



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Pharmakophor-Modellierung und Synthese eines positiven allosterischen Modulators am GABA_A-Rezeptor“

verfasst von / submitted by

Michael Wadsak

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Inhaltsangabe

Danksagung	1
Liste der Abkürzungen	2
Liste der Abbildungen	3
Liste der Schemen	4
1. Einleitung	5
1.1. Das menschliche Nervensystem.....	5
1.2. Grundlagen der synaptischen Übertragung	5
1.3. γ -Aminobuttersäure (GABA)	6
1.4. GABA _A -Rezeptor als Angriffspunkt	8
1.4.1. Benzodiazepine.....	8
1.4.2. Barbiturate.....	10
1.4.3. Valerensäure (VA).....	11
1.5. Pharmakophor Modellierung.....	13
1.5.1. Definition	13
1.5.2. Methoden	14
1.5.2.1. Struktur-basiertes Design	14
1.5.2.2. Liganden-basiertes Design	14
1.5.2.3. Pharmakophor-basiertes virtuelles Screening	15
2. Ziel	16
3. Hauptteil	17
3.1. Pharmakophor Modelling.....	17
3.1.1. Generierung eines Pharmakophor-Modells der Valerensäure-Derivate	17
3.1.2. Generierung einer neuen aktiven Verbindung	19

3.2. Synthese	22
3.2.1. Formelschema	22
3.2.2. Reaktionsschritte.....	23
Zusammenfassung.....	29
Abstract.....	30
4. Experimenteller Teil	31
4.1. Allgemeine Anmerkungen.....	31
4.2. Syntheseprotokoll	32
4.2.1. Synthese von 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on	32
4.2.2. Versuch zur Synthese von 2-Methyl-3-oxo-propionitirl	34
4.2.3. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril	35
4.2.4. Versuch zur Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd	36
4.2.5. Versuch zur Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd	37
4.2.6. Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd	38
4.2.7. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril	39
4.2.8. Synthese von Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat	40
4.2.9. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril	41
5. Quellenangabe	42
6. Spektren	45
7. Lebenslauf	85

Danksagung

Zu Beginn möchte ich ein großes Dankeschön an meinen Diplomarbeit-Betreuer Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban aussprechen, dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Diplomarbeit am Department für pharmazeutische Chemie auszuführen. Als Student ist es immer schön einen Betreuer zu haben, den man immer um Rat fragen kann.

Ein großes Dankeschön auch an Univ.-Prof. Dr. Thierry Langer für die Zusammenarbeit und Unterstützung, vor allem im Bereich des Pharmakophor-Modelling.

Weiters bedanke ich mich bei Dr. Thomas Seidel und Dipl.-Ing. Theresa Weigl-Pollack, die mir mit ihren Ratschlägen und Hilfestellungen immer zur Seite standen. Danke für die freundliche Betreuung in allen Bereichen meiner Arbeit.

All das wäre ohne die Unterstützung von ganz besonderen Menschen nicht möglich gewesen. Somit möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, dass sie es mir ermöglicht haben meinen Traum zu verwirklichen.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Studienkollegen und Kolleginnen bedanken. Danke für die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Liste der Abkürzungen

BZD	Benzodiazepine
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
GABA	γ-Aminobuttersäure
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LiOH	Lithiumhydroxid
NaH	Natriumhydrid
NaN ₃	Natriumazid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMV	Neu modellierte Verbindung
PNS	Peripheres Nervensystem
PP	Pharmakophor
PPA	Polyphosphorsäure
p-TsOH	p-Toluensulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
VA	Valerensäure
VA-A	Valerensäure-amid
VA-TET	Valerensäure-tetrazol
ZNS	Zentrales Nervensystem

Liste der Abbildungen

Abbildung 1: a GABA _A -Rezeptor verankert in der Membran. b Querschnitt durch den Rezeptor.....	7
Abbildung 2: Zusammenfassung der Effizienz der Valerensäure-Derivate.....	11
Abbildung 3: Überblick über die chemische Struktur einiger VA-Derivate.....	12
Abbildung 4: Valerensäure mit dem Pharmakophor Modell.....	17
Abbildung 5: Alignment der 5 Verbindungen mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell.....	18
Abbildung 6: Gemeinsames Pharmakophor-Modell.....	18
Abbildung 7: Liste der Pharmakophor-Verbindungen mit ihren Features und Scoring-Werten.....	19
Abbildung 8: VA-TET mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell.....	19
Abbildung 9: Neu modellierte Verbindung (NMV).....	20
Abbildung 10: Alignment von VA-TET (blau) und NMV (grün).....	20
Abbildung 11: Alignment von VA-TET (blau) und NMV (grün) mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell.....	21

Liste der Schemen

Schema 1: Synthese von 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on.....	23
Schema 2: Synthese von 2-Methyl-3-oxo-propionitril.....	24
Schema 3: Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril.....	24
Schema 4: Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd.....	25
Schema 4.1: Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd.....	26
Schema 5: Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril.....	26
Schema 6: Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril.....	27
Schema 7: Synthese von Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat.....	27
Schema 8: Tautomerie von 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on.....	28

1. Einleitung

1.1. Das menschliche Nervensystem

Das menschliche Nervensystem ist aus Nervengewebe aufgebaut. Dieses besteht aus den Nervenzellen, sogenannten Neuronen, und den Gliazellen. Neuronen bestehen grundsätzlich aus einem Zellkörper mit Zellkern und besitzen ein oder mehrere Fortsätze. Diese Fortsätze werden wiederum in zwei Typen unterteilt. Zum einen in Dendriten, welche dem Erregungsempfang dienen, und zum anderen in Neuriten, so genannten Axonen, die für die Erregungsweitergabe zuständig sind [1].

Dieser Vorgang der Erregungsweiterleitung geschieht, indem die empfangenen Signale elektrisch umgewandelt, an einen anderen Ort transportiert und als Senderelemente an andere Neuronen weitergegeben werden [2].

Die andere Klasse von Zellen, die Gliazellen, umgeben als so genannte Myelinschicht die axonalen Fortsätze einer Nervenzelle. Sie dienen der Isolierung und beschleunigen die Fortleitung der Impulse [3].

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und dem peripheren Nervensystem (PNS). Das ZNS umfasst Gehirn und Rückenmark und ist aus ganzen Neuronen mit Zellkörper und Fortsätzen aufgebaut. Das PNS hingegen durchzieht als gebündelte Nervenfasern den Körper in Form von sensiblen und motorischen Leitungsbahnen. Mit Hilfe von sensiblen Leitungsbahnen werden Impulse von der Peripherie zum ZNS geleitet, wo sie verarbeitet werden. Motorische Leitungsbahnen tragen die verarbeiteten Signale vom ZNS wieder in die Peripherie, wo sie an ein Erfolgsorgan, meist eine Muskelzelle, weitergegeben werden [1].

1.2. Grundlagen der synaptischen Übertragung

Am Ende eines Axons befindet sich eine feine Aufzweigung (Telodendron), an deren Enden sich die synaptischen Endknöpfchen befinden. Gemeinsam mit der Membran der nachfolgenden Zelle und dem Spalt, der zwischen ihnen liegt, bilden sie die sogenannte Synapse.

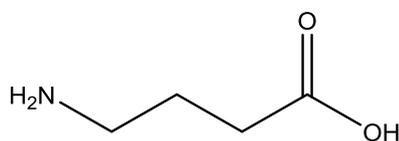
Über diese wird eine Erregung von einer Nervenzelle auf die nächste übertragen. Hierbei führt ein an den Endknöpfchen ankommender Reiz zum Einstrom von Kalziumionen an der präsynaptischen Zellmembran. Dadurch verschmelzen die synaptischen Vesikeln, welche den Transmitter enthalten, mit der Membran und der Überträgerstoff wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet [4].

An der nachfolgenden Zelle befinden sich Rezeptoren, an denen der Transmitter andocken kann. Dadurch kommt es zu einer Erregung der postsynaptischen Membran. Auf diese Weise wird das Signal von Zelle zu Zelle weitergeleitet. Abhängig von der Beschaffenheit eines Rezeptors kann der Überträgerstoff erregend oder hemmend auf die nachfolgende Zelle wirken [4].

Die wichtigsten Neurotransmitter des PNS sind Acetylcholin und Noradrenalin. Diese sind auch im ZNS vorhanden, gemeinsam mit Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA) und vielen anderen. Exzitatorische, oder erregende Stoffe, wie zum Beispiel Acetylcholin oder Glutamat, stimulieren die Erregung der postsynaptischen Membran durch Öffnung von Natriumkanälen. Dadurch kann vermehrt Natrium in die Zelle und es kommt zu einer Depolarisation der Membran.

Inhibitorische oder hemmende Stoffe, wie zum Beispiel GABA oder Glycin, öffnen an der postsynaptischen Membran Chloridkanäle, wodurch eine Hyperpolarisation entsteht und so die Erregung gehemmt wird [5].

1.3. γ -Aminobuttersäure (GABA)



γ -Aminobuttersäure

GABA ist der wichtigste hemmende Transmitter im zentralen Nervensystem. Er wird aus Glutamat, dem wichtigsten erregenden Transmitter, mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase hergestellt. Nach Freisetzung in den synaptischen Spalt kann GABA an zwei Haupttypen von Rezeptoren binden, GABA_A und

GABA_B. Der GABA_A-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Chloridkanal an der postsynaptischen Membran, der sich nach Bindung von GABA öffnet und die Zelle durch den erhöhten Cl⁻ - Einstrom hemmt [6].

Im Grunde setzt sich der GABA_A-Rezeptor aus fünf Proteinuntereinheiten zusammen, zum größten Teil bestehend aus zwei α, zwei β und einer γ – Untereinheit. Diese Untereinheiten weisen je vier transmembrane Segmente auf und bilden eine Pore, durch welche die Chlorid-Ionen in die Zelle einströmen können. Der Rezeptor besitzt eine GABA-Bindungsstelle und eine Benzodiazepin-Bindungsstelle. Die für GABA befindet sich zwischen der α- und β-Untereinheit, während Benzodiazepine (BZD) an der extrazellulären Domäne des Rezeptors zwischen der α- und γ-Untereinheit binden [7].

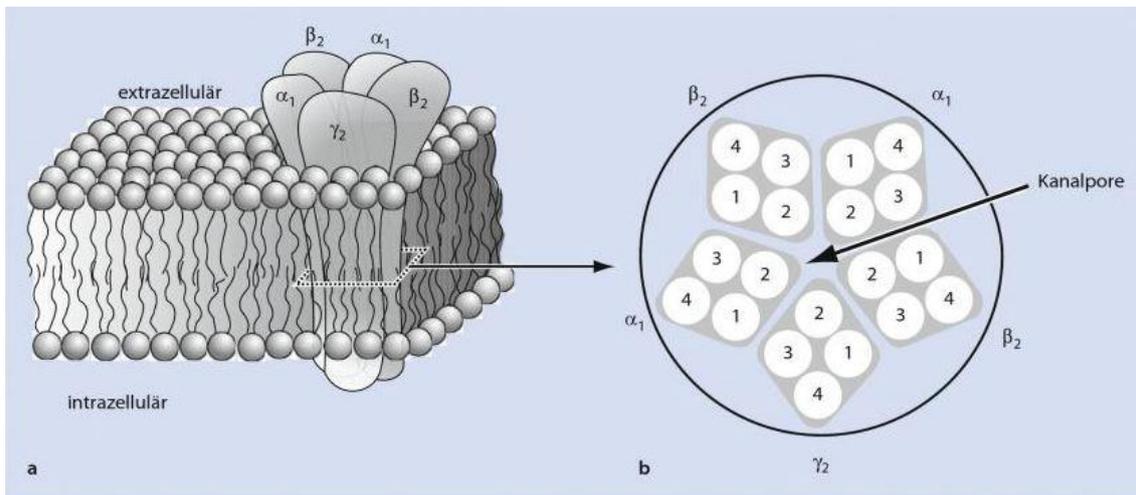


Abbildung 1: a GABA_A-Rezeptor verankert in der Membran.
b Querschnitt durch den Rezeptor [7].

Liganden, die an die BZD-Bindungsstelle binden, können als negative Modulatoren (inverse Agonisten), welche den Cl⁻ - Strom (I_{GABA}) durch den Rezeptor hemmen, als positive Modulatoren (Agonisten), welche I_{GABA} erhöhen oder als Nullmodulatoren (Antagonisten), welche I_{GABA} nicht beeinflussen, wirken [8].

Im Vergleich zum GABA_A-Rezeptor ist der GABA_B-Rezeptor kein Chloridkanal, sondern ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Bindet GABA an präsynaptische GABA_B-Autorezeptoren, wird dessen eigene Freisetzung in den synaptischen Spalt gehemmt. Nach Bindung an postsynaptische GABA_B-Rezeptoren wird über G_i die Öffnungswahrscheinlichkeit für Ca²⁺ - Kanäle vermindert und die Öffnungswahrscheinlichkeit für K⁺ - Kanäle erhöht.

Durch die Blockade des Einstroms erregender Ca²⁺ - Ionen und die Stimulation des Ausstroms von K⁺ - Ionen vermittelt auch der GABA_B-Rezeptor eine Hemmung der Zelle [6].

1.4. GABA_A-Rezeptor als Angriffspunkt

Am GABA_A-Rezeptor können viele verschiedene, pharmakologisch und klinisch wichtige Stoffklassen angreifen [9].

Es folgt ein Überblick über einige dieser Wirkstoffe und Wirkstoffklassen.

1.4.1. Benzodiazepine

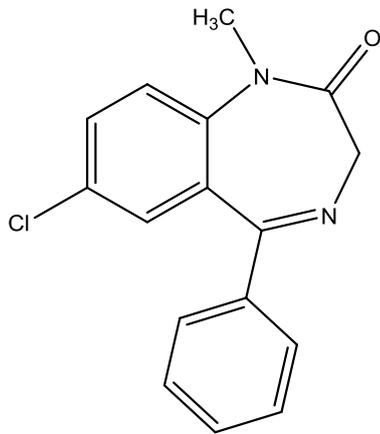
Benzodiazepine binden an die BZD-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors. Somit sind sie nicht in der Lage den Rezeptor direkt zu aktivieren.

Stattdessen fördert sie die Wirkung von GABA am Rezeptor, indem sie allosterisch die Frequenz der GABA-induzierten Kanalöffnung entweder erhöhen (Agonisten) oder senken (inverse Agonisten) [10].

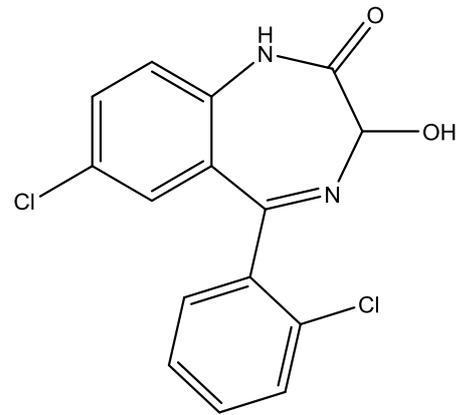
Die Wirkungen der BZD sind vielfältig. Therapeutisch werden sie als Hypnotika, Antikonvulsiva, Muskelrelaxantia und Anxiolytika eingesetzt. Pharmakokinetisch betrachtet gibt es drei Klassen von Benzodiazepinen: kurz-, mittel- und lang-wirkende BZD. Als Prototyp dieser Wirkstoffklasse gilt Diazepam [10].

Einige BZD-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten im Überblick:

Bsp. für Agonisten: Diazepam, Lorazepam

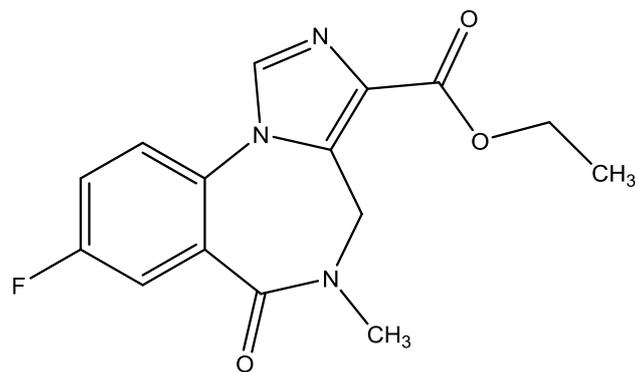


Diazepam



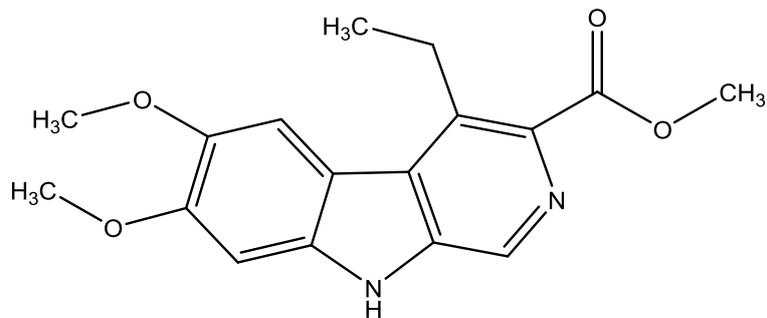
Lorazepam

Bsp. für Antagonisten: Flumazenil



Flumazenil

Bsp. für inverse Agonisten: DMCM

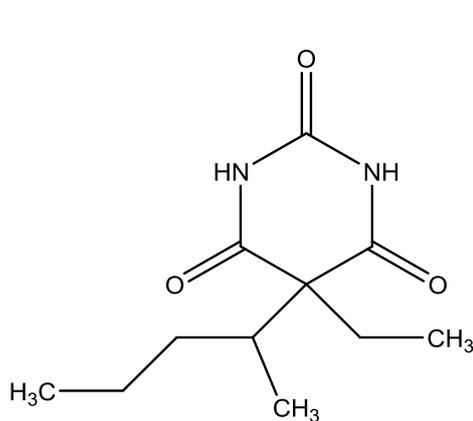


DMCM

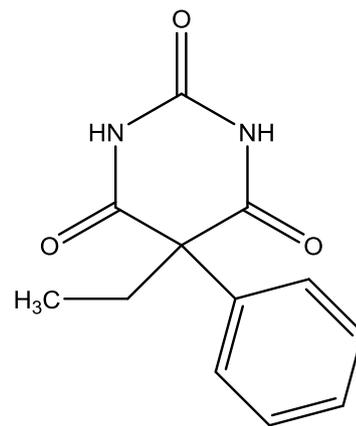
1.4.2. Barbiturate

Es gibt Anzeichen dafür, dass Barbiturate, wie zum Beispiel Pentobarbital und Phenobarbital, am GABA_A-Rezeptor, je nach Konzentration, 3 verschiedene Effekte erzielen können: bei geringer Konzentration verstärken sie die Wirkung des Agonisten und fördern damit den Cl⁻-Strom durch den Rezeptor. Bei höherer Konzentration können sie, sogar in Abwesenheit eines Agonisten, den Rezeptor direkt aktivieren und bei noch höherer Konzentration blockieren sie den GABA_A-Rezeptor [11].

Barbiturate wurden früher zur Behandlung von Insomnie, Angststörungen, als Muskelrelaxantien und als Anästhetika eingesetzt. Sie haben allerdings im Vergleich zu Benzodiazepinen eine wesentlich geringere therapeutische Breite und eine bedeutend höhere Toxizität. Daher wurden sie heute weitgehend von den Benzodiazepinen abgelöst, werden aber immer noch zur Anästhesie und zur Behandlung der Epilepsie herangezogen [12].

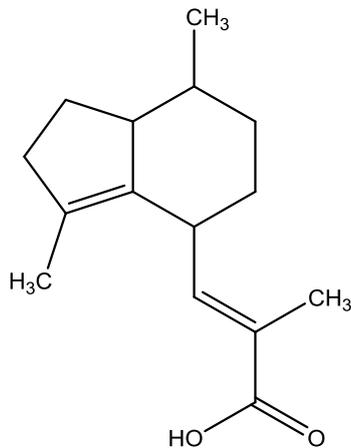


Pentobarbital



Phenobarbital

1.4.3. Valerensäure (VA)

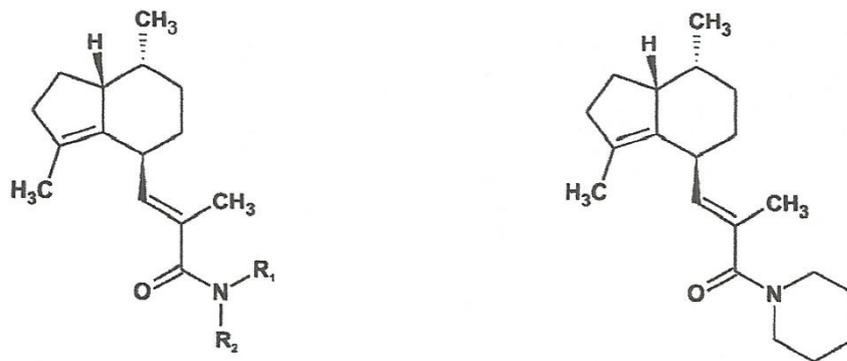


Die Valerensäure ist eine der Hauptkomponenten im Baldrian, welcher als pflanzliches, medizinisches Produkt zur Behandlung von Angststörungen und Insomnie eingesetzt wird. Sie ist ein Untereinheiten-spezifischer, allosterischer Modulator des GABA_A-Rezeptors. Es hat sich gezeigt, dass durch VA nur Rezeptoren mit einer β_2 oder einer β_3 -Untereinheit stimuliert werden. Dabei interagiert VA nicht mit der BZD-Bindungsstelle, sondern bindet wahrscheinlich an die Loreclezol-Bindungsstelle. Wird $\beta_{2/3}$ durch β_1 ersetzt, reduziert sich die Sensitivität des Rezeptors stark [13].

Viele Derivate der Valerensäure haben ähnliche Effekte auf den GABA_A-Rezeptor. Es gibt sogar welche, die noch effektiver mit dem Rezeptor interagieren als VA selbst. Ein Beispiel dafür wäre das Valerensäure-amid (VA-A), wie man anhand der EC₅₀ und der maximalen Stimulation von I_{GABA} in **Abbildung 2** gut erkennen kann [14].

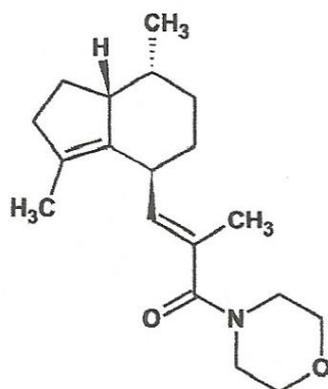
	EC ₅₀ (μM)	Maximum stimulation of I _{GABA} (EC ₃₋₅) (%)	Hill coefficient (n _H)	Number of experiments (n)
VA	22.8 ± 5.6	858 ± 153	1.9 ± 0.3	5
VA-A	13.7 ± 2.3*	2247 ± 252*	1.6 ± 0.2	7
VA-MA	26.3 ± 6.6	2298 ± 312*	1.4 ± 0.1	6
VA-DMA	28.4 ± 7.1	1383 ± 211	2.1 ± 0.5	5
VA-EA	23.4 ± 6.9	1678 ± 258*	1.3 ± 0.3	5
VA-DEA	23.7 ± 6.3	901 ± 120	1.4 ± 0.1	6
VA-BA	18.8 ± 6.9	569 ± 57	1.1 ± 0.2	5
VA-IPA	22.5 ± 6.0	506 ± 76	1.5 ± 0.3	4
VA-PIP	54.6 ± 17.0*	1698 ± 266*	1.6 ± 0.3	6
VA-MO	64.2 ± 13.8*	1064 ± 132	1.6 ± 0.2	7
VA-EE	49.2 ± 26.3	250 ± 65*	1.4 ± 0.6	5

Abbildung 2: Zusammenfassung der Effizienz der Valerensäure-Derivate

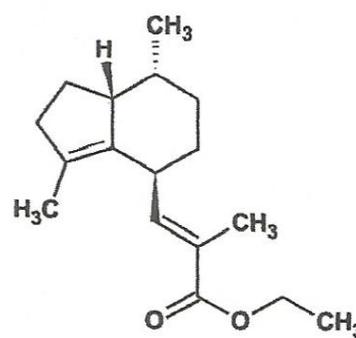


$R_1 = H$	$R_2 = H$	VA-A
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	VA-MA
$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$	VA-DMA
$R_1 = C_2H_5$	$R_2 = H$	VA-EA
$R_1 = C_2H_5$	$R_2 = C_2H_5$	VA-DEA
$R_1 = H_3C-CH-CH_3$	$R_2 = H$	VA-IPA
$R_1 = C_4H_9$	$R_2 = H$	VA-BA

VA-PIP



VA-MO



VA-EE

Abbildung 3: Überblick über die chemische Struktur einiger VA-Derivate

VA-A: Valerensäureamid; VA-MA: Valerensäuremethamid;

VA-DMA: Valerensäuredimethylamid; VA-EA: Valerensäureethylamid;

VA-DEA: Valerensäurediethylamid; VA-IPA: Valerensäureisopropylamid;

VA-BA: Valerensäurebutylamid; VA-PIP: Valerensäurepiperidinamide;

VA-MO: Valerensäuremorpholinamide; VA-EE: Valerensäureethylester [14]

1.5. Pharmakophor Modellierung

Seit dem Erscheinen von computerunterstützten Struktur-Aktivitäts-Studien, wurde der Ausdruck „Pharmakophor“ (PP) zu einem der meist gängigsten Wörter in der medizinischen Chemie [15].

Um an einen Rezeptor binden zu können, muss ein Ligand von diesem erkannt werden. Dafür sind einige spezifische, unverzichtbare Eigenschaften des Liganden nötig, wohingegen andere Teile des Moleküls verändert werden können, ohne die Affinität der pharmakologischen Aktivität drastisch zu beeinflussen. Solch eine Anordnung von wesentlichen chemischen Gruppen, die häufig bei aktiven Molekülen zu finden sind, bildet das Pharmakophor [16].

1.5.1. Definition

Der Begriff „Pharmakophor“ wird von vielen Autoren verwendet, um funktionelle oder strukturelle Elemente mit biologischer Aktivität zu definieren. Dies deckt sich jedoch nicht mit der von einer IUPAC-Arbeitsgruppe erarbeiteten, offiziellen Definition, die im Jahr 1998 veröffentlicht wurde:

Ein Pharmakophor ist die Vereinigung von sterischen und elektronischen Eigenschaften, die notwendig ist, um die optimalen supramolekularen Interaktionen mit einer spezifischen biologischen Zielstruktur zu sichern und ihre biologische Antwort auszulösen oder zu verhindern [15].

Als Folge davon:

1. Ein Pharmakophor beschreibt die wesentlichen, sterischen und elektronischen, funktionsbeschreibenden Punkte, die für eine optimale Interaktion mit einem relevanten pharmakologischen Target notwendig sind.
2. Ein Pharmakophor stellt kein reales Molekül oder eine reale Gemeinschaft von funktionellen Gruppen dar, sondern ein rein abstraktes Konzept, welches die gemeinsamen Molekül-Interaktions-Kapazitäten einer Gruppe von Stoffen zu deren Zielstruktur erklärt.
3. Pharmakophore sind keine spezifischen funktionellen Gruppen (z.B. Sulfonamide) oder „Teile von Molekülen“ (z.B. Dihydropyridine, Arylpiperazine) [15].

1.5.2. Methoden

Zur Entwicklung eines Pharmakophor Modells gibt es zwei Herangehensweisen: Struktur-basiertes Design und Liganden-basiertes Design [17].

1.5.2.1. Struktur-basiertes Design

Diese Methode kann angewendet werden, wenn eine 3-D Struktur des Targets vorliegt, die zuvor experimentell bestimmt wurde und eine hohe Auflösung aufweist [18].

Sie wird auch bei Vorliegen ungenügender Information über Liganden, welche am Target angreifen, verwendet [19].

Struktur-basiertes Design ist normalerweise eng mit dem Begriff „Docking“ verbunden, welches das Liganden-Molekül flexibel in einer starren makromolekularen Umgebung ausrichtet und dann die Stärke der Interaktion mit sogenannten „Scoring-Funktionen“ berechnet [17].

1.5.2.2. Liganden-basiertes Design

Im Gegensatz zum Struktur-basiertem Design wird diese Methode beim Fehlen einer 3-D Zielstruktur angewendet. Ziel ist es, die gemeinsamen chemischen Eigenschaften bekannter Liganden, die am Target angreifen, zu gewinnen [20].

Die Generierung eines solchen Pharmakophors mehrerer Liganden (als „Training Set Compounds“ bezeichnet) beinhaltet im Wesentlichen zwei Hauptschritte:

1. Exploration des konformativen Raums für jeden Liganden im Training Set, um die konformative Flexibilität der Liganden zu berücksichtigen.
2. Übereinanderlegen der Liganden im Training Set und Bestimmung der wesentlichen gemeinsamen stereoelektronischen Eigenschaften zur Erstellung des Pharmakophor Modells [20].

1.5.2.3. Pharmakophor-basiertes virtuelles Screening

Nach dem Erstellen eines PPs, entweder nach Struktur-basiertem Design oder nach Liganden-basiertem Design, kann das Modell dazu verwendet werden, um Molekül-Datenbanken zu durchsuchen und so potentielle Liganden zu finden. Diesen Vorgang nennt man „Pharmakophor-basiertes virtuelles Screening“. Die erhaltenen Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften werden als „Hits“ bezeichnet. Manche dieser Hits ähneln möglicherweise sehr stark bereits bekannten aktiven Verbindungen. Andere wiederum könnten ganz neue Stoffe darstellen [20].

2. Ziel

Das grundsätzliche Ziel meiner Diplomarbeit ist es einen neuen, noch nicht bekannten Liganden am GABA_A-Rezeptor zu finden und diesen auf synthetischem Weg herzustellen.

Dafür sollte zuerst mit Hilfe des Programms „LigandScout“ ein gemeinsames Pharmakophor Modell bereits bekannte Liganden erstellt werden. Aufbauend auf dieses sollte eine Verbindung modelliert werden, welche bezüglich ihrer Eigenschaften dem zuvor generierten Modell entspricht.

Danach sollte eine Strategie zur Synthese der neuen Verbindung erstellt und schließlich diese auf synthetischem Weg hergestellt werden.

3. Hauptteil

3.1. Pharmakophor Modelling

3.1.1. Generierung eines Pharmakophor-Modells der Valerensäure-Derivate

Ziel war es einen neuen positiven allosterischen Modulator am GABA_A-Rezeptor zu kreieren. Da die aus dem Baldrian bekannte Valerensäure einen solchen darstellt, wurde mit Hilfe des Programms „LigandScout“ ein ligandenbasiertes Modell erstellt (Abbildung 4).

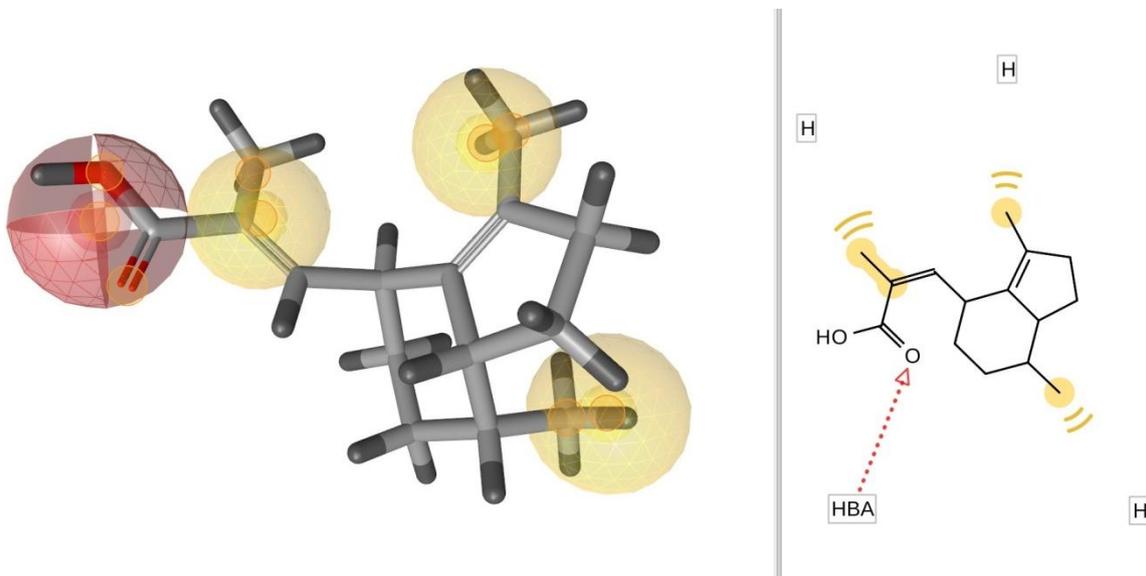


Abbildung 4: Valerensäure mit dem Pharmakophor Modell

Aufgrund der Tatsache, dass neben der Valerensäure auch deren Derivate und manche andere Arzneistoffe, wie zum Beispiel Loreclezol, Etomidat oder Propofol, eine ähnliche oder teilweise noch stärkere positive allosterische Wirkung auf den GABA_A-Rezeptor haben, wurden zur Generierung eines gemeinsamen Pharmakophor-Modells insgesamt 5 Verbindungen übereinandergelegt (Abbildung 5).

