

**Synthese, biochemische und
physikochemische Charakterisierung
von Liganden der
Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Carina Edinger

geboren in Lemgo

Mainz, 2010

Vom Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz als Dissertation angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2006 bis Oktober 2010 am Institut für Pharmazie und Biochemie – Therapeutische Lebenswissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Datum der mündlichen Prüfung: 21.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glutamatrezeptoren	2
1.1.1	Klassifizierung der Glutamatrezeptoren	2
1.2	NMDA-Rezeptor	4
1.2.1	Rezeptoraufbau.....	4
1.2.2	Rezeptoraktivierung	7
1.2.3	Exzitotoxizität	9
1.2.4	Ligandenbindungsstellen.....	11
1.2.4.1	Liganden der L-Glutamat-Bindungsstelle.....	13
1.2.4.2	Liganden der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle.....	14
1.2.4.3	Liganden der Polyamin-Bindungsstelle.....	17
1.2.4.4	Offener-Kanal-Blocker	19
1.2.4.5	Modulatoren an der N-terminalen Domäne.....	21
1.2.4.6	Inhibitoren der PSD-95/NMDA-Interaktion als neuer Therapieansatz	24
1.3	Potentielle therapeutische Indikationen von NMDA-Rezeptor-Antagonisten	26
1.3.1	Zerebrale Ischämie nach Schlaganfall.....	26
1.3.2	Epilepsie.....	29
1.3.3	Morbus Parkinson.....	31
1.3.4	Alzheimer Demenz	32
1.3.5	Amyotrophe Lateralsklerose.....	32
1.3.6	Neuropathischer Schmerz.....	34

2	Zielsetzung.....	36
3	Chemischer Teil.....	38
3.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Leitstruktur	38
3.2	Synthese des Indolgrundkörpers.....	41
3.2.1	Überblick.....	41
3.2.2	Diazotierung und Reduktion	42
3.2.3	Hydrazonbildung.....	44
3.2.4	Indolsynthese	47
3.3	Substitution des Indolgrundkörpers an Position 3.....	50
3.3.1	Überblick.....	50
3.3.2	Formylierung nach Vilsmeier	51
3.4	Strukturvariation an Position 3 des Indolgrundkörpers.....	53
3.4.1	Überblick.....	53
3.4.2	Hydantoin-Derivate	55
3.4.2.1	Multikomponentensynthese der Imidazolidin-2,4- dione.....	57
3.4.2.2	Darstellung der Isocyanate	61
3.4.2.3	Esterhydrolyse	63
3.4.2.4	Etherspaltung der 5-Methoxygruppe.....	64
3.4.2.5	Selektive Reduktion der Carbonylfunktionen	67
3.4.2.6	Imidazolidin-2-on-Derivate	74
3.4.3	Aldolkondensation	77
3.5	Variation der sauren Funktion an Position 2 des Indolgrundgerüsts	83
3.5.1	Überblick.....	83
3.5.2	Synthese der Hydroxamsäurederivate.....	84
3.6	Valproinsäurederivat	85
3.6.1	Darstellung der Aminomethylfunktion als Kopplungspartner	86
3.6.2	Kopplung mit Valproinsäure.....	87

4	Biochemische und physikochemische Testmethoden ...	89
4.1	Bindungsstudie zur Bestimmung der Affinität zu der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors	90
4.1.1	Radioligand-Bindungsstudien.....	90
4.1.1.1	Radioligand.....	91
4.1.1.2	Gewebe-Homogenate.....	92
4.1.1.3	Unspezifische Bindung	93
4.1.1.4	Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssig- szintillationsmethode.....	94
4.1.2	Praktische Durchführung.....	96
4.1.2.1	Membranpräparation	96
4.1.2.2	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford.....	98
4.1.2.3	[³ H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassay.....	98
4.1.2.4	Auswertung.....	101
4.2	XTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	103
4.2.1	Theoretischer Hintergrund.....	103
4.2.2	Kultivierung der Mono Mac 6-Zellen.....	104
4.2.3	Zellzählung.....	104
4.2.4	Durchführung des XTT-Assays	105
4.3	Log P-Wert-Bestimmung zur Beurteilung der Lipophilie.....	106
4.3.1	Theoretischer Hintergrund.....	106
4.3.2	Barrieren des ZNS.....	106
4.3.3	Modulation der Funktion der Blut-Hirn-Schranke	109
4.3.4	Überlegungen zur Überwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke.....	110
4.3.4.1	Physikochemische Parameter	110
4.3.4.2	Blut-Hirn-Schranken-Modell.....	111
4.3.5	log P-Wert-Bestimmung	113
4.3.5.1	Potentiometrische log P-Wert-Bestimmung	114

4.3.5.2	Bestimmung des log P-Wertes nach einer HPLC-Methode	117
4.4	Positronen-Emissions-Tomographie.....	119
4.4.1	Theoretischer Hintergrund.....	119
4.4.2	<i>In vivo</i> -Experiment.....	121
5	Ergebnisse und Diskussion.....	122
5.1	Bindungsstudien.....	122
5.1.1	Bindung von Liganden an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors.....	123
5.1.2	Ergebnisse der [³ H]MDL105,519-Bindungstudien	125
5.1.2.1	Übersicht.....	125
5.1.2.2	Auswirkungen der Variation des Substituentenmusters am Indolgrundgerüst.....	129
5.1.2.3	Einfluss der unterschiedlichen Reste an Position 3 des Hydantoins.....	131
5.1.2.4	Auswirkungen der unterschiedlichen Wasserstoffbrücken-Donor und -Akzeptor-Eigenschaften ausgehend von der Hydantointeilstruktur	134
5.1.2.5	Einfluss der semicyclischen C=C-Bindung zwischen Indol und Imidazolidin-2,4-dion bzw. Pyrrolidin-2,5-dion-Struktur.....	136
5.1.2.6	Einfluss der unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2 des Indolgrundgerüsts	137
5.1.2.7	Hybridmolekül als dual-affiner Ligand	140
5.1.2.8	Serin-gekoppelte 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Derivate	141
5.1.2.9	Gavestinel-Derivate.....	143
5.1.2.10	Zusammenfassung der Ergebnisse der [³ H]MDL105,519-Bindungsstudie	145

5.2	XTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	147
5.2.1	Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays	147
5.3	Log P-Wert-Bestimmung zur Beurteilung der Lipophilie.....	151
5.3.1	Ergebnisse der log P-Wert-Bestimmungen	155
5.4	<i>In vivo</i>-Experimente	156
5.4.1	Ergebnisse der PET-Untersuchungen.....	156
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	160
6.1	Zusammenfassung der Forschungsergebnisse.....	160
6.2	Ausblick	162
7	Experimenteller Teil	165
7.1	Geräte, Material und Reagenzien.....	165
7.1.1	[³ H]-MDL 105,519-Bindungsassay	165
7.1.1.1	Geräte.....	165
7.1.1.2	Material.....	166
7.1.1.3	Reagenzien	167
7.1.2	XTT-Viabilitätsassay.....	168
7.1.2.1	Geräte.....	168
7.1.2.2	Material.....	169
7.1.2.3	Reagenzien	170
7.1.3	Log P-Wert-Bestimmungen	170
7.1.3.1	Geräte.....	170
7.1.3.2	Material.....	171
7.1.3.3	Reagenzien	171
7.2	Syntheseverfahren und Analytik.....	172
7.2.1	Allgemeine Angaben	172
7.2.1.1	Chromatographie	172
7.2.1.2	Elementaranalyse.....	172
7.2.1.3	Entfernung der Lösungsmittel.....	172

Inhaltsverzeichnis

7.2.1.4	IR-Spektroskopie.....	173
7.2.1.5	Massenspektrometrie.....	173
7.2.1.6	NMR-Spektroskopie.....	173
7.2.1.7	Schmelzpunkt-Bestimmung	174
7.2.1.8	Chemikalien und Lösungsmittel	175
7.2.2	Synthesen.....	176
8	Anhang	279
8.1	Abkürzungsverzeichnis	279
8.2	Abbildungsverzeichnis	283
8.3	Tabellenverzeichnis.....	288
8.4	Formelverzeichnis	290
8.5	Literaturverzeichnis.....	294
8.6	Lebenslauf.....	320

1 Einleitung

Eine Besonderheit des Gehirns zeigt sich unter anderem darin erlernte Fähigkeiten dauerhaft zu speichern und bei Bedarf wiederzugeben. Lernen und Gedächtnis resultieren dabei im Wesentlichen aus der präzisen Wirkweise von Ionenkanälen, welche die Grundlage für die Kommunikation zwischen Nervenzellen darstellen. Vor allem den durch die Aminosäure L-Glutamat aktivierbaren Ionenkanälen bzw. Rezeptoren kommt dabei eine bedeutende Rolle zu. Neben der Beteiligung an dem Phänomen der synaptischen Plastizität, die mit emotionalen und kognitiven Prozessen sowie mit Gedächtnisleistung in Zusammenhang gebracht wird, sind sie außerdem in eine Vielzahl von pathologisch exzitotoxischen Prozessen involviert ⁽¹⁾. So gibt es Hinweise darauf, dass bei einem Großteil der neurodegenerativen Erkrankungen die Schädigung der Neuronen zumindest teilweise durch eine Überstimulation von Glutamat-Rezeptoren entsteht ⁽²⁾. Als akute neurodegenerative Erkrankungen lassen sich zerebrale Ischämien beispielsweise nach Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma oder Epilepsie sehen, während Morbus Parkinson, Alzheimer Demenz, amyotrophe Lateralsklerose, Chorea Huntington oder AIDS-Demenz zu den chronischen neurodegenerativen Erkrankungen zu zählen sind. Ferner sind Glutamat-Rezeptoren an der Übertragung von Schmerzsignalen beteiligt ⁽³⁾.

Aufgrund der Korrelation insbesondere der chronisch degenerativen, neuronalen Erkrankungen mit zunehmendem Alter und der immer älter werdenden Bevölkerung, gewinnt die Möglichkeit in die durch L-Glutamat ausgelösten, neurotoxischen Mechanismen therapeutisch eingreifen zu können, immer mehr an Bedeutung.

1.1 Glutamatrezeptoren

Die chemische Reizweiterleitung von einem Neuron auf eine nachgeschaltete Nervenzelle erfolgt über Neurotransmitter, die beim Erreichen des Aktionspotentials an der präsynaptischen Membran ausgeschüttet werden und schließlich nach Diffusion durch den synaptischen Spalt postsynaptische ligandengesteuerte Ionenkanäle aktivieren. Den wichtigsten erregenden (exzitatorische) Neurotransmitter im ZNS stellt dabei die Aminosäure L-Glutamat dar, und der größte Anteil der schnellen exzitatorischen Neurotransmission erfolgt über ionotrope Glutamatrezeptoren. Diese gehören zur großen Gruppe der Aminosäure-Rezeptoren, welche wiederum zu den membranständigen Rezeptoren gezählt werden.

Neben dem exzitatorischen Effekt lässt sich ebenfalls eine hemmende (inhibitorische) Wirkung von Aminosäuren feststellen, die durch den Strychnin-sensitiven Glycin-Rezeptor (Gly_A)⁽⁴⁾ sowie die γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA_{A-C}) ausgelöst werden können⁽⁵⁾.

1.1.1 Klassifizierung der Glutamatrezeptoren

Die Klasse der Glutamatrezeptoren kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen in die Gruppe der membranständigen Rezeptoren, die an guanylnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind, die sogenannten metabotropen Rezeptoren (mGlu). Und zum anderen in die Gruppe der membranständigen ionotropen Glutamatrezeptoren (iGlu), die ligandengesteuerte Kationenkanäle darstellen. Die metabotropen Glutamatrezeptoren werden ihrerseits in 3 Untergruppen eingeteilt, die sich durch Ähnlichkeiten in der Signaltransduktionskaskade und dem Rezeptoraufbau auszeichnen. Von den acht Untergruppen werden der mGlu₁- und mGlu₅-Rezeptor aufgrund der Stimulation der Phospholipase C und der sich anschließenden Bildung von 1,4,5-Inositoltriphosphat und Diacylglycerol der Gruppe I zugeordnet.

Die metabotropen Rezeptoren der Gruppe II (mGlu₂, mGlu₃) sowie der Gruppe III (mGlu₄; mGlu₆₋₈) werden durch die Hemmung der Adenylatcyclase charakterisiert⁽¹⁾. Eine Übersicht ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

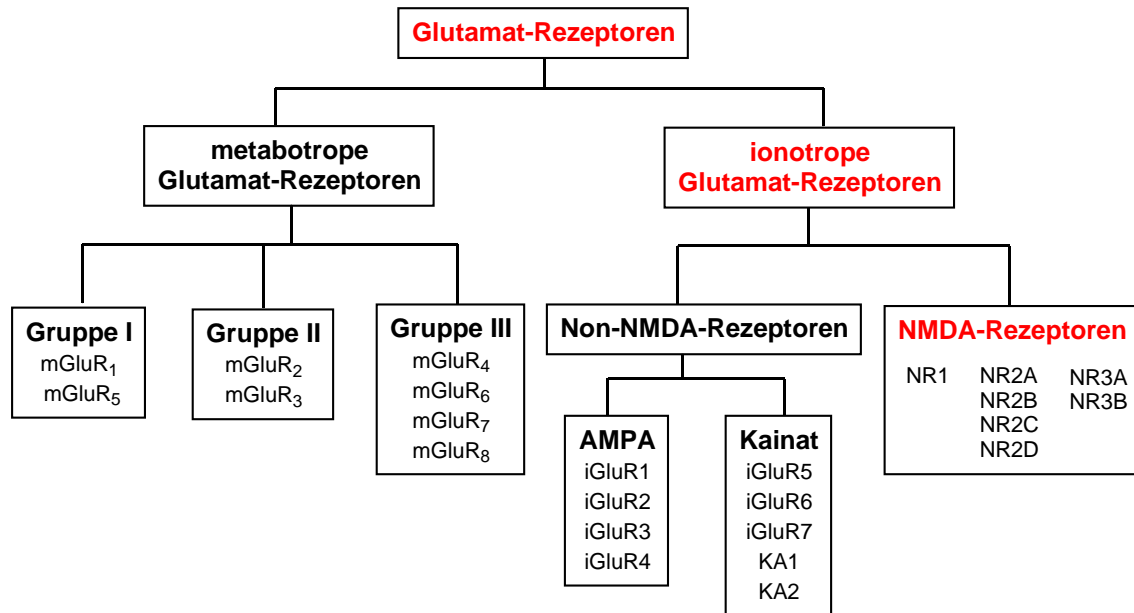


Abbildung 1: Klassifizierung der Glutamat-Rezeptoren

Die glutamatergen, ionotropen Kationenkanäle werden übergeordnet in NMDA- und Non-NMDA-Rezeptoren gegliedert, wobei letztere in AMPA- und Kainat-Rezeptoren unterteilt werden. Ihre Namensgebung bezieht sich auf selektive exogene und teilweise synthetische Liganden, welche spezifisch den entsprechenden Rezeptortyp aktivieren. Ihre Strukturen sind in Abbildung 2 gezeigt.

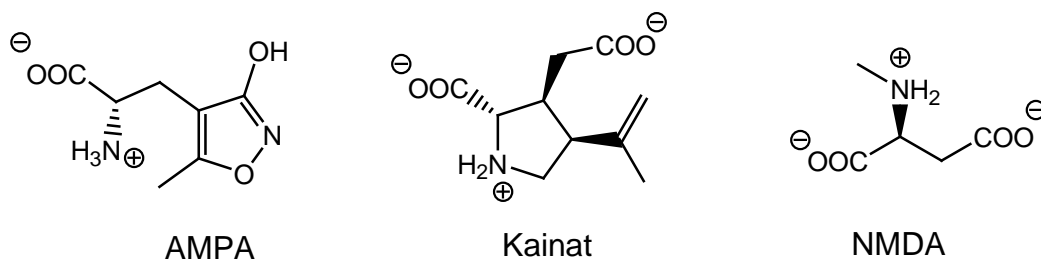


Abbildung 2: Strukturen der namensgebenden Liganden ionotroper Glutamatrezeptoren; AMPA=2-Amino-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionat; Kainat=2-[2-Carboxy-4-(2-propenyl)pyrrolidin-3-yl]acetat; NMDA=N-Methyl-D-aspartat

Allen ionotropen Glutamatrezeptoren gemeinsam ist der nichtselektive Durchtritt von Kationen in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus. Während der Ionenstrom der AMPA- und Kainat-Rezeptoren hauptsächlich von Na^+ - und K^+ -Ionen getragen wird, vermittelt der NMDA-Rezeptor zusätzlich einen hohen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Aber auch für einige Subtypen der AMPA-Rezeptoren wird eine geringe Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen diskutiert, die nach einem unterschiedlichen Mechanismus verläuft ⁽⁶⁾.

Dabei erfolgt der Ioneneinstrom über die Non-NMDA-Rezeptoren im Bereich von Mikrosekunden, wodurch sie hauptverantwortlich für die schnelle Weiterleitung erregender Signale im Gehirn sind. Der NMDA-Rezeptor dagegen ist etwas langsamer (im Bereich von Millisekunden), aber auch andauernder in seiner Rezeptorantwort. Dabei ist die Rezeptorzusammensetzung wesentlich an der Öffnungsdauer beteiligt und liegt in Bereich von ca. 120 Millisekunden (NR1/NR2A) über 400 Millisekunden (NR1/NR2B-C), bis hin zu ca. 5000 Millisekunden (NR1/NR2D) ⁽⁷⁾.

Generell sind gegenwärtig sieben verschiedenen Untereinheiten beschrieben (vgl. Abbildung 1), wobei von der NR1-mRNA durch alternatives Spleißen acht verschiedene Spleißvarianten gebildet werden können.

1.2 NMDA-Rezeptor

1.2.1 Rezeptoraufbau

Während Non-NMDA-Rezeptoren monomere Ionenkanäle ausbilden können, die lediglich durch L-Glutamat aktiviert werden, handelt es sich bei dem NMDA-Rezeptor um einen heteromultimeren Proteinkomplex, der aus 4 radial angeordneten Untereinheiten aufgebaut ist und somit strukturelle Ähnlichkeiten zum spannungsabhängigen Kaliumkanal zeigt. Um dabei eine Funktionsfähigkeit zu erreichen, sind zwei Heterodimere ^{(8), (9)} aus jeweils einer glycinbindenden NR1-Untereinheit sowie einer beliebigen, modulierenden NR2A-D-Untereinheit, wel-

che eine Bindestelle für L-Glutamat aufweist, und/oder einer NR3-Untereinheit essentiell⁽¹⁰⁾.

Erst in jüngster Zeit konnte dabei die Rolle der NR3-Untereinheit aufgeklärt werden, welche ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität für Glycin aufweist^{(11), (12)}. Ihre Beteiligung am Ionenkanal vermindert allerdings die Ca^{2+} -Permeabilität weshalb ihnen eine regulierende Funktion zugeschrieben wird^{(13), (14)}.

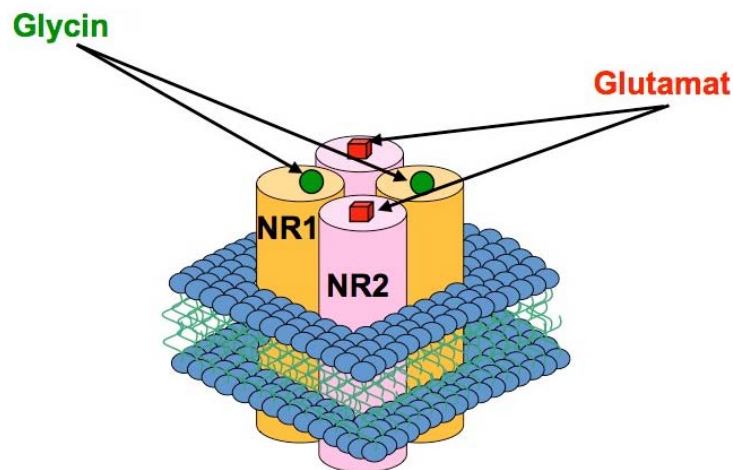


Abbildung 3: Schema des heterotetrameren NMDA-Rezeptorkomplexes

Durch unterschiedliche Kombination der Untereinheiten ist somit eine Vielzahl verschiedener Rezeptorzusammensetzungen möglich, woraus eine Diversität struktureller und funktioneller NMDA-Rezeptoren in verschiedenen Hirnarealen resultiert⁽¹⁵⁾.

Während die NR1-Untereinheit ubiquitär im gesamten Gehirn vorkommt, zeigen die 4 NR2-Untereinheiten eine charakteristische, zum Teil altersabhängige Verteilung in spezifischen Hirnarealen. So findet man die höchste Dichte der NR2A-Untereinheit im cerebralen Cortex sowie im Hippocampus. Im Gegensatz dazu wird die NR2B-Untereinheit verstärkt im Vorderhirn, aber auch im Cortex, Hippocampus, Septum oder Thalamus exprimiert. Im Kleinhirn (Cerebellum) ist vornehmlich die NR2C-Untereinheit zu finden, während die NR2D-Untereinheit nur selten und auch in nur geringer Dichte in Bereichen des Thalamus und des Hirnstammes vorkommt⁽⁷⁾.

Neben der Expression im ZNS konnten NMDA-Rezeptoren verschiedener Zusammensetzung weiterhin in extraneuronalen Bereichen wie Herz⁽¹⁶⁾, Lunge⁽¹⁷⁾ oder in den β -Zellen des Pankreas^{(18), (19)} nachgewiesen werden. Aber auch in Knochenzellen⁽²⁰⁾ und der Haut, in für die Schmerzwahrnehmung wichtigen unmyelierten sensorischen Nervenendigungen⁽²¹⁾ sowie in hämatopoetischen Zellen wie peripheren Monozyten⁽²²⁾ oder Megakaryozyten⁽²³⁾ wurden entsprechende Rezeptoren gefunden.

Obwohl den verschiedenen Untereinheiten unterschiedliche Eigenschaften zugeordnet werden, ähneln sie sich doch stark in ihrer transmembranären Topologie. Demzufolge besitzen sie alle, wie in Abbildung 4 gezeigt, einen extrazellulären N-Terminus, drei transmembranäre Domänen (M1, M3, M4), eine membranäre Domäne (M2) sowie einen intrazellulären C-Terminus.

Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) befindet sich im relativ großen N-terminalen extrazellulären Bereich und wird mutmaßlich über Zusammenlagerungen verschiedener extrazellulärer Domänen gebildet. Sie setzt sich aus den Subdomänen S1 und S2 zusammen, wobei die allosterische Bindung der Liganden nach einem „Venusfliegenfallen-artigen“ Mechanismus diskutiert wird⁽²⁴⁾.

Daneben wird die N-terminale Domäne (NTB) im extrazellulären Bereich gefunden. Diese besteht aus den ersten ca. 400 Aminosäure-Resten und spielt vermutlich bei der Aktivierung, der Desensitivierung sowie der Zusammensetzung der Untereinheiten eine wichtige Rolle. Die Pore des Kanals wird wesentlich durch die membranäre Schleife (M2) gebildet und bestimmt die Permeationseigenschaften des Rezeptors⁽²⁵⁾.

Der intrazelluläre C-Terminus verankert schließlich die Rezeptoruntereinheit zum einen mit membranassoziierten Gerüstproteinen (z.B. PSD-95) und zum anderen mit Proteinen, die zu der anschließenden Signalübertragung beitragen. Überdies kann sie die Rezeptoraktivierung durch verschiedene Phosphorylierungsstellen modulieren⁽²⁶⁾. Die NR2-Untereinheiten weisen dabei im Gegensatz zu den NR1-Untereinheiten einen deutlich längeren C-Terminus auf⁽²⁷⁾.

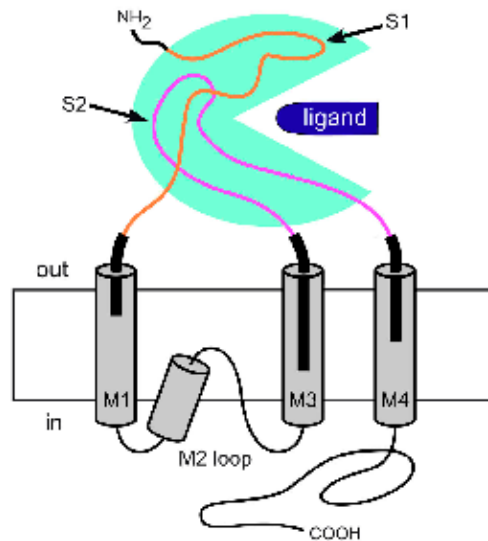


Abbildung 4: Topologie einer NMDA-Rezeptor-Untereinheit nach Sobolevsky ⁽¹⁵⁾; die hydrophoben und mutmaßlich α -helicalen transmembranären Segmente M1, M3 und M4 sowie die membranäre Schleife M2 sind als graue Zylinder gekennzeichnet; die S1- (orange) und S2-Subdomänen (magenta) bilden die Ligandenbindedomäne.

1.2.2 Rezeptoraktivierung

Die Einzigartigkeit des NMDA-Rezeptors im Vergleich zu allen anderen ligandengesteuerten Ionenkanälen zeigt sich in seinen bemerkenswerten Aktivierungseigenschaften. So ist die Kanalpore nahe dem Ruhepotential durch ein extrazelluläres Magnesiumion blockiert, das an einem Bindungsareal innerhalb des Kanals angreift ⁽²⁸⁾. Erst nach Überschreiten eines bestimmten Membranpotentials, welches beispielsweise durch Aktivierung eines kolokalisierten AMPA-Rezeptors ausgelöst werden kann, oder durch hochfrequente tetanische Reize (25-200 Hz), löst es sich aus der geöffneten Pore ⁽²⁹⁾, womit eine Ähnlichkeit zu spannungsabhängigen Ionenkanälen festzustellen ist ^{(30), (31)}.

Ein Ionenfluss kann dann aber nur stattfinden, wenn gleichzeitig Glycin und L-Glutamat als stimulierende Liganden an dem Kanal angreifen können. Somit kann von einem echten Koagonismus beider Liganden gesprochen werden.

Nur das gleichzeitige Eintreten beider Ereignisse vermag es NMDA-Rezeptoren zu aktivieren, wodurch sie Eigenschaften der liganden- und spannungsabhängigen Ionenkanäle miteinander verbinden.

Sie wirken daher als Koinzidenzdetektoren⁽⁸⁾, die zeitlich und räumlich nahe beieinander liegende Depolarisationsschritte aufsummieren, die für sich allein nicht den Schwellenwert erreichen⁽³²⁾.

Als Ausnahme muss allerdings der NR1/NR3-iGlu-Rezeptor betrachtet werden, da er aufgrund des Fehlens einer L-glutamatbindenden-Untereinheit allein durch Glycin aktivierbar ist⁽³³⁾,⁽³⁴⁾ und folglich einen exzitatorischen Glycin-Rezeptor darstellt⁽³⁵⁾.

Die außergewöhnlichen Eigenschaften der NMDA-Rezeptoren führen daher zu einer Art Konditionierbarkeit der Neurone, ebenfalls vergleichbar mit einer synaptischen Koinzidenz, wie sie im Fall der Hebb'schen Synapse postuliert wird⁽³⁶⁾. Hierbei müssen in einer logischen UND-Verknüpfung mindestens zwei Vorgänge gleichzeitig miteinander verbunden sein, um einen Reiz zu veranlassen. Diese Voraussetzung ist durch den Koagonismus von L-Glutamat und Glycin sowie der spannungsabhängigen Aufhebung der Magnesiumionen-Blockade gegeben, wodurch schließlich die Möglichkeit entsteht, neuronale Schaltkreise auszubilden und so auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren⁽³⁷⁾. Wie bereits erwähnt, werden emotionale und kognitive Prozesse, sowie Gedächtnisleistungen wesentlich durch die synaptische Plastizität beeinflusst. Auch hier besteht wieder eine Spezifität der Rezeptorsubtypen⁽³⁸⁾.

Einen wichtigen Begriff in diesem Zusammenhang stellt die Langzeit-Potenzierung (LTP = long term potentiation) dar⁽³⁹⁾, die eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung bezeichnet. NMDA-Rezeptoren als Koinzidenz-Rezeptoren spielen dabei eine bedeutende Rolle⁽⁴⁰⁾, da LTP verstärkt bei synchronisiertem Feuern mehrerer Neurone entsteht.

Von zentraler Bedeutung nach Rezeptoraktivierung ist der zum Teil enorme Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die ihrerseits NMDA-abhängige Signaltransduktionskaskaden aktiviert⁽⁴¹⁾, in denen neben NO-Synthasen,

Phospholipasen A₂ und C, Proteinkinase C auch Tyrosinkinasen sowie Phosphatasen eine große Rolle spielen^{(13), (42)}.

1.2.3 Exzitotoxizität

Um die exzitatorischen und bei Überaktivierung toxischen Effekte der L-Glutamat-vermittelten Prozesse begrifflich zusammenfassen zu können, wurde 1969 durch Olney der Begriff der Exzitotoxizität geprägt⁽⁴³⁾.

Im Rahmen von pathophysiologischen Vorgängen, wie beispielsweise der zerebralen Ischämie oder der Hypoglykämie, kommt es zu einer massiven Ausschüttung von L-Glutamat, welche zu einer schnellen Depolarisation der postsynaptischen Membran, ausgelöst durch aktivierte AMPA-Rezeptoren, führt.

Unter Aufhebung der spannungsabhängigen Mg²⁺-Blockade der NMDA-Rezeptoren erfolgt ein starker Influx von Ca²⁺- und auch Na⁺-Ionen in die Zelle, wobei die Gegenwart physiologischer Glycin-Konzentrationen die schnelle Desensitivierung des aktivierten Rezeptors zusätzlich inhibiert⁽⁴⁴⁾.

Als eine Folge des verstärkten Na⁺-Einstroms kommt es gleichzeitig zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle, wodurch schließlich eine dramatische Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration resultiert und infolgedessen eine große Zahl von nachgeschalteten neurotoxischen Signalkaskaden aktiviert wird^{(45), (46)}.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Tatsache, dass L-Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn ist, und der dort vorhandenen enorm hohen Dichte an Glutamat-Rezeptoren, können durch die exzitotoxischen Vorgänge nahezu alle Hirnareale betroffen sein.

Das Schema der durch L-Glutamat vermittelten Exzitotoxizität ist in Abbildung 5 veranschaulicht.

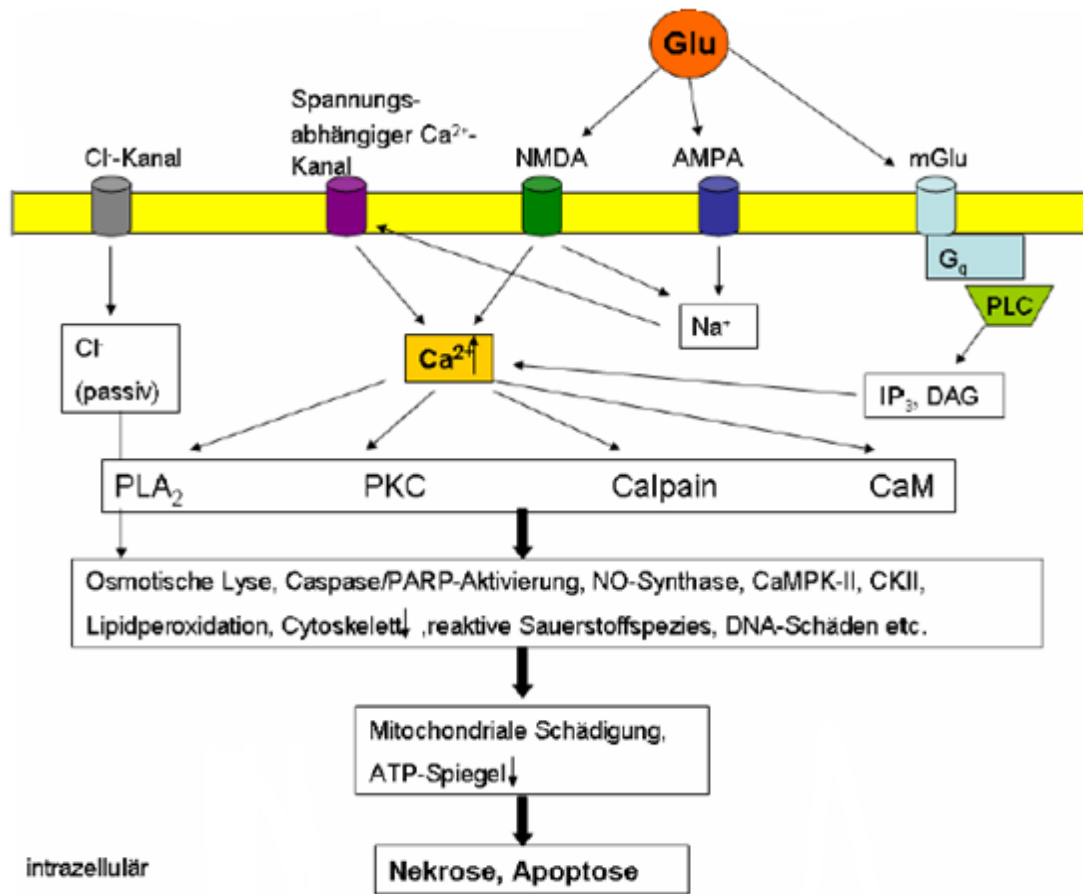


Abbildung 5: Prinzip der durch L-Glutamat vermittelten Exzitotoxizität modifiziert nach Stark *et al.* ⁽¹⁾; G_q= Guanylnukleotidbindendes Protein; PLC= Phospholipase C; IP₃= 1,4,5-Inositoltriphosphat; DAG= Diacylglycerol; PLA₂= Phospholipase A₂; PKC= Proteinkinase C; CaM= Calmodulin; PARP= Poly(ADP-Ribose)-Polymerase; CaMPKII= Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; CKII= Caseinkinase; ATP= Adenosintriphosphat

Durch die Überladung der Zelle mit Ca²⁺-Ionen kommt es zu einer Aktivierung von calcium-abhängigen Enzymen wie Calpain, Calmodulin aber auch von Proteinkinasen und Phospholipasen ⁽⁴⁷⁾. Neben den von ihnen ausgelösten Effekten wie beispielsweise der Bildung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), erfolgt durch den mengenmäßig großen Einstrom von Kationen in die Zelle ein passiver Cl⁻-Influx, wodurch eine Steigerung des osmotischen Drucks hervorgerufen wird, der schließlich in einer osmotischen Lyse der Zelle enden kann.

Weiterhin führt eine mitochondriale Dysfunktion zu einem starken Abfall der ATP-Spiegel. Folge dieser exzitotoxischen Prozesse ist, je nach Intensität des Stimu-

lus, des Zelltyps sowie der Entwicklungsphase in der sich die Zelle befindet, ein Zelluntergang in Form einer Nekrose oder Apoptose.

In der bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen „source-specificity“-Hypothese konnte dabei die Beteiligung der NMDA-Rezeptoren an den neurotoxischen Prozessen nach Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle nochmals untermauert werden. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ) alleine führen dagegen zu keiner neurotoxischen Aktivierung der beschriebenen Signalkaskaden⁽⁴⁷⁾, wodurch gezeigt wird, dass nicht die Menge, sondern die Eintrittsstelle der Ca^{2+} -Ionen in die Zelle eine tragende Rolle spielt⁽⁴⁸⁾.

Weiterhin scheint die Rezeptor-Zusammensetzung im Rahmen der Neurotoxizität von großer Bedeutung zu sein⁽⁴⁹⁾, wobei der NR2B-Untereinheit dabei eine entscheidende Funktion zugesprochen wird⁽⁵⁰⁾. Für NR2A-Untereinheit-enthaltende Rezeptoren gibt es dagegen Hinweise, dass sie an Signalwege gekoppelt sind, die neuronale Überlebensmechanismen auslösen (SSC = survival signal-complex)⁽⁵¹⁾.

1.2.4 Ligandenbindungsstellen

Neben den bereits beschriebenen kompetitiven Bindungsstellen für L-Glutamat bzw. NMDA auf den NR2-Untereinheiten und Glycin auf der NR1-bzw. NR3-Untereinheit lassen sich weiterhin eine Reihe von allosterischen Ligandenbindungsstellen auf den verschiedenen Untereinheiten oder im Ionenkanal finden. Dabei führen Liganden der allosterischen Bindestellen meist eher zu einer Modulation des Rezeptorkomplexes. Zu nennen sind die Polyamin-Bindungsstelle außerhalb des Kanals, sowie die MK-801-Bindungsstelle innerhalb der Kanalpore, die als Target für sogenannte Open-Channel-Blocker fungiert.

Ferner wird der Zustand des Rezeptors durch dessen Redox-Zustand, eine pH-abhängige Stelle, sowie eine außerhalb des Kanals liegende Bindungsstelle für Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen mitbestimmt.

Aus der Vielzahl der vorhandenen Bindungs- und Modulationsstellen des NMDA-Rezeptors resultiert ein äußerst komplexes pharmakologisches Verhalten und dadurch die Möglichkeit, therapeutisch in unterschiedliche Regulationsmechanismen differenziert und selektiv eingreifen zu können.

Eine Übersicht der Bindungsstellen ist in Abbildung 6 veranschaulicht, desweiteren sollen die wichtigsten im weiteren Verlauf kurz erläutert, sowie eine Auswahl angreifender Liganden genauer betrachtet werden.

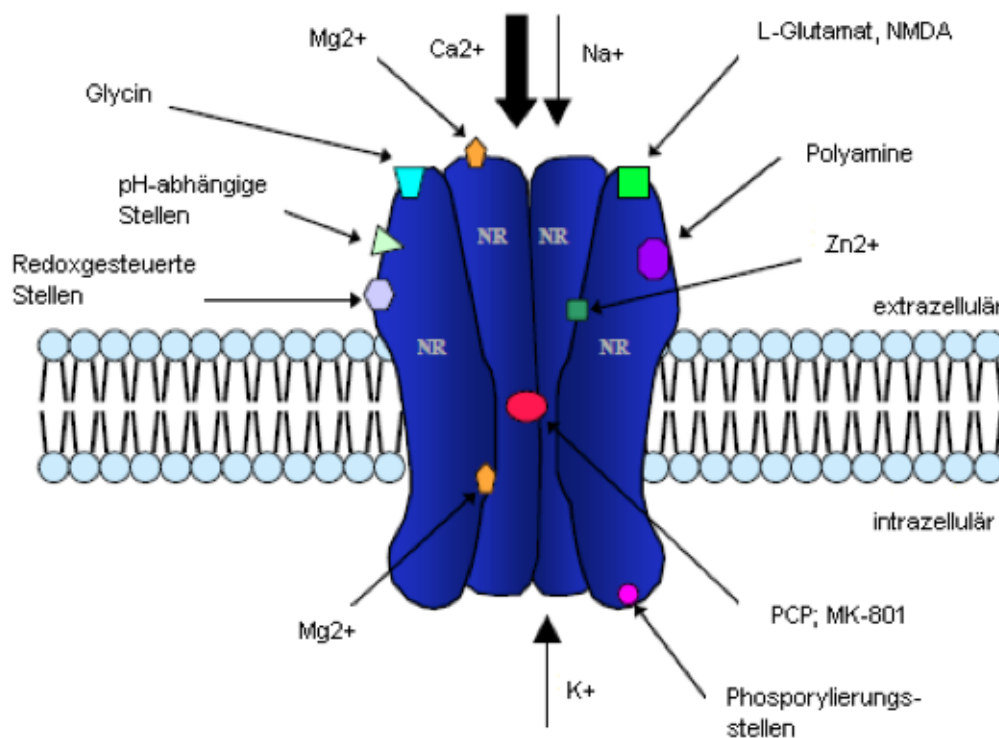


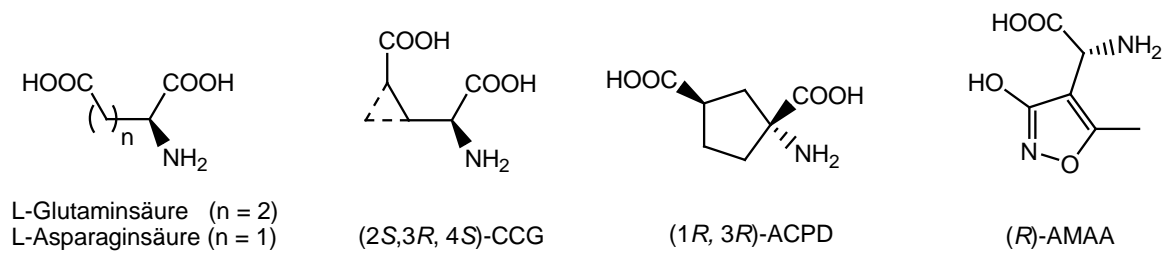
Abbildung 6: Übersicht der Ligandenbindungsstellen des NMDA-Rezeptorkomplexes nach Leeson *et al.* ⁽⁵²⁾.

1.2.4.1 Liganden der L-Glutamat-Bindungsstelle

Neben L-Glutamat als endogenem Agonisten weisen auch die ebenfalls endogene Aminosäure L-Aspartat, sowie die synthetische Aminosäure NMDA eine hohe Affinität zur NR2-Untereinheit auf, wobei für die verschiedenen Untereinheiten (NR2A-D) unterschiedliche Affinitäten bekannt sind. Die Affinität von NMDA ist

zwar geringer, aber die vergleichsweise höhere Selektivität hat zur Namensgebung des Rezeptors geführt. Dabei ist diese Struktur als einzigartig anzusehen, da sie als einzige N-methylierte Aminosäure eine den unmethylierten Analoga vergleichbare Affinität aufweist⁽²⁾. Allen Agonisten strukturell gemeinsam sind zwei Carbonsäurefunktionen in einem definierten Abstand, wobei eine Teil einer α -Aminosäurefunktion ist.

Agonisten



Antagonisten

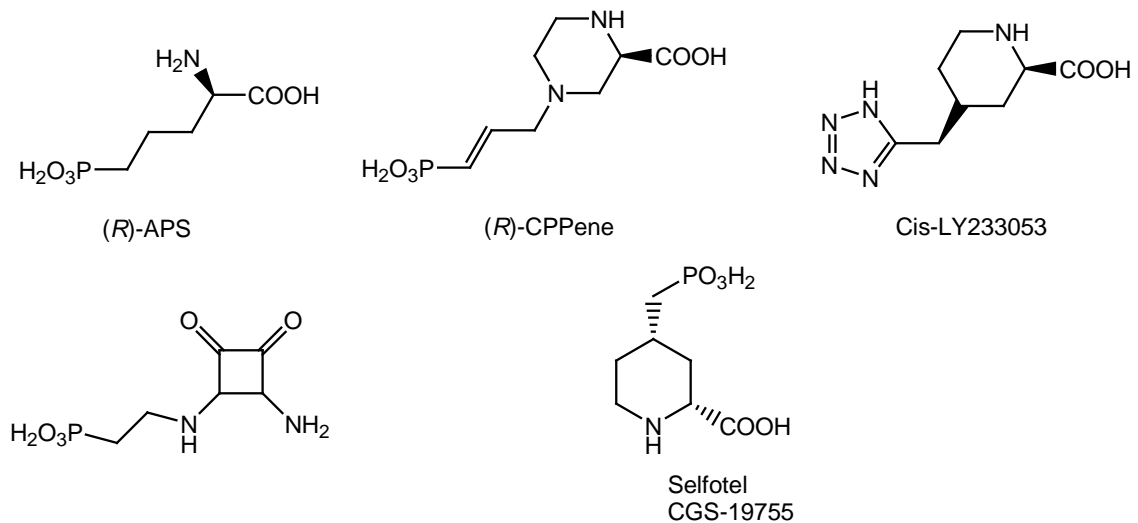


Abbildung 7: Agonisten und Antagonisten der L-Glutamat-Bindungsstelle

Leitstruktur der Antagonisten an der L-Glutamat-Bindungsstelle ist die (*R*)-2-Aminoadipinphosphonsäure (*R*)-APS. Bei den meisten dieser Strukturen handelt es sich um Phosponoaminosäuren, bei denen die Carboxyl- und die bioisostere Phosphono- oder Tetrazolgruppe durch einen Abstand von 4 oder 6 Atomen voneinander getrennt sind.

Eine Besonderheit stellt dabei die 2-[(2-Amino-3,4-dioxo-1-cyclobuten-1-yl)amino]ethylphosphonsäure dar, bei der die Aminosäurestruktur durch ein bioisosteres, nichtionisierbares Strukturelement ersetzt wurde, um verbesserte physikochemische Eigenschaften zu erlangen.

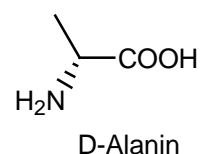
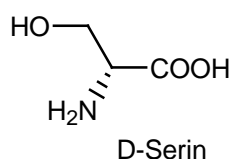
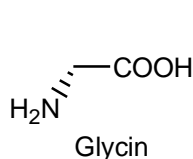
Alle Liganden an der L-Glutamat-Bindestelle sind wichtige pharmakologische Werkzeuge beispielsweise in der Struktur- oder Funktionsaufklärung des Rezeptors, der therapeutische Nutzen ist allerdings sehr gering. So musste die Phase-III-Studie des Antagonisten Selfotel⁽⁵³⁾ aufgrund des Auftretens starker zentralnervöser Nebenwirkungen sowie der nicht signifikant nachweisbaren Wirkung abgebrochen werden⁽⁵⁴⁾.

1.2.4.2 Liganden der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle

Als Koagonist spielt Glycin eine wichtige Rolle in der Modulation der strychnin-insensitiven Bindungsstelle (Gly_B) auf der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, vergleichbar mit der allosterischen Modulation der Benzodiazepine am GABA-Rezeptor. Aber auch andere kleine endogene Aminosäuren wie D-Alanin und D-Serin weisen hohe Affinitäten auf und führen zusammen mit L-Glutamat, gerade in Hirnarealen mit einer geringen Konzentration an Glycin, zur Aktivierung des NMDA-Rezeptors⁽⁵⁵⁾.

Für einige pathologische Bedingungen, insbesondere bei verschiedenen psychischen Erkrankungen wie Depressionen und Schizophrenien, wird eine Hypoaktivität der NMDA-Rezeptoren vermutet. Daher werden nicht nur reine Agonisten mit einer maximalen intrinsischen Aktivität, sondern auch welche mit partieller, aber ausreichend hoher Effektivität - sogenannte partielle Agonisten - therapeutisch genutzt⁽⁵⁶⁾. Zu nennen sind dabei D-Cycloserin als Cyclisierungsprodukt des D-Serins oder das cyclische Hydroxamsäurederivat D-HA-966, welche beide die Fähigkeit aufweisen durch die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren⁽²⁾. Ihre Strukturen sind in Abbildung 8 gezeigt.

Agonisten



partielle Agonisten

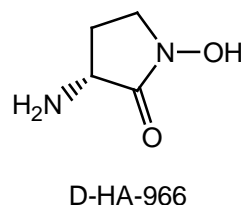
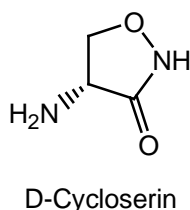


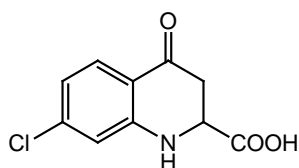
Abbildung 8: Agonisten und partielle Agonisten der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle

Auf der Seite der Antagonisten wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Substanzklassen entwickelt. Dabei zeigte sich zuerst die ausgeprägte Affinität der endogenen Kynurensäure, welche ein Metabolisierungsprodukt der Aminosäure L-Tryptophan darstellt.

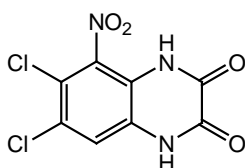
Systematische Veränderungen und Optimierungen führten schließlich zu den verschiedenen Substanzklassen der Chinoxalin-2,3-dionen⁽⁵⁷⁾, den 1,2,3,4-Tetrahydrochinolinen, den Chinolin-2-onen, den Benzimidazolen⁽⁵⁸⁾ sowie den Indol-2-carbonsäuren. Neben der Vielzahl an bicyklischen Derivaten wurden ebenfalls einige mono- und tricyklische Verbindungen synthetisiert. Eine Auswahl ist in Abbildung 9 gezeigt.

Generell sollen Antagonisten und auch partielle Agonisten an der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle ein deutlich besseres Nebenwirkungspotential aufweisen, als beispielsweise Liganden an der Bindestelle für L-Glutamat oder „Offene Kanal-Blocker“⁽⁵⁹⁾.

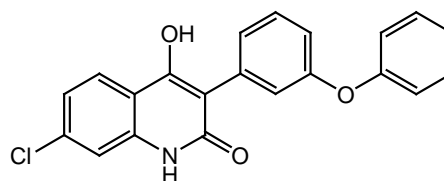
Antagonisten



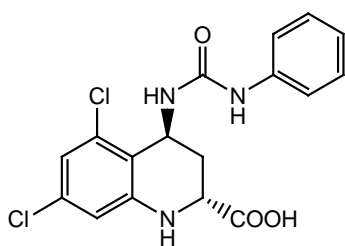
7-Chlorokynurensäure



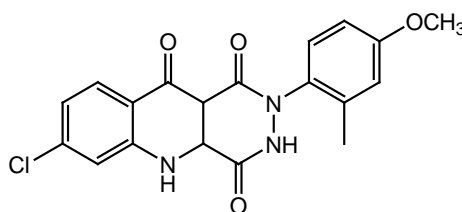
Licostinel
ACEA 1021



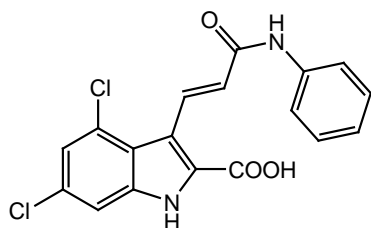
L-701,324



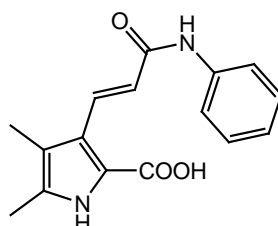
L-689,560



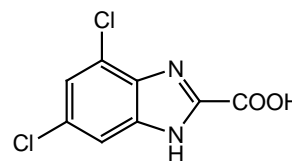
ZD-9379



Gavestinel
GV-150526



Pyrrol-2-carbonsäure-
Derivat



Benzimidazol-
Derivat

Abbildung 9: Antagonisten der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle

Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Obwohl die gezeigten Strukturen sehr heterogen erscheinen, ist ihnen doch ein einheitliches Pharmakophor gemeinsam. Basierend auf dem Pharmakophormodell nach Leeson *et al.* ⁽⁵²⁾, welches bereits Anfang der 90er Jahre für das Kynurensäurederivat L-689,560 postuliert wurde, erfolgte die Entwicklung einer Vielzahl an Antagonisten an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors.

In Abbildung 10 werden die daraus hervorgehenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen gezeigt und in Abschnitt 3.1 näher betrachtet.

