.; Andrisano, V.; Clos, M. V.; Inestrosa, N. C.; Muñoz-Torrero, D. Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2549-2567.
268. Sola, I.; Aso, E.; Frattini, D.; López-González, I.; Espargaró, A.; Sabaté, R.; Di Pietro, O.; Luque, F. J.; Clos, M. V.; Ferrer, I.; Muñoz-Torrero, D. Novel levetiracetam derivatives that are effective against the Alzheimer-like phenotype in mice: Synthesis, in vitro, ex vivo, and in vivo efficacy studies. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6018-6032.
269. Poupiana, S.; Esperagaró, A.; Galdeano, C.; Viayna, E.; Sola, I.; Ventura, S.; Muñoz-Torrero, D.; Sabaté, R. Thioflavin-S staining of bacterial inclusion bodies for the fast, simple, and inexpensive screening of amyloid aggregation inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1152-1159.
270. Wang, B.; Mai, Y. C.; Li, Y.; Hou, J. Q.; Huang, S. L.; Ou, T. M.; Tan, J. H.; An, L. K.; Li, D.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S. Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and related alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1415-1423.
271. Xiao, Y.; Xu, Y.; Cheon, H.-S.; Chae, J. Copper(II)-catalyzed hydroxylation of aryl halides using glycolic acid as a ligand. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5804-5809.
272. Martinot, T. A.; Austad, B. C.; Côté, A.; Depew, K. M.; Genov, D.; Greinier, L.; Helble, J.; Lescarbeau, A.; Nair, S.; Trudeau, M.; White, P.; Yu, L.-C. A design of experiments approach to a robust final deprotection and reactive crystallization of IPI-926, a novel hedgehog pathway inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1693-1702.
273. Shaik, A. A.; Nishat, S.; Andreana, P. R. Stereoselective synthesis of natural and non-natural thomsen-nouveau antigens and hydrazide derivatives. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2582-2585.
274. Sawatzky, E.; Bukowczan, J.; Decker, M. Investigation into selective debenzoylation and ring cleavage of quinazoline based heterocycles. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2973-2976.
275. Corey, E. J.; Gras, J.-L.; Ulrich, P. A new general method for protection of the hydroxyl function. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *11*, 809-812.
276. Huang, G.; Roos, D.; Stadtmüller, P.; Decker, M. A simple heterocyclic fusion reaction and its application for expeditious syntheses of rutaecarpine and its analogs. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3607-3609.
277. Jann, M. W. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **2000**, *20*, 1-12.
278. Perola, E.; Cellai, L.; Lamba, D.; Filocamo, L.; Brufani, M. Long chain analogs of physostigmine as potential drugs for Alzheimer's disease: New insights into the mechanism of action in the inhibition of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1343*, 41-50.
279. Herholz, K.; Weisenbach, S.; Kalbe, E. Deficits of the cholinergic system in early AD. *Neuropsychologia* **2008**, *46*, 1642-1647.
280. Copeland, A. R. Irreversible enzyme inactivators. In: Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, **2013**, Auflage 2, Kapitel 9, 345-382.
281. Siebert, C. D. Arzneistoffentwicklung: Das Bioisosterie-Konzept. *Chem. Unserer Zeit* **2004**, *38*, 320-324.

282. Luo, W.; Yu, Q.-s.; Kulkarni, S. S.; Parrish, D. A.; Holloway, H. W.; Tweedie, D.; Shafferman, A.; Lahiri, D. K.; Brossi, A.; Greig, N. H. Inhibition of human acetyl- and butyrylcholinesterase by novel carbamates of (-)- and (+)-tetrahydrofurobenzofuran and methanobenzodioxepine. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2174-2185.
283. Rivera-Becerril, E.; Joseph-Nathan, P.; Perez-Alvarez, V. M.; Morales-Rios, M. S. Synthesis and biological evaluation of (-)- and (+)-debromoflustramine B and its analogues as selective butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5271-5284.
284. Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and biological evaluation of novel tacrine derivatives and tacrine-coumarin hybrids as cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7073-7084.
285. Karlsson, D.; Fallarero, A.; Brunhofer, G.; Guzik, P.; Prinz, M.; Holzgrabe, U.; Erker, T.; Vuorela, P. Identification and characterization of diarylimidazoles as hybrid inhibitors of butyrylcholinesterase and amyloid beta fibril formation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 169-183.
286. Velec, H. F. G.; Gohlke, H.; Klebe, G. DrugScore^{CSD}-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6296-6303.
287. Bartolucci, C.; Stojan, J.; Yu, Q. S.; Greig, N. H.; Lamba, D. Kinetics of *Torpedo californica* acetylcholinesterase inhibition by bisnorcymserine and crystal structure of the complex with its leaving group. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 269-277.
288. Spitzmüller, A.; Velec, H. F. G.; Klebe, G. MiniMuDS: A new optimizer using knowledge-based potentials improves scoring of docking solutions. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1423-1430.
289. Molecular Operating Environment (MOE), 2014.09; *Chemical Computing Group Inc.*, 1010 Sherbooke St. West, Suite No. 910, Montreal, QC, H3A 2R7, Canada, **2014**.
290. Berdagué, P.; Herbert-Pucheta, J.-E.; Jha, V.; Panossian, A.; Leroux, F. R.; Lesot, P. Multi-nuclear NMR of axially chiral biaryls in polypeptide orienting solvents: Spectral discriminations and enantiorecognition mechanisms. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 9504-9517.
291. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-510.
292. Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. Inorganic chemistry. *Pearson Education Limited*, Edinburgh Gate, **2005**, Auflage 2.
293. Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. EMBOSS: the european molecular biology open software suite. *Trends Genet.* **2000**, *16*, 276-277.
294. Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370-30376.

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

***In silico* Studien zu Bis-Tacrinen,
Chinazolinen und Chinazolinonen sowie
Synthese von Chinazoliniumverbindungen
als Inhibitoren von Cholinesterasen**

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Sarah Wehle