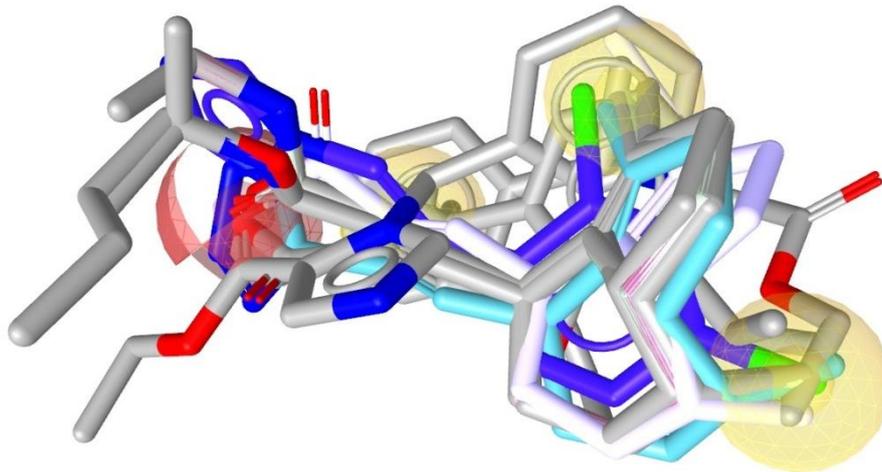


Abbildung 5: Alignment der 5 Verbindungen mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell

Dieses gemeinsame Pharmakophor enthält 4 Features: 1 Feature für einen H^+ -Akzeptor (**rote** Sphäre) und 3 Features für Hydrophobie/Lipophilie (**gelbe** Sphäre) (Abbildung 6).

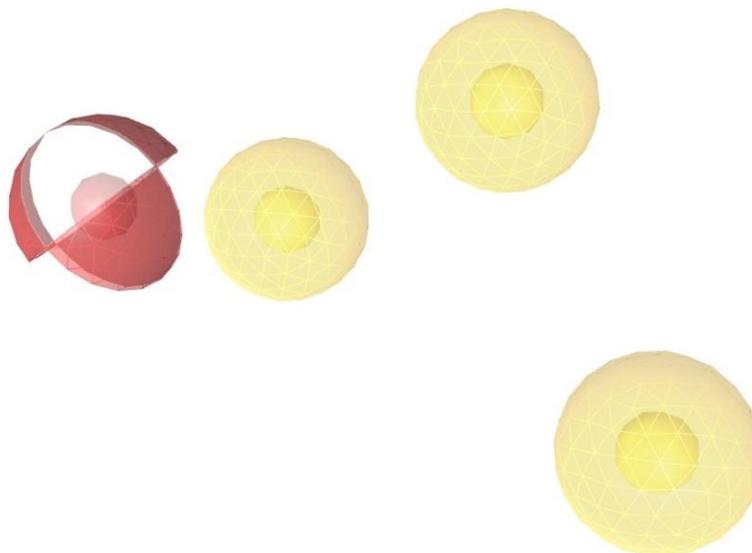


Abbildung 6: Gemeinsames Pharmakophor-Modell

In Abbildung 7 sind alle für das PP verwendeten Verbindungen mit ihren Features und Pharmakophor-Fit-Werten (Scoring-Werten) dargestellt:

1	<input type="checkbox"/>	VA-TET	Training	<input type="checkbox"/>	47.0400
2	<input type="checkbox"/>	VA-MA	Training	<input type="checkbox"/>	48.4200
3	<input type="checkbox"/>	Loreclezol	Training	<input type="checkbox"/>	47.1100
4	<input type="checkbox"/>	MAX-859	Training	<input type="checkbox"/>	47.0700
5	<input type="checkbox"/>	VA-A	Training	<input type="checkbox"/>	48.4000
6	<input type="checkbox"/>	VA-ISO	Test	<input type="checkbox"/>	48.4300
7	<input type="checkbox"/>	VA	Test	<input type="checkbox"/>	48.2000
8	<input type="checkbox"/>	VA-BA	Test	<input type="checkbox"/>	48.5400
9	<input type="checkbox"/>	R-Etomidat	Test	<input type="checkbox"/>	38.6700
10	<input type="checkbox"/>	VA-EA	Test	<input type="checkbox"/>	48.4200
11	<input type="checkbox"/>	S-Etomidat	Test	<input type="checkbox"/>	38.6400
12	<input type="checkbox"/>	Propofol	Test	<input type="checkbox"/>	37.0400

Abbildung 7: Liste der Pharmakophor-Verbindungen mit ihren Features und Scoring-Werten

3.1.2. Generierung einer neuen aktiven Verbindung

Als Ausgangssubstanz zur Erstellung eines neuen positiven allosterischen Modulators am GABA_A-Rezeptor wurde das Valerensäure-tetrazol (VA-TET) gewählt (Abbildung 8).

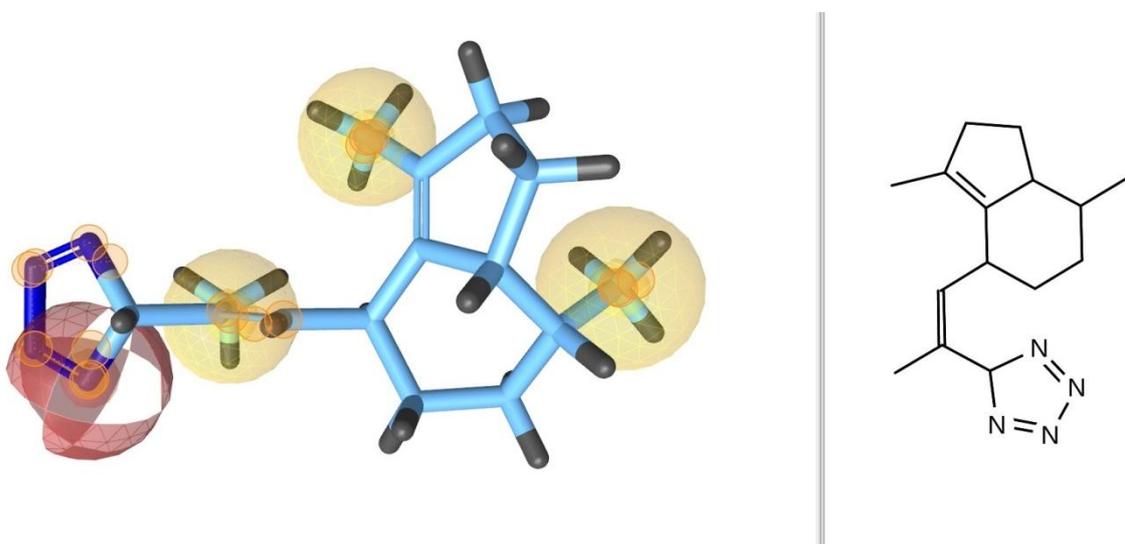


Abbildung 8: VA-TET mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell

Sowohl die Tetrazol-Struktur als auch das daran anschließende 2-Methylpropen wurden unverändert übernommen. Das bicyclische System wurde zu einem Pyridin-2-on um-modelliert, mit je einer Methylgruppe in Position 4 und 6 (Abbildung 9).

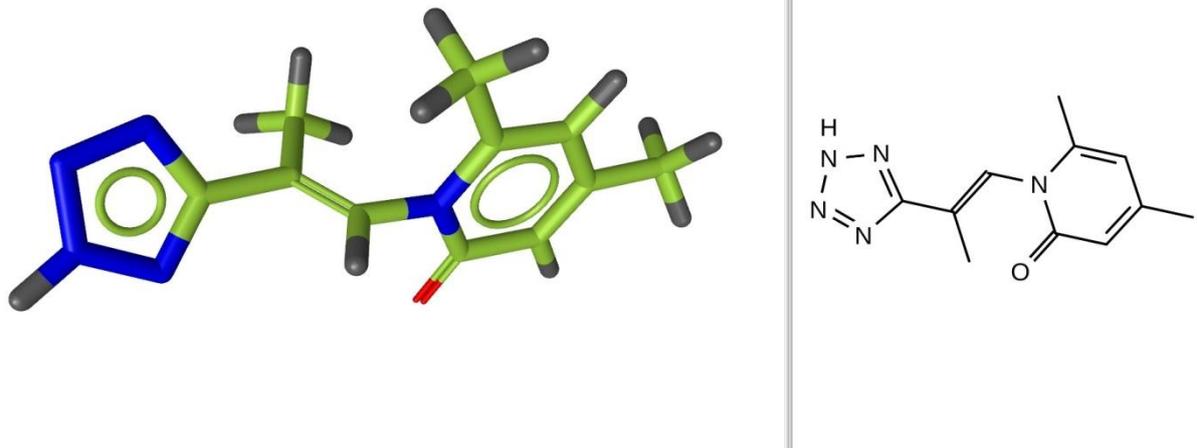


Abbildung 9: Neu modellierte Verbindung (NMV)

Aus dem VA-TET wurde das 1-(2-(2H-Tetrazol-5-yl)prop-1-en-1-yl)-4,6-dimethylpyridin-2(1H)-on.

Zum Vergleich wurden beide Verbindungen übereinander gelegt (Abbildung 10) und anschließend auch das PP eingeblendet (Abbildung 11).

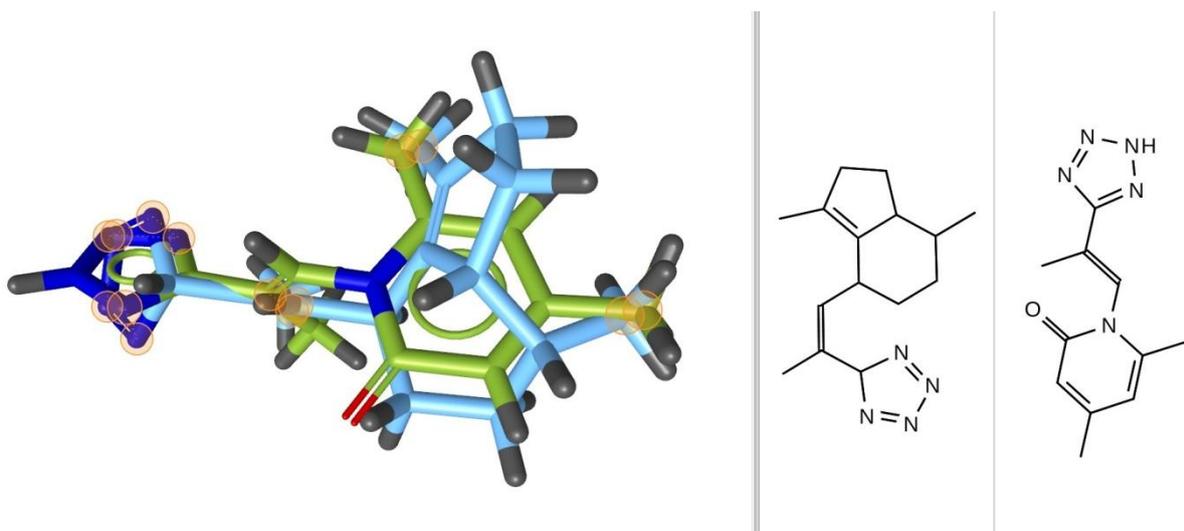


Abbildung 10: Alignment von VA-TET (blau) und NMV (grün)

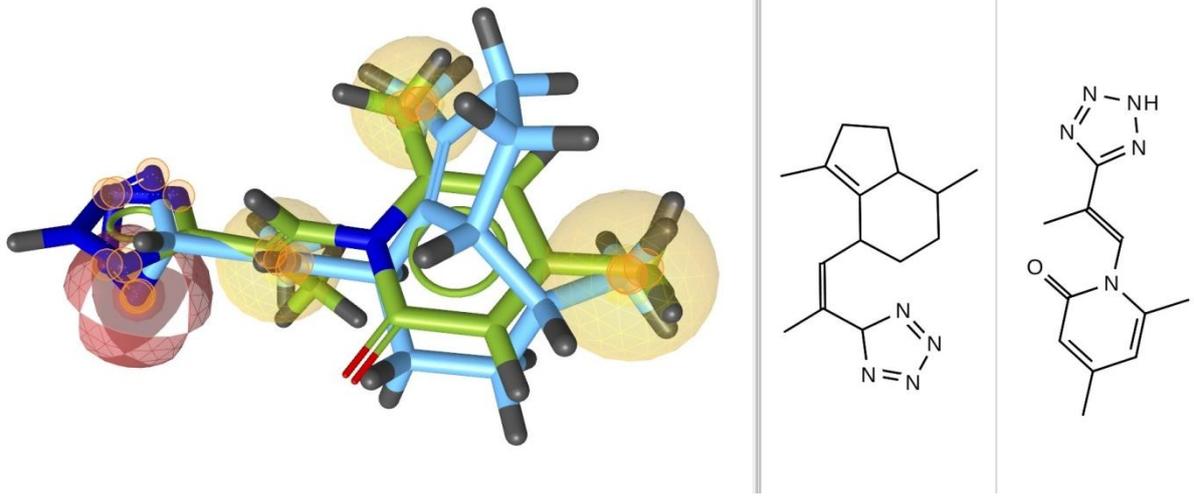


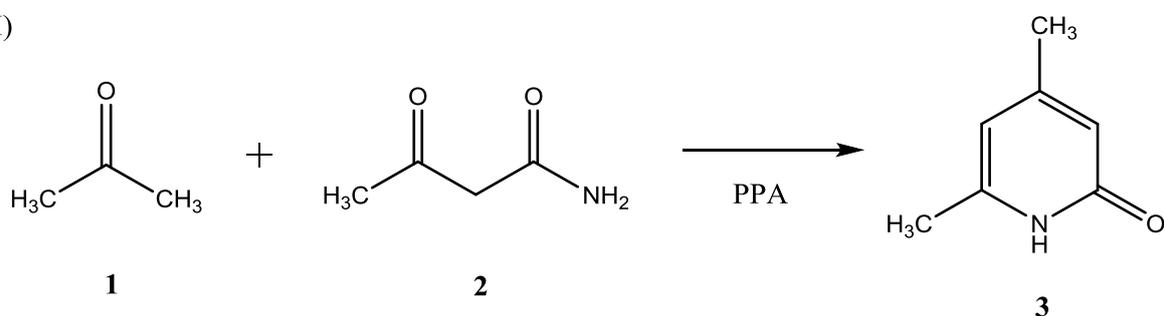
Abbildung 11: Alignment von VA-TET (blau) und NMV (grün)
mit dem gemeinsamen Pharmakophor Modell

3.2. Synthese

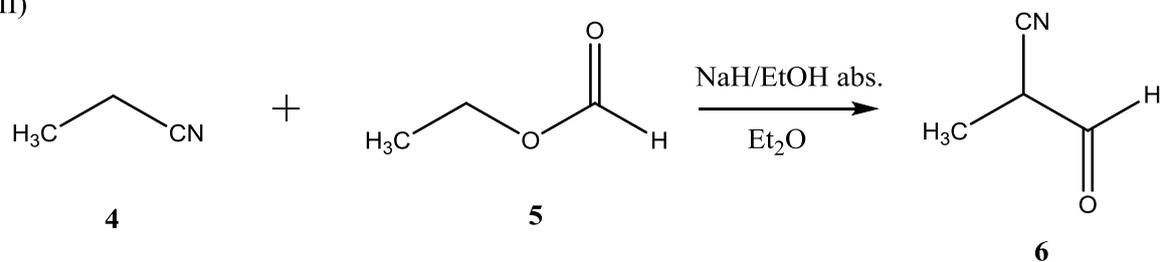
Um eine Synthesestrategie zu entwickeln, wurde die Zielverbindung in kleinere Teilstrukturen unterteilt, welche Schritt für Schritt synthetisiert werden sollten. Zur Findung von Synthesepänen wurden Reaktionsdatenbanken wie „Reaxys“ und „SciFinder“ herangezogen.

3.2.1. Formelschema

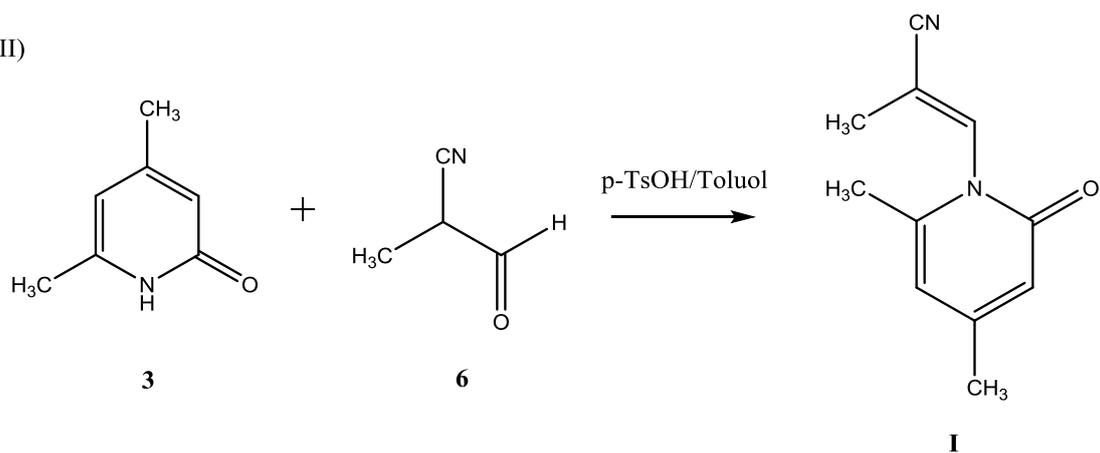
I)



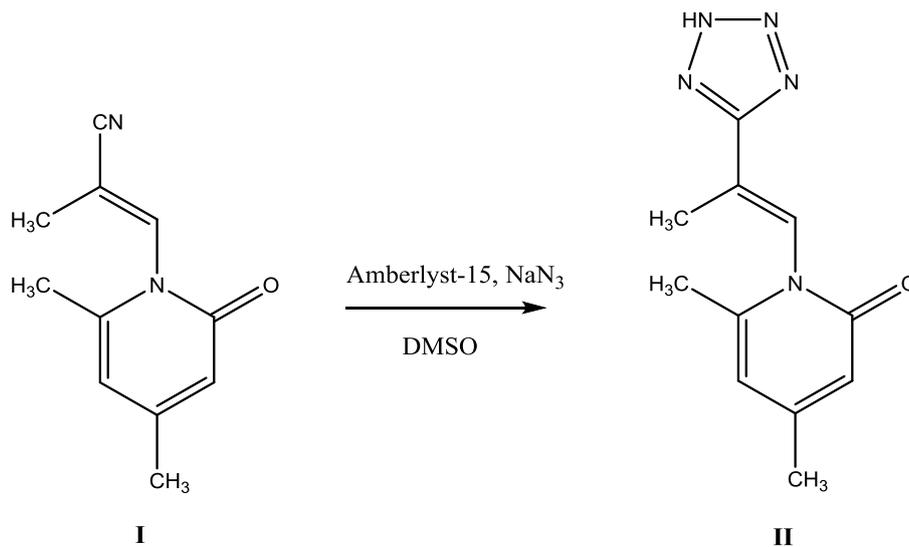
II)



III)

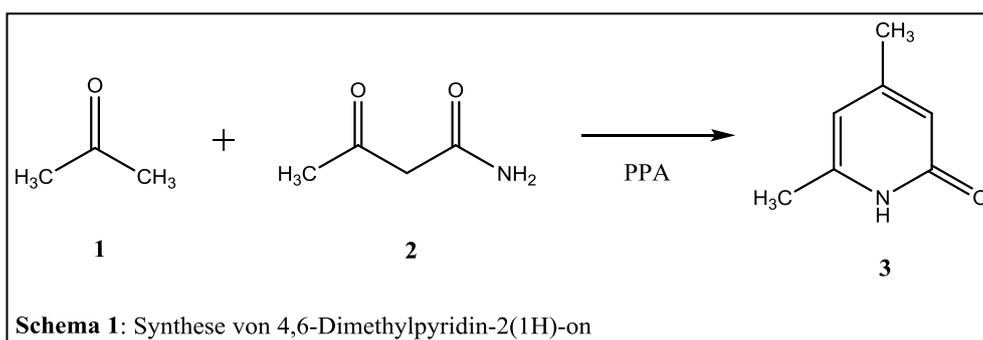


IV)

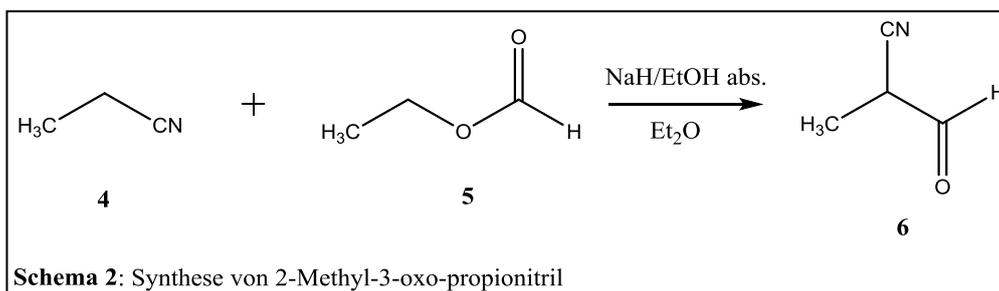


3.2.2. Reaktionsschritte

Im ersten Schritt wurde 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on (**3**) in Anlehnung an [21] hergestellt. Die Verbindung konnte in einer Ausbeute von 26 % gewonnen werden (Schema 1).

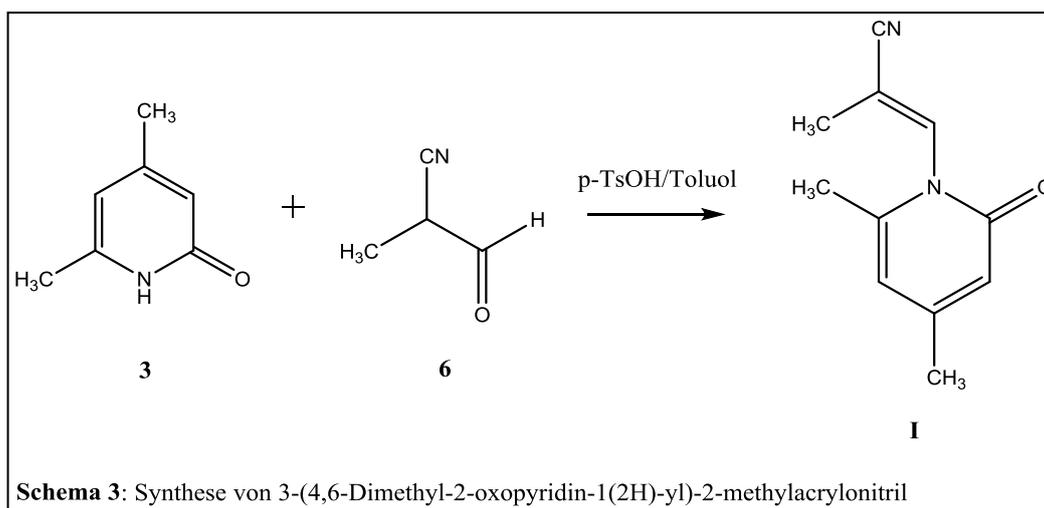


Im zweiten Schritt sollte 2-Methyl-3-oxo-propionitril (**6**) in Anlehnung an [22] synthetisiert werden (Schema 2).



Der Beweis, dass die Reaktion nicht funktioniert hat, erwies sich als schwierig: Zwar war im anschließenden ¹H-NMR-Spektrum kein Aldehyd-Signal zu sehen, aber dies kann laut [22] auch auf eine Polymerisation des Produktes zurückzuführen sein. In der Hitze soll die Verbindung jedoch laut [22] wieder zum gewünschten Produkt zerfallen. Aus diesem Grund wurde die Synthese mit dem Versuch der Kopplung von **3** und **6** fortgesetzt.

Durch die Kopplung sollte in diesem dritten Schritt 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril (**I**) in Anlehnung an [23] hergestellt werden (Schema 3).

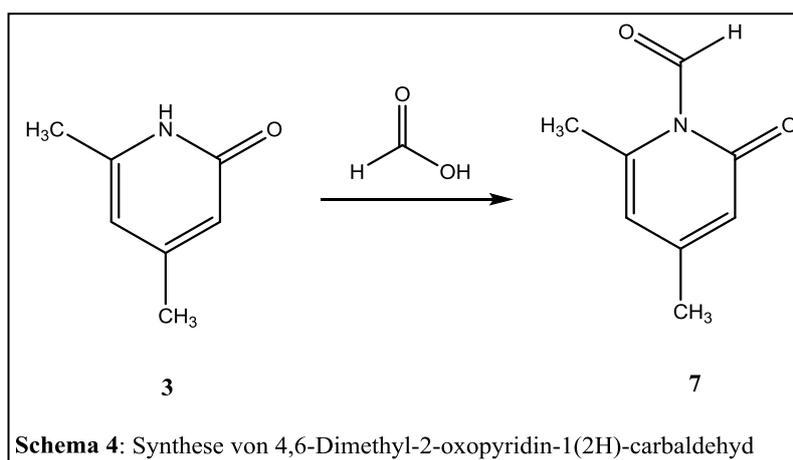


Im anschließenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war nur Edukt sichtbar. Es konnte keine Umsetzung zum gewünschten Produkt beobachtet werden, was wahrscheinlich auf das fehlerhafte bzw. fehlende **6** aus dem zweiten Schritt der Reaktion zurückzuführen war.

Beide Schritte, sowohl II) als auch III), wurden wiederholt, ohne die gewünschten Verbindungen zu liefern.

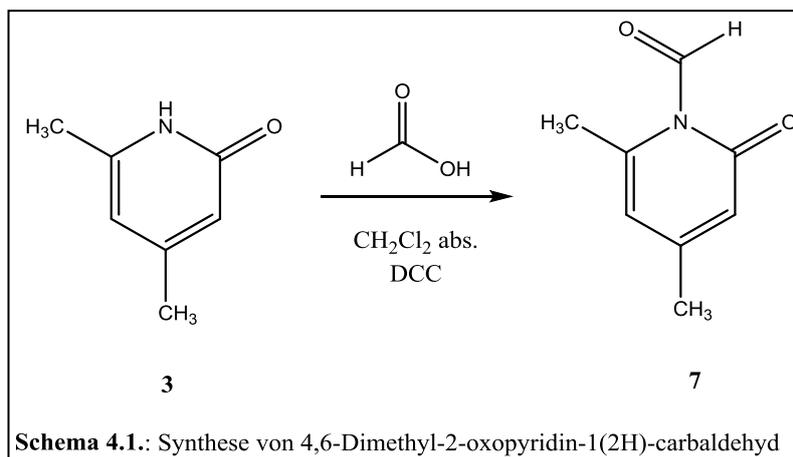
Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle der Synthesepfad geändert und versucht **3** auf einen anderen Weg umzusetzen um die Zielstruktur zu erhalten.

Ziel war es **3** durch Reaktion mit Ameisensäure in Anlehnung an [24] zu 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd (**7**) umzusetzen (Schema 4).



Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war das Signal der Ameisensäure bei etwa 8,3 ppm deutlich sichtbar, was darauf hindeutet, dass es zu keiner Umsetzung gekommen war.

Die Reaktion wurde in Anlehnung an [25] mit zusätzlicher Anwesenheit von CH_2Cl_2 abs. und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kopplungsreagens wiederholt (Schema 4.1.)

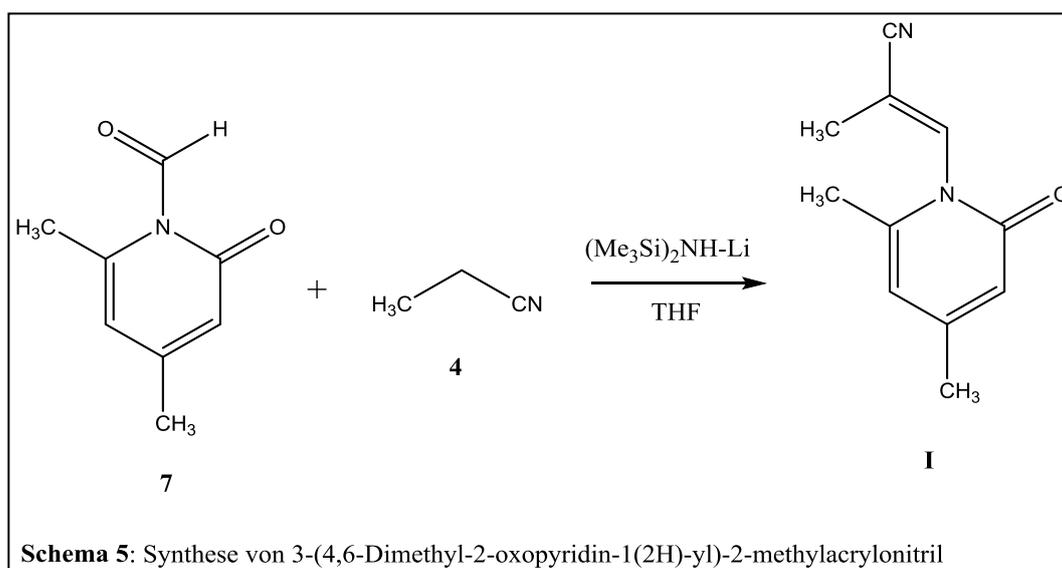


Die Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft und ein Produkt-Spot war zu erkennen. Nach der Aufarbeitung war im anschließenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum jedoch nur Edukt sichtbar.

Nach erneuter dünnschichtchromatographischer Überprüfung zeigte sich, dass der Produkt-Spot verschwunden war, was darauf hindeutet, dass sich das Produkt bei der Aufarbeitung wieder zersetzte.

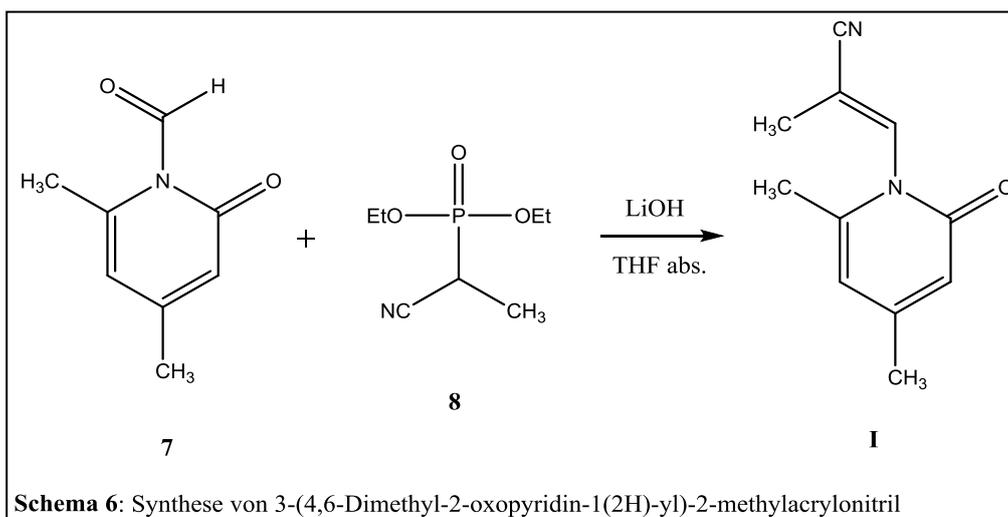
Deshalb wurde die Reaktion wiederholt und im letzten Schritt das Lösungsmittel in der Kälte am Rotationsverdampfer abgezogen. Dadurch konnte **7** nur als Rohprodukt gewonnen werden. Wegen der Labilität von **7** wurde keine Aufreinigung durchgeführt, sondern das Rohprodukt in den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Anschließend sollte **7** mit Propionitril in Anlehnung an [26] zu 3-(4,6-Dimethyl-2-oxypyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril (**I**) umgesetzt werden (Schema 5).