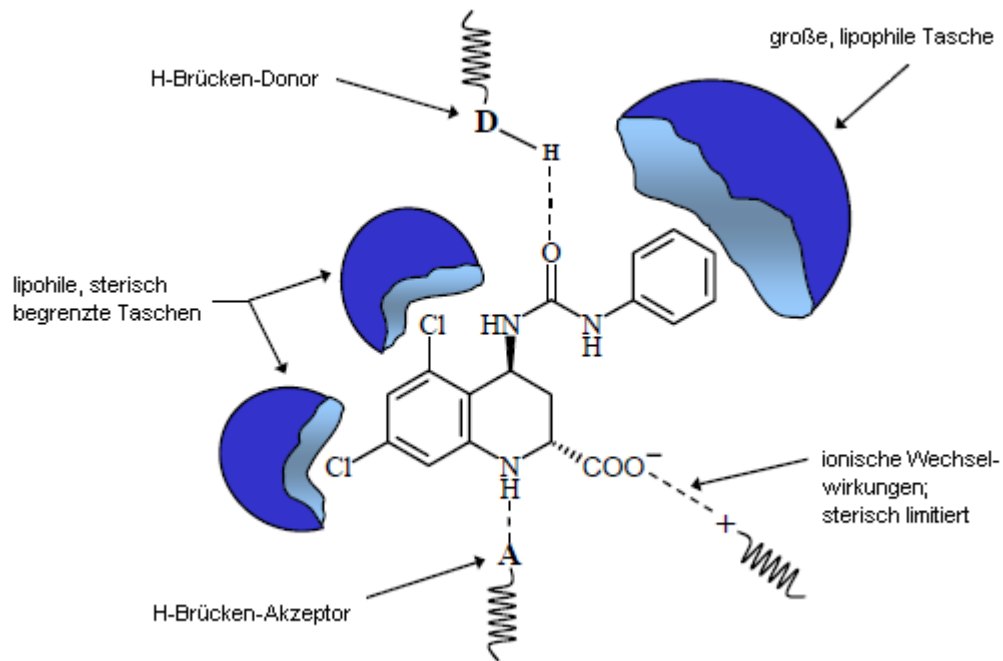


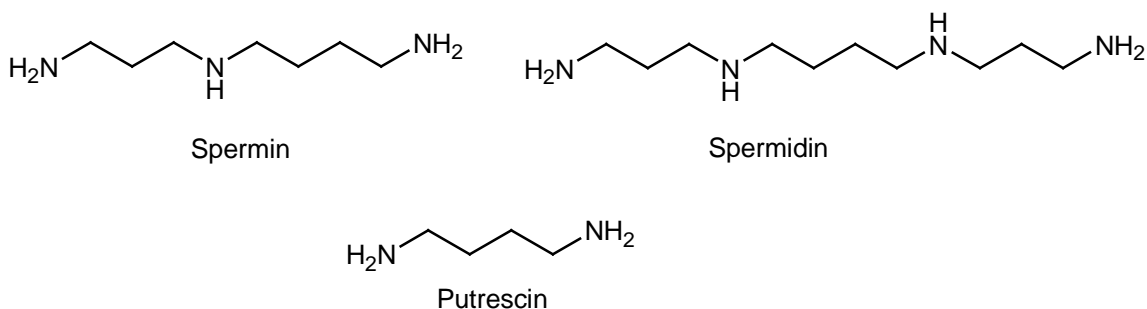
Abbildung 10: Struktur-Wirkungsbeziehung des Antagonisten L-689,560, basierend auf dem Pharmakophormodell nach Leeson *et al.*^{(52), (60)}

1.2.4.3 Liganden der Polyamin-Bindungsstelle

Polyamine sind polybasische, aliphatische Amine, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladen vorliegen. Die aus Ornithin gebildeten endogenen Polyamine Spermin, Spermidin sowie Putrescin kommen in hohen intrazellulären Konzentrationen vor und interagieren mit einer Reihe von Ionenkanälen. Auf dem NMDA-Rezeptor-Komplex sind mindestens drei Bindungsstellen für Polyamine, vornehmlich in der N-terminalen Domäne, vorhanden⁽⁶¹⁾. Dadurch sind entsprechende Liganden in der Lage konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auszulösen, welche wiederum stark von der Zusammensetzung der Untereinheiten beeinflusst werden. Dabei sind als modulierende Effekte die Erhöhung der Glycinempfindlichkeit, eine spannungsabhängige Blockade und auch eine spannungs- und glycinunabhängige Potenzierung der NMDA-Rezeptorfunktion zu nennen⁽⁶²⁾. Polyamine üben dabei eine agonistische oder auch antagonistische modulierende Aktivität aus, welche von ihrer Konzentration als auch der chemischen Struktur abhängt⁽⁶³⁾.

Inverse Agonisten sind in der Lage durch Bindung an der Polyamin-Bindungsstelle die spezifische Bindung von Dizocilpin (MK-801) im Ionenkanal zu blockieren ⁽⁶⁴⁾. Im Gegensatz zu den Polyaminen reduzieren sie die Öffnungsfrequenz des NMDA-Rezeptors-Komplexes, wobei ihre Wirkstärke nur sehr gering ist ⁽⁶⁵⁾. Die Strukturen der endogenen als auch der inversen Agonisten sind in Abbildung 11 gezeigt.

endogene Agonisten



inverse Agonisten

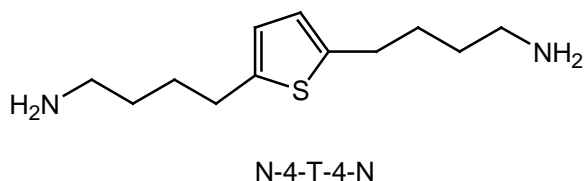
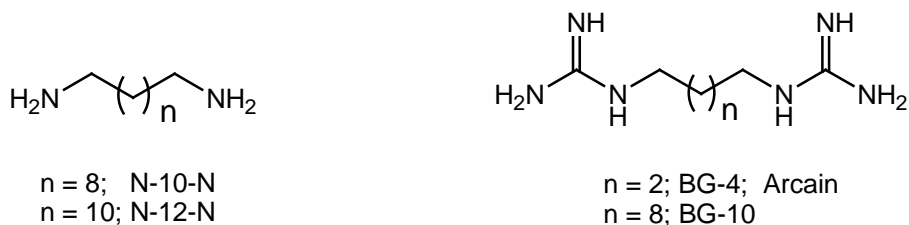


Abbildung 11: endogene Agonisten und inverse Agonisten der Polyamin-Bindungsstelle

Im Gegensatz zu den Polyaminen findet sich für die strukturell völlig andersartigen Phenylethanolamine Ifenprodil und Eliprodil eine sehr hohe Affinität zur Polyamin-Bindungsstelle ⁽⁶⁶⁾ und das mit einer über 200fachen Selektivität zu der NR2B-Untereinheit ⁽⁶⁷⁾. Aufgrund ihrer antagonistischen Eigenschaften gegenüber einer Reihe anderer Ionenkanäle wie α_1 - und Serotonin-Rezeptoren sowie

spannungsabhängigen Calcium-Kanälen sind kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu befürchten. Durch strukturelle Weiterentwicklungen konnte dieses Problem behoben werden, wobei Traxoprodil und Radiprodil sich derzeit in Phase II der klinischen Prüfung befinden.

Selektive Modulatoren des NR2B-Untereinheit enthaltenden NMDA-Rezeptors gelten als nebenwirkungsarme Verbindungsklasse ⁽⁶⁸⁾ und stellen einen vielversprechenden neuen Ansatz in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen dar ⁽⁶⁹⁾. Viele strukturell unterschiedliche Verbindungen befinden sich daher in der klinischen Prüfung ⁽⁷⁰⁾, von denen eine Auswahl in Abbildung 12 veranschaulicht ist. Aber auch NR2C/D-untereinheit-spezifische Antagonisten befinden sich derzeit in der Entwicklung ⁽⁷¹⁾. Durch die Selektivität zu bestimmten NMDA-Rezeptorzusammensetzungen erhofft man sich, das klinische Sicherheitsprofil zu verbessern.

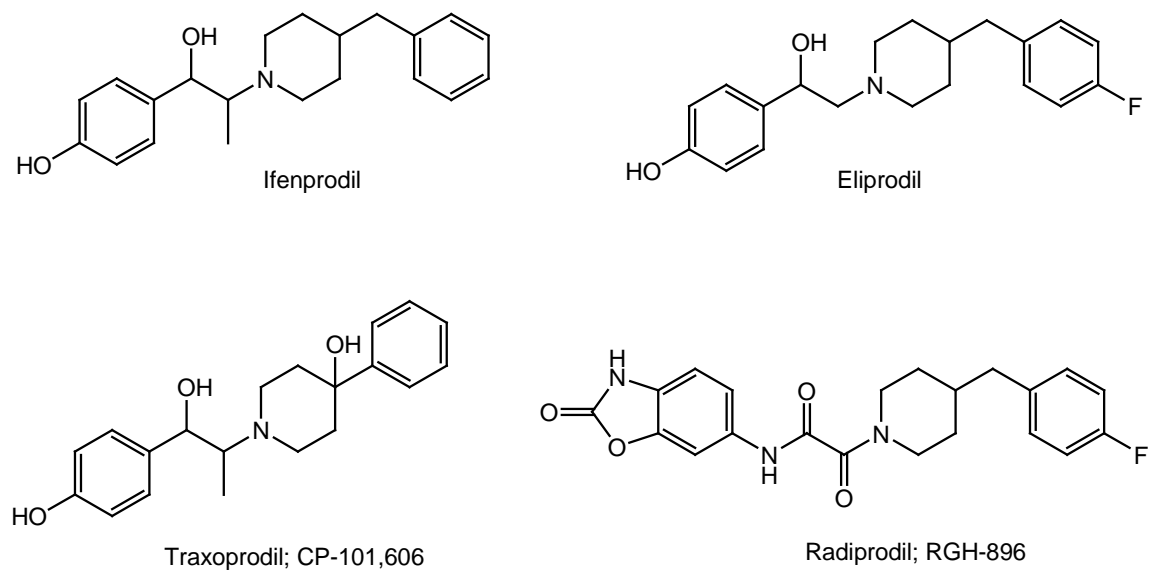


Abbildung 12: allosterische Modulatoren der Polyamin-Bindungsstelle NR2B-untereinheit-enthaltender NMDA-Rezeptoren

1.2.4.4 Offener-Kanal-Blocker

Zu der Klasse der sogenannten Offenen-Kanal-Blocker gehören hochpotente, nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten, deren Effekt agonistenabhängig ist und daher davon ausgegangen werden kann, dass sie im Ionenkanal binden. Anhand unterschiedlicher Bindungskinetiken lässt sich jedoch feststellen, dass sie dabei keine einheitliche Bindungsstelle einnehmen. Um ein Eindringen in die Kanalpore zu ermöglichen muss der Rezeptor durch vorhergehende Aktivierung in einem geöffneten Zustand vorliegen. Sie blockieren den Rezeptor in einer „use-dependence“-Weise⁽⁷²⁾.

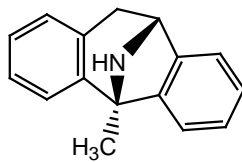
Als Modellsubstanz zur Untersuchung des Rezeptorzustandes und dessen Wirkweise dient das hochselektive polyzyklische Amin MK-801 (Dizocilpin), welches allerdings ein hohes Nebenwirkungspotential aufweist und eine therapeutische Verwendung folglich nicht in Frage kommt. Als vielversprechender haben sich andere basische Verbindungen erwiesen, wie das Anästhetikum Ketamin mit einer hemmenden Wirkung des neuropathischen Schmerzempfindens⁽⁷³⁾ oder die Parkinsontherapeutika Amantadin und Memantin. Sie zählen in der Klasse der Kanalblocker zu den niedrig-affinen NMDA-Rezeptorantagonisten und weisen außerdem eine raschere An- und Abflutkinetik im Ionenkanal auf⁽⁷⁴⁾. Aufgrund dieser Tatsache geht man von einer eher extrazellulär lokalisierten Bindungsstelle aus. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Memantin wenigstens an zwei Bindungsarealen innerhalb des Ionenkanals bindet⁽⁷⁵⁾. Als weiterhin vorteilhaft wird ihr spannungsabhängiger Bindungsmodus angesehen, der vergleichbar mit dem der Mg^{2+} -Ionen ist.

Eine vielversprechende Option in der Therapie des Tinnitus hat sich mit dem Cyclohexan-Derivat Neramexan gezeigt, welches sich derzeit in Phase III der klinischen Prüfung befindet⁽⁷⁶⁾.

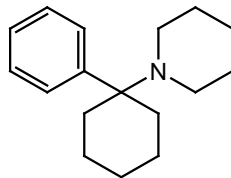
Ein Problem der Offenen-Kanal-Blocker sind jedoch die für NMDA-Rezeptorantagonisten typischen Nebenwirkungen wie psychische Unruhe oder Halluzinationen bis hin zu neurotoxischen Reaktionen. Auch neuere Weiterentwicklungen führten noch nicht zum erwünschten Erfolg. So wurden klinische Prüfungen des Neuroprotektikums Aptiganel aufgrund des Auftretens unerwünschter Wirkungen wie Fehlorientiertheit, Verwirrung und anderer schizophrener Zustände in Phase

III abgebrochen⁽⁷⁷⁾. Abbildung 13 gibt eine Übersicht über Strukturen der Kanalblocker sowie der aktuellen Weiterentwicklungen.

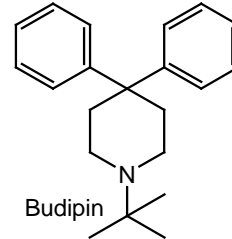
Kanalblocker



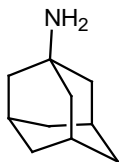
Dizocilpin;
MK-801



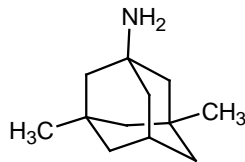
Phencyclidin;
PCP



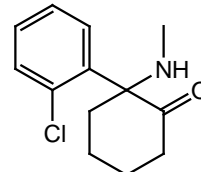
Budipin



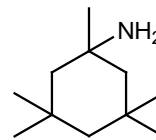
Amantadin



Memantin

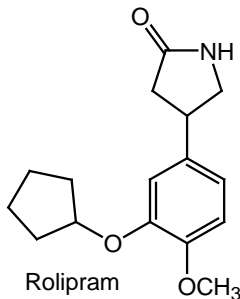


Ketamin

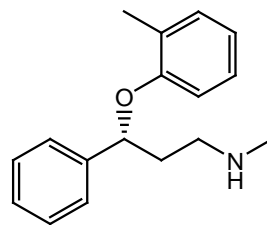


Neramexan

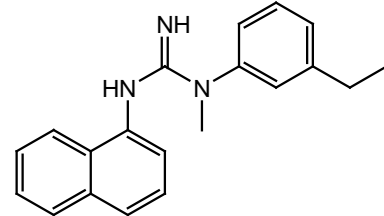
neue Kanalblocker



Rolipram



Atomoxetin



Aptiganel;
CNS 1102

Abbildung 13: Strukturen verschiedener Kanalblocker des NMDA-Rezeptors

1.2.4.5 Modulatoren an der N-terminalen Domäne

Neben den Modulatoren der Polyamin-Bindungsstelle sind weiterhin noch eine Reihe von Liganden mit Angriff an der N-terminalen Domäne (NTD) zu nennen, die ebenfalls zu einer Modulation des Rezeptorzustandes bzw. der Rezeptoraktivierung führen.

Der Einfluss von Protonen bewirkt eine Hemmung des Rezeptors, die unter physiologischen pH-Bedingungen von 7,4 eine große Rolle spielt und gleichzeitig auch als eine Art Schutzmechanismus angesehen werden kann, beispielsweise in ischämischen Zuständen, die mit pH-Werten unter 6,5 einhergehen⁽²⁾. Für den inhibitorischen Protoneneinfluss wird die NR1-1a-Untereinheit verantwortlich gemacht, die nicht über das zusätzliche Exon 5 verfügt, welches durch das Vorkommen mehrerer Histidinreste für die Aufhebung der pH-abhängigen Hemmung sorgt. Spleißvarianten der NR1-Untereinheit wie die NR1-1b-Untereinheit, die das entsprechende Exon aufweisen, werden folglich nicht durch die Anwesenheit von Protonen gehemmt. Auch Polyamine wie Spermin heben die pH-abhängige Inhibition auf⁽⁷⁸⁾.

Ifenprodil oder nanomolare Konzentrationen des zweiwertigen Kations Zink fördern dagegen die pH-Inhibition^{(79), (80)}.

Zink stellt also einen weiteren Modulator dar, dessen Bindungsstelle sich auf den GluN2A und mit mehr als 100fach geringerer Affinität auf den GluN2B-Untereinheiten befindet⁽⁸¹⁾. Basierend auf der Tatsache, dass Zn^{2+} -Ionen an einigen glutamatergen Synapsen vesikulär freigesetzt werden, ist zu vermuten, dass die Zn^{2+} -vermittelte, allosterische Hemmung physiologisch bedeutsam zu sein scheint.

Auch der Redoxzustand des NMDA-Rezeptors stellt einen entscheidenden Faktor seine Funktion betreffend dar. So lassen sich wenigstens zwei Redoxzustände unterscheiden: auf der einen Seite eine vollständig reduzierte Form mit hoher Aktivität und auf der anderen Seite eine vollständig oxidierte Form mit eher moderater Aktivität⁽⁸²⁾. Beobachtungen, dass sowohl oxidierende (DTNB = 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) als auch reduzierende (DTT = Dithiothreitol) Reagenzien in der Lage sind einen Effekt auszulösen, deuten aber darauf hin, dass der NMDA-Rezeptor in einem Gleichgewichtszustand zwischen vollständig reduzierter und oxidierte Form vorliegt. Durch die dabei vergleichsweise stärkere Beeinflussung durch das reduzierende Agens DTT liegt jedoch die Vermutung nahe, dass sich der native Zustand näher an der vollständig oxidierten Form befindet⁽⁸³⁾.

Endogene modulierende Strukturen weisen meist eine Thiol- oder Disulfid-Teilstruktur auf (Cystein, Homocystein, Glutathion⁽⁸⁴⁾, Liponsäure⁽⁸⁵⁾), aber auch Ascorbinsäure, Metallionen (Zn^{2+}) oder freie Radikale (NO) wirken regulierend auf den Rezeptor.

Es lässt sich feststellen, dass der NMDA-Rezeptor einige endogene Mechanismen aufweist, die ihn vor Überstimulation schützen sollen.

Aufgrund der zahlreichen vorhandenen Bindungsstellen und der teilweise unterschiedlichen Beeinflussung der verschiedenen Untereinheiten diverser Rezeptorzusammensetzungen gestaltet sich die Betrachtung der Neurotransmission über die NMDA-Rezeptoren als ausgesprochen vielschichtig. Eine Übersicht der komplexen Affinitätsbeeinflussungen verschiedener Bindungsstellen ist schematisch in Abbildung 14 gezeigt.

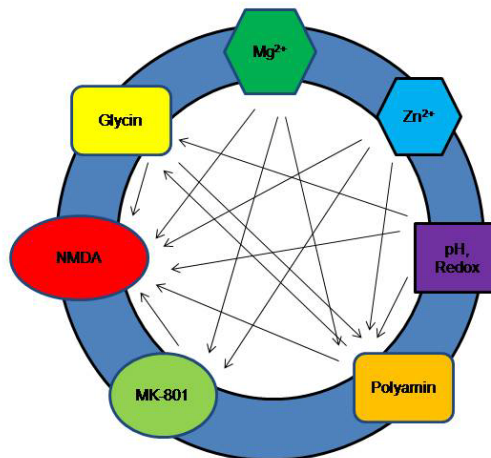


Abbildung 14: Affinitätsbeeinflussungen der Ligandenbindungsstellen des NMDA-Rezeptors modifiziert nach Stark *et al.*⁽¹⁾.

1.2.4.6 Inhibitoren der PSD-95/NMDA-Interaktion als neuer Therapieansatz

PSD-95 (Postsynaptic Density-95) stellt ein Mitglied der MAGUK-Proteinfamilie (Membrane-associated guanylate kinase) dar, welches wichtige Aufgaben im Bereich der Kopplung zwischen der extrazellulären Umgebung mit intrazellulären Signalwegen und des Zytoskeletts innehat⁽⁸⁶⁾. Das Protein ist aus drei Domänen aufgebaut, von denen eine die PDZ-Domäne (PSD-95/Discs large/Zona occludens-1) darstellt, welche in der Lage ist durch Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPI = protein-protein-interactions) mit anderen Proteinen zu interagieren. Diese modular aufgebaute Interaktionsdomäne bindet sequenzspezifisch an kurze Peptide innerhalb anderer Proteine, die sogenannten PDZ-Bindemotive, welche sich oftmals am C-terminalen Ende eines Proteins befinden. Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, gehören in der Regel zu den Gerüstproteinen, welche die Grundlage für die Organisation von größeren Proteinkomplexen an spezifische, subzelluläre Kompartimente bilden und dabei die direkte Interaktion der Proteine vermitteln.

PSD-95 weist drei PDZ-Domänen auf, wobei PDZ1 und PDZ2 mit dem NMDA-Rezeptor (NR2A und NR2B) interagieren^{(87), (88)}, sowie gleichzeitig auch mit Enzymen der intrazellulären Signalkaskaden wie der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS). Aus dem NMDA-Rezeptor-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle resultiert daher unter anderem die Aktivierung der nNOS, welche zur direkten Bildung von neurotoxischen NO führt.

Basierend auf diesen Feststellungen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der PSD-95/NMDA-Rezeptor-Interaktion zu einer Vorbeugung neurotoxischer Effekte - ausgelöst durch die nNOS - führt, während die physiologischen Funktionen des NMDA-Rezeptors erhalten bleiben⁽⁸⁹⁾.

Nach anfänglicher Suppression der PSD-95-Expression in corticalen Neuronen durch Verwendung entsprechender Antisense Oligonucleotide, wurde versucht PSD-95 von der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors zu entkoppeln. Durch ein Fusionspeptid, zusammengesetzt aus einem Nonapeptid, welches dem C-Terminus der NR2B-Untereinheit (NR2B9c) entspricht, und dem HIV-1 Tat-Peptid, welches in der Lage ist durch Zellmembranen sowie die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren (vgl. Abbildung 15), wurde dieses Vorhaben erreicht. Es

befindet sich gegenwärtig als potentieller Wirkstoff zur Behandlung der zerebrovaskulären Ischämie beispielsweise nach Schlaganfall in klinischen Entwicklungsstudien ⁽⁹⁰⁾.

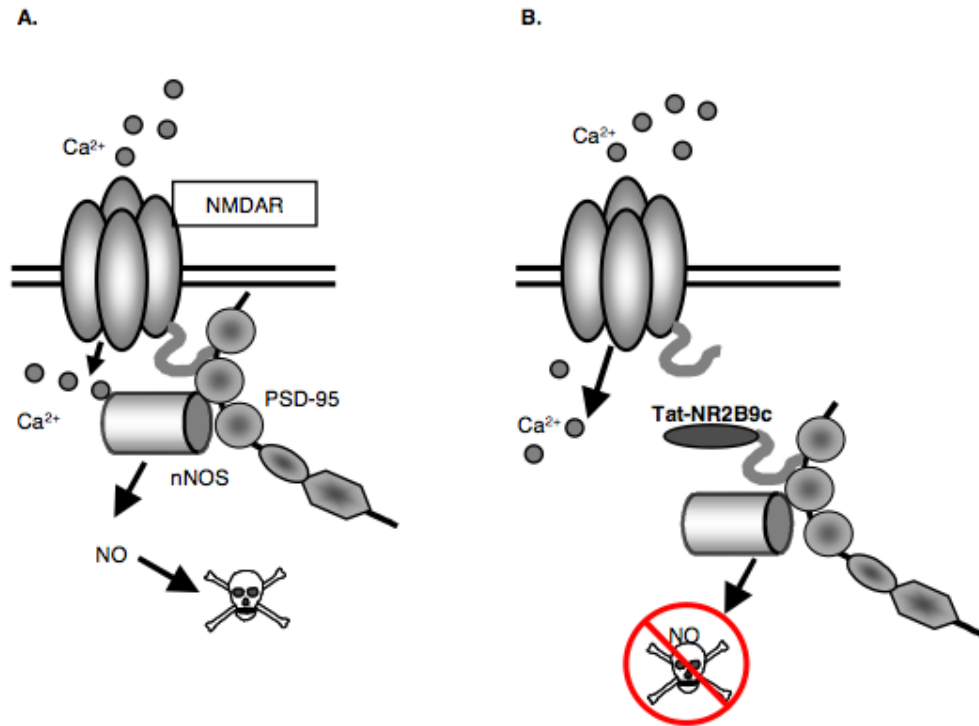


Abbildung 15: A: Kolokalisierung von NMDA-Rezeptoren und nNOS vermittelt durch das Gerüstprotein PSD-95; B: Inhibition des exzitotoxischen Signalweges von NMDAR durch Verwendung eines zellpermeablen NR2B-Peptids nach Aarts *et al.* ⁽⁹¹⁾

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist in der Blockade der direkten Interaktion der NR2B-Untereinheit mit DAPK-1 (death-associated protein kinase 1) zu sehen. Das Enzym aus der Familie der Serin/Threonin-Kinasen nimmt eine Schlüsselposition in der neuronalen zelltod-vermittelnden Signalkaskade ein und ist somit wesentlich an den exzitotoxischen und ischämischen Zellschäden nach NMDA-Rezeptor-Überaktivierung beteiligt ⁽⁹²⁾.

1.3 Potentielle therapeutische Indikationen von NMDA-Rezeptor-Antagonisten

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, die primär auf völlig unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sind, münden im weiteren Verlauf in einer gemeinsamen Endstrecke, der Exzitotoxizität wie sie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben ist.

Aufgrund der maßgeblichen Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an exzitotoxischen Prozessen liegt es nahe, Antagonisten dieses Rezeptors bei verschiedenen Formen neurodegenerativer Erkrankungen einzusetzen. Dabei sind folgende akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen, aber auch symptomatische Einsatzmöglichkeiten von Bedeutung.

1.3.1 Zerebrale Ischämie nach Schlaganfall

Nach der koronaren Herzkrankheit und malignen Tumoren stellen zerebrale Durchblutungsstörungen die dritthäufigste Todesursache in Industrieländern dar⁽⁹³⁾ und führen oft zu enormen sozialmedizinischen Konsequenzen. In ca. 90 % der Fälle liegen ihnen arteriosklerotische Veränderungen der betreffenden Gefäße zugrunde, die zu einem Verschluss der Blutgefäße führen und schließlich zu einer Sauerstoffarmut in den entsprechenden Hirnarealen. Durch die Hypoxie ausgelöst, kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von L-Glutamat, welches durch Überstimulation der NMDA-Rezeptoren einen exzessiven Ca^{2+} -Einstrom in die Neuronen bewirkt. Nach dem, in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen Mechanismus der Exzitotoxizität, kommt es zur Aktivierung einer Reihe von Signalkaskaden sowie zu einer mitochondrialen Schädigung, welche direkt mit einem Abfall der ATP-Spiegel und damit einem Energiemangel einhergeht⁽⁹⁴⁾.

In Abbildung 16 sind die pathologischen Mechanismen nach Schlaganfall vereinfacht dargestellt.

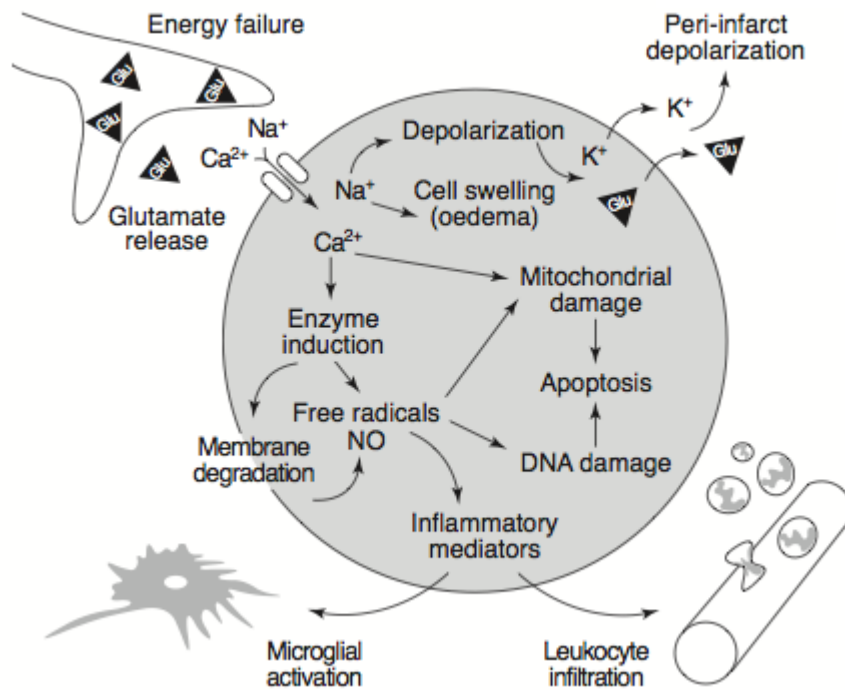


Abbildung 16: Vereinfachter Überblick der pathologischen Mechanismen im fokalen ischämischen Zustand des Gehirns nach Dirnagel *et al.*⁽⁹⁴⁾

Bei akuten neurodegenerativen Verlaufsformen ist der Therapiebeginn nach Infarkt ein entscheidendes Kriterium für den Behandlungserfolg und das therapeutische Fenster als sehr eng anzusehen. Insbesondere in der Penumbra, der Region um den nekrotischen Kern, können so neuroprotektive Effekte erzielt werden und der Zelluntergang noch deutlich eingeschränkt werden, wenn 2-6 Stunden nach Apoplex mit Neuroprotektoren therapiert wird. Nach 24 Stunden ist die Erfolgsaussicht bereits um ein Vielfaches geringer. Die Vorgänge im nekrotischen Kern dagegen bleiben irreversibel.

Wie in Abbildung 17 zu sehen, tritt direkt nach der akuten Ischämie weiterhin eine Periinfarkt-Depolarisation und Stunden später eine klassische Entzündungsreaktion im betroffenen Hirnareal auf⁽⁹⁴⁾, die weiterhin zum ischämisch bedingten Zellschaden beitragen. Einige NMDA-Rezeptor-Antagonisten sind in der Lage diese Depolarisation wenigstens in der Penumbra aufzuheben und erlangen dadurch ihr neuroprotektives Potential. Die post-ischämische Entzündungsreaktion stellt ein weiteres Target für ein therapeutisches Eingreifen in die pathologischen Vorgänge dar. So kann in die neutrophile Infiltration eingegriffen werden oder es

werden Enzyme, die wesentlich an der Produktion proinflammatorischer Mediatoren verantwortlich sind, gehemmt.

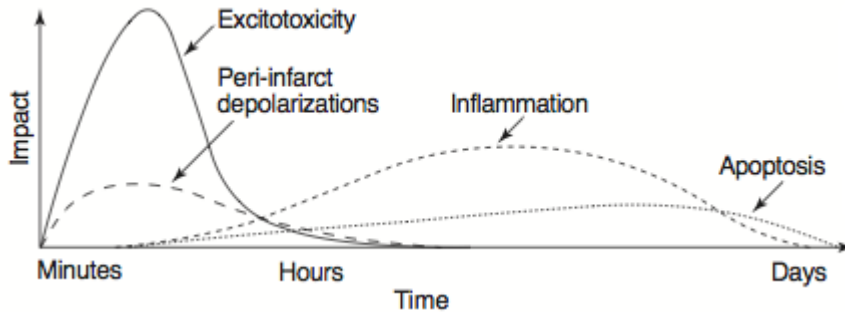


Abbildung 17: Mutmaßlicher Verlauf der schädigenden Ereignisse nach fokaler zerebraler Ischämie

Neben L-Glutamat-Rezeptor-Antagonisten befinden sich weiterhin verschiedenartige neuroprotektive Substanzklassen zur Therapie nach einem Schlaganfall in der Entwicklung, wobei eine Auswahl in Tabelle 1 gezeigt ist.

Tabelle 1: Auswahl von in der Entwicklung befindlichen Substanzklassen mit neuroprotektiven Eigenschaften

Substanzklasse	INN	Struktur
Antioxidantien bzw. Radikalfänger	Ebselen ⁽⁹⁵⁾ Edaravon ⁽⁹⁶⁾	
Caspase-Inhibitoren	Q-VD-OPH ⁽⁹⁷⁾	
β -Carboline	Abecarnil ⁽⁹⁸⁾	

Aber auch anderen Substanzen bzw. Substanzklassen werden neuroprotektive Effekte in Bezug auf ischämische Zustände nachgesagt. So befindet sich das Antimykotikum Clotrimazol ⁽⁹⁹⁾, der Calcium-Antagonist Nimodipin und auch Erythropoietin ⁽¹⁰⁰⁾ in Untersuchungen neuroprotektives Potential und Toleranz betreffend. Für Magnesiumsulfat wird derzeit eine große multizentrische Phase-III-Studie zur Wirksamkeit beim ischämischen Schlaganfall durchgeführt ⁽¹⁰¹⁾.

1.3.2 Epilepsie

Epileptische Aktivität ist durch eine gesteigerte Erregbarkeit einzelner Nervenzellen bzw. eine erhöhte Synchronisationsneigung des neuronalen Netzwerkes gekennzeichnet ⁽¹⁰²⁾. Das normalerweise fein ausbalancierte Wechselspiel aus Erregung und Hemmung ist durch ein Ungleichgewicht zwischen diesen Zuständen gestört, das sich in einer spontanen, übermäßigen und unkontrollierten elektrischen Aktivität einer Gruppe von Neuronen äußert und zu abnormen motorischen Reaktionen führt. Diese zeigen sich in Krämpfen, Zuckungen und Stereotypen mit und ohne Bewusstseinsverlust.

Generell zielen antikonvulsive Arzneistoffe darauf ab, die Erregbarkeit von Neuronenverbänden herabzusetzen. Dabei verfügen die meisten im klinischen Einsatz befindlichen Antikonvulsiva über mehr als einen Wirkmechanismus. Die wichtigsten pharmakologischen Angriffspunkte stellen dabei die Begrenzung repetitiver neuronaler Entladungen durch Blockade spannungsabhängiger Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle, die Verstärkung der GABA-vermittelten inhibitorischen Neurotransmission und eben die Hemmung der Glutamat-vermittelten exzitatorischen Neurotransmission dar. Dabei gehört die Entdeckung, dass man mit Glutamat-Antagonisten antikonvulsive Effekte erzielen kann, zu den erst spät aufgedeckten Mechanismen und für einige Standardantikonvulsiva wurde eine derartige Wirkung erst lange nach ihrer klinischen Zulassung identifiziert ⁽¹⁰³⁾.

So ist für Levetiracetam, Lamotrigin, Topiramat, Oxcarbazepin, Valproat und Zonisamid ein Einfluss auf das glutamaterge System nach verschiedenartigen Mechanismen nachweisbar ^{(104), (105)}. Felbamat besitzt dabei einen Glutamat-antagonistischen Effekt durch Blockade von NMDA-Rezeptoren.

Die Weiterentwicklung zum Fluorfelbamat durch Einführung eines Fluoratoms soll eine metabolische Stabilität bewirken und dadurch die Bildung biotoxischer Metabolite verhindern⁽¹⁰⁶⁾ (vgl. Abbildung 18).

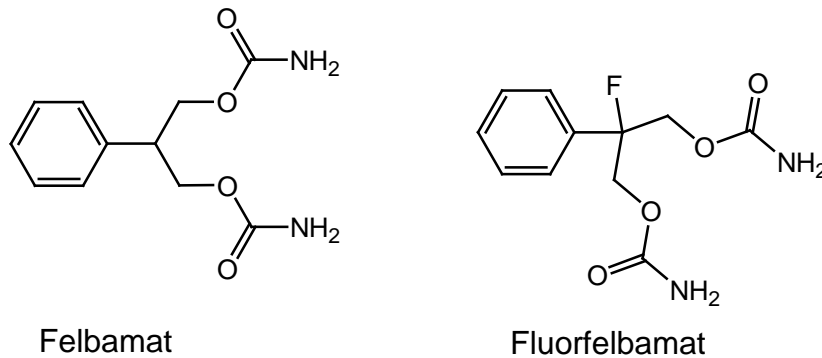


Abbildung 18: Strukturen von Felbamat und Fluorfelbamat

Als neuer, sehr gut verträglich geltender Wirkstoff befindet sich der AMPA-Rezeptor-Antagonist Talampanel⁽¹⁰⁷⁾ derzeit in Klinischen-Phase-II-Untersuchungen. AMPA-Rezeptoren kommt, wie im Vorfeld beschrieben (Abschnitt 1.2.2), eine Schlüsselposition in der Erregungsausbreitung und der Depolarisation mit anschließender Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu.

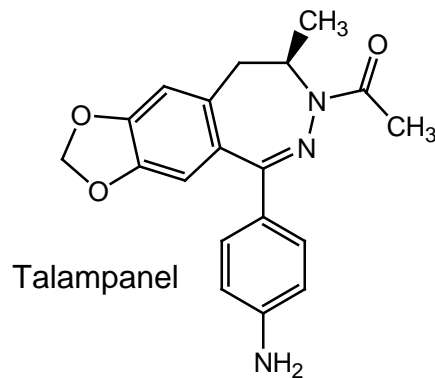


Abbildung 19: Struktur des AMPA-Rezeptor-Antagonisten Talampanel

1.3.3 Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit wird durch eine fortschreitende Degeneration der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (Mittelhirn) und dem damit einhergehenden Verlust des Neurotransmitters Dopamin im Striatum verursacht. Der Niedergang führt zu einem Ungleichgewicht insbesondere zwischen Dopamin, Acetylcholin und L-Glutamat in den Basalganglien, welche in der Kontrolle der Motorik eine wichtige Rolle einnehmen⁽¹⁰⁸⁾. Dieser Sachverhalt führt schließlich über einen komplexen Regelkreis zu den, für die Parkinson-Krankheit typischen, motorischen Störungen wie Verlangsamung der Bewegung, Zittern im Ruhezustand, Muskelsteifigkeit und instabile Körperhaltung. Daneben treten nicht selten auch kognitive Beeinträchtigungen und Depressionen sowie vegetative Störungen auf⁽¹⁰⁹⁾. Insbesondere die motorischen Störungen finden sich erst dann, wenn bereits 50 % der dopaminergen Neuronen degeneriert sind.

Durch die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten wird die Überaktivierung des glutamatergen Systems blockiert und der Zelluntergang überdies gehemmt⁽¹¹⁰⁾. Auch die übermäßige Aktivität der cholinergen Interneurone scheint inhibiert zu werden und somit das gestörte Gleichgewicht zwischen Dopamin und Acetylcholin verbessert⁽¹¹¹⁾. Dabei finden insbesondere die Open-Channel-Blocker Amantadin, Memantin⁽¹¹²⁾ und Budipin Verwendung (Abschnitt 1.2.4.4; S. 20), welche eine moderate, niedrig-affine, nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Blockade hervorrufen. Budipin zeigt weiterhin noch indirekte dopaminerge Effekte sowie schwache antimuskarinische Wirkung und hemmt die striatale GABA-Freisetzung.

Erste *in vitro*-Studien mit dem NR2B-Antagonist Ifenprodil zeigen eine effektive Reduktion der pathologischen Prozesse⁽¹¹³⁾ und belegen gleichzeitig den Einfluss der NMDA-Rezeptorzusammensetzung auf die Neuropathologie der Parkinson-Krankheit⁽¹¹⁴⁾.

1.3.4 Alzheimer Demenz

Bei der Alzheimer-Erkrankung handelt es sich um eine, im höheren Lebensalter auftretende, progrediente, neurodegenerative Erkrankung, die durch qualitative und quantitative Abnahme der Hirnleistung, mit Störungen des Gedächtnisses, des Lernens, des Antriebs, des Auffassungs- und Konzentrationsvermögens, der Orientierung und schließlich des sozialen Verhaltens gekennzeichnet ist. Histologisch werden Entzündungsprozesse ⁽¹¹⁵⁾, intrazelluläre Faserbündel die hyperphosphorylierte Neurofilamentproteine (Tau-Proteine) enthalten, sowie extra-zelluläre Plaques und Fibrillen (β -Amyloid) insbesondere im limbischen System und angrenzendem Cortex gefunden ⁽¹¹⁶⁾. Nachdem sich frühere Arbeiten ursächlich auf die Beteiligung des cholinergen Systems fokussierten, häufen sich mittlerweile die Hinweise für eine Dysfunktion des glutamatergen Systems in frühen Phasen der Alzheimer Demenz ⁽¹¹⁷⁾.

Durch die Biopsie der Gehirne verstorbener Alzheimerpatienten konnte gezeigt werden, dass glutamaterge Neuronen und senile Plaques kolokalisiert vorliegen. Anschließende *in vitro*-Studien führten zu der Erkenntnis, dass das enthaltene β -Amyloid die glutamatinduzierte Toxizität vermindert, sowie die NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotransmission durch Förderung der Endozytose der NMDAR herabsetzt ⁽¹¹⁸⁾. Überdies konnte eine veränderte Zusammensetzung der Rezeptoren in diesen Gehirnen nachgewiesen werden ^{(119), (120)}, die maßgeblich an der Prädisposition der Alzheimer Krankheit beteiligt zu sein scheint ⁽¹²¹⁾. Durch eine anhaltende Herabregulierung der NMDA-rezeptor-induzierten Transmission verspricht man sich daher eine Veränderung der pathologischen Prozesse sowie eine Neuroprotektion ⁽¹²²⁾. Derzeit besteht einzig für den Open-Channel-Blocker Memantin ein Einsatz als NMDA-Antagonist in der Therapie der Alzheimer Demenz ^{(123), (74)}.

1.3.5 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine degenerative, progressive Erkrankung der Neuronen des willkürlichen motorischen Systems, bei der sowohl

zentrale Neuronen mit ihren absteigenden Bahnen als auch spinale Motoneuronen zugrunde gehen. Die Krankheit führt innerhalb weniger Jahre zum Tod. Als klinische Symptome der Degeneration und Sklerotisierung der motorischen Bahnen sind spastische oder schlaffe Lähmungen der Skelettmuskulatur, Muskelatrophien und faszikuläre Zuckungen zu nennen, wobei die Patienten über volle kognitive und sensitive Funktionen verfügen.

Diskutiert wird eine genetische Prädisposition, die mit einer Mutation im Gen einer Kupfer-Zink-Superoxiddismutase einhergeht ⁽¹²⁴⁾. Der Verlust der neurotrophen Faktoren wird dabei von einer neuronalen Exzitotoxizität begleitet ⁽¹²⁵⁾, welche durch die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten unterbunden werden soll. Nachdem klinische Studien mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonist Dextrometorphan keinen erkennbaren Nutzen in der Therapie der ALS zeigten ⁽¹²⁶⁾, befindet sich derzeit Riluzol als erster zugelassener Arzneistoff zur Behandlung der ALS auf dem Markt ⁽¹²⁷⁾.

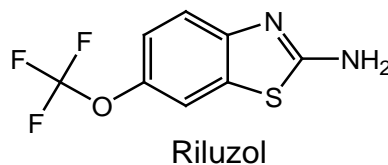


Abbildung 20: Stuktur von Riluzol

Aber auch Talampanel (vgl. Abschnitt 1.3.2) zeigt derzeit in Phase-II-Studien eine gute Wirksamkeit und scheint eine vielversprechende neue Therapieoption in der Behandlung der ALS zu sein ⁽¹²⁸⁾.

NMDA-Rezeptoren sind überdies in einer Reihe weiterer chronischer und entzündlicher neurodegenerativer Erkrankungen impliziert wie etwa der Chorea Huntington ⁽¹²⁹⁾, ⁽¹³⁰⁾, der AIDS-Demenz ⁽¹³¹⁾ oder auch des Systemischen Lupus Erythematoses ⁽¹³²⁾.

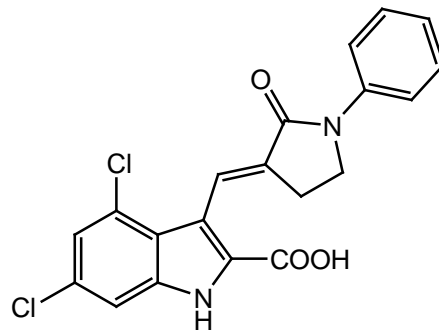
1.3.6 Neuropathischer Schmerz

Es wird angenommen, dass plastische Veränderungen bei der anregenden synaptischen Transmission zwischen bestimmten Zellen der Entzündungsübertragung (C-Fasern) und den Schmerzfasern (dorsale Nozizeptoren) im Hippocampus zu einer Speicherung der Schmerzerinnerung führen. Diese kann leicht wieder abgerufen werden und führt zu einem neuropathischen Schmerz, der sich rasch steigert. NMDA-Rezeptoren nehmen dabei - aufgrund ihrer Beteiligung an den Mechanismen der synaptischen Plastizität - eine Schlüsselrolle in der Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses ein ⁽¹³³⁾. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die NMDA-Rezeptor-Aktivierung die Bildung von Peroxynitrit - einem wichtigen Mediator der nozizeptiven Übertragung - fördert und dadurch an der zentralen Sensitivierung durch Nitrierung der Glutamat-Transporter (GTL-1) und der Glutamin-Synthase (GS) maßgeblich beteiligt ist ⁽¹³⁴⁾.

Durch NMDA-Rezeptorantagonisten wird sich folgedessen versprochen die aufschaukelnde Schmerzconditionierung zu unterbrechen, ohne die ungünstigen Effekte anderer Analgetika wie Sedierung, Amnesie oder Toleranzentwicklung herbeizuführen ⁽¹³⁵⁾. Gleichzeitig bleibt das Empfinden von akutem Schmerz unbeeinflusst ⁽¹³⁶⁾.

Mit Ketamin konnten signifikante schmerzlindernde Effekte festgestellt werden, während die Datenlage für Amantadin und Memantin noch gering ist. Dextrometorphan hingegen zeigt insbesondere bei neuropathischen Schmerzen nach Rückenmarksischämie und bei diabetischer Neuropathie eine gute Wirksamkeit ⁽¹³³⁾.

Aktuell werden vor allem für Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors antihyperalgetische Effekte gezeigt, wobei in ersten Studien zwar *in vitro*-Wirksamkeiten festgestellt werden konnten, die orale Bioverfügbarkeit allerdings als sehr gering zu bezeichnen ist ^{(137), (138)}. Als eine der möglichen Ursachen wird dabei der Efflux-Transporter BCRP (breast cancer resistance protein) angeführt. In *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der NMDA-Rezeptor-Glycin-Antagonist GV196771 (vgl. Abbildung 21) ein Substrat des BCRP darstellt ^{(135), (139)}.



GV196771

Abbildung 21: Struktur des NMDA-Rezeptor-Glycin-Antagonist GV197661

Hohe Erwartungen werden weiterhin an NR2B-selektive Antagonisten für die Therapie des neuropathischen Schmerzes gestellt ⁽¹⁴⁰⁾.

Generell ist bei der Therapie mit NMDA-Rezeptorantagonisten häufig mit unerwünschten Wirkungen, insbesondere der Entwicklung von Psychosen mit schizophrenen Zuständen sowie Depressionen zu rechnen.

Auf der anderen Seite wurde bei Patienten mit chronischer Schizophrenie eine leichte Besserung der Negativsymptomatik unter Behandlung mit modulato-
rischen NMDA-Rezeptor-Agonisten wie Glycin oder D-Cycloserin ⁽¹⁴¹⁾ beobachtet ⁽¹⁴²⁾. Zahlreichen Untersuchungen zufolge ist eine Unterfunktion von NMDA-Rezeptoren daher ein wesentliches Merkmal von Erkrankungen, die kognitive Leistungen und Wahrnehmungsprozesse beeinflussen. Auch eine Erhöhung der Rezeptor-Aktivität durch Agonisten ist somit zur Behandlung im Rahmen dieser Erkrankungen von Bedeutung.

2 Zielsetzung

Neben der Beteiligung an den wichtigen physiologischen Prozessen der synaptischen Plastizität, welche mit kognitiven Funktionen und Gedächtnisleistung in Verbindung gebracht werden, sind NMDA-Rezeptoren - vor allem aufgrund ihrer hohen Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen - maßgeblich in neurotoxische Prozesse involviert.

Vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie zerebraler Ischämie nach Schlaganfall, Epilepsie, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, amyotropher Lateralsklerose, Chorea Huntington und AIDS-Demenz, wird dabei eine Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren zugrunde gelegt. Ferner sind sie an den Mechanismen der neuropathischen Schmerzentstehung beteiligt.

Durch das Eingreifen in die Glutamat-vermittelten pathologischen Prozesse verspricht man sich daher die Möglichkeit einer Neuroprotektion bei der Therapie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, die primär auf völlig unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sind.

Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors bieten dabei den möglichen Vorteil ein günstigeres Nebenwirkungspotential zu besitzen als Antagonisten anderer Bindungsstellen des Rezeptors^{(143), (59)}.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in vorausgegangenen Arbeiten im Arbeitskreis⁽¹⁴⁵⁾ Verbindungen mit Indol-Grundstruktur und verschiedenen strukturellen Modifikationen entwickelt. In ersten Charakterisierungen zeigten sich dabei hochaffine Liganden an der Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors mit IC_{50} -Werten im mittleren nanomolaren Bereich. Als eine der potentesten Verbindungen stellte sich das, in Abbildung 22 aufgeführte, Phenylhydantoin-substituierte 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Derivat MDJ-118 (CED-9) heraus, welches im Rahmen dieser Arbeit als Leitstruktur fungiert.

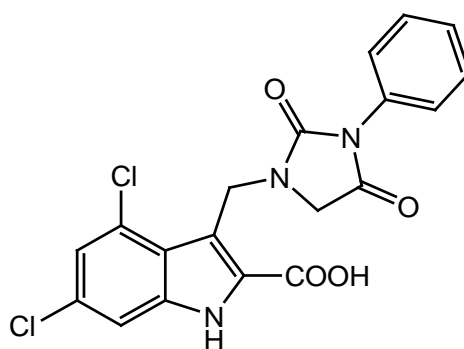


Abbildung 22: Struktur der Leitstruktur MJD-118 (CED-9)

Aufbauend auf den im Vorfeld von Jansen entwickelten Forschungsergebnissen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

- Strukturelle Derivatisierung der Leitstruktur MJD-118, wobei das Pharmakophormodell von Leeson *et al.* (Abschnitt 1.2.4.2) zugrunde gelegt wird
- Untersuchung des Einflusses der strukturellen Modifikationen auf die Affinität zur Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors. Hierfür wird ein Verdrängungsassay mit einem Radioliganden herangezogen, der auf schnellem Weg bereits parallel zur Durchführung der Synthesen zu aussagekräftigen Ergebnissen führt, wodurch eine gezielte Optimierung der Derivatisierungen erreicht werden soll. Weiterhin soll dadurch die Selektivität und Potenz der Liganden abgeschätzt werden
- Bestimmung des Zytotoxizitätsprofils ausgewählter synthetisierter Strukturen
- Abschätzung der Bioverfügbarkeit ausgewählter Testverbindungen, insbesondere der Permeationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke, durch Bestimmung der log P-Werte

Zusammenfassend sollen Struktur-Wirkungs-Beziehungen erarbeitet werden sowie eine pharmakologische, toxikologische und physikochemische Charakterisierung der synthetisierten Strukturen erfolgen.

Ergänzend sollen durch Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Rösch ähnliche [¹⁸F]-markierte Substanzen mit Hilfe des PET in Bezug auf die Fähigkeit der Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke charakterisiert werden.

