

## 209. Die Position 5 im Oxotremorin-Gerüst: Eine zentrale Stelle für die Steuerung der Aktivität am muscarinischen Rezeptor

von René Amstutz\*, Annemarie Clossel<sup>1)</sup> und Gernot Gmelin

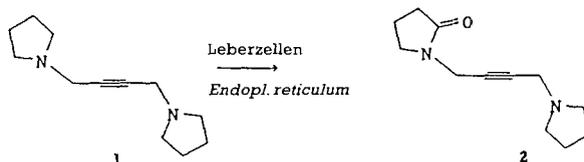
Sandoz AG, Präklinische Forschung, CH-4002 Basel

(30.IX.87)

### Position 5 at the Oxotremorine Skeleton as the Steering Position for Activity at the Muscarinic Receptors

Substitution of the CH<sub>2</sub> group at position 5 of oxotremorine (**2**) by electronegative atoms like O- or N-atom, or by sterically bulkier groups like methyl, *N*-formyl, or *N*-acetyl changes the pharmacological profile of oxotremorine drastically. The O- and N-analogues were potent but unselective (M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>) muscarinic agonists. The methyl analogue ((*R*)-BOK-1) is a muscarine antagonist which is 10 times more potent on the ganglion cervical superius (pA<sub>2</sub> = 9.3) than pirenzepine and is able to distinguish between the ileal and ganglion receptor by a factor of 100. The *N*-formyl derivative differentiates between the two receptors by a factor of 500 with a potency comparable to pirenzepine. The two M<sub>1</sub>-selective antagonists have higher affinity to the rat-ganglion receptors compared to the affinity to rat-cortex homogenate. The synthesis and the pharmacological activity of several new oxotremorine analogues are discussed.

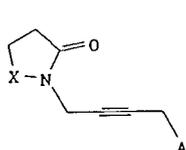
Die Entdeckung von Tremorin (**1**) und die Charakterisierung seines biologisch aktiven Metaboliten Oxotremorin (**2**) erlaubte eine intensive Untersuchung des zentralen cholinergen Mechanismus [1] [2]. Das anfängliche Interesse an dieser Verbindung galt in erster Linie der Suche nach Anticholinergika, welche in der *Parkinson*'schen Krankheit therapeutische Verwendung finden sollten [1]. Oxotremorin selbst ist ein in der Potenz an verschiedenen isolierten Organen dem natürlichen Transmitter Acetylcholin vergleichbarer muscarinischer Agonist [3] [4].



Durch Einführung von lipophilen, stark raumbeanspruchenden Substituenten wurde versucht, zentralwirksame muscarinische Antagonisten herzustellen. Im Gegensatz zu der sonst üblichen Substitution durch raumbeanspruchende Reste [5] ergab bereits die Einführung einer Me-Gruppe in der 5 bzw. 1 Position im Oxotremorin-Gerüst sehr potente und in der pharmakologischen Wirksamkeit dem Atropin überlegene muscarinische Agonisten [6].

<sup>1)</sup> Verschieden am 14.6.1987.

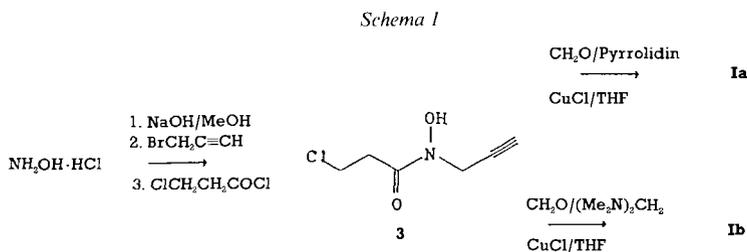
In jüngerer Zeit sind zentral wirksame selektive ( $M_1/M_2$ ) muscarinische Verbindungen wieder im Gespräch. Vor allem  $M_1$ -selektive Agonisten und/oder praesynaptische Antagonisten könnten bei fortgeschrittener Degeneration des cholinergen Systems substitutionstherapeutisch eingesetzt werden. Wie das Beispiel der Me-Gruppensubstitution gezeigt hat, ist die 5-Position eine entscheidende Stelle für die pharmakologische Aktivität. Durch systematische Substitution sowohl elektronischer als auch sterischer Art soll nun der Einfluss von Substituenten an dieser Stelle untersucht werden. (z. B. *McNeal-A343* ist ein Oxotremorin-Derivat, das nur am  $M_1$ -Rezeptor agonistisch wirkt) [18] [20]. Es werden die Synthesen und die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen **Ia, b**, **II**, **IIIa, b** und **IV–VI** beschrieben.



X	A = Pyrrolidinyl	A = N(Me) <sub>2</sub>
O	<b>Ia</b>	<b>Ib</b>
NH	<b>II</b>	
NMe	<b>IIIa</b>	<b>IIIb</b>
NCHO	<b>IV</b>	
NAc	<b>V</b>	
S	<b>VI</b>	

X	A = Pyrrolidinyl
CH <sub>3</sub>	Oxotremorin (2)
C=O	DKJ-22
CHMe	BOK-1

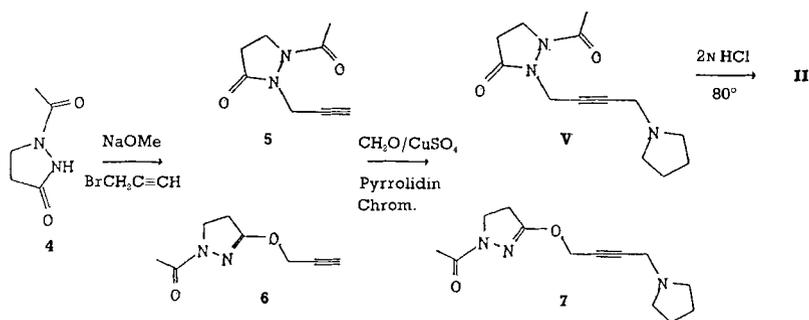
**Synthesen.** – Ausgehend von Hydroxylamin-hydrochlorid lässt sich die Verbindung **3** durch Umsetzen mit Propargyl-bromid und 3-Chlorpropionyl-chlorid in 34% Gesamtausbeute im Eintopfverfahren herstellen (*Schema 1*). Beim Versuch, das propargylierte Hydroxylamin-Zwischenprodukt zu isolieren, werden Verpuffungsreaktionen beobachtet. Anschliessende *Mannich*-Reaktion mit Pyrrolidin bzw. Bis(dimethylamino)methan unter Cu(I)-Katalyse ergibt in 50 und 34% Ausbeute die Verbindungen **Ia** bzw. **Ib**.



Die Alkylierung des bekannten Pyrazolidinons **4** [7] mit Propargyl-bromid und NaOMe als Base liefert neben dem gewünschten *N*-alkylierten Produkt **5** zu einem grossen Teil die *O*-alkylierte Verbindung **6** (*Schema 2*). Chromatographisch lässt sich **5/6** nicht trennen. Erst nach der *Mannich*-Reaktion mit Pyrrolidin und Paraformaldehyd werden die Verbindungen mittels Kieselgel-Chromatographie in **V** und **7** aufgetrennt. Die nicht-wässrige *Mannich*-Reaktion mit Dioxan oder Tetrahydrofuran als Lösungsmittel ergibt sehr schlechte Ausbeuten. Die Strukturen **V** und **7** lassen sich mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zuordnen (s. *Exper. Teil*). Erwärmen von **V** mit 2N HCl bei 80° liefert das freie Amin **II** in 67% Ausbeute, welches sich in das Formyl-Derivat **IV** überführen lässt (84%).