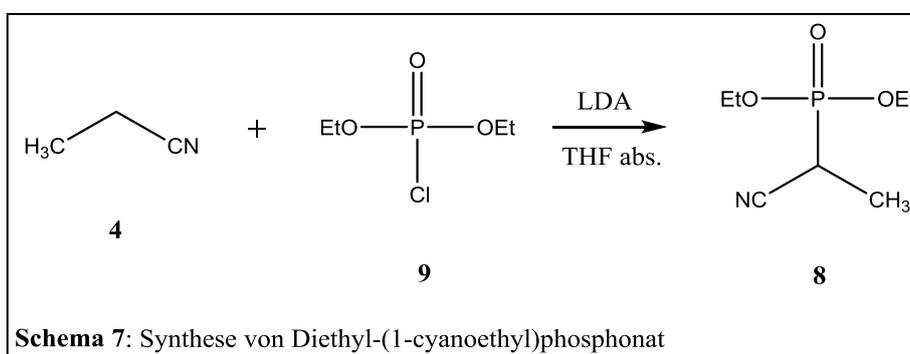


Im anschließenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war keine Umsetzung zum gewünschten Produkt sichtbar. Deshalb wurde versucht **I** auf einen anderen Weg ausgehend von **7** zu synthetisieren.

So sollte **7** mit Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat (**8**) in Anlehnung an [27] zu 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril (**I**) umgesetzt werden (Schema 6).

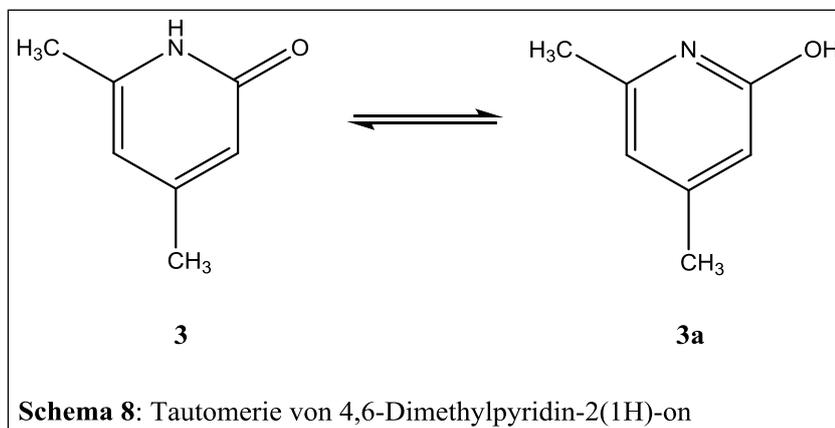


Um die Reaktion, wie in Schema 6 dargestellt, durchzuführen zu können, sollte zuerst **8** in Anlehnung an [28] synthetisiert werden (Schema 7). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 17 % gewonnen werden.



Nach der Reaktion zur Herstellung von **I** nach Schema 6, wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. In diesem waren jedoch die gewünschten Signale nicht sichtbar, was auf eine Zersetzung der Edukte hindeutet.

Wahrscheinlich liegt das Scheitern der Umsetzungen in der mangelnden Basizität des Stickstoffs des Amids **3**. Weiters ist ein möglicher Grund für das Misslingen der Umsetzung in der Möglichkeit zur Tautomerisierung von **3** zum Hydroxypyridin **3a** gegeben (Schema 8).



Allerdings lassen sich in den NMR-Spektren von **3** keine Signale der tautomeren Form **3a** erkennen.

Zusammenfassung

Der GABA_A-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Chlorid-Kanal und Angriffspunkt vieler verschiedener Arzneistoffe. Die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Hauptliganden GABA bewirkt eine durch den Chlorid-Einstrom entstehende Hyperpolarisation und somit eine Erregungshemmung der Zelle.

Neben GABA können auch BZD, Barbiturate, Anästhetika oder Antiepileptika am Rezeptor binden. In diesen Fällen wird er nicht direkt aktiviert, sondern allosterisch.

Besonders die BZD nehmen eine große Bedeutung in der medizinischen Therapie ein. Sie wirken anxiolytisch, sedativ bis hypnotisch, muskelrelaxierend und anitkonvulsiv. Daher sind sie vielfältig einsetzbar, z.b. bei Angststörungen, als Schlafmittel oder zur Behandlung der Epilepsie. Leider ist die Anwendung der BZD auch mit einigen Nebenwirkungen verbunden, wie Abhängigkeit, Hang Over, Reboundinsomnie oder Toleranzentwicklung. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll andere Arzneistoffe zu finden, welche genauso vielfältig einsetzbar sind wie die BZD, ohne die angeführten Nebenwirkungen befürchten zu müssen.

Die Valerensäure, einer der Hauptkomponenten im Baldrian, stellt einen positiven allosterischen Modulator am GABA_A-Rezeptor dar. Sie interagiert nicht mit der BZD-Bindungsstelle, sondern bindet wahrscheinlich an die Loreclezol-Bindungsstelle.

In dieser Arbeit wurde ausgehend vom Valerensäure-tetrazol ein Arzneistoff modelliert, der dieselben Eigenschaften aufweist. Nach erfolgreicher Erstellung einer Verbindung mit Hilfe von liganden-basiertem Design, konnte leider anschließend im Rahmen dieser Arbeit der Arzneistoff nicht synthetisiert werden. Die Herstellung schien doch schwieriger zu sein als zuvor angenommen. Zu Beginn lief es gut und die erste Teilstruktur, das 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on, konnte erfolgreich synthetisiert werden. Nach vielen weiteren Versuchen konnte schließlich die Struktur auch erweitert werden zum 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd. Von diesem Punkt an konnte die Verbindung trotz vieler Versuche leider nicht weiter umgesetzt werden.

Auf diesem Gebiet wird es wichtig sein, weitere Versuche und Forschungen durchzuführen, um vielleicht eines Tages die BZD durch neue Arzneistoffe ohne, oder weniger schlimme Nebenwirkungen zu ersetzen.

Abstract

The GABA_A-receptor is a ligand-gated chlorid channel and point of application of many different active compounds. The activation by its main ligand GABA causes a hyperpolarisation by chlorid influx, which results in an inhibition of the cell. There are also other ligands, which bind to the GABA_A-receptor, such as BZD, barbiturates, anaesthetics or antiepileptics. They are not able to activate the receptor directly, as GABA does, but they act as allosteric modulators.

BZD take a big role in medical therapy. Because of their variety of effects, they are used for threatment of anxiety, insomnia and epilepsy. Unfortunately, there are a lot of side effects connected to the application of BZD, such as dependence, hang over, reboundinsomnia and tolerance. Therefore it would be very useful to find other drugs with the same positive effects, but without the side effects of BZD.

Valerenic acid is one oft he main ingredients in Valeriana officinalis and acts as an allosteric modulator of the GABA_A-receptor. Valerenic acid does not interact with the BZD-binding site, but probably binds to the loreclezol-binding site.

In this work, a drug was modeled based on VA-TET, which shows the same properties. Unfortunately, after succeeding in creating such a compound with ligand-based design, it was not able to synthesise it. The synthesis seemed far more difficult than expected. At first it was possible to successfully synthesise the first part of the structure, the 4,6-Dimethylpyridine-2(1H)-one. After further attempts it was even possible to extend the structure to the 4,6-Dimethyl-2-oxopyridine-1(2H)-carbaldehyde. From that point on, it was not able to completed the synthesis though many attempts.

Nevertheless, more trials and researches will be nessecary that maybe one day the BZD can be replaced by better drugs without or less of their side effects.

4. Experimenteller Teil

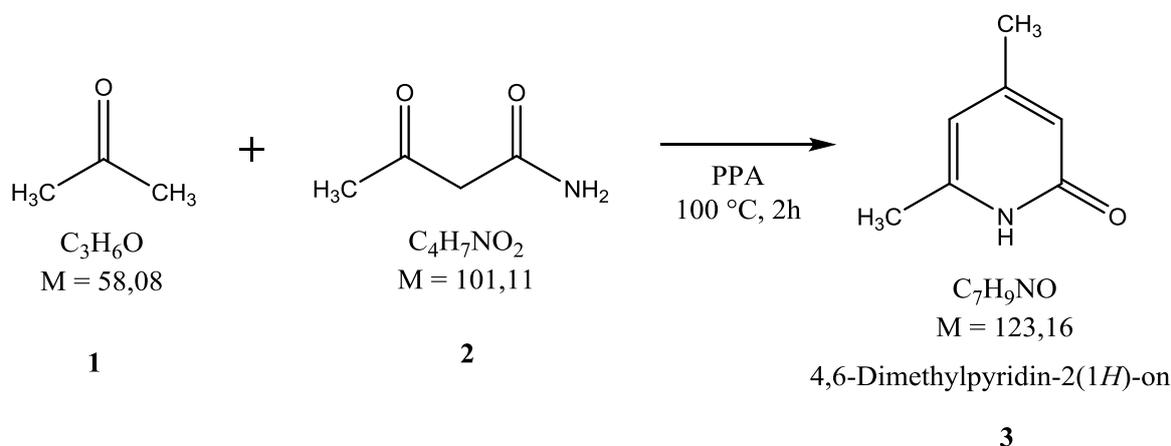
4.1. Allgemeine Anmerkungen

Falls nichts Gegenteiliges vermerkt ist, wurden alle Reagenzien von kommerziellen Anbietern ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Avance 500 sowie einem Bruker Avance 200 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Die Eichung der ppm-Skala für die NMR-Spektren erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals für CDCl_3 [$\delta(^1\text{H}) = 7.26 \text{ ppm}$] bzw. CDCl_3 [$\delta(^{13}\text{C}) = 77.00 \text{ ppm}$]. Für die Flash-Chromatographie wurde Kieselgel der Firma Merck (Si 60, 40 – 63 μm) eingesetzt. Ein Teil des Sorbens wurde in fünf Teile Laufmittel suspendiert, in die Säule eingebracht und solange Laufmittel durch die Säule gepresst (ungefähr 0.5 bar), bis die Packung luftblasenfrei war. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden vorbeschichtete Platten ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey Nagel, 0.20 mm Silicagel 60 Lagen mit Fluoreszenzindikator UV₂₅₄) verwendet. Das Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF) wurde mit Natrium getrocknet und stets frisch destilliert verwendet. Als Indikator für die Wasserfreiheit wurde Benzophenon zugesetzt. Das Kühlen der Reaktionsmischung auf -78°C erfolgte durch das Benutzen eines Kühlbades, das durch Lösen von Trockeneis (festes Kohlenstoffdioxid) in Aceton hergestellt wurde.

4.2. Syntheseprotokoll

Im Folgenden sind die genauen experimentellen Protokolle zur Synthese der einzelnen Substanzen angeführt. Alle Synthesen wurden unter Argon-Atmosphäre ausgeführt.

4.2.1. Synthese von 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on



Synthese in Anlehnung an [21].

Eine Mischung von Aceton **1** (5 g; 86,09 mmol; 4,35 eq.), Acetoacetamid **2** (2 g; 19,78 mmol, 1 eq.), und Polyphosphorsäure (PPA, 10 g) wurde unter ständigem Rühren 2h lang bei 100 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf Eis gegossen und mit festem $NaHCO_3$ neutralisiert. Danach die Mischung abfiltriert, mit Wasser gewaschen und die erhaltenen Kristalle über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde in CH_2Cl_2 gelöst und das beim Abfiltrieren entstandene wässrige Filtrat 3x mit CH_2Cl_2 im Scheidetrichter gewaschen. Die Phasen wurden gesammelt und zum gelösten Produkt hinzugefügt. Danach wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das erhaltene Produkt mit einer Mischung aus Petrolether und Ethylacetat umkristallisiert. Auf diese Weise konnte **3** in Form von gelben Kristallen erhalten werden. (0,631 g; 5,13 mmol; 25,91%).

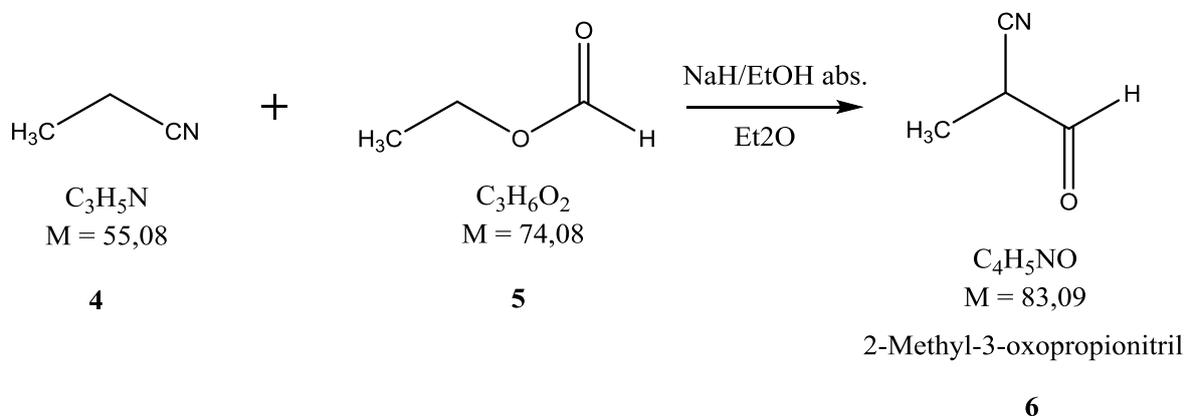
Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte eine Umsetzung der Edukte zum gewünschten Produkt.

$[\text{M}+\text{H}]^+ = 124$

$^1\text{H-NMR}$ (δ in ppm): 6.19 (s, 1H, CH, 3), 5.90 (s, 1H, CH, 5), 2.16 (s, 3H, CH_3 , 4),
2.30 (s, 3H, CH_3 , 6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (δ in ppm) : 165.84 (CO), 115.10 (CH-CO), 153.67 (C- CH_3), 108.56
(CH-C-N), 144.51 (NCCH₃), 21.57 (CH_3CHN), 18.83 (CH_3)

4.2.2. Versuch zur Synthese von 2-Methyl-3-oxo-propionitril

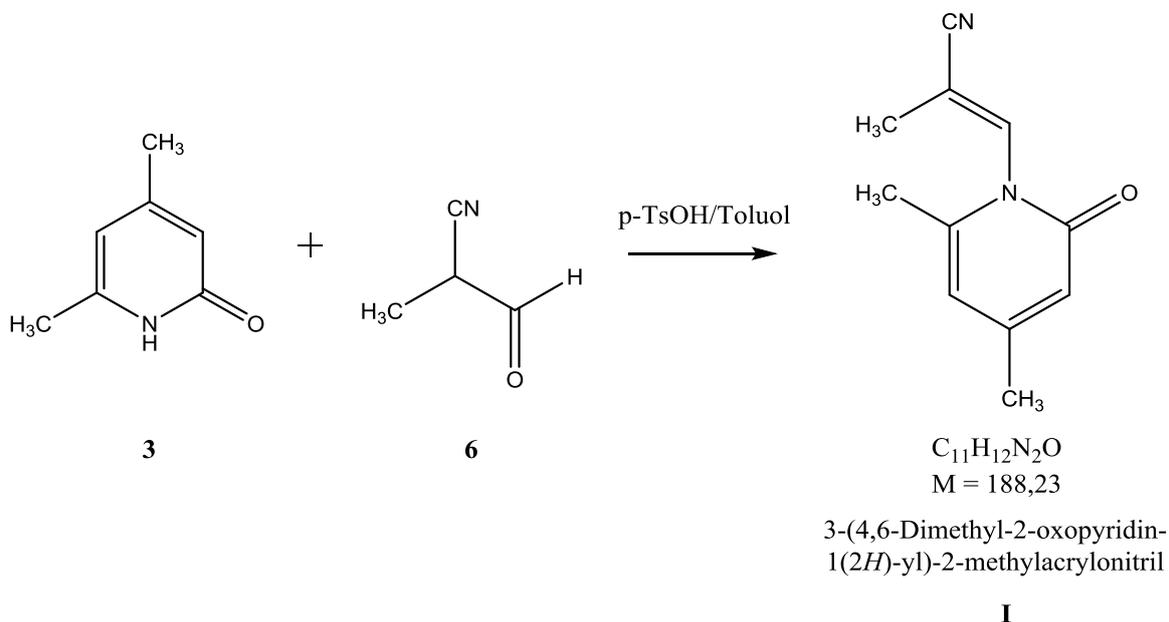


Synthese in Anlehnung an [22].

Eine Lösung von Propionitril **4** (17,1 ml; 240 mmol; 1 eq.), Ethylformiat **5** (39 ml; 484 mmol; 2 eq.) und absolutem Ethanol (2 ml, 34,3 mmol; 0,14 eq.) in 30 ml wasserfreiem Ether wurde über eine Dauer von ca. 30 min tropfenweise zu einer gut gerührten Suspension von NaH (9,6 g) in 100 ml wasserfreiem Ether bei Raumtemperatur hinzugefügt. Danach wurde die milchig-weiße Suspension 16 h lang gerührt und anschließend das Lösungsmittel bei einer Wasserbadtemperatur unter 30 °C am Rotationsverdampfer abgezogen. Zu dem erhaltenen Feststoff wurden vorsichtig 50 ml H_2O hinzugefügt. Die Mischung wurde mit Essigsäure neutralisiert (pH 4-5) und im Scheidetrichter 3x mit CH_2Cl_2 gewaschen. Danach wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei einer Wassertemperatur unter 30 °C abgezogen.

Im 1H -NMR waren nicht die gewünschten Signale sichtbar.

4.2.3. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril

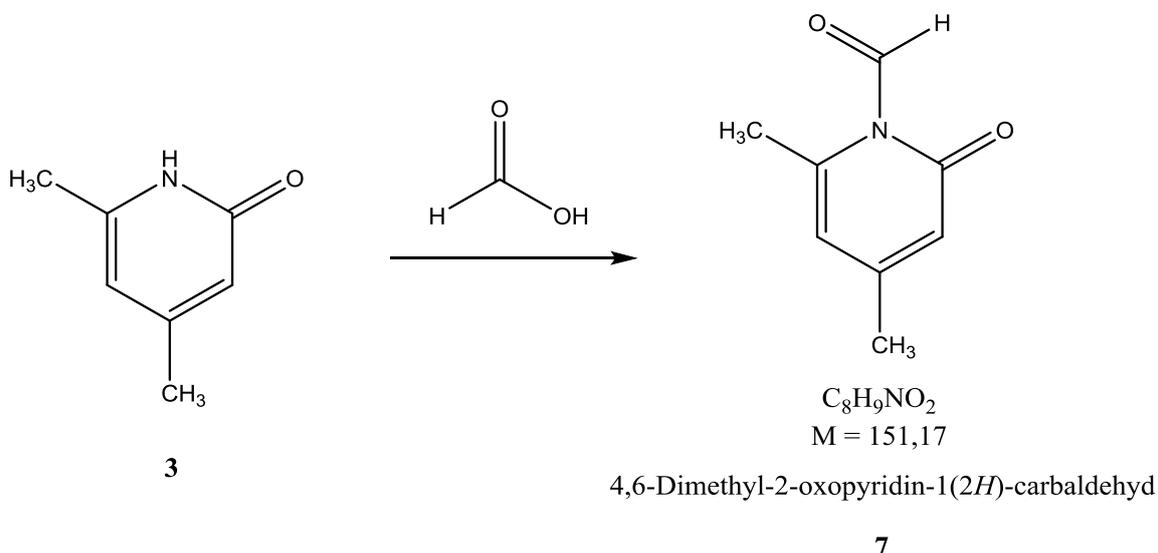


Synthese in Anlehnung an [23].

In einen 50 ml Rundkolben wurden 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on **3** (0,15 g; 1,22 mmol; 1 eq.), 2-Methyl-3-oxopropionitril **6** (0,304 g; 3,66 mmol; 3 eq.) und p-Toluensulfonsäure (p-TsOH) (0,023 g; 0,122 mmol; 0,1 eq.) als Katalysator eingewogen. Anschließend wurden 25 ml Toluol hinzugefügt und die Mischung am Ölbad unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und die wässrige Phase 3x mit Ethylacetat extrahiert. Danach wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das 1H -NMR zeigte keine Umsetzung zum gewünschten Produkt.

4.2.4. Versuch zur Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd

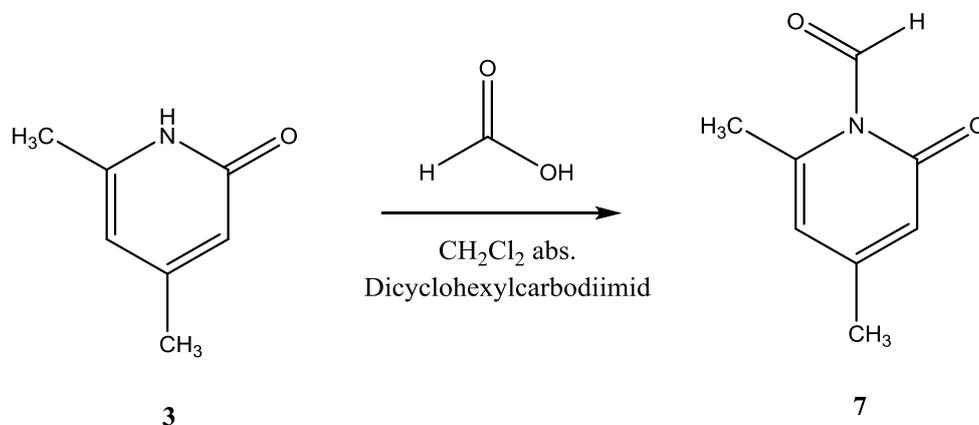


Synthese in Anlehnung an [24].

Eine Lösung von 4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on **3** (0,265 g; 2,2 mmol; 1 eq.) in Ameisensäure (3,6 ml; 95,4 mmol; 43 eq.) wurde unter Rückfluss 3 h lang erhitzt. Die Mischung wurde anschließend auf Eis gegossen und filtriert. Die Kristalle wurden mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die wässrige Phase wurde 3x mit Ethylacetat extrahiert, die Ethylacetat-Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Um die Ameisensäure wegzubekommen wurde das Produkt in Toluol gelöst und danach auch dieses am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte nicht die gewünschten Signale, was auf eine Zersetzung des Eduktes hindeutet.

4.2.5. Versuch zur Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd

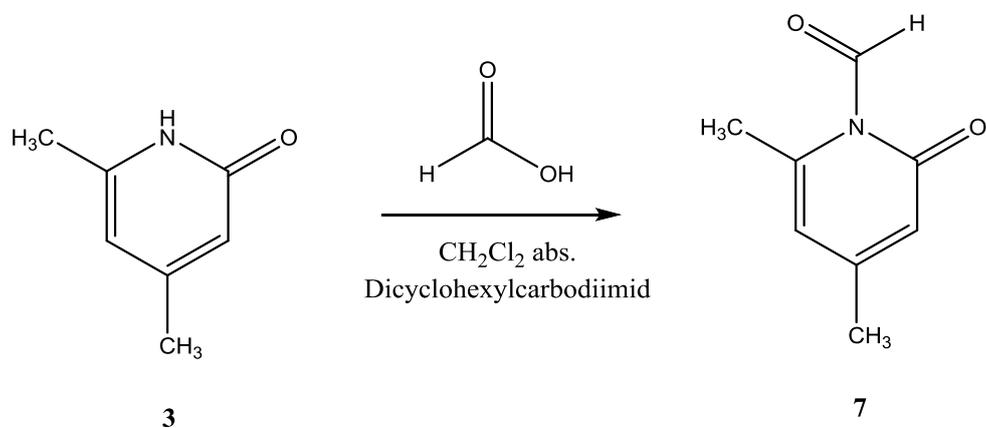


Synthese in Anlehnung an [25].

4,6-Dimethylpyridin-2(1H)-on **3** (0,4 g; 3,25 mmol; 1 eq.) und Ameisensäure (0,39 g; 8,49 mmol; 1,16 eq.) wurden in 6,7 ml absolutem CH₂Cl₂ unter Rühren und bei Feuchtigkeitsausschluss bei 0 °C suspendiert. Hierzu wurde eine Lösung von DCC (1,86 g; 9,03 mmol; 1,24 eq.) in 7,2 ml absolutem CH₂Cl₂ zutropfen. Anschließend wurde 2 h lang bei 0°C gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Nach Abzug etwa der Hälfte des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde anschließend die restliche Lösung über Nacht auf -40 °C gekühlt. Danach wurde der restliche ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, zur erhaltenen Flüssigkeit ca. 100 ml Petrolether hinzugefügt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das anschließende ¹H-NMR zeigte keine Umsetzung zum gewünschten Produkt.

4.2.6. Synthese von 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd



Durchführung wie bei 4.2.5.

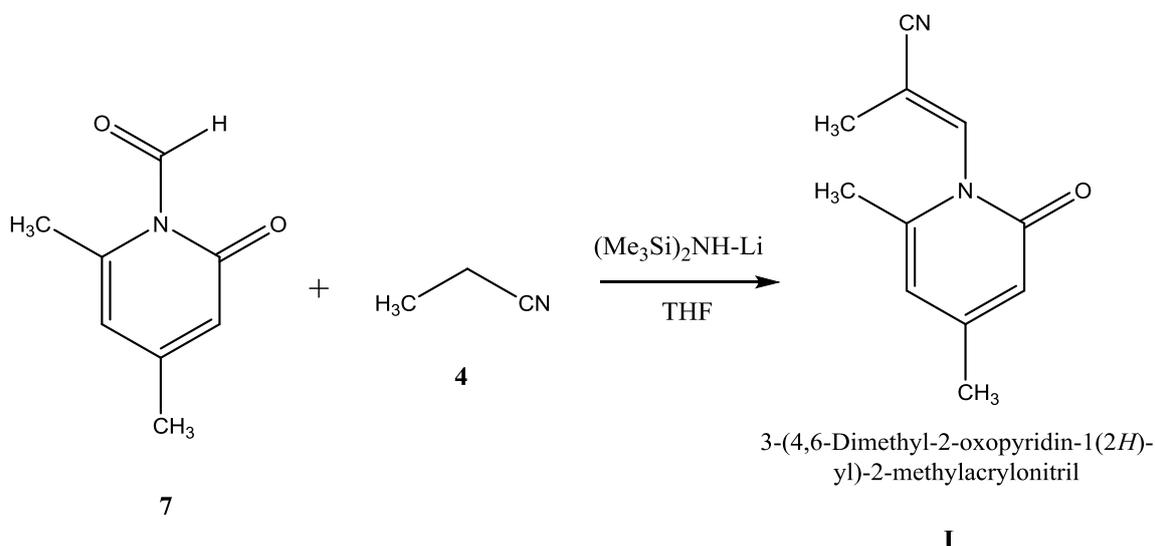
Nach dem Hinzufügen von ca. 100 ml Petrolether zur Lösung, die nach dem Abfiltrieren des restlichen ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff erhalten wurde, wurde das Lösungsmittel bei unter 30 °C am Rotationsverdampfer abgezogen. Zurück blieb ein unreines, sehr labiles Produkt. (1,17 g; 7,7 mmol; 238,78%).

Das ¹H-NMR zeigte die gewünschten Signale.

¹H-NMR (δ in ppm): 6.67 (s, 1H, CH, 3), 5.91 (s, 1H, CH, 5), 2.35 (s, 3H, CH₃, 4), 2.46 (s, 3H, CH₃, 6), 8.87 (Amid), 8.59 (Rotamerer Formamid)

¹³C-NMR (δ in ppm) : 157.52 (CO), 111.08 (CH-CO), 151.92 (C-CH₃), 122.60 (CH-C-N), 157.26 (NCCH₃), 20.93 (CH₃CHN), 23.74 (CH₃), 159.16 (Amid), 161.91 (Rotamerer Formamid)

4.2.7. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril

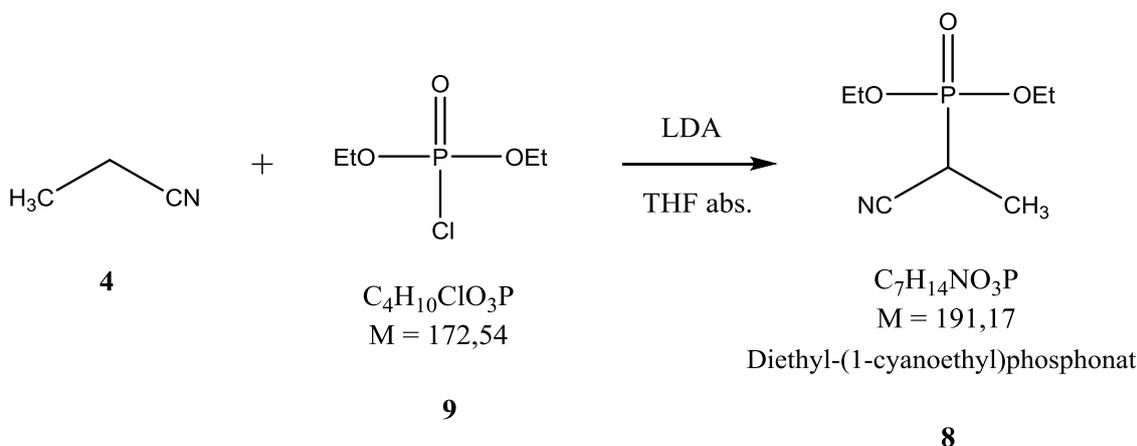


Synthese in Anlehnung an [26].

Propionitril **4** (0,13 g; 2,36 mmol; 1,2 eq.) wurde in 3 ml THF auf -78 °C gekühlt, anschließend 2,6 ml Lithiumbis(trimethylsilyl)amid zugetropft und 30 min lang rühren gelassen. Danach wurde 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd **7** (0,3 g; 1,98 mmol; 1 eq.) in 3 ml THF zugetropft und die Mischung 12 h lang bis Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurden ca. 5 ml CH₂Cl₂ und 0,5 ml Trifluoressigsäure (TFA) hinzugefügt und die Mischung 4 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit NaHCO₃-Lösung nachgewaschen, die wässrige Phase noch 3x mit CH₂Cl₂ extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Abschließend wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei etwas 15 g Kieselgel verwendet wurden. Als Fließmittel diente CH₂Cl₂.

Das ¹H-NMR zeigte nicht die gewünschten Signale, was auf eine Zersetzung des Eduktes hindeutet.

4.2.8. Synthese von Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat



Synthese in Anlehnung an [28].

Zu Beginn dieser Reaktion wurde eine Lithiumdiisopropylamid (LDA)-Lösung hergestellt. Dabei wurde zu einer Lösung von 3,1 ml Diisopropylamin in 65 ml absolutem THF 8,8 ml n-Butyllithium zugetropft und anschließend unter Argon auf -78 °C abgekühlt.

Danach wurde Propionitril **4** (0,8 ml; 11 mmol; 1 eq.) in 60 ml absolutem THF tropfenweise etwa für 1 h lang hinzugefügt. Die Mischung wurde 30 min lang gerührt und anschließend eine Lösung von Diethylchlorphosphat **9** (1,9 g; 11 mmol; 1 eq.) in 10 ml absolutem THF tropfenweise über eine Dauer von 30 min zugegeben. Dann wurde drei weitere Stunden gerührt und die Mischung über Nacht bei -30 °C gelagert.

Später wurde die Mischung auf 100 ml Wasser gegossen und die wässrige Phase 3x mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetat-Phasen und die THF-Phase wurden zusammengefügt und 2x mit je 25 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Abschließend über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

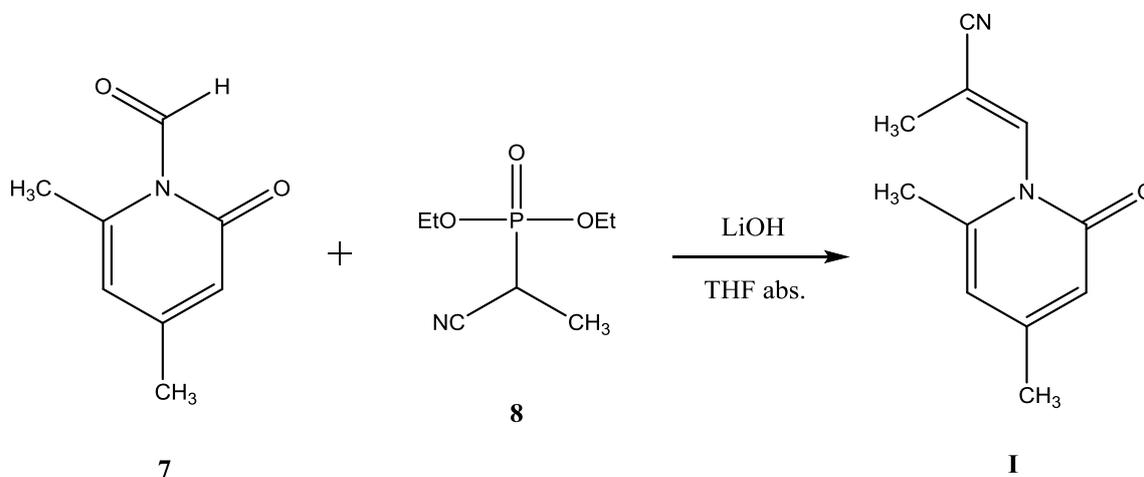
Man erhält das Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat als Produkt **8**.