3 Chemischer Teil

3.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Leitstruktur

Im Rahmen der im Vorfeld durchgeführten Dissertationsarbeit von Jansen ⁽¹⁴⁵⁾ wurde gezeigt, dass es sich bei Hydantoin-substituierten 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Derivaten um hochpotente Verbindungen mit Affinitäten zur Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors im mittleren nanomolaren Bereich handelt. Aus den daraus erzielten Forschungsergebnissen resultierte ein Pharmakophor-Modell, welches in Abbildung 23 veranschaulicht ist.

Dabei konnten folgende pharmakophore Deskriptoren für die Interaktion zwischen Rezeptorprotein und Ligand als bedeutsam herausgestellt werden:

- sterisch limitierte, ionische Wechselwirkungen der - unter physiologischen Bedingungen - deprotonierten Carboxylfunktion mit einer positiven Ladung des Rezeptorproteins
- unsubstituierte Indol-NH-Funktion, um mit einem Wasserstoffbrücken-Akzeptor des Proteins in Wechselwirkung zu treten
- lipophile, größenbegrenzte Substituenten mit -I- bzw. -M-Effekt insbesondere in Position 4 und 6 des Indolgrundgerüsts
- Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion in Position 3 des Indols, um mit H-Brücken-Donor des Rezeptors zu interagieren
- eine verhältnismäßig große, lipophile Tasche („bulk tolerance“ Region) des Rezeptors erlaubt einen lipophilen, raumfüllenden Rest im nord-östlichen Teil des Liganden

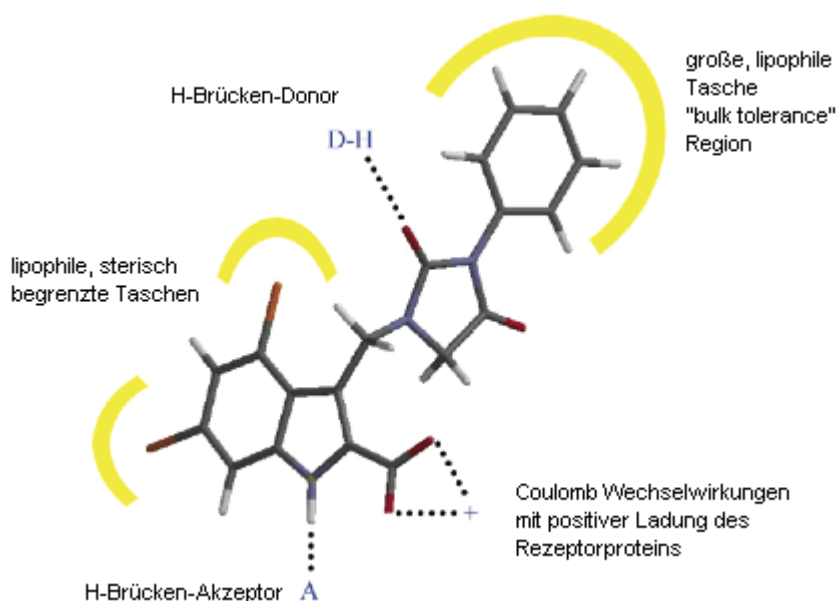


Abbildung 23: Pharmacophor Modell von MJD-118 (CED-9) und seine Interaktionen mit dem Rezeptorprotein⁽¹⁴⁶⁾ basierend auf dem Pharmacophor Modell nach Leeson *et al.*⁽⁵²⁾

Als essentiell anzusehen sind dabei die Carboxylgruppe, sowie die freie NH-Funktion des Indols. Formal betrachtet stellen diese beiden Strukturmerkmale eine Glycin-Teilstruktur dar (vgl. Abbildung 24), wobei die Carboxylfunktion auch durch andere saure Struktureinheiten ersetzt werden kann⁽¹⁴⁷⁾.

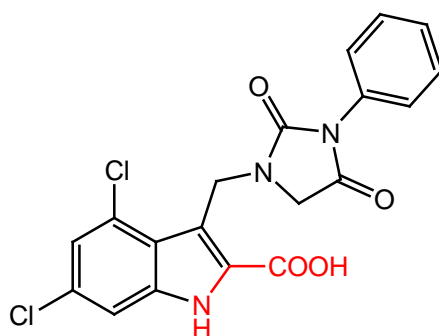


Abbildung 24: Leitstruktur MJD-118 (CED-9); in rot dargestellt ist die in das Molekül integrierte Glycin-Teilstruktur

Auf diesen Ergebnissen basierend sollen im Verlauf der vorliegenden Arbeit strukturelle Modifikationen der Leitstruktur erarbeitet werden, mit dem Ziel eine gleichbleibend hohe bzw. verbesserte Affinität an der entsprechenden

Bindungsstelle des Rezeptorproteins sowie verbesserte physikochemische Parameter zu erhalten.

In Abbildung 25 ist eine Übersicht der durchzuführenden strukturellen Modifikationen dargestellt.

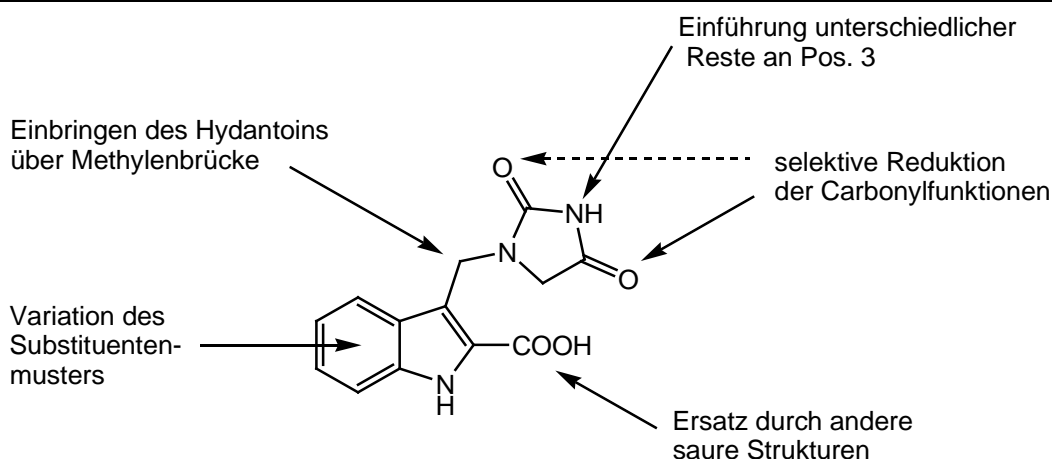


Abbildung 25: Übersicht über die im Rahmen der Dissertationsarbeit vorzunehmenden strukturellen Modifikationen der Leitstruktur

Die Synthesestrategie umfasst dabei folgende Abschnitte:

- Variation des Substituentenmusters durch Einführung verschiedener Substituenten an unterschiedlichen Positionen des Indolgrundgerüsts
- Einführung unterschiedlicher Reste an Position 3 des Hydantoin um die Ausmaße der „bulk tolerance“-Region zu untersuchen
- selektive Reduktionen zum Alkohol bzw. zum Alkan der Carbonylfunktionen des Hydantoin um die Auswirkungen der Wasserstoff-Brücken-Akzeptor- und -Donor-Funktionen zu untersuchen
- Einbringen eines Hydantoin bzw. Succinimids über eine semicyclische C=C-Bindung um ein verändertes Wasserstoff-Brücken-Akzeptor und -Donor-Muster zu erhalten, sowie eine eingeschränkte Drehbarkeit des Molekülrestes (Reduzierung der „rotatable bonds“)
- Ersatz der Carboxylgruppe an Position 2 des Indols durch andere saure Substituenten um verbesserte physikochemische Parameter zur Permeationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke zu erhalten

Außerdem soll ein Hybridmolekül aus dem 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Grundgerüst und Valproinsäure synthetisiert werden, welches zu einem dual-affinen Liganden führen soll (siehe Abschnitt 3.6; S. 85).

Im Folgenden wird zuerst detailliert auf die Synthese des Indolgrundkörpers eingegangen, worauf sich Erläuterungen der Synthesestrategien der verschiedenen Molekülmodifikationen betreffen. Zum Teil werden mechanistische Aspekte der angewendeten Reaktionen erläutert, sowie Besonderheiten in der NMR- und IR-spektroskopischen Analytik.

3.2 Synthese des Indolgrundkörpers

3.2.1 Überblick

Der für die Synthese der angestrebten Zielstrukturen erforderliche Indolgrundkörper wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einer 4 Stufen umfassenden Synthese dargestellt (vgl. Abbildung 26).

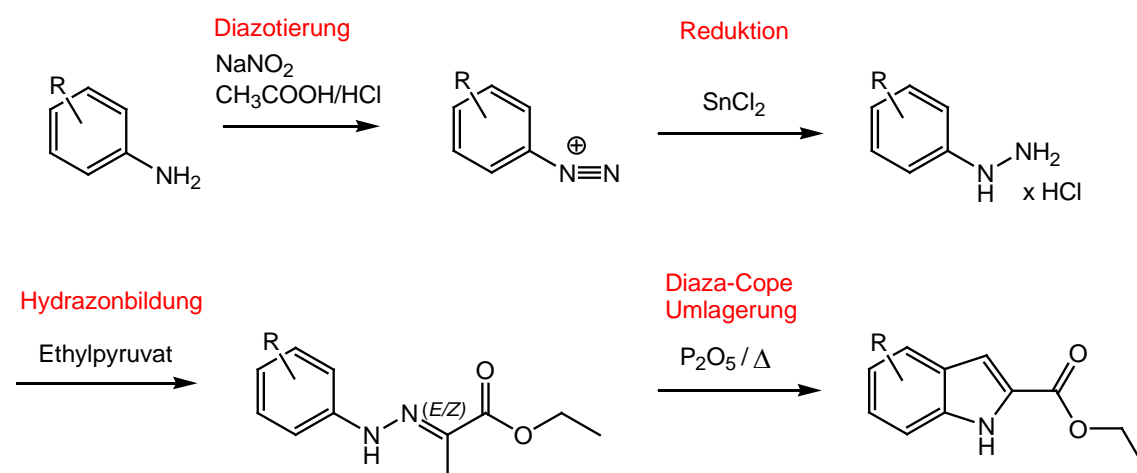
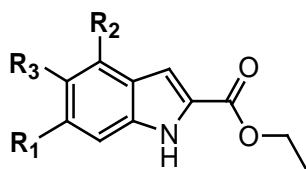


Abbildung 26: Allgemeiner Überblick zur Synthese des Indolgrundkörpers; das mit R angegebene Substituentenmuster zeigt Tabelle 2

Um eine mögliche Änderung der Affinität an der Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptorproteins durch Variation des Substituentenmusters am Indol-Grundgerüst zu untersuchen, werden Edukte mit den entsprechenden Substituenten zum Aufbau des Indols verwendet. In diesem Zusammenhang wurde in früheren Arbeiten bereits gezeigt, dass eine 4,6-Dichlor-Substitution zu einer enormen Affinitätszunahme im Gegensatz zu keiner bzw. einer 5-*tert*-Butyl-Substitution des Indolgrundkörpers führt⁽¹⁴⁵⁾.

Die Reihe der Substituenten soll durch die in Tabelle 2 gezeigten Strukturen erweitert werden. Die 4,6-Dichlor-Substitution der Leitstruktur wird als eine der strukturellen Modifikationen beibehalten.

Tabelle 2: Variation des Substituentenmusters am Indolgrundgerüst



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
CED-3	-Cl	-Cl	-H
CED-16	-F	-F	-H
CED-21	-Cl	-H	-H
CED-26	-F	-H	-H
CED-31	-H	-H	-OCH ₃

3.2.2 Diazotierung und Reduktion

Im ersten Schritt erfolgt in saurer Lösung durch Einwirken der mit Natriumnitrit entstehenden elektrophilen Nitrosierungsagenzien, die Diazotierung der entsprechenden Anilin-Derivate. Durch anschließende Reduktion des entstehenden Diazoniumsalzes mit Zinn(II)-chlorid lassen sich die substituierten Phenylhydrazine erhalten, welche aufgrund der erhöhten Nucleophilie im Vergleich zum Anilin-Derivat, leicht mit Brenztraubensäureethylester zum Hydrazone umgesetzt werden können.

Dabei wird das primäre aromatische Amin in saurer Lösung mit Natriumnitrit versetzt, wobei als Überträger des Nitrosyl-Ions NO^+ nicht die zu vermutende salpetrige Säure, sondern je nach eingesetzter Mineralsäure verschiedene Agenzien wirksam werden. In diesem Fall findet eine Mischung aus Salzsäure und Essigsäure Verwendung, weshalb man von Nitrosylchlorid als nitrosierende Spezies ausgehen kann ⁽¹⁴⁸⁾.

Da aromatische Amine vergleichsweise schwache Basen sind, liegt unter den gegebenen Reaktionsbedingungen neben der protonierten Form auch ein geringer Anteil an unprotoniertem Amin vor, welches mit dem nitrosierenden Agens reagiert ⁽¹⁴⁹⁾.

Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt entsteht dabei primär ein Nitrosamin, welches rasch über das tautomere Diazohydroxid säurekatalytisch zum Diazoniumsalz dehydratisiert (vgl. Abbildung 27).

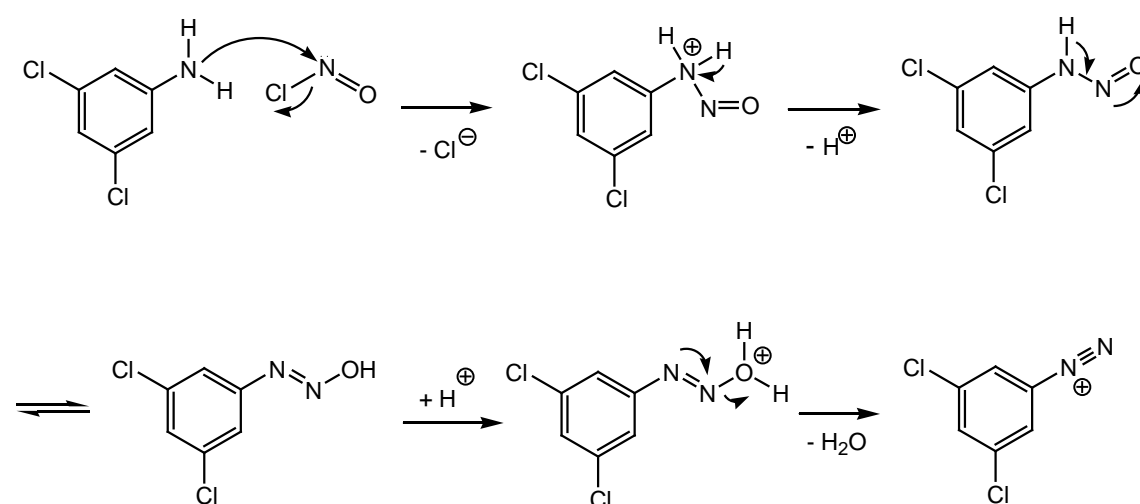


Abbildung 27: Entstehung des Diazoniumsalzes unter salzsauren Bedingungen

Die so entstandenen Diazoniumsalze sind bei Temperaturen unter $0\text{ }^\circ\text{C}$ stabil, werden aber - um Folgereaktionen zu vermeiden - ohne weitere Aufarbeitung direkt mit Zinn(II)-chlorid in konzentrierter Salzsäure zum Phenylhydrazin reduziert (vgl. Abbildung 28). Dabei muss weiterhin darauf geachtet werden, die niedrige Temperatur beizubehalten. Da im Rahmen der Aufarbeitung das Hydrazin aus Ether mit Hilfe von ethanolischer HCl ausgefällt wird, werden die gewünschten Produkte als Hydrochloride erhalten.

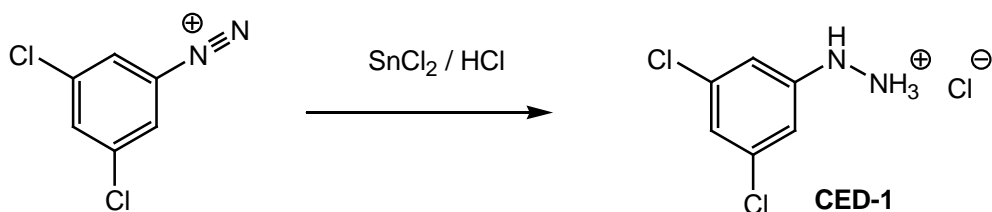


Abbildung 28: Reduktion des Diazoniumsalzes zum Phenylhydrazin-HCl mit Zinn(II)-chlorid

Aufgrund der begrenzten Stabilität der Diazoniumsalze, der arbeits- und zeitaufwendigen Herstellung, sowie der sehr schlechten Ausbeute von unter 10 % der Theorie, werden die substituierten Phenylhydrazin-Hydrochloride im weiteren Verlauf der Arbeit kommerziell erworben.

3.2.3 Hydrazonbildung

Um die für die Indol-Synthese benötigten Hydrazone bereitstellen zu können, werden die erhaltenen Hydrazine mit Brenztraubensäureethylester versetzt. Dabei erweisen sich saure Bedingungen als hilfreich, die schon durch das Vorliegen der Hydrazine als Hydrochloride gegeben sind. Um die Dehydratisierung des Zwischenproduktes, als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt weiterhin zu beschleunigen, ist auch die Zugabe von Schwefelsäure als Katalysator sinnvoll. Die Bildung ist am Beispiel von CED-2 in Abbildung 29 dargestellt.

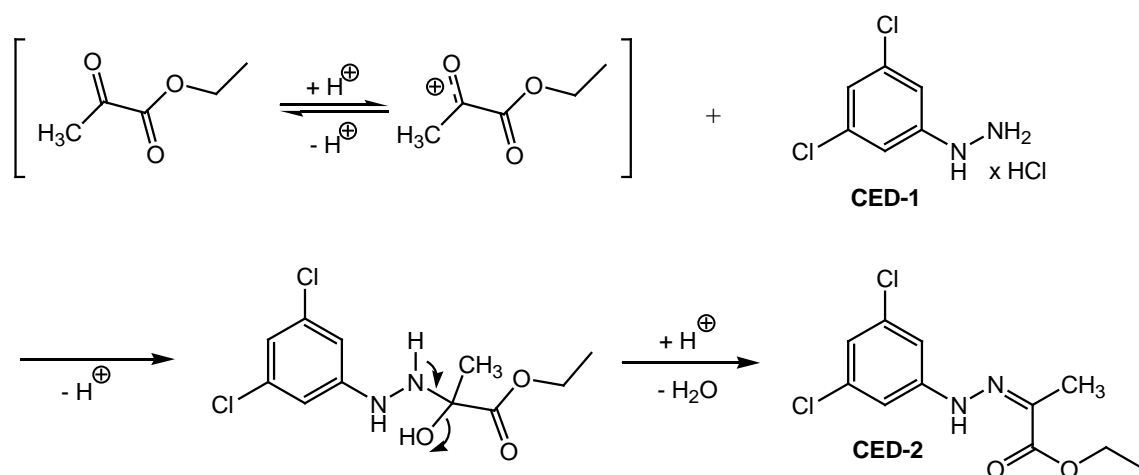


Abbildung 29: Bildung des Phenylhydrazons CED-2

Durch den Einsatz von Brenztraubensäureethylester als unsymmetrisches Keton werden zwei verschiedene π -Diastereomere erhalten, die durch die unterschiedliche Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Dadurch ist eine leichte säulenchromatographische Trennung möglich, wodurch sie anschließend eindeutig durch NMR- sowie IR-Experimente oder dem Schmelzpunkt voneinander unterschieden werden können. Aufgrund der durch die C=N-Bindung verursachten fixierten Geometrie ist auch bei Hydrazonen eine Einteilung in *E/Z*-Isomere nach Cahn-Ingold-Prelog (CIP) möglich⁽¹⁵⁰⁾, wobei das freie Elektronenpaar am Stickstoff nach CIP als Substituent mit niedrigster Priorität betrachtet wird. Durch die synperiplanare Anordnung der konjugierten Doppelbindung der Ester-Carbonylfunktion zur C=N-Bindung ergibt sich bei beiden Isomeren eine *s-cis*-Konformation.

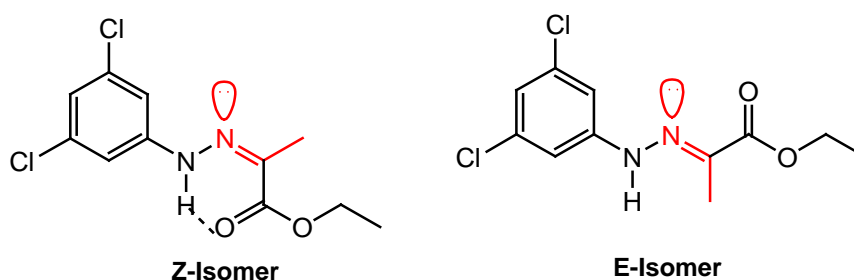


Abbildung 30: Unterschiedliche π -Diastereomere am Beispiel von CED-2

Im zum strukturellen Nachweis aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigen die beiden Isomere eine unterschiedliche Lage der NH-Protonen (vgl. Abbildung 31 und 32). Um die jeweilige Konfiguration des Isomers eindeutig zu klären, wird jeweils ein $^1\text{H-NOE}$ -Experiment durchgeführt. Dieses Verfahren, bei dem der Kern-Overhauser-Effekt (NOE) ausgenutzt wird, kann zur Untersuchung des Abstands zweier Protonen im Molekül herangezogen werden. Befinden sie sich in räumlicher Nähe ($< 3 \text{ \AA}$) zueinander, so wird bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz in den einen Kern dessen Energie auf den benachbarten Kern übertragen und somit die relative Intensität seines Signals erhöht. Dabei ist der Effekt umso größer, je kleiner der direkte, räumliche Abstand zweier Kerne im Molekül ist. Durch Subtraktion des ^1H -Spektrums vom Doppelresonanzspektrum erhält man

Chemischer Teil

nur dort Signale, wo zwischen den beiden Spektren mit und ohne NOE Intensitätsunterschiede vorhanden sind. An der Stelle der eingestrahlten Frequenz erscheint ein Signal mit negativer Amplitude ⁽¹⁵¹⁾.

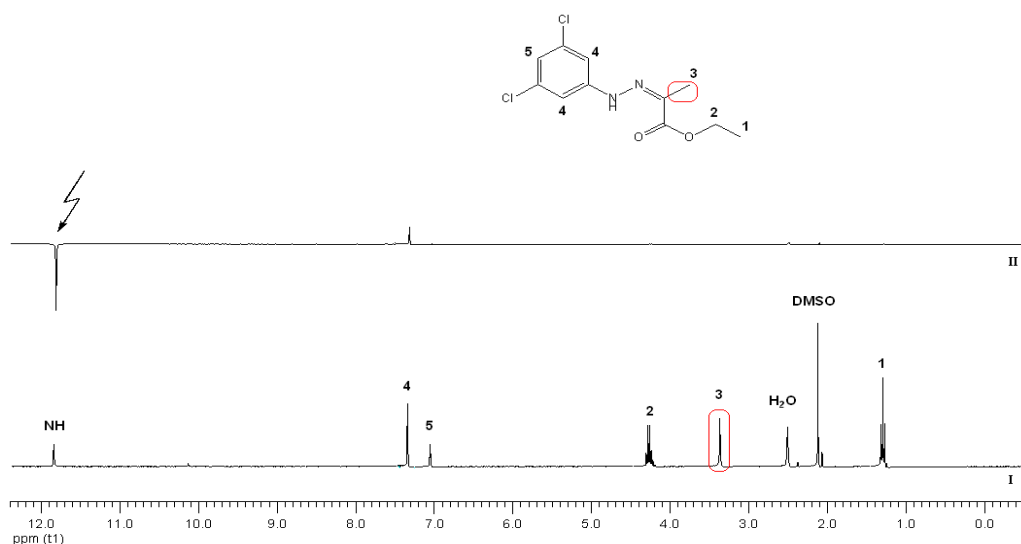


Abbildung 31: ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung des *Z*-Isomers von CED-2 (DMSO-d₆)
(I): ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz)
(II): ¹H-NOE-Differenzspektrum (8334,93 Hz eingestrahlt)

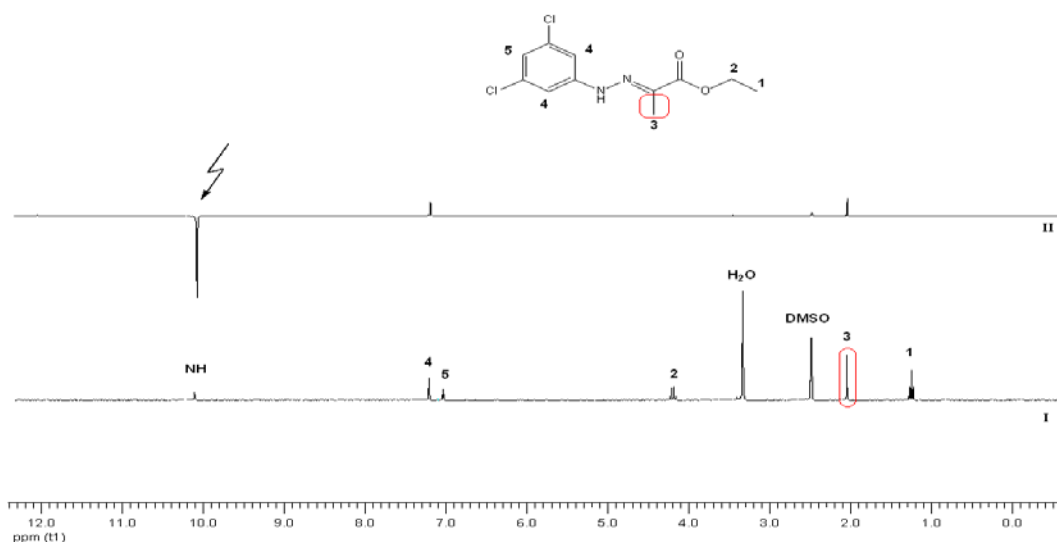


Abbildung 32: ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung des *E*-Isomers von CED-2 (DMSO-d₆)
(I): ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz)
(II): ¹H-NOE-Differenzspektrum (7824,23 Hz eingestrahlt)

Durch Einstrahlen der jeweiligen Resonanzfrequenz in den Kern des NH-Protons beider Diastereomere wird deutlich, dass nur bei einem Isomer eine räumliche Nähe zur Methylgruppe (2,05 ppm) besteht (vgl. Abbildung 32) und es sich demnach um das *E*-Isomer handeln muss. Bei beiden Isomeren lässt sich außerdem die Nachbarschaft zu den ortho-ständigen aromatischen Protonen zeigen, welche bei 7,21 bzw. 7,32 ppm in Resonanz treten.

Das NH-Proton des *Z*-Isomers weist folglich eine deutliche Tieffeldverschiebung auf und erscheint bei 11,81 ppm, wohingegen das NH-Proton des *E*-Isomers bei 10,11 ppm gefunden wird.

Dieser Unterschied lässt sich durch die Ausbildung der intramolekularen Wasserstoffbrücke des *Z*-Isomers erklären (vgl. Abbildung 30) und ebenso eindeutig durch IR-Untersuchungen belegen. Hier zeigt das *Z*-Isomer eine bathochrome Verschiebung der N-H-, sowie der C=O Valenzschwingungen von 3653 cm^{-1} und 1659 cm^{-1} im Gegensatz zu dem *E*-Isomer, bei dem energiereichere IR-Strahlung zur Anregung der entsprechenden Valenzschwingungen benötigt wird, was sich im Spektrum als Signal bei geringfügig höheren Wellenzahlen von 3657 cm^{-1} und 1677 cm^{-1} zeigt.

Weiterhin ist der Schmelzpunkt des *Z*-Isomers deutlich erniedrigt und befindet sich bei 60 °C , während der des Diastereomers bei 130 °C liegt. Auch dieser Sachverhalt lässt sich auf die unterschiedliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken zurückführen. Im festen Zustand liegt das *E*-Isomer als Dimer vor, welches durch 2 Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Im *Z*-Isomer dagegen ist durch die intramolekulare Ausbildung der H-Brücke folglich nur eine Valenz vorhanden, die den Schmelzpunkt mit beeinflusst. Zusätzlich dazu ist das *trans*-isomere Molekül symmetrischer gebaut.

3.2.4 Indolsynthese

Die erhaltenen Phenylhydrazone werden in einer protonenkatalysierten Indolsynthese nach *Fischer* in die entsprechenden Indole überführt. Abbildung 33 verdeutlicht den Reaktionsmechanismus am Beispiel von CED-3.

Als Protonensäure wird Polyphosphorsäure eingesetzt, die hier gleichzeitig auch als Lösungsmittel dient. Dabei werden die Hydrazone vorsichtig in der zähflüssigen Säure erhitzt, wobei es zunächst zu einer reversiblen Umlagerung zu einem En-Hydrazin kommt. Anschließend erfolgt in einer [3,3]-sigmatropen Umlagerung (Diaza-Cope-Umlagerung) die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung unter Aufhebung des aromatischen Systems. Danach kommt es durch einen Protonentransfer vom Kohlenstoff zum Stickstoff zu einer Rearomatisierung, woraufhin ein aromatisches Amin entsteht, welches umgehend am Imin angreift und ein Aminoal bildet. Weiterhin säurekatalysiert erfolgt die Spaltung des Aminoals worauf sich unter Eliminierung von Ammoniak schließlich die Bildung des Indols anschließt.

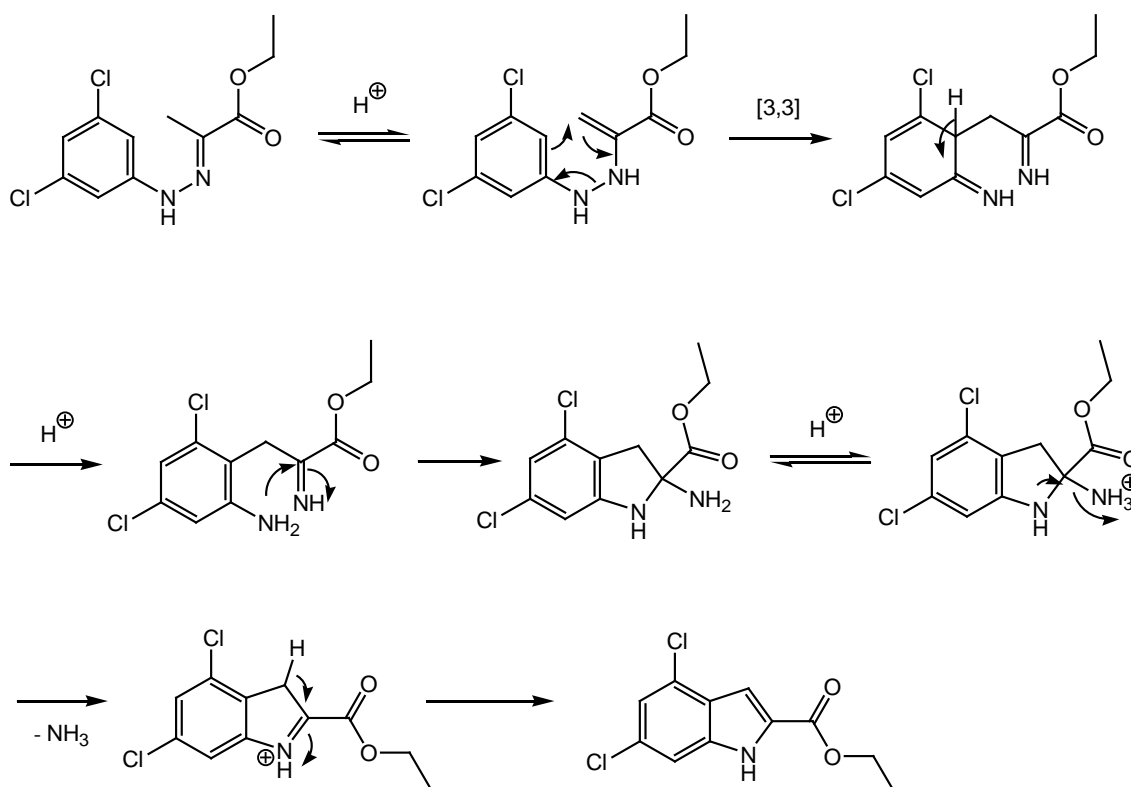


Abbildung 33: Reaktionsmechanismus der protonenkatalysierten Fischer Indol-Synthese am Beispiel von CED-3

Während der Reaktionsführung muss darauf geachtet werden nach Einsetzen der exothermen Reaktion bei ca. 100 °C einen unkontrollierten Anstieg der Temperatur zu verhindern, indem vorübergehend im Eisbad gekühlt wird. Um die Reaktion dabei trotzdem möglichst quantitativ ablaufen zu lassen wird weiterhin für

ungefähr 10 Minuten auf ca. 120 °C erhitzt, was aber sofort abgebrochen werden muss, sobald der Reaktionsansatz seine Farbe ändert und von beige zu dunkelbraun übergeht. Besonders die Fluorderivate CED-16 und CED-26 bilden dabei viele Nebenprodukte, wobei aber auch durch den Einsatz anderer Katalysatoren wie Schwefelsäure oder Zinkchlorid keine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen erreicht werden konnte.

Um die Regioselektivität der monosubstituierten Indolderivate CED-21 und CED-26 (vgl. Tabelle 2; S. 42) eindeutig zu beweisen, wird ein ¹H-NOE-Differenzspektrum aufgenommen. In früheren Untersuchungen von Ockenden *et al.* ⁽¹⁵²⁾ konnte gezeigt werden, dass wenn es sich bei der meta-Substitution eines Arylhydrazons um ein Cl-Atom handelt unter verschiedenen Bedingungen der Fischercyclisierung ausschließlich das 6-Chlorindol entsteht. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte des Cl-Atoms - der elektronenziehenden Eigenschaft durch eine hohe Elektrophilie einerseits, und der Elektronen-Donor-Eigenschaft durch Konjugation der freien Elektronenpaare mit dem konjugierten aromatischen Elektronensystem andererseits - ist ein „para-dirigierender“ Effekt gegeben, der zu der bevorzugten Bildung des an Position 6 substituierten Produktes führt.

Durch Einstrahlen der entsprechenden Resonanzfrequenz in den Kern des 3H-Prottons von CED-21 wird die unmittelbare Nachbarschaft eines Prottons bei 7,1 ppm bestätigt, wodurch der Beweis des Vorliegens eines an Position 4 unsubstituierten Indols erbracht wird, und es sich folglich, um das vermutete 6-Chlorindol handeln muss (vgl. Abbildung 34).

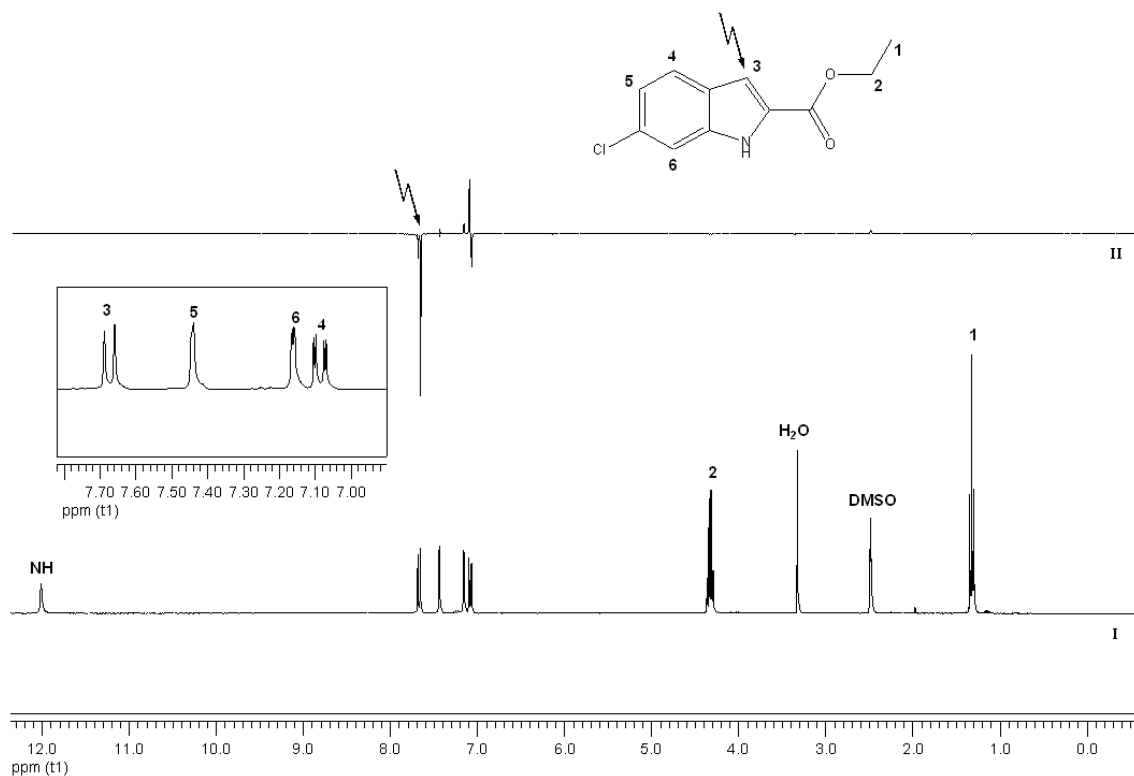


Abbildung 34: ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung zur Klärung der Regioselektivität monohalogenierter Indolderivate am Beispiel von CED-21 (DMSO-d_6)
 (I): ^1H -NMR-Spektrum von CED-21 (300 MHz)
 (II): ^1H -NOE-Differenzspektrum eingestrahlt bei 7,7 ppm (7090,62 Hz)

Bei allen anderen Derivaten ist dagegen durch die para- bzw. dimeta-Substitution der eingesetzten Hydrazone nur ein Produkt möglich.

3.3 Substitution des Indolgrundkörpers an Position 3

3.3.1 Überblick

Als elektronenreiche und dadurch vergleichsweise reaktionsfähige Heteroaromaten lassen sich Indole leicht im Sinne einer elektrophilen aromatischen Substitution ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ -Reaktion) formylieren ⁽¹⁵³⁾. Dabei wird die Position 3 des aromatischen

Ringsystems bevorzugt angegriffen, was die Darstellung der Resonanzbeschreibung in Abbildung 35 veranschaulicht.

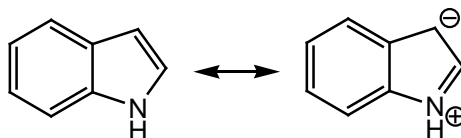


Abbildung 35: Einfache Resonanzbeschreibung des Indols

Das Einbringen einer Formylgruppe ist dabei besonders interessant, da von ihr ausgehend alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevanten Folgereaktionen realisiert werden können.

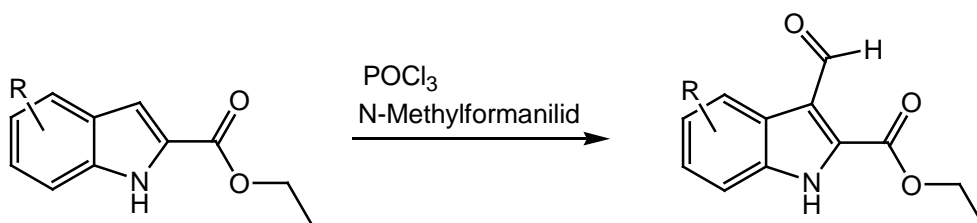


Abbildung 36: Formylierung des Indolgrundkörpers an Position 3; das mit R angegebene Substituentenmuster zeigt Tabelle 2

Die Formylierung wird nach einer Methode nach *Vilsmeier*⁽¹⁵⁴⁾ durchgeführt.

3.3.2 Formylierung nach Vilsmeier

Um die Formylgruppe elektrophil einführen zu können, muss sich zu Beginn der Reaktion ein geeignetes Formylierungsreagenz ausbilden, was sich durch die Verwendung von N-Methylformanilid und Phosphorylchlorid erreichen lässt (vgl. Abbildung 37). Auch der Einsatz des kostengünstigeren Dimethylformamids ist denkbar, stellt sich aber im Fall einer S_EAr-Reaktion am Indol aufgrund der geringeren Reaktivität im Gegensatz zum N-Methylformamid als ungeeignet heraus⁽¹⁴⁵⁾.

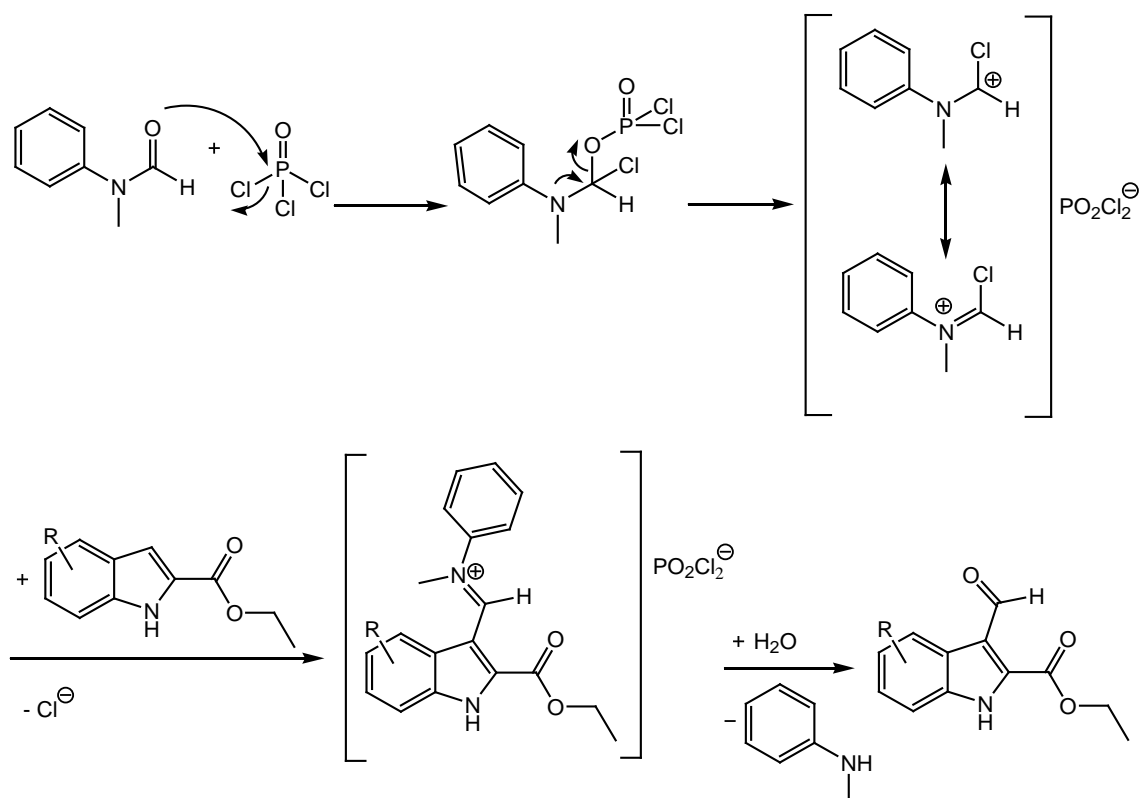


Abbildung 37: Mechanismus der Formylierung nach Vilsmeier; das mit R angegebene Substitutionsmuster zeigt Tabelle 2

Die intermediäre Bildung des Chlormethyleniminiumsalses als eigentliches elektrophiles Formylierungsreagenz lässt sich im Reaktionsverlauf durch die Ausbildung eines orangefarbenen Feststoffes erkennen. Erst dann wird der Indolcarbonsäureethylester zugegeben. Das primär gebildete Addukt der Reaktion ist wiederum ein Iminiumsals und kann bei einem pH-Wert zwischen 9 und 10, welcher mit gesättigter wässriger Natriumacetat-Lösung eingestellt wird, zum Endprodukt hydrolysiert werden. Als Lösungsmittel findet wasserfreies Dichlorethan Verwendung, da es aufgrund des höheren Siedepunktes im Gegensatz zu Dichlormethan höhere Temperaturen während der Reaktion zulässt. Allerdings muss darauf geachtet werden, diese nicht über 70 °C ansteigen zu lassen, da sonst das N-Methylformanilid selbst formyliert wird, was zu einem drastischen Absinken der Produktbildung führt⁽¹⁴⁹⁾.

Die erfolgreiche Umsetzung lässt sich im ^1H -NMR-Spektrum durch das zusätzliche Signal bei 10,61 ppm erkennen. Wie in Abbildung 38 gezeigt, ist das Proton des eingebrachten Aldehyds durch den Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe stark tieffeldverschoben.

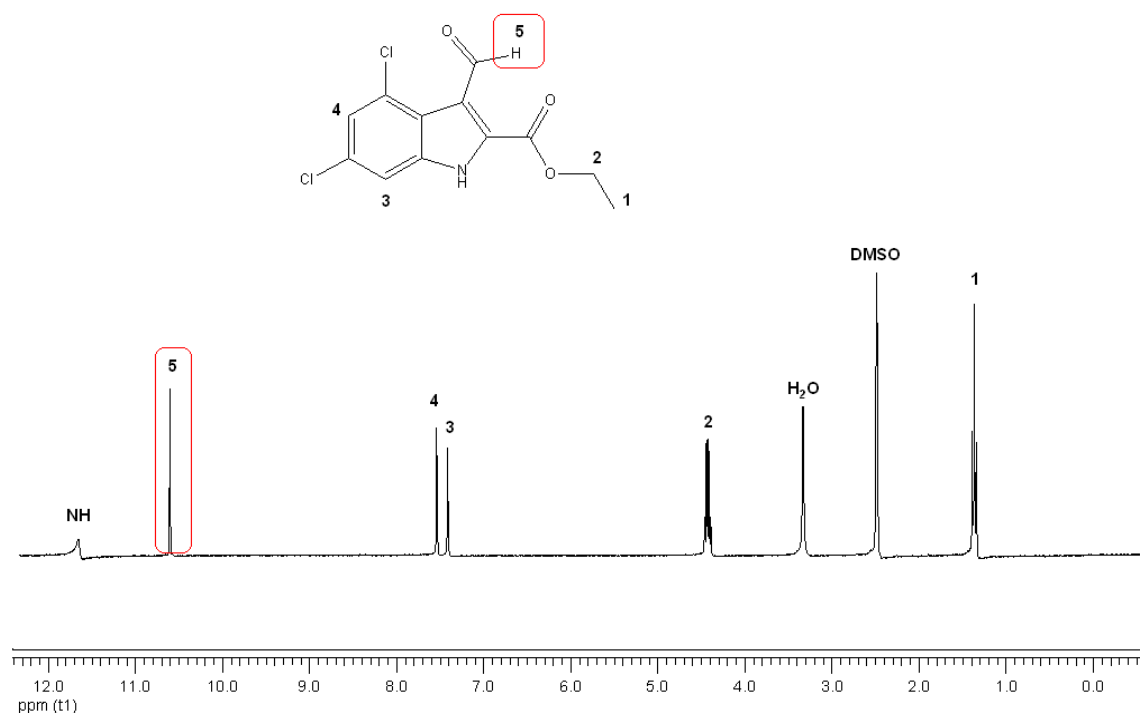


Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrum an Position 3 formylierter Indolderivate am Beispiel von CED-7; (DMSO- d_6 , 300 MHz)

3.4 Strukturvariation an Position 3 des Indolgrundkörpers

3.4.1 Überblick

Ausgehend von den an Position 3 formylierten Derivaten, werden 3 verschiedene Synthesewege eingeschlagen. Eine Übersicht ist in Abbildung 39 veranschaulicht.

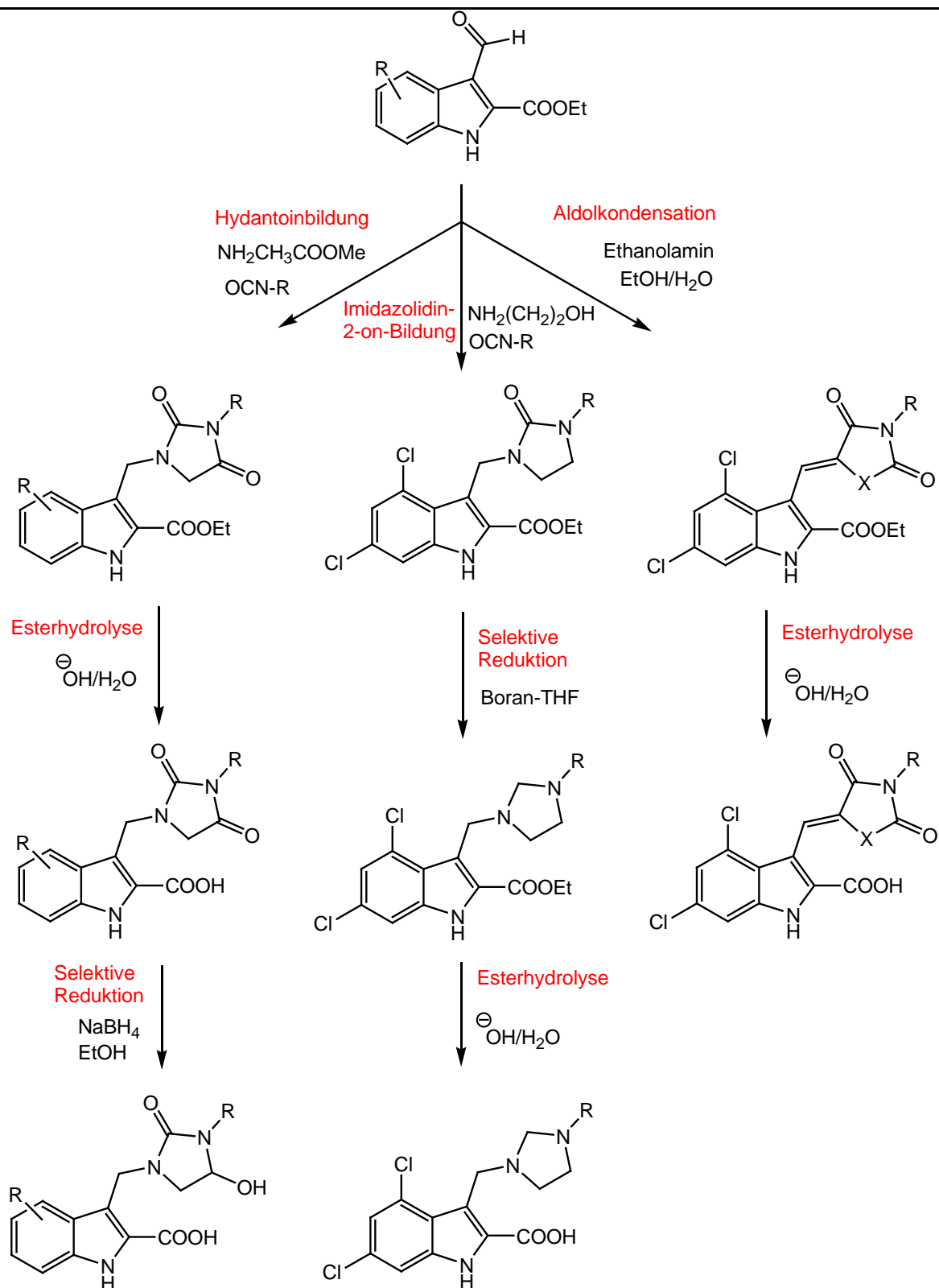


Abbildung 39: Überblick über die Strukturvariationen an Position 3 des Indolgrundkörpers

Wie in Abschnitt 3.1 bereits erwähnt, hat sich eine saure Funktion für die Affinität eines Liganden an der Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors als essentiell herausgestellt.