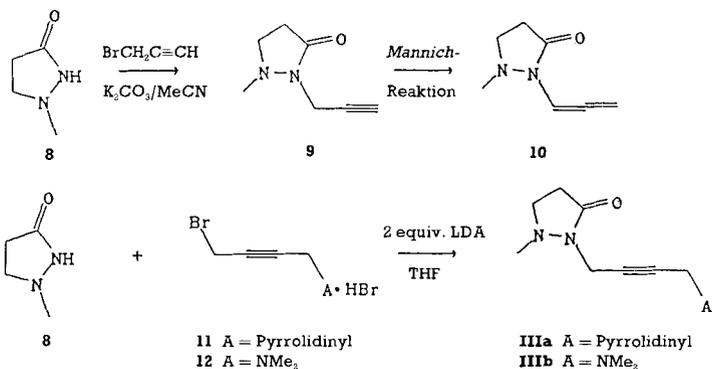
Versetzt man das bekannte Pyrazolidinon **8** [8] mit Propargyl-bromid in MeCN und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> als Protonenfänger, so erhält man in > 90% das *N*-alkylierte Derivat **9**. Im

Schema 2

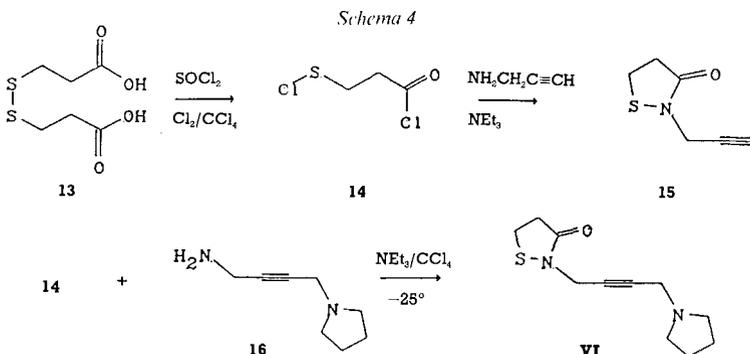


Gegensatz zur *N*-Acyl-Verbindung **4** wird nur das *N*-propargylierte Produkt **9** beobachtet. Bei der anschliessenden *Mannich*-Reaktion mit Pyrrolidin oder Bis(dimethylamino)methan unter Cu(I)-Katalyse in nichtwässrigem (Dioxan/THF) oder wässrigem Medium lässt sich nur das Produkt **10** in schlechten Ausbeuten isolieren. Hingegen ergibt die Alkylierung von **8** mit den Aminobutynyl-bromid-hydrobromiden **11** und **12** (aus den entsprechenden Aminobutynolen mit Thionyl-bromid hergestellt [9]) und 2 equiv. Lithiumdiisopropylamid (LDA) in THF in über 60% Ausbeute die gewünschten Oxotremorin-Derivate **IIIa** bzw. **IIIb** (Schema 3). Ein NOE-Experiment zeigt, dass ausschliesslich die *N*-alkylierte Verbindung vorliegt. Beim Einstrahlen auf Me-N(1) zeigen neben den Lactamring-Protonen auch die Methylen-H-Atome in der Seitenkette einen NOE. Auffällig ist auch die magnetische Nichtäquivalenz dieser Protonen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, was auf eine stark gehinderte Rotation um die (N–CH<sub>2</sub>)-Bindung schliessen lässt.

Schema 3



Um den Heterocyclus **VI** aufzubauen, wurde die bekannte oxidative Spaltung [10] einer (S–S)-Bindung mit Cl<sub>2</sub> verwendet. Die 3,3'-Dithiodipropionsäure (**13**) wird mit Thionyl-chlorid ins Dichlorid überführt. Anschliessende (S–S)-Spaltung mit Cl<sub>2</sub> ergibt das Sulfenyl-chlorid **14**, das nicht isoliert wird. Die Reaktion mit Propargylamin ergibt den Heterocyclus **15** in 35% Ausbeute. Die basischen Bedingungen einer *Mannich*-Reak-



tion von **15** mit Pyrrolidin und Formaldehyd ergeben nur unidentifizierbare Produkte. Der Umsatz des Acylchlorids **14** mit dem beschriebenen Amin **16** hingegen [11] führt zur gewünschten Verbindung **VI** in bescheidenen Ausbeuten. Das Thiazolidinon-Derivat **VI** ist aber in  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{MeOH}$  nicht stabil, ganz im Gegensatz zu **15**. Schon nach 5 min in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $^1\text{H-NMR}$ -Messung) wird eine hydrolytische Spaltung der (S–N)-Bindung festgestellt. Diese Instabilität lässt somit keine pharmakologischen Experimente zu.

**Pharmakologische Resultate und Diskussionen.** – Die pharmakologischen Wirkungen der Verbindungen **Ia, b**, **II**, **IIIa, b**, **IV**, **V** und **7** und der Vergleichsverbindungen wurden mit einer *in-vitro*-Testanordnung bestimmt. Die Affinität zu muskarinischen Bindungsstellen wurde durch Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]cis-2-Methyl-4-(trimethylaminomethyl)-1,3-dioxalan (= CD, [12] [15]) und [ $^3\text{H}$ ]Pirenzepin (= Pi, [13]) im Cortex des Rattenhirns bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die muskarinischen Rezeptoren im Cortex zu ca. 25% dem ‘ $\text{M}_2$ -Rezeptor’ (Pirenzepin-Affinität = 13 nM) und zu ca. 75% dem ‘ $\text{M}_1$ -Rezeptor’ (Pirenzepin-Affinität = 3 nM) [14] [19] entsprechen. CD ist ein potenter aber unselektiver muscarinischer Agonist [17], während Pirenzepin ein selektiver muscarinischer Antagonist ist [14]. Die Konzentration der verwendeten radioaktiven Liganden im Bindungsassay wurde so niedrig gewählt, dass nur hochaffine Bindungsstellen besetzt werden und der  $\text{IC}_{50}$ -Wert ungefähr dem  $\text{K}_i$ -Wert entspricht. Das Meerschweinchen-Ileum ist ein funktioneller Test, der eher einem ‘ $\text{M}_2$ -Rezeptor’-Modell entspricht. Das isolierte Ganglion *cervicale superius* der Ratte hingegen ist bekannt als ‘ $\text{M}_1$ -Rezeptor’-Modell [18].

Bei der Substitution der  $\text{CH}_2$ -Gruppe in 5-Stellung des Oxotremorin-Gerüsts durch ein O-Atom nimmt die Affinität sowohl an der CD- als auch an der Pi-Bindungsstelle gegenüber Oxotremorin leicht ab. Die am Ileum bestimmten  $\text{pD}_2$ -Werte von 6,6 und 6,2 für die Verbindungen **Ia** bzw. **Ib**, sind nur 3–8mal schwächer als für Oxotremorin. Die Abnahme der agonistischen Wirkung in den funktionellen Testen ist in der gleichen Grössenordnung wie der Affinitätsverlust an der CD-Bindungsstelle. Beide O-Analogen sind am Ganglion sehr potente Agonisten. Eine Selektivitätserhöhung – Ileum/Ganglion – im Vergleich zu Oxotremorin ist nicht festzustellen, obwohl vor allem die Affinität zur Pi-Bindungsstelle der Verbindung **Ib** um über einen Faktor 50 abnimmt (s. Tabelle).

Auch beim NH-Analogen **II** nimmt die Affinität zur CD- und die Pi-Bindungsstelle ab; parallel dazu erniedrigen sich die Aktivitäten am Ileum und Ganglion.