(0,354 g; 1,85 mmol; 168,49 %)

Das ¹H-NMR zeigte eine Umsetzung der Edukte zum gewünschten Produkt.

¹H-NMR (δ in ppm): 4.25 (m, 4H, OCH₂), 2.97 (dq; ²J(¹H, ³¹P) = 23,65 Hz, ³J(¹H, ¹H) = 7.25 Hz, 1H, CH), 1.56 (dq; ³J(¹H, ³¹P) = 17,05 Hz, ³J(¹H, ¹H) = 7.25 Hz, 3H, CH₃), 1.39 (m, 6H, -CH₂-CH₃).

4.2.9. Versuch zur Synthese von 3-(4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-yl)-2-methylacrylonitril



Synthese in Anlehnung an [27].

Eine Mischung von Diethyl-(1-cyanoethyl)phosphonat **8** (0,21 g; 1,1 mmol; 1,1 eq.), Lithiumhydroxid (LiOH) (0,03 g; 1,2 mmol; 1,2 eq.) und 10 ml absolutem THF wurde 3 h lang bei 70 °C gerührt und danach auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend wurde 4,6-Dimethyl-2-oxopyridin-1(2H)-carbaldehyd **7** (0,15 g; 1,0 mmol; 1 eq.) über ein Septum zugetropft. Die Mischung wurde 1,5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde eine Dünnschichtchromatographie (DC) gemacht um zu sehen, ob sich das Edukt vollständig umgesetzt hat. Die organische Phase wurde mit 20 ml Diethylether verdünnt und mit 5 ml 1N HCl-Lösung und anschließend mit 2x 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das 1H-NMR zeigte nicht die gewünschten Signale, was auf eine Zersetzung des Eduktes hindeutet.

5. Quellenangabe

- [1] Martin Trepel, 2008. Neuroanatomie – Struktur und Funktion, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 2-3
- [2] Heinrich Reichert, 2000. Neurobiologie, Georg Thieme Verlag, 17
- [3] Martin Trepel, 2008. Neuroanatomie – Struktur und Funktion, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 7
- [4] Martin Trepel, 2008. Neuroanatomie – Struktur und Funktion, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 4
- [5] Martin Trepel, 2008. Neuroanatomie – Struktur und Funktion, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 13
- [6] Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke, 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 126-127
- [7] Peter H. Tonner, Lutz Hein, 2011. Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin: Grundlagen und klinische Konzepte, Springer Verlag, 23-24
- [8] Elaine V. Morlock, Cynthia Czajkowski, 2011. Different Residues in the GABA_A Receptor Benzodiazepine Binding Pocket Mediate Benzodiazepine Efficacy and Binding, *Molecular Pharmacology* 80:14-22
- [9] Paul J. Whiting, 1999. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention, Elsevier, *Neurochemistry International* 34, 387-390
- [10] John R. Atack, 2010. Development of Subtype-Selective GABA_A Receptor Compounds for the Treatment of Anxiety, Sleep Disorders and Epilepsy, Department of Neuroscience, Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, Springer Basel AG, 25-72.
doi:10.1007/978-3-0346-0226-6_2
- [11] Mag. pharm. Sophia Khom, Dissertation 2008. Valerenic acid, actein and derivatives: Subunitdependent Modulation of GABA_A receptors, 24
- [12] Kelly R. Tan, Uwe Rudolph, Christian Lüscher, 2011. Hooked on benzodiazepines: GABA_A receptor subtypes and addiction, *Trends Neuroscience* 34(4): 188-197. doi: 10.1016/j.tins.2011.01.004.

- [13] Khom S., Baburin I., Timin E., Hohaus A., Trauner G., Kopp B., Hering S., 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity, Elsevier, *Neuropharmacology* 53, 178-187. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.04.018
- [14] Khom S., Strommer B., Ramharter J., Schwarz T., Schwarzer C., Erker T., Ecker GF., Mulzer J., Hering S., 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands – in vitro and in vivo characterization, *British Journal of Pharmacology* 161, 65-78. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00865.x
- [15] Thierry Langer, Remy D. Hoffman, Raimund Mannhold, Hugo Kubinyi, Gerd Folkers, 2006. *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*, Vol. 32, 3
- [16] Erna Obkircher, Diplomarbeit 2002. *Computer-Aided Design of Potential Inhibitors of HSD Isoenzymes*, Leopold-Franzens Universität Innsbruck, 14
- [17] Gerhard Wolber, Thierry Langer, 2005. LigandScout: 3-D Pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters, *J. Chem. Inf. Model.* 45, 160-169. doi: 10.1021/ci049885e
- [18] Theodora M. Steindl, Daniela Schuster, Gerhard Wolber, Christian Laggner, Thierry Langer, 2006. High-throughput structure-based pharmacophore modelling as a basis for successful parallel virtual screening, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 20: 703-715. doi: 10.1007/s10822-006-9066-y
- [19] Jia Fei, Lu Zhou, Tao Liu, Xiang-Yang Tang, 2013. Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Molecular Docking Studies for Discovery of Novel Akt2 Inhibitors, *International Journal of Medical Sciences* 10(3): 265-275. doi: 10.7150/ijms.5344
- [20] Sheng-Yong Yang, 2010. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances, Elsevier, *Drug Discovery Today* 15 (11-12): 444-450. doi: 10.1016/j.drudis.2010.03.013
- [21] Tetsuzo Kato, Masayuki Sato, Masaki Noda, Tetsuo Itoh, 1980. Synthesis of Methylpyridine Derivatives. XXXIV. Condensation of Acetoacetamide with Ketones to form Pyridone Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 28(7): 2244-2247

- [22] Rajagopal Bakthavatchalam, Scott M. Capitolsti, Indranath Ghosh, Geroge D. Maynard, Luyan Zhang, 2008. Crf1 receptor ligands comprising fused bicyclic heteroaryl moieties. WO2008083070 A1
- [23] Alan R. Katritzky, Guowei Yao, Xiangfu Lan, Xiaohong Zhao, 1993. The Conversion of Secondary into Tertiary Amides Using Benzotriazole Methodology, *J. Org. Chem.* 58(8): 2086-2093. doi: 10.1021/jo00060a025
- [24] Sherif A.F. Rostom, Hassan M. Faidallah, Mohammed S. Al-Saadi, 2011. A facile synthesis of some 3-cyano-1,4,6-trisubstituted-2(1H)-pyridinones and their biological evaluation as anticancer agents, *Med. Chem. Res.* 20: 1260-1272. doi: 10.1007/s00044-010-9469-0
- [25] Franz Effenberger, Michael Keil, Eberhard Bessey, 1980. Darstellung von N-Formylpyridonen – Selektive Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole mit N-Acylpyridonen, *Chem. Ber.* 113: 2110-2119
- [26] Xuechen Li, Samuel J. Danishefsky, 2008. New Chemistry with Old Functional Groups: On the Reaction of Isonitriles with Carboxylic Acids – A Route to Various Amide Types, *Journal of the American Chemical Society* 130(16): 5446-5448. doi: 10.1021/ja800612r
- [27] Alessandra Lattanzi, Liliana R. Orelli, Patrizia Barone, Antonio Massa, Patrizia Iannece, Arrigo Scettri, 2003. Convenient procedure of Horner-Wadsworth-Emmons olefination for the synthesis of simple and functionalized α,β -unsaturated nitriles, *Tetrahedron Letters* 44: 1333-1337
- [28] Ali A. Kandil, Terence M. Porter, Keith N. Slessor, 1987. One-step Synthesis of Stabilized Phosphonates, *Synthesis* 1987, 1987(4): 411-413. doi: 10.1055/s-1987-27968

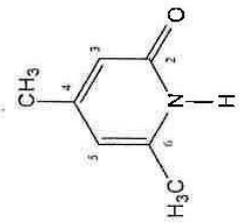
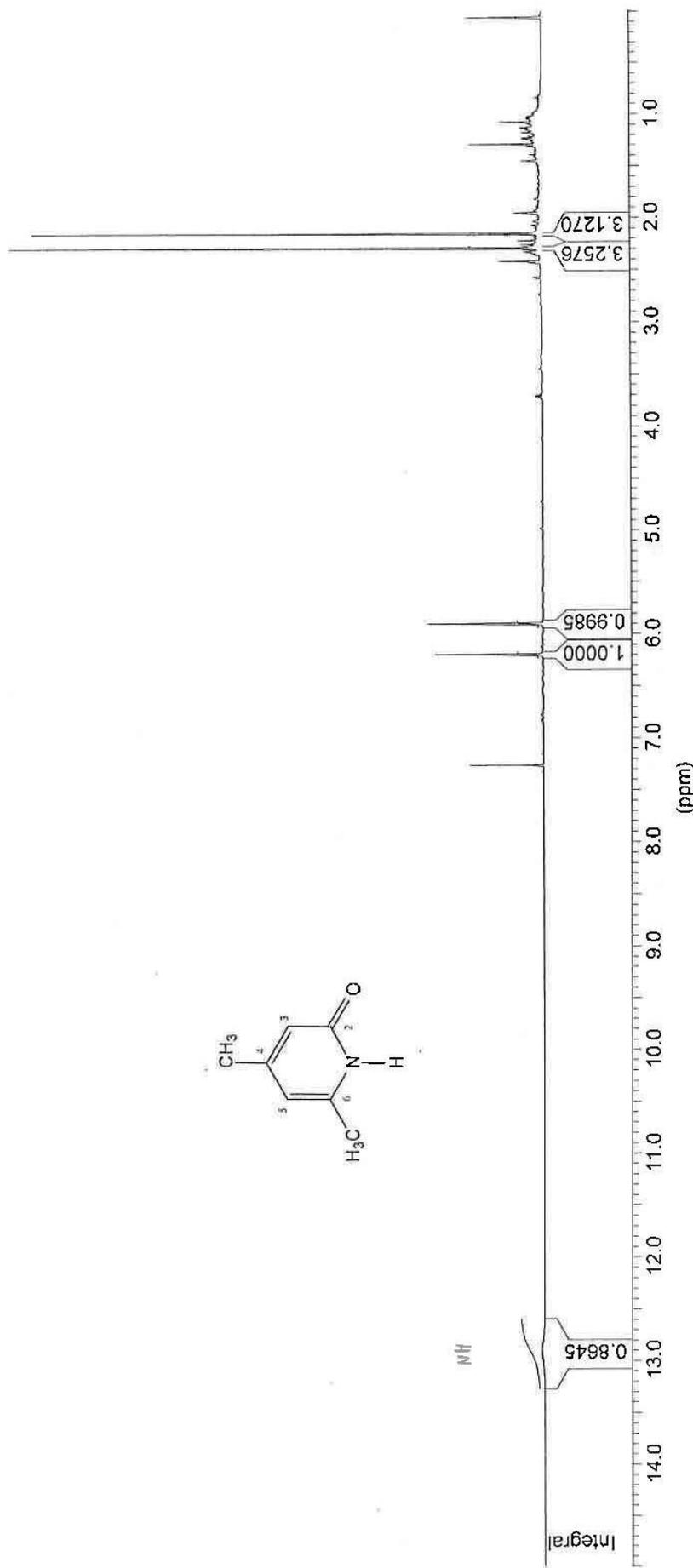
6. Spektren