Um eine hohe Affinität am Rezeptorprotein zu erreichen, müssen die dargestellten Indol-2-carbonsäureethylester daher meist in einem letzten Schritt jeweils zur Indol-2-carbonsäure hydrolysiert werden(vgl. Abschnitt 3.4.2.3; S. 63).

3.4.2 Hydantoin-Derivate

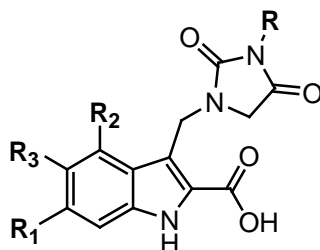
Im Rahmen der Synthese der Imidazolidin-2,4-dion-Derivate (Hydantoine) werden

- unterschiedliche Reste am Imidazolidin-2,4-dion-Ring eingeführt.
- Phenylhydantoine mit unterschiedlichem Substitutionsmuster am Indolgrundkörper dargestellt.
- Strukturveränderungen durch selektive Reduktion der Carbonylfunktionen des Hydantoins durchgeführt (vgl. Tabelle 4; S. 68)

Tabellen 3 gibt einen Überblick der synthetisierten Hydantoin-Derivate.

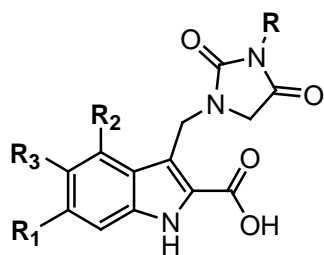
Auf die durch selektive Reduktion erhaltenen Strukturen, sowie die Imidazolidin-2-on-Derivate wird nach der ausführlichen Betrachtung der Hydantoinbildung genauer eingegangen.

Tabelle 3: Übersicht der synthetisierten Hydantoinderivate

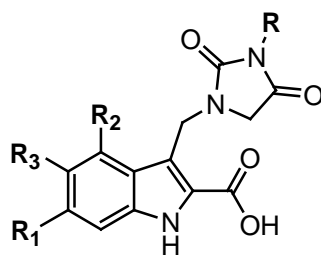







Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R
------------	----------------	----------------	----------------	---

Chemischer Teil



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R
CED-9	-Cl	-Cl	-H	
CED-43	-Cl	-Cl	-H	
CED-45	-Cl	-Cl	-H	
CED-47	-Cl	-Cl	-H	
CED-50	-Cl	-Cl	-H	
CED-53	-Cl	-Cl	-H	
CED-55	-Cl	-Cl	-H	
CED-57	-Cl	-Cl	-H	-H



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R
CED-18	-F	-F	-H	
CED-24	-Cl	-H	-H	
CED-29	-F	-H	-H	
CED-34	-H	-H	-OCH ₃	
CED-35	-H	-H	-OH	

3.4.2.1 Multikomponentensynthese der Imidazolidin-2,4-dione

Die Synthese der Imidazolidin-2,4-dione (Hydantoine) lässt sich mit Hilfe einer Multikomponentenmethode nach Sim und Ganesan realisieren ⁽¹⁵⁵⁾. Dabei sind Multikomponentenreaktionen (multi component reactions, MCR) Eintopfreaktionen, dessen Terminus folgendermaßen definiert ist: Es handelt sich um eine chemische Reaktion, bei der mindestens 3 Edukte in einem Reaktionsgefäß miteinander reagieren. Das gebildete Produkt enthält wesentliche Teile eines jeden Eduktes ⁽¹⁵⁶⁾.

Auf diese Weise lässt sich in einem Schritt ein über mehrere Zwischenstufen gebildetes Produkt herstellen und mehrere Isolierungs- und Aufarbeitungsschritte

vermeiden, wodurch sich ein verminderter Zeit- als auch Materialaufwand ergibt. Bereits im Jahr 1882 erkannte Hantzsch, dass mit Hilfe der MCRs hochsubstituierte Heterocyclen synthetisiert werden können ⁽¹⁵⁷⁾. Durch den Einsatz von Ammoniak, β -Ketoestern und Aldehyden werden beispielsweise Dihydropyridine erhalten und auch bei der nach ihm benannten *Hantzsch* Dreikomponentensynthese aus Ammoniak, β -Ketoestern und α -Chlorcarbonylen lassen sich Pyrrole mit 3 unterschiedlichen Substituenten darstellen.

Eine weitere Multikomponentenmethode zur Synthese von Hydantoinen stellt die *Bucherer-Bergs-Reaktion* dar, bei der es zu einer Umsetzung zwischen einem Keton, Kaliumcyanid und Ammoniumcarbonat kommt ⁽¹⁵⁸⁾, ⁽¹⁵⁹⁾. Durch die intermediär entstehende Blausäure wird diese einfache und auch kostengünstigere Methode als Syntheseoption allerdings ausgeschlossen.

Bei der verwendeten Multikomponentenmethode erfolgt die Umsetzung eines Indol-3-carbaldehyds, α -Aminosäureesters (Glycinmethylester) und Isocyanats zum Hydantoin-Derivat (vgl. Abbildung 40).

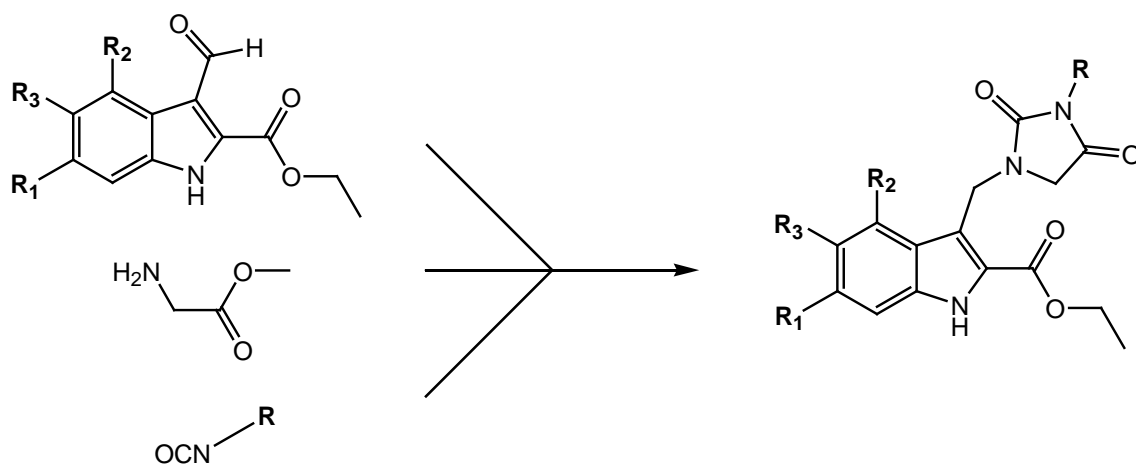


Abbildung 40: Edukte der Multikomponentenmethode zur Synthese der Hydantoinderivate nach Sim und Ganesan ⁽¹⁵⁵⁾

Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 41 dargestellt. In einem ersten Schritt wird der Glycinmethylester mit dem Indol-3-carbaldehyd-Derivat zum Imin umgesetzt, wobei zunächst ein Halbamin erhalten wird, welches unter Protonenkatalyse reversibel Wasser abspaltet. Anschließend erfolgt eine *in situ* Reduktion zu einem sekundären Amin durch Natriumtriacetoxyborhydrid (reduktive

Aminierung). Dieses erweist sich im Gegensatz zu alternativ verwendbaren Agenzien wie Natriumcyanoborhydrid als besseres Reduktionsmittel, da eine mildere und selektivere Reaktionsführung eingehalten werden kann. Durch die Verwendung des Aminosäureesters als Hydrochlorid muss die bei der Reaktion frei werdende Säure durch Zugabe einer Hilfsbase (Triethylamin) neutralisiert werden. Im zweiten Schritt erfolgt die Addition des Isocyanates, wodurch schließlich über die Bildung eines Harnstoffderivats der Ringschluss realisiert wird und das angestrebte Hydantoin-Derivat resultiert.

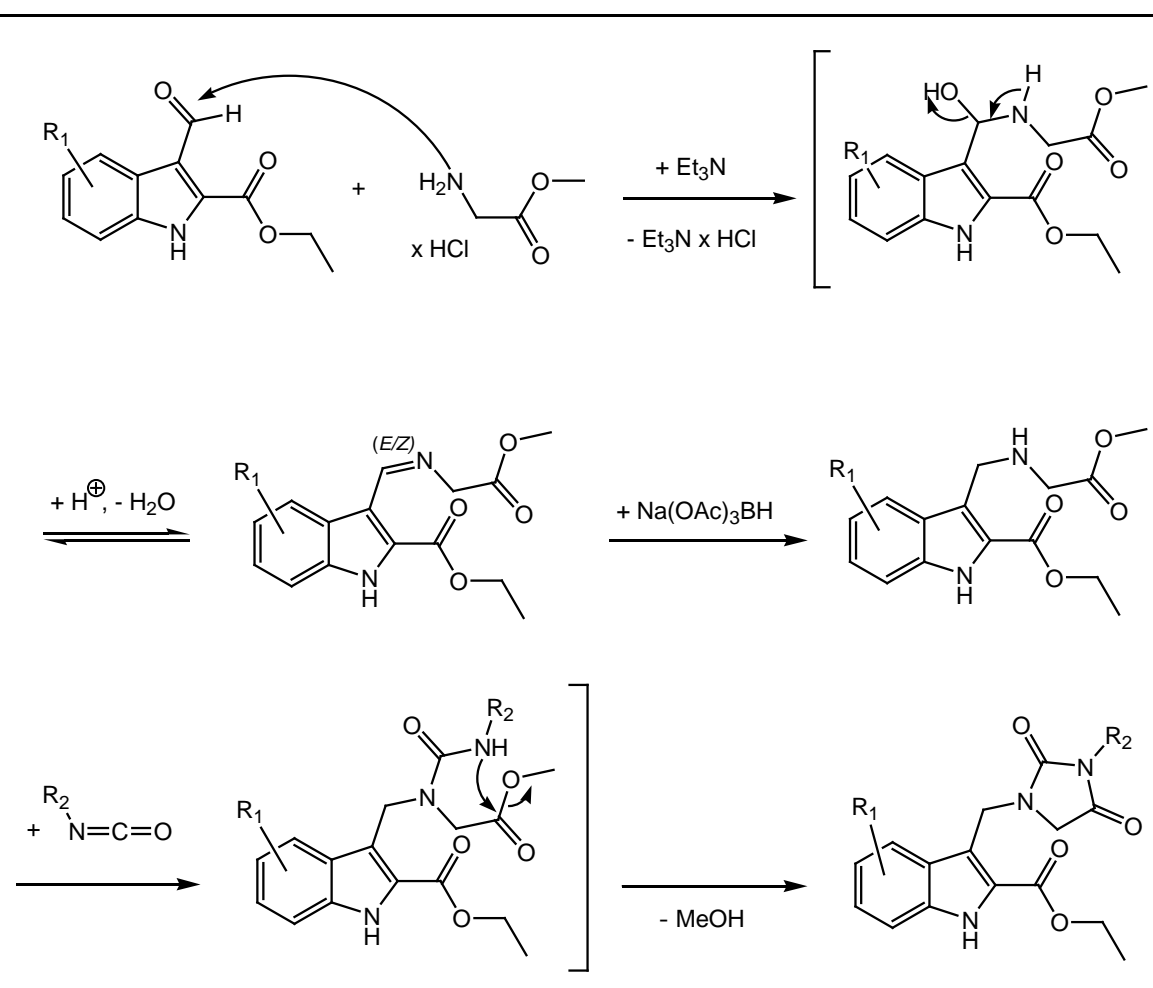


Abbildung 41: Allgemeiner Reaktionsmechanismus zur Darstellung der Imidazolidin-2,4-dione durch eine Multikomponentenmethode nach Sim und Ganesan⁽¹⁵⁵⁾
 R₁ bezeichnet das Substitutionsmuster am Indol
 R₂ bezeichnet die unterschiedlichen Reste am Imidazolidin-2,4-dion-Ring,
 die durch die entsprechenden Isocyanate eingebracht werden (vgl. Tabelle 3)

Im Fall von CED-54 (vgl. Abbildung 42) tritt bei gleicher Reaktionsführung kein Ringschluss des sonst nur intermediär gebildeten Harnstoffderivates ein, was

vermutlich auf sterische Hinderungen des raumerfüllenden Adamantyl-Restes zurückzuführen ist. Durch die nachträgliche Zugabe einer frisch hergestellten Natriumethanolat-Lösung zu dem isolierten, ringoffenen Harnstoffderivat CED-53 lässt sich schließlich das gewünschte Produkt darstellen.

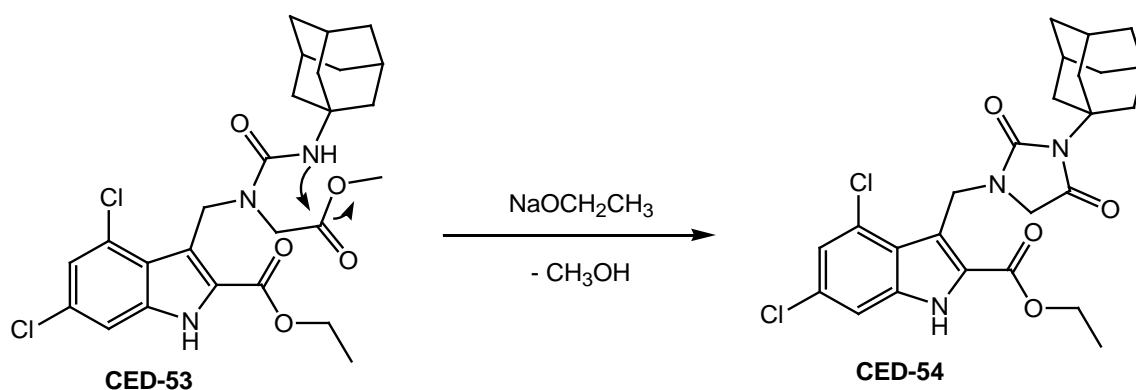


Abbildung 42: Ringschluss von CED-53 mit Natriumethanolat

Die eindeutige Zuordnung der Protonen bei der ¹H-spektroskopischen Untersuchung zur Identifizierung des Produktes stellt sich, aufgrund von Überlagerungen, zunächst als schwierig heraus. In Abbildung 43 wird gezeigt, dass es mit der Methode des ¹³C-NMR-Spin-Echo-Experiments gelingt, die einzelnen Strukturelemente den Signalen der Testsubstanz CED-55 eindeutig zuzuordnen.

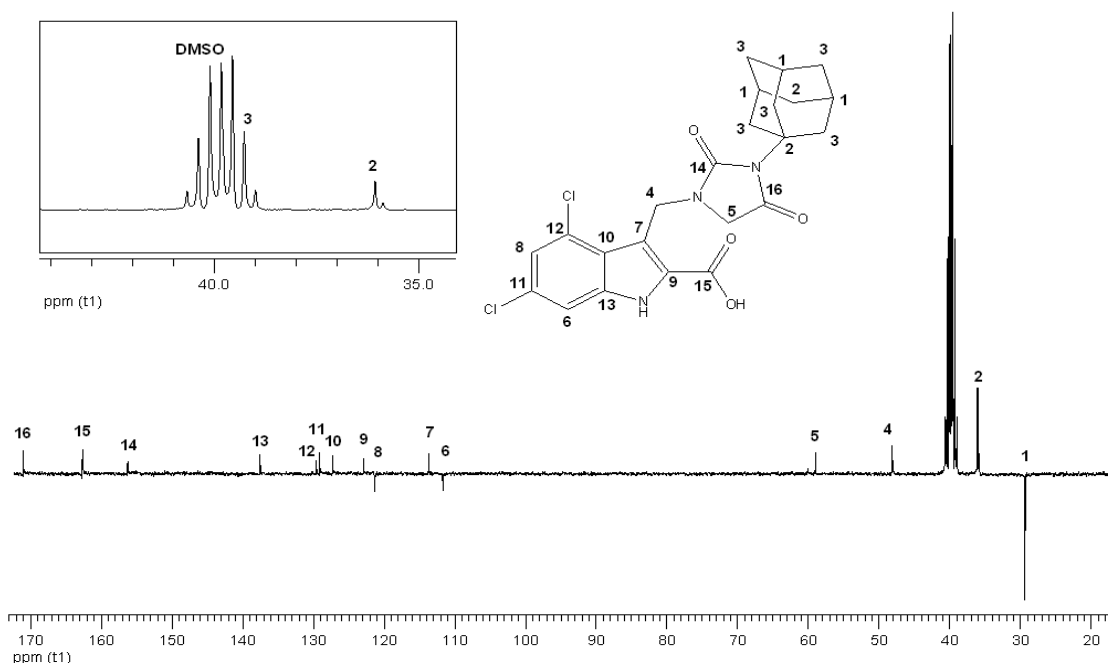


Abbildung 43: ^{13}C -NMR-Spektrum eines Spin-Echo Experiments von CED-55 (DMSO- d_6 , 75 MHz)

3.4.2.2 Darstellung der Isocyanate

Die Darstellung der Isocyanate für die Mehrkomponentensynthese erfolgt, sofern nicht kommerziell erhältlich, durch einen thermischen Abbau des entsprechenden Säureazids. Der Mechanismus der verwendeten Umlagerung nach *Curtius*⁽¹⁵⁴⁾ ist in Abbildung 44 am Beispiel der 3-Thienylcarbonsäure veranschaulicht. Das Azid wird dabei durch Zugabe einer wässrigen Natriumazid-Lösung zum *in situ* hergestellten Säurechlorid bei 0 °C erhalten. Nach Extraktion des Säureazids aus dem wässrigen Reaktionsansatz wird vorsichtig die Temperatur erhöht. Dadurch kommt es in einer konzertierten Reaktion zur gleichzeitigen Abspaltung des Stickstoffs und zu einer anionotropen Umlagerung des Thienylrestes, wodurch das Isocyanat gebildet wird.

In der Literatur⁽¹⁶⁰⁾ wird weiterhin der Ablauf über die Bildung einer Nitren-Zwischenstufe diskutiert. Dabei handelt es sich um eine Elektronenmangelverbindung mit einem Elektronensextett am Stickstoff, welche durch die dadurch bedingte starke Elektrophilie eine hohe Tendenz zur anionotropen Umlagerung aufweist, wobei das Isocyanat gebildet wird. Lwowski⁽¹⁶¹⁾ konnte zeigen, dass diese reaktive Zwischenstufe nur unter Lichteinwirkung eine Rolle spielt. Unter

den gegebenen Bedingungen verläuft die thermisch ausgelöste Umlagerung jedoch konzertiert.

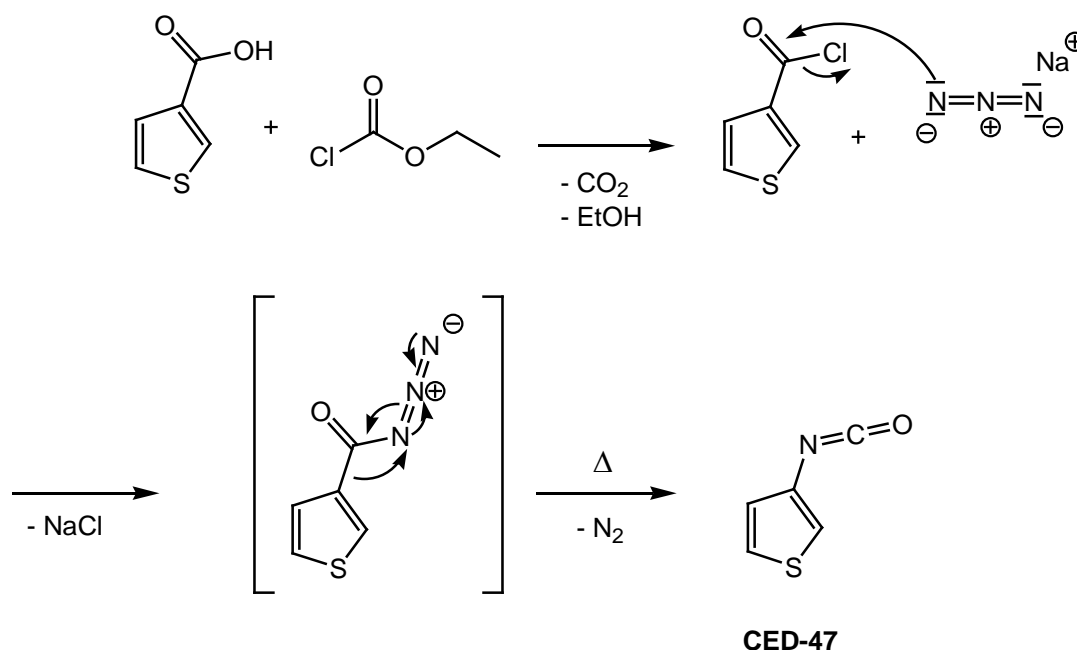


Abbildung 44: Isocyanatbildung nach *Curtius* unter thermischen Bedingungen

Das gewünschte Isocyanat konnte nicht isoliert werden. Wahrscheinlich erfolgt schon im wässrigen Reaktionsansatz bei tiefer Temperatur eine Stickstoffabspaltung vom reaktiven Säureazid woraufhin das durch Umlagerung gebildete Isocyanat unter den gegebenen wässrigen Bedingungen zur Carbaminsäure hydrolysiert wird. Diese ist instabil und decarboxyliert zum entsprechenden Amin (vgl. Abbildung 45).

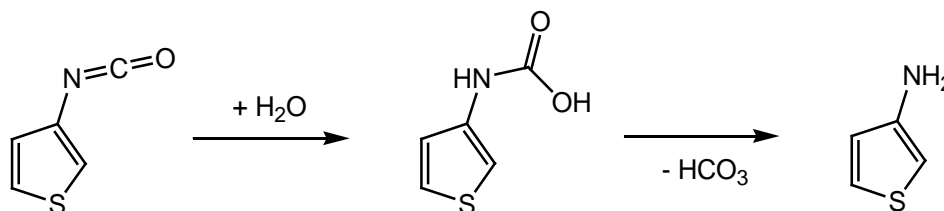


Abbildung 45: Folgereaktion bei der Isocyanatbildung nach *Curtius*

Die Strukturaufklärung des isolierten Hauptproduktes der Reaktion mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt diese Vermutung (vgl. Abbildung 47). Bei der Charakterisierung zeigt sich ein Harnstoff-Derivat, dessen Entstehung die Bil-

dung des angestrebten Isocyanats nur als Zwischenprodukt bestätigt. Dieses greift das, durch die Folgereaktion, gebildete Amin nucleophil an, woraufhin das isolierten Produkt entsteht, welches in Abbildung 46 dargestellt ist.

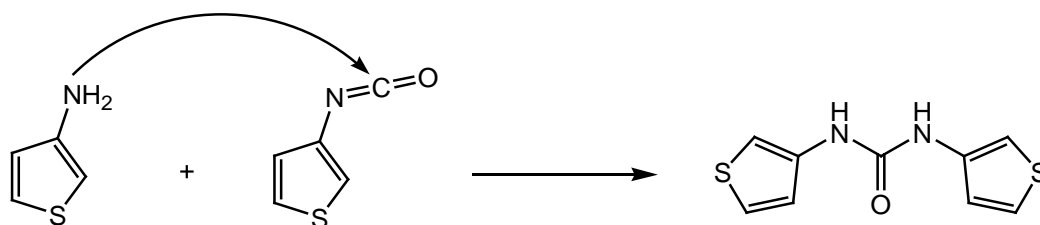


Abbildung 46: Entstehung des identifizierten Hauptproduktes bei der Isocyanatbildung nach Curtius

Um die unerwünschte Reaktion zu vermeiden wird der Reaktionsansatz im Fall des Thiophen-Derivates CED-50 auf der Stufe des Säureazids ohne weitere Aufarbeitung zu dem gebildeten sekundären Amin bei der Mehrkomponentensynthese des Imidazolidin-2,4-dion (vgl. Abbildung 41) gegeben und vorerst sehr vorsichtig erhitzt. Erst nach beendeter Gasentwicklung wird für mehrere Stunden refluxiert, um das Hydantoin zu erhalten.

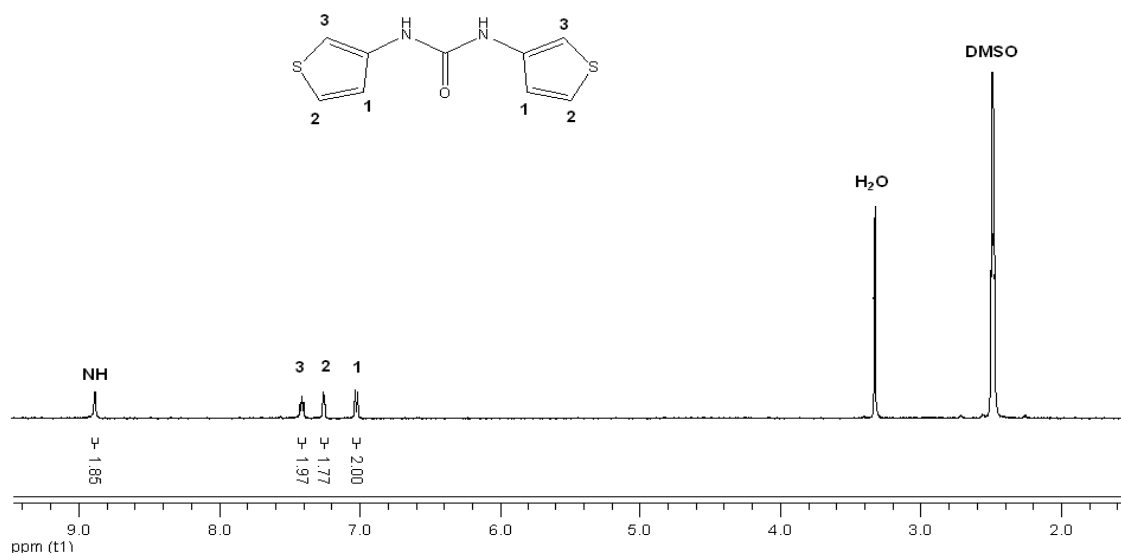


Abbildung 47: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des beim Curtius-Abbau entstehenden Hauptproduktes; (DMSO- d_6 ; 300 MHz)

Eine weitere Möglichkeit der Isocyanatbildung aus der entsprechenden Carbonsäure stellt eine modifizierte *Curtius-Reaktion* nach Nonomya^{(162), (163)} mit Phosphorsäurediphenylesterazid (DPPA, Diphenylphosphorylazid) dar. Dabei lagert sich das durch Katalyse von Triethylamin zunächst entstehende Additionsprodukt aus Carbonsäure und DPPA in das Säureazid um. Es entsteht durch anschließende Stickstoffabspaltung ein Acylnitren, welches unter anionotroper Umlagerung in das Isocyanat übergeht.

3.4.2.3 Esterhydrolyse

In einem letzten Schritt der Syntheseführung erfolgt die Spaltung des Esters zur Carbonsäurefunktion, welche in Abbildung 48 beispielhaft an CED-8 gezeigt ist.

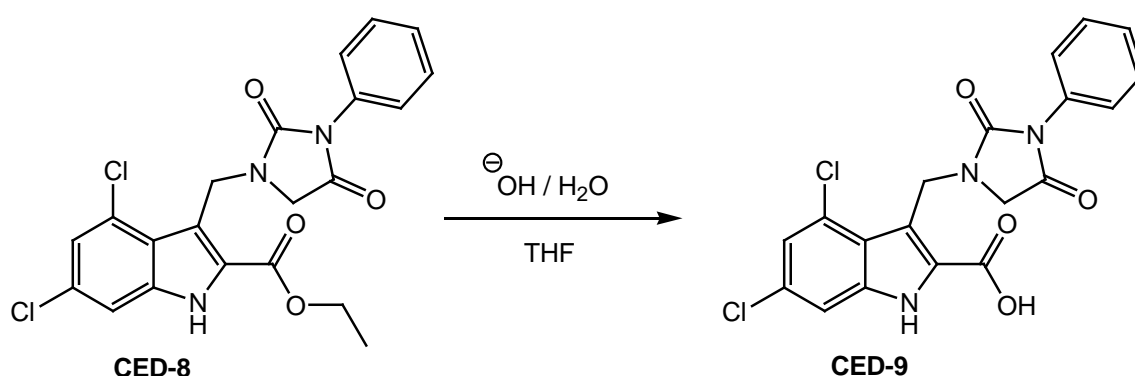


Abbildung 48: Basenkatalysierte Esterhydrolyse am Beispiel von CED-8

Als Methode der Wahl wird die basische Esterhydrolyse herangezogen, bei der der Ester für mehrere Stunden in einem THF/Wasser-Gemisch mit einer wässrigen 0,5 molaren Lösung von Lithiumhydroxid oder einer 2 normalen Natriumhydroxid-Lösung bei Raumtemperatur versetzt wird. Als Vorteil bietet sich bei dieser Variante der schnellere Ablauf und darüber hinaus eine einfachere Reaktionsführung im Vergleich zur sauren Esterhydrolyse an, da durch die Irreversibilität des letzten Schrittes eine Abdestillation des gebildeten Alkohols während der Reaktion vermieden werden kann.

Das Fortschreiten der Reaktion kann anhand des Ausfallens des gebildeten Carboxylat-Salzes beobachtet werden. Um die freie Carbonsäure zu erhalten, wird mit 10 %iger Salzsäure-Lösung bis zur sauren Reaktion versetzt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert.

3.4.2.4 Etherspaltung der 5-Methoxygruppe

Um abschätzen zu können, wie sich die Affinität zum NMDA-Rezeptorprotein durch Einführung einer polaren Gruppe an das Indolgrundgerüst verhält, wird die im Fall von CED-34 vorhandene Methoxygruppe an Position 5 des Indols unter möglichst milden Bedingungen zur Hydroxylgruppe gespalten. Als besonders geeignet stellt sich dabei die Etherspaltung mit Lewis-Säuren wie Bortribromid, Bortrichlorid, Bortrifluorid, Dimethylborbromid oder Aluminiumchlorid heraus. Eine Spaltung lässt sich außerdem durch Erhitzen mit Halogenwasserstoffsäuren erreichen ⁽¹⁵⁴⁾. Aufgrund der postulierten nahezu quantitativen Umsetzung von Methylarylethern ^{(164), (165)} und den daraus resultierenden guten Ausbeuten wird eine Methode unter sehr schonenden Reaktionsbedingungen mit Bortribromid zur Durchführung der Etherspaltung gewählt.

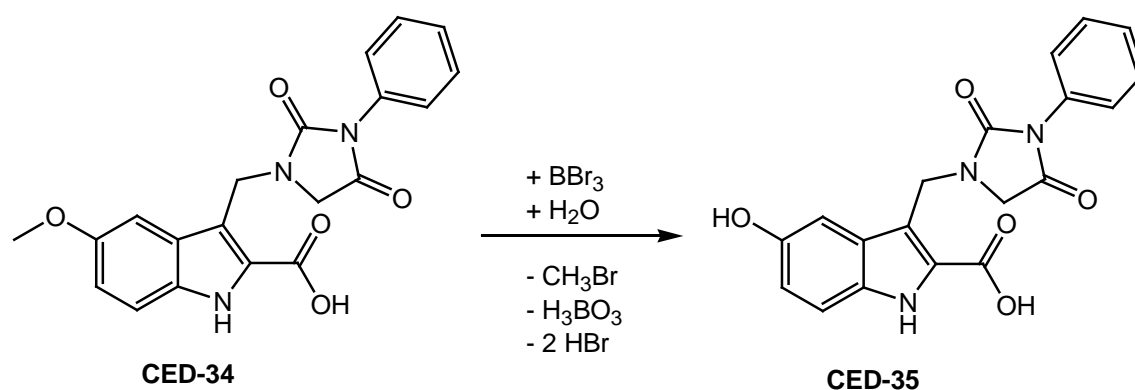


Abbildung 49: Etherspaltung der Methoxygruppe von CED-34 zur Hydroxylfunktion mit BBr₃

Als Lewisäure reagiert Bortribromid dabei mit dem Ethersauerstoff der Methoxyverbindung CED-34 (vgl. Abbildung 50) in wasserfreiem Dichlormethan unter Ausbildung eines Übergangskomplexes zum Oxoniumion. Dieses wird von einem Bromid-Ion nucleophil angegriffen, woraufhin Methylbromid und ein Di-

bromborsäurearylether resultieren. Letzterer wird schließlich durch Hydrolyse in das Phenolderivat CED-35 unter Bildung von Borsäure und Bromwasserstoff überführt. Aufgrund der einsetzenden exothermen Reaktion wird diese unter Eiskühlung durchgeführt.

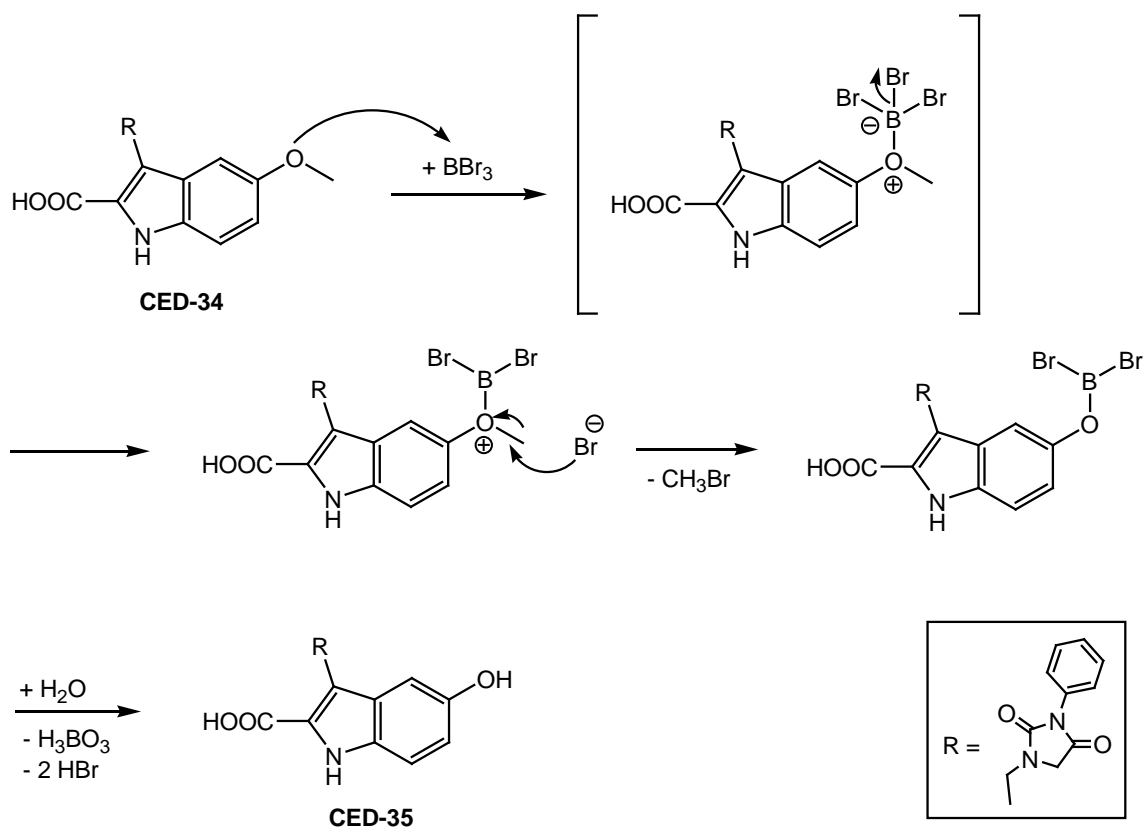


Abbildung 50: Mechanismus der Etherspaltung mit Bortribromid

Eine ^1H -spektroskopische Untersuchung belegt durch das Fehlen des Signals der Methylgruppe bei 3,71 ppm eindeutig die erfolgreiche Spaltung der Etherfunktion. Am Aufspaltungsmuster der übrigen Protonen treten keine Veränderungen auf. Das ^1H -NMR-Spektrum des Produktes CED-35 ist im direkten Vergleich zum ^1H -NMR-Spektrum des Methoxy-Derivates CED-34 in Abbildung 51 dargestellt.

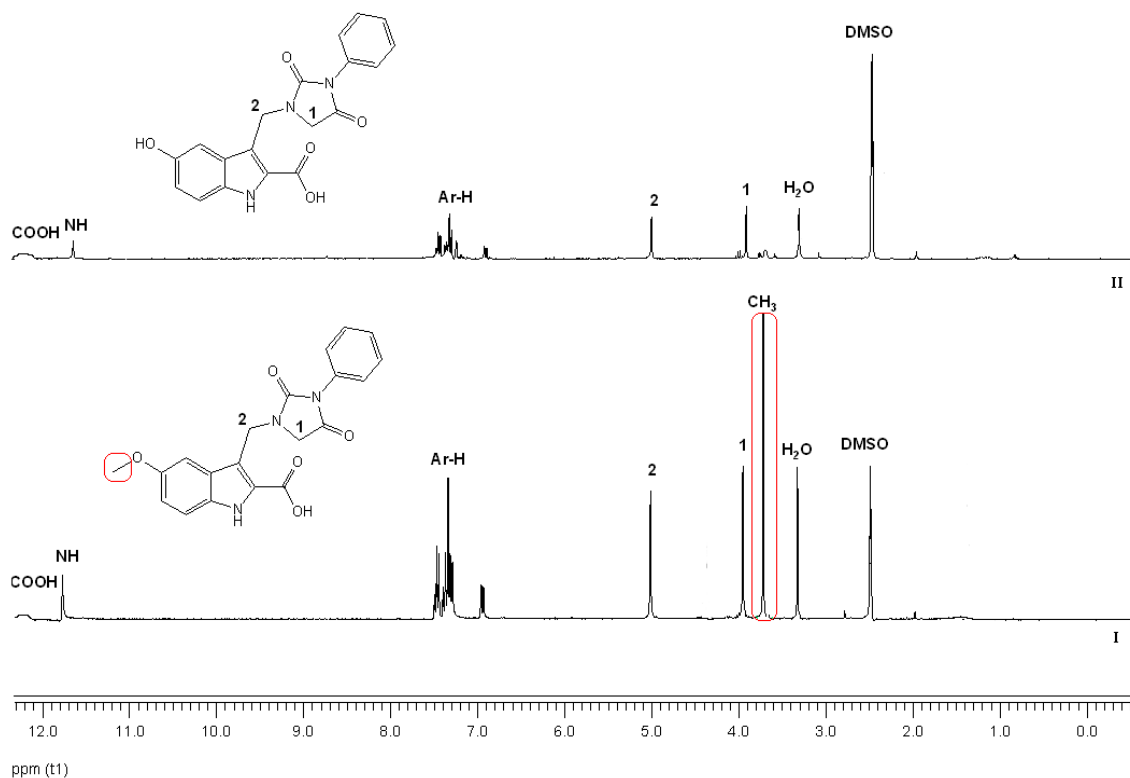
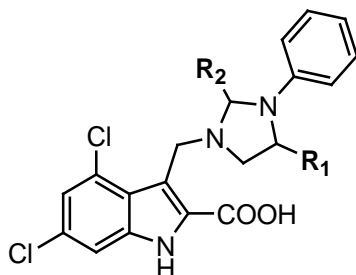


Abbildung 51: ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung zum Beweis der Etherspaltung
 (I): ¹H-NMR-Spektrum von CED-34 (DMSO-d₆; 300 MHz)
 (II): ¹H-NMR-Spektrum von CED-35 (DMSO-d₆; 300 MHz)

3.4.2.5 Selektive Reduktion der Carbonylfunktionen

Um die Wasserstoffbrücken-Donor/-Akzeptor Eigenschaften an Position 3 des Indolgrundgerüsts weiter zu untersuchen, wird versucht, die Carbonylfunktionen am Imidazolidin-2,4-dion-Ring selektiv zu reduzieren. Durch die Reduktion zu einer Hydroxylfunktion werden folglich H-Brücken-Donor-Eigenschaften erreicht, durch die Reduktion zum Alkan ist keine Wasserstoffbrückenausbildung mehr möglich. In Tabelle 4 ist eine Übersicht der Strukturveränderungen durch Reduktion der Carbonylfunktionen des Hydantoin gezeigt.

Tabelle 4: Übersicht der Strukturveränderung der Carbonylfunktionen ausgehend vom Hydantoin



Verbindung	R ₁	R ₂
CED-36	-OH	=O
CED-39	-H	=O
CED-41	-H	-H

Da die Carbonsäurestruktur als essentielle funktionelle Gruppe im Molekül erhalten werden soll (vgl. Abschnitt 3.1), muss ein möglichst selektives Reduktionsmittel verwendet werden. Außerdem sollen die Reaktionsbedingungen so mild wie möglich gehalten werden, um Nebenreaktionen einzugrenzen. Im Hinblick auf diese Überlegungen, scheinen komplexe Hydride besonders geeignet, da sie gegenüber anderen Methoden einige wichtige Vorteile bieten. Zum einen verlaufen die Reduktionen unter sehr milden Bedingungen und mit hohen Ausbeuten. Desweiteren gelingt die Reduktion auch eher reaktionsträger Carbonsäurederivate⁽¹⁵⁴⁾. Durch Verwendung verschiedener Hydride und Variation des Lösungsmittels lassen sich gezielt selektive Reduktionen erreichen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick gebräuchlicher komplexer Hydride als Reduktionsmittel in der Carbonylchemie und deren mögliche Eignung zur gewünschten Produktbildung. Hierbei muss angemerkt werden, dass eine Lösungsmittelabhängigkeit existiert, die in der Übersicht nicht gezeigt ist.

Tabelle 5 : Übersicht der Reduktion von Carbonylfunktionen zum Alkohol bzw. Amin mit komplexen Hydriden, modifiziert nach Clayden et al. ⁽¹⁶⁰⁾

	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}$	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NR}_2$	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
NaCNBH ₃	Yellow	Red	Red	Red
Na(OAc) ₃ BH	Yellow	Red	Red	Red
NaBH ₄	Green	Yellow	Red	Red
LiBH ₄	Green	Red	Red	Red
Li(O ^t Bu) ₃ AlH	Green	Yellow	Red	Red
LiEt ₃ BH	Green	Green	Red	Red
LiAlH ₄	Green	Green	Red	Red
BH ₃	Yellow	Yellow	Green	Green
DIBAL-H	Green	Green	Green	Green

	Reduktion
	langsame Reduktion
	i.d.R. keine Reduktion

Im Folgenden soll kurz auf die jeweils durchgeführte Reaktionsmethoden eingegangen werden.

Reduktion mit Natriumborhydrid

Zunächst wird die Carbonylfunktion an Position 4 des Imidazol-2,4-dion-Ringes selektiv zur Hydroxylgruppe reduziert.

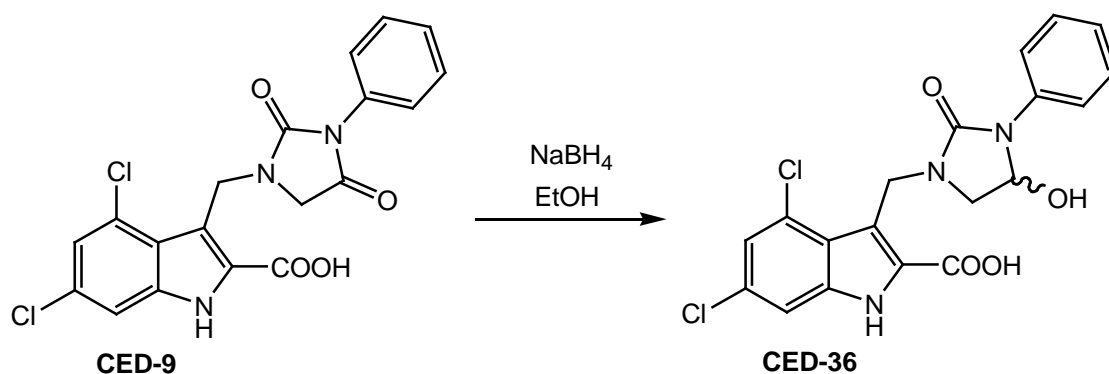


Abbildung 52: Reduktion mit Natriumborhydrid

Zur Darstellung von selektiv reduzierten Alkoholen stellt sich Natriumborhydrid in wasserfreiem Ethanol als besonders geeignet heraus ⁽¹⁶⁶⁾. Aufgrund der Tatsache, dass NaBH_4 jedoch in der Lage ist Esterfunktionen zu reduzieren, wird die freie Säure CED-9 als Edukt verwendet. Abbildung 53 zeigt den Reaktionsmechanismus sowie den Einfluss des Lösungsmittels auf die Entstehung des Alkohols.

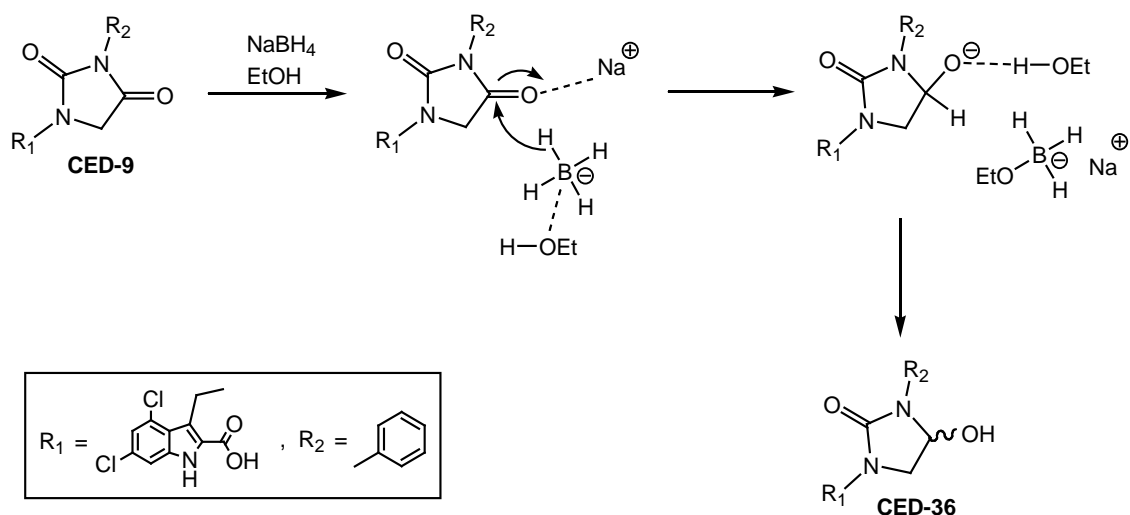


Abbildung 53: Reduktion der 4-Carbonylfunktion des Imidazolidin-2,4-dions durch Hydridtransfer mit Natriumborhydrid in abs. Ethanol

Entscheidend bei der Reaktion ist die nucleophile Übertragung eines Hydridions auf den Carbonylkohlenstoff der Ketofunktion (Hydridtransfer). Dieser wird durch das Metall-Kation, welches sich an den Carbonylsauerstoff koordiniert hat, aktiviert. Das dabei entstehende Oxoanion wird durch Ethanol stabilisiert und schließlich protoniert, wobei das Produkt CED-36 als Racemat erhalten wird. Das als Nebenprodukt entstehende Alkoxyborohydrid-Anion weist weiterhin reduzierende Eigenschaften auf und kann Schritt für Schritt drei weitere Carbonylfunktionen reduzieren, bis alle Wasserstoffatome übertragen sind. Eine vollständige Reduktion der 4-Ketofunktion zur Hydroxylfunktion ist dabei nach 24 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur erreicht.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (vgl. Abbildung 54) lässt sich die selektive Reduktion beweisen. Neben einem zusätzlichen Signal bei 5,33 ppm, welches das Proton der entstandenen Hydroxylfunktion zeigt, ist noch ein Signal für das Proton an Position 4 des Imidazolidin-2-on-Ringes bei 5,23 ppm als Quartett zu sehen. Weiterhin ist durch die Bildung von diastereotopen Protonen das Signal der Methylengruppe, welche der Hydroxylfunktion benachbart ist, aufgespalten. Die der Carbonylfunktion benachbarten Methylenprotonen des Hydantoins von CED-9 erscheinen dagegen als Singulett.

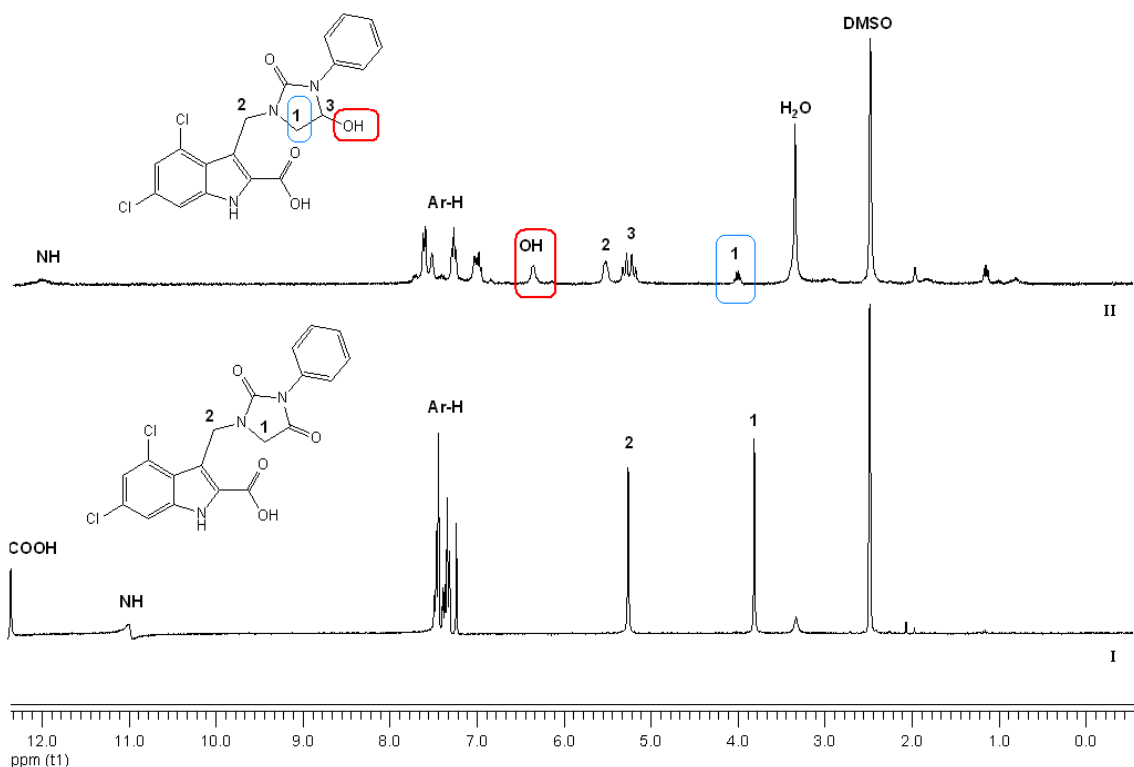


Abbildung 54: ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung zur Reduktion der 4-Carbonylfunktion des Hydantoins zum Alkohol
 (I) ¹H-Spektrum von CED-9 (DMSO-d₆; 300 MHz)
 (II) ¹H-Spektrum von CED-36 (DMSO-d₆, 300 MHz)

Der Versuch, die entstandene Hydroxylfunktion durch eine längere Reaktionsdauer und Erhitzen des Reaktionsansatzes mit Natriumborhydrid zum Alkan zu reduzieren, führt nicht zum Erfolg.