Ganz erstaunliche Effekte erhält man bei der weiteren Substitution am N-Atom durch eine Me-, Formyl- oder Ac-Gruppe. Die N-Methyl-Verbindungen **IIIa, b** verlieren die

Tabelle. *Cortex-Affinitäten und in-vitro-Wirkungen am Ileum und Ganglion cervicale superius von verschiedenen 5-substituierten Oxotremorin-Analogen*

Verbindung	A <sup>a)</sup>	pD <sub>27</sub> - Ileum	pA <sub>27</sub> - Ileum	pD <sub>27</sub> - Ganglion	pA <sub>27</sub> - Ganglion	CD-Cortex <sup>b)</sup> IC <sub>50</sub> (nM)	Pi-Cortex <sup>b)</sup> IC <sub>50</sub> (nM)
Oxotremorin (2) (S.D.) <sup>c)</sup>	Pyrr.	7,1 (0,1)		8,0 (0,2)		2,8 (0,72) (0,2)	113,0 (1,03) (15)
CD (S.D.)		7,5 (0,3)		7,8 (0,1)		6,4 (0,98) (1,35)	2100 (0,84) (100)
Pirenzepin (S.D.)			6,80 (0,2)		8,3 (0,1)	335,0 (0,57) (125)	4,25 (0,99) (0,07)
<i>McNeal-A343</i> (S.D.)		inaktiv		6,3 (0,3)		280,0 (0,93) (55)	1100 (1,1) (30)
DKJ 22 (S.D.)	Pyrr.		5,25			25,5 (0,81) (3,8)	353,0 (1,0) (43)
( <i>R</i> )-BOK-1 (S.D.)	Pyrr.		7,18 (0,1)		9,2 (0,4)	6,7 (0,90) (0,62)	7,8 (1,03) (0,27)
<b>Ia</b> (S.D.)	Pyrr.	6,6 (0,2)		7,3 (0,1)		4,5 (0,94) (0,2)	155,0 (1,1) (45)
<b>Ib</b> (S.D.)	NMe <sub>2</sub>	6,2 (0,1)		7,1 (0,1)		17,5 (0,88) (3,8)	6200 (0,76) (1050)
<b>II</b> (S.D.)	Pyrr.	5,6 (0,2)		6,3 (0,2)		41,0 (0,87) (2,0)	570,0 (1,0) (20,0)
<b>IIIa</b>	Pyrr.	inaktiv		inaktiv		> 10000	> 20000
<b>IIIb</b>	NMe <sub>2</sub>	inaktiv		inaktiv		> 10000	> 20000
<b>IV</b> (S.D.)	Pyrr.		5,20 (0,2)		7,9 (0,4)	135,0 (0,93) (15)	155,0 (0,92) (5,0)
<b>V</b> (S.D.)	Pyrr.		6,30 (0,4)		6,9 (0,3)	350,0 (0,89) (30,0)	47,5 (0,92) (5,7)
<b>7</b> (S.D.)	Pyrr.	inaktiv		inaktiv		3350 (0,86) (40,0)	4000 (1,05) (40,0)

<sup>a)</sup> Pyrr. = 1-Pyrrolidinyl.

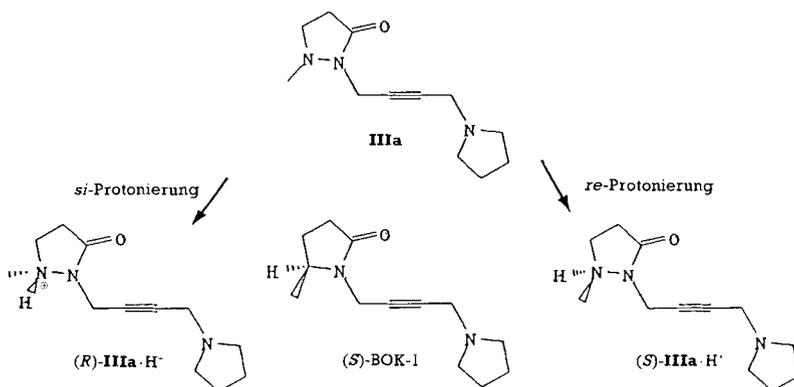
<sup>b)</sup> In Klammern Hill-Koeffizienten.

<sup>c)</sup> Für die IC<sub>50</sub>-Werte sind die Abweichungen in S. E. M. angegeben.

<sup>d)</sup> (*R*)-BOK-1 depolarisiert das Ganglion in Konzentrationsbereichen von 0,01–0,1 µM.

Affinität zu den Bindungsstellen. Dementsprechend sind sie auch an den funktionellen Testen inaktiv. Dies ist umso erstaunlicher, da die Verbindung **IIIa** isosterisch mit BOK-1 ist, einem muscarinischen Antagonisten, der *in vivo ca.* 2mal stärker antagonistisch wirkt wie Atropin [6] und Affinitäten zu den Bindungsstellen im nanomolaren Bereich aufweist. Wie das Beispiel **II** zeigt, kann nicht die zusätzliche Protonierung am N-Atom den totalen Verlust der Affinität erklären. Sowohl **II** als auch **IIIa** sind unter physiologischen Bedingungen doppelt protoniert. Die Tieffeldverschiebung der (CH<sub>2</sub>-N-CO)-Protonen im <sup>1</sup>H-NMR einerseits und die Salzbildung mit Säuren andererseits (Verhältnis Säure/Base 2:1, s. *Exper. Teil*) sind genügend Hinweise, dass **II** und **IIIa** in H<sub>2</sub>O doppelt protoniert vorliegen. Die Art der Protonierung könnte aber einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von **IIIa** haben. Im Gegensatz zu **II** entsteht bei der Protonierung von **IIIa** ein chirales Zentrum (s. *Schema 5*). Vom isosterischen BOK-1 ist bekannt, dass nur das (*R*)-Enantiomere potente antimuskarinische Wirkung zeigt [6]. (Die Restaktivität vom (*S*)-Enantiomeren stammt von der Verunreinigung durch das Spiegelbild: *ca.* 90% ee.) Durch die diastereoisomere Wechselwirkung von **IIIa** mit der chiralen Umgebung eines

Schema 5

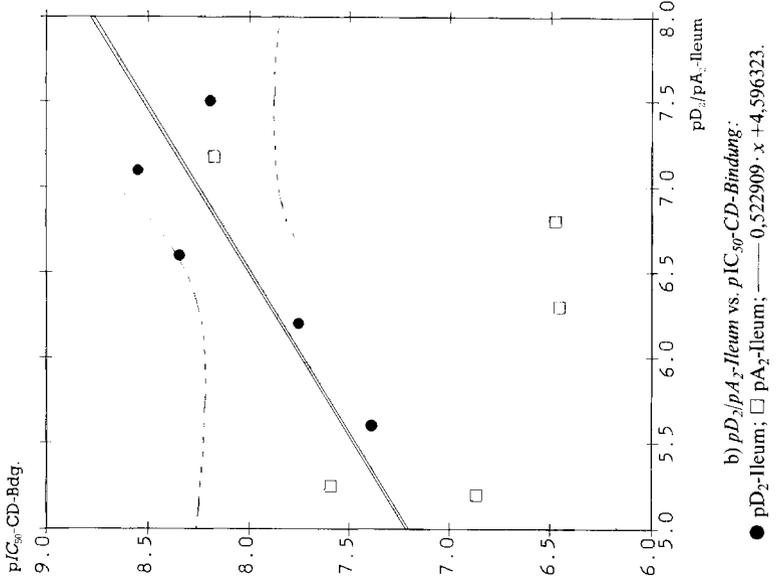
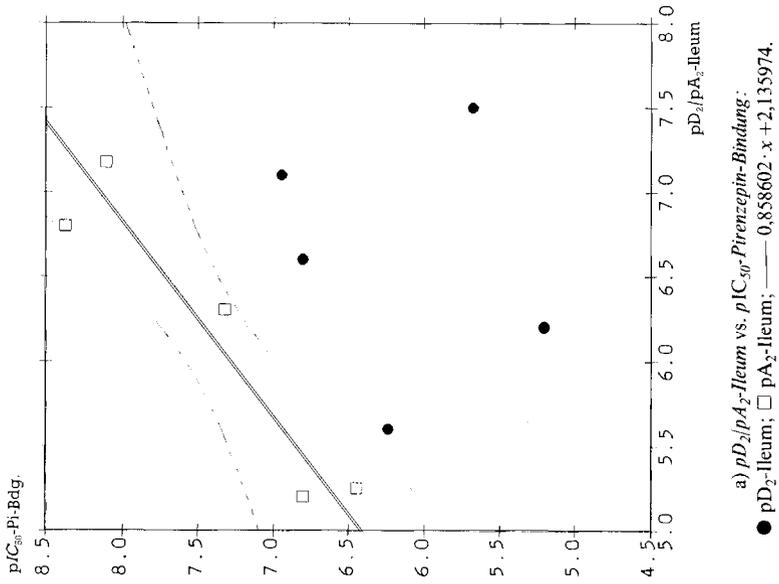