2.2934
2.1547

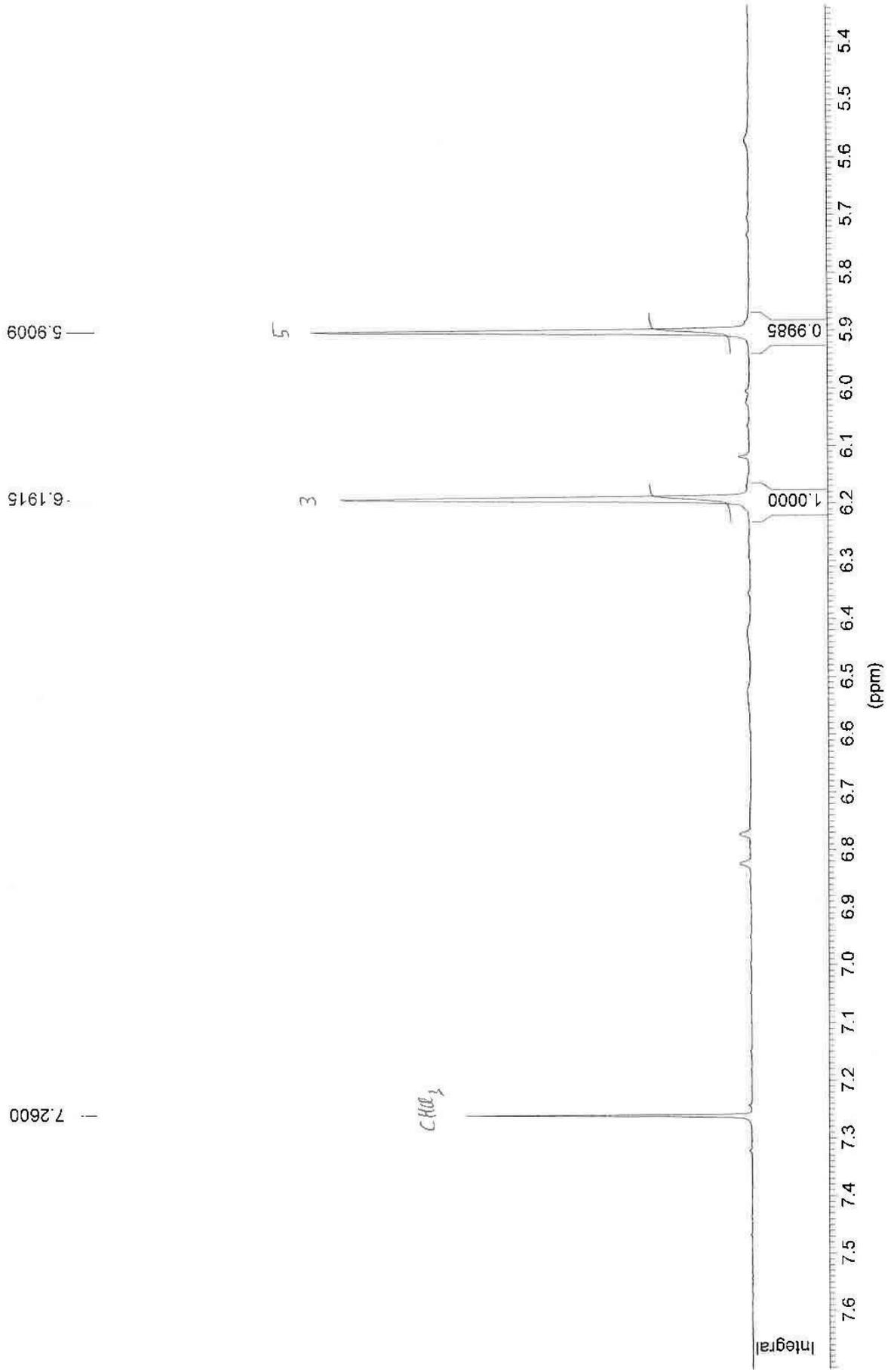
5.9009
6.1915

7.2600

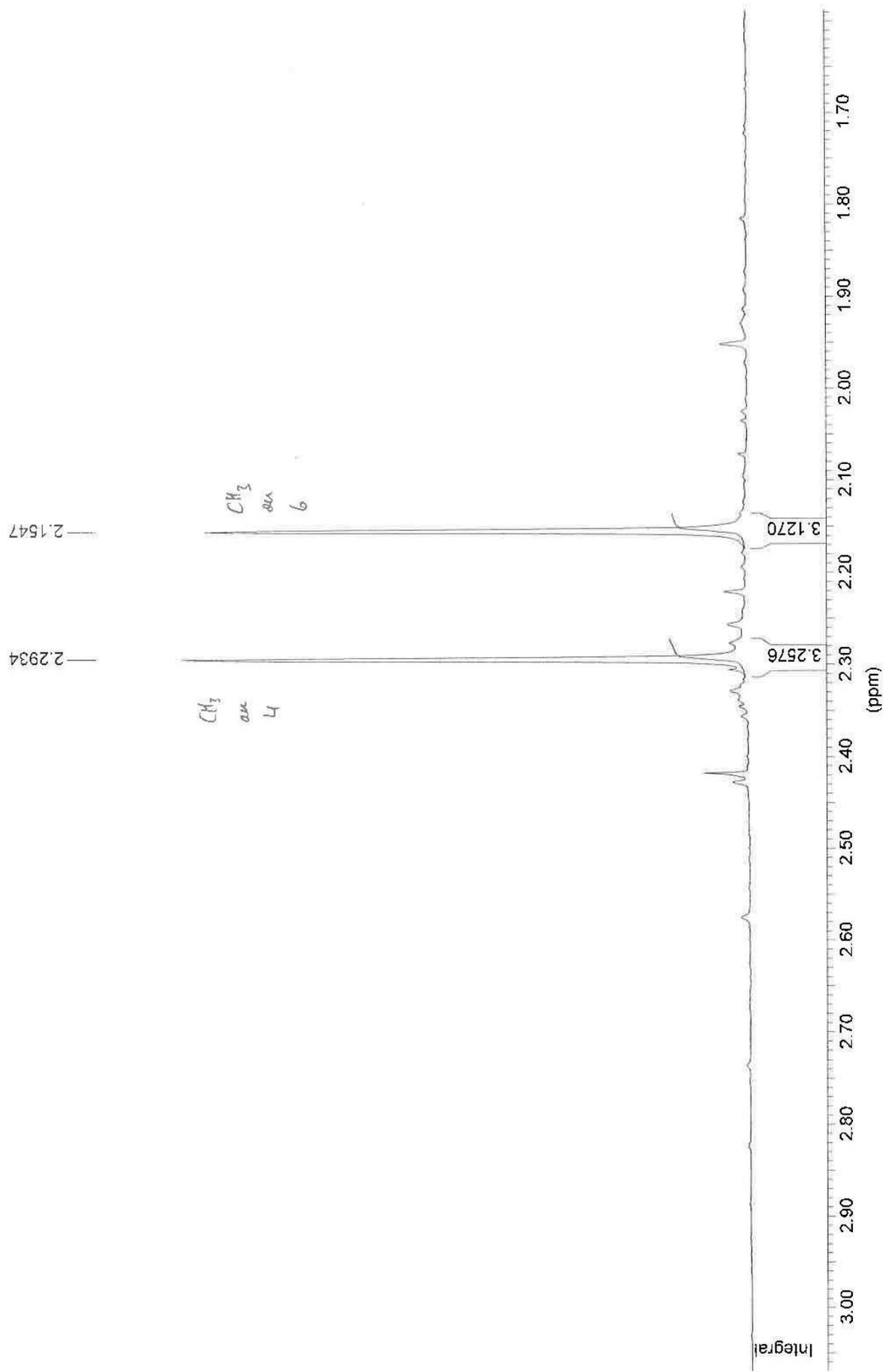
12.8961



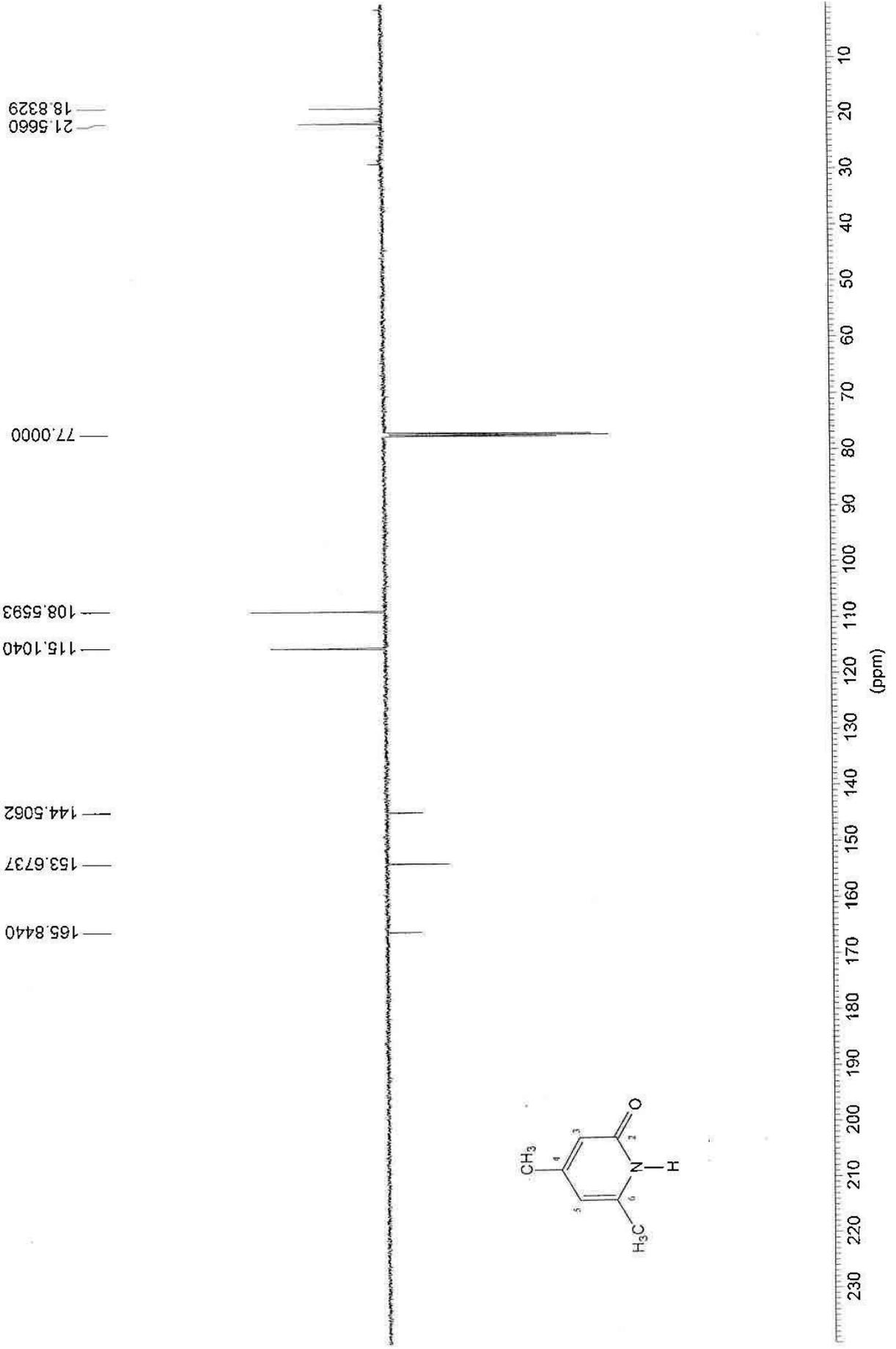
MW001 in cdcl3 (Proton), 10.7.2014



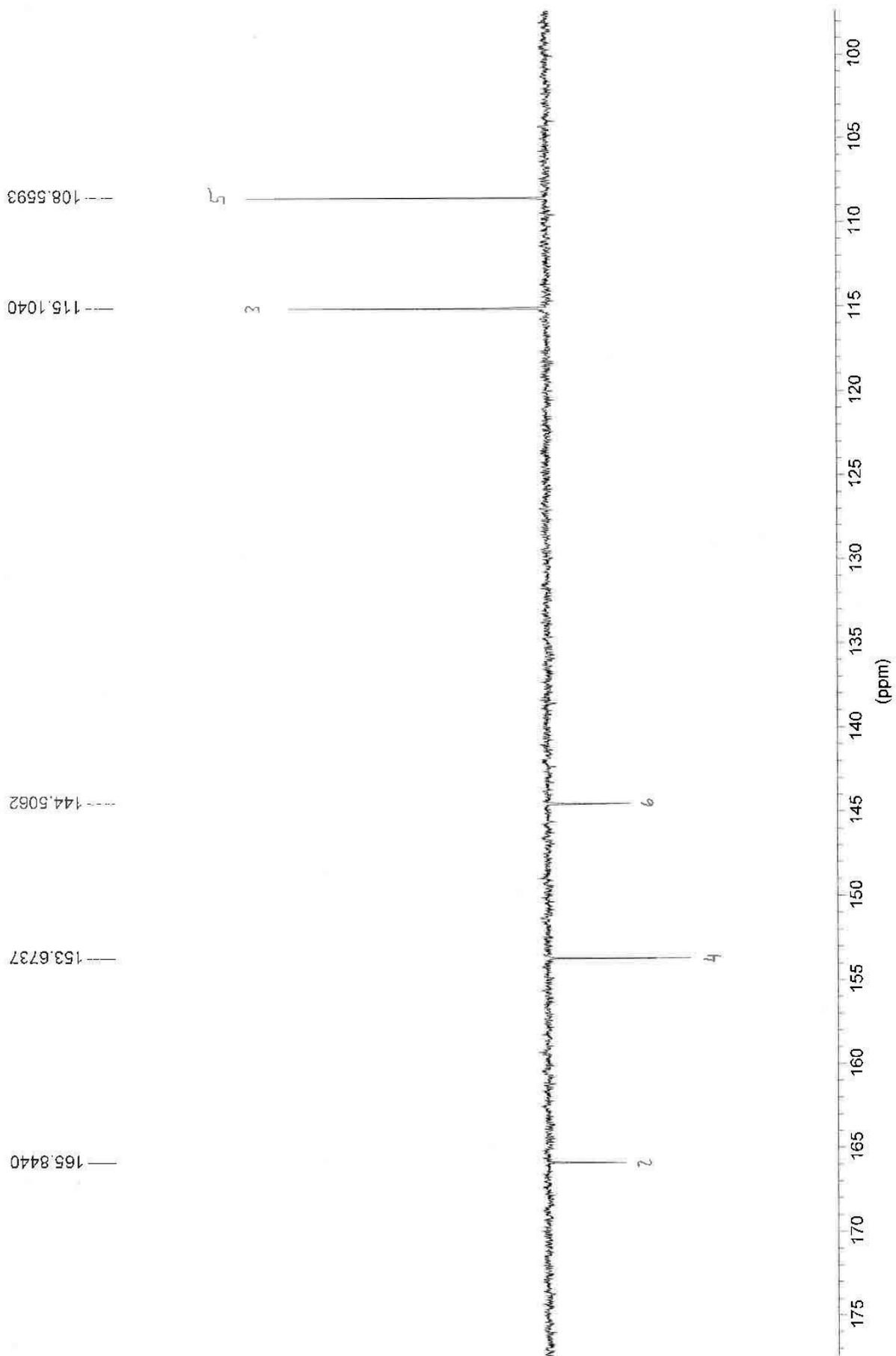
MW001 in cdcl3 (Proton), 10.7.2014

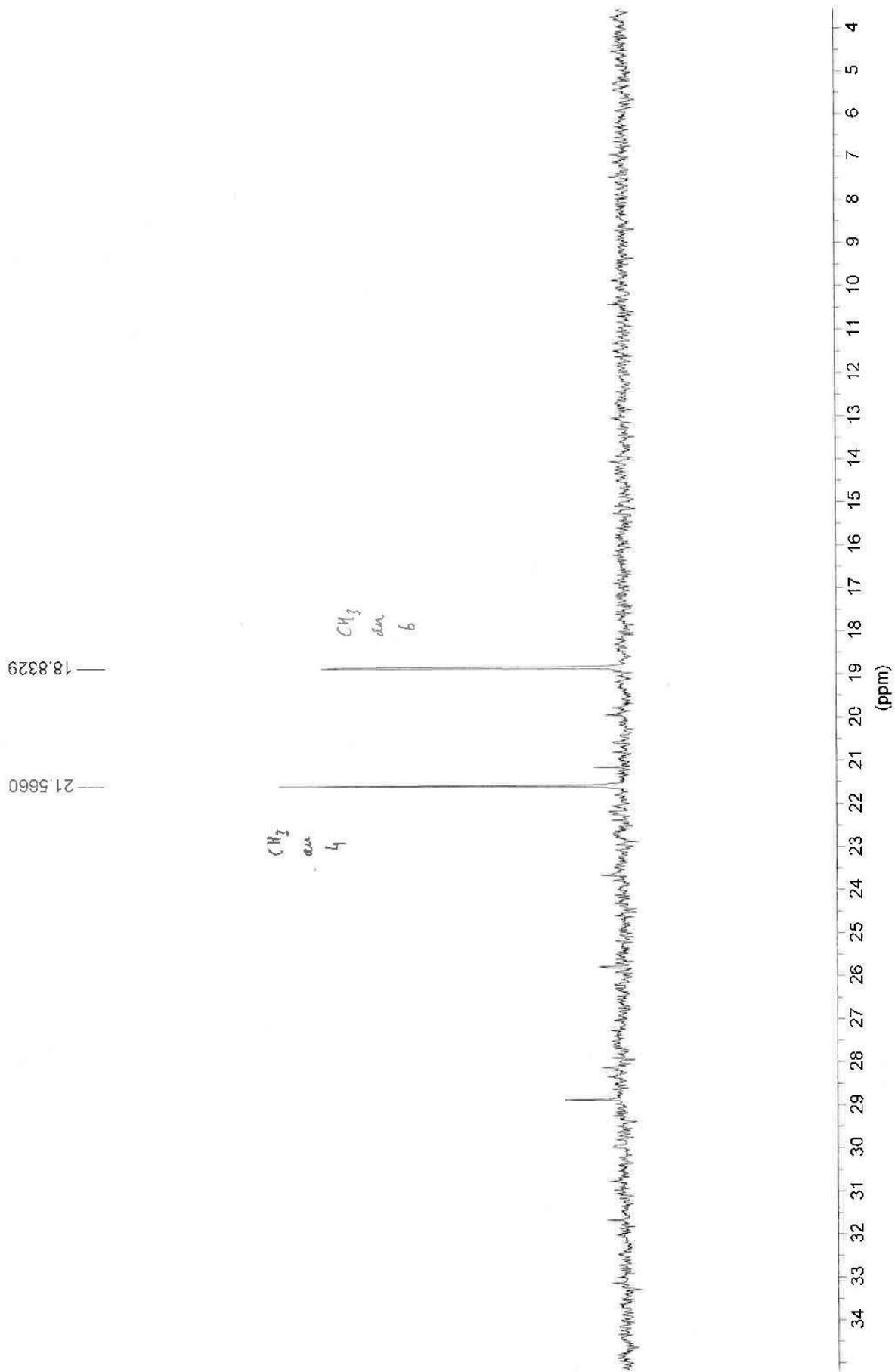


MW001 in cdcl3 (APT), 10.7.2014

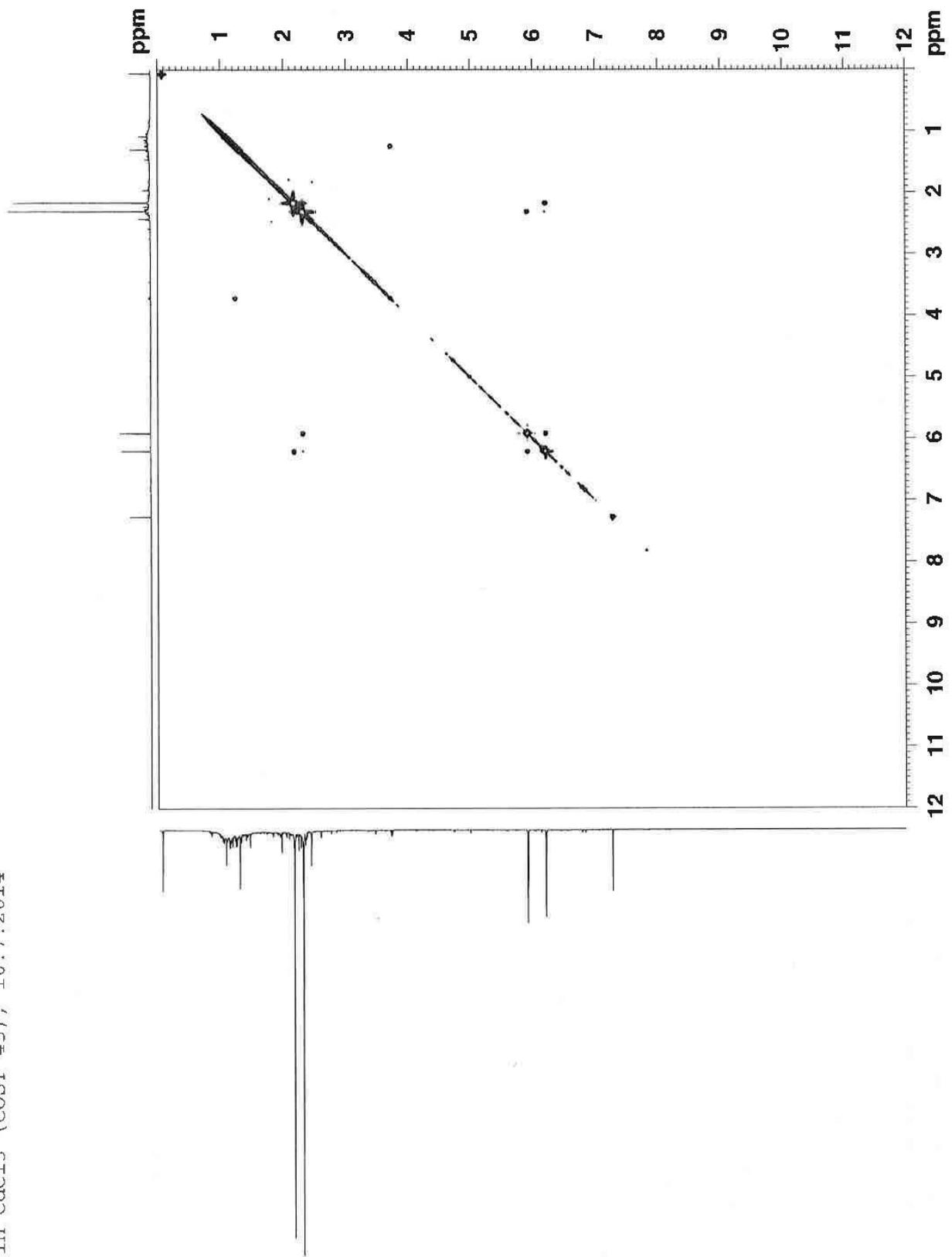


MW001 in cdd3 (AFT), 10.7.2014

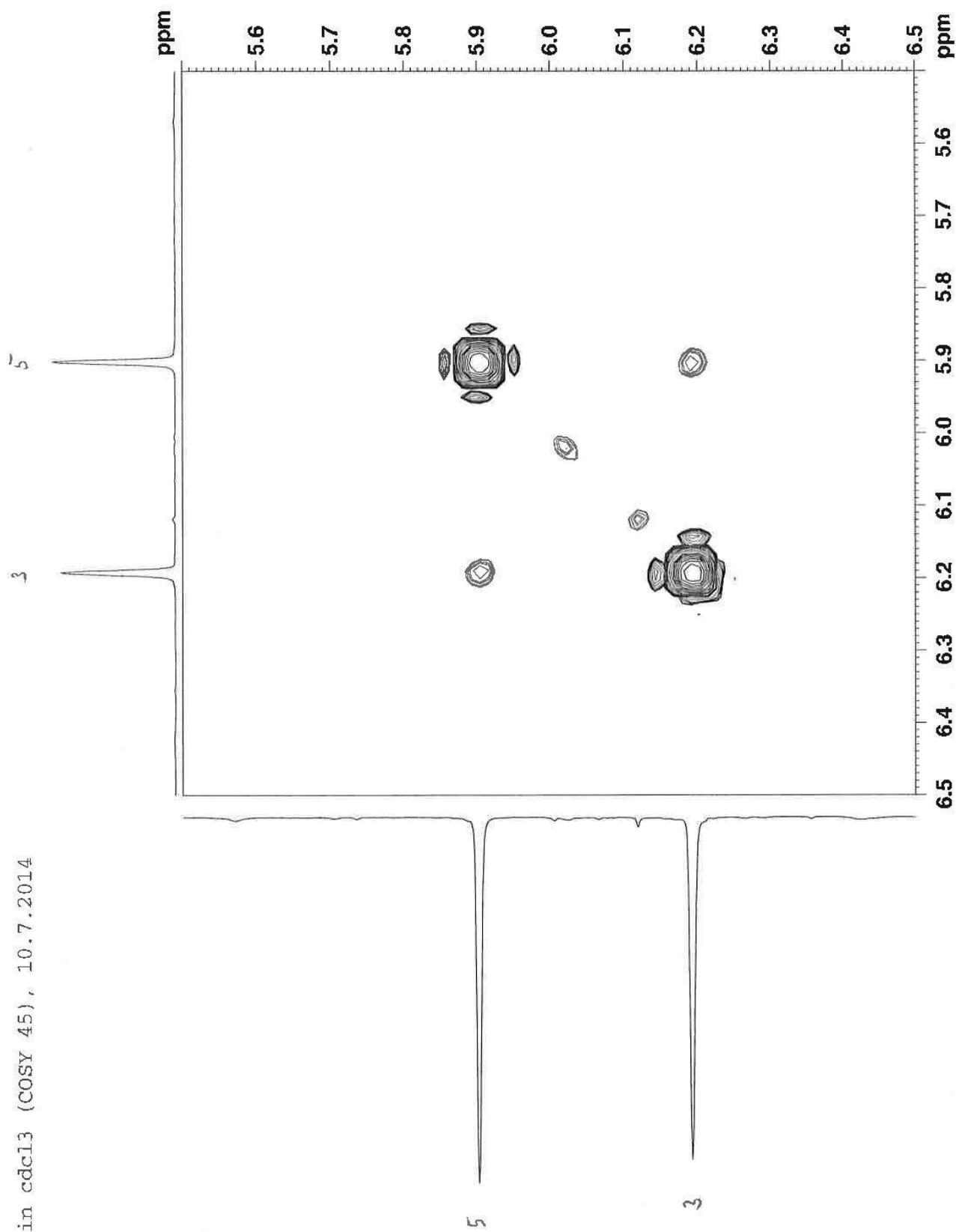




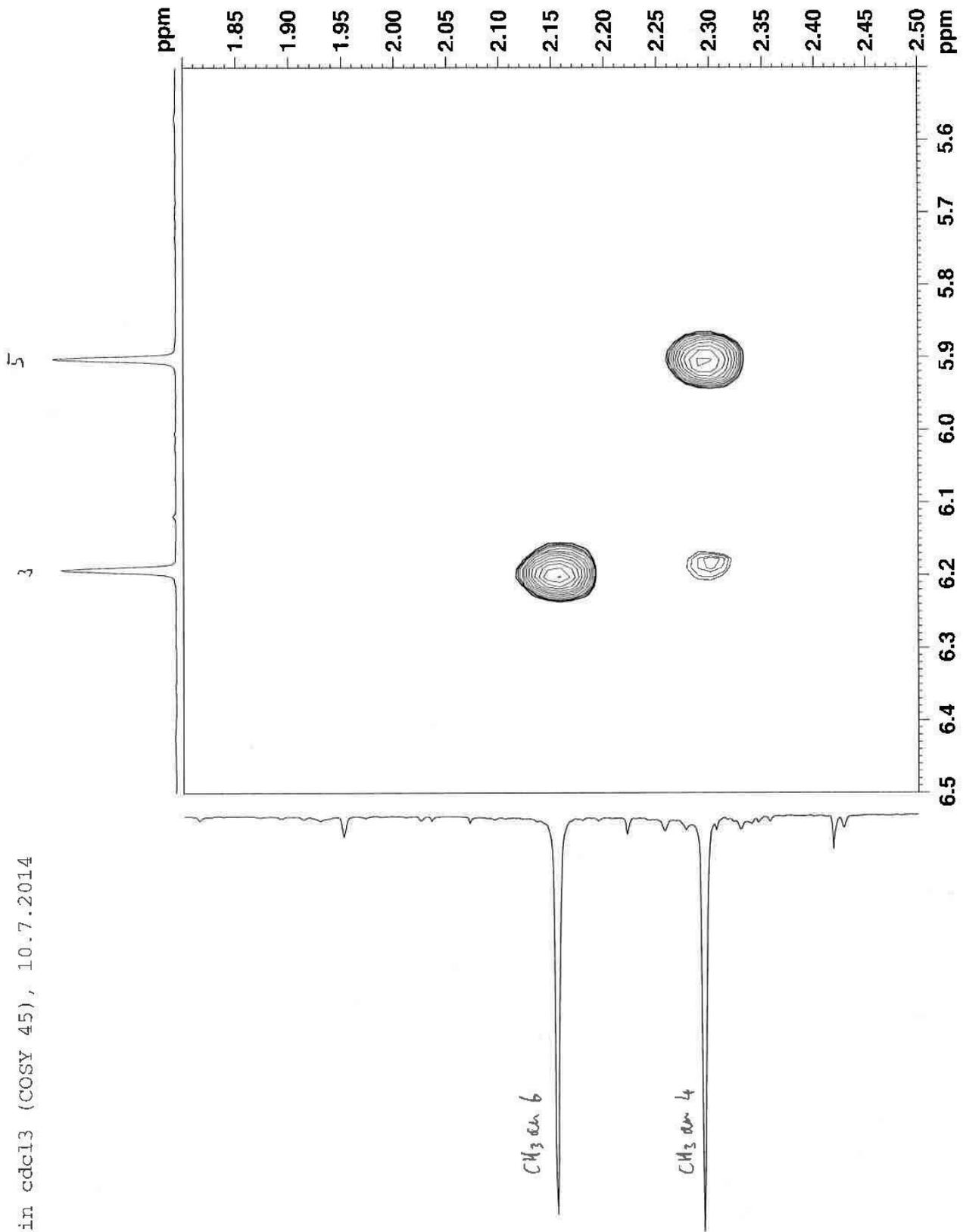
MW001 in cdcl3 (COSY 45), 10.7.2014



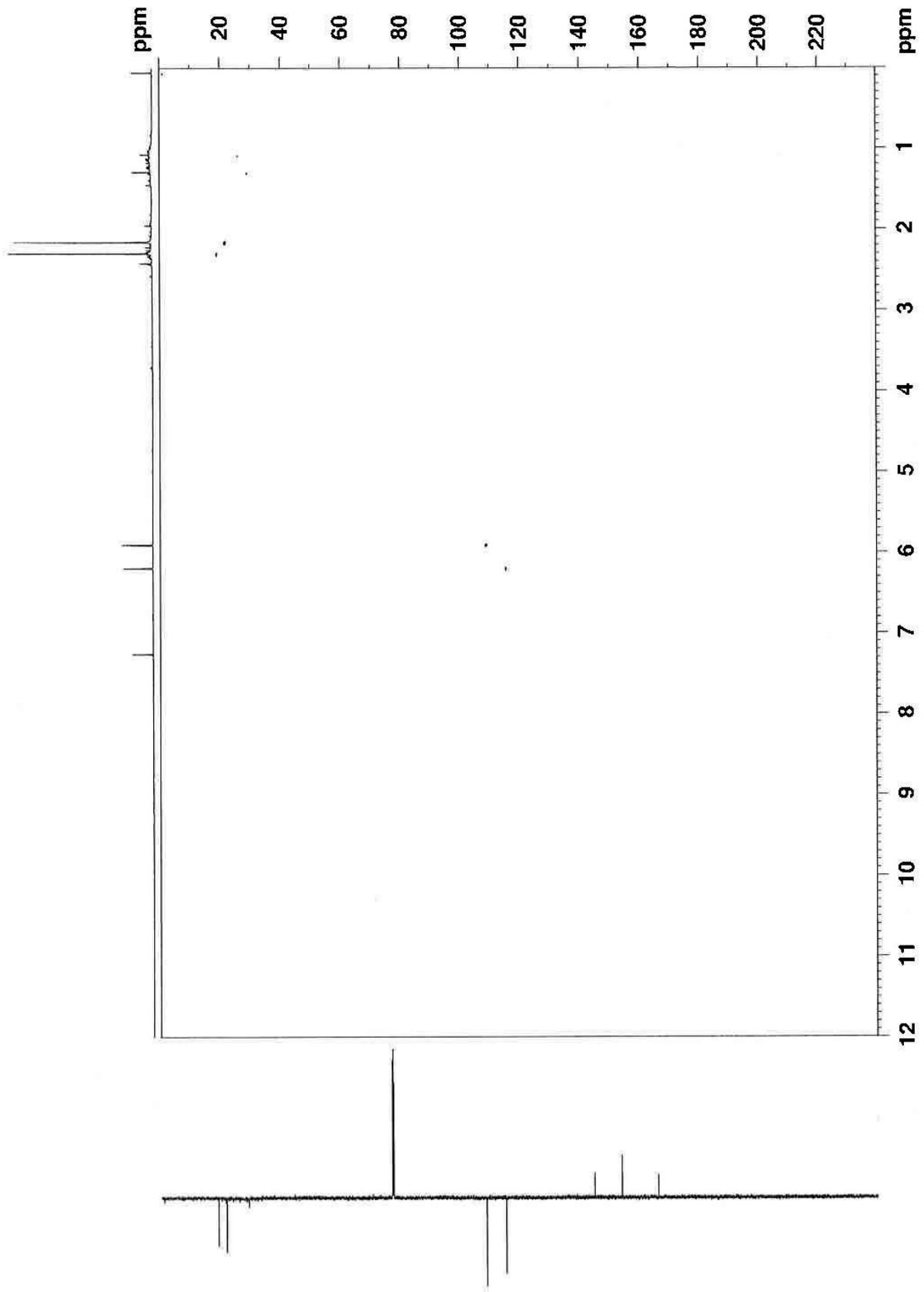
MW001 in cdcl3 (COSY 45), 10.7.2014



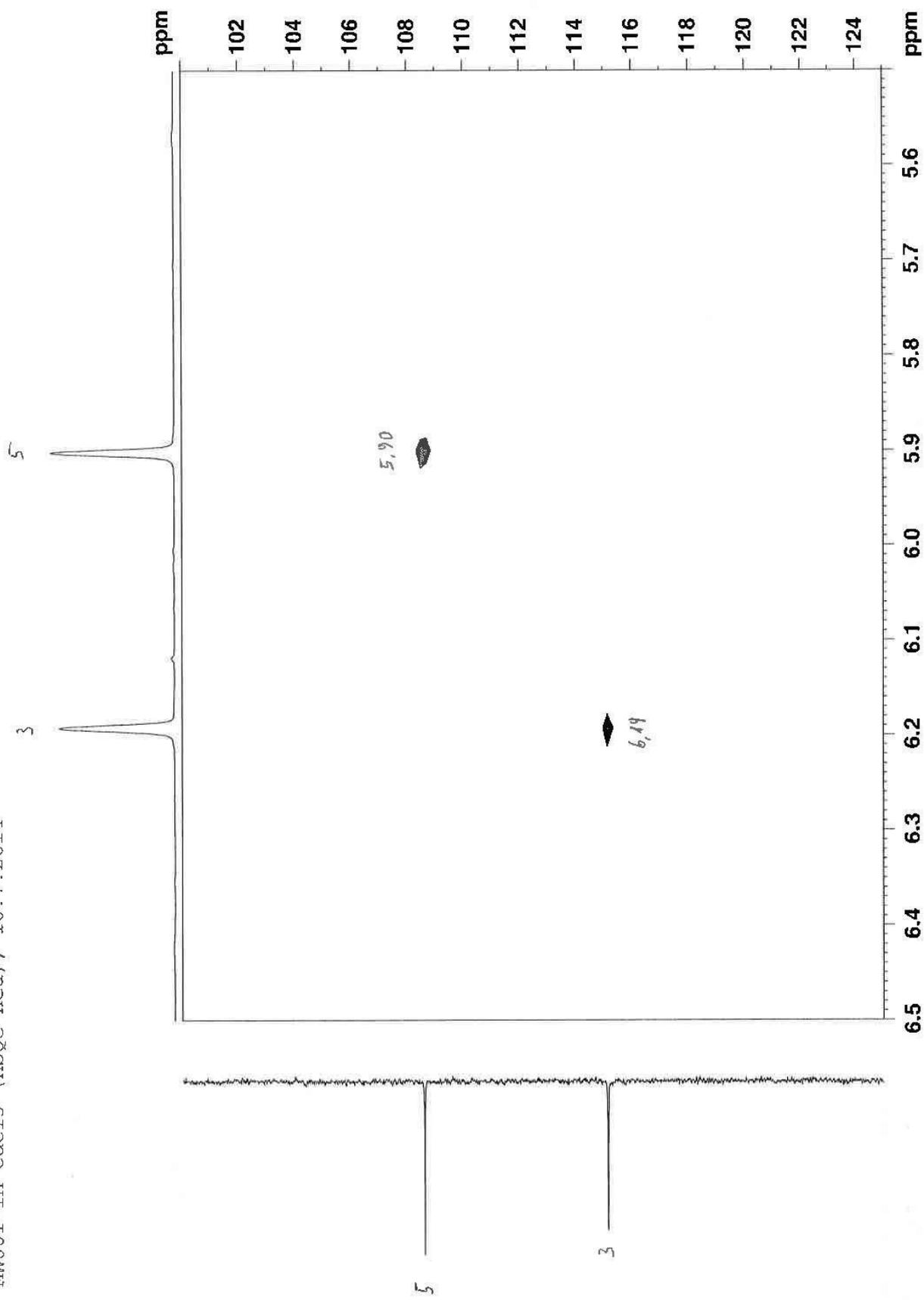
MW001 in cdcl3 (COSY 45), 10.7.2014



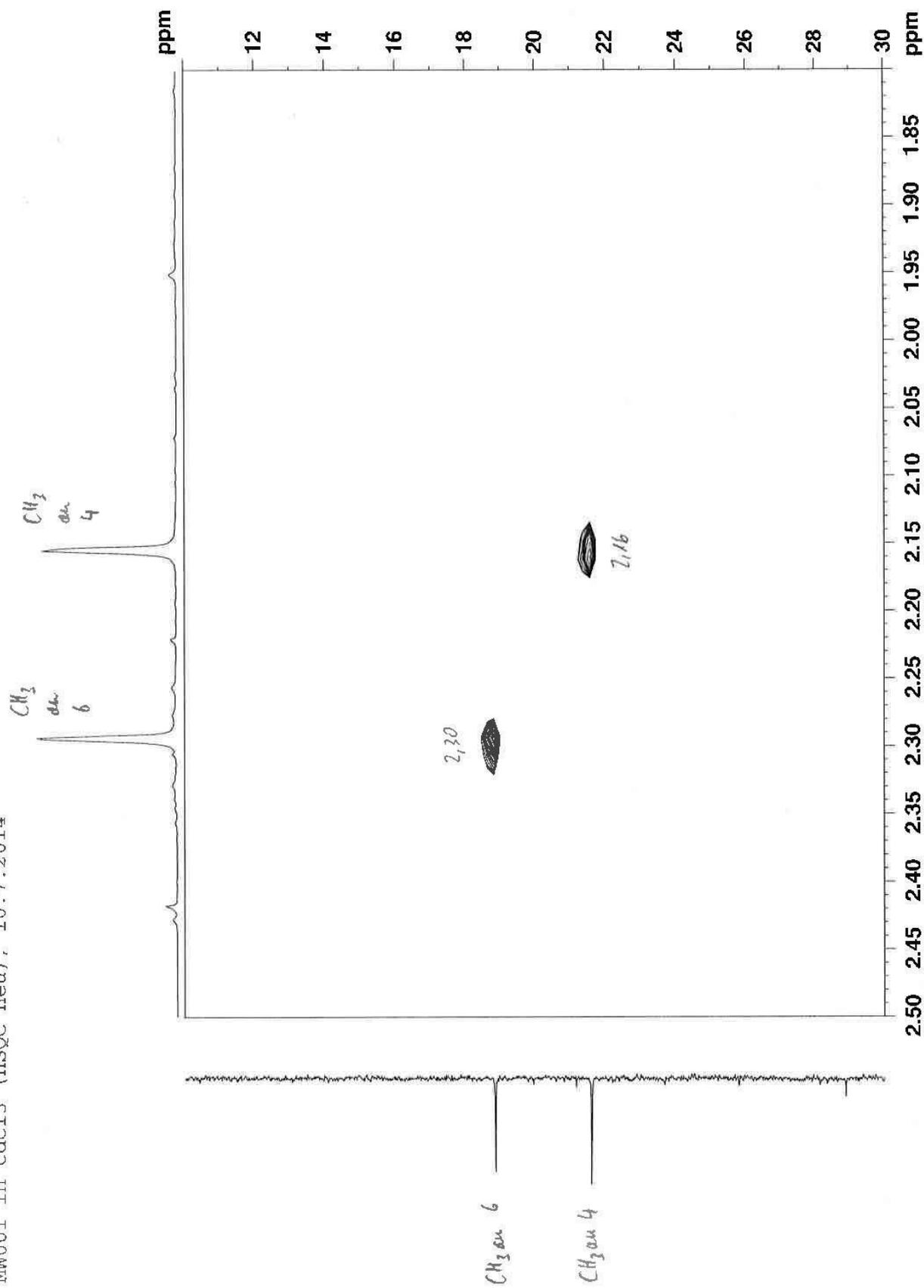
MW001 in cdcl3 (HSQC neu), 10.7.2014