Um sowohl die 4- als auch die 2-Carbonylfunktion der Imidazolidin-2,4-dion-Struktur bis zum Alkan zu reduzieren, werden deshalb Reduktionsversuche mit weiteren Metallhydriden durchgeführt.

Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

In einer Arbeit von 1983 beschreiben Cortes und Kohn ⁽¹⁶⁷⁾ die Reduktion von N,N-disubstituierten Hydantoin-Derivaten mit Lithiumaluminiumhydrid, bei der eine Vielzahl von Produkten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen entsteht. Eine Übersicht gibt Abbildung 55.

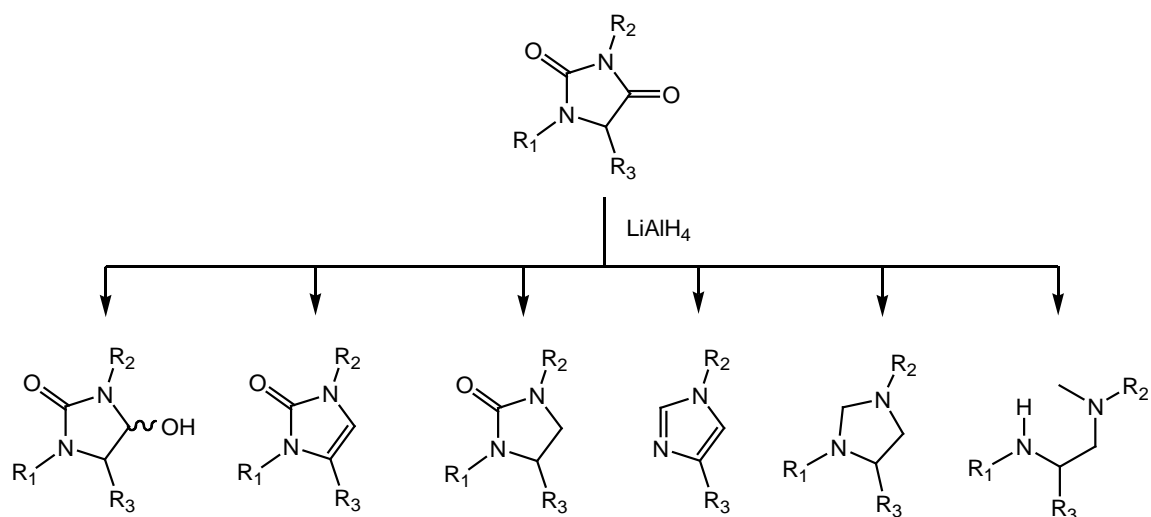


Abbildung 55: Übersicht über mögliche Reduktionsprodukte von Hydantoinderivaten mit Lithiumaluminiumhydrid nach Cortes und Kohn ⁽¹⁶⁷⁾

Die selektive Reduktion des Carbonsäurederivates CED-9 mit Lithiumaluminiumhydrid gestaltet sich durch Probleme der eindeutigen Charakterisierung des erhaltenen Produktgemisches als schwierig und die Isolierung als nicht möglich. Die im FD-Massenspektrum aufgeführte Molekulargewichtsverteilung lässt unter anderem als ein Nebenprodukt mit 404,25 g/mol den entsprechenden Alkohol infolge Reduktion der Carbonsäure vermuten.

3.4.2.6 Imidazolidin-2-on-Derivate

Um Nebenreaktionen bei der Durchführung selektiver Reduktion weitestgehend einzuschränken wird als Ausgangsverbindung das Imidazolidin-2-on-Derivat CED-38 hergestellt. Von dieser Struktur ausgehend erfolgt anschließend die im Folgenden noch näher zu betrachtende selektive Reduktion der 2-Carbonylfunktion des Imidazolidin-2-ons.

Die Edukte der verwendeten Multikomponentenmethode sind in Abbildung 56 dargestellt.

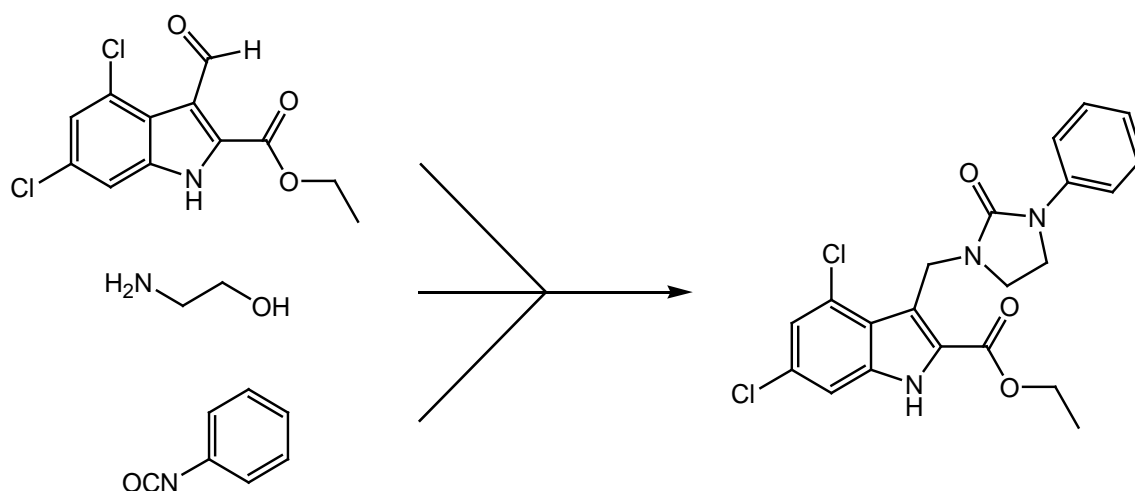


Abbildung 56: Edukte der Multikomponentenmethode zur Synthese des Imidazolidin-2-on-Derivates nach Abdel-Magid⁽¹⁶⁸⁾ und Kim *et al.*⁽¹⁶⁹⁾

In Anlehnung an eine Vorschrift nach Abdel-Magid⁽¹⁶⁸⁾ erfolgt zunächst eine reduktive Aminierung des formylierten Indol-2-carbonsäureethylesters (CED-7) mit 2-Aminoethanol in Anwesenheit von Natriumtriacetoxyborhydrid und anschließender Reaktion mit Phenylisocyanat. Statt mit Ethanolat-Lösung (vgl. CED-53) wird der Ringschluss in diesem Fall durch eine N-Cyclisierungsreaktion nach Kim *et al.*⁽¹⁶⁹⁾ mit Kalium-*tert*-Butylat und *p*-Toluolsulfonylchlorid erreicht. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 57 dargestellt und kann wie folgt gedeutet werden. Durch einen Überschuss an Base (*t*-BuOK) wird das Harnstoffderivat CED-37 mit *p*-Toluolsulfonylchlorid (TsCl) zum Sulfonamid bzw. Iminosulfonat aktiviert. Das dabei entstandene Alkoholat-Anion greift anschlie-

ßend am Tosylat-S-Atom an, wodurch sich ein Stickstoff-Anion bildet, das die intramolekulare, regioselektive Cyclisierung zum angestrebten Imidazolidin-2-on-Derivat (CED-38) unter Abspaltung des Tosylats (TsO^-) ermöglicht.

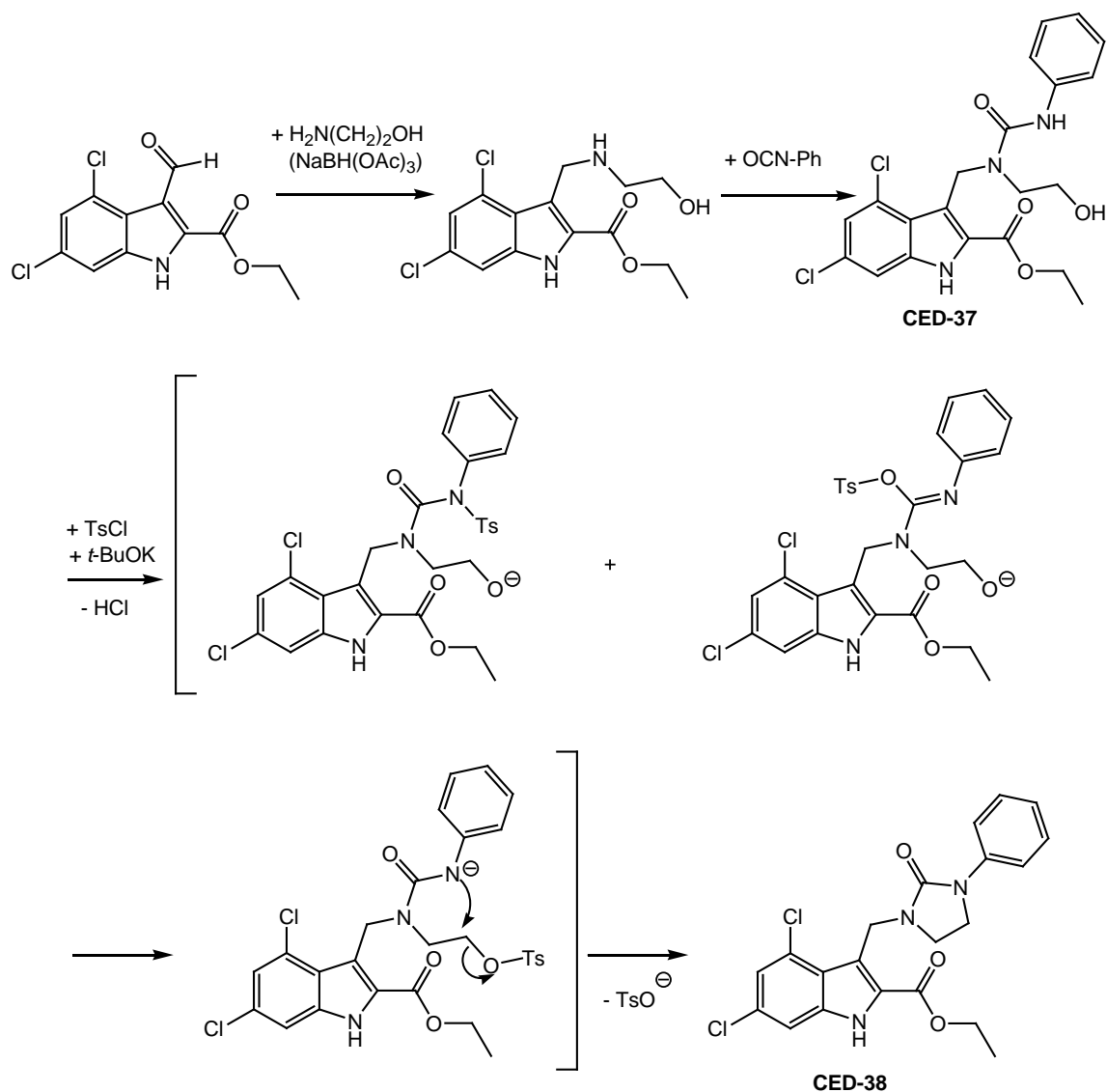


Abbildung 57: Reaktionsmechanismus der Cyclisierung zum Imidazolidin-2-on-Derivat CED-38 mit *p*-Toluolsulfonylchlorid und Kalium-*tert*-Butylat nach Kim *et al.* ⁽¹⁶⁹⁾

Reduktion mit Boran-THF-Komplex

Ausgehend von der dargestellten Struktur CED-38 wird mit einem Boran-THF-Komplex in Anlehnung an eine Vorschrift nach Brown⁽¹⁷⁰⁾ und Shetty⁽¹⁷¹⁾ die Reduktion der 2-Carbonylfunktion durchgeführt (vgl. Abbildung 58).

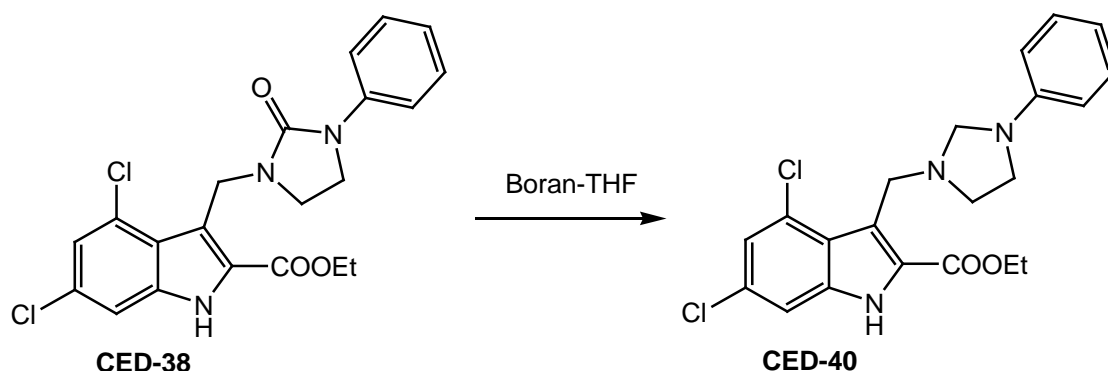


Abbildung 58: Reduktion mit Boran-THF-Komplex

Boran-THF-Komplexe reagieren bevorzugt mit weniger polarisierten Kohlenstoffatomen von Carbonylgruppen und sind so in der Lage, Amide in Gegenwart von Carbonsäureestern zu reduzieren⁽¹⁶⁰⁾. Das normalerweise gasförmige Boran (B_2H_6) lässt sich dabei als Lösung in einem Komplex mit Tetrahydrofuran, Diethylether oder auch Dimethylsulfid einsetzen. Abbildung 59 zeigt den Reaktionsmechanismus der Reduktion.

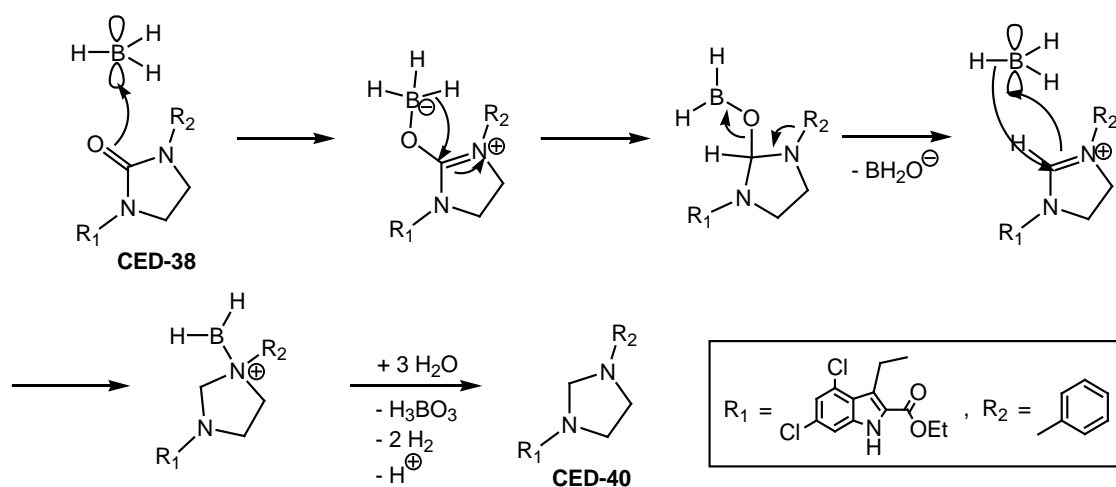


Abbildung 59: Reaktionsmechanismus der Reduktion von Carbonylgruppen zum Alkan mit Boran-THF-Komplex

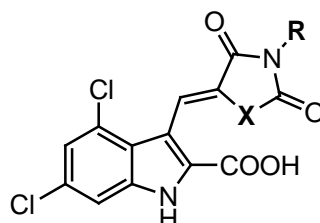
Im ersten Schritt bildet die Carbonylgruppe einen Komplex mit dem leeren p-Orbital der Lewissäure. Dadurch ist ein Hydridtransfer vom anionischen Bor-Ion zum elektrophilen Kohlenstoff möglich. Das daraus resultierende Intermediat ist instabil und bildet ein Iminium-Ion, welches erneut mit Boran reagiert und schließlich durch Zugabe von Wasser unter Abspaltung von Borsäure zum Amin (CED-40) reduziert wird.


Die Ausbeute der Reaktion ist gering und liegt unter 10 % der Theorie.

3.4.3 Aldolkondensation

Durch die zusätzliche NH-Funktion der Imidazolidin-2,4-dione und eine semi-cyclische Methylenbrücke wird sowohl ein verändertes Wasserstoffbrücken-Donor/-Akzeptor-Muster im Vergleich zur Leitstruktur CED-9 erhalten, als auch eine eingeschränkte Drehbarkeit des Molekülrestes erreicht. Eine Übersicht der vorgenommenen Strukturmodifikationen ist in Tabelle 6 veranschaulicht.

Tabelle 6: Übersicht der Methylenimidazolidin-2,4-dion- bzw. Methylenpyrrolidin-2,5-dion-Derivate



Bezeichnung	X	R
CED-61	-NH-	-H
CED-65	-NH-	
CED-67	-CH ₂ -	-H

Eine C-C-Bindungsknüpfung lässt sich durch eine Aldolkondensation zwischen einem enolisierbaren Keton oder Aldehyd und der Carbonylgruppe eines

weiteren Ketons oder Aldehyds erzielen. Die Reaktion verläuft dabei über eine β -Hydroxycarbonylverbindung (Aldol) mit anschließender Dehydratisierung, wobei α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen resultieren. Dabei ist Hydantoin (Imidazolidin-2,4-dion) bzw. Succinimid (Pyrrolidin-2,5-dion) aufgrund seiner aktiven Methylengruppe in Position 5 in der Lage, unter geeigneten Bedingungen die entsprechenden Kondensationsprodukte mit der formylierten Indol-2-carbonsäure CED-7 zu liefern.

3-Phenylhydantoin (CED-64) muss vor der Kondensationsreaktion aus Phenylisocyanat und Glycinmethylester hergestellt werden. Der Ringschluss wird, wie bei CED-54 bereits gezeigt, mit einer frisch hergestellten Lösung von Natriumethanolat erreicht.

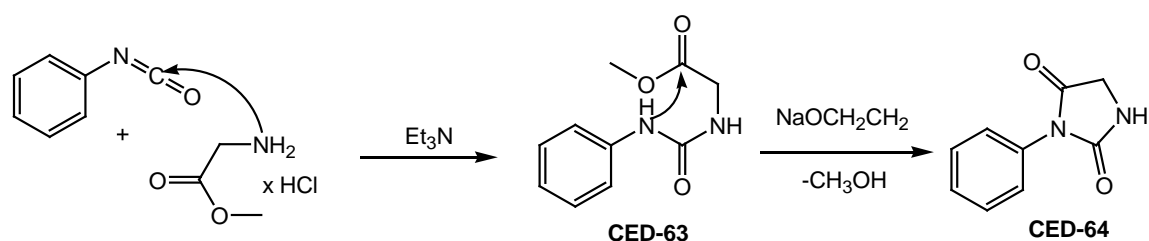


Abbildung 60: Synthese des 3-Phenylhydantoins CED-64

Die erfolgreiche Durchführung der Aldolreaktion erweist sich allerdings als schwierig und führt zunächst nicht zum erwarteten Produkt. Die Synthese wird unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, welche als Übersicht in Abbildung 62 gezeigt sind.

Nach einer von Thenmozhiyal *et al.* ⁽¹⁷⁴⁾ beschriebenen und modifizierten Methode (III) lässt sich letztlich das angestrebte Produkt erhalten

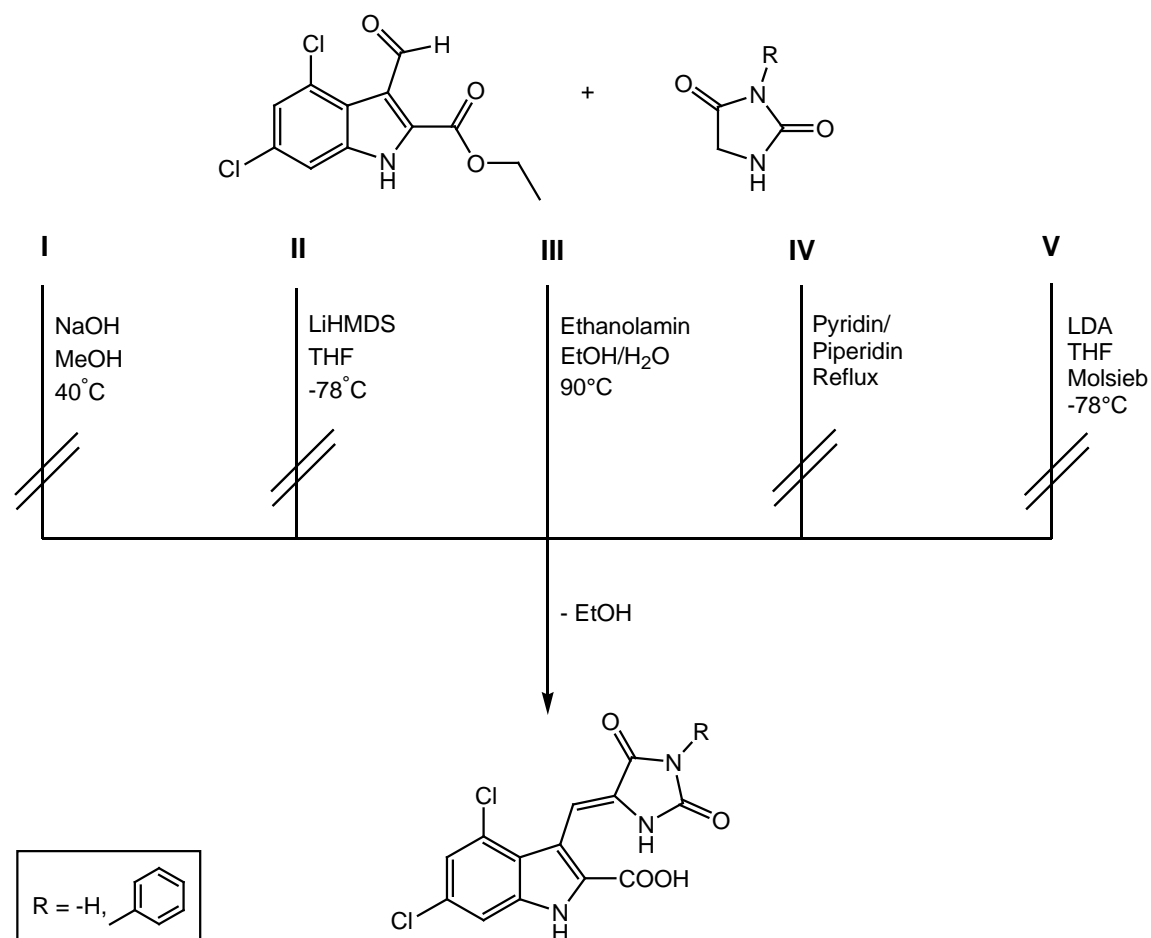


Abbildung 61: Übersicht der durchgeführten Aldolkondensation bei verschiedenen Reaktionsbedingungen; I⁽¹⁷²⁾, II⁽¹⁷³⁾, III⁽¹⁷⁴⁾, IV^{(175) (176)}, V⁽¹⁵⁴⁾

Im Rahmen der Syntheseführung nach Thenmozhiyal *et al.* wird nach vollständiger Lösung des Hydantoin in Wasser der pH-Wert mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf 7,0 eingestellt. Erst dann erfolgt die Zugabe der Base Ethanolamin unter langsamer Temperaturerhöhung auf 90 °C und anschließendem Zutropfen des Aldehyds.

Dass eine Carbonylreaktion bei einem bestimmten pH-Wert schneller oder besser verläuft als in stärker saurem oder basischem Milieu, ist häufig in der Literatur beschrieben⁽¹⁵⁴⁾. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der gesamten Aldolreaktion um eine reine Gleichgewichtsreaktion handelt, hängt die Ausbeute der Produkte oder das generelle Gelingen der Umsetzung stark von den Reaktionsbedingungen (jeweiliger pH-Wert, Temperatur) ab. In Abbildung 62 wird der

Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Aldolkondensation im Einzelnen betrachtet.

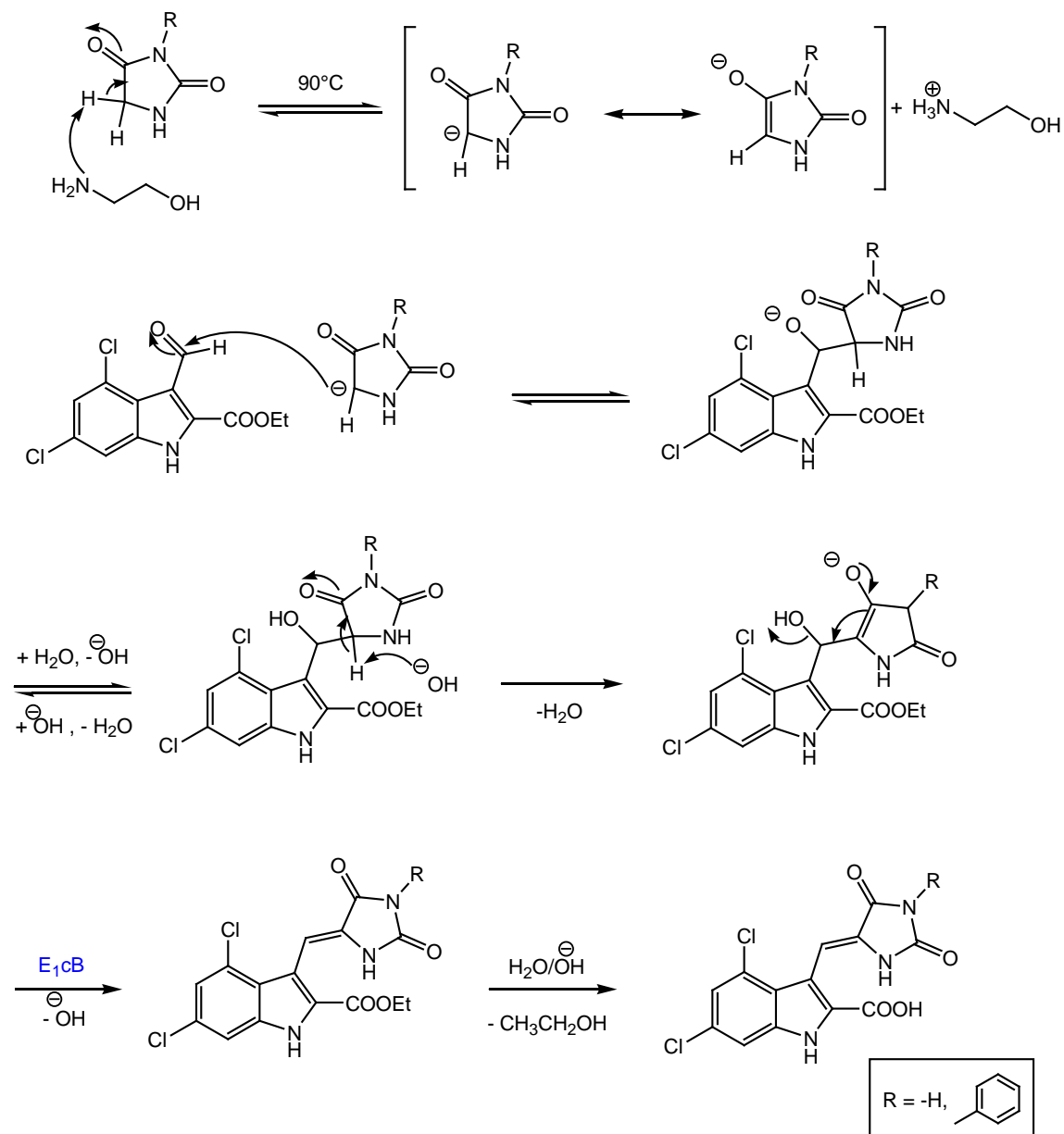


Abbildung 62: Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Aldolkondensation

Durch den $-I$ -Effekt der Carbonylfunktion zur α - CH_2 -Gruppe an Position 5 des Hydantoins wird diese polarisiert (CH-acide) und das Proton ist bereits mit Ethanolamin abspaltbar, woraufhin sich ein mesomeriestabilisiertes Enolat-Anion ausbildet. Dieses addiert sich an das positivierte Kohlenstoffatom des Aldehyds

(Carbonylkomponente) unter Bildung des Aldol-Anions, welches wiederum als Base durch das vorhandene Wasser zur β -Hydroxycarbonylverbindung (Aldol) protoniert wird. Unter Abspaltung des zweiten α -Protons entsteht basenkatalysiert nach einem E_1cB -Mechanismus eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung.

Aufgrund der wässrig- basischen Reaktionsbedingungen kommt es bereits während der Durchführung der Aldolreaktion teilweise zur Verseifung der Ethylesterfunktion an Position 2 des Indols. Um eine quantitative Umsetzung zur freien Carbonsäure zu erhalten, wird nach der bereits in Abschnitt 3.4.2.3 beschriebenen Methode mit 2 N NaOH-Lösung in einer THF/Wasser-Mischung hydrolysiert.

Schutzgruppen

In einem weiteren Versuch der erfolgreichen Synthese der Aldolkondensationsprodukte erfolgt die Einführung von Schutzgruppen am N-1 des formylierten Indolcarbonsäureethylesters (CED-7). Dieses Vorgehen scheint sinnvoll, da es aufgrund der z.T. stark basischen Bedingungen im Verlauf der Aldolkondensation zu einer Deprotonierung am Indol-N kommt und die Carbonylreaktivität an Position 3 des Indols herabgesetzt wird⁽¹⁵³⁾. Ihr Einsatz soll diese mögliche Reaktivitätsabnahme unterbinden und die Reaktionsausbeute steigern.

Als Reagenzien werden Vinylchloroformiat und Di-*tert*-butylcarbonat verwendet, die beide mit dem Stickstoff des Indols ein Carbamat bilden und so unter den basischen Reaktionsbedingungen der Aldolkondensationen stabil sind (vgl. Abbildung 63). Der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe ist dabei der Vorzug zu geben, da sie sich im Zuge der Aufarbeitung mit verdünnten Säuren wieder nahezu quantitativ abspalten lässt.

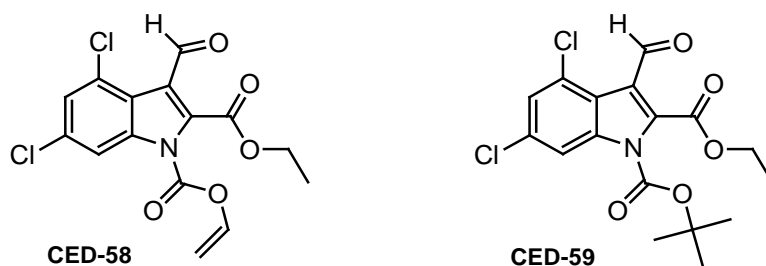


Abbildung 63: CED-7 mit unter basischen Bedingungen stabilen Schutzgruppen an N-1

Die Verwendung des N-Boc-geschützten Indol-3-carbaldehyd-Derivats CED-59 erweist sich als nur wenig vorteilhaft. Zwar lässt sich eine Steigerung der Ausbeute der Aldolkondensationsprodukte erzielen, was jedoch durch den zusätzlichen Reaktionsschritt der Entschützung relativiert wird.

Diastereomere

Aufgrund der entstandenen semicyclischen C=C-Doppelbindung ist die Entstehung von Diastereomeren der Indolmethylenehydantoin-Derivate wahrscheinlich.

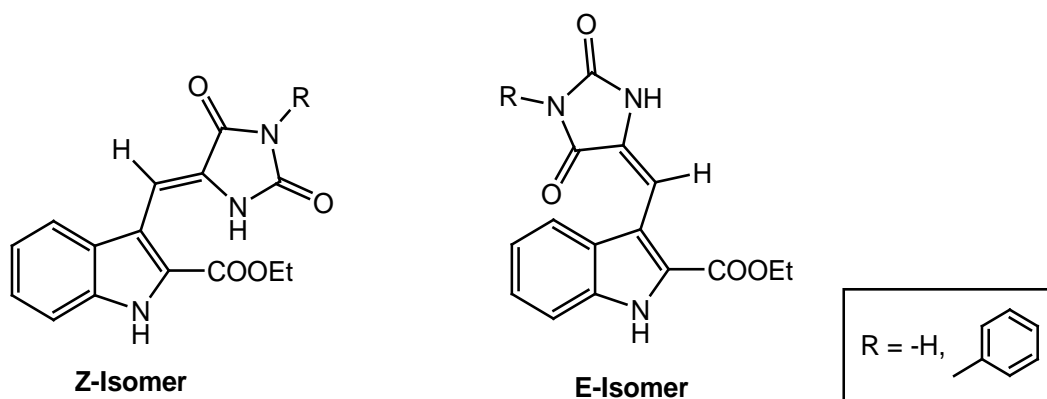


Abbildung 64: Mögliche entstandene Diastereomere durch basenkatalysierte Aldolkondensation; zur besseren Übersicht sind die Diastereomere ohne Substituenten am Indol-2-carbonsäureethylester-Grundgerüst gezeigt

Ob dabei bevorzugt die *Z*-oder die *E*-Form gebildet wird lässt sich in der Regel anhand der vicinalen Kopplungskonstanten der Vinyl-Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum feststellen. Dabei ist die Konstante der *trans*-Kopplung stets höher als die der *cis*-Kopplung und liegt zwischen 11-19 Hz im Gegensatz zu 5-14 Hz⁽¹⁵¹⁾. Aufgrund der Tatsache, dass das Methylen-Proton der dargestellten Verbindungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als Singulett erscheint, ist die Nachweismethode in diesem Fall nicht anwendbar.

Tan *et al.* ist es gelungen, bei ähnlichen Strukturen eine eindeutige Identifizierung der stereoisomeren Form vorzunehmen^{(177), (178)}, indem sie anhand ^1H -spektroskopischer Untersuchungen die chemische Verschiebung der Methylen-, der N-1- sowie der *ortho*-Protonen charakterisieren konnten. Durch den magne-

tischen Anisotropie-Effekt der 4-Carbonylfunktion ist das Vinyl-Proton der *Z*-Form entschirmt und im Gegensatz zum *E*-Isomer tieffeldverschoben. Auch das NH-Proton der Hydantointeilstruktur findet sich im tieferen Feld wieder.

Gezeigt werden konnte daher, dass sich unter basenkatalysierten Bedingungen der Aldolkondensation mit einem aromatischen Aldehyd und einem 1-N-unsubstituierten Hydantoin ausschließlich die *Z*-Form ausbildet.

Aufgrund der vermuteten stereoselektiven Bildung nur einer diastereomeren Form und dem Fehlen von Vergleichsmöglichkeiten der Verschiebung von Signalen zwischen *E*- und *Z*-Form im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, wird auch in diesem Fall zur Aufklärung der Konfiguration die Methode der $^1\text{H-NOE}$ -Differenz-spektroskopie herangezogen.

Nach Einstrahlen der entsprechenden Resonanzfrequenz in das Signal des Protons der Methylengruppe kann, aufgrund des Fehlens jeglicher Resonanzsignale, gezeigt werden, dass die C=C-Doppelbindung wie erwartet *Z*-konfiguriert ist.

3.5 Variation der sauren Funktion an Position 2 des Indolgrundgerüsts

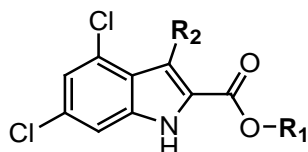
3.5.1 Überblick

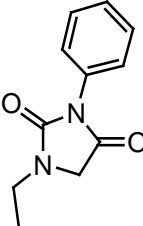
In der vorangegangenen Dissertationsarbeit von Jansen ⁽¹⁴⁵⁾ wurde bereits versucht, die saure Funktion an Position 2 des Indolgrundgerüsts insoweit zu modifizieren, dass es zu einer verbesserten Ausprägung der pharmakokinetischen sowie physikochemischen Eigenschaften kommt, ohne dabei die ausgeprägten Affinitäten der Carbonsäurederivate am Rezeptorprotein zu vermindern. Dabei wurden mehrere Struktureinheiten entwickelt, die in Abschnitt 5.1.2.6 gezeigt sind.

Um die Reihe der z.T. bioisosteren ⁽¹⁷⁹⁾ Teilstrukturen zur Carboxylgruppe zu erweitern wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Hydroxamsäure- bzw. eine Hydroxamsäuremethyletherfunktion eingeführt. Dabei wird als Grundstruktur

auch ein 4,6-Dichlorindol-Derivat gewählt um später direkte Vergleiche, nur die Säurefunktion betreffend, vornehmen zu können. Zusätzlich dazu erfolgt der Austausch der Carbonsäure durch eine Hydroxamsäurefunktion bei dem 4,6-Dichlor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-Derivat (CED-9).

Tabelle 7: Übersicht der 4,6-Dichlorindolcarbonsäurederivate mit unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2



Verbindung	R ₁	R ₂
CED-4	-H	-H
CED-5	-NHOH	-H
CED-6	-NHCH ₃	-H
CED10	-NHOH	

3.5.2 Synthese der Hydroxamsäurederivate

Zur Darstellung von Hydroxamsäuren wird in der Regel ein Carbonsäurechlorid mit Hydroxylaminderivaten umgesetzt die eine freie NH-Funktion aufweisen ⁽¹⁵⁴⁾. Durch Verwendung einer Vorschrift nach Summers *et al.* ⁽¹⁸⁰⁾ mit Oxalylchlorid gelingt es dabei, die Ausbeute auf 65 % der Theorie zu erhöhen, im Gegensatz zu einer Reaktionsführung mit Thionylchlorid mit nur einer Produktbildung von 13 % der Theorie.

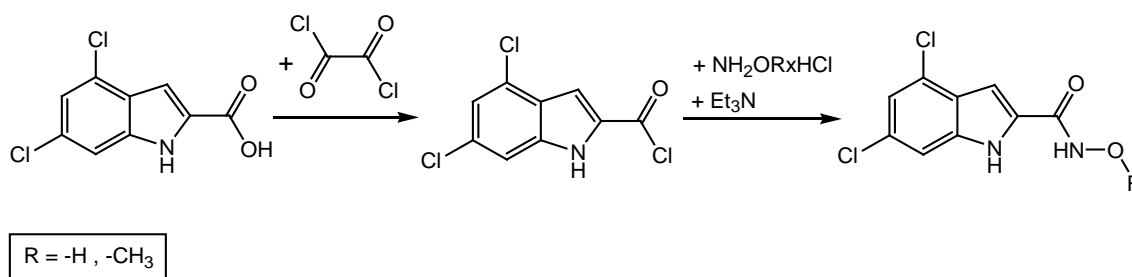


Abbildung 65: Übersicht der Hydroxamsäure- bzw. Methylether-Bildung mit Oxalylchlorid

Die Bildung der Hydroxamsäure ist im IR-Spektrum durch eine Verschiebung der CO-Valenzschwingung von 1683 cm^{-1} zu tieferen Wellenzahlen zu beobachten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist je ein Singulett bei 9,27 und bei 11,41 ppm gezeigt und den Protonen der NH- bzw. OH-Gruppierung zuzuordnen. Im Fall des Methoxycarbamid-Derivates ist zusätzlich noch ein Signal bei 2,88 ppm zusehen. Außerdem ist die Bildung eines tiefrot gefärbten Eisen(III)-Komplexes nach Zugabe einer Eisen(III)-chlorid-Lösung ein weiterer Hinweis für die erfolgreiche Synthese.

3.6 Valproinsäurederivat

Durch die Kombination der hochaffinen 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure mit Valproinsäure, welche unter anderem spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen-Kanäle blockiert, wird ein möglicher dual affiner Ligand dargestellt.

Dabei gibt es generell verschiedenen Möglichkeiten, ein Hybrid-Molekül aus zwei bekannten Liganden zu entwickeln. Zum einen den überlappenden Typ (Typ I), bei dem einzelne Strukturmerkmale der Liganden zu einem neuen Liganden kombiniert werden. Zum anderen den verbundenen Typ (Typ II), bei dem die gesamten Strukturen beider Liganden direkt oder über einen Spacer miteinander verbunden sind.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Prinzip entspricht dem Typ I.

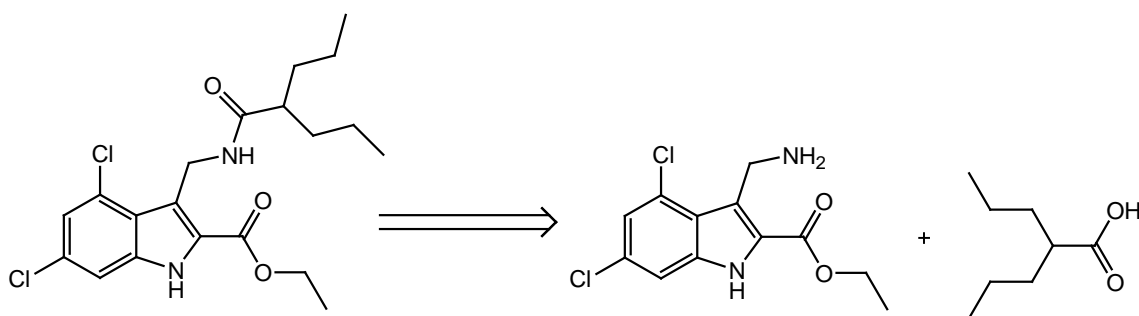


Abbildung 66: Erster Schritt der retrosynthetischen Betrachtung des Hybridmoleküls CED-13

Um die Valproinsäure amidisch mit dem Indol-3-carbaldehyd CED-7 verknüpfen zu können ist zuerst eine Überführung in eine Aminomethylfunktion notwendig.

3.6.1 Darstellung der Aminomethylfunktion als Kopplungspartner

Um eine Aminomethylfunktion an Position 3 des Indols zu erhalten, wird der 4,6-Dichlor-3-formylindol-2-carbonsäureethylester (CED-7) mit Hydroxylamin-HCl und Pyridin als Katalysator zum entsprechenden Aldoxim umgesetzt, welches dann leicht zum Amin reduziert werden kann. Als Reduktionsmittel wird Zinkpulver in Eisessig gewählt, wobei mit wasserfreiem Natriumacetat gepuffert wird. Diese Reaktionsführung in Anlehnung an die *Clemmensen*-Reduktion⁽¹⁸¹⁾ ermöglicht die selektive Reduktion des Oxims, ohne den vorhandenen Ester zu beeinflussen. Durch die Fällung des freienamins mit ethanolischer HCl wird das gewünschte Produkt als Hydrochlorid erhalten.

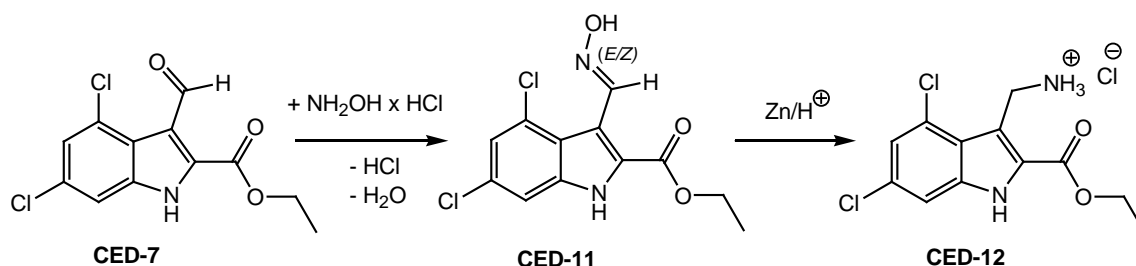


Abbildung 67: Schema der Überführung des Aldehyds in eine Aminomethylfunktion

3.6.2 Kopplung mit Valproinsäure

Das dargestellte Amin CED-12 wird anschließend mit Hilfe des Kopplungsreagenzes 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDCI) amidisch mit Valproinsäure nach einer modifizierten Vorschrift nach Kumar *et al.* ⁽¹⁸²⁾ verknüpft. EDCI, welches vor allem in der Proteinchemie eine große Rolle spielt, weist gegenüber anderer Carbodiimiden wie beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) den Vorteil der besseren präparativen Handhabung sowie der geringeren Nebenproduktbildung auf. Der Reaktionsmechanismus wird dabei wie in Abbildung 69 dargestellt diskutiert ⁽¹⁸³⁾. Zuerst bildet sich aus Valproinsäure und dem Carbodiimid ein O-Acylisoharnstoff. Dieser ist als aktivierte Carbonsäure aufzufassen und kann sich insbesondere bei Abwesenheit eines Nucleophils in ein stabileres N-Acylharnstoffderivat umlagern (vgl. Abbildung 68).

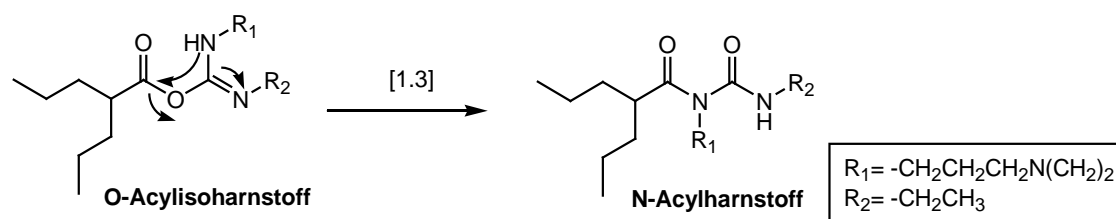


Abbildung 68: 1,3-sigmatrope Umlagerung des O-Acylisoharnstoffderivat zum inaktiven N-Acylharnstoffderivat

Um diese Nebenreaktion weitestgehend zurückzudrängen, wird das als Hilfsnucleophil fungierende N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zugegeben. Dieses greift den O-Acylisoharnstoff nucleophil an, wobei das EDCI als Harnstoffderivat abgespalten wird. Der so entstandene Aktivester ist durch den Elektronenzug des Stickstoffs aktiviert und kann leicht durch das zu verkuppelnde Amin nucleophil angegriffen werden, wobei der freie O-Acylisoharnstoff aber auch direkt mit dem Amin reagiert. Unter Rückbildung des eingesetzten HOBt erfolgt die Amidbildung zum angestrebten Produkt CED-13.

Chemischer Teil

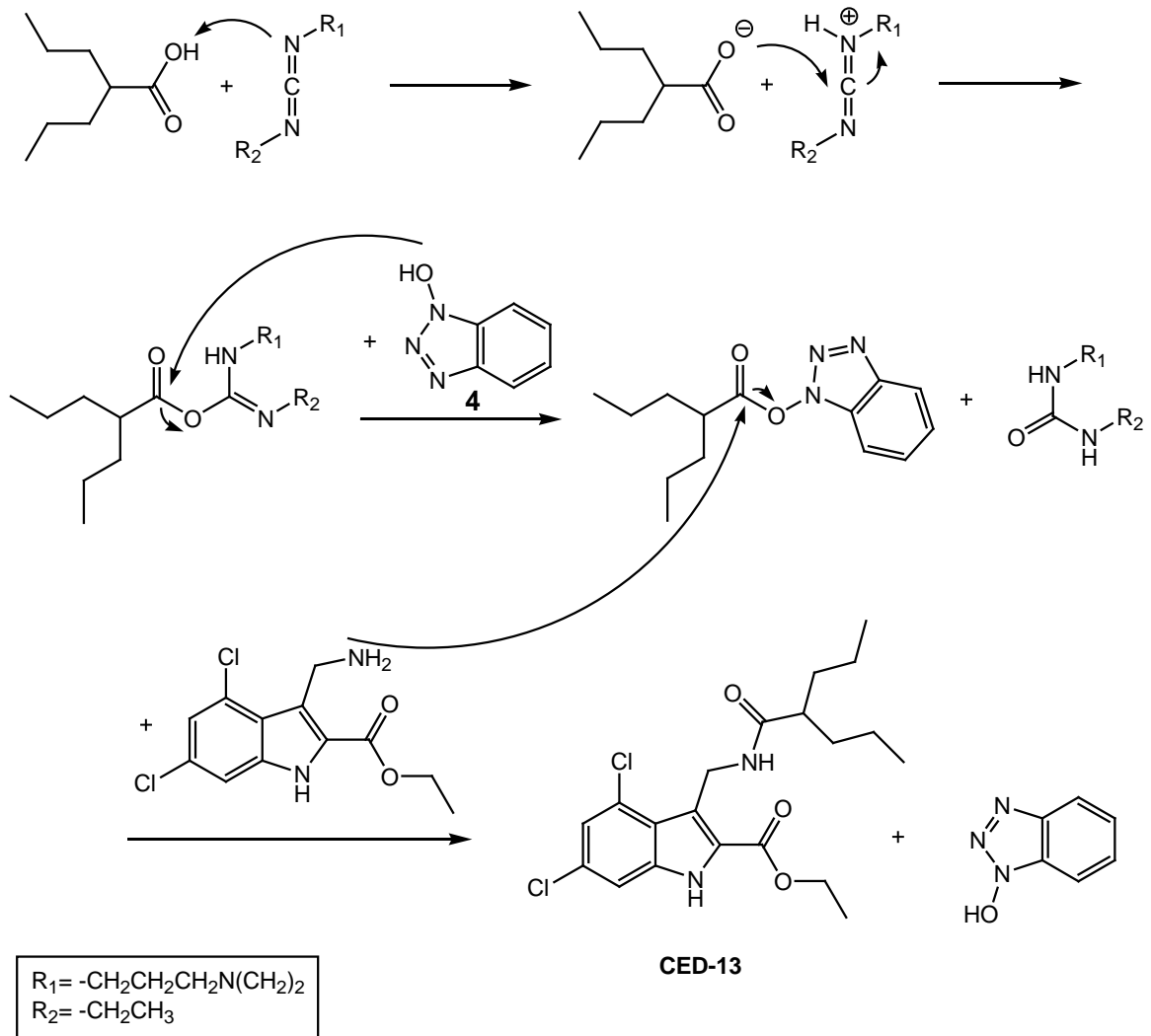


Abbildung 69: Reaktionsmechanismus der Amidbildung mit EDCI und HOBT

4 Biochemische und physikochemische Testmethoden

Die im Vorfeld beschriebenen synthetisierten Verbindungen sollen schließlich anhand bio- und physikochemischer Testmethoden pharmakologisch, toxikologisch sowie physikochemisch charakterisiert werden.

Von Interesse sind dabei in erster Linie die Affinitäten der einzelnen Testsubstanzen zur Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors, die bereits parallel während der Durchführung der Synthesen untersucht werden und dabei zu einer gezielten Optimierung der strukturellen Modifikationen führen sollen. Hierfür wird ein Verdrängungsassay mit einem radioaktiv markierten Liganden an Schweinehirnmembranen herangezogen, der schnell zu aussagekräftigen Ergebnissen führt.

Desweiteren wird die Zytotoxizität mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zellviabilitätsassays (XTT-Test) an MM 6-Zellen bestimmt.

Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit, insbesondere zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, soll außerdem die Lipophilie durch Bestimmung des log P-Wertes ermittelt werden. Zum einen wird dieser mit Hilfe einer potentiometrischen Titrationmethode bestimmt, und zum anderen eine HPLC-Methode angewendet.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Rösch, Institut für Kernchemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, sollen [^{18}F]-markierte Liganden in einem bildgebenden, nuklearmedizinischen Verfahren - der Positronen-Emissions-Tomographie - zur Visualisierung der NMDA-Rezeptoren im Gehirn führen und somit gleichzeitig die Permeationsfähigkeit der Liganden durch die Blut-Hirn-Schranke untersucht werden.

Im Folgenden wird auf die Durchführung, sowie den theoretische Hintergrund der einzelnen Testmethoden genauer eingegangen.

4.1 Bindungsstudie zur Bestimmung der Affinität zu der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors

Die Affinitäten der synthetisierten Liganden zu der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors werden über eine Bindungsstellenanalyse mit einem radioaktiv markierten Liganden in einem Verdrängungsassay an Schweinehirn-Homogenaten bestimmt.

Die Durchführung erfolgt nach einem im Arbeitskreis etablierten und im Verlauf der vorliegenden Arbeit modifizierten Verdrängungsassay mit dem Radioliganden [³H]MDL-105,519.

4.1.1 Radioligand-Bindungsstudien

Radioligand-Bindungsstudien können als eine einfache, aber dennoch sehr effektive Methode zur Aufklärung verschiedener Rezeptorinteraktionen sowie -eigenschaften angesehen werden. Sie sind daher zu einem wichtigen Werkzeug im Prozess der Wirkstoffentwicklung sowohl im Rahmen der akademischen als auch der industriellen Forschung geworden, da ihre Durchführung als einfach zu handhaben und vielfältig einsetzbar gilt, sowie darüber hinaus einen hohen Probandendurchsatz zulässt. Weiterhin erlauben sie neben der Untersuchung von Interaktionen von beispielsweise Neurotransmittern und Hormonen mit den entsprechenden Rezeptoren auch die Charakterisierung regulatorischer Veränderungen der Rezeptoranzahl, ihrer Verteilung oder der physiologischen Funktion⁽¹⁸⁴⁾.

An die Versuchsbedingungen von Bindungsstellenanalysen werden im Allgemeinen folgende Anforderungen gestellt.

- reversible Bindung zwischen Rezeptorprotein und Radioligand
- Sättigbarkeit des Rezeptors
- möglichst lineare Dosis-Abhängigkeit der Ligandenbindung am Rezeptor
- hohe Spezifität des eingesetzten radioaktiv markierten Liganden⁽⁶⁰⁾

Im Rahmen der Untersuchung wird dann die Verdrängung des Radioliganden durch die Testsubstanzen am Rezeptorprotein bestimmt. Hierzu werden die Testverbindungen mit einer definierten Menge an Protein-Homogenat, welches

den Rezeptor enthält, in Anwesenheit des Radioliganden inkubiert bis sich ein Bindungsgleichgewicht eingestellt hat. Anschließend erfolgt die Trennung des ungebundenen Anteils des Radioliganden vom gebundenen Anteil, wobei in den meisten Fällen die Technik der Membranfiltration eingesetzt wird. Auf die Affinität der zu untersuchenden Verbindung kann letztlich aus der kompetitiven Verdrängung des Markers von der Bindestelle des Rezeptors durch die Testsubstanz geschlossen werden ⁽¹⁸⁵⁾, indem die zurück gebliebene Radioaktivität mit einem geeigneten Verfahren bestimmt wird.

4.1.1.1 Radioligand

Als Radioliganden können endogene Liganden oder hochaffine Agonisten bzw. Antagonisten an der Rezeptorbindungsstelle verwendet werden. Es hat sich gezeigt, dass eine hohe Affinität zum Target von großem Vorteil ist, wodurch die Konzentration des Liganden im durchgeführten Assay so gering wie möglich gehalten werden kann und folglich eine geringere Ausprägung einer unspezifischen Bindung resultiert. Weiterhin bedingt ein hohes Maß an Affinität eine geringere Dissoziationsrate vom Rezeptor.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wird der tritiierte Ligand [³H]MDL-105,519 (*[E]*-3-(2-Phenyl-2-carboxyethenyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure eingesetzt, welcher in Abbildung 70 gezeigt ist.

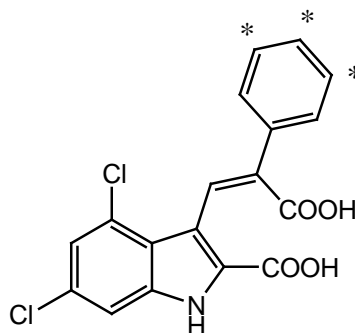


Abbildung 70: Struktur des Radioliganden [³H]MDL-105,519 (*[E]*-3-(2-Phenyl-2-carboxyethenyl)-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäure); * bezeichnet die Positionen der Tritiumatome

Dieser Marker kann als ein Hybridmolekül aus den für die Affinität erforderlichen Struktureinheiten von MDL100,748⁽¹⁸⁶⁾ und MDL100,458⁽¹⁸⁷⁾ welches das optimale Grundgerüst darstellt, betrachtet werden⁽¹⁸⁸⁾ (vgl. Abbildung 71).

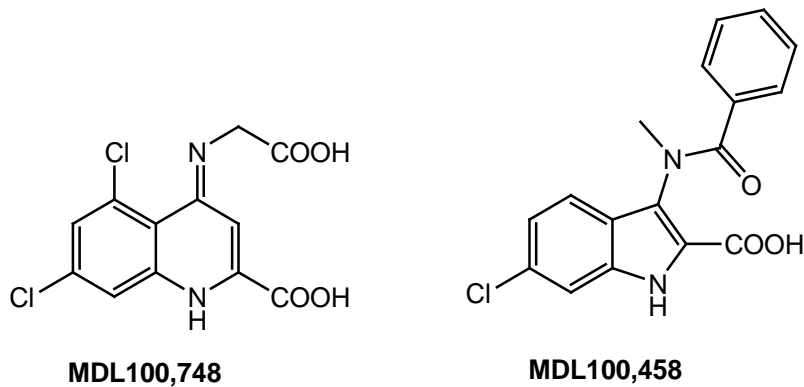


Abbildung 71: Strukturen von MDL100,748 (4-Carboxymethylamino-5,7-dichlorchinolin-2-carbonsäure) und MDL100,458 (3-(Benzoylmethylamino)6-chloro-1H-indol-2-carbonsäure)

Als Hybridstruktur führt er zu einer multiplikativen Steigerung der Rezeptoraffinität, im Vergleich zu beiden Leitstrukturen sowie anderen häufig eingesetzten, radioaktiv markierten Liganden der Glycinbindestelle wie [³H]glycin und [³H]DCKA⁽¹⁸⁹⁾. Dabei zeichnet er sich gleichzeitig durch einen hohen Grad an Selektivität zur Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors aus⁽¹⁸⁸⁾.

Der Einbau von Tritiumatomen führt in der Regel weder zu einer Veränderung der chemischen noch der pharmakologischen Eigenschaften. Ganz im Gegenteil zu Markern mit Fluoreszenzlabel, bei denen eine Neuoptimierung der Struktur vor der Bindungsanalyse durchgeführt werden muss⁽¹⁹⁰⁾.

4.1.1.2 Gewebe-Homogenate

Als Gewebe-Homogenate dienen feinverteilte Suspensionen rezeptortragender Zellmembranpartikel, deren Gewinnung in diesem Fall aus Schweinehirnen erfolgt, wobei nur die Bereiche entnommen werden, für die eine hohe Dichte an den entsprechenden Rezeptoren bekannt ist. Die Verwendung von Schweinehirnen bietet dabei im Vergleich zur oft beschriebenen Membranpräparation aus Rattenhirnen einen großen ethischen Vorteil unter Umgehung von Tierversuchen.

Beim Schlachten der Schweine fällt ihr Hirn in der Regel als Abfallprodukt an, wodurch ein hoher Verbrauch an Versuchstieren vermieden werden kann.

Nach Überführung in ein hypotones Medium erleiden die Zellen einen osmotischen Schock, wodurch es dann zu ihrer vollständigen Auflösung unter Freisetzung der Zellorganellen kommt. Als besonders kritischen Schritt in der Aufarbeitung werden die nachfolgenden Wasch- und Zentrifugationsschritte angesehen, die mit großer Sorgfalt durchgeführt werden müssen, um die in nativen Geweben vorkommenden hohen Konzentrationen an freier Glutaminsäure und Glycin zu entfernen, die sonst zu Verfälschungen der Messwerte führen.

4.1.1.3 Unspezifische Bindung

Wie zuvor erläutert bindet der Radioligand [³H]MDL105,519 hochaffin und selektiv an der Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors. In höheren Konzentrationen allerdings kommt es wie bei allen Rezeptorbindungsexperimenten in gewissem Maß zu einer unspezifischen Bindung an andere biologische oder künstliche Strukturen. Beispielsweise treten Liganden, die die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenausbildung aufweisen dann mit in Gewebepräparationen enthaltenen Proteinen in schwache Wechselwirkung oder lipophile Liganden binden an Lipide, die wiederum in Membranpräparationen immer anwesend sind. Neben anderen Proteinen und Gewebebestandteilen kann es sich dabei auch um nichtbiologische Strukturen wie etwa Mikrotiterplatten oder Inkubationsröhrchen handeln⁽⁶⁰⁾, die ebenfalls potentielle Haftstellen für Radioliganden darstellen. Um diesen Sachverhalt zu berücksichtigen, muss bei jedem Bindungsstudienexperiment die unspezifische Bindung mitbestimmt werden.

Im Rahmen der durchgeführten Testbedingungen wird das mit der Verwendung eines 100 bis 1000fachen Überschusses eines nicht markierten Liganden mit bekannter Pharmakologie und Bindungsverhalten anstelle der Testsubstanz realisiert. Der Überschuss führt zu einer kompetitiven Verdrängung der Testsubstanz vom NMDA-Rezeptor, also der spezifischen Bindestelle, die unspezifische Bindung bleibt unberücksichtigt⁽¹⁹¹⁾. Dieser Anteil kann dann radioaktiv erfasst

werden. Bei der Auswertung erfolgt schließlich die Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtbindung und man erhält die tatsächliche Bindung der Testverbindungen an der Glycinbindestelle des Rezeptors.

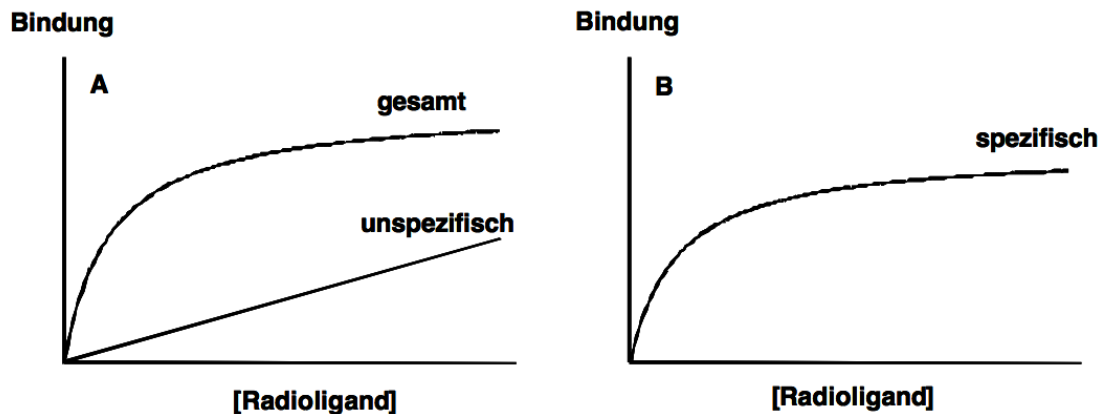


Abbildung 72: A: Im Gegensatz zur unspezifischen Bindung zeigt die gesamte Bindung eine Sättigungskinetik. B: Nach Subtraktion der unspezifischen Bindung von der gesamten Bindung ergibt sich die spezifische Bindung

4.1.1.4 Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmethode

Nach der Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioligand - meist durch Filtration - wird der gebundene Anteil durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Dabei besteht im Fall von Tritium als β -Strahler die Problematik einer nur sehr geringen Reichweite der Strahlung von 6 mm, welche die direkte Erfassung der Radioaktivität beispielsweise mit einem Zählrohr nicht erlaubt. Sie wird daher indirekt mit Hilfe von Flüssigszintillatoren bestimmt.

Das Prinzip der Flüssigszintillationsmethode (LSC = Liquid Scintillation Counting) besteht darin, dass die radioaktive Probe mit dem Messmedium, einem flüssigen Szintillator, gemischt wird, wodurch ein so enger Kontakt zwischen strahlenden Atomen und Szintillatormolekülen hergestellt wird, dass selbst kurzreichweitige β -Strahlung wie von ^3H ($E_{\text{max}}=18$ keV) gemessen werden kann. Die Besonderheit der Messmethode liegt darin, dass Probe und Messmedium eine Einheit bilden und sich somit gegenseitig beeinflussen. Die Energie eines

β -Teilchens wird zunächst durch die Lösungsmittelmoleküle absorbiert und erzeugt in diesen elektronische Anregung. Diese Anregungsenergie wird von den Lösungsmittelmolekülen auf die Szintillatormoleküle übertragen, wodurch diese ebenfalls angeregt werden und beim Übergang in den Grundzustand Lichtquanten aussenden. Die Lichtquanten fallen auf eine Photokathode und lösen dort Elektronen aus, die im Weiteren in einem Photomultiplier zu einem messbaren Impuls verstärkt werden. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 73 veranschaulicht.

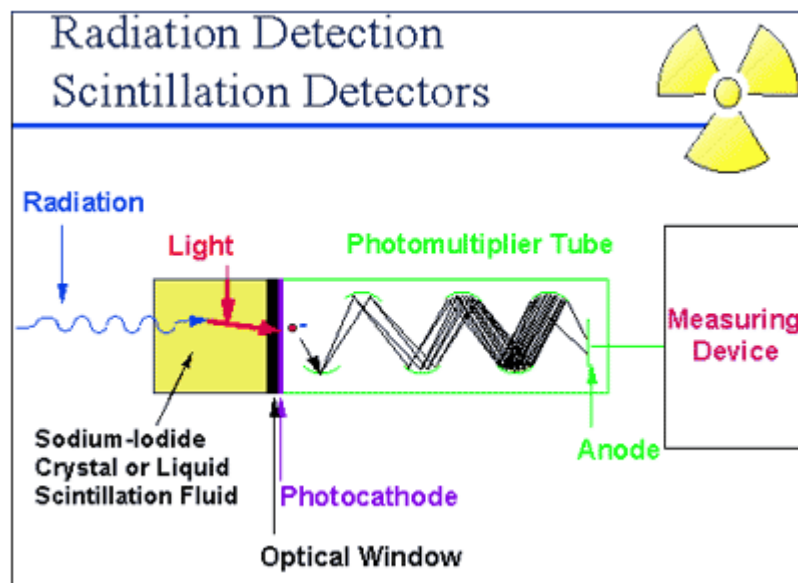


Abbildung 73: Schematischer Überblick der Szintillationsmethode

Das Gerät registriert also die radioaktiven Zerfallsereignisse innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls, die als cpm (counts per minute) angegeben werden. Verwendet wird aber die Aktivitätsangabe dpm (decays per minute), Zerfälle pro Minute, die aus den cpm berechnet werden können, wenn die Zählrohrbeute des Gerätes berücksichtigt wird.

4.1.2 Praktische Durchführung

4.1.2.1 Membranpräparation

Die Aufarbeitung der Schweinehirne erfolgt angelehnt an eine bereits vielfach in der Literatur beschriebene Vorschrift^{(192), (193), (194)}.

Dabei werden zwei Hirne von frisch geschlachteten Schweinen unverzüglich nach der Entnahme auf Eis gekühlt und direkt mit der Aufarbeitung begonnen. Dabei ist es wichtig, über den ganzen Zeitraum der Präparation zu kühlen, weshalb auf einer umgedrehten, mit Eis gefüllten Kristallisierschale gearbeitet wird.

Zuerst erfolgt die gründliche Entfernung der Hirnhaut mit einer Pinzette. Aufgrund des literaturbekannten Vorkommens einer hohen Dichte an NMDA-Rezeptoren im Cortex^{(195), (196)}, wird dieser gräuliche Teil sehr sorgfältig abgezupft, wobei es so gut wie möglich vermieden wird, andere Hirnbestandteile ebenfalls zu erfassen. Der weiße, innere Bereich des Schweinehirns wird verworfen. Die Cortexstücke werden unverzüglich in einen eisgekühlten Sucrose-TRIS-Puffer gegeben, bis eine Menge von ca. 4 g Cortex gewonnen wurde. Nach Überführung des Gemisches in ein Pottergefäß wird mit Sucrose-TRIS-Puffer auf 33,0 g Gesamtinhalt aufgefüllt und mit zehn Schlägen eines Potter-Elvehjem versetzt. Die so entstandene Suspension wird mit frischem Puffer zu einer Gesamtmenge von 150,0 g ergänzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Das erhaltene Homogenisat wird gleichmäßig auf 8 Zentrifugenröhrchen verteilt und nach dem folgenden Schema entsprechend mit Hilfe einer Ultrazentrifuge aufgearbeitet:

1. Zentrifugation 4200 rpm; 8 min; 4 °C: der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen dekantiert und austariert, das Pellet wird verworfen
2. Zentrifugation 16000 rpm; 30 min; 4 °C: der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 15 ml Milliporewasser 30 Sekunden im Ultraturrax homogenisiert und austariert.
3. Zentrifugation 10000 rpm; 30 min; 4 °C: Buffy Coat-Methode: der Überstand wird zusammen mit dem weichen Pelletanteil in ein neues

Zentrifugenröhrchen dekantiert und austariert, nur das ganz feste, herzförmige Pellet wird verworfen.

4. Zentrifugation 25000 rpm; 30 min; 4 °C: der Überstand wird dekantiert und verworfen, das Pellet wird mit jeweils 5 ml 5 mM Tris-Puffer resuspendiert, in ein 200 ml Becherglas überführt und jedes Röhrchen 2 Mal mit Puffer nachgespült (Poolen der Suspension). Die Mischung wird erneut mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert und wieder gleichmäßig auf 8 Zentrifugenröhrchen verteilt.
5. Zentrifugation 30000 rpm; 30 min; 4 °C: dieser Zentrifugationsschritt wird 6 Mal wiederholt, um vor allem Glutaminsäure- und Glycinreste quantitativ zu entfernen.

Von einem Röhrchen wird der Überstand schließlich verworfen, das Pellet in 8 ml 5 mM Tris-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt für die gesamte Charge eingestellt.

Die Aufarbeitung kann nach jedem Schritt durch Einfrieren der Suspension bei -80 °C unterbrochen werden. Nach dem Auftauen im Schüttelwasserbad (37 °C) wird dann erneut mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und mit der Aufarbeitung fortgefahren.

Mit jeder so erhaltenen neuen Hirnmembrancharge werden vor der Verwendung im Bindungsexperiment mit Testsubstanzen die Affinitäten von Vergleichssubstanzen mit bekanntem Bindungsprofil bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden als Referenzverbindungen 5,7-Dichlor-thiokynurensäure, 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure sowie L-689,560 als Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors eingesetzt.

Für die Verwendung im Bindungsexperiment wird das Pellet eines Zentrifugationsröhrchens in 40 ml 50 mM TRIS-Puffer aufgenommen und mit dem Ultra-Turrax zu einer feinverteilten Suspension homogenisiert.

4.1.2.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Um eine definierte Menge an Protein pro Volumen Hirnsuspension im Bindungsassay bereitstellen zu können, muss zuerst der Proteingehalt nach einer geeigneten Methode bestimmt werden.

Die Einstellung des gewünschten Proteingehalts erfolgt nach dem Standardverfahren nach *Bradford*⁽¹⁹⁷⁾.

Dabei muss zunächst eine Proteinverdünnungsreihe angefertigt werden, um später eine Kalibriergerade erstellen zu können.

Die Durchführung ist wie folgt:

1. Aus der BSA-Stammlösung (Bovines Serum Albumin) werden je 100 μl / 80 μl / 60 μl / 40 μl / 20 μl / 0 μl mit 5 mM TRIS-Puffer auf 100 μl Gesamtlösung versetzt und in dreifacher Ausführung hergestellt.
2. 5 ml Coomassie-Brilliant-Blue G-250-Lösung werden jeweils zu den Protein-Verdünnungen gegeben und homogenisiert.
3. Frühestens 2 Minuten und längstens 60 Minuten nach Inkubation wird die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines UV-Spektrometers gemessen.
4. Von der Hirnsuspension werden 100 μl und 50 μl in 100 μl Gesamtsuspension mit 5 mM TRIS-Puffer wie beschrieben dreifach vermessen.
5. Die Kalibriergerade erhält man durch Auftragen des Proteingehalts in μg der Verdünnungsreihe gegen die Absorption.

Die Proteinsuspension wird so auf die Zentrifugenröhrchen verteilt, dass am Ende 5333 μg Protein pro Röhrchen enthalten sind.

4.1.2.3 [³H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassay

Das Prinzip des [³H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassays beruht darauf, dass der Radioligand, der, wie beschrieben, einen hochaffinen, selektiven Antagonisten an der Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors darstellt, zusammen mit NMDA-Rezeptor enthaltenen Protein-Homogenaten unter Zugabe der Testverbindung inkubiert wird. Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichtes nach einer definierten Zeit, wird der Ansatz über eine Glasfasermembran abfiltriert,

wobei der ungebundene Anteil des Radioliganden durch den Filter gezogen wird, während das Rezeptorprotein mit gebundenen Liganden auf dem Filter verbleibt. Erfolgt die Filtration dabei schnell genug, so ist die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität ein Maß für die Fähigkeit der Testverbindung den Radioliganden kompetitiv vom Rezeptor zu verdrängen. Es gilt, je niedriger die zurückgebliebene Radioaktivität, desto höher ist das inhibitorische Potential und damit die Affinität der Testverbindung zur Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors.

Im Folgenden wird detailliert auf die Durchführung eingegangen.

Der Inhalt eines Zentrifugenröhrchens, der Proteinsuspension mit einem Gehalt von 5333 µg Protein enthält, wird langsam im Schüttelwasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend 30 Minuten bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 50 mM TRIS-Puffer (pH 7,4) aufgenommen, mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach erfolgtem Waschvorgang wird das Pellet erneut nach Zugabe von 50 mM TRIS-Puffer resuspendiert und mit diesem auf 40 ml aufgefüllt, so dass eine Protein-Konzentration von ca. 50 µg pro Messeinheit resultiert. Für die Herstellung der Verdünnungsreihen werden die zu testenden Verbindungen in einer Mischung aus gleichen Teilen von DMSO und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 1000 µl gelöst, so dass jeweils eine 10^{-2} molare Stammlösung resultiert. Bei sich schlecht lösenden, sauren Verbindungen kann gegebenenfalls ein Fünftel des Wassers durch 0,1 M NaOH-Lösung ersetzt werden. Aus der jeweils so erhaltenen Stammlösung werden Verdünnungen in Konzentrationen von 10^{-3} M; 3×10^{-4} M; 10^{-4} M; 3×10^{-5} M; 10^{-5} M; 3×10^{-6} M; 10^{-6} M; 3×10^{-7} M; 10^{-7} M und 3×10^{-8} M mit 50 mM TRIS-Puffer hergestellt (1000 µl).

Für die Durchführung des Bindungsexperiments werden jeweils 50 µl dieser Teststoffverdünnungen in einem Inkubationsröhrchen mit 50 µl der 20 nM [3 H]MDL105,519-Lösung versetzt. Zur Bestimmung der Gesamtbindung (Total Bound) erfolgt anstelle der Testsubstanzlösung die Zugabe von 50 µl 50 mM TRIS-Puffer-Lösung, sowie zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (Non-Specific Bound) der Ersatz der Testsubstanzverdünnung unter Verwendung von 10^{-2} M Glycin-Lösung. Jede Bestimmung erfolgt dabei in doppelter Ausführung.

Im Abstand von 10 Minuten werden dann zu jeweils 24 Inkubationsröhrchen 400 µl der eisgekühlten Hirnsuspension pipettiert und homogenisiert. Pro Testeinheit ist die Charakterisierung von 4 Testverbindungen möglich. Es ergibt sich das in Tabelle 8 dargestellte Pipettierschema.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Durchführung des [³H]MDL105,519-Assays

Pipettierschema	Bound	Non-Specific-Bound	Testverbindung
50 mM TRIS-Puffer	50 µl	-	-
10 ⁻² M Glycin-Lsg.	-	50 µl	-
Testsubstanzlsg. (10 ⁻³ -3x10 ⁻⁸ M)	-	-	50 µl
20 nM [³ H]MDL- 105,519-Lsg.	50 µl	50 µl	50 µl
Hirnsuspension	400 µl	400 µl	400 µl

Das Endvolumen der Messansätze beträgt demnach 500 µl, wodurch eine weitere Verdünnung der Testsubstanzen um eine Zehnerpotenz im Gesamtinkubationsmedium erfolgt ist. Die Testverbindungen werden also letztlich in Konzentrationen von 10⁻⁴ M; 3x10⁻⁵ M; 10⁻⁵ M; 3x10⁻⁶ M; 10⁻⁶ M; 3x10⁻⁷ M; 10⁻⁷ M; 3x10⁻⁸ M; 10⁻⁸ M und 3x10⁻⁹ M bestimmt. Wird im Rahmen der ersten Testung eine sehr hohe Affinität mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich gefunden, so wird eine weitere Testung unter Verwendung niedriger konzentrierter Verdünnungen durchgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von exakt 60 Minuten werden jeweils 24 Proben in Mikrotiterplatten pipettiert und die Ansätze daraus mit Hilfe einer Filteranlage über Glasfaserfilterzuschnitte unter Vakuum abgesaugt und dreimal mit 4 ml 50 mM TRIS-Puffer nachgewaschen. Dieser Schritt muss dabei so schnell wie möglich erfolgen, da sonst die Dissoziation des gebundenen Radioliganden vom Rezeptor erfolgt und nicht mehr als gebundener Anteil radioaktiv erfasst werden kann. Die Verwendung einer eisgekühlten Puffer-Lösung wirkt diesem Effekt zusätzlich entgegen.

Die Filterstellen, an denen sich der am Rezeptor gebundene Ligand befindet, werden ausgestanzt, in Szintillationsröhrchen überführt und mit 5 ml Szintillatorlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden, möglichst bis die Filter transparent geworden sind, wird erneut mit Hilfe eines Rüttlers gemischt und schließlich die auf den Filtern zurückgebliebene Radioaktivität mit einem Flüssigszintillationszähler bestimmt.

4.1.2.4 Auswertung

Die spezifische Bindung (Specific Bound = SB) des Radioliganden ist aus den bereits erläuterten Gründen eine auf direktem Wege nicht messbare Größe; es wird im Verlauf der Bindungsstudie die Gesamtbindung bestimmt, wobei diese sich aus der spezifischen und der unspezifischen Bindung zusammensetzt. Durch Überführung der Messergebnisse in das Programm Excel werden diese mit Hilfe einer voreingestellten Berechnung normalisiert. Man erhält die spezifische Bindung indem die unspezifische Bindung (Non Specific Bound = NSB) des Glycins von der Gesamtbindung (Total Bound = TB) sowie der Bindung nach Verdrängung des [³H]MDL105,519 (Bound = B) subtrahiert werden.

Es gilt folgende Beziehung:

$$\text{Spezifische Bindung SB [\%]} = \frac{\text{B} - \text{NSB}}{\text{TB} - \text{NSB}} \times 100$$

Abbildung 74: Formel zur Bestimmung der Spezifischen Bindung SB

Der Wendepunkt der durch halblogarithmische Auftragung der Konzentration gegen die jeweiligen berechneten Werte erhaltene Kurve gibt die Konzentration an, bei der 50 % der Bindung des Radioliganden zum Rezeptor durch die Testsubstanz inhibiert wird.

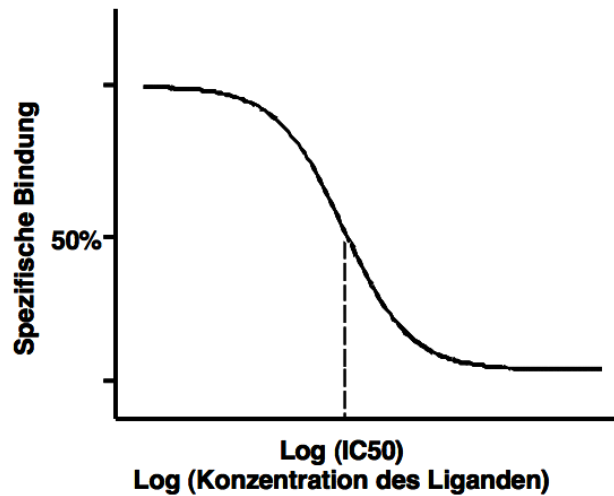


Abbildung 75: Verlauf der Hemmungskurve bei halblogarithmischer Auftragung der Konzentrationen der Testsubstanz gegen die spezifische Bindung in %

Mit Hilfe eines „nonlinear regression“ Programms wird die mittlere inhibitorische Konzentration, ausgedrückt als IC_{50} -Wert, der jeweiligen Testverbindung bestimmt. Dazu wird die Konzentration in μM halblogarithmisch gegen den bindenden Anteil an Radioligand in % aufgetragen. Es resultiert ein annähernd sigmoider Kurvenverlauf, aus dem der IC_{50} -Wert ermittelt werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird dazu die Software GraphPad PRISM 3.03⁽¹⁹⁸⁾ verwendet.

Bei bekanntem K_d -Wert (Dissoziations-Konstante) des Radioliganden (K_d [3H]MDL105,519 = 3,73 +/- 0,43 nM) kann anschließend noch der entsprechende K_i -Wert (Inhibitions-Konstante) mit Hilfe der *Cheng-Prusoff* Gleichung⁽¹⁹⁹⁾ ermittelt werden.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\frac{1 + [L]}{K_D}}$$

$[L] = \text{Konz. } [^3H]\text{MDL105,519}$
 $K_D = \text{Dissoziationskonstante}$

Abbildung 76: Formel zur Bestimmung der Inhibitions-Konstante K_i

4.2 XTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität

Die Bestimmung der Toxizität einer Substanz in einem therapeutischen Konzentrationsbereich stellt ein wichtiges Kriterium bei der Arzneistoffentwicklung dar. So kann eine nachgewiesene Toxizität die mögliche Eignung als Arzneistoff ausschließen. Um dabei das Toxizitätsprofil frühzeitig abschätzen zu können, werden schnelle, zellbasierte *in vitro*-Methoden eingesetzt, wie es der kommerziell erhältliche „Cell Proliferation Kit II (XTT)“ bietet und dessen Durchführung routinemäßig im Arbeitskreis etabliert ist.

4.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die Durchführung des Viabilitätsassays erfolgt an der humanen, monozytären Suspensionszelllinie Mono Mac 6 (MM 6), die aus dem Blut von Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde.

Im Verlauf der Durchführung wird die Vitalität bzw. der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe gemessen.

Der Assay basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3'-[1-Phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzyl-sulfonsäure (XTT) zu einem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan-Derivat (vgl. Abbildung 77). Diese Reaktion findet extrazellulär an der Plasmamembran lebender Zellen statt und wird durch mitochondrial produziertes NADH über transmembranären Elektronentransport vermittelt ⁽²⁰⁰⁾. Die Konzentration an entstandenem Formazan wird dann direkt über eine Absorptionsmessung in einem ELISA-Reader ermittelt und korreliert mit der Vitalität der lebenden Zellen.

Um den Elektronentransfer von NADH auf das Tetrazolium-Salz zu erleichtern, erfolgt die Zugabe des Elektronen-Kupplungsreagens PMS (N-Methylphenazinium-Methylsulfat) ^{(201), (202), (203), (204)}.

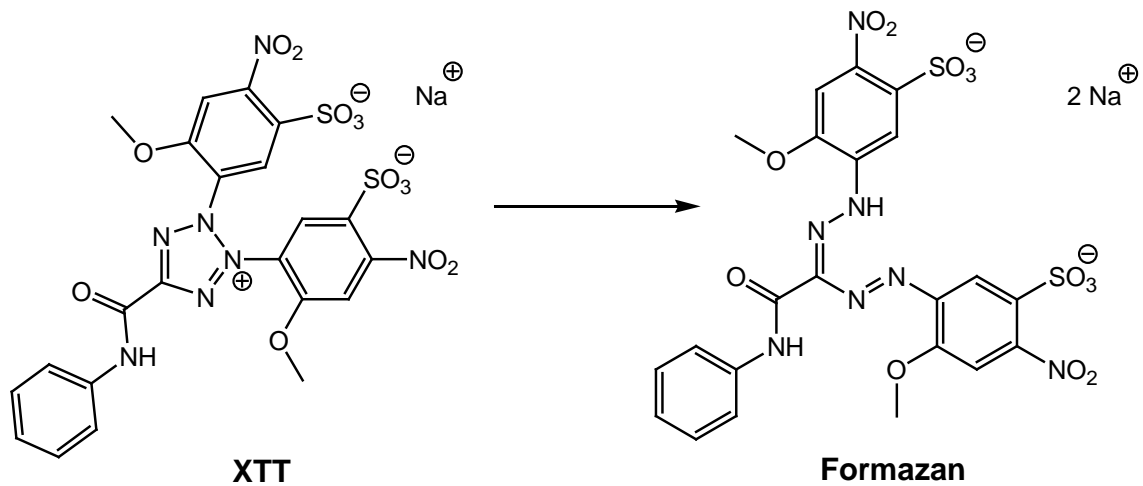


Abbildung 77: Metabolisierung des gelben Tetrazolium-Salzes XTT zum orangefarbenen Formazan-Derivat durch MM-6 Zellen

4.2.2 Kultivierung der Mono Mac 6-Zellen

Die Kultivierung erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 40 ml Routinemedium für Mono Mac 6-Zellen. Im Brutschrank werden die Zellen als offenes System standardmäßig bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert, wobei sie zweimal wöchentlich passagiert werden. Um die Zellpopulation dabei möglichst homogen zu halten, werden sie jeweils nur ein halbes Jahr kultiviert und anschließend durch kryokonservierte Zellen ersetzt.

4.2.3 Zellzählung

Bei der Arbeit mit Zellsuspensionen sind definierten Zelldichten notwendig, um später reproduzierbare sowie miteinander vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Für die Quantifizierung wird dabei eine Neubauer-Zählkammer verwendet, mit deren Hilfe eine Zellzahl von 1,25 x 10⁶/ml folgendermaßen eingestellt wird.

1. Die Neubauer-Zählkammer wird mit einem Deckglas unter dem Mikroskop plaziert.

2. In einem Eppendorf-Cap werden je 20 μl Zellsuspension und Trypanblau-Lösung miteinander vermischt.
3. 20 μl der Suspension werden unter das Deckglas pipettiert und unter dem Mikroskop, bei 5facher Vergrößerung, in den 4 Eckquadraten der Neubauer-Zählkammer (je 0,1 μl) lebende und tote Zellen gezählt.
4. Zelldichte pro ml = Anzahl lebender Zellen x 5000

4.2.4 Durchführung des XTT-Assays

Die Durchführung des Assays erfolgt in 96-well Mikrotiterplatten, wobei pro Platte 10 Testsubstanzen und 2 Blindproben aufgetragen werden. Die Testsubstanz-Stammlösungen werden in DMSO hergestellt und auf Testkonzentrationen von 100 μM sowie 10 μM verdünnt.

1. Die MM 6-Zellen enthaltenen Zellkulturschalen werden unter die Laminar-Flow-Box gebracht und die Zellsuspension resuspendiert.
2. Die Zelldichte wird ermittelt und $1,88 \times 10^7$ Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.
3. Nach Zentrifugation bei $1400 \text{ min}^{-1}/400\text{g}$, 7 min wird der Überstand entfernt und die Zellen in 15 ml Routinemedium für MM 6 ohne Phenolrot resuspendiert.
4. In Eppendorfcaps werden jeweils 1 ml Zellsuspension und 2,5 μl Substanz-Stammlösung oder DMSO für die Blindlösungen vermischt. Davon erfolgt die Überführung von 100 μl in jedes Well, wobei der Inhalt eines Caps auf jeweils eine Reihe zu 8 Wells verteilt wird.
5. Die Mikrotiterplatten werden für 24 h im Brutschrank inkubiert.
6. Die Mikrotiterplatten werden erneut unter die Laminar-Flow-Box gebracht und mit der Mehrkanalpipette in jedes Well 50 μl einer Mischung aus 100 μl Elektronen-Kupplungs-Reagenz PMS und 5 ml XTT gegeben, wobei auf sorgfältiges Homogenisieren sowie Blasenfreiheit geachtet werden muss.

7. Mit dem ELISA-Reader werden nach 0, 30, 60, 90 und 120 min die Absorptionen bei 450 nm gemessen. Zwischen den Messungen werden die Platten im Brutschrank belassen.
8. Für die Berechnung der Zellviabilität sind die Messungen nach 120 min maßgeblich.

$$\text{Es gilt: Zellviabilität} = \frac{\text{Absorption (Substanz)}}{\text{Absorption (DMSO)}} \times 100\%$$

4.3 Log P-Wert-Bestimmung zur Beurteilung der Lipophilie

4.3.1 Theoretischer Hintergrund

Während in den meisten Organen ein intensiver Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet, ist dies im Gehirn nur beschränkt möglich. Hier ist das Kapillarblut durch Barrieren abgetrennt. Auf diese Weise kann im Hirngewebe ein spezielles, für die Neuronen und Gliazellen adäquates Milieu aufrechterhalten werden⁽²⁰⁵⁾. Gleichzeitig wird es vor Stoffen geschützt, die nicht in das ZNS gelangen sollen.

Um also eine ausreichende Bioverfügbarkeit zu erreichen und eine entsprechende Wirkung im ZNS entfalten zu können, müssen NMDA-Rezeptor-Antagonisten in der Lage sein, diese Barrieren zu überwinden.

4.3.2 Barrieren des ZNS

Im Zentralnervensystem lassen sich folgende 3 Barrieren zwischen Blut und Hirngewebe unterscheiden⁽²⁰⁶⁾.

- Blut-Hirn-Schranke
- zirkumventrikuläre Blut-Liquor-Schranke
- Blut-Liquor-Schranke im Plexus chorioideus

Der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird jedoch die größte Bedeutung beigemessen, da sie den Hauptteil der Barrierefunktion übernimmt. Sie wird von den Kapillarendothelzellen der zerebralen Blutgefäße gebildet, wobei die Gesamtoberfläche der luminalen Gefäßinnenseite zum Austausch zwischen Blut und Hirngewebe etwa $12 - 18 \text{ m}^2$ ⁽²⁰⁷⁾ beträgt. Diese Barriere besteht aus 3 Schichten: den zerebralen Kapillarendothelien, der darunterliegenden Basalmembran und schließlich den Fußfortsätzen der Astrocyten, deren Endigungen eng aneinander gereiht an der Basalmembran liegen und damit die äußere Schicht bilden. Sie dienen insbesondere der Stabilisierung, da ihre interzellulären Lücken so groß sind, dass sie kein Hindernis für den Stoffaustausch darstellen. Weiterhin befinden sich auf der Basalmembran noch Perizyten und Neuronen. Für die BHS in erster Linie verantwortlich ist aber das Endothel mit seinen besonders dichten Interzellulärverbindungen (tight junctions). Diese auch Zonula occludens genannten Membranbereiche stellen punktförmige Verschmelzungen der äußeren Schicht zweier gegenüberliegender Membranen dar. Auf diese Weise verschließen die tight junctions den Zellzwischenraum und bilden eine parazelluläre Barriere, die den Fluss von Molekülen über das Endothel kontrolliert und eine strikte Trennung des Interstitiums des Gehirns vom Kapillarlumen bedingt.

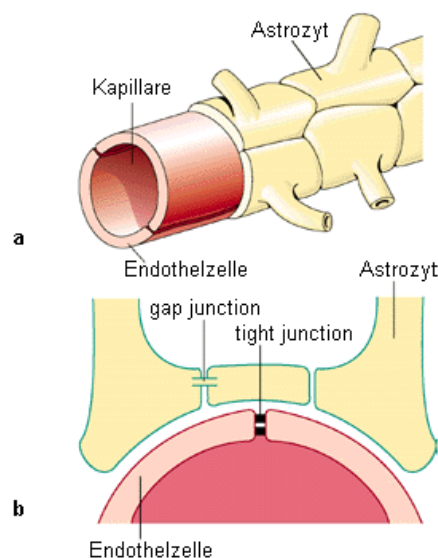


Abbildung 78: Blut-Hirn-Schranke; a) Zerebrale Kapillare besetzt mit Astrozyten; b) Schematischer Querschnitt einer zerebralen Kapillare

Neben der physikalischen Barrierefunktion der tight junctions spielen auch noch metabolische Prozesse eine wichtige Rolle. Durch den intensiven Stoffwechsel und eine umfangreiche Enzymausstattung der zerebralen Kapillarendothelzellen können lipophile, durch passive Diffusion eingetretene Substanzen metabolisch inaktiviert werden. Weiterhin existieren spezifische Efflux-Prozesse, die die Konzentration von unerwünschten Stoffen im Gehirn mittels ABC-Transporter-Efflux (ATP-binding cassette) gering halten. Einen besonders wichtigen Beitrag liefert die aktive Effluxpumpe P-Glykoprotein (Pgp), die u.a. in der luminalen Membran von Gehirnendothelzellen vorkommt und in die Membran eingedrungene, lipophile Stoffe zurück in das Lumen transportiert⁽²⁰⁸⁾. Aufgrund ihres sehr breiten Substratspektrums spielt sie eine große Rolle in der BHS-Überwindbarkeit von Arzneistoffen.

An allen 3 Oberflächen resultiert die Barrierefunktion also aus einer Kombination der verschiedenen Mechanismen⁽²⁰⁷⁾.

Um dennoch einen Stoffaustausch zwischen Kapillarblut und Hirngewebe und damit eine Versorgung des Gehirns zur Aufrechterhaltung der inneren Homöostase sicher zu stellen, existieren mehrere Transportmechanismen als Möglichkeiten des selektiven Stoffaustausches über die BHS, welche in Abbildung 79 gezeigt sind.

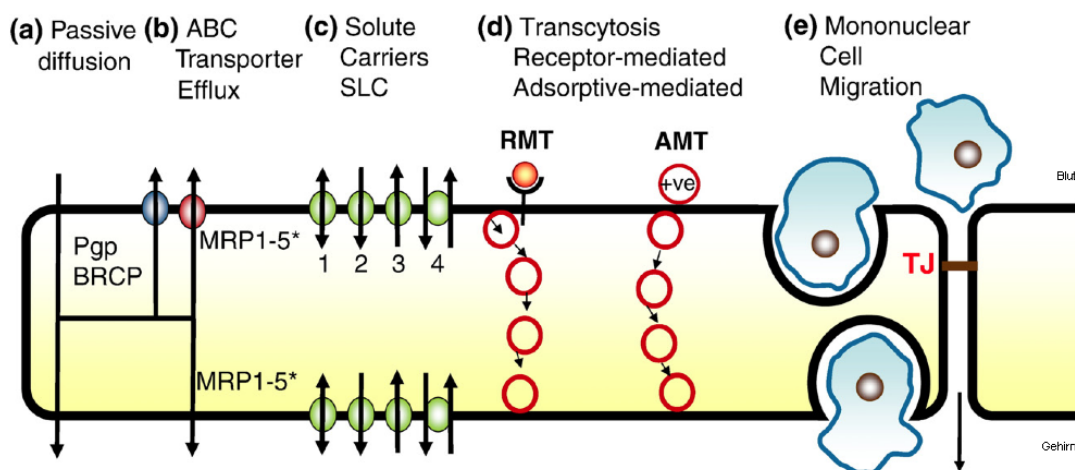


Abbildung 79: Transportmechanismen durch die Blut-Hirn-Schranke nach Abbott *et. al.*⁽²⁰⁷⁾
 Pgp=P Glycoprotein, BRCP= Breast Cancer Resistance Protein, MRP= Multi drug Resistance-associated Proteins, TJ= Tight Junctions

Weiterhin spielt die Plasma-Proteinbindung eine Rolle in der Befähigung eines Stoffes durch die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren. Erfolgt der Durchtritt durch den Prozess der passiven Diffusion, so ist das nur als freie Form möglich. Eine Bindung an Plasmaproteine verringert daher die Aufnahme. Besonders wichtig scheint dieser Sachverhalt für saure Strukturen zu sein, da das Albumin, welches für deren Bindung verantwortlich ist, mengenmäßig mit 40 g/l (ca. 600 μ M) die Hauptfraktion darstellt ⁽²⁰⁹⁾. Basische und neutrale Moleküle werden durch das α_1 -saure Glycoprotein durch das Blut transportiert.

4.3.3 Modulation der Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Verschiedene chemische Bestandteile des Blutplasmas, oder welche die durch Zellen sezerniert werden die in Verbindung mit der BHS stehen, beeinflussen ihre Permeabilität, ihre Transportmechanismen oder ihre Metabolisierungsprozesse. Dabei können sie die Funktionen sowohl beeinträchtigen, als auch verbessern und beispielsweise zu einer Abdichtung der Barriere führen ⁽²⁰⁶⁾.

Insbesondere bei pathophysiologischen Zuständen wird die Funktion der Blut-Hirn-Schranke, bedingt durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren, beeinträchtigt. So kommt es bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose, HIV, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Epilepsie, Hirntumoren und nach Schlaganfall oder Trauma zu einer erhöhten Durchlässigkeit oder einer Verminderung der Efflux-Mechanismen ^{(210), (211)}.

Dieser Sachverhalt lässt sich insbesondere bei der Anwendung therapeutischer Wirkstoffe in den jeweiligen pathophysiologischen Situationen ausnutzen.

4.3.4 Überlegungen zur Überwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke

4.3.4.1 Physikochemische Parameter

Um voraussagen zu können, wie wahrscheinlich ein Arzneistoff in der Lage ist biologische Membranen zu durchdringen, bedarf es der Betrachtung einiger physikochemischer Parameter. Lipinski formulierte dabei eine „Regel“ (rule of 5), mit deren Hilfe sich eine gute Absorption und Permeationsfähigkeit von Arzneistoffen abschätzen lässt⁽²¹²⁾. Dabei sollte ein Arzneistoff idealerweise folgende Eigenschaften aufweisen:

- Molekulargewicht < 500 g/mol
- $\log P_{n\text{-Octanol}} < 5$
- Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren < 5 (Summe der OHs und NHs)
- Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren < 10 (Summe von O und N)

Zur besseren Beurteilung der Befähigung zur Überwindung der BHS sind diese Überlegungen von Clark noch erweitert worden⁽²¹³⁾.

Es gilt:

- Summe von N und O < 5
- polare Oberfläche (polar surface area PSA) von $60 - 70 \text{ \AA}^2$
- Molekulargewicht < 450
- $\log D_{7,4}$ 1-3

Für Substanzen die über Transportsysteme durch die BHS gelangen, gelten diese Anforderungen jedoch nicht.

Die Effizienz des passiven Transports bzw. der Diffusion wird also wesentlich durch die Lipophilie, die Molekülgröße, den Ladungszustand sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des zu transportierenden Stoffes bestimmt. Während Moleküle mit zu geringer Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke nur unzureichend passieren können, birgt eine zu hohe Lipophilie die Gefahr der Akkumulierung innerhalb der Lipidmembran⁽²⁰⁷⁾.

4.3.4.2 Blut-Hirnschranken-Modell

Zur Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke werden vielfältige Methoden herangezogen, die am lebenden Tier (*in vivo*), an Geweben aus dem lebenden Tier (*ex vivo*), an kultivierten Zellen (*in vitro*) oder in biophysikalischen Modellen durchgeführt werden. Die Reduktion der komplexen Situation des Gehirns auf ein Zellkultur-Modell (*in vitro*) bietet dabei die Möglichkeit, unter definierten Laborbedingungen eine Vielzahl von kontrollierten und reproduzierbaren Untersuchungen durchzuführen, um das Phänomen der BHS weiter aufzuklären. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit dem Zellkultur-System ein leicht handhabbares System zur Überprüfung der Hirngängigkeit neuer Wirkstoffe zur Verfügung steht. Es ist der *in vivo*-Situation näher als beispielsweise Löslichkeitsversuche oder Verteilungsgleichgewichte, da die Transporterausstattung der *in vivo*-Situation ähnelt bzw. entspricht und ist weniger materialintensiv als Untersuchungsmethoden, die auf Tierversuchen basieren.

Aus Hirnkapillaren werden dabei isolierte Endothelzellen kultiviert, bis sie konfluente Monolayer bilden, die dann viele der *in vivo* Charakteristika der BHS zeigen⁽²¹⁴⁾.

Es hat sich gezeigt, dass *in vitro* Modelle mit Primärzellkulturen dabei den *in vivo* Gegebenheiten am ähnlichsten sind. Die Zellen weisen dann sowohl die typische Morphologie wie das ausschließlich einschichtige Wachstum, die Ausbildung von tight junctions und die Expression spezifischer Enzyme auf⁽²¹⁵⁾.

In Abbildung 80 ist exemplarisch ein *in vitro*-Modell dargestellt, bestehend aus mikrovaskulären Schweinehirnendothelzellen, die auf kollagenbeschichteten Filtermembran-Inserts kultiviert wurden bis sie einen konfluenten Monolayer ausbilden. Die Permeabilität wird gemessen, indem die Passage eines geeigneten Markers, der *in vivo* die BHS nur geringfügig passiert, von der apikalen Kammer über den Endothelzellmonolayer in die basolaterale Kammer bestimmt wird.

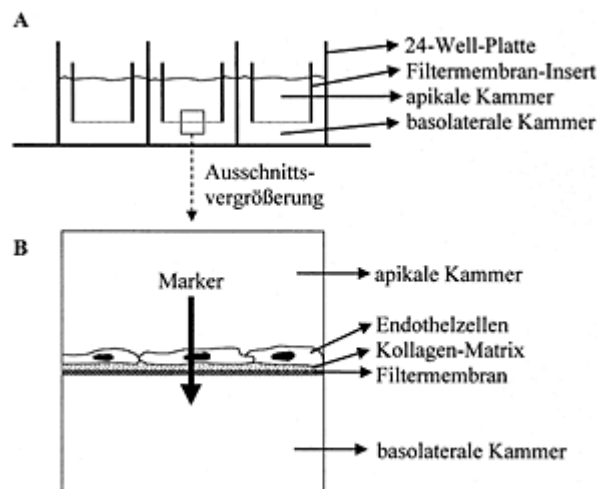
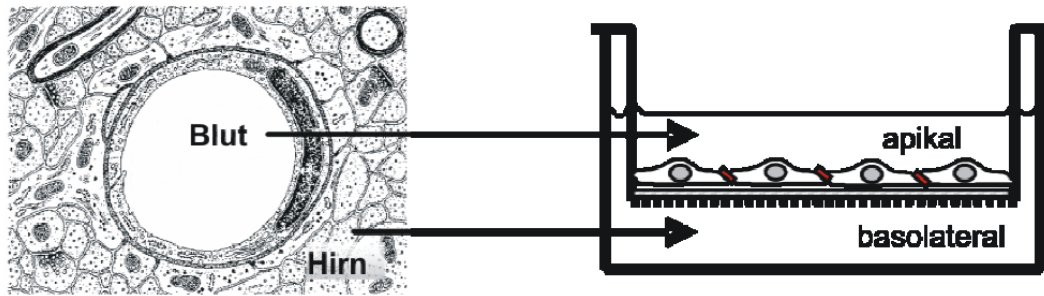


Abbildung 80: Schematische Darstellung des *in vitro*-Modells der Blut-Hirn-Schranke mit Monolayer cerebraler Kapillarendothelzellen von Schweinen; bedingt durch den polaren phänotypischen Aufbau der Zellen entspricht das Medium im apikalen (oberen) Kompartiment dem Blut im Kapillar-Lumen, das Medium im basolateralen (unteren) Kompartiment dem Extravasalraum des ZNS⁽²¹⁵⁾.