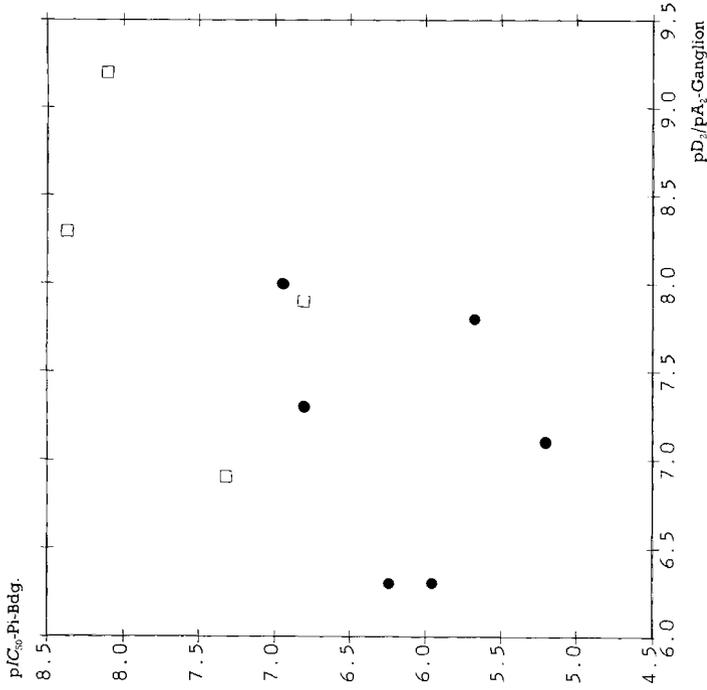
Rezeptors kann man annehmen, dass von den beiden protonierten Verbindungen (*(R)*- und (*(S)*-IIIa·H<sup>+</sup> eines bevorzugt gebildet wird. Die Inaktivität von IIIa könnte somit mit der selektiven Protonierung von der *re*-Seite erklärt werden. Das so gebildete (*(S)*-IIIa·H<sup>+</sup> ist isosterisch mit dem inaktiven (*(S)*-BOK-1.

Vergrossert man die Reste am N-Atom (Verbindungen IV und V), so nimmt die Affinität zu den Bindungsstellen wieder zu. Schon die höhere Affinität zu den Pi-Bindungsstellen im Vergleich zur CD-Affinität ist ein Hinweis, dass es sich um Antagonisten handeln könnte. Das Ac-Derivat V wirkt in den funktionellen Testen wie ein mittlerer unselektiver kompetitiver Antagonist mit mittlerer Affinität zur CD- aber hoher Affinität zur Pi-Bindungsstelle. Mit einem pA<sub>2</sub>-Wert von 7,9 am Ganglion ist die Verbindung IV nur 2,5mal schwächer als Pirenzepin selbst, dem bisher selektivsten 'M<sub>1</sub>-Antagonisten'. Am Ileum – dem 'M<sub>2</sub>-Test' – ist die Substanz aber 40mal schwächer und in der antagonistischen Wirkung mit dem (C=O)-Analogen DKJ 22 vergleichbar. Das Verhältnis pA<sub>2</sub>-Ileum/pA<sub>2</sub>-Ganglion beträgt 500. Das *N*-Formyl-Analogue IV ist somit 15mal selektiver als Pirenzepin bei annähernd gleichem pA<sub>2</sub>-Wert am *Ganglion cervicale superius*. Bemerkenswert ist auch die schwache Affinität zur Pirenzepin-Bindungsstelle im Cortex von nur 155 nmol, was einem max. pA<sub>2</sub>-Wert von 6,8 am Ganglion entsprechen sollte. Verbindung IV scheint somit eine höhere Affinität zum 'Ganglion-Rezeptor' zu haben.

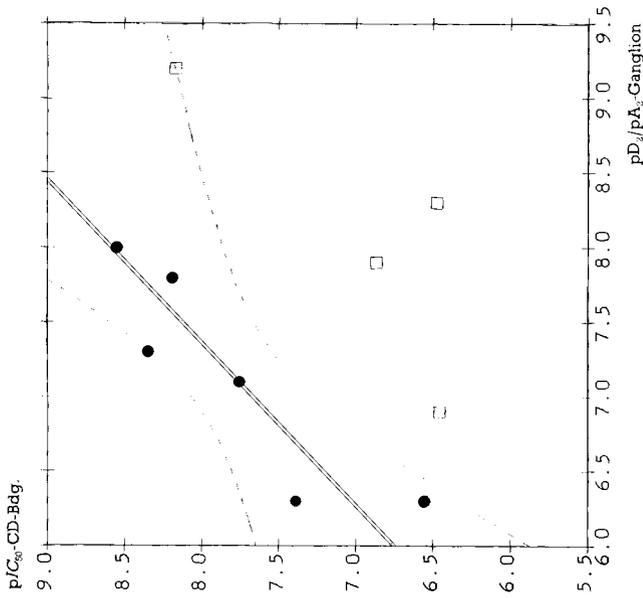
Auch (*(R)*-BOK-1 scheint ein 'Ganglion-selektiver' Antagonist zu sein. Mit einer Selektivität (pA<sub>2</sub>-Ileum/pA<sub>2</sub>-Ganglion) von 100 ist die Verbindung mehr als 3mal so selektiv wie Pirenzepin und zudem noch 8mal potenter am Ganglion (s. *Tabelle*). Es zeigt sich aber, dass die Verbindung *allein* im Konzentrationsbereich 0,01–0,1 μmol das Ganglion zu depolarisieren vermag. Der maximale Effekt beträgt etwa 25% desjenigen von Muscarin. (*(R)*-BOK-1 ist somit ein äusserst schwacher partieller Agonist [21] am Ganglion und ein mittlerer kompetitiver Antagonist am Ileum.

Von den vier am Ganglion untersuchten Verbindungen, welche die Wirkung von Muscarin antagonisieren können, zeigen zwei – Pirenzepin und V – die von den Bindungsdaten im Cortex (Pi-Bindung) erwartete Aktivität, die anderen zwei hingegen – (*(R)*-BOK-1 und IV – sind 10mal potenter am funktionellen Test ('Ganglion-Selektivität').





d)  $pD_2/pA_2$ -Ganglion vs.  $pIC_{50}$ -Pirenzepin-Bindung:  
 ●  $pD_2$ -Ganglion; □  $pA_2$ -Ganglion.



c)  $pD_2/pA_2$ -Ganglion vs.  $pIC_{50}$ -CD-Bindung:  
 ●  $pD_2$ -Ganglion; □  $pA_2$ -Ganglion; —  $0.91487 \cdot x + 1.27237$ .

Figur. Graphische Gegenüberstellung der Affinitäten im Cortex mit den Affinitäten am Ileum und Ganglion cervicale superius

Obwohl die Affinitäten zur Pi-Bindungsstelle im Cortex ( $M_1$ -Gewebe) gemessen wurden, zeigen die  $pA_2$ -Werte der Antagonisten am Ileum ( $M_2$ -Gewebe) eine gute Korrelation mit den  $pIC_{50}$ -Werten im Cortex (s. *Figur a*). Mit einer Steigung von 0,86 ergibt sich nahezu eine (1:1)-Beziehung. Hingegen besteht bei Agonisten keine Beziehung zwischen der Wirkung am Ileum und der Affinität zur Pirenzepin-Bindungsstelle. Eine wenn auch nicht (1:1)-Korrelation scheint zwischen der Affinität zur Agonisten-Bindungsstelle und den  $pD_2$ -Werten am Ileum zu bestehen (s. *Figur b*). Dies ist umso erstaunlicher, da im funktionellen Test die 'Efficacy' und die Rezeptor-Belegung der einzelnen Agonisten mit eingeht [21]. Auch die  $pD_2$ -Werte am *Ganglion cervicale superius* korrelieren mit dem  $pIC_{50}$ -Werten der Agonisten-Bindungsstelle im Cortex (s. *Figur c*), wobei in diesem Vergleich nahezu eine (1:1)-Beziehung festgestellt werden kann. Überhaupt keine Verknüpfung sowohl für die Agonisten als auch für die Antagonisten ist zwischen der Affinität zur Pi-Bindungsstelle im Cortex und den Ganglion-Wirkungen ersichtlich (s. *Figur d*).