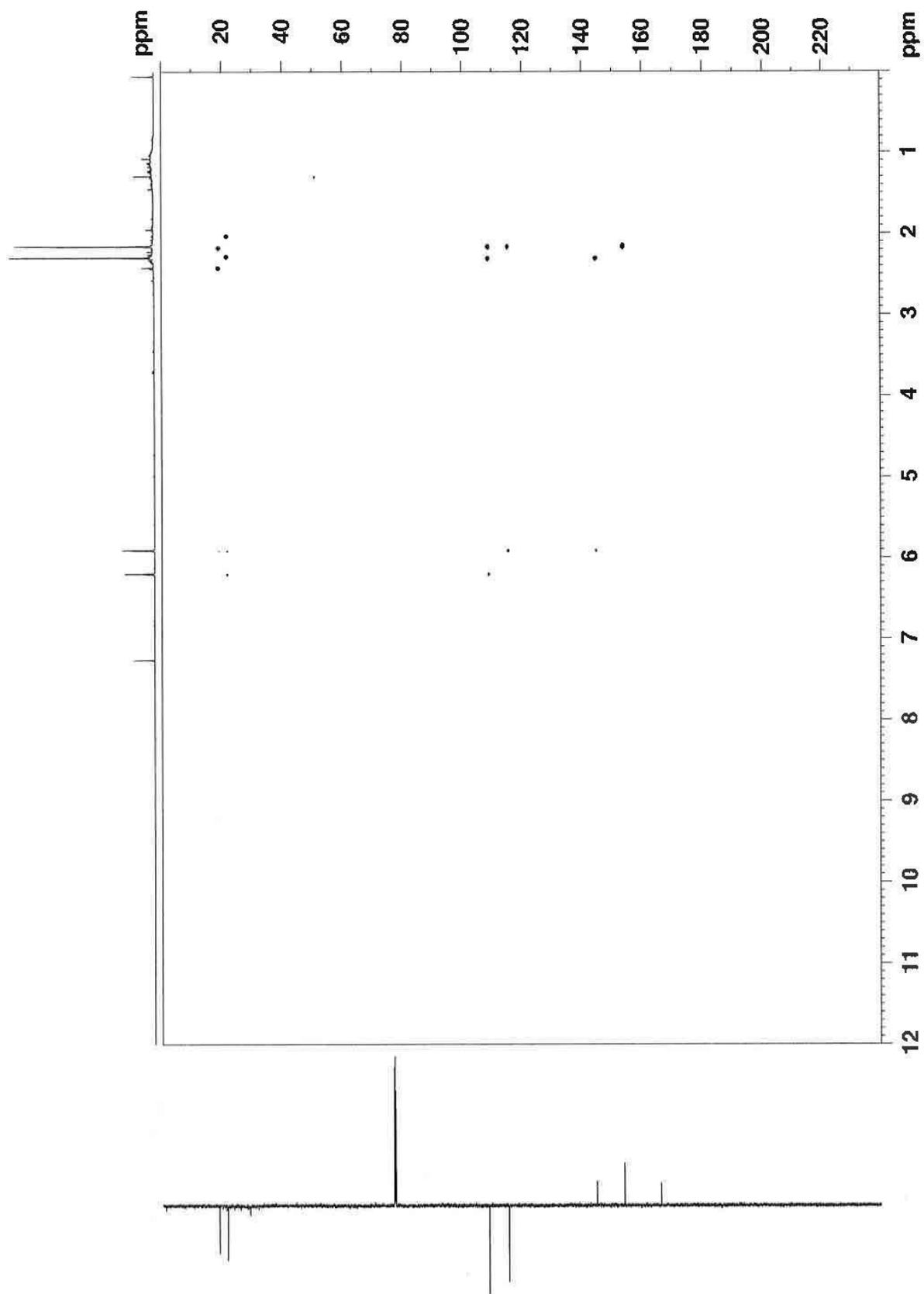
MW001 in cdcl3 (HSQC neu), 10.7.2014



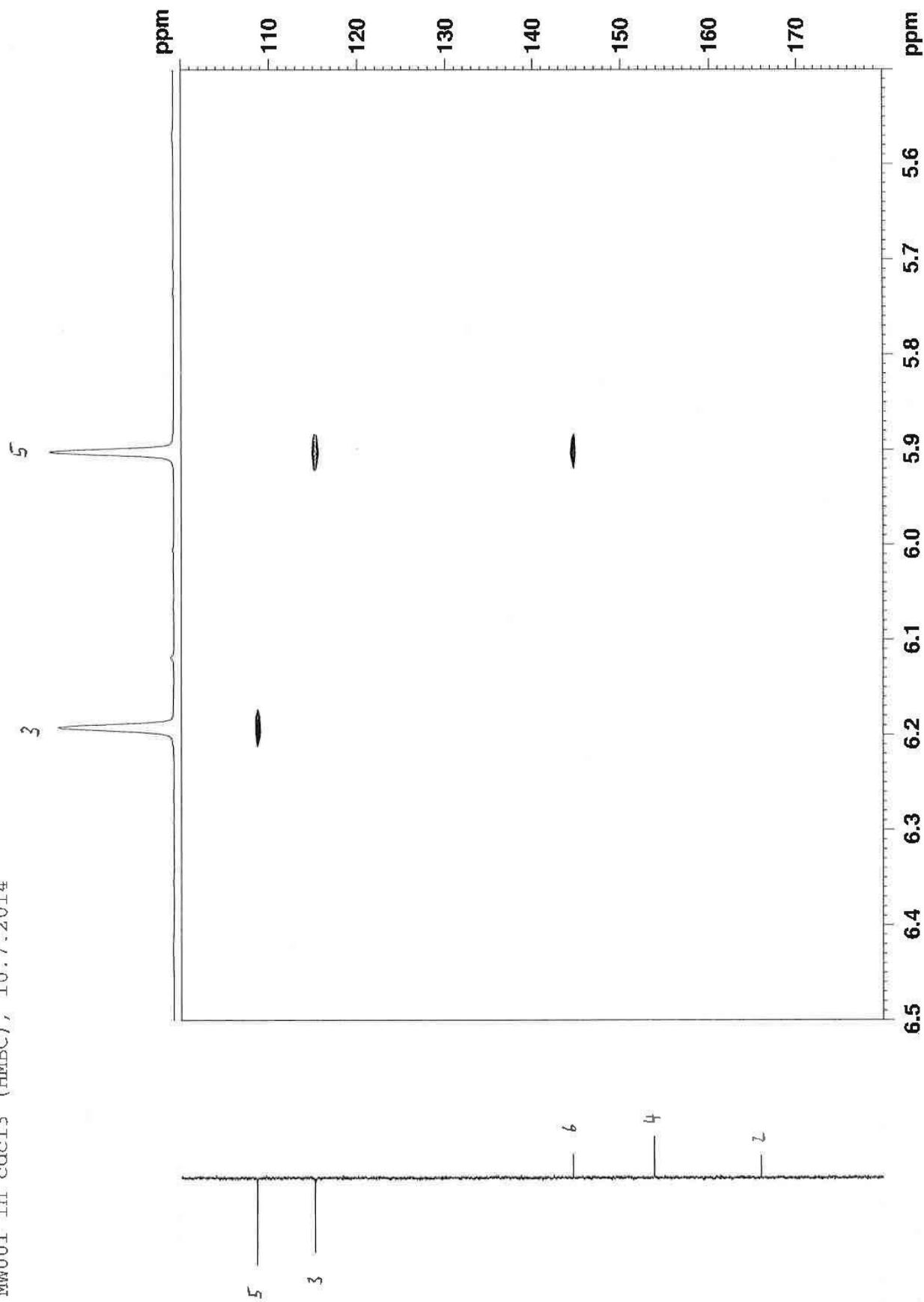
MW001 in cdcl3 (HSQC neu), 10.7.2014



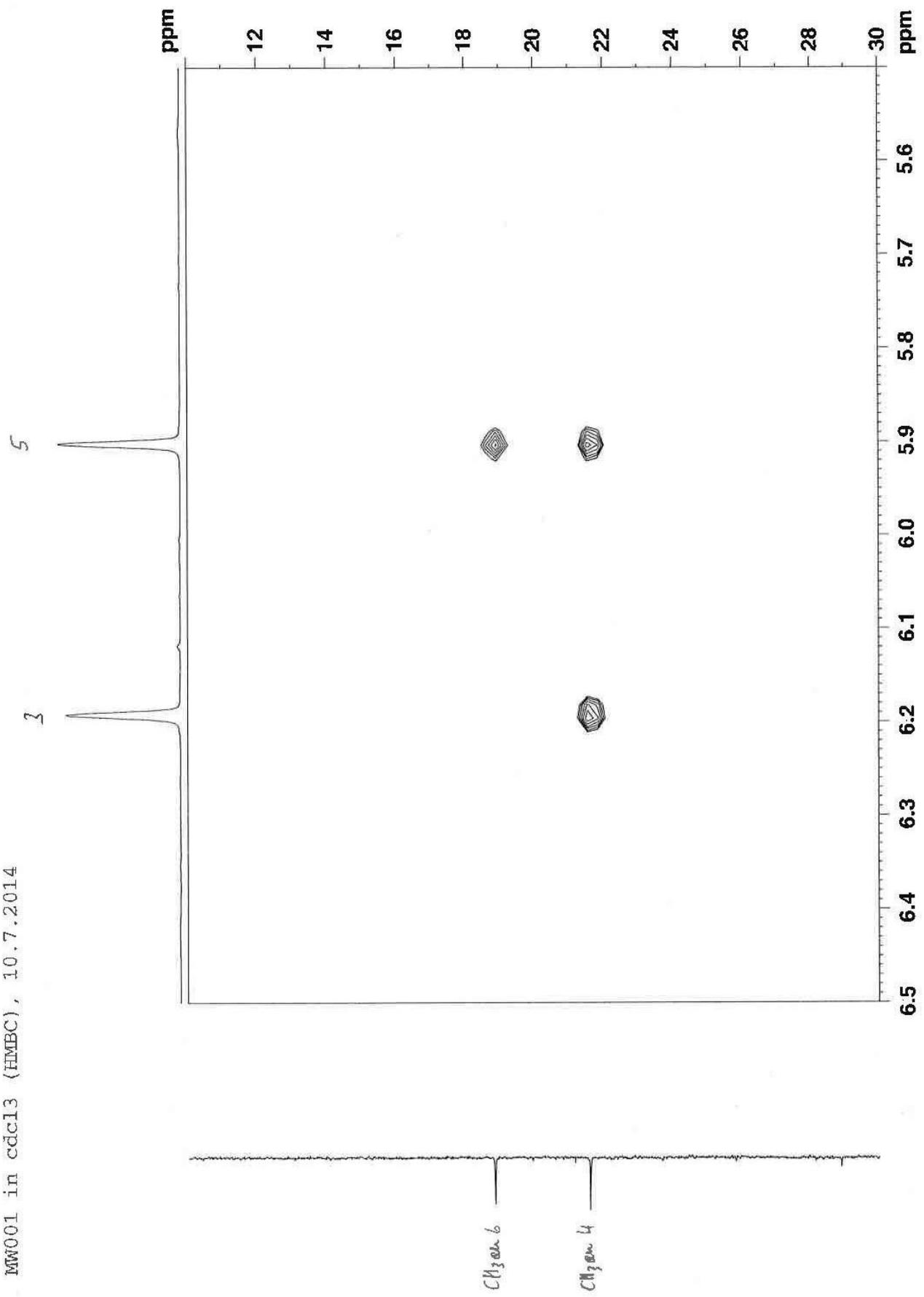
MM001 in cdcl3 (HMBC), 10.7.2014



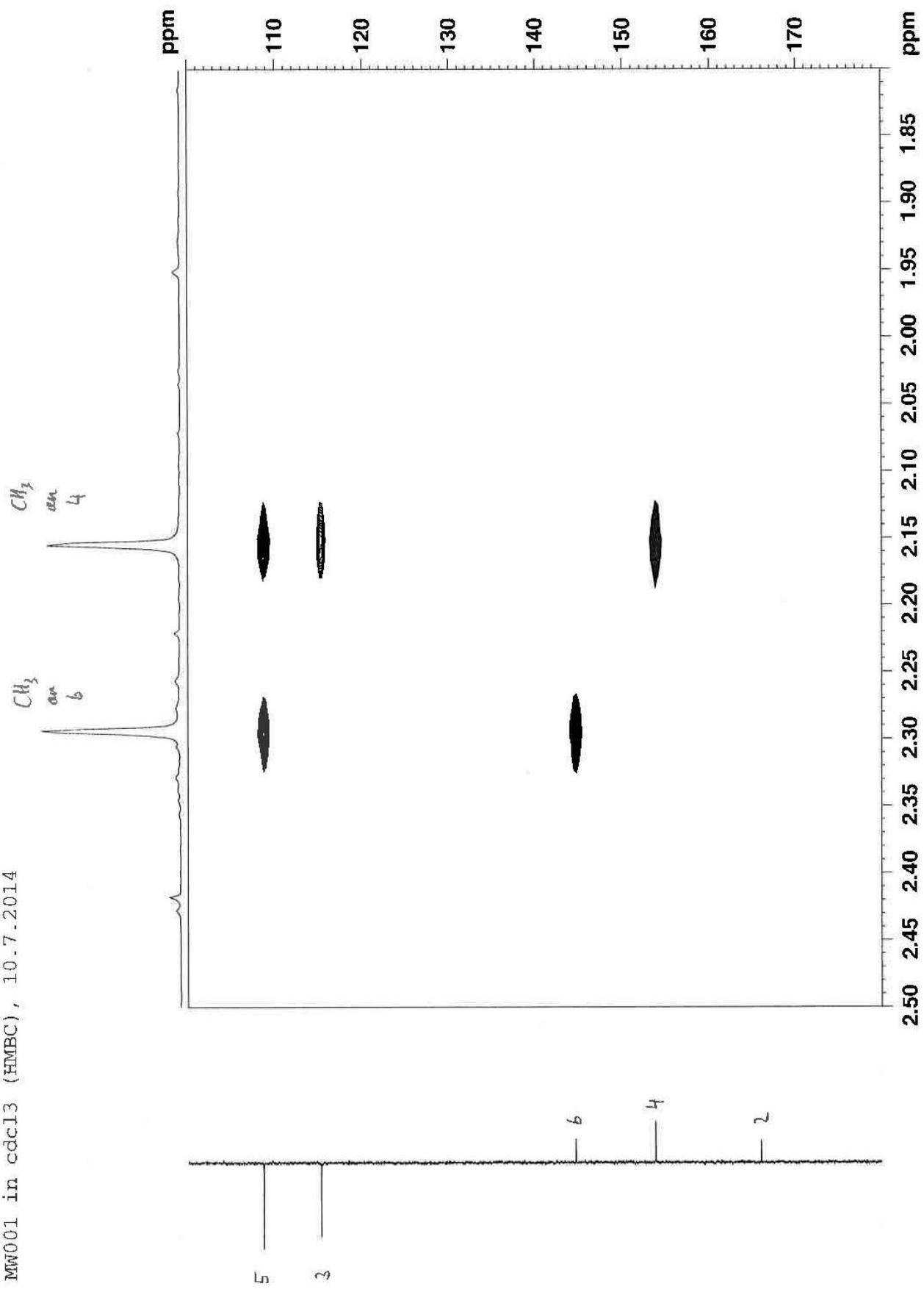
MW001 in cdcl3 (HMBC), 10.7.2014



MW001 in cdcl3 (HMBC), 10.7.2014



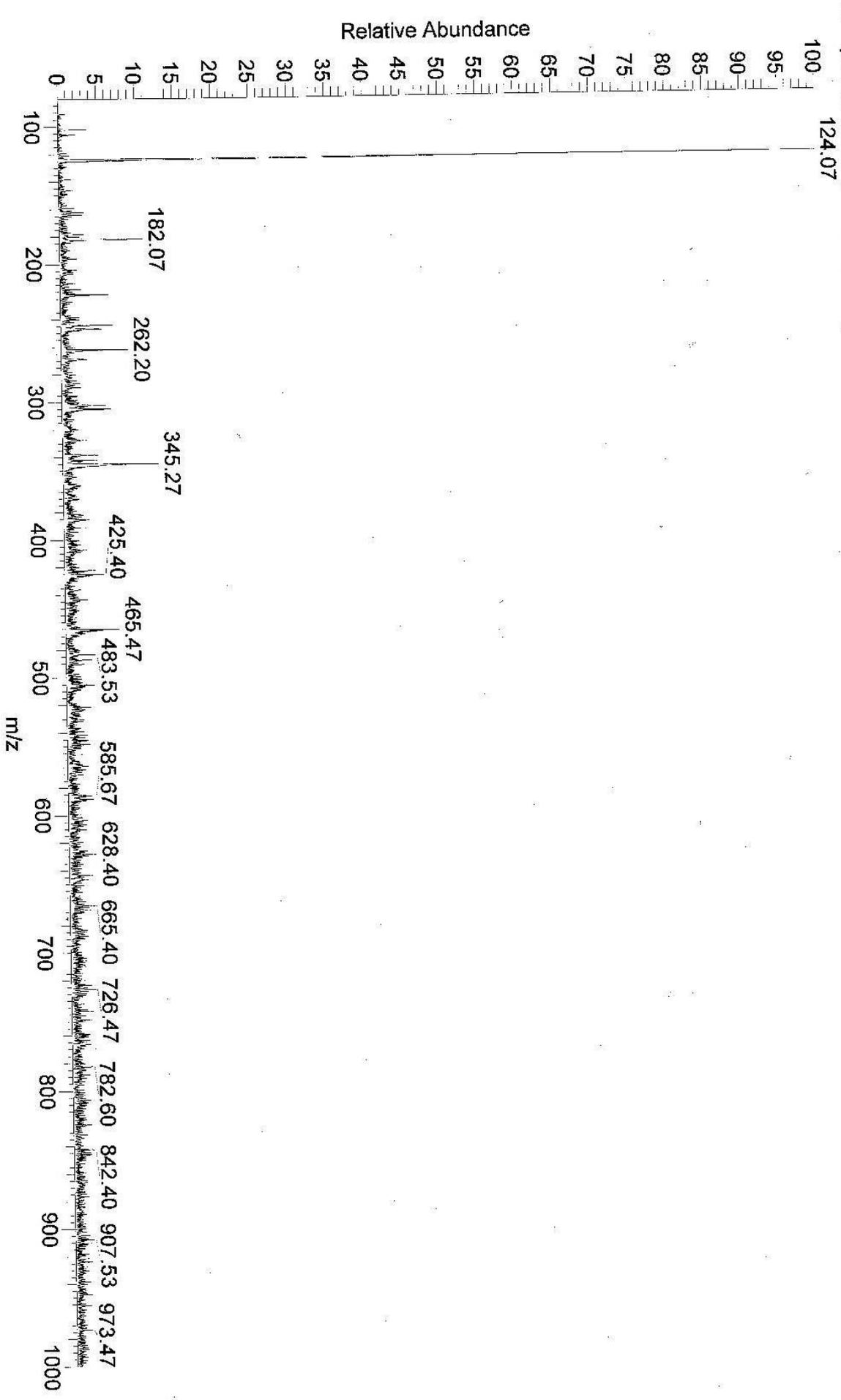
MW001 in cdcl3 (HMBC), 10.7.2014

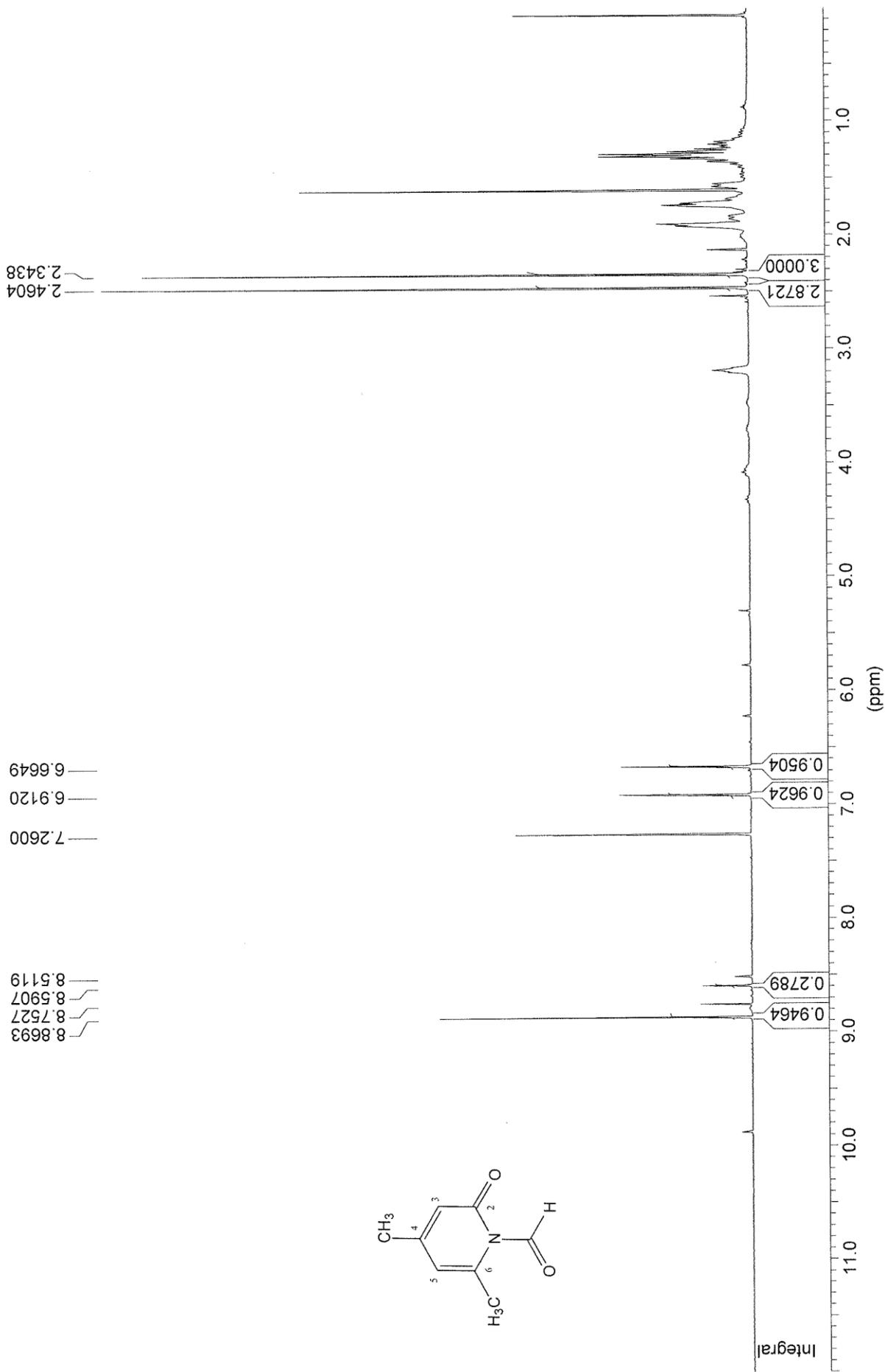


pos. Mode

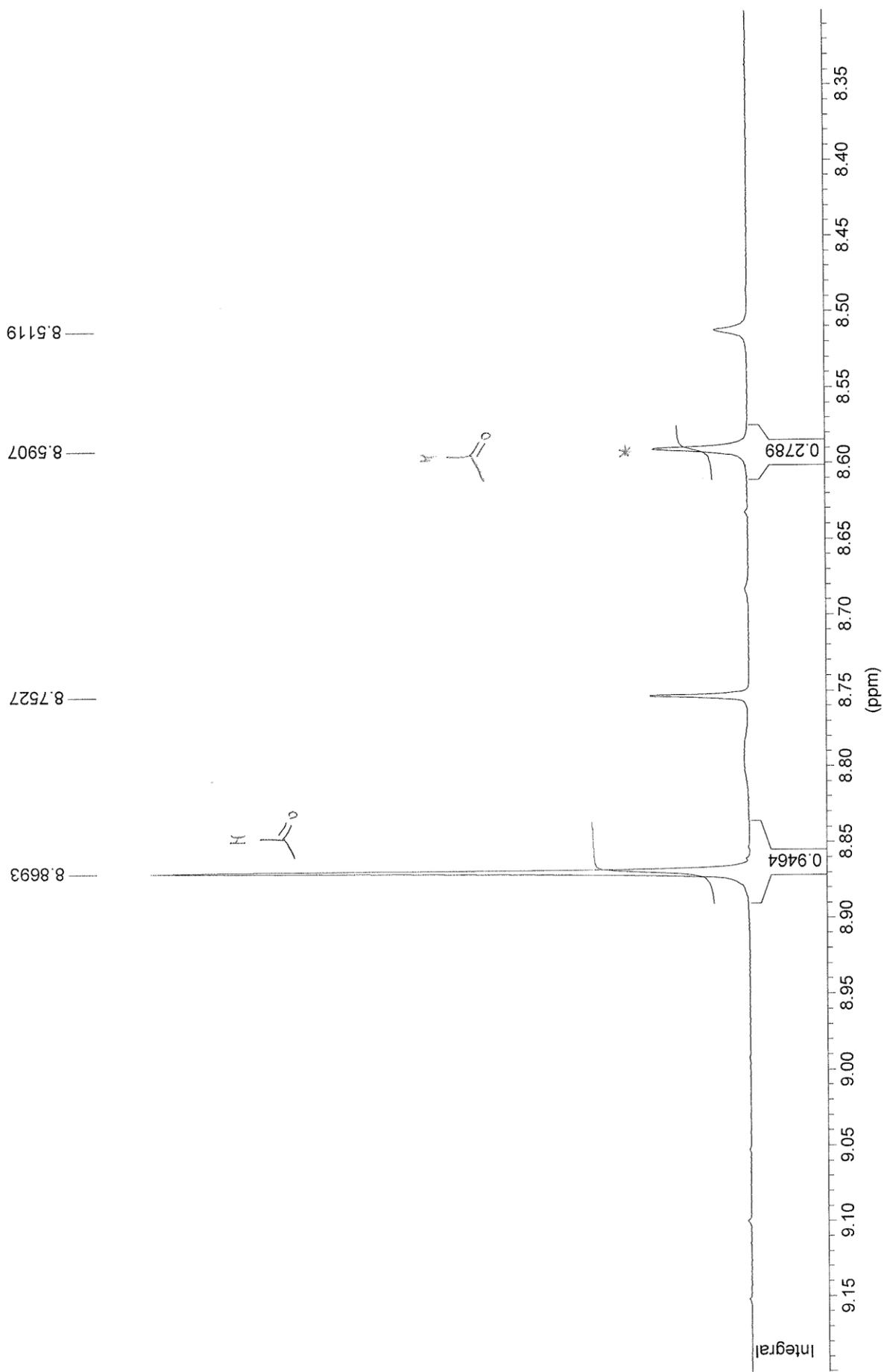
MW_001 #26.35 RT: 0.42-0.56 AV: 10 NL: 7.43E6

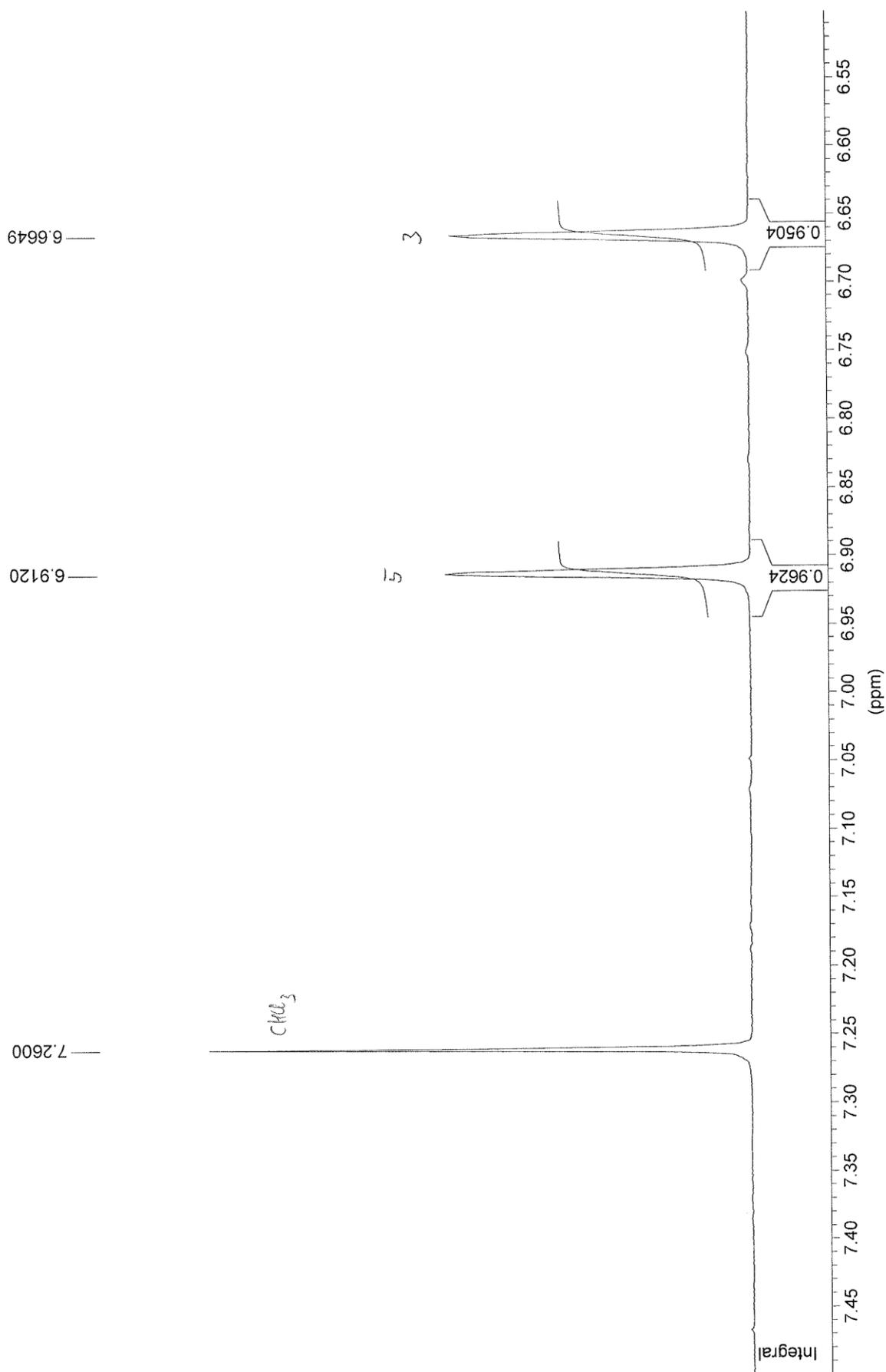
T: + p ESI Full ms [80.00-1000.00]



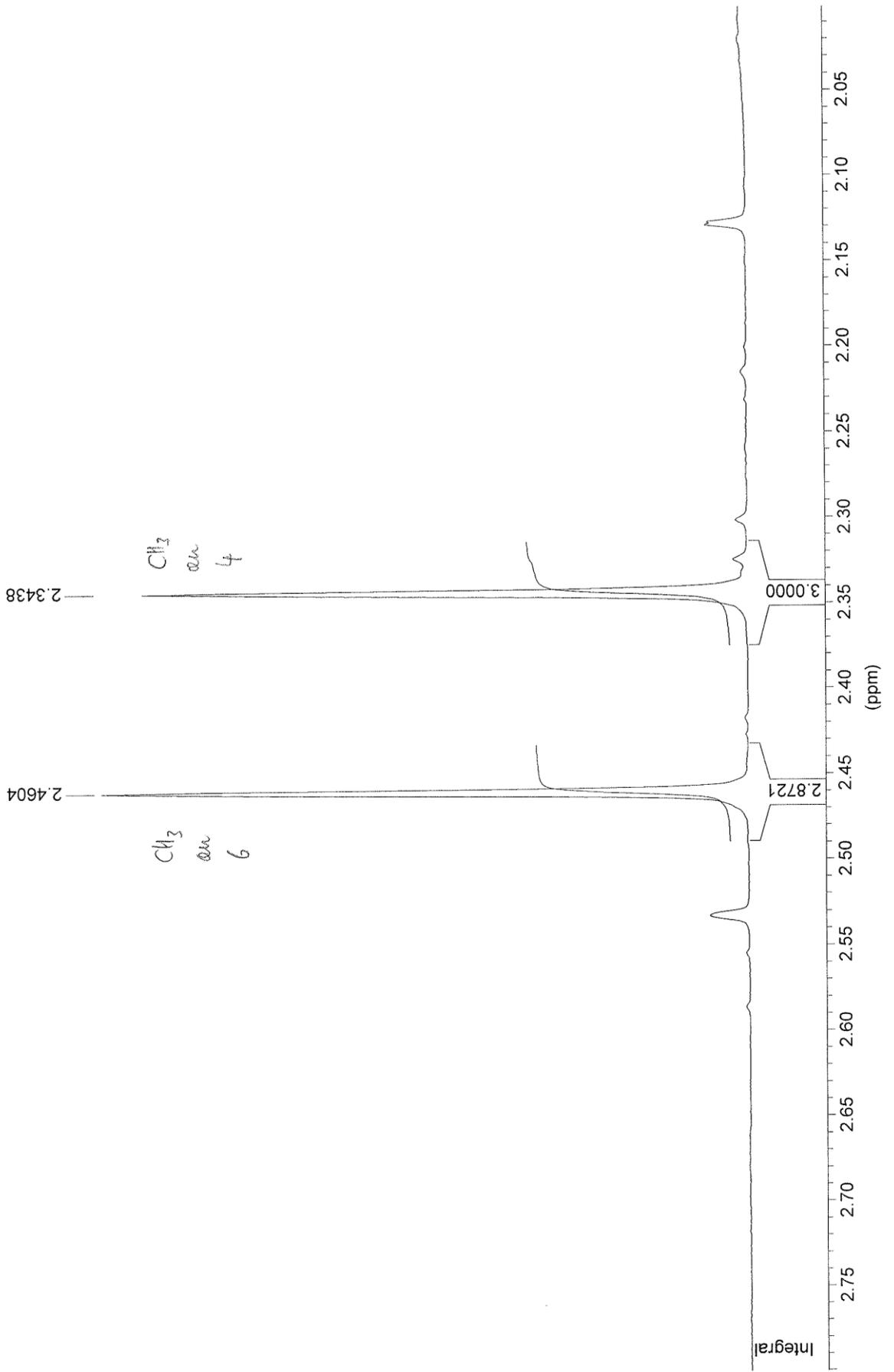


MW009 in cdcl3 (Proton), 17.6.2014

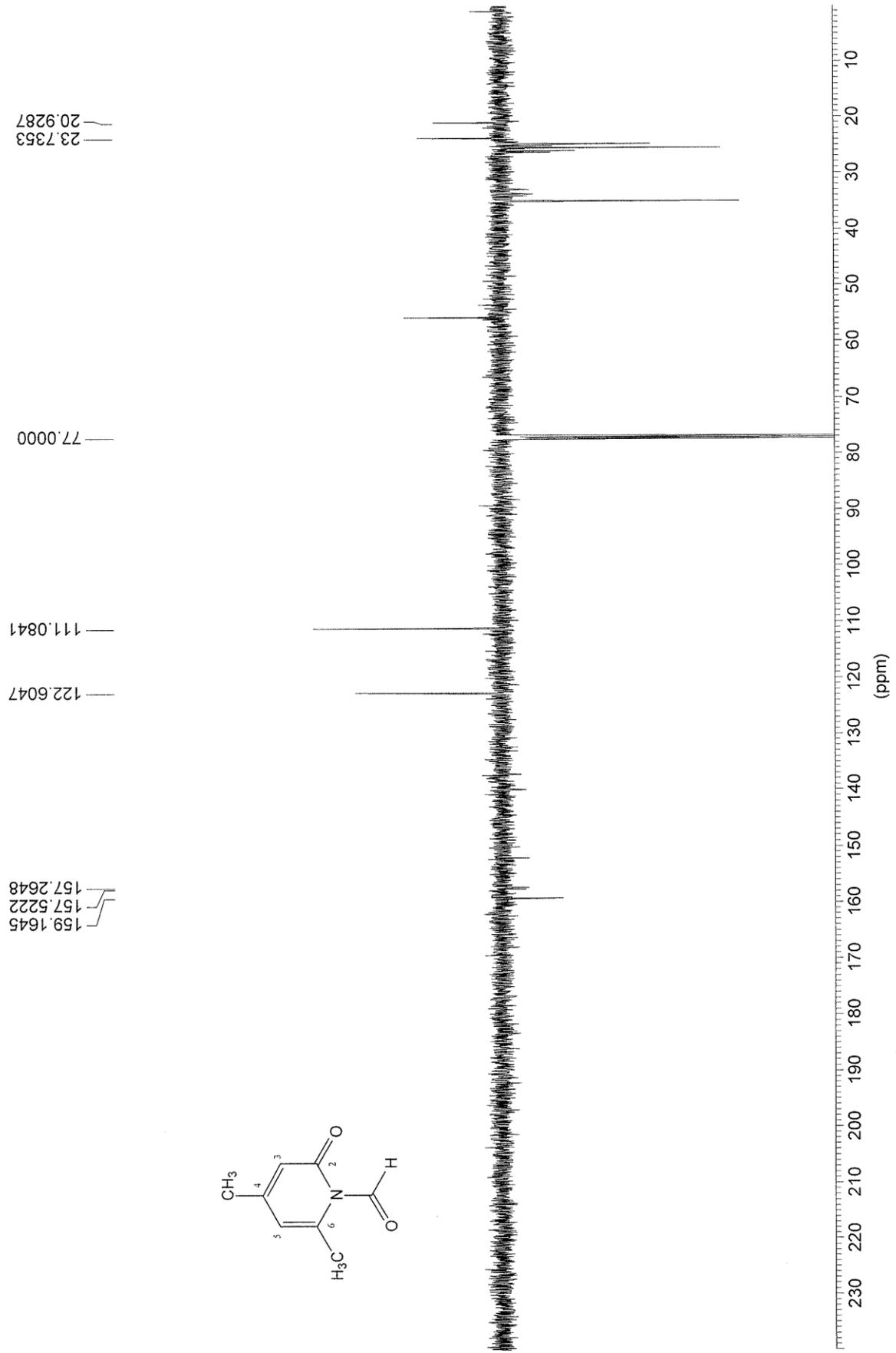
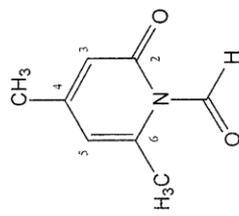