Im Rahmen der Arzneistoffentwicklung ist es also sinnvoll die Permeation eines Stoffes durch die Blut-Hirn-Schranke beurteilen zu können. Neben der Methode eines *in vitro* Blut-Hirn-Schranken-Modells besteht weiterhin die Möglichkeit zur Messung der Oberflächenaktivität⁽²¹⁶⁾, der computergestützten Bestimmung der 3-dimensionalen Struktur⁽²¹³⁾ sowie der Beurteilung der Lipophilie durch log P-Wert-Bestimmungen.

4.3.5 log P-Wert-Bestimmung

Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie einer Substanz erfolgt durch Bestimmung ihres log P-Wertes. Dieser stellt den dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten ($P = \text{partition coefficient}$) einer bestimmten Molekülspezies zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten dar. Als Zwei-Phasen-System findet vor allem ein *n*-Octanol/Wasser-System Verwendung.

Für die Definition des log P gilt:

$$\log P = \log \frac{[HA]_{n\text{-Octanol}}}{[HA]_{\text{Wasser}}}$$

HA = Konzentration einer
einprotonigen Säure

Abbildung 81: Formel zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten log P

Die Konzentrationen der Testverbindungen beziehen sich dabei jeweils auf den nichtionisierten Anteil.

Aufgrund der Tatsache, dass für die Permeationsfähigkeit durch die BHS einer Substanz aber die Lipophilie bei dem pH-Wert des Blutes von 7,4 von besonderem Interesse ist, und diese in dem pH-Bereich in verschiedenen Ladungszuständen vorliegen kann, ist es sinnvoller anstatt des log P-Wertes den log D-Wert anzugeben. Der log D (distribution coefficient) beinhaltet im Gegensatz zum log P nicht nur den Verteilungskoeffizienten einer Molekülspezies, sondern setzt sich aus dem Verhältnis der Summen aller vorkommenden Formen (ionisiert und nichtionisiert) in Abhängigkeit vom pH-Wert in den jeweiligen Lösungsmitteln zusammen. Aufgrund seiner pH-Abhängigkeit muss der pH-Wert, bei dem die Bestimmung erfolgt ist, angegeben werden.

Für undissoziierbare Strukturen ist der $\log P = \log D$ in jedem pH-Bereich.

Für die Definition des log D gilt:

$$\log D = \log \frac{\sum_1^N [c]_{n\text{-Octanol}}^X}{\sum_1^N [c]_{\text{Wasser}}^X}$$

N = Anzahl der Molekül-
formen
X = Ladung

Abbildung 82: Formel zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten D einer Molekülspezies

Die Bestimmung des log P-Wertes kann nach verschiedenen Verfahren erfolgen. Nach einer Ausschüttelmethode⁽²¹⁷⁾, einer RP-HPLC-Methode⁽²¹⁸⁾ oder einer potentiometrischen Methode durch Titration⁽²¹⁹⁾.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lipophilien über eine potentiometrische und eine HPLC-Methode bestimmt.

4.3.5.1 Potentiometrische log P-Wert-Bestimmung

Theoretischer Hintergrund

Durch das von Dyrssen *et al.*⁽²¹⁹⁾ entwickelte Verfahren der potentiometrischen Zwei-Phasen-Titration lassen sich die Lipophilien ionisierbarer Substanzen bestimmen. Diese Vorgehensweise wird durch die Beziehung zwischen der Lipophilie und dem pK-Wert einer Substanz ermöglicht.

Bestimmung des pK_a-Wertes

Zunächst müssen daher im wässrigen Medium durch potentiometrische Titration die Ionisationskonstanten (pK_a-Werte) der Testverbindungen ermittelt werden. Dabei wird ihre Löslichkeit in Wasser oder wässrigen Systemen vorausgesetzt, wobei eine Mindestlöslichkeit von 10⁻⁴ M gegeben sein muss⁽²²⁰⁾. Durch Titration von idealerweise vollständig protonierten Stoffen (sauer) zu vollständig deprotonierten (basisch) ergibt sich eine Titrationkurve, aus der mit Hilfe von Refine 200[®] der pK_a-Wert errechnet werden kann.

Es gilt:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad \begin{array}{l} HA = \text{protonierte Form} \\ A^- = \text{deprotonierte Form} \end{array}$$

Abbildung 83: Formel zur Bestimmung der Ionisationskonstante pK_a

Weisen die zu untersuchende Verbindungen eine zu geringe Löslichkeit auf, muss die Zugabe von Kosolventien, hier Methanol oder Dimethylsulfoxid, erfolgen.

Durch den Zusatz verringert sich die Dielektrizitätskonstante ϵ des Lösungsmittels. Durch Extrapolation auf ein kosolventfreies, wässriges System wird dann der wirkende pK_a -Wert einer Verbindung zugänglich. Die *Yasuda-Shedlovsky*-Gleichung beschreibt die lineare Abhängigkeit der Größe des messbaren pK_a -Wertes bei einem bestimmten Kosolvent/Wasser-Verhältnis (p_sK_a) von der Wasserkonzentration und der Dielektrizitätskonstante in dem verwendeten Gemisch ^{(221), (222)}.

$$p_s k_a + \log [H_2O] = \frac{A}{\epsilon} + B$$

A = Steigung der Geraden
B = Ordinatenabschnitt

Abbildung 84: Yasuda-Shedlovsky-Gleichung

Bei Kenntnis der p_sK_a -Werte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen lässt sich also durch Auftragung von ($p_sK_a + \log [H_2O]$) gegen $1/\epsilon$ in reinem Wasser extrapolieren und dadurch der pK_a -Wert im *Yasuda-Shedlovsky*-Plot mit dem Programm Refine 200[®] erhalten. Im Standardparametersatz von SIRIUS sind die Werte von $\log [H_2O]$ und $1/\epsilon$ für die eingesetzten Gemische, sowie die Änderung der Elektrodenparameter angegeben.

Bestimmung des log P-Wertes

Gibt man während der Titration ein der wässrigen Phase äquivalentes Volumen *n*-Octanol hinzu und titriert wieder auf den niedrigen pH-Wert zurück, so kommt es zu einer Verschiebung des pK_a -Wertes, wobei er bei sauren Funktionen erhöht und im Fall von basischen Gruppen erniedrigt wird. Man erhält den p_0K_a -Wert, welcher nur „scheinbar“ ist. Die beiden so erhaltenen Titrationskurven unterscheiden sich am deutlichsten im Pufferbereich der Säure, falls die protonierte Form in *n*-Octanol löslich ist ⁽²²³⁾. Die Differenz zwischen beiden Werten ist ein Maß für die Lipophilie der Säure, da gilt, je höher diese Differenz, desto lipophiler ist die Verbindung und damit ihr log P-Wert.

Die Titration einer einprotonigen Säure ist als vereinfachtes Beispiel anhand der Indol-2-carbonsäure in Abbildung 85 dargestellt. Neben dem pH-abhängigen

Gleichgewicht in Wasser (pK_a) existiert ein korrespondierendes Gleichgewicht in n -Octanol, der p_oK_a -Wert.

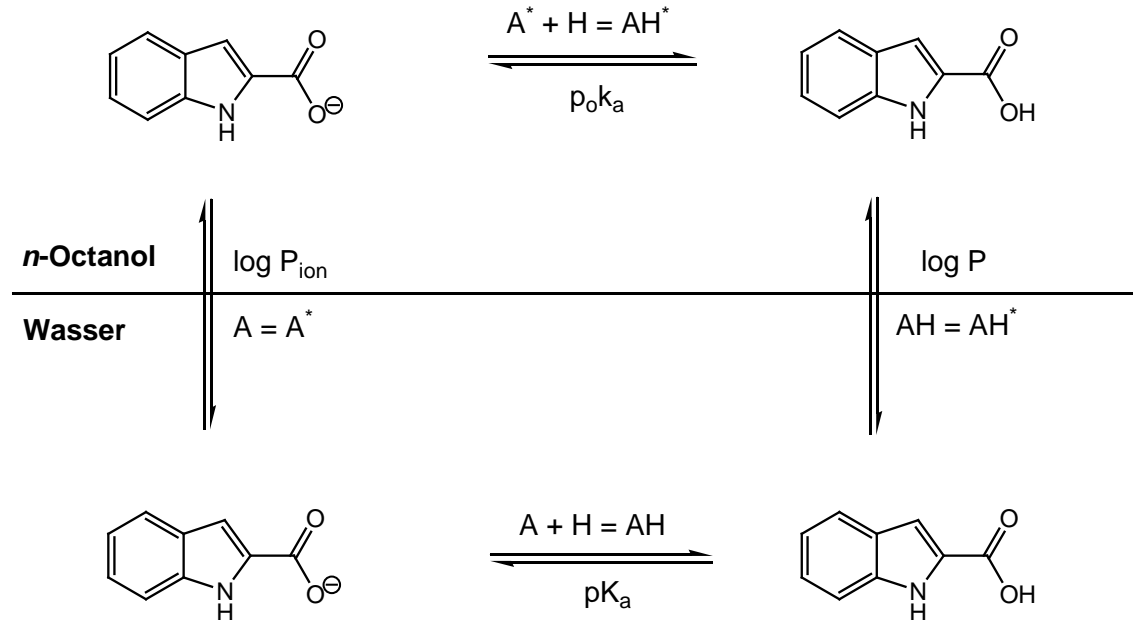


Abbildung 85: Dissoziations- und Diffusionsgleichgewicht bei der Titration einer einprotonigen Säure am Beispiel der Indol-2-carbonsäure in einem n -Octanol-Wasser-System modifiziert nach Scherrer *et al.*⁽²²⁴⁾
 * = Aufenthalt des Moleküls in der organischen Phase

Bei einem sehr niedrigen pH-Bereich liegt die Indol-2-carbonsäure protoniert vor, daher wird sich der Großteil undissoziiert in der n -Octanol-Phase wiederfinden. Wird im Laufe der potentiometrischen Titration der pH-Wert durch Zugabe von KOH-Lösung erhöht, wird der in der wässrigen Phase befindliche Anteil deprotoniert. Um jedoch die Hälfte der Neutralform in die entsprechenden Carboxylat-Anionen zu überführen, muss der pH-Wert auf einen höheren Wert eingestellt werden, als es dem pK_a -Wert im wässrigen Medium entspräche, da nach Le Chatelier die Moleküle erst aus der organischen Phase diffundieren müssen.

In die Berechnung des $\log P$ -Wertes mit Refine 200[®] geht also sowohl die Differenz der beiden experimentell ermittelten Ionisationskonstanten pK_a und p_oK_a , als auch das Verhältnis von n -Octanol zu Wasser mit ein⁽²²⁰⁾.

Vergleichbare Beziehungen lassen sich auch auf basische sowie mehrfach ionisierbare Verbindungen übertragen.

Um dabei korrekte Messergebnisse zu erzielen, müssen die Testverbindungen über den ganzen Titrationsbereich ausreichend gelöst bleiben. Das bereitet gerade bei der Titration der Ester Schwierigkeiten, die sich im gesamten pH-Bereich nur begrenzt lösen lassen, oder z.T. während der Titration ausfallen.

In dem Fall muss eine andere Bestimmungsmethode herangezogen werden. Die Bestimmung der log P-Werte erfolgt daher noch nach einer HPLC-Methode.

Praktische Durchführung

Die Durchführung der Potentiometrischen Titrationsen erfolgt halbautomatisch mit Hilfe des Mikrotitrators PCA 200[®] und anschließender Auswertung durch die zugehörige Software Control 200[®] und Refine 200[®]. Um eine potentielle CO₂-Aufnahme der Proben und damit eine Beeinflussung des pH-Wertes zu unterbinden, sowie eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, werden diese bei 25 °C +/- 0,5 °C unter Stickstoffatmosphäre titriert.

Zu Beginn jeder Messung ist eine „Blank Standardisation“ als Titration ohne Probe notwendig.

Anschließend wird eine ca. 1 mM-Lösung der Testverbindungen bei 3 verschiedenen Konzentrationen an Cosolvens (DMSO oder Methanol) über einen pH-Bereich von 2-11 titriert.

Analog erfolgt die Bestimmung der Lipophilie einer 1 mM-Testlösung mit 3 verschiedenen Volumina an *n*-Octanol.

4.3.5.2 Bestimmung des log-P-Wertes nach einer HPLC-Methode

Eluiert man Substanzen mittels einer Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) über eine RP-Säule (Reverse Phase), so bewegen sich diese durch Verteilung zwischen der mobilen, wässrigen und der stationären Phase entlang der HPLC-Säule. Die Elution der Substanz erfolgt dabei in Abhängigkeit von dem Verteilungskoeffizienten Wasser/RP-Phase, wobei polare Verbindungen zuerst und unpolare zuletzt eluiert werden. Dieser Sachverhalt ermöglicht es, Beziehungen zwischen der Retentionszeit t_r und dem *n*-Octanol/Wasser-Verteilungs-

koeffizienten herzustellen. Der Verteilungskoeffizient lässt sich durch die Bestimmung des Kapazitätsfaktors k ermitteln, wobei für k gilt:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \begin{array}{l} t_r = \text{Retentionszeit} \\ t_0 = \text{Totzeit} \end{array}$$

Abbildung 86: Formel zur Bestimmung des Kapazitätsfaktors k

Zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten werden von Substanzen mit bekanntem $\log P$ die Retentionszeiten ermittelt und unter Verwendung einer sehr hydrophilen Substanz, hier Thioharnstoff, die Totzeit bestimmt.

Durch Auftragung des $\log k$ gegen den $\log P$ und anschließender linearer Regression, lässt sich dann eine Kalibriergerade erstellen.

Aufgrund der Löslichkeitsunterschiede zwischen Carbonsäuren und Carbonsäureethylestern als Testverbindungen erfolgt die Bestimmung der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen mit 2 verschiedenen Fließmitteln, wodurch zwei verschiedene Kalibriergeraden resultieren.

Die $\log P$ -Werte der Referenzen wurden der *OECD-guideline for testing of chemicals* entnommen⁽²¹⁸⁾.

Tabelle 9: Experimentell bestimmte Retentionszeiten der Referenzsubstanzen; Fließmittel Acetonitril/Wasser 2:1

Referenzsubstanz	$\log P$	t_r [min]	$\log k$
Thioharnstoff	-0,92	2,0	0
Benzoessäure	1,9	2,71	-0,457
2-Naphtol	2,7	3,82	-0,046
Diphenylamin	3,4	7,67	0,45
Biphenyl	4,0	11,73	0,685
Phenanthren	4,5	16,23	0,85

Tabelle 10: Experimentell bestimmte Retentionszeiten der Referenzverbindungen; Fließmittel Methanol/Wasser 1:1 + 10 % Essigsäure

Referenzsubstanzen	log P	t _r [min]	log k
Thioharnstoff	-0,92	2,35	0
Phenol	1,5	4,49	0,04
Benzoessäure	1,9	7,34	0,327
2-Naphtol	2,7	10,53	0,541
Diphenylamin	3,4	34,1	1,13
Biphenyl	4,0	87,6	1,56

4.4 Positronen-Emissions-Tomographie

4.4.1 Theoretischer Hintergrund

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) handelt es sich um ein nicht-invasives, bildgebendes, nuklearmedizinisches Verfahren, mit dem biochemische Prozesse wie z.B. Stoffwechselprozesse, Transmitter-Rezeptor-Interaktionen, Signaltransduktion oder auch Genexpression in ihrer Verteilung im lebenden Organismus dargestellt werden können.

Zur Anwendung der tomographischen Technik werden geeignete radioaktiv markierte Moleküle eingesetzt. Zum einen besteht die Möglichkeit zur Original- bzw. Analog-Markierung mit den Positronen-Emittern ¹¹C oder ¹⁸F, wobei sich die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der eingesetzten Moleküle nicht oder nur wenig von endogenen Liganden oder exogenen Arzneistoffen unterscheiden. Zum anderen wird das Tracerkonzept verfolgt, bei dem die radioaktiv markierte Verbindung in einer pharmakodynamisch irrelevanten Stoffmenge verwendet wird, so dass man einen Einblick in das lebende biochemische System erhält, ohne dieses zu stören oder zu beeinflussen⁽²²⁵⁾. Dieses Verfahren ist insbesondere bei der Untersuchung von Bindungen der markierten Substanzen an Neurotransmitter-Systemen relevant.

Die bildhafte Darstellung der eingesetzten markierten Verbindungen erfolgt über Messung ihrer Radioaktivitätsverteilung.

Mit diesem Prinzip lässt sich insbesondere eine Reihe von Fragestellungen klären, die im Zusammenhang mit ZNS-Erkrankungen stehen. Bezüglich dieser Thematik wird die PET derzeit vor allem klinisch zur Diagnostik von Hirntumoren, neurodegenerativen Erkrankungen, zerebrovaskulären Erkrankungen, Epilepsien sowie psychiatrischen Erkrankungen genutzt.

Aber auch im Bereich der Arzneimittel-Entwicklung haben sich völlig neue Möglichkeiten der Einsicht in physiologische und krankhaft gestörte Hirnfunktionen eröffnet.

Das Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie ist in Abbildung 87 schematisch dargestellt.

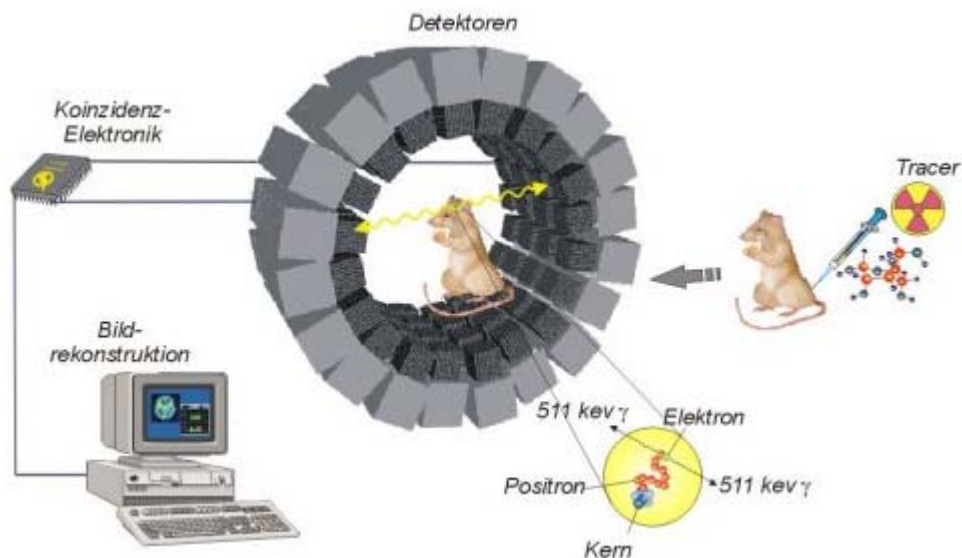


Abbildung 87: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie⁽²²⁶⁾

4.4.2 *In vivo*-Experiment

Zur Vorbereitung auf die *in vivo*-Experimente werden - unter vorheriger Evaluierung mit Hilfe des [³H]MDL105,519 Verdrängungsassays - entsprechend affine Liganden an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors radioaktiv markiert. Im Rahmen der Kooperation wird ¹⁸F-Fluor verwendet, welches zuvor mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt wurde. Das zur anschließenden Markierung der Liganden gebräuchliche Synthon 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat ([¹⁸F]FETos) wird durch eine computergesteuerte, automatische Synthese hergestellt.

Unter Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgt schließlich die Umsetzung des Markierungsreagenzes mit nucleophilen Gruppen des zuvor evaluierten, affinen Liganden unter Bildung des Radiotracers. Aufgrund der Halbwertszeit des ¹⁸F-Fluors von 109,7 Minuten muss anschließend rasch mit dem *in vivo*-PET-Experiment begonnen werden.

Dabei werden die entsprechenden Radiotracer unter Isofluran-Narkose Spargue-Dawley-Ratten i.v. injiziert und in einem μ PET dynamische Scans in einem Zeitraum von 60 Minuten aufgenommen. Es werden Zeitaktivitätskurven sowie Aktivitätsverteilungen in verschiedenen Hirnregionen erhalten, die eine Aussage bezüglich Aufnahme und Verteilung des Radioliganden im Gehirn zulassen. Gleichzeitig kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Liganden die Fähigkeit aufweisen durch die Blut-Hirn-Schranke zu gelangen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Testsubstanzen wurden anhand verschiedener biochemischer und physikochemischer Testverfahren charakterisiert und somit ihre mögliche Eignung als Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors untersucht.

Nachfolgend werden die erhaltenen Ergebnisse dargestellt und zum Teil mit in früheren Arbeiten erzielten Erkenntnissen diskutiert, um einen umfassenden Überblick des aktuellen Forschungsstandes zu geben.

Zuerst werden das Bindungsverhalten und die erhaltenen Affinitäten der synthetisierten Liganden zur Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors aus dem [³H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassay an Schweinehirnmembranen präsentiert, sowie daraus abgeleitete Struktur-Wirkungs-Beziehungen erstellt.

Desweiteren erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen sowie die nach verschiedenen Methoden erhaltenen log P-Werte, durch die eine Permeation der Blut-Hirn-Schranke abgeschätzt wird.

Abschließend werden kurz die Ergebnisse von ersten *in vivo*-Untersuchungen mit ¹⁸F-markierten Liganden in Positronen-Emissions-Tomographie-Experimenten an Ratten dargestellt, die durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Rösch (Institut für Kernchemie; Johannes Gutenberg-Universität Mainz) entstanden sind.

5.1 Bindungsstudien

Nachdem in den Kapiteln 1.2.4.2 und 3.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen bezüglich potentieller Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors anhand verschiedener Pharmakophor-Modelle diskutiert wurden, soll im Folgenden die Ligandenbindungsdomäne der NR1-Untereinheit genauer betrachtet werden. Anhand, auf Röntgenkristallstrukturanalysen basierenden, Modellstrukturen wird dabei die Bindung von Liganden an der Glycinbindungsstelle gezeigt, um dadurch ein besseres Verständnis des strukturellen Bindungsverhaltens zu

erlangen. Anschließend werden die Ergebnisse des [³H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassays zusammengefasst und beziehend auf die vorgestellten Erkenntnisse diskutiert.

5.1.1 Bindung von Liganden an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors

Lange Zeit war es nicht möglich eindeutige Aussagen bezüglich des Bindungsverhaltens von Liganden an der Glycinbindungsstelle treffen zu können. Erst in jüngerer Zeit ist es gelungen eine Röntgenkristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne (S1-S2) der NR1-Untereinheit zu erhalten⁽²²⁷⁾. Durch Ko-kristallisation mit Agonisten und Antagonisten oder mit Hilfe von computerchemischen Verfahren lassen sich wichtige Interaktionen zwischen den Aminosäuren des Rezeptorproteins und den entsprechenden Liganden zeigen.

In Abbildung 88 sind die Röntgenkristallstrukturen der NR1-Ligandenbindedomäne kokristallisiert sowohl mit Glycin als auch mit dem Antagonisten 5,7-Dichlorkynurensäure (DCKA = 5,7-Dichlor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-2-carbonsäure) gezeigt. Evident ist, dass die deprotonierte Carboxylfunktion beider Strukturen jeweils eine essentielle ionische Wechselwirkung mit dem Guanidinium-Rest von Arg523 des Rezeptors eingeht.

Die Carboxylatgruppe von Glycin fungiert weiterhin als Wasserstoffbrücken-Akzeptor u.a. für die Amidbindung des Thr518 und Ser688 sowie für die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette von Ser688. Die positiv geladene Amino-Gruppe des Glycins interagiert mit dem Carbonylsauerstoff von Pro516, der Hydroxyl-Gruppe des Thr518 sowie mit dem Carboxylat-Sauerstoff von Asp732. Zusätzlich bestimmen Wassermoleküle entscheidende Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptorprotein⁽²²⁸⁾.

Auch im Fall der Bindung des Antagonisten DCKA dient die freie NH-Funktion des Chinolin-Rings als H-Brücken-Donor für den Carbonyl-Sauerstoff von Pro516. Weiterhin zeigt die aromatische Chinolin-Struktur eine π - π -Wechselwirkung (π -stacking-interaction) zu der Phe484-Seitenkette.

Die lipophilen Chlor-Substituenten an Position 5 und 7 interagieren entsprechend über van der Waals-Kräfte mit den aromatischen Resten von Phe408 und Trp731.

Bei Antagonisten mit 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäurestruktur wird ein entsprechender Bindemodus beschrieben, sowie durch vorhandene raumerfüllende Reste an Position 3 darüberhinaus eine höhere Affinität postuliert⁽²²⁷⁾.

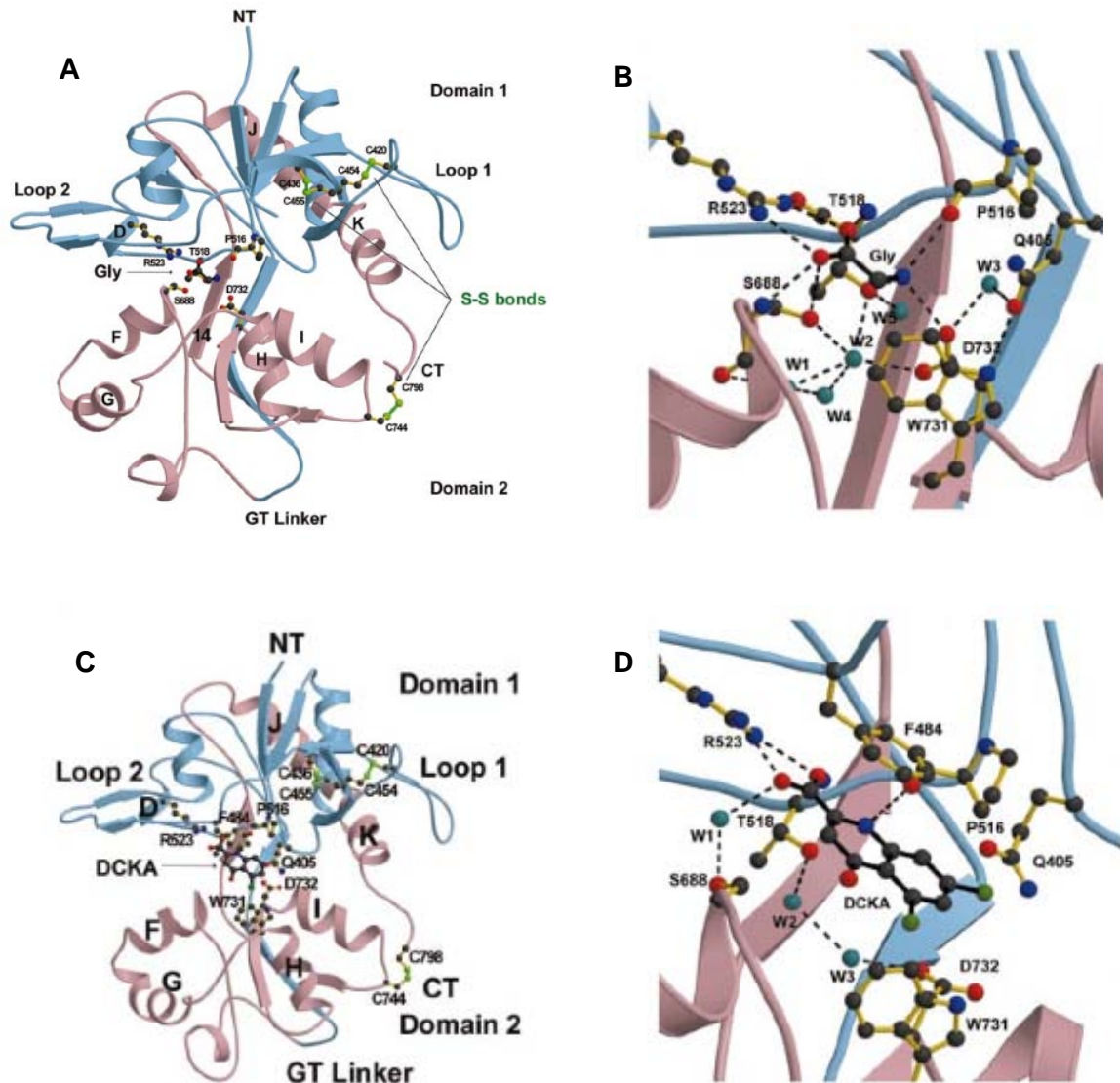


Abbildung 88: Bindung von Liganden an der Ligandenbindungsstelle (S1-S2) der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors⁽²²⁸⁾
 A: Bindung des Agonisten Glycin; B: vergrößertes Ausschnitt der Bindungstasche von A; C: Bindung des Antagonisten Dichlorkynurensäure (DCKA); D: vergrößertes Ausschnitt der Bindungstasche von C

Als ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu der allosterischen Aktivierung durch den endogenen Agonisten Glycin nach einem „Venusfliegenfallen-artigen“ Klappmechanismus aus Domäne 1 und 2, wird durch die Bindung von Antagonisten eine offene Konformation stabilisiert, bei der eine erweiterte Spalte zwischen den Domänen bestehen bleibt^{(228), (227)}. Ein Antagonist wirkt daher wie ein „Keil“, welcher wesentliche, zur konformativen Öffnung des Ionenkanals notwendigen Interaktionen unterbricht.

5.1.2 Ergebnisse der [³H]MDL105,519-Bindungstudien

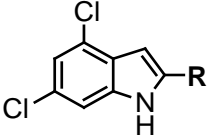
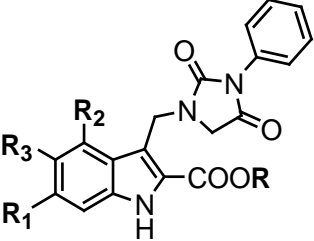
Die Bindungsaffinitäten zur Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors, unter Betrachtung des Einflusses der strukturellen Modifikationen der synthetisierten Verbindungen, wurden anhand eines Verdrängungsassays mit dem Radioliganden [³H]MDL105,519 bestimmt. Dieser hochaffine, selektive Antagonist wurde mit aufgearbeiteten Schweinehirnhomogenaten sowie der jeweiligen Testverbindung bis zum Erlangen eines Bindungsgleichgewichtes inkubiert. Nach anschließender Abtrennung des gebundenen vom ungebundenen Anteil des Radioliganden erfolgte die Bestimmung der verbliebenen Radioaktivität mit Hilfe der Flüssigszintillationsmethode. Diese ist ein Maß für die Fähigkeit der Testverbindung den Radioliganden kompetitiv von seiner Bindungsstelle am Rezeptor zu verdrängen, wobei gilt, je niedriger die gemessenen Radioaktivität, desto höher ist die Affinität der Testverbindung und damit ihr inhibitorisches Potential einzuschätzen.

5.1.2.1 Übersicht

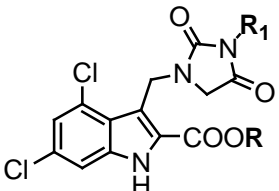



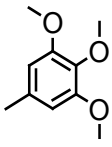
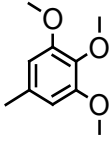
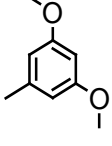
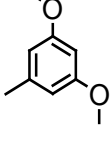

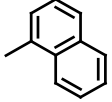


Im Folgenden werden in Tabelle 11 die Ergebnisse der [³H]MDL105,519-Bindungsstudien aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Testverbindungen dargestellt. Danach schließt sich in Tabelle 12 bis 17 die genauere Betrachtung und Diskussion in Abhängigkeit der jeweiligen vorgenommenen Strukturmodifikation an. Dabei wird gegebenenfalls Bezug auf weitere, in früheren Arbeiten dargestellte Strukturen genommen, um umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erstellen.

Ergebnisse und Diskussion

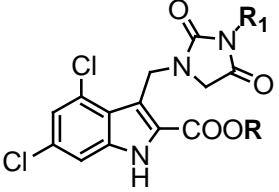




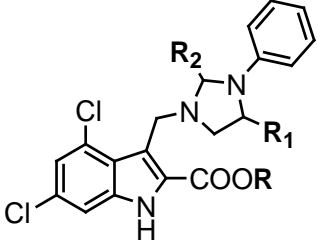
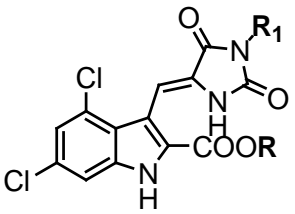


Tabelle 11: Übersicht der Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. In Klammern ist die Anzahl der Stichproben gezeigt; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind rot hervorgehoben.

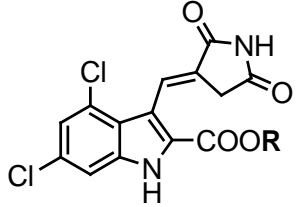
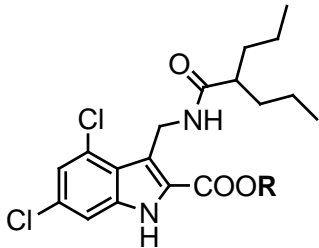
Struktur	Substituenten				Verb.	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R	R ₁	R ₂	R ₃		
	-COOCH ₂ CH ₃	-	-	-	CED-3	30,45 ± 5,6 (4)
	-COOH	-	-	-	CED-4	3,41 ± 0,9 (6)
	-CONHOH	-	-	-	CED-5	35,72 ± 4,2 (4)
	-CONHOHCH ₃	-	-	-	CED-6	42,25 ± 3 (4)
	-CH ₂ CH ₃	-F	-F	-H	CED-18	24,9 ± 1,8 (4)
	-H	-F	-F	-H	CED-19	0,0046 ± 0,003 (8)
	-CH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H	CED-23	47,7 ± 8,1 (2)
	-H	-Cl	-H	-H	CED-24	6,27 ± 0,3 (4)
	-CH ₂ CH ₃	-F	-H	-H	CED-28	38,7 ± 14 (2)
	-H	-F	-H	-H	CED-29	4,3 ± 0,7 (4)
	-CH ₂ CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	CED-33	> 3000 (2)
	-H	-H	-H	-OCH ₃	CED-34	> 3000 (2)
	-H	-H	-H	-OH	CED-35	> 3000 (2)

Ergebnisse und Diskussion

Struktur	Substituenten		Verb.	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R	R ₁		
	-CH ₂ CH ₃		CED-8	23,04 ± 1,3 (6)
	-H		CED-9	0,0028 ± 0,004 (8)
	-NHOH		CED-10	8,4 ± 5,8 (2)
	-CH ₂ CH ₃		CED-42	54,5 ± 5,8 (4)
	-H		CED-43	2,07 ± 1,1 (4)
	-CH ₂ CH ₃		CED-44	34,9 ± 2,5 (4)
	-H		CED-45	0,13 ± 0,07 (4)
	-CH ₂ CH ₃		CED-46	30,9 ± 8,5 (2)
	-H		CED-47	1,39 ± 1,1 (4)
	-CH ₂ CH ₃		CED-49	52,8 ± 12,4 (4)
-H		CED-50	0,0031 ± 0,004 (4)	

Ergebnisse und Diskussion

Struktur	Substituenten			Verb.	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R	R ₁	R ₂		
	-CH ₂ CH ₃		-	CED-51	256 ± 72 (2)
	-H		-	CED-52	16,57 ± 9,1 (4)
	-CH ₂ CH ₃		-	CED-54	312 ± 43 (2)
	-H		-	CED-55	29,02 ± 5,3 (4)
	-CH ₂ CH ₃	-H	-	CED-56	397 ± 78 (2)
	-H	-H	-	CED-57	7,8 ± 2,8 (4)
	-H	-OH	=O	CED-36	0,013 ± 0,004 (4)
	-CH ₂ CH ₃	-H	=O	CED-38	108 ± 4 (2)
	-H	-H	=O	CED-39	0,17 ± 0,07 (4)
	-H	-H	-H	CED-40	15,8 ± 28 (2)
	-CH ₂ CH ₃	-H	-	CED-60	38 97 (2)
	-H	-H	-	CED-61	51,8 ± 18 (2)
	-CH ₂ CH ₃		-	CED-64	156 ± 41 (2)
	-H		-	CED-65	0,046 ± 0,2 (2)

Struktur	Substituenten	Verb.	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R		
	-H	CED-67	31 ± 16 (2)
	-CH ₂ CH ₃	CED-13	399 ± 17 (2)
	-H	CED-14	220 ± 52 (2)

Aus der Übersichtstabelle ist zu erkennen, dass generell bei jeder Strukturmodifikation im direkten Vergleich die Carbonsäurederivate eine zum Teil mit großem Abstand bessere Affinität an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors aufweisen als die entsprechenden Derivate mit Carbonsäureethylester-Funktion. Diese liegt in einem Bereich von IC₅₀ = 0,0028 bis 51,8 μM im Gegensatz zu den Strukturen mit Ethylester-Funktion, deren Affinitäten mit IC₅₀-Werten von 23,04 bis 3000 μM als deutlich schlechter zu beurteilen sind.

Im Folgenden werden daher zur Betrachtung der Auswirkungen der vorgenommenen Strukturmodifikationen auf das Bindungsverhalten der Liganden am Rezeptor nur die Carbonsäure-Derivate untereinander verglichen.

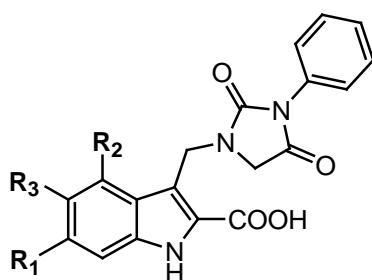
5.1.2.2 Auswirkungen der Variation des Substituentenmusters am Indolgrundgerüst

Bezugnehmend auf das Pharmakophor-Modell von Leeson *et al.* ⁽⁵²⁾ und Jansen ⁽¹⁴⁶⁾, nachdem insbesondere in Position 4 und 6 des Indolgrundgerüsts lipophile, größenbegrenzte Substituenten mit -I -bzw. -M-Effekt zu einer optimalen Affinität am Rezeptorprotein führen, wurde das Substituentenmuster an verschiedenen

Ergebnisse und Diskussion

Stellen variiert. Die erhaltenen Ergebnisse der Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit einem unterschiedlichen Substitutionsmuster am Indolgrundgerüst. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituenten			IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R ₁	R ₂	R ₃	
CED-9	-Cl	-Cl	-H	0,0028 ± 0,004
CED-19	-F	-F	-H	0,0046 ± 0,003
CED-24	-Cl	-H	-H	6,27 ± 0,3
CED-29	-F	-H	-H	4,3 ± 0,7
CED-34	-H	-H	-OCH ₃	> 3000
CED-35	-H	-H	-OH	> 3000
MJD-122	-H	-H	-Isopropyl	23,6
MJD-116	-H	-H	-H	4,4

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die bereits mehrfach in der Literatur beschriebene 4,6-Dichlorsubstitution der Leitstruktur CED-9 zu einer Bindungsaffinität im niedrigen nM-Bereich (2,8 nM) führt. Dieses ausgeprägt

Bindungsverhalten bleibt ebenfalls bei dem Austausch durch kleinere Fluor-Atome an den gleichen Positionen erhalten. Auch bei der 4,6-Difluorsubstitution (CED-19) finden sich somit IC_{50} -Werte im niedrigen nM-Bereich (4,6 nM).

Anders verhält es sich bei den monosubstituierten Derivaten an Position 6 CED-24 und CED-29. Hier werden Affinitäten vergleichbar mit der unsubstituierten Verbindung MJD-116 erhalten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich zeigen, dass ein lipophiler Substituent an Position 4 vorteilhaft im Vergleich zu demjenigen an Position 6 ist und sich dadurch eine Steigerung der Affinität um den Faktor 1000 bis 2200 erreichen lässt.

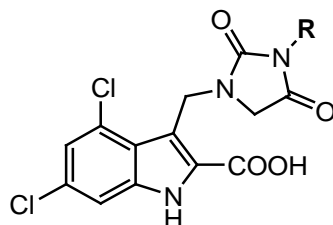
Ganz anders verhält es sich bei Substituenten, die an Position 5 des Indols eingebracht wurden. Hier sinkt die Affinität im Vergleich zu CED-9 weiter um den Faktor 5 wenn mit dem Isopropylrest (MJD-122) eine relativ raumerfüllende Struktur Verwendung findet. Durch Einführung einer Methoxy- bzw. Hydroxylfunktion an der gleichen Stelle (CED-34 bzw. CED-35) ist dann mit gemessenen IC_{50} -Werten von >3000 keine Affinität des Liganden zum Rezeptorprotein mehr gegeben. Diese drastische Abnahme im Bindungsverhalten könnte unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass diese Verbindungen im Grundgerüst strukturelle Ähnlichkeit mit Serotonin zeigen, welches ebenfalls als Neurotransmitter in Bereichen des Gehirns fungiert und somit Crossaffinitäten zum NMDA-Rezeptor verhindert werden.

5.1.2.3 Einfluss der unterschiedlichen Reste an Position 3 des Hydantoins

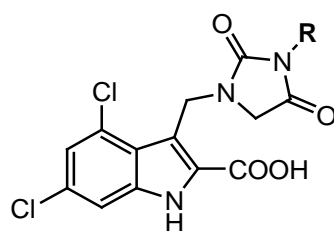
Durch die Einführung unterschiedlicher Reste an Position 3 des Hydantoins werden die Ausmaße der postulierten „bulk-tolerance“-Region der Ligandenbindungsstelle der NR1-Untereinheit untersucht. Hierbei sollen in diesem Bereich relativ große, lipophile Reste toleriert werden. In Tabelle 13 sind die eingeführten Reste und ihre entsprechenden Testergebnisse dargestellt.

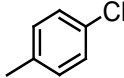
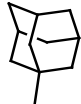


Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen Resten an Position 3 des Hydantoin. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituent R	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
CED-9		0,0028 ± 0,004
CED-43		2,07 ± 1,1
CED-45		0,13 ± 0,07
CED-47		1,39 ± 1,1
CED-50		0,0031 ± 0,004
CED-52		16,57 ± 9,1



Verbindung	Substituent	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R	
MJD-140		0,18
CED-55		29,02 ± 5,3
CED-57	-H	7,8 ± 2,8
MJD-124		0,2
MJD-130		1,61

Eine der Leitstruktur CED-9 vergleichbare ausgeprägte Affinität an der Glycin-bindungsstelle des NMDA-Rezeptors von IC₅₀ = 3,1 nM weist die Verbindung CED-50 auf, bei der der Phenyl-Rest an Position 3 des Hydantoin durch einen bioisosteren Thiophen-Ring ersetzt wurde. Durch eine 4-Chlor-Substitution am Phenyl-Rest welche weiterhin einen Beitrag zur Lipophilie liefert (MJD-140), sinkt die Affinität auf einen IC₅₀-Wert von 0,18 μM.

Durch Derivatisierung des Phenyl-Rings verlieren die Liganden generell an Affinität, wobei die 3,5-Dimethoxy-Substitution eine um den Faktor 46 und die 3,4,5-Trimethoxy-Substitutionen eine nochmal um den Faktor 16 schlechtere Bindungseigenschaft liefert. Das Einbringen eines größeren Naphtyl-Restes (CED-

47) führt zu einer Affinitätsabnahme um den Faktor 500, der Benzyl-Rest (CED-52) um den Faktor 6000 im Vergleich zur Leitstruktur.

Generell lässt sich jedoch feststellen, dass sich ein aromatisches π -Elektronensystem im nordöstlichen Teil des Liganden als vorteilhaft erweist. Vergleicht man die Verbindungen welche im Rahmen der Substitution mit aliphatischen Resten erhalten wurden fällt auf, dass ein aliphatischer Rest in Form eines Cyclohexyl-Restes (MJD-124) noch eine Affinität im hohen nM-Bereich erlaubt, während der kleinere Isopropyl-Rest bei MJD-130 zu einem Affinitätsverlust um eine Zehnerpotenz führt. Eine NH-Funktion an Position 3 der Imidazolidin-2,4-dion-Struktur unterscheidet sich nur marginal im Bindungsverhalten zum Isopropyl-Rest, während durch das Einbringen des voluminösen Adamantyl-Restes ein Wirkungsverlust nochmal um den Faktor 20 zu verzeichnen ist.

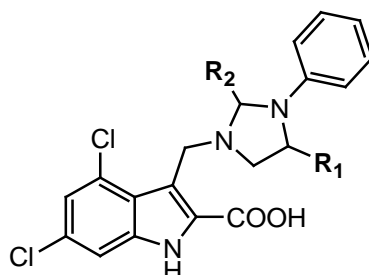
5.1.2.4 Auswirkungen der unterschiedlichen Wasserstoffbrücken-Donor- und -Akzeptor-Eigenschaften ausgehend von der Hydantoin-teilstruktur

Um die Auswirkungen eines unterschiedlichen Wasserstoffbrücken-Donor/-Akzeptor-Musters zu untersuchen, wurden die Carbonylfunktionen des Imidazolidin-2,4-dion-Ringes selektiv zum Alkohol bzw. zum Alkan reduziert. Im zu-grundliegenden Pharmakophor-Modell wird eine essentielle Wasserstoffbrücke in diesem Bereich postuliert, wobei das Rezeptorprotein einen Wasserstoffbrücken-Donor aufweist. Durch Variation unterschiedlicher H-Brücken-Donor- und -Akzeptor-Funktionen soll dieser Sachverhalt untersucht werden.

Im Rahmen der Derivatisierung wurden bezüglich dieser Fragestellung die in Tabelle 14 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen Wasserstoff-Brücken-Donor- und -Akzeptor-Funktionen ausgehend von der Hydantointeilstruktur. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituenten		IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R ₁	R ₂	
CED-9	=O	=O	0,0028 ± 0,004
CED-36	-OH	=O	0,013 ± 0,004
CED-39	-H	=O	0,17 ± 0,07
CED-40	-H	-H	15,8 ± 28

Man erkennt, dass die Leitstruktur CED-9 mit 2 vorhandenen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bei einem IC₅₀ = 2,8 nM das beste Bindungsverhalten aufweist. Durch selektive Reduktion der 4-Carbonylfunktion zu einer Hydroxylfunktion als H-Brücken-Donor sinkt die Affinität um den Faktor 5 und durch den Verlust der Fähigkeit eine Wasserstoffbrücke an dieser Stelle mit dem Rezeptorprotein zu bilden (CED-39) um den Faktor 60 im Vergleich zur Leitstruktur.

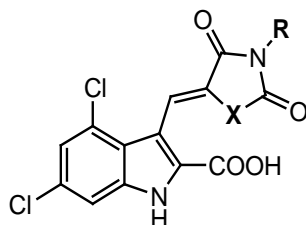
Als besonders interessant ist dabei aber die drastische Affinitätsabnahme der Verbindung CED-40 zu sehen, bei der die Carbonylfunktionen sowohl an Position 4 als auch an Position 2 bis zum Alkan reduziert wurden. Der IC₅₀-Wert von 15,8 μM zeigt hier deutlich, dass eine Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion in Posi-


tion 2 von essentieller Bedeutung ist und ihr Verlust zu einer ausgeprägten Verschlechterung der Bindungseigenschaften führt.

5.1.2.5 Einfluss der semicyclischen C=C-Bindung zwischen Indol und Imidazolidin-2,4-dion bzw. Pyrrolidin-2,5-dion-Struktur

Durch die Anbindung der Imidazolidin-2,4-dion- (Hydantoin) bzw. einer Pyrrolidin-2,5-dion- (Succinimid) Struktur über eine semicyclische C=C-Bindung an das Indolgrundgerüst wird weiterhin ein unterschiedliches Wasserstoffbrücken-Donor-Muster durch die zusätzliche NH-Funktion der Testverbindungen erhalten. Desweiteren wird die Drehbarkeit der Reste durch die C=C-Bindung eingeschränkt. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei den getesteten Strukturen um die Z-Isomere handelt, dessen Ergebnisse aus dem [³H]105,519-Bindungsassay in Tabelle 15 gezeigt sind.

Tabelle 15: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit Methylenebrücke zwischen Indol und Imidazolidin-2,4-dion- bzw. Pyrrol-2,5-dion-Struktur. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in µM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituenten		IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [µM]
	R	X	
CED-61	-H	-NH-	51,8 ± 18
CED-65		-NH-	0,046 ± 0,2
CED-67	-H	-CH ₂ -	31 ± 16

Ersichtlich ist, dass im Fall der C=C-verknüpften Verbindung CED-65 bei sonst gleichen Resten im Vergleich zur Leitstruktur CED-9, die Bindungsaffinität um den Faktor 16 abnimmt. Als mögliche Ursache ist zum einen der zusätzliche H-Brücken-Donor in Form der freien NH-Funktion und zum anderen die sterische Fixierung durch die Methylenbrücke zu nennen.

Die Testverbindungen CED-61 und CED-67 zeigen deutlich schlechtere Bindungseigenschaften, die allerdings durch das Fehlen eines aromatischen Restes erklärt werden können. Im direkten Vergleich zueinander zeigt jedoch das Succinimid-Derivat CED-67 ein marginal besseres Bindungsverhalten, woraus man schließen kann, dass der zusätzliche H-Brücken-Donor in Form einer NH-Funktion nicht zur Bindung am Rezeptor beiträgt oder darüber hinaus sogar als störend zu bewerten ist.

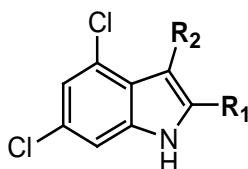
5.1.2.6 Einfluss der unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2 des Indolgrundgerüsts

Eine Carbonsäurefunktion an Position 2 des Indolgrundgerüsts gehört zu den essentiellen pharmakophoren Deskriptoren eines Liganden an der Glycinebindestelle des NMDA-Rezeptors und imitiert zusammen mit der freien Indol-NH-Funktion eine Glycinteilstruktur. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) liegt diese Säurefunktion als Carboxylat-Ion vor, welches eine Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert und eine ausreichende Bioverfügbarkeit somit einschränkt. Bezugnehmend auf dieses Problem wurden Verbindungen mit unterschiedlichen, zum Teil zur Carboxylgruppe bioisosteren, sauren Funktionen synthetisiert, dessen Bindungsaffinitäten in Tabelle 16 dargestellt sind.

Um einen direkten Vergleich der Modifikationen an Position 2 in Bezug zur Leitstruktur CED-9 vornehmen zu können, wurde darüberhinaus nur die Carboxylgruppe von CED-9 durch eine Hydroxamsäure-Funktion ausgetauscht.