Diese Daten zeigen, dass durch Substitution in der 5-Stellung des Oxotremorins (**2**) das pharmakologische Profil stark modifiziert werden kann. Verbindungen mit Heteroatomen wie O- oder N-Atom an Stelle der  $CH_2$ -Gruppe sind immer noch recht potente muscarinische Agonisten, die aber wie Oxotremorin selbst nicht zwischen  $M_1$ - und  $M_2$ -Subtypen von muscarinischen Rezeptoren differenzieren können. Lipophile Gruppen wie Me oder stärker raumbeanspruchende Substituenten wie *N*-Acetyl und *N*-Formyl führen zu zum Teil hoch potenten und vor allem sehr selektiven (Ileum/Ganglion) Antagonisten.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Destillationen: Kurzwegdestillationsapparatur oder Kugelrohröfen (*GKR-50*; *Büchi*). Säulenchromatographie: Silicagel 0,063–0,2 mm. Schmp.: nicht korrigiert; in offenen Kapillaren im Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli (*Büchi*; CH-Pat. 320.388). IR ( $cm^{-1}$ ): *Perkin Elmer 720*.  $^1H$ -NMR: *Bruker WH360* (360 MHz), *Bruker HX90*, *Varian EM360A*; chemische Verschiebungen in  $\delta$ -Werten [ppm] bezüglich Tetramethylsilan als internem Standart ( $= 0$  ppm), Kopplungskonstanten *J* in Hz.  $^{13}C$ -NMR: *Bruker WH360* (360 MHz). MS ( $m/z$  (%)): *AEI MS30* und *Varian MAT 212*, Spannung 70 EV. FAB-MS: Thioglycerin als Matrix.

2-[4'-(*Pyrrrolidin-1''-yl*)-2'-*butinyl*]isoxazolidin-3-on (**1a**). Bei RT. wurden 12 g (172 mmol)  $NH_2OH \cdot HCl$  zusammen mit 69 g (172 mmol) NaOH-Plättchen in 250 ml MeOH 1 h gerührt. Dann tropfte man in die weisse Suspension innert 15 min 10,23 g (86 mmol) 2-Propinyl-bromid. Nach 1 h Rühren bei RT. versetzte man die bräunliche Suspension mit 10 ml Pyridin. Bei  $-78^\circ$  wurden 10,9 g (86 mmol) 3-Propionyl-chlorid innert 15 min zutropft. Nach langsamem Erwärmen auf RT. wurde noch 1 h gerührt und dann eingedampft. Den Rückstand löste man in 150 ml 2N HCl und extrahierte die wässr. Phase 4mal mit 75 ml  $CH_2Cl_2$ . Die vereinigten org. Phasen wurden getrocknet ( $Na_2SO_4$ ) und eingedampft: 4,8 g 3-Chloro-*N*-hydroxy-*N*-(2-propinyl)propionamid (**3**) als farblose Flüssigkeit.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 60 MHz): 9,3 (br. s, NH); 4,45 (*d*,  $J = 2$ ,  $CH_2C \equiv CH$ ); 3,75 (*t*,  $J = 6$ ,  $CH_2Cl$ ); 3,65 (*s*, OH); 3,0 (*t*,  $J = 6$ ,  $CH_2CO$ ); 2,35 (*t*,  $J = 2$ ,  $CH_2C \equiv CH$ ).

Amid **3** wurde ohne Reinigung direkt einer *Mannich*-Reaktion unterworfen: 2 g (12,3 mmol) **3**, 0,5 g (16,7 mmol) Paraformaldehyd, 1,5 ml (18,2 mmol) Pyrrrolidin und 50 mg CuCl wurden 2 h unter  $N_2$  in 25 ml THF unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abziehen des Lsgm. wurde das braungrüne Öl mit 50 ml 2N  $Na_2CO_3$  versetzt und 3mal mit 50 ml  $CH_2Cl_2$  extrahiert. Nach dem Trocknen der org. Phase ( $Na_2SO_4$ ) wurde das Öl mittels Säulenchromatographie ( $CH_2Cl_2/MeOH$  95:5,  $R_f$  0,4) gereinigt: 1,1 g **1a** (50%). Schmp. 35–38°. IR ( $CH_2Cl_2$ ): 1702s (CO).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 90 MHz): 4,35 (*t*,  $J = 8$ , 2 H-C(5)); 4,3 (*t*,  $J = 2$ , 2 H-C(1'')); 3,4 (*t*,  $J = 2$ , 2 H-C(4'')); 2,75 (*t*,  $J = 8$ , 2 H-C(4)); 2,55 (*m*, 2 H-C(2''), 2 H-C(5'')); 1,75 (*m*, 2 H-C(3''), 2 H-C(4'')). Anal. ber. für  $C_{11}H_{16}N_2O_2$  (208,3): C 63,4, H 7,7, N 13,5; gef.: C 63,4, H 8,0, N 13,2.

2-[4'-(Dimethylamino)-2'-butinyl]jisoxazolidin-3-on (**1b**). Unter N<sub>2</sub> wurden 3,4 g (21 mmol) 3, 100 mg CuCl, 10 ml (73 mmol) Bis(dimethylamino)methan in 40 ml THF 2 h unter Rückfluss gerührt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgte analog zu **1a**: 1,3 g (34%) leicht gelbliche Flüssigkeit. Zur besseren Charakterisierung wurde **1a**·HCl durch Fällen mit HCl-Lsg. in Et<sub>2</sub>O hergestellt. Schmp. 113–116°. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, freie Base): 2200 (br., NH), 1705s (C=O). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz, freie Base): 4,35 (t, J = 7, 2 H–C(5)); 4,25 (br. s, 2 H–C(1')); 3,3 (br. s, 2 H–C(4')); 2,75 (t, J = 7, 2 H–C(4)); 2,25 (s, Me<sub>2</sub>N). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz; Salz): 13 (br., NH); 4,4 (t, J = 8, 2 H–C(5)); 4,35 (t, J = 2, 2 H–C(1')); 4,0 (br. s, 2 H–C(4')); 2,8–3,0 (m, 2 H–C(4), Me<sub>2</sub>N). Anal. ber. für C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O (218,7): C 49,4, H 6,9, Cl 16,2, N 12,8; gef.: C 48,9, H 6,9, Cl 16,7, N 12,5.

1-Acetyl-2-(2-propinyl)pyrazolidin-3-on (**5**) und 1-Acetyl-4,5-dihydro-3-[(2-propinyl)oxy]-1H-pyrazol (**6**). Zu einer Lsg. von 0,79 g (34,34 mmol) Na in 50 ml H<sub>2</sub>O-freiem MeOH gab man 4,0 g (31,2 mmol) 1-Acetylpyrazolidin-3-on (**7**) (**4**). Nach 5 min Rühren bei RT. wurde die Lsg. eingedampft und der Rückstand in 50 ml 2-Butanon suspendiert. Die Suspension wurde mit 2,47 ml (32,8 mmol) 2-Propinyl-bromid versetzt und 8 h unter Rückfluss gekocht, dann eingedampft und mit 100 ml MeOH versetzt. Nach Abdampfen wurde der Rückstand in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> digeriert und das NaBr abfiltriert. Nach Abdampfen des Lsgm. erhielt man 4,9 g **5/6** als gelbliche Kristalle, welche chromatographisch nicht aufgetrennt werden konnten. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz): 4,8–4,6 (d, J = 2, 2 H, CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>NCO); 4,3 3,85 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>NAc); 3,1–2,7 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CO); 2,6, 2,25 (t, J = 2, 1 H, C≡CH); 2,1 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO).