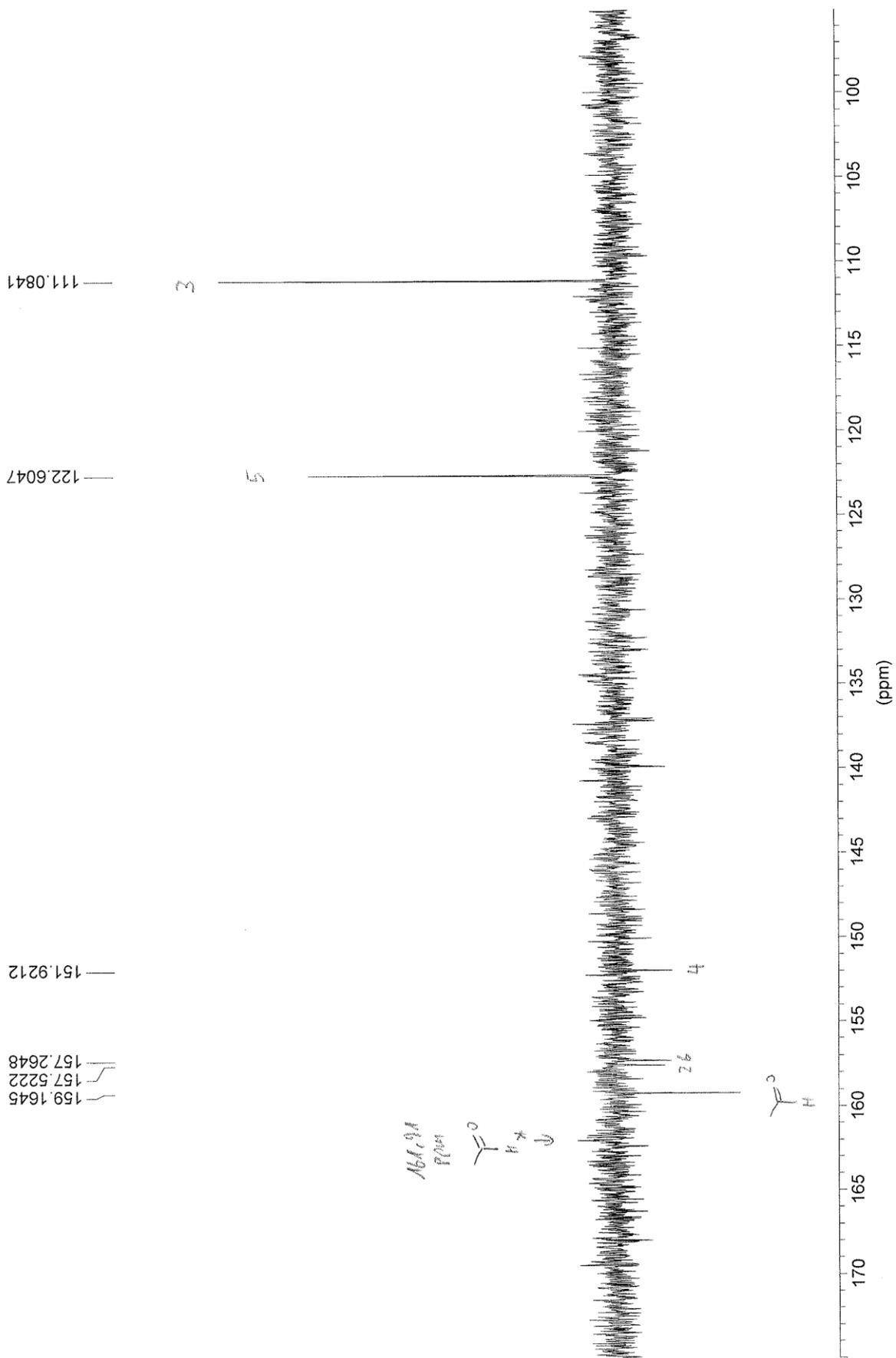
MW009 in cdcl3 (Proton), 17.6.2014

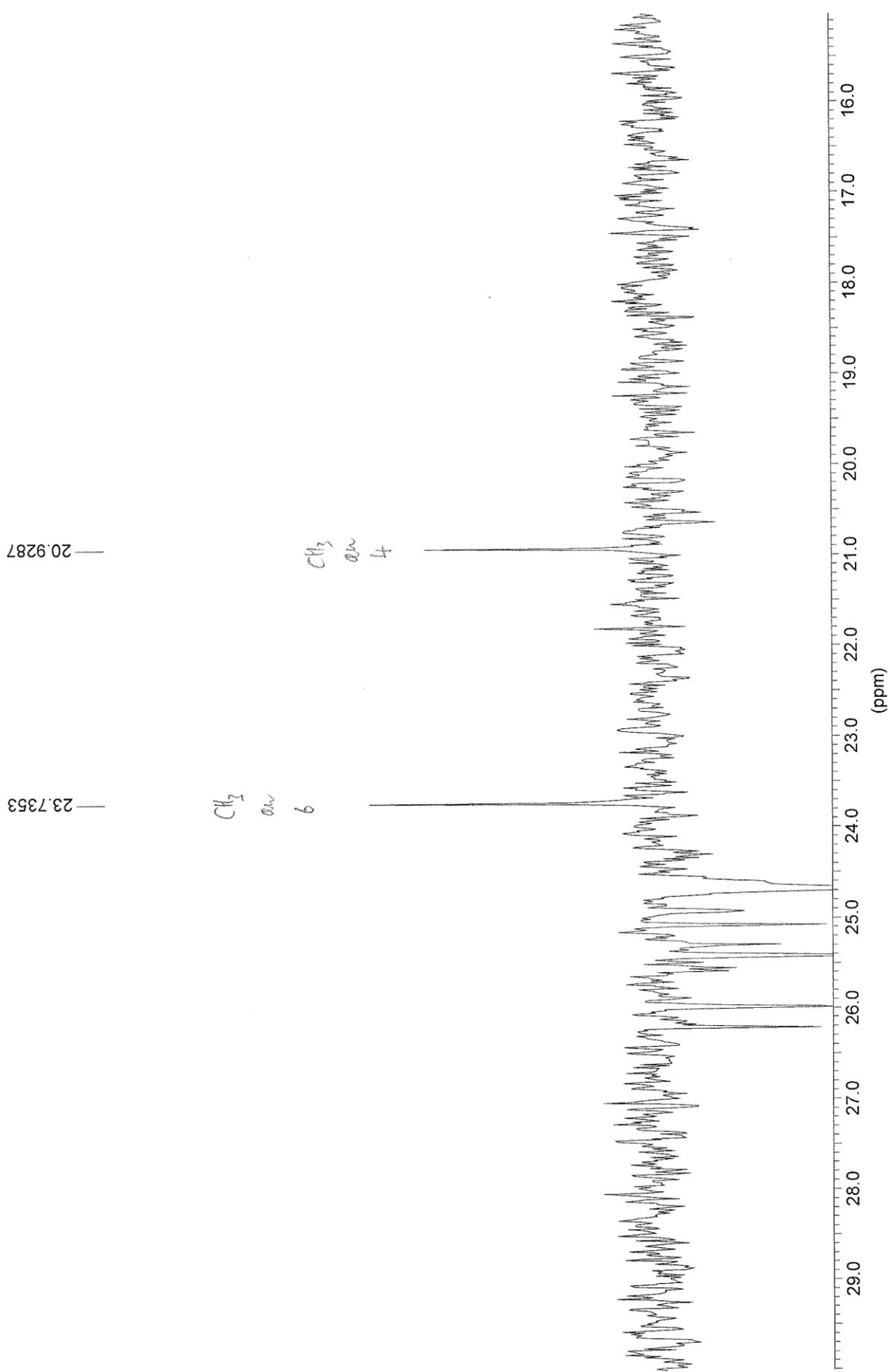


MMW009 in ccd3 (APT), 17.6.2014

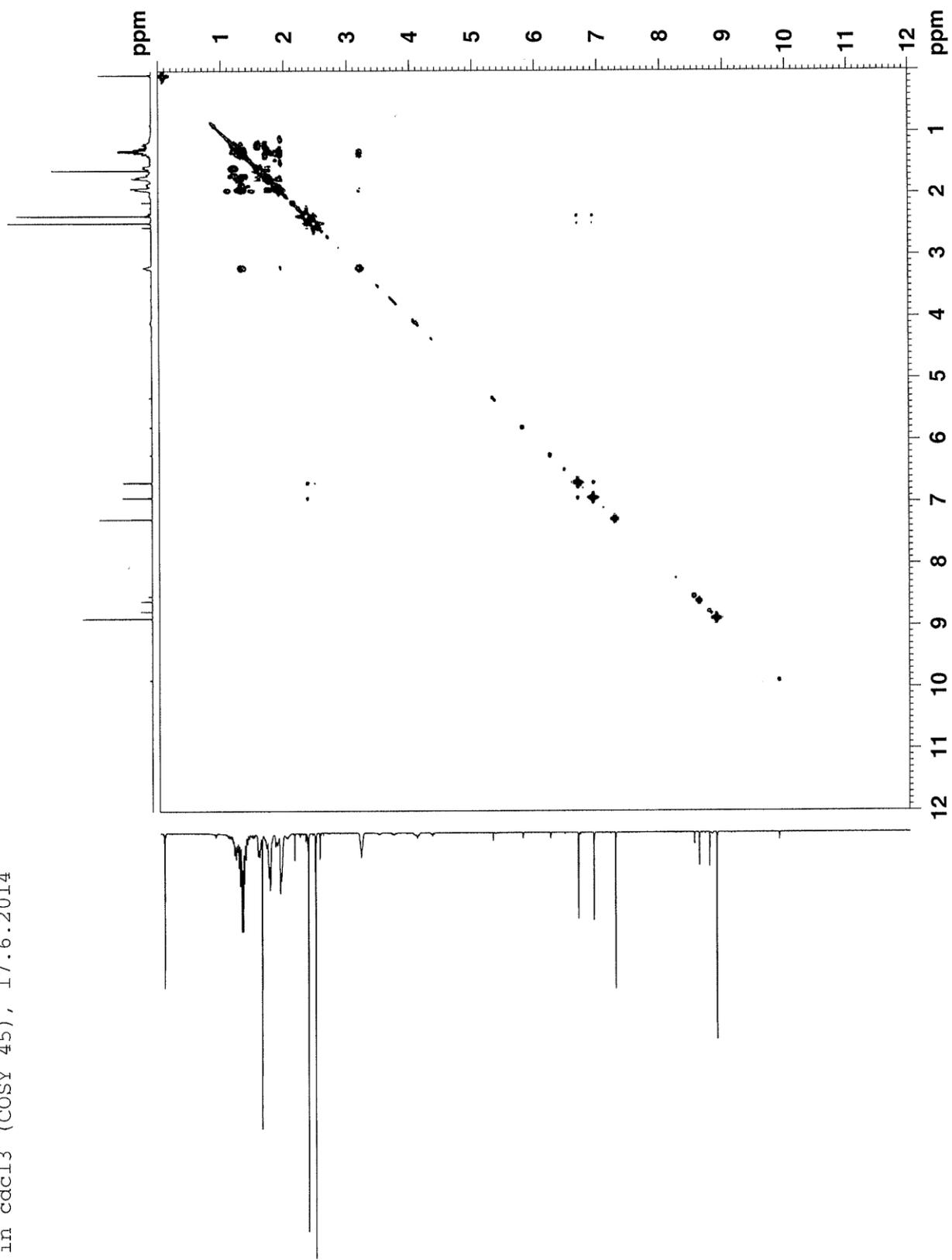


MW009 in cdcl3 (APT), 17.6.2014

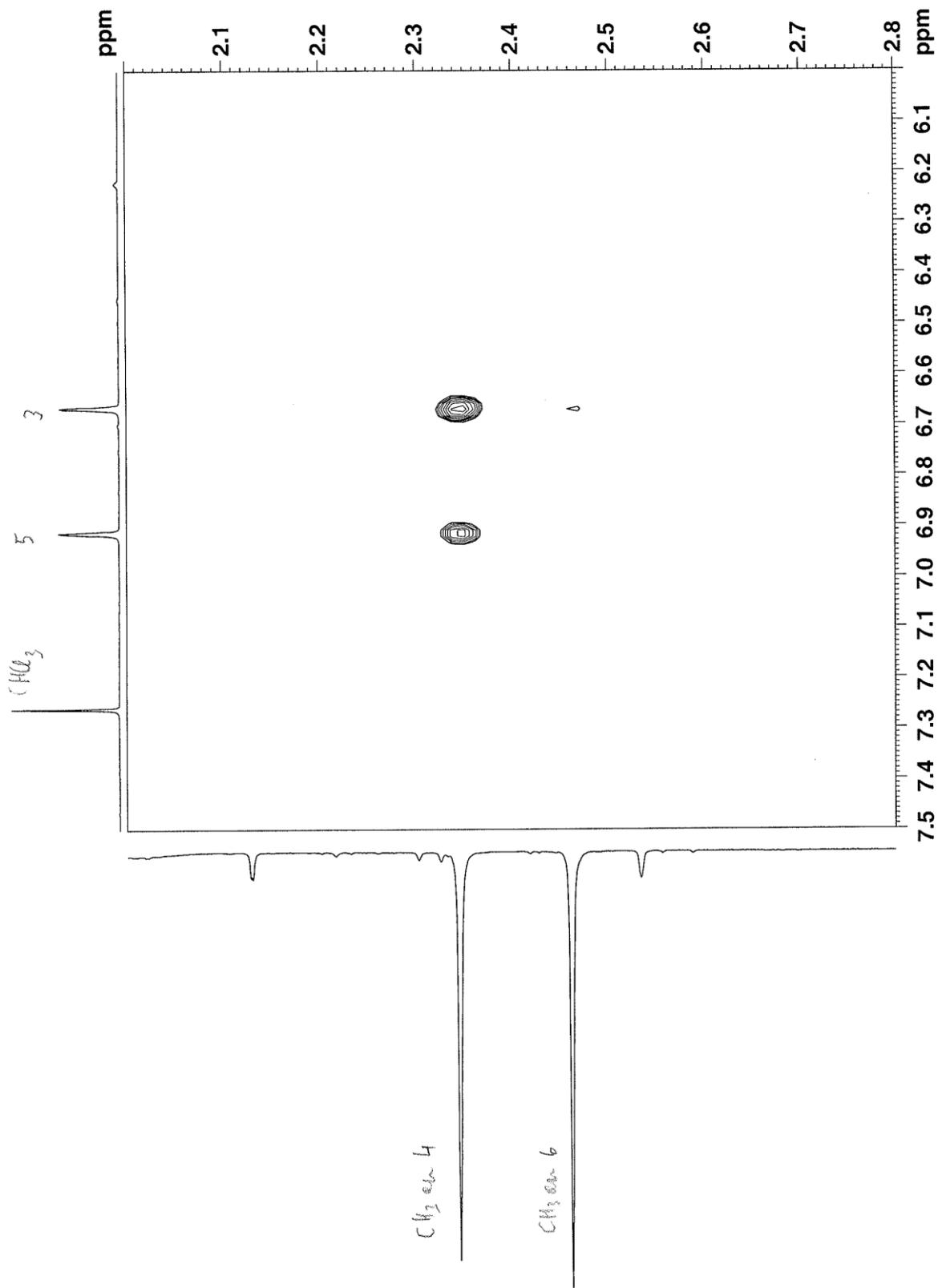




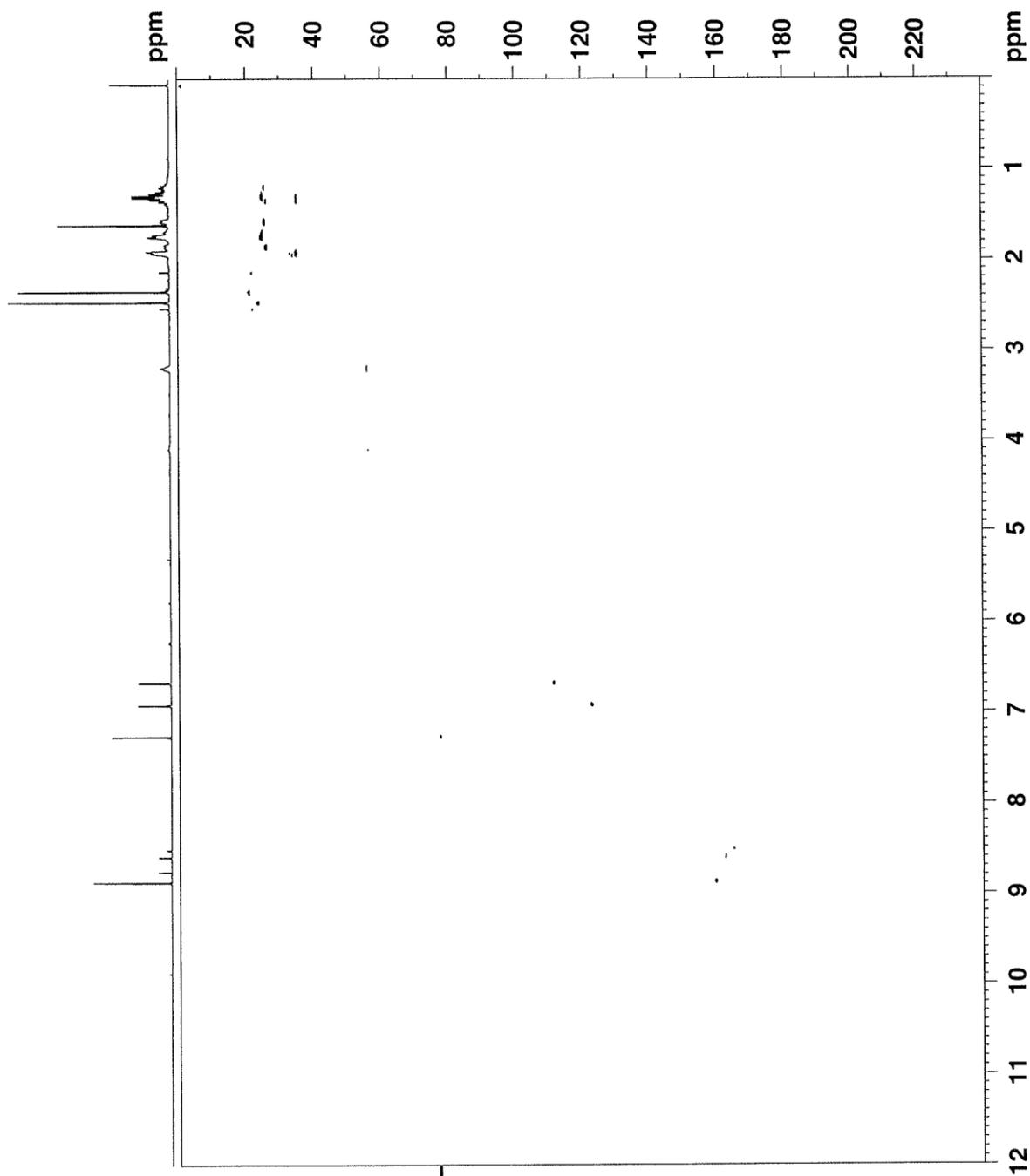
MW009 in cdcl3 (COSY 45), 17.6.2014



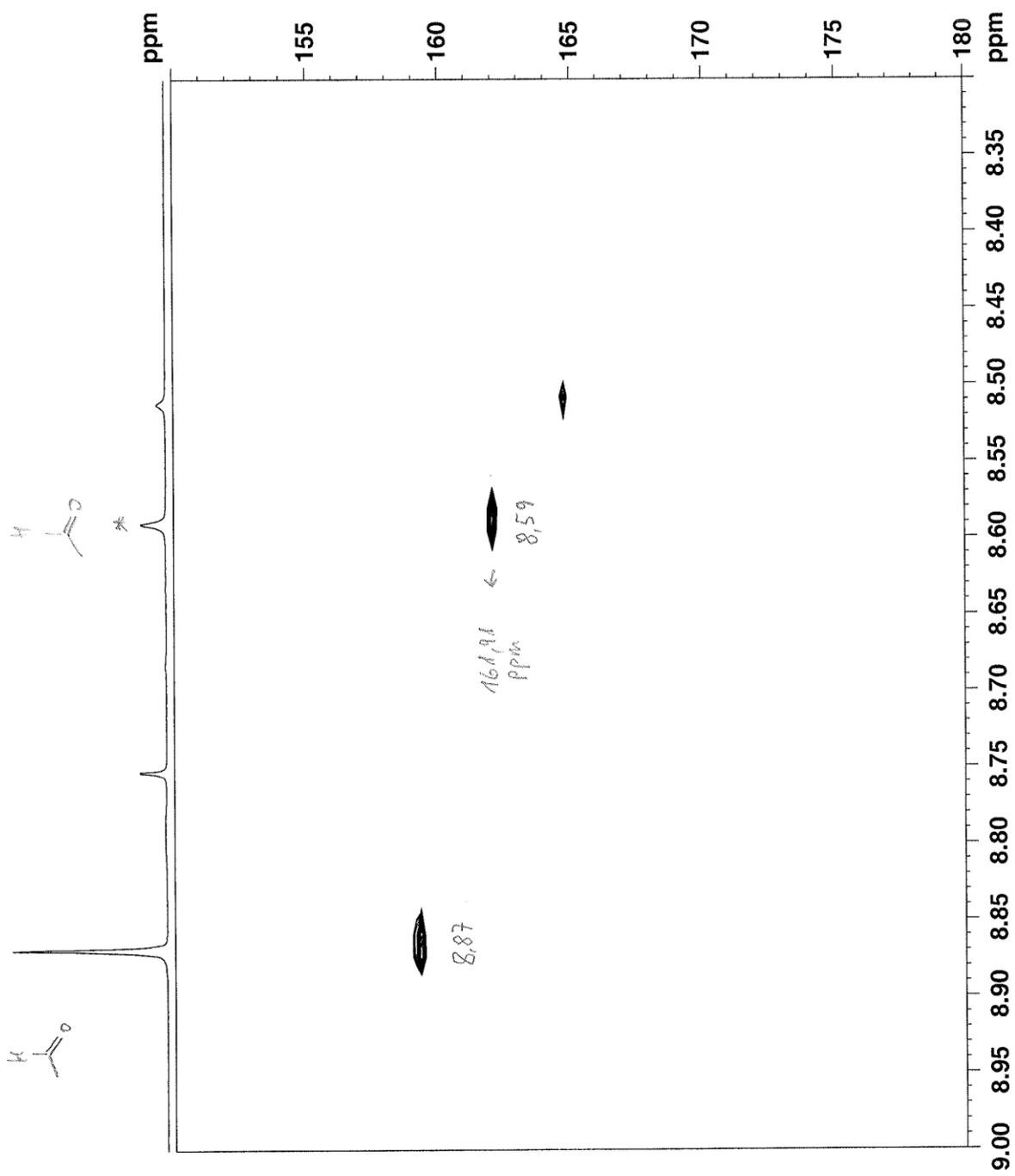
MW009 in cdcl3 (COSY 45), 17.6.2014



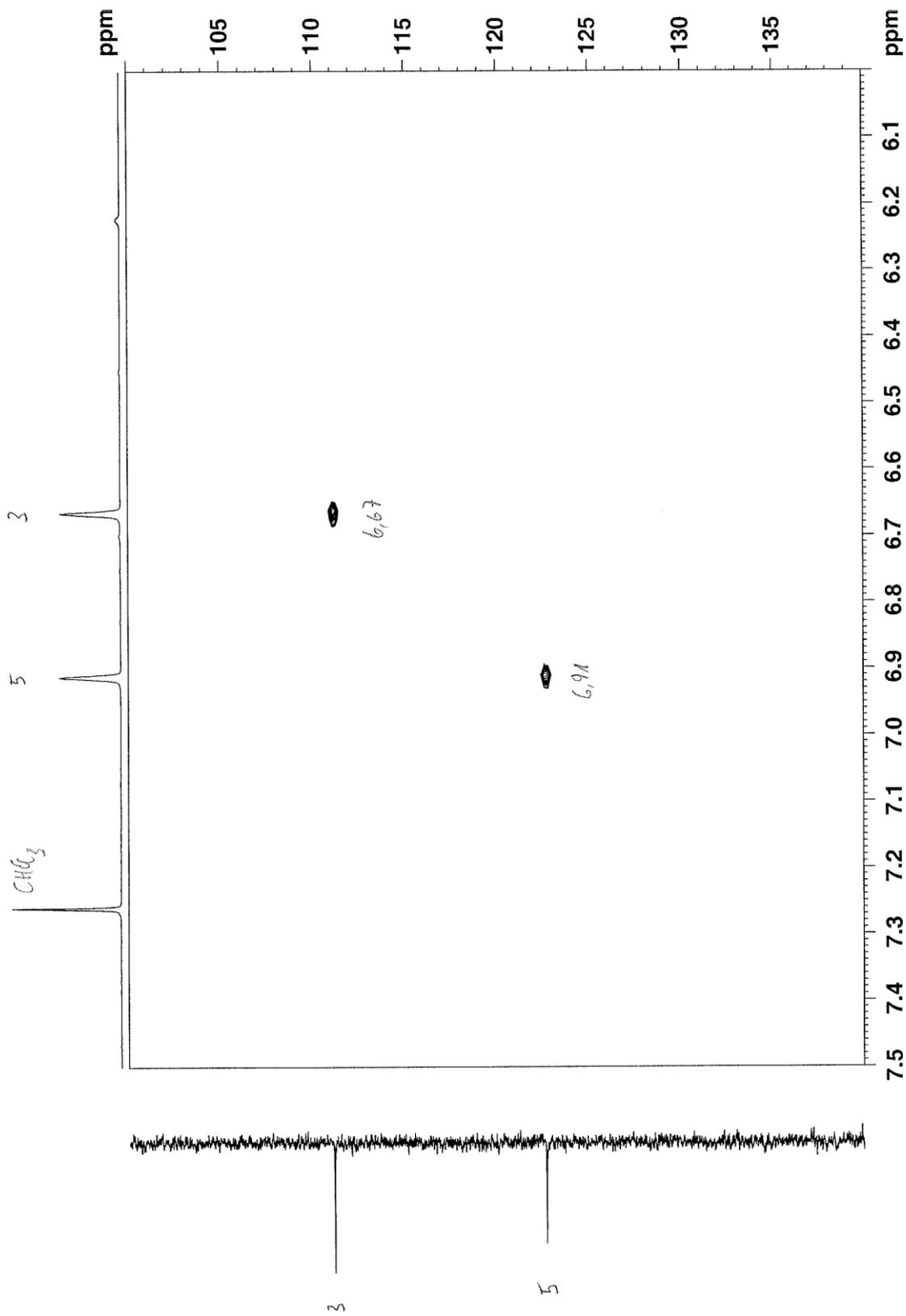
MW009 in cdcl3 (HSQC neu), 17.6.2014



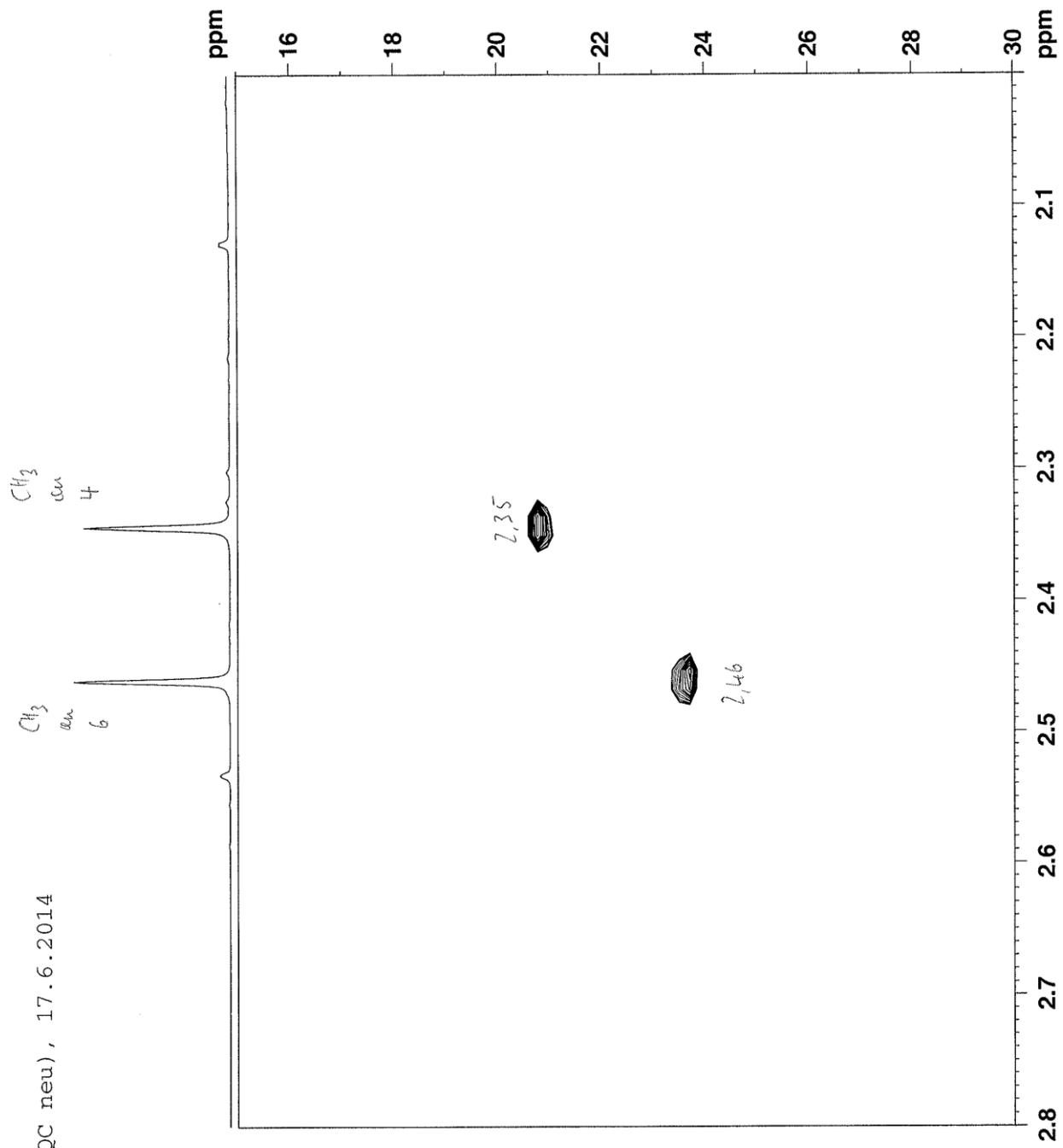
MW009 in cdcl3 (HSQC neu), 17.6.2014



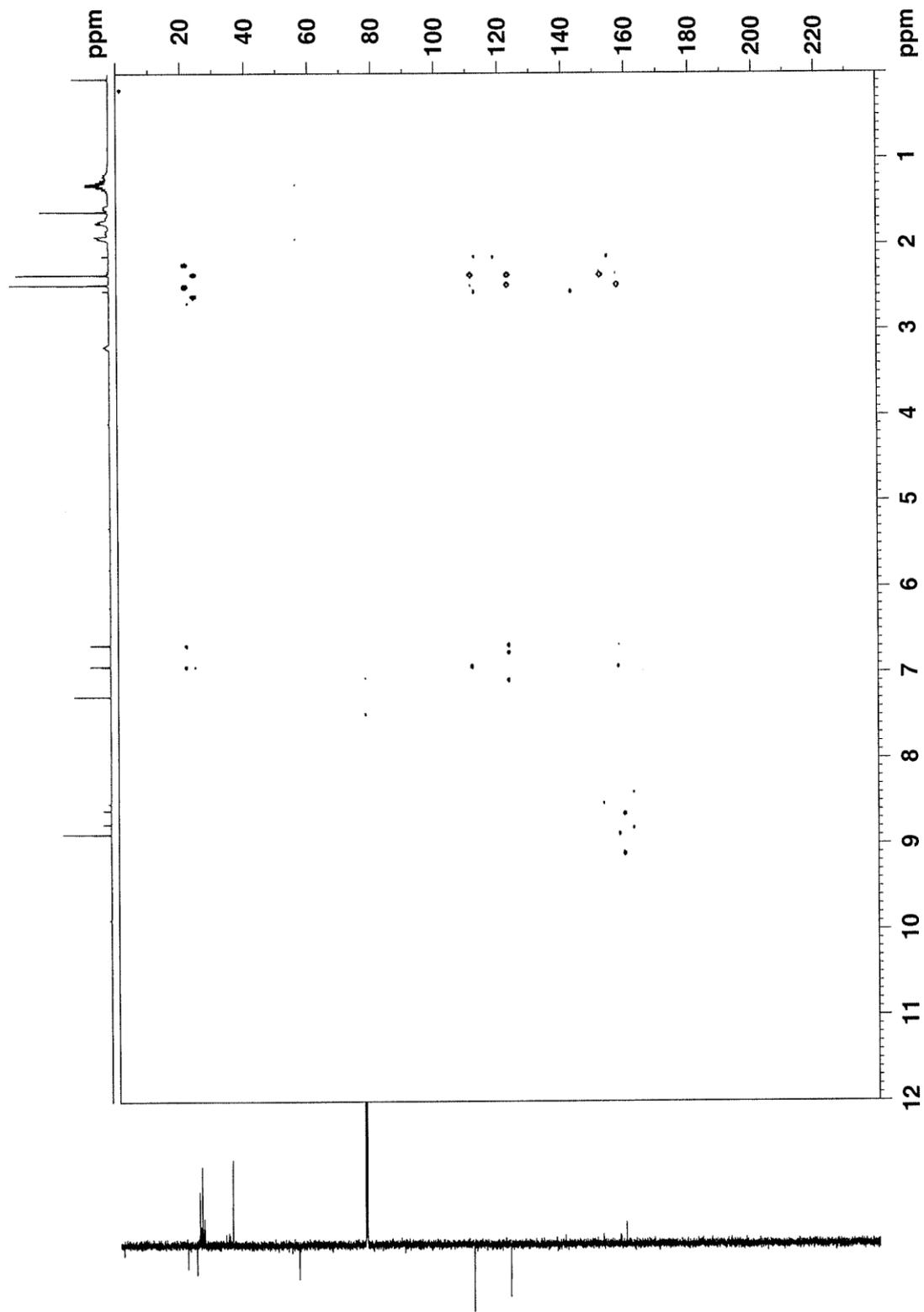
MW009 in cdcl3 (HSQC neu), 17.6.2014



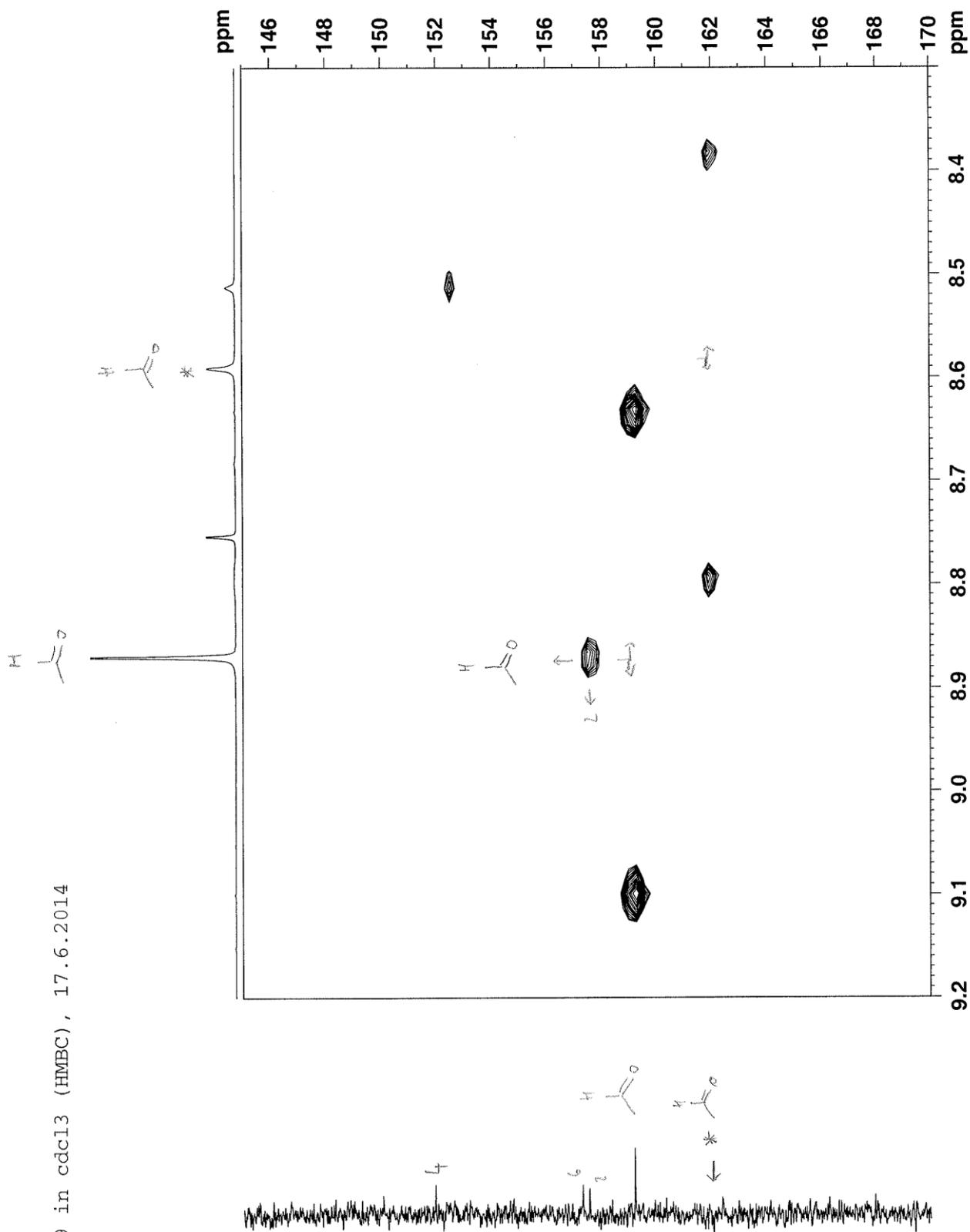
MW009 in cdcl3 (HSQC neu), 17.6.2014



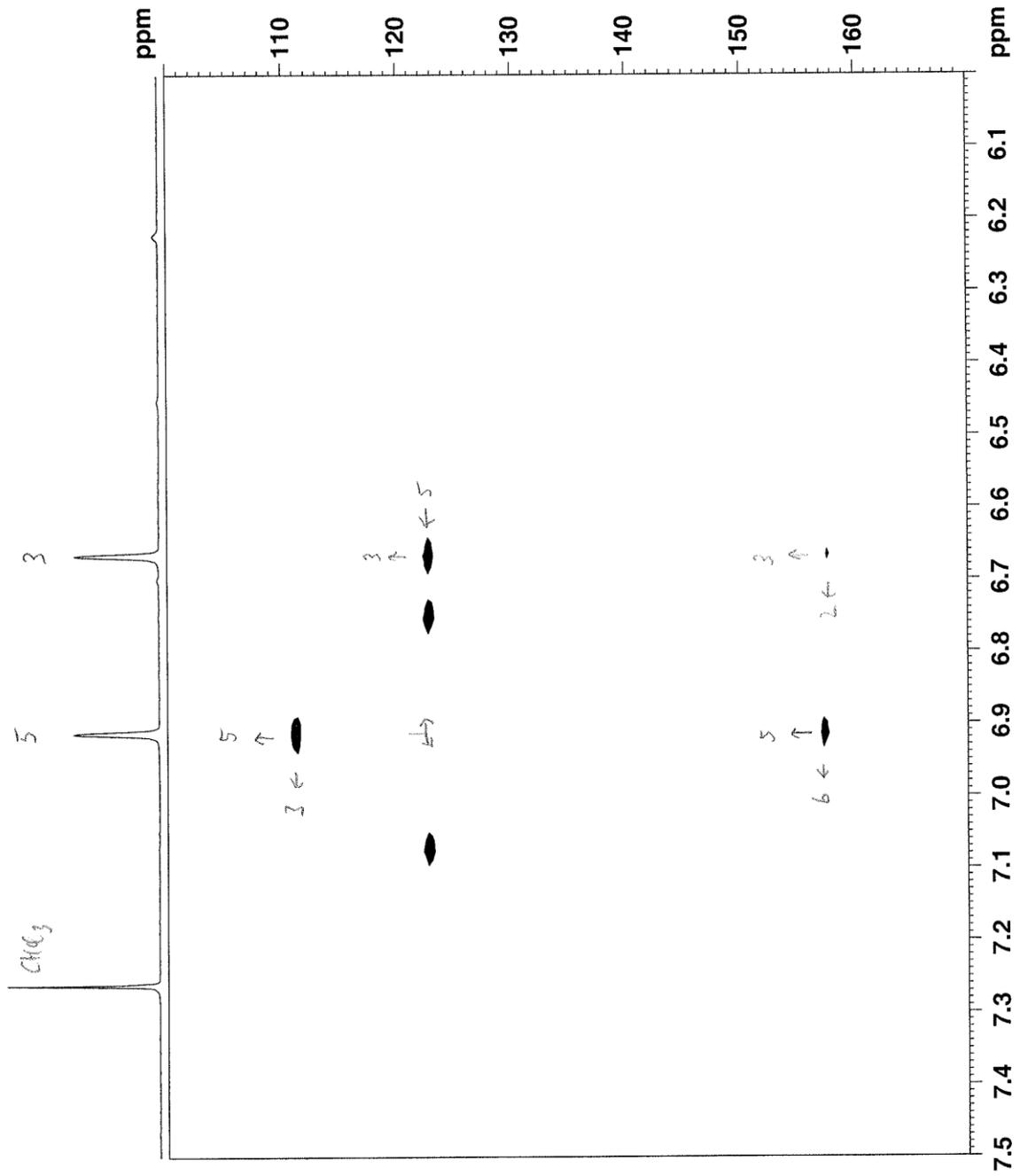
MW009 in cdcl3 (HMBC), 17.6.2014



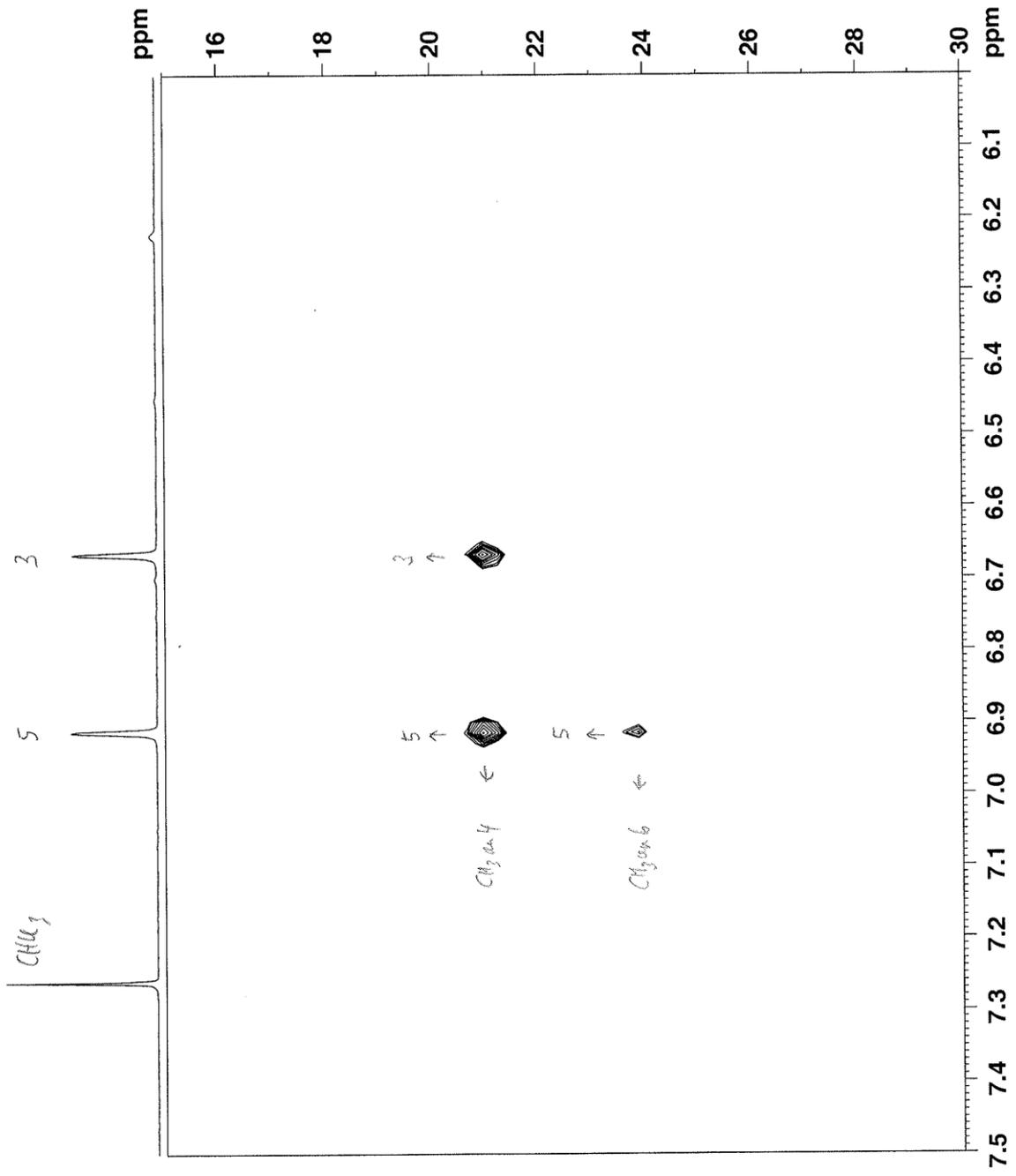
MW009 in cdcl3 (HMBC), 17.6.2014



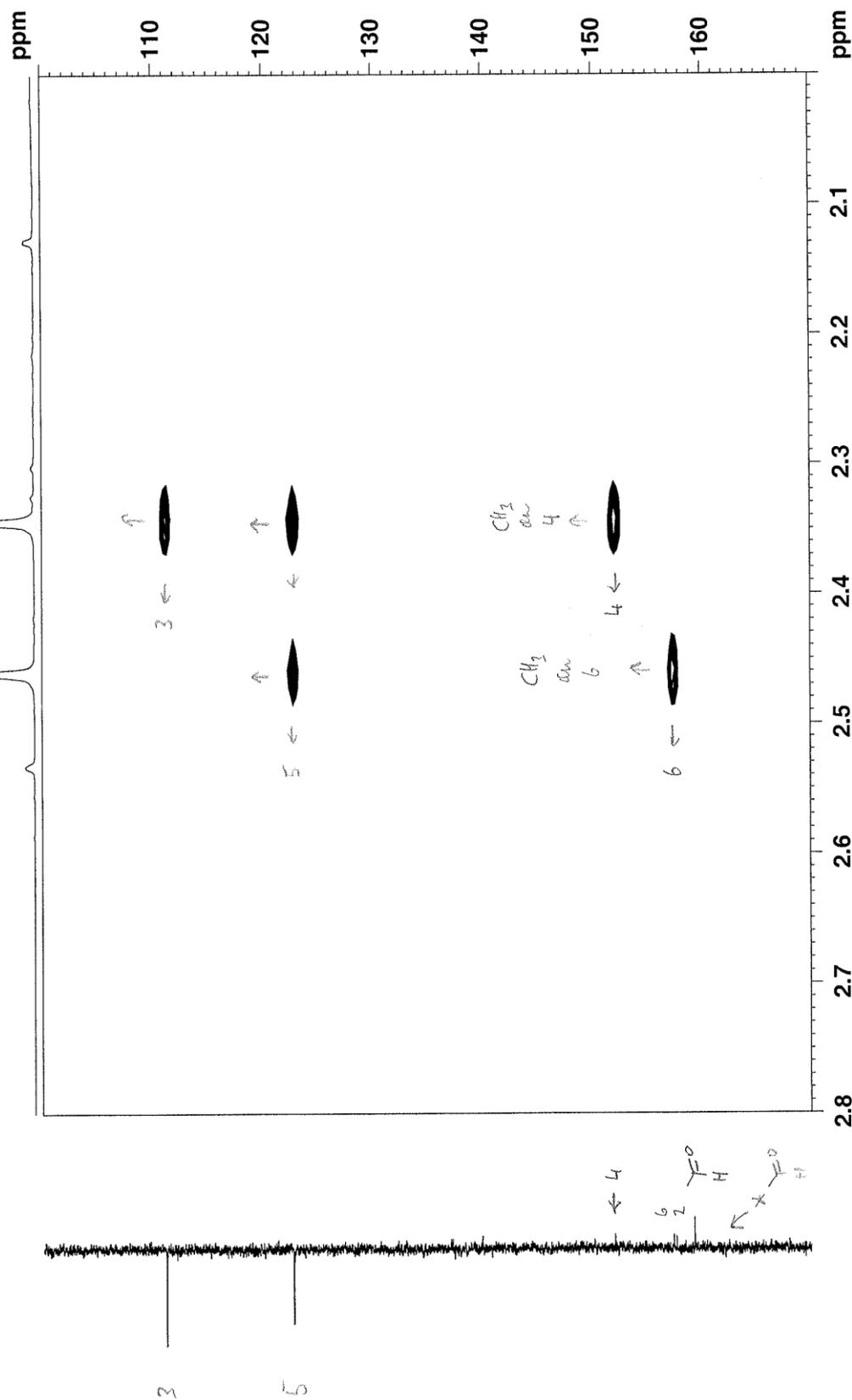
MW009 in cdcl3 (HMBC), 17.6.2014



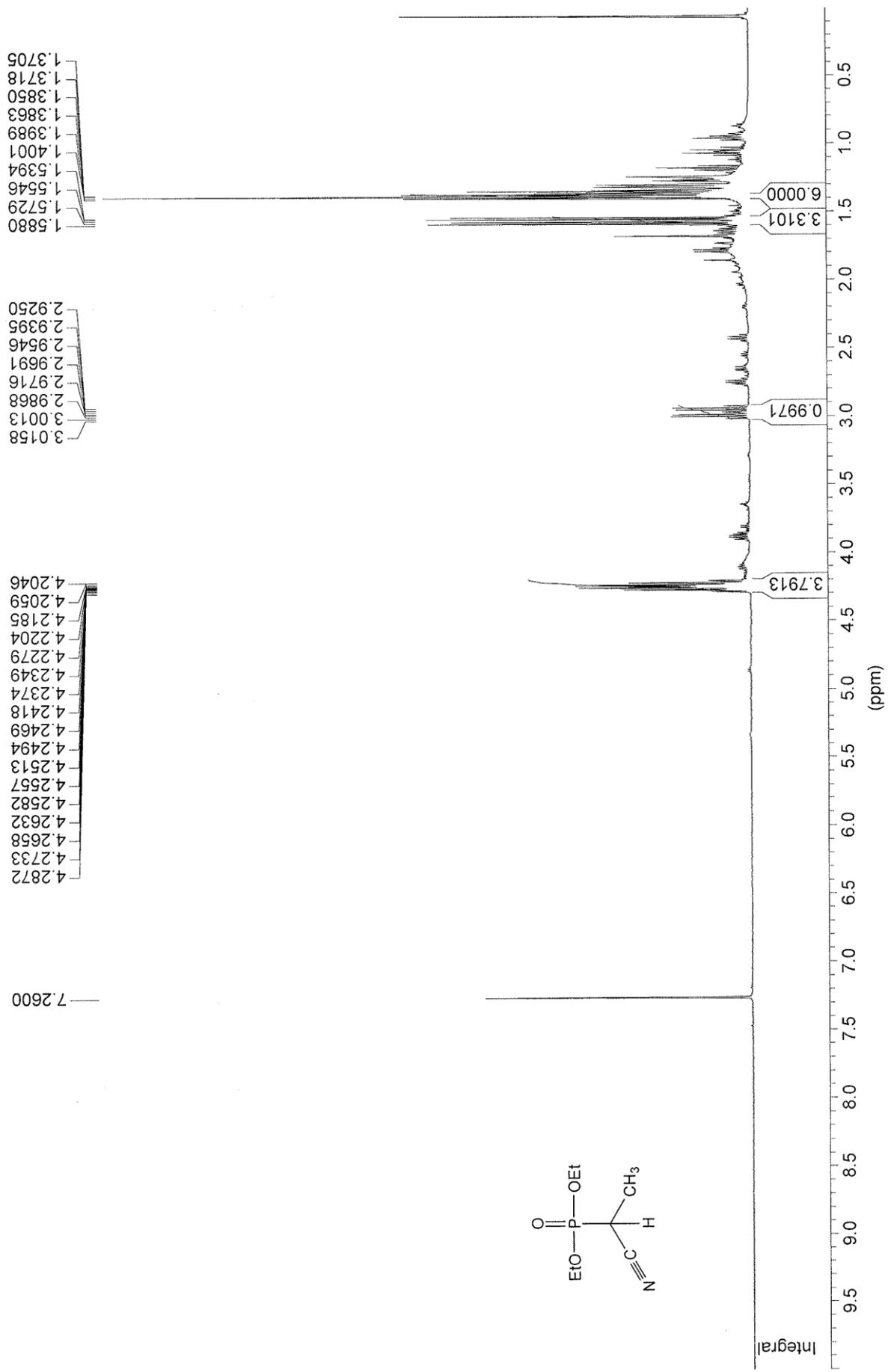
MW009 in cdcl3 (HMBC), 17.6.2014



MW009 in cdcl3 (HMBC), 17.6.2014

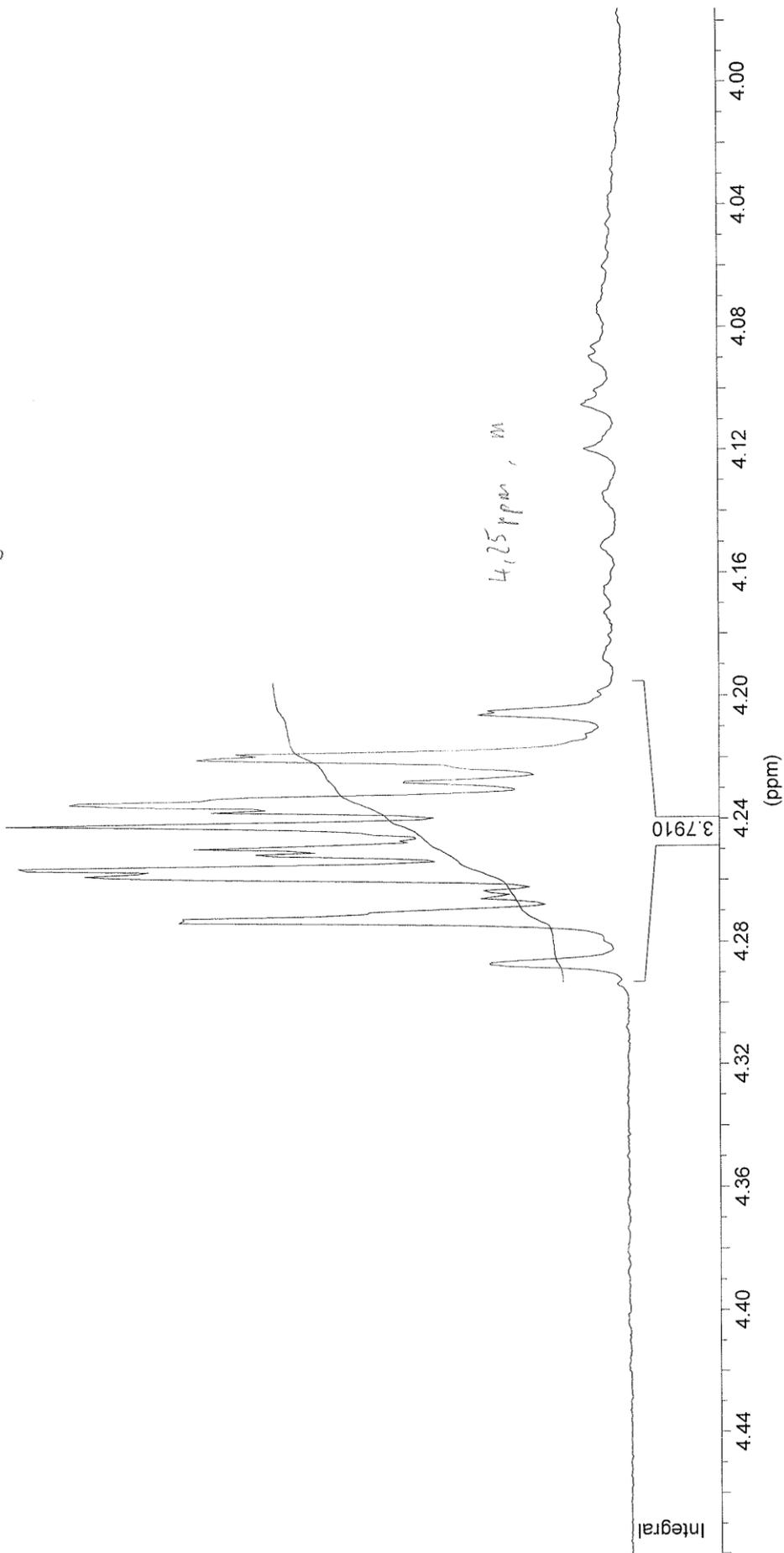


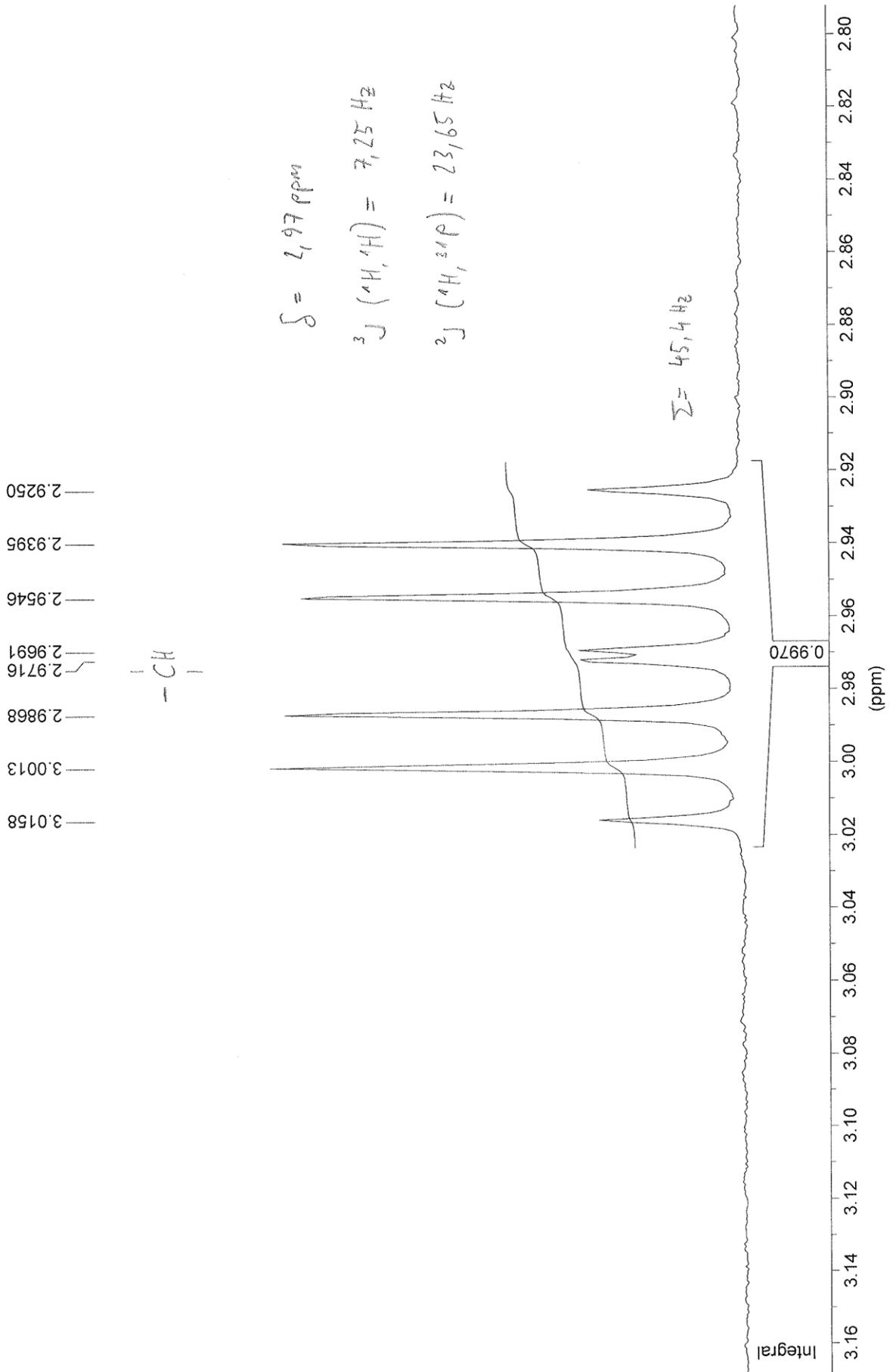