1-Acetyl-2-[4'-(pyrrolidin-1"-yl)-2'-butinyl]pyrazolidin-3-on (**V**) und 1-Acetyl-4,9-dihydro-3-[(4'-(pyrrolidin-1"-yl)-2'-butinyl)oxy]-1H-pyrazol (**7**). Eine Lsg. von 4,5 ml (54,2 mmol) Pyrrolidin in 30 ml H<sub>2</sub>O wurde mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Eiskühlung auf pH 9 gepuffert. Man versetzte die Lsg. nun mit 5,86 ml (72,2 mmol) Formalin-Lsg. (35%), 7,5 g **5/6** sowie 375 mg CuSO<sub>4</sub> in 4 ml H<sub>2</sub>O. Mit Pyrrolidin wurde die grüne Lsg. auf pH 8,5 gestellt und 10 min auf 80° erwärmt. Die nun gelbbraune Lsg. wurde in 75 ml ges. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. gegossen und mit festem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gesättigt. Nach 4mal Extraktion mit 50 ml Et<sub>2</sub>O wurden die vereinigten org. Phasen getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und eingedampft. Das braune Harz (10,1 g) wurde durch Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) in **V** und **7** aufgetrennt: 3 g (26,7%) **V** als gelbes Öl und 2,1 g (18,6%) **7** als Öl. Verbindung **V** wurde aus Et<sub>2</sub>O umkristallisiert, Schmp. 58–60°, und das Fumarat von **7** aus EtOH, Schmp. 164–166°.

**7**: IR: 1670s (br., CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): 4,82 (t, J = 2, 2 H–C(1')); 4,0 (t, J = 10,8, 2 H–C(5)); 3,45 (t, J = 2, 2 H–C(4')); 2,9 (t, J = 10,8, 2 H–C(4)); 2,63 (m, 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 2,18 (s, Ac); 1,80 (m, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, Zuordnung mittels H, C-Korrelation): 168 (1 C, C=O); 164 (1 C, C(3)); 84 (1 C, C(2'')); 78 (1 C, C(3'')); 58 (1 C, C(1'')); 52,8 (2 C, C(2''), C(5'')); 44,8 (1 C, C(5)); 43,2 (1 C, C(4'')); 30,0 (1 C, C(4)); 23,8 (2 C, C(3''), C(4'')); 21,2 (1 C, CH<sub>3</sub>CO). MS: 250 (3,4, M<sup>+</sup>), 179 (1,7), 122 (38), 121 (90), 120 (52), 94 (43), 84 (43), 71 (21), 70 (100). Anal. ber. für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·1,5 Fumarsäure (423): C 53,9, H 5,9, N 9,9; gef.: C 53,9, H 5,9, N 9,9.

**V**: IR: 1720s (CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): 4,58 (br. s, 2 H–C(1')); 4,10 (t, J = 9,7, 2 H–C(5)); 3,38 (t, J = 1,5, 2 H–C(4')); 2,65 (t, J = 9,7, 2 H–C(4)); 2,55 (m, 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 2,18 (s, Ac); 1,8 (m, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). <sup>13</sup>C-NMR ((D<sub>6</sub>)DMSO): 174 (1 C, CH<sub>3</sub>CO); 170 (C(3)); 80 (C(2'')); 78 (1 C, C(3'')); 51,5 (2 C, C(2''), C(5'')); 47 (C(1'')); 42,5 (C(4'')); 36 (C(5)); 31 (C(4)); 23,5 (2 C, C(3''), C(4'')); 21 (CH<sub>3</sub>CO). MS: 250 (14, M<sup>+</sup>), 248 (16), 207 (36), 206 (34), 165 (34), 123 (72), 122 (80), 121 (94), 120 (80), 108 (68), 84 (52), 71 (100), 70 (100). Anal. ber. für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (249,3): C 62,6, H 7,7, N 16,9; gef.: C 62,4, H 7,4, N 16,8.

2-[4'-(Pyrrolidin-1"-yl)-2'-butinyl]pyrazolidin-3-on (**II**). Eine Lsg. von 5,0 (20 mmol) **V** in 50 ml 2N HCl wurde 10 min bei 80° gerührt. Dann wurde die Lsg. mit festem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gesättigt und 4mal mit 50 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und eingedampft. Nach der Reinigung durch Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) erhielt man 2,1 g (67,5%) gelbes harziges **II**. Mit 2 equiv. Fumarsäure wurde das Fumarat-Salz hergestellt und aus EtOH umkristallisiert. Schmp. 115–118°. IR (freie Base): 1690s (CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz; freie Base): 4,7–4,6 (br. s, NH); 4,28 (br. s, 2 H–C(1')); 3,5–3,35 (br. m, 2 H–C(4'), 2 H–C(5)); 2,65–2,5 (m, 2 H–C(4), 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 1,8 (m, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). MS: 207 (42, M<sup>+</sup>), 123 (60), 85 (20), 71 (100), 70 (88). Anal. ber. für C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O·2 Fumarsäure (439): C 51,9, H 5,7, N 9,6, O 32,8; gef.: C 51,4, H 5,8, N 9,4, O 33,3.

1-Formyl-2-[4'-(pyrrolidin-1"-yl)-2'-butinyl]pyrazolidin-3-on (**IV**). Eine Lsg. aus 2,19 ml (22,45 mmol) Ac<sub>2</sub>O und 0,895 ml (23,7 mmol) HCOOH wurde 1,5 h bei 60° gerührt. Bei 0° gab man 1,2 g (5,78 mmol) **II** hinzu und rührte noch 1 h bei 0°. Dann wurde die Lsg. 10 min auf 60° erwärmt und eingedampft. Den Rückstand verteilte man zwischen ges. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Nach 4mal Extraktion der H<sub>2</sub>O-Phase wurden die vereinigten org. Phasen getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und eingedampft. Nach Reinigung des Produkts durch eine Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1) erhielt man 1,4 g (84%) **IV** als gelbes Harz. Mit Fumarsäure wurde das Fumarat hergestellt und aus EtOH umkristallisiert. Schmp. 107–108°. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; freie Base): 1730s (CO), 1690s (CHO). <sup>1</sup>H-NMR ((D<sub>6</sub>)DMSO, 360 MHz, 150°; freie Base): 8,3 (s, CHO); 4,48 (t, J = 2, 2 H–C(1'')); 3,95 (t, J = 7,5, 2 H–C(5)); 3,34

(*t*, *J* = 2, 2 H–C(4'')); 2,6 (*t*, *J* = 7,5, 2 H–C(4)); 2,55 (*m*, 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 1,7 (*m*, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). MS: 234 (8, *MH*<sup>+</sup>), 207 (12), 151 (13), 123 (48), 122 (28), 121 (56), 119 (34), 109 (42), 98 (36), 71 (52), 70 (100). Anal. ber. für C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·Fumarsäure (351,36): C 54,7, H 6,0, N 12,0; gef.: C 54,3, H 6,1, N 12,0.

**1-Methyl-2-[4'-(pyrrolidin-1''-yl)-2'-butinyl]pyrazolidin-3-on (IIIa).** Zu einer Lsg. von 5,6 ml (40 mmol) H<sub>2</sub>O-freiem (i-Pr)<sub>2</sub>NH in 100 ml abs. THF tropfte man bei 0° unter Ar 25 ml (40 mmol) 1,6*n* BuLi in Hexan. Nach 15 min Rühren gab man 2,0 g (20 mmol) Lactam **8** [8] in 10 ml abs. THF bei –78° hinzu. Nach 1 h Rühren bei –78° drückte man mit Ar-Überdruck (inverse Zugabe) die Lsg. durch einen Teflon-Schlauch (Ø 2 mm) in eine auf –78° gekühlte Lsg. von 5,66 g (20 mmol) Amin-hydrobromid **11** [9] in 50 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Man rührte 30 min bei –78°, liess dann auf RT. erwärmen und rührte noch 1 Nacht bei RT. Das Lsgm. wurde abgedampft, und den Rückstand reinigte man mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/konz. NH<sub>3</sub> 7:3:0.1): 2,7 g (61%) braunes harziges **IIIa**. IR: 2800<sub>w</sub> (N–C–H), 1620<sub>s</sub> (CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): 4,18 (*d*, *J*<sub>gem</sub> = 15, *J*(1',4') = 2, 1 H–C(1'')); 4,03 (*dt*, *J*<sub>gem</sub> = 15, *J*(1',4') = 1,5, 1 H–C(1'')); 3,98 (*m*, 1 H–C(5)); 3,63 (*m*, 1 H–C(5)); 3,48 (*t*, *J* = 1,5, 2 H–C(4'')); 3,25 (*s*, MeN); 2,83 (*m*, 2 H–C(4)); 2,42 (*m*, 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 1,85 (*m*, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). Anal. ber. für C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O·1,8 Naphthalindisulfonsäure (509,6): C 51,9, H 5,3, N 8,2, O 22,0, S 12,6; gef.: C 51,3, H 5,5, N 8,2, O 22,3, S 12,5.

Naphthalindisulfonat-Salz von **IIIa**: Schmp. 226–228°.

**1-Methyl-2-[4'-(dimethylamino)-2'-butinyl]-1-methylpyrazolidin-3-on (IIIb).** In Analogie zu **IIIa** wurde **IIIb** aus Amin **12** hergestellt: 2,9 g (74%) bräunliches harziges **IIIb**. Mit Maleinsäure wurde das Bis(hydrogenmaleat) hergestellt. Schmp. 117–118°. IR (freie Base): 1610 (CO). <sup>1</sup>H-NMR ((D<sub>6</sub>)DMSO, 360 MHz; Salz): 4,63, 4,57 (*dt*, *J*<sub>gem</sub> = 15, *J*(1',4') = 1,5, je 1 H, 2 H–C(1'')); 4,15–3,95 (*m*, 2 H–C(5)); 4,08 (*t*, *J* = 1,5, 2 H–C(4'')); 3,32 (*s*, MeN); 3,0–2,85 (*m*, 2 H–C(4)); 2,72 (*s*, Me<sub>2</sub>). FAB-MS: 196 (*MH*<sup>+</sup>). EI-MS: 195 (4, *M*<sup>+</sup>), 98 (31), 96 (39), 95 (58), 72 (40), 58 (100). Anal. ber. für C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O·2 Maleinsäure (427,41): C 50,6, H 5,9, N 9,8, O 33,7; gef.: C 50,7, H 5,7, N 9,8, O 33,7.

**1-Methyl-2-(2-propinyl)pyrazolidin-3-on (9).** Zu einer Suspension aus 1,38 g (10 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,0 g (10 mmol) **8** [8] und 40 ml MeCN tropfte man bei RT. 0,754 ml (10 mmol) 2-Propinyl-bromid in 1 ml MeCN. Die Suspension wurde 14 h gerührt, das Lsgm. abgedampft und der Rückstand in 40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:1 gelöst. Nach Filtration und Abdampfen des Lsgm. erhielt man 1,4 g braunes Harz, das mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:1) gereinigt wurde: 1,3 g (94%) weisse Kristalle, Schmp. 129–131°. IR (KBr): 2250<sub>m</sub> (C≡CH), 1600<sub>s</sub> (C=O). <sup>1</sup>H-NMR ((D<sub>6</sub>)DMSO, 360 MHz): 4,2 (*m*, 2 H–C(1'')); 3,8–3,69 (*m*, 2 H–C(5)); 3,78 (*br. s*, H–C(3'')); 3,18 (*s*, MeN); 2,52 (*t*, *J* = 12, 2 H–C(4)). <sup>13</sup>C-NMR: 177,06 (CO); 79,87 (C(3'')); 74,67 (C(2'')); 60,67 (C(5)); 57,24 (C(1'')); 54,05 (MeN); 32,75 (C(4)). MS: 139 (8, *MH*<sup>+</sup>), 138 (75, *M*<sup>+</sup>), 99 (100, *M*<sup>+</sup> – CH<sub>2</sub>C≡CH), 95 (94), 83 (58), 69 (18), 55 (58).

**2-(2-Propinyl)isothiazolidin-3-on (15).** Zu einer Lsg. von 1 g (4,04 mmol) Dichlorid von **13** in 10 ml CCl<sub>4</sub> tropfte man innert 5 min bei –20° 3,4 ml (4,04 mmol) 1,2*N* Cl<sub>2</sub> in CCl<sub>4</sub>. Nach 5 min Rühren bei –20° tropfte man diese Lsg. bei –20° zu einer Mischung aus 0,55 ml (8,08 mmol) 2-Propinylamin, 2,82 ml (20,2 mmol) Et<sub>3</sub>N und 30 ml CCl<sub>4</sub>. Die Suspension wurde nun langsam auf RT. erwärmt, und man rührte noch 30 min bei RT. Nach Filtration und Abdampfen wurde der Rückstand zwischen ges. KHCO<sub>3</sub>-Lsg. und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verteilt. Die wässr. Phase wurde noch 2mal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Nach dem Trocknen der org. Phasen (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und Eindampfen erhielt man 500 mg gelbes Harz, welches durch Chromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 98:2) gereinigt wurde: 400 mg (35%) gelbes Harz, das aus Et<sub>2</sub>O kristallisierte. Schmp. 54–57°. IR: 3300<sub>s</sub> (C≡C–H), 1680 (CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): 4,18 (*d*, *J* = 3, 2 H–C(1'')); 3,5 (*t*, *J* = 7, 2 H–C(5)); 2,8 (*t*, *J* = 7, 2 H–C(4)); 2,32 (*t*, *J* = 3, 1 H–C(3'')). MS: 141 (69, *M*<sup>+</sup>), 59 (23), 55 (100), 54 (22). Anal. ber. für C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS (141,19): C 51,0, H 5,0, N 9,9, O 11,3, S 22,7; gef.: C 50,9, H 5,0, N 9,9, O 11,8, S 22,2.

**2-[4'-(Pyrrolidin-1''-yl)-2'-butinyl]isothiazolidin (VI).** Zu einer Lsg. aus 4,0 g (16,17 mmol) Dichlorid von **13** in 40 ml CCl<sub>4</sub> tropfte man innert 10 min bei –20° 13,5 ml (16,18 mmol) 1,2*N* Cl<sub>2</sub>-Lsg. in CCl<sub>4</sub>. Nach 5 min Rühren bei –20° tropfte man diese gelbe Mischung zu einer Lsg. von 4,47 g (32,36 mmol) Amin **16** [11], 11,28 ml (80,19 mmol) Et<sub>3</sub>N und 120 ml CCl<sub>4</sub> bei –20°. Nach 30 min Rühren bei –20° und 30 min bei 0° liess man die Suspension auf RT. erwärmen, filtrierte sie und dampfte ein. Das gelbe Harz wurde durch Chromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) gereinigt: 1,8 g (24,8%) gelbes Harz, welches aus Pentan/Et<sub>2</sub>O kristallisierte. Schmp. 41–43°. IR: 2800 (N–C–H), 1675 (CO). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 360 MHz): 4,2 (*t*, *J* = 2, 2 H–C(1'')); 3,48 (*t*, *J* = 7, 2 H–C(5)); 3,43 (*t*, *J* = 2, 2 H–C(4'')); 2,28 (*t*, *J* = 7, 2 H–C(4)); 2,10 (*m*, 2 H–C(2''), 2 H–C(5'')); 1,82 (*m*, 2 H–C(3''), 2 H–C(4'')). MS: 225 (4, *MH*<sup>+</sup>), 224 (11, *M*<sup>+</sup>), 223 (7), 154 (8), 138 (15), 120 (38), 108 (25), 70 (100). Anal. ber. für C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS (224,32): C 58,9, H 7,2, N 12,5, O 7,1, S 14,3; gef.: C 58,9, H 7,2, N 12,4, O 7,1, S 14,5.