MW012 in cdcl3 (Proton), 22.07.2014

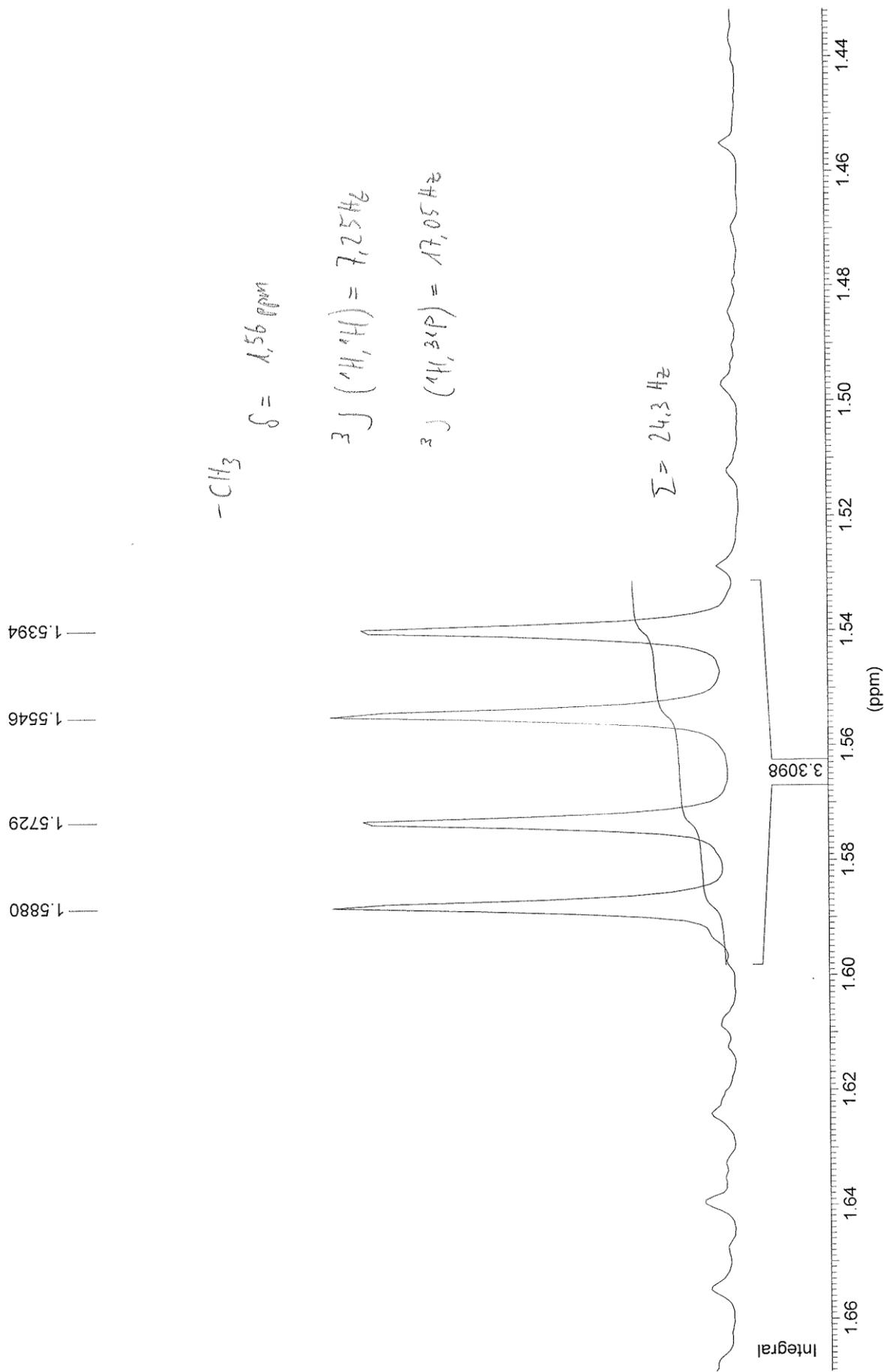


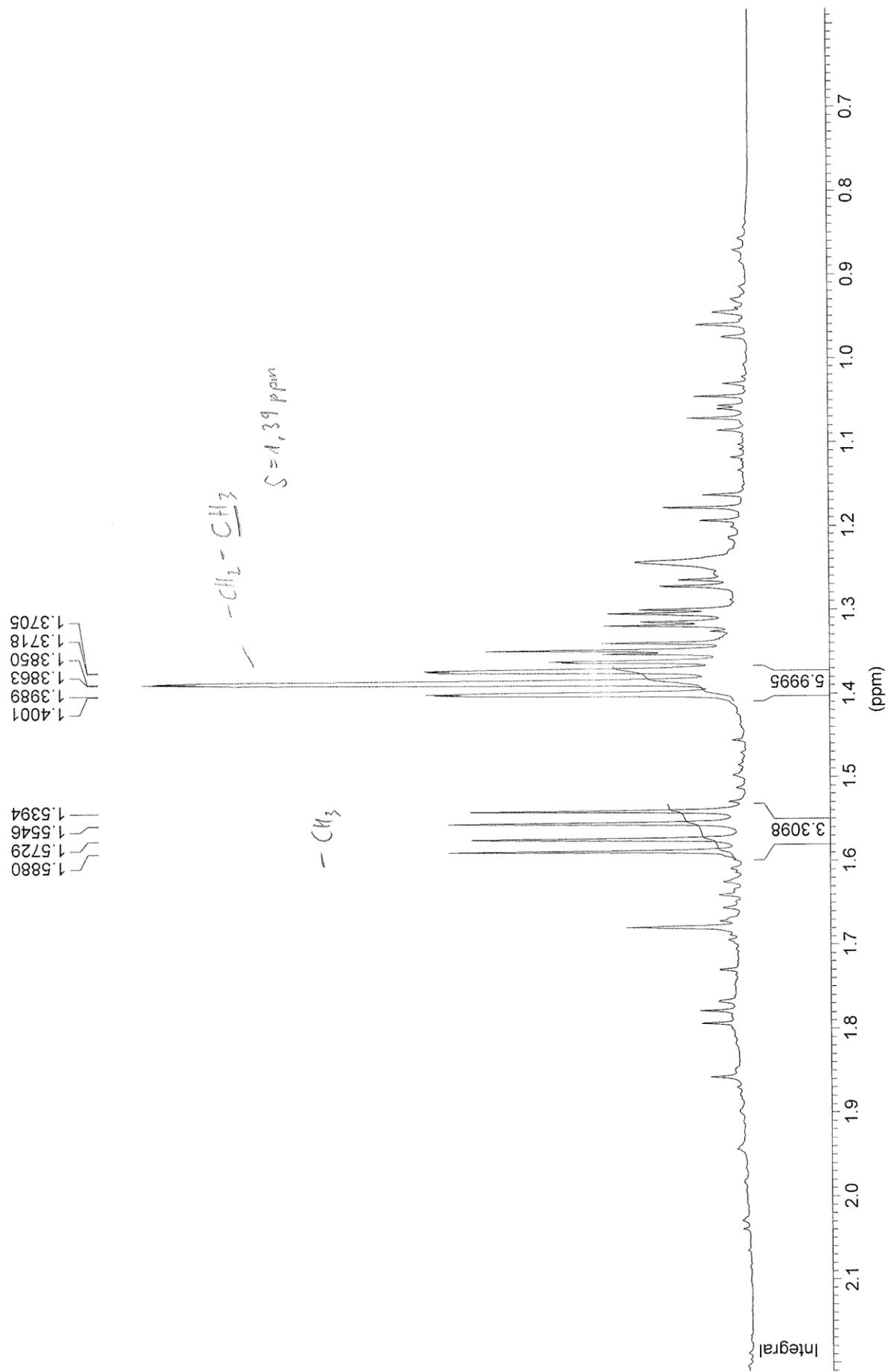
4.2872
4.2733
4.2658
4.2632
4.2582
4.2557
4.2513
4.2494
4.2469
4.2418
4.2374
4.2349
4.2279
4.2204
4.2185
4.2059
4.2046

OCH₂









7. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Michael Wadsak
Telefon: 0664/911 46 29
E-Mail: michael.wadsak@gmx.at
Adresse: Windberg 6, 3332 Rosenau
Geburtsdatum: 18.09.1987
Geburtsort: Waidhofen/Ybbs
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung:

seit 10/2007: Pharmaziestudium an der Universität Wien
11/2006-08/2007: Zivildienst im Therapiezentrum Buchenberg
2006: Reifeprüfung
1998-2006: Stiftsgymnasium Seitenstetten
1994-1998: Volksschule Gleiß

Berufliche Erfahrung:

2004-2010: Ferialpraktikum bei der Firma Mondi
2011: Ferialpraktikum bei der Firma MBA Polymers
Austria Kunststoffverarbeitung GmbH
2012-2013: Ferialpraktikum bei der Firma Mondi
2014-2015: Ferialpraktikum in der Ybbstal Apotheke
(Waidhofen/Ybbs)

Tätigkeiten an der Universität Wien:

2014-2015: Tutor am Department für Pharmazeutische Chemie:
Praktikum "Arzneimittelanalytik und
Wirkstoffentwicklung"