**Bindungsassay.** **Materialien:** [<sup>3</sup>H]-*cis*-2-Methyl-4-(trimethylammonium)methyl-1,3-dioxalan (CD), spezifische Aktivität: 36,1 Ci/mM, [<sup>3</sup>H]Pirenzepin (Pi), spezifische Aktivität: 70,6 Ci/mM, *New England Nuclear*. *Tricin*-Puffer: *N*-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin 0,05M mit 1*N* NaOH/KOH 8:2 auf pH 7,4 bei 22° eingestellt,

enthaltend 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mmol CaCl<sub>2</sub>. *Tris*-Puffer: Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid 0,05M, pH 7,7 bei 25°. Phosphat-Puffer: pH = 7,4 (10 mM). [<sup>3</sup>H]CD-Bindung und [<sup>3</sup>H]Pirenzepin-Bindung: Membransuspensionen: 10 männliche OFA-Ratten (150–200 g) wurden dekapitiert und die Hirne rasch entnommen. Die Cortices wurden in 50 ml eiskaltem *Tris*-Puffer mit einem *Polytron PT-20* (Stellung 7) 30 sec homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 35 000 g zentrifugiert und das Pellet in frischem Puffer resuspendiert. Nach 3mal Wiederholen dieses Prozesses wurde das Pellet in 20 ml Puffer suspendiert und in 2-ml Portionen rasch durch Drehen in Trockeneis/Aceton eingefroren und bei –70° gelagert. Vor Gebrauch wurden die eingefrorenen Proben 5 min bei 37° aufgetaut [15]. Für das CD-Bindungs'assay' wurde das Pellet mit dem 200fachen Volumen an *Tricine*-Puffer verdünnt. Zu 1,8 ml dieser Membran-Suspension gab man 0,1 ml der unbekanntten Verbindung gelöst in Puffer oder in H<sub>2</sub>O und CD-Lsg. bis zu einer Endkonzentration des [<sup>3</sup>H]-Liganden von 1 nM. Man inkubierte darauf 30 min bei 22°. Für das Pi-Bindungs'assay' wurde das Pellet mit dem 500fachen Volumen an Phosphat-Puffer verdünnt. Nach Zugabe der zu messenden Substanz, gelöst in 0,1 ml Puffer oder H<sub>2</sub>O, stellte man die [<sup>3</sup>H]Pirenzepin-Konzentration auf 0,3 nM und inkubierte 30 min bei 25°. Dann filtrierte man durch *Whatman-GF/B*-Glasfaser-Filter, welche mit 0,05% Polyethylenimin vorbehandelt worden waren ('*Brandell cell harvester type filtration apparatus*'). Man wusch noch 3mal mit 5 ml eiskaltem 50 mM *Tris*-Puffer im CD-'assay' bzw. mit kaltem Phosphat-Puffer im Pi-'assay'. Für die Affinitätsbestimmung wurden mindestens 4 verschiedene Konzentrationen im Doppel verwendet. Die detaillierte Analyse des Verdrängungsexperiments wurde nach der Methode von *Tobler-Engel* durchgeführt [16].

*Meerschweinchen-Ileum*. Männliche Meerschweinchen (300–500 g) wurden dekapitiert und das Ileum herauspräpariert. Nach dem Spülen mit Tyrode-Lsg. wurden etwa 2,5-cm lange Segmente in thermostatisierten (36°) separaten Organ-Kammern befestigt. Die oxygenierte Tyrode-Lsg. hatte folgende Zusammensetzung: 136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,41 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM Glucose. Die Messung der Kontraktionskraft erfolgte isometrisch mit *Statham UC2 Transducern*. 30 min nach der Montage der Ileum-Segmente in die Kammern wurde an den Därmen eine Vorspannung von ca. 0,8 p eingestellt. Nach weiteren 30 min wurden dem Organ-Bad erstmals Substanzen beigegeben. Die Substanzen wurden in Einzeldosen (mit Spülung nach jeder Dosis) bis zum Erreichen einer max. Kontraktion zugegeben. Es wurden 4–8 Messungen pro Substanz durchgeführt. Bei der Prüfung von Antagonisten wurde der vermeintliche Antagonist 2 min vor Zugabe der Muskarin-Dosen (Muscarin wurde als Referenzverbindung genommen) zugegeben.

*Isoliertes Ganglion cervicale superius*. Von mit Urethan narkotisierten Ratten (200–300 g) wurden beide *Ganglia cervicale superius* herauspräpariert und das die Ganglia umgebende Bindegewebe abgeschält. Jeweils 4 Ganglia wurden in voneinander unabhängigen, thermostatisierten (36°) Durchflusskammern mit den präganglionären Enden nach oben eingehängt und mit oxygenierter Nährlsg. (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1 ml/min) superfundiert. Die Nährlsg. hatte folgende Zusammensetzung: 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Glucose. Das untere postganglionäre Ende wurde in eine Saugelektrode, die Teil einer Kalomel-Elektrode ist, eingesaugt. Zwischen dieser und einer indifferenten Kalomel-Elektrode, die mit der Durchflusszelle verbunden ist, wurde mit einem Mikrovoltmeter (*Keithley 177*) das Summenpotential der postganglionären Fasern gemessen. Die Substanzen wurden in einzelnen Dosen jeweils so lange appliziert, bis die maximale Depolarisation der Ganglien erreicht war. Es wurden 4–8 Messungen pro Substanz durchgeführt. Die Wirkung von Antagonisten als Verschiebung der Muscarin-Dosis-Wirkungskurve (Muscarin wurde als Referenz verwendet) wurde nach Vorinkubation (10 min) der Ganglien mit dem Antagonisten bestimmt.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. M. Everett, *Nature (London)* **1956**, *177*, 1238.
- [2] A. K. Cho, W. L. Haslett, D. J. Jenden, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *5*, 276.
- [3] A. K. Cho, W. L. Haslett, D. J. Jenden, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1962**, *138*, 249.
- [4] R. George, W. L. Haslett, D. J. Jenden, *Life Sci.* **1962**, *1*, 361.
- [5] D. J. Triggle, in 'CRC Handbook of Stereoisomers. Drugs in Psychopharmacology 31–67', CRC Press, Inc., Florida, 1984.
- [6] R. Amstutz, B. Ringdahl, B. Karlen, M. Roch, D. J. Jenden, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1760.
- [7] H. Dorn, A. Zurbek, *Z. Chem.* **1967**, *7*, 150. H. Dorn, D. Arndt, *J. Prakt. Chem.* **1971**, *313*, 115.
- [8] H. Dorn, A. Zubeck, G. Hilgetag, *Z. Chem.* **1965**, *5*, 3377.
- [9] R. L. Salvador, D. Simon, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 2570.
- [10] A. Luettringhaus, R. Schneider, *Liebigs Ann.* **1964**, *679*, 123.

- [11] U. Svensson, U. Hacksell, R. Dahlboom, *Acta Pharm. Suec.* **1978**, *15*, 67; U.S. Pat. 3.354.178, 1976.
- [12] H. Bittiger, J. Heid, *Experientia* **1981**, *37*, 638.
- [13] M. Watson, H. I. Yamamura, W. R. Roeske, *Life Sci.* **1983**, *32*, 3001.
- [14] R. Hammer, C. P. Berrie, N. J. M. Birdsall, A. S. V. Burgen, E. C. Hulme, *Nature (London)* **1980**, *283*, 90.
- [15] J. M. Palacios, G. Bolliger, A. Closse, A. Enz, G. Gmelin, J. Malanowski, *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *125*, 45.
- [16] H. J. Tobler, G. Engel, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1983**, *322*, 183.
- [17] A. Closse, H. Bittiger, D. Langenegger, A. Wanner, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1987**, *335*, 372.
- [18] R. Hammer, A. Giachetti, *Life Sci.* **1982**, *31*, 2991.
- [19] N. J. M. Birdsall, A. S. V. Burgen, E. C. Hulme, J. M. Stockton, M. J. Zigmond, *Br. J. Pharmacol.* **1983**, *78*, 257.
- [20] R. M. Eglen, R. L. Whiting, *J. Auton. Pharmacol.* **1984**, *5*, 323.
- [21] R. R. Ruffolo, Jr., *J. Auton. Pharmacol.* **1982**, *2*, 277.