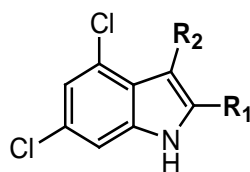
Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; Werte im nM Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituenten		IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R ₁	R ₂	
CED-3	-COOCH ₂ CH ₃	-H	30,45 ± 5,6
CED-4	-COOH	-H	3,41 ± 0,9
CED-5	-CONHOH	-H	35,72 ± 4,2
CED-6	-CONHOCH ₃	-H	42,25 ± 3
MJD-78		-H	98,8
MJD-79	-CONHNH ₂	-H	185,6
MJD-81		-H	27,2
MJD-82		-H	111,1
MJD-83		-H	26,2

Ergebnisse und Diskussion



Verbindung	Substituenten		IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R ₁	R ₂	
CED-8	-COOCH ₂ CH ₃		23,04 ± 1,3
CED-9	-COOH		0,0028 ± 0,004
CED-10	-CONHOH		8,4 ± 5,8

Unter allen synthetisierten 4,6-Dichlorindol-Derivaten mit unterschiedlichen sauren Funktionen zeigt das Carbonsäure-Derivat CED-4 mit einem IC₅₀-Wert von 3,41 μM die höchste Affinität. Ersetzt man die Säure-Funktion an Position 2 des Indols durch eine Hydroxamsäure- (CED-5) bzw. einen Hydroxamsäure-methylether-Funktion (CED-6), sinkt die Affinität um ca. eine Zehnerpotenz und ist damit vergleichbar mit der Affinität des Ethylester-Derivats CED-3.

Durch die im Rahmen der Dissertationsarbeit Jansen dargestellten Strukturen ist außerdem ersichtlich, dass auch die zur Carboxylgruppe bioisostere Tetrazol-Funktion in MJD-78, trotz eines ähnlichen pK_a-Wertes, eine um den Faktor 30 schlechtere Bindungseigenschaft aufweist. Das Trifluormethansulfonamid-Derivat MJD-83 zeigt dagegen eine der Ester-Funktion vergleichbare Affinität, während das Methansulfonamid MJD-82 wahrscheinlich aufgrund der geringeren Acidität ein schlechteres Bindungsverhalten zeigt.

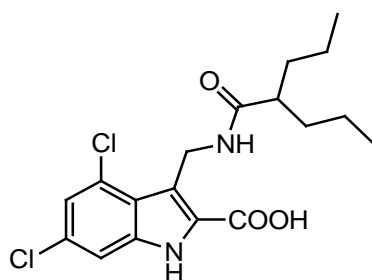
Weiterhin ist zu erkennen, dass mit dem Ersatz durch eine Hydroxamsäure-Funktion an Position 2 der Leitstruktur ein Affinitätsverlust um den Faktor 3000 zu verzeichnen ist (CED-10).

Diese Ergebnisse verdeutlichen eindrucksvoll, wie wichtig eine Carbonsäure-Funktion in Position 2 des Indolgrundgerüsts ist, um eine hohe Bindungsaffinität am Rezeptorprotein zu erreichen. Eine Strukturoptimierung diese Funktion betreffend konnte durch einen Ersatz anderer saurer Strukturen nicht erreicht werden und führt zu einem drastischen Affinitätsverlust am Rezeptorprotein.

5.1.2.7 Hybridmolekül als dual-affiner Ligand

Mit CED-14 sollte ein Hybridmolekül mit der hochaffinen Grundstruktur der 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure und der Valproinsäure, welche unter anderem spannungsabhängige Natrium- und Calcium-Kanäle blockiert, synthetisiert werden. Die Bindungsaffinität ist in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Hybridstruktur aus 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure und Valproinsäure über eine Amidbindung. Gezeigt ist der IC₅₀-Wert in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung.



Verbindung	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
CED-14	220 ± 52

Mit einem IC₅₀-Wert von 220 μM ist die Bindungsaffinität als schlecht zu beurteilen. Obwohl die Verbindung den optimalen Indolgrundkörper aufweist und auch

ein Wasserstoff-Brücken-Akzeptor in Position 3 vorhanden ist, führt vermutlich der sterisch anspruchsvolle 2-Propylpentanamidomethyl-Rest verglichen mit der Hydantoin-Teilstruktur zu einer kaum vorhandenen Affinität zur Glycin-bindungsstelle des NMDA-Rezeptors.

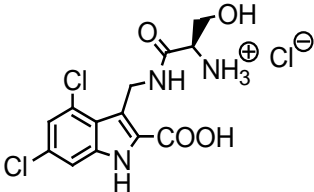
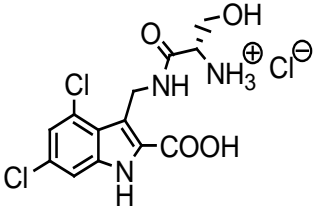
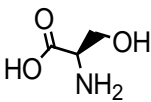
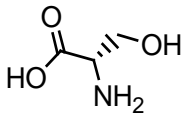
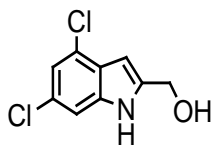
5.1.2.8 Serin-gekoppelte 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Derivate

In Kapitel 1.2.4.2 wurde bereits angemerkt, dass neben Glycin als Koagonist am NMDA-Rezeptor auch D-Serin eine ausgeprägte Affinität zu der Ligandenbindungsstelle der NR1-Untereinheit aufweist. Gerade in Hirnbereichen mit einer geringen Konzentration an Glycin führt es zusammen mit L-Glutamat zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren.

Bezugnehmend auf diese Erkenntnisse wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von C. Heyl ⁽²²⁹⁾, welche parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde versucht, Liganden zu entwickeln, welche Strukturmerkmale der Leitstruktur sowie des Serins miteinander verbinden. Dabei wurde zum einen die 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure-Grundstruktur über eine Aminomethylfunktion mit D-bzw. L-Serin verknüpft. Zum anderen wurde die Carbonsäurestruktur an Position 2 durch eine Hydroxymethylfunktion ersetzt, um die 2-Aminoethanol-Struktur des Serins nachzuahmen. Die erhaltenen Testergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 18: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der im Rahmen der Diplomarbeit C. Heyl synthetisierten Strukturen. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

Struktur	Verbindung	IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,51 [μM]
	CH-4 (D-Serin-Rest)	37,2 ± 4,3
	CH-2 (L-Serin-Rest)	7,38 ± 3,1
	D-Serin	5,75 ± 0,9
	L-Serin	122,5 ± 24,1
	CH-25	2874 ± 231

Der direkte Vergleich der Bindungsergebnisse von D- und L-Serin zeigt die erwartete höhere Bindungsaffinität des D-Serins und den damit verbundenen Einfluss des vorhandenen Chiralitätszentrums. Das D-Enantiomer weist somit eine ca. 20fach höhere Bindungseigenschaft auf. Dieser Effekt lässt sich bei den dargestellten Testsubstanzen CH-4 und CH-2 nicht mehr zeigen. Durch das Vorliegen der Testverbindungen als Hydrochlorid ist die Bindungsaffinität generell herabgesetzt und liegt, im Gegensatz zur Leitstruktur, nur noch im mittleren μM-Bereich.

Die Reduktion der Carboxylfunktion des Indolgrundgerüsts zur Hydroxymethylgruppe hat einen vollständigen Wirkungsverlust zur Folge und untermauert um ein weiteres die essentielle Bedeutung der Carbonsäurestruktur an dieser Stelle.

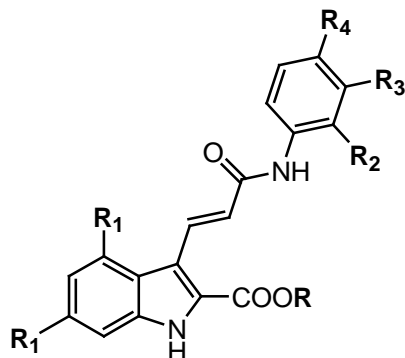
5.1.2.9 Gavestinel-Derivate

Zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Liganden wurden desweiteren Strukturen auf ihre Bindungsaffinität an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors untersucht, die im Rahmen einer Dissertationsarbeit von T. Betzel in der Arbeitsgruppe von Prof. Rösch, Institut für Kernchemie entstanden sind ⁽²³⁰⁾. Leitstruktur dieser Liganden war die Verbindung 4,6-Dichlor-3-(2-phenyl-carbamoylviny)-1*H*-indol-2-carbonsäure (Gavestinel, GV 150526), welche bereits in Tierexperimenten evaluiert, sowie in klinischen Studien am Menschen untersucht wurde. Bei dieser Verbindung mit nachgewiesener *in-vivo*-Aktivität wurden Fluorethylierungen in ortho-, meta- und para-Stellung des Phenylrestes vorgenommen, um Referenzverbindungen für eine spätere ¹⁸F-Markierung zu erhalten. Von der Verbindung mit dem besten Bindungsverhalten zum Rezeptor sollten anschließend Radiotracer durch Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat synthetisiert werden, welche zur Visualisierung der NR-1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors in der Positronen-Emissions-Tomographie Verwendung finden sollten.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien im [³H]MDL105,519-Assay, welche zu der Auswahl des Radiotracers geführt haben, sind nachfolgend in Tabelle 19 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Testergebnisse aus dem [³H]MDL105,519-Bindungsassay der Gavestinel-Derivate. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte in μM als Maß für die Konzentration der Testsubstanz durch die eine 50%ige Verdrängung des Radioliganden [³H]MDL105,519 von der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors erfolgt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Werte im nM-Bereich sind hervorgehoben.



Verbindung	Substituenten					IC ₅₀ vs. [³ H]MDL 105,519 [μM]
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
29	-CH ₂ CH ₃	-Cl		-H	-H	258 ± 56
30	-CH ₂ CH ₃	-Cl	-H		-H	239 ± 53
31	-CH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H		401 ± 36
32	-H	-Cl		-H	-H	1,4 ± 0,5
33	-H	-Cl	-H		-H	0,6 ± 0,06
34	-H	-Cl	-H	-H		0,2 ± 0,25
37	-CH ₂ CH ₃	-F	-H	-H		45 ± 10
38	-H	-F	-H	-H		0,42 ± 0,04
39	-CH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H	-H	48 ± 9
40	-H	-Cl	-H	-H	-H	0,02 ± 0,01

(Gavestinel)

Bei Betrachtung der Testergebnisse der Säure-Derivate fällt auf, dass auch bei dieser Grundstruktur die am terminalen Phenyl-Rest unsubstituierte Verbindung

40 (Gavestinel) mit einem IC_{50} -Wert im mittleren nM-Bereich die höchste Bindungsaffinität aufweist. Diese Tatsache deckt sich mit den zuvor diskutierten Resultaten. Um ein Derivat mit der notwendigen 18 Fluorethylierung zu erhalten wird dann die para-Position gewählt (34), da ein Rest an dieser Stelle den geringsten Affinitätsverlust von einer Zehnerpotenz zeigt, im Gegensatz zu dem meta-substituierten Derivate mit Verlust der Bindungsaffinität um den Faktor 30 bzw. 70 beim ortho-Derivat.

Auch in der Reihe der Gavestinel-Derivate führt eine 4,6-Difluor-Substitution des Indolgrundgerüsts (38) zu Bindungsaffinitäten vergleichbar mit dem 4,6-Dichlor-Derivat (34).

Für die anschließende radioaktive Markierung zur Durchführung der angestrebten *in vivo*-PET-Experimente wird das Säure-Derivat 34 sowie der korrespondierende Ethylester 31 gewählt.

5.1.2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der [3 H]MDL105,519-Bindungsstudie

Aus den Ergebnissen des [3 H]MDL105,519-Rezeptorbindungsassays geht hervor, dass es sich bei den im Zuge der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen um sehr potente Liganden an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors handelt. Ihre Bindungsaffinitäten zur NR1-Untereinheit des Rezeptors sind stark ausgeprägt, was sich anhand von IC_{50} -Werten im zum Teil niedrigen nM-Bereich zeigen lässt.

Zusammenfassend aus allen erhaltenen Erkenntnissen lassen sich folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen erstellen:

- lipophile, größenbegrenzte Substituenten in Position 4 und 6 des Indolgrundgerüsts führen zu der höchsten Affinität am Rezeptorprotein. Dabei ist eine 4,6-Dichlorsubstitution im Bindungsverhalten vergleichbar mit einer 4,6-Difluor-Substitution.
- ein aromatischer Rest an Position 3 des Imidazolidin-2,4-dion-Ringes ist einem aliphatischen Rest vorzuziehen. In der sogenannten „bulk tolerance“-Region konnte eine postulierte Akzeptanz eines großen, rau-

merfüllenden Restes nicht beobachtet werden. Ein Phenyl-Rest bzw. ein bio-isosterer Thiophen-Ring führen zu den besten Bindungseigenschaften. Ist eine Derivatisierung des aromatischen Ringes notwendig, wird ein Substituent in para-Stellung am besten toleriert.

- Ein H-Brücken-Akzeptor in Position 2 des Imidazolidin-2,4-dion-Ringes ist als ein wichtiger Deskriptor eines Liganden an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors zu sehen. In Position 4 dagegen trägt ein H-Brücken-Akzeptor zu einer erhöhten Bindungseigenschaft bei, während ein H-Brücken-Donor nur geringfügig schlechtere Affinitäten hervorruft, gefolgt von einer Struktur mit fehlender H-Brücken-Ausbildung.
- durch Anbindung des Phenylhydantoin-Restes durch eine semicyclische Methylenbrücke ist eine Bindungsaffinität im mittleren nM-Bereich zu verzeichnen, die aber geringer ist als bei der sterisch nicht fixierten Leitstruktur.
- eine Carbonsäurefunktion in Position 2 des Indolgrundkörpers ist für die Bindungsaffinität am Rezeptorprotein von essentieller Bedeutung. Alle anderen Strukturmodifikationen führen zu einem drastischen Affinitätsabfall.

5.2 XTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der Zytotoxizität

Eine Toxizität in einem therapeutischen Konzentrationsbereich kann trotz guter Wirksamkeit die mögliche Eignung der Liganden als Arzneistoff ausschließen. Um das Zytotoxizitätsprofil frühzeitig abschätzen zu können, wurde eine Auswahl der synthetisierten Verbindungen in einem XTT-Viabilitätsassay an MM 6-Zellen untersucht. Diese sind in der Lage das gelbe XTT metabolisch in ein orange-farbenes Produkt zu überführen, welches quantitativ bestimmt wird und mit der Zellviabilität korreliert.

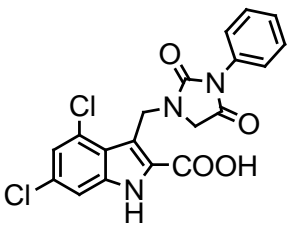
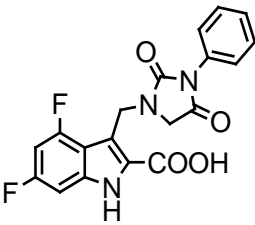
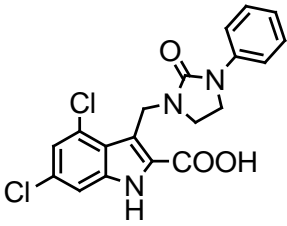
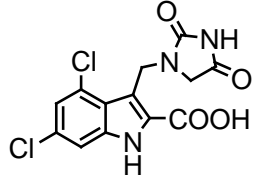
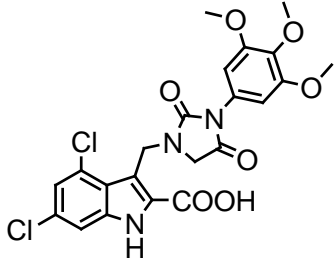
5.2.1 Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays

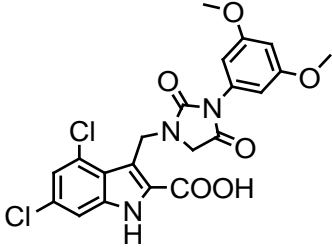
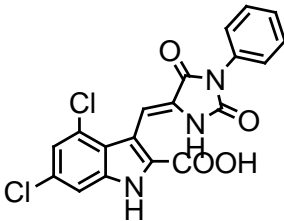
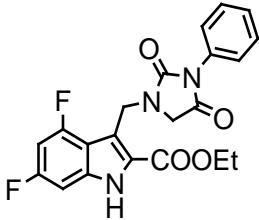
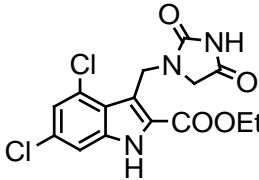
Im Verlauf der Durchführung wurde die Vitalität bzw. die prozentuale Überlebensrate der Zellen nach Zugabe einer Testverbindung im Vergleich zu einer Kontrollprobe (DMSO) gemessen. Die synthetisierten Verbindungen wurden in Konzentrationen von 10 und 100 μM untersucht, wobei man von einer potentiellen Zytotoxizität sprechen kann, wenn die Überlebensrate auf Werte $< 60 \%$ absinkt.

Nach Auswertung der Datensätze aller Messungen konnte festgestellt werden, dass bereits nach 120 Minuten keine Farbveränderung durch metabolische Prozesse der Zellen mehr zu verzeichnen war, weshalb die Absorption bei 120 Minuten zur Auswertung herangezogen wurde. In Tabelle 20 sind die prozentualen Überlebensraten der Zellen nach Inkubation mit der entsprechenden Testverbindung gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays zur Bestimmung der Zytotoxizität. Gezeigt ist die Überlebensrate der Zellen in % nach Inkubation mit den Testverbindungen nach 120 Minuten im Vergleich zu einer Kontrollprobe mit DMSO. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Anzahl der Stichproben $n = 8$.

Struktur	Verbindung	Überlebensrate [%]	
		10 μ M	100 μ M
	CED-9	108,34 \pm 27,6	103,1 \pm 10,26
	CED-19	104,81 \pm 7,0	102,63 \pm 8,93
	CED-39	100,07 \pm 6,71	81,84 \pm 5,67
	CED-57	105,1 \pm 13,9	98,1 \pm 9,8
	CED-43	109,8 \pm 27,3	88,7 \pm 8,7

Struktur	Verbindung	Überlebensrate [%]	
		10 μ M	100 μ M
	CED-45	119,1 \pm 33,5	80,6 \pm 4,9
	CED-65	104,1 \pm 10,9	79,9 \pm 5,4
	CED-18	96,6 \pm 3,1	97,8 \pm 11,1
	CED-56	101,1 \pm 7,7	104,4 \pm 9,5

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass keine der untersuchten Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μ M ein zytotoxisches Potential aufweist. Auch bei Verwendung einer um eine Zehnerpotenz konzentrierteren Untersuchungslösung konnte keine Toxizität nachgewiesen werden. Zur besseren Veranschaulichung dieses Sachverhaltes sind die prozentualen Überlebensraten der Zellen nach Inkubation mit der jeweiligen Testverbindung in einer Konzentration von 100 μ M in Abbildung 89 graphisch dargestellt.

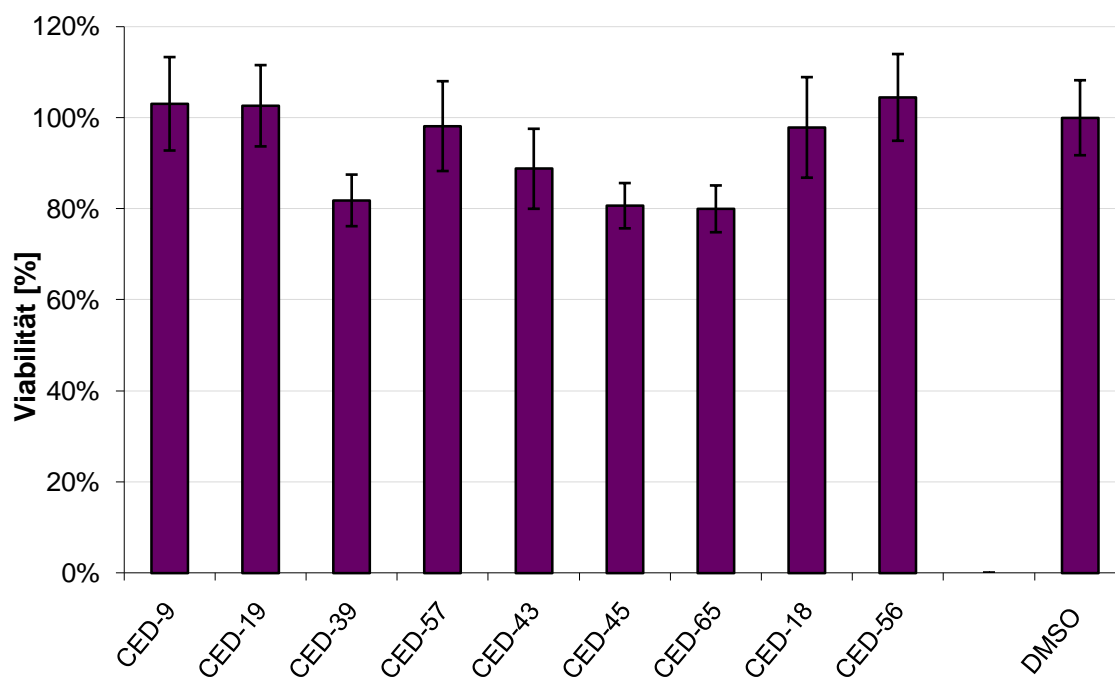


Abbildung 89: Graphische Darstellung der Testergebnisse des XTT-Viabilitätsassays zur Bestimmung der Zytotoxizität. Gezeigt ist die Überlebensrate der Zellen in % nach Inkubation von 120 Minuten mit den Testverbindungen in einer Konzentration von 100 μ M im Vergleich zu einer Kontrollprobe mit DMSO. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

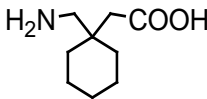
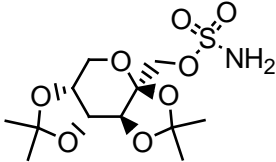
Bei Betrachtung der graphischen Darstellung wird deutlich, dass alle untersuchten Verbindungen eine prozentuale Überlebensrate von über 60 % aufweisen und somit als untoxisch zu bezeichnen sind. Bei dem Pyrrolidin-2-on-Derivat CED-39, dem Dimethoxyphenyl-Derivat CED-45 sowie dem Derivat mit semi-cyclischer Methylenbrücke CED-65 ist lediglich eine geringe Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität der MM 6-Zellen zu verzeichnen. Alle genannten Verbindungen weisen jedoch IC_{50} -Werte im nM-Bereich auf, weshalb eine Konzentration von 100 μ M im XTT-Viabilitätsassay weit über der therapeutisch einzusetzenden Konzentration liegen würde.

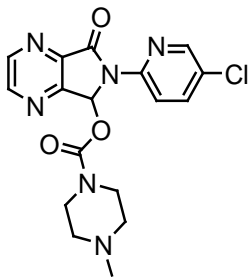
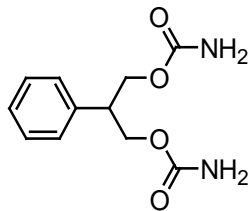
5.3 Log P-Wert-Bestimmung zur Beurteilung der Lipophilie

Um eine ausreichende Bioverfügbarkeit zu erreichen und eine entsprechende Wirkung im ZNS entfalten zu können, müssen die synthetisierten Verbindungen in der Lage sein die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Gelangen sie nicht über Transportprozesse durch die BHS, wird die Effizienz des passiven Transports bzw. der Diffusion durch die Lipophilie, die Molekülgröße, den Ladungszustand sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des zu transportierenden Stoffes bestimmt.

Die Lipophilie einer Substanz wird durch ihren log P-Wert zum Ausdruck gebracht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es daher sinnvoll diesen zu bestimmen, um eine potentielle Penetrationsfähigkeit durch die BHS abschätzen zu können. Der optimale log P-Wert für ZNS-aktive Substanzen liegt nach Literaturangaben bei 2 bzw. der log $D_{7,4}$ -Wert zwischen 1 und 3⁽²¹³⁾. Dass jedoch auch Wirkstoffe mit abweichenden Werten eine Wirksamkeit im ZNS zeigen ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Strukturen von zentral wirksamen Arzneistoffen mit log P-Werten < 2

Verbindung	Struktur	M_r	log P
Gabapentin		171,24	-1,1
Topiramamat		339,4	0,53

Verbindung	Struktur	M_r	log P
Zopiclon		388,81	0,8
Felbamat		238,24	1,6

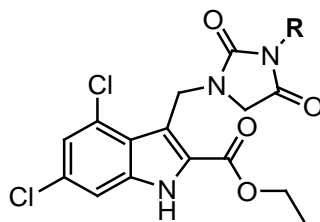
5.3.1 Ergebnisse der logP-Wert-Bestimmungen

Im Folgenden sind die experimentell bestimmten pK_a - und log P-Werte einiger ausgewählter Indolderivate mit Hydantointeilstruktur sowohl als Ethylester als auch mit Carbonsäure-Funktion beispielhaft zusammengefasst. Zum einen erfolgte die Bestimmung durch eine potentiometrische Zwei-Phasen-Titration und zum anderen wurde eine HPLC-Methode an einer RP-Phase verwendet.

Die log $D_{7,4}$ -Werte wurden aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften der Verbindungen bei pH 7,4 mit dem Programm ChemAxon⁽²³¹⁾ berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

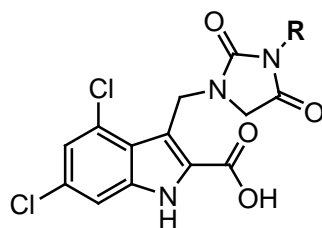
Tabelle 22: Ergebnisse der pK_a - sowie log P-Wert-Bestimmungen ausgewählter Indolderivate mit Hydantoinanteilstruktur und Esterfunktion; angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung; n.m.= nicht messbar; n.t. = nicht getestet


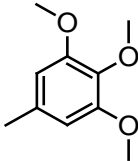
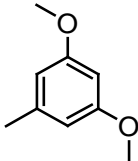
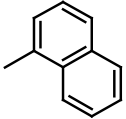
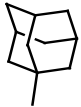


Verbindung	R	pK_a	log P		log $D_{7,4}$
			titriert	HPLC	
CED-8		$10,03 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,28$	3,7	3,5
CED-42		$9,86 \pm 0,01$	$3,18 \pm 0,04$	3,44	3,47
CED-44		$9,58 \pm 0,02$	$3,31 \pm 0,06$	3,73	3,49
CED-47		$10,16 \pm 0,1$	$3,84 \pm 0,19$	3,91	4,76
CED-54		$9,72 \pm 0,17$	$3,42 \pm 0,05$	3,46	3,35
CED-56	H	$5,81 \pm 0,01$	n.m.	n.t.	2,08

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 23: Ergebnisse der pK_a - sowie $\log P$ -Wert-Bestimmungen ausgewählter Indolderivate mit Hydantoinreststruktur und Carbonsäurefunktion; angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung; n.m.= nicht messbar



Verbindung	R	pK_a	$\log P$		$\log D_{7,4}$
			titriert	HPLC	
CED-9		$4,3 \pm 0,54$	$2,18 \pm 0,01$	2,81	-0,09
CED-43		$4,01 \pm 0,48$	$2,88 \pm 0,01$	2,84	-0,56
CED-45		$3,92 \pm 0,4$	$3,19 \pm 0,02$	2,97	-0,41
CED-48		$4,02 \pm 0,05$	$2,67 \pm 0,01$	2,56	0,9
CED-55		$4,72 \pm 0,17$	$5,84 \pm 0,02$	2,69	-0,71
CED-57	H	$3,57 \pm 0,01$ $10,89 \pm 0,1$	n.m.	2,25	-1,98

Die durch Titration ermittelten log P-Werte der meisten Säure-Derivate lassen mit Werten zwischen 2,18 und 3,19 (Ausnahme CED-55 mit 5,84) eine gute Permeationsfähigkeit der Liganden durch die Blut-Hirn-Schranke vermuten. Anhand der ebenfalls bestimmten pK_a -Werte ist jedoch ersichtlich, dass alle Säuren bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 deprotoniert vorliegen. Um diesen Sachverhalt zu berücksichtigen, muss zur Beurteilung der Überwindbarkeit der BHS der $\log D_{7,4}$ -Wert der Verbindungen betrachtet werden, welcher im Gegensatz zu den log P-Werten in einem viel niedrigerem Bereich zu finden ist. Anhand dieser Tatsache offenbart sich somit die - unter physiologischen Bedingungen - tatsächliche Lipophilie der synthetisierten Verbindungen. Diese weisen zwar unter anderem aufgrund der Carboxylgruppe zum einen hohe Affinitäten zur Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors im nM-Bereich auf, zum anderen erschwert bzw. verhindert sie aber mutmaßlich den Durchtritt durch die BHS.

Anders verhält es sich dagegen bei den Ethylester-Derivaten, die auch unter physiologischen pH-Bedingungen log P-Werte zwischen 3,2 und 3,84 bzw. $\log D_{7,4}$ -Werte von 2,08 bis 4,76 aufweisen. In diesem Fall ist eine Permeationsfähigkeit durch die BHS für einige Verbindungen denkbar.

An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass die Lipophilie nur einen physikochemischen Parameter darstellt, mit dem eine Einschätzung bezüglich der BHS-Gängigkeit von Substanzen vorgenommen werden kann. Weiterhin sind das Molekulargewicht, die Summe von Stickstoff- und Sauerstoff-Atomen sowie die polare Oberfläche (PSA) des Moleküls zu betrachten.

Ob dann tatsächlich eine Aufnahme in das ZNS erfolgt, beispielsweise auch durch die Möglichkeit eines aktiven Transports durch die BHS, kann letztendlich nur durch *in vivo*-Experimente sicher bestimmt werden.

5.4 *In vivo*-Experimente

Im Arbeitskreis Prof. Rösch wurden von T. Betzel Positronen-Emissions-Tomographie-Experimente (PET) mit radioaktiv markierten Liganden der Glycin-bindungsstelle des NMDA-Rezeptors durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchungen war die Beurteilung der Aufnahme und Verteilung des verwendeten Radioliganden im Gehirn der Ratte. Gleichzeitig konnte eine Abschätzung der Permeationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke getroffen werden.

5.4.1 Ergebnisse der PET-Untersuchungen

Es wurden PET-Experimente mit den Radioliganden [¹⁸F]34 und [¹⁸F]31 durchgeführt (vgl. Tabelle 19; S. 144).

Im Fall des Säure-Derivats [¹⁸F]34 betrug die Startaktivität zur Synthese des Liganden 3-4 GBq. Im PET-Experiment wurde unter Isofluran-Narkose 29 MBq des Radiotracers in 600 µl isotonischer Kochsalzlösung einer 290 g schweren weiblichen Spargue-Dawley-Ratte injiziert und anschließend in einem Zeitraum von 60 Minuten dynamische Scans der Ratte aufgenommen.

Anhand der zusätzlich erhaltenen Zeitaktivitätskurven war ersichtlich, dass keine Aufnahme des Radioliganden im Gehirn der Ratte nachgewiesen werden konnte. Auch die Betrachtung der Transversalaufnahmen der Aktivitätsverteilung, welche in Abbildung 90 zu sehen sind, lässt keine Aktivität im Gehirn erkennen. Es ist lediglich ein unspezifisch höherer Uptake messbar, sowie eine stärkere Aktivität in den Venen (Sinus). Eine Permeationsfähigkeit des Säure-Derivates durch die Blut-Hirn-Schranke ist somit nicht gegeben.

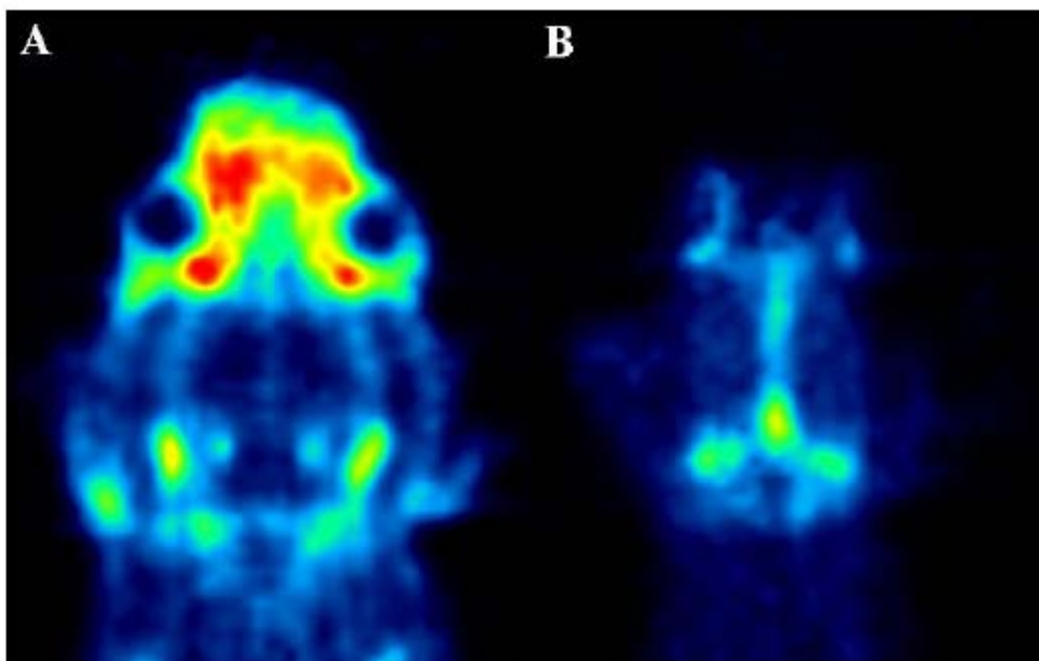


Abbildung 90: Transversalaufnahmen der Aktivitätsverteilung von [^{18}F]34 in verschiedenen Hirnregionen im μPET -Experiment; A + B: PET-Aufnahmen

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde daher das entsprechende Ethylester-Derivat [^{18}F]31 zur nachfolgenden PET-Untersuchung herangezogen, welches unter physiologischen pH-Bedingungen einen annähernd optimalen log P-Wert (3,41) zur Passage der Blut-Hirn-Schranke aufweist.

Die Startaktivität zur Synthese betrug 3-4 GBq. Im μPET -Experiment wurden anschließend 29 MBq des Radiotracer in 800 μl isotonischer Kochsalzlösung einer 340 g schweren männlichen Spargue-Dawley-Ratte injiziert. In einem Zeitraum von 60 Minuten wurden dynamische Scans der Ratte aufgenommen, welche unter Angabe verschiedener Hirnaufnahmen in Abbildung 91 veranschaulicht sind.

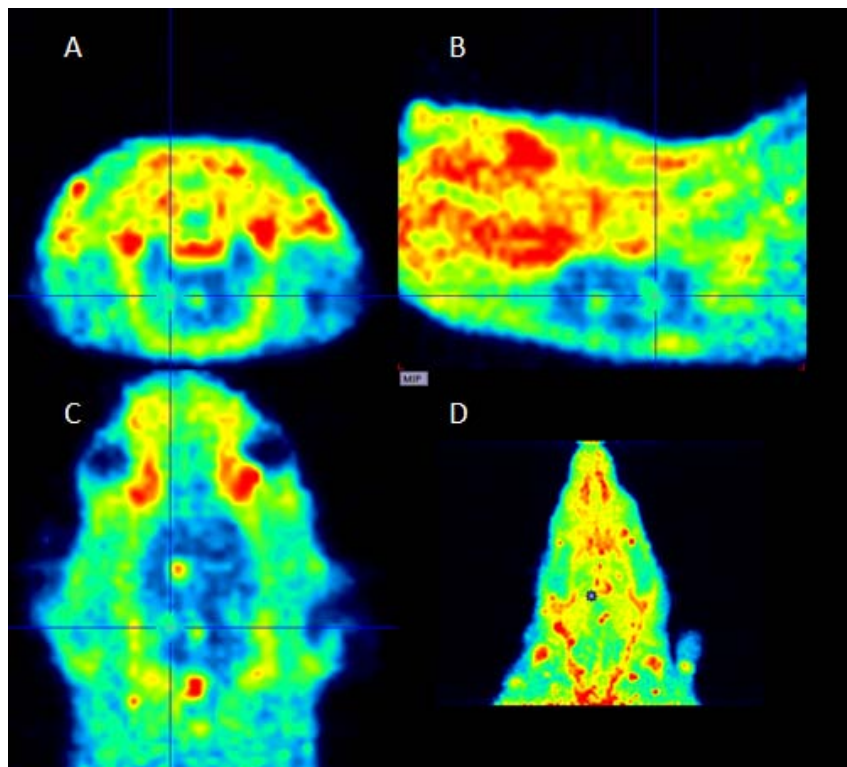


Abbildung 91: Aufnahme der Aktivitätsverteilung von [^{18}F]31 in verschiedenen Hirnregionen im μPET -Experiment; A: koronare Hirnaufnahme; B: sagittale Hirnaufnahme; C: transversale Hirnaufnahme; D: Aufnahme des kompletten Oberkörpers der Ratte

Anhand der μPET -Aufnahmen erkennt man in einigen Teilen des Gehirns der Ratte eine Anreicherung des eingesetzten Radioliganden. Speziell in der koronaren (A) und sagittalen (B) Hirnaufnahme sind 2 Bereiche mit spezifischer Radioaktivität erkennbar, wobei aber noch keine Aussage darüber getroffen werden kann um welche spezifischen Hirnstrukturen es sich handelt.

In der transversalen Aufnahme (C) lässt sich eine hohe, punktuelle Anreicherung des Radioliganden erkennen, welche ersten Vermutungen zufolge einen Hirntumor zeigt. Dieser könnte durch Neovaskualisierung neue Blutgefäße bilden, welche in der Regel erhebliche strukturelle Unterschiede gegenüber den normalen Blutgefäßen im Gehirn aufweisen und oft auch zu signifikanten lokalen Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke führen^{(232), (233)} (vgl. Abschnitt 4.3.3; S. 109). Dadurch ist eine erleichterte Aufnahme des Radioliganden denkbar.

In Abbildung 92 ist die ausgeprägte Radioaktivitätsanreicherung in nur einem Punkt des Gehirns nochmals anhand verschiedener transversaler Hirnaufnahmen der Ratte veranschaulicht.

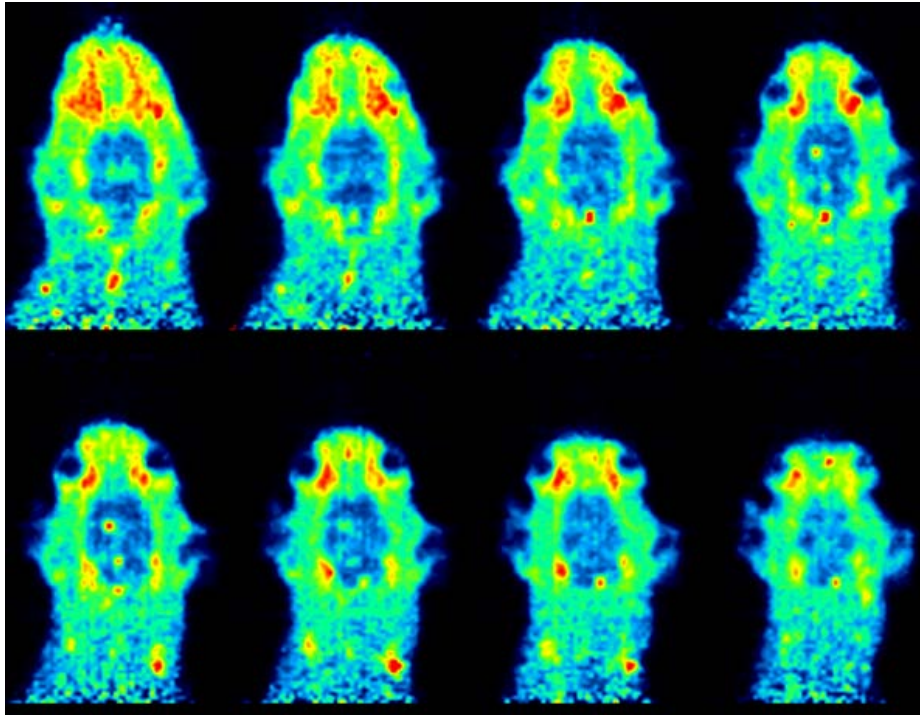


Abbildung 92: verschiedene Transversalaufnahmen der Aktivitätsverteilung von [^{18}F]31 im μPET -Experiment

Ob es sich bei der visualisierten, punktuellen Struktur im Gehirn der Ratte tatsächlich um einen Hirntumor handelt bedarf im Folgenden weiterer Abklärung. Desweiteren steht ein eindeutiger Nachweis der vermuteten Permeationsfähigkeit des Ethylester-Derivates [^{18}F]31 noch aus.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Gegenstand und Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung von Liganden mit Indolgrundstruktur für die Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors zur Therapie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen.

Ausgehend von in früheren Arbeiten synthetisierten Hydantoin-substituierten Dichlorindol-2-carbonsäure-Derivaten, die hochaffine Eigenschaften zur Glycinbindestelle des NMDA-Rezeptors aufweisen, sollten neue Derivate entwickelt und untersucht werden, einschließlich der Charakterisierung ihrer Affinität zur NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, ihrer Zytotoxizität sowie der physikochemischen Parameter.

6.1 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

Im Verlauf der Arbeit wurden strukturelle Modifikationen der Leitstruktur CED-9 mit dem Ziel einer gleichbleibend hohen bzw. verbesserten Affinität zur Glycinbindungsstelle des Rezeptors sowie der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften vorgenommen.

Zur Bestimmung der Affinität der synthetisierten Substanzen wurde ein etablierter und im Verlauf der Arbeit modifizierter Verdrängungsassay mit dem Radio-liganden [³H]MDL105,519 an Schweinehirn-Membranen herangezogen. Alle Testverbindungen wurden anhand der vorliegenden Bindungsstudien evaluiert. Neben den freien Säuren wurden jeweils auch ihre Vorstufen mit Ethylesterfunktion charakterisiert.

Im Rahmen der Struktur-Wirkungs-Untersuchungen mit Hilfe der Bindungs-experimente konnten bestimmte Strukturmerkmale als essentiell herausgestellt bzw. bekräftigt werden. Die Testverbindungen zeigten dabei IC₅₀-Werte im Bereich von 0,0028 bis 51,8 µM. Die entsprechenden Ester dagegen IC₅₀-Werte von 23,04 bis >3000 µM. Als vielversprechende Strukturen mit Affinitäten im

niedrigen nanomolaren Bereich stellten sich Derivate mit einer 4,6-Dichlor-oder Difluor-Substitution am Indolgrundgerüst (2,8 bis 4,6 nM) heraus. Auch die Substitution des Phenylhydantoin-Teils durch das bioisostere Thiophen-3-ylhydantoin führte zu einer gleichbleibenden ausgeprägten Affinität (3,1 nM). Im Folgenden sind die Affinitätsabnahmen in Betrachtung einzelner Strukturmodifikationen dargestellt:

- Variation des Substituentenmusters am Indol:
4,6-Dichlor \geq 4,6-Difluor > 6-Chlor > 6-Fluor > 5-Methoxy \gg 5-Hydroxy
- Einführung unterschiedlicher Reste an Position 3:
Phenyl \geq Thiophen > 3,5-Dimethoxyphenyl > Naphtyl > 3,4,5-Trimethoxyphenyl > Benzyl > H > Adamantyl
- Selektive Reduktion der Carbonylfunktionen des Hydantoins:
2,4-Dioxo > 2-Oxo, 4-Hydroxy > 2-Oxo > 2,4-Methyl
- Ersatz der Carboxylgruppe durch andere saure Strukturen:
COOH > COOCH₂CH₃ > CONHOH > CONHOCH₃
- Einbringen der Harnstoffstruktur über eine semicyclische Methylenbrücke:
Phenylhydantoin > Succinimid > Hydantoin

Um das Zytotoxizitätsprofil der synthetisierten Strukturen frühzeitig abschätzen zu können, wurde ein schnell durchführbares, zellbasiertes *in vitro*-Testsystem, der kommerziell erhältliche „Cell Proliferation Kit II (XTT-Test)“, eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Substanzen bei einer Konzentration von 100 μ M, welche weit über der therapeutisch einzusetzenden Konzentration liegt, als untoxisch zu bezeichnen sind.

Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit, insbesondere der Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, wurden die Lipophilien bei einer Auswahl der Testverbindungen durch Bestimmung ihrer log P-Werte ermittelt. Neben dem

Verfahren der potentiometrischen Titration wurde eine HPLC-Methode an einer RP-Phase verwendet.

Die Lipophilien der Carbonsäure-Derivate liegen im Bereich von 2,18 bis 3,19 (bzw. $\log D_{7,4} = -1,98$ bis 0,9), während die Ethylester-Derivate $\log P$ -Werte zwischen 3,2 bis 3,8 (bzw. $\log D_{7,4} = 2,08$ bis 4,76) aufweisen. Es ist festzustellen, dass die niedrigen $\log D_{7,4}$ -Werte der Säuren aufgrund des Vorliegens als Carboxylate bei pH 7,4 eine Aufnahme über die BHS erschweren. Die $\log D_{7,4}$ -Werte einiger Ester dagegen befinden sich im optimalen Bereich zur Passage der BHS und lassen eine Permeationsfähigkeit ins Gehirn vermuten.

Im Rahmen von Positronen-Emissions-Tomographie-Experimenten an Ratten sollte eine Aussage bezüglich der Aufnahme und Verteilung eines radioaktiv markierten, hochaffinen Liganden an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors im Gehirn getroffen werden. Dabei wurden sowohl das Carbonsäure-Derivat sowie der korrespondierende Ethylester dieser Testung unterworfen.

Für das Derivat mit Carbonsäure-Funktion konnte keine spezifische Aktivität im Gehirn nachgewiesen werden, während für das Ethylester-Derivat erste PET-Untersuchungen eine Hirnaufnahme vermuten lassen.

6.2 Ausblick

In Fortführung dieser Arbeit sollte versucht werden eine ausreichende Bioverfügbarkeit der dargestellten hochaffinen Verbindungen zu erreichen.

Als vielversprechend könnte sich dabei das Prodrug-Prinzip erweisen, da vermutlich die Ethylester-Derivate die Fähigkeit aufweisen, durch die Blut-Hirnschranke zu gelangen. In weiteren *in vivo*-Untersuchungen sollte die Möglichkeit der enzymatischen Esterhydrolyse im Gehirn untersucht werden, um ein Vorliegen der hochaffinen, freien Carbonsäurederivate zu gewährleisten.

Als weiterhin interessant ist das Prinzip des Chemical Delivery-Systems (CDS) ^{(234), (235)} anzusehen, bei dem der sequentielle Metabolismus redoxbasierter Systeme ausgenutzt wird und Ähnlichkeit mit dem endogenen NADH/NAD⁺ Coenzym-System besteht. Hierbei wird ein Arzneistoff über seine Carbonsäurefunktion kovalent über eine Aminoalkohol-Brücke an ein lipophiles Dihydropyridin gebunden. Dieses Prodrug ist leicht in der Lage mittels passiver Diffusion die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Im Gehirn erfolgt eine enzymatische Oxidation zu einem Pyridinium-Salz wodurch eine Rückdiffusion verhindert wird. Durch enzymatische Hydrolyse wird der Arzneistoff schließlich vom Trägermolekül freigegeben, wodurch er seine Wirkung im Gehirn entfalten kann, während das kleine Trägermolekül aktiv aus dem ZNS heraus transportiert wird. Literaturangaben zur Folge konnten nach diesem Verfahren Arzneistoffe mit einer - unter physiologischen Bedingungen vorliegenden - Carboxylatfunktion erfolgreich ins Gehirn transportiert werden ⁽²³⁴⁾. Mögliche Prodrugs nach dem CDS-Prinzip sind in Abbildung 93 veranschaulicht.

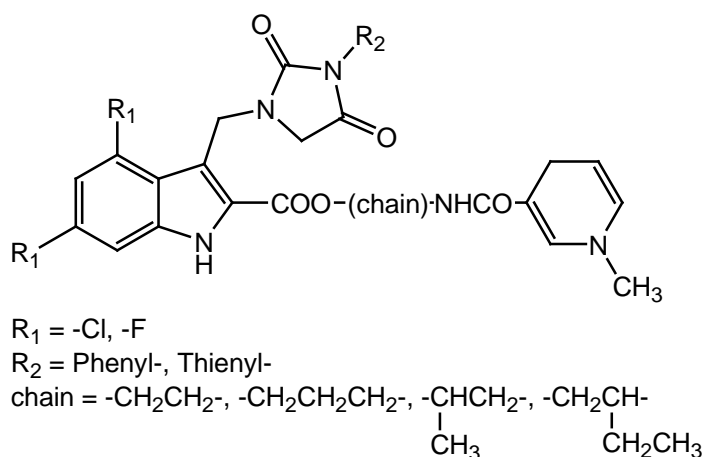


Abbildung 93: mögliche Prodrugs nach dem CDS-Prinzip

Darüberhinaus sollte die Möglichkeit eines aktiven Transports durch die Blut-Hirn-Schranke bzw. eines vorhandenen Efflux-Mechanismus anhand geeigneter Blut-Hirn-Schranken-Modelle abgeklärt werden. Aufgrund der Tatsache, dass der

Ligand GV 196771 (vgl. Abbildung 21; S. 35), welcher starke strukturelle Ähnlichkeiten mit den synthetisierten Verbindungen zeigt, ein Substrat für den Efflux-Transporter BCRP darstellt, scheint dies sinnvoll zu sein.

Gelingt es, eine Hirngängigkeit der dargestellten Liganden bzw. eine Freisetzung der Liganden aus potentiellen Prodrugs zu erreichen, stehen vielversprechende, hochaffine, nicht toxische Antagonisten an der Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors zur Verfügung, welche eine wertvolle Stellung in der Therapie und Prophylaxe verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen einnehmen könnten.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte, Material und Reagenzien

7.1.1 [³H]-MDL 105,519-Bindungsassay

7.1.1.1 Geräte

Betacounter	Liquid Scintillation Counter; Wallac 1409/ MultiCalc™ Routine mit Laboratory Data Management Programm V 2.6; Wallac ADL GmbH, Freiburg
Filteranlage	PHD™ Cell harvester 200 A; Brandel, Unterföhring, Ser.-Nr. PS-22100
Potter	Elvehjem Homogenisator; Kleinfeld La- bortechnik; Gehrden
Pumpe	Esward Speedivac 2; Ser.-Nr. 027515887
Reagenzglasschüttler	Top Mix 2; Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Reinstwasseranlage	Direct-Q; Millipor GmbH, Schwalbach
Rotor	Typ 60 Ti; Beckmann Coulter, Krefeld
Schüttelwasserbad	Polytest 20; Fisher Scientific, Schwerte
Tiefkühlschrank (-86 °C)	Forma 905 -86 °C ULT Freezer; Thermo Scientific, Schwerte, Ser.-Nr.: 41060666
Ultraturrax	T 25 basic; IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen

Experimenteller Teil

Ultrazentrifuge	Optima LE-80K; Beckmann Coulter, Krefeld, Ser.-Nr.: COL98A19
UV-Spektrometer	Hitachi U-2000; Hitachi High Technologies Europe GmbH, Duisburg
7.1.1.2 Material	
Caps	Eppendorf, Hamburg, Art.-Nr. 211-2120
Dispensette	III Easy Calibration; Brand GmbH & Co KG, Wertheim; Art.-Nr. 4700340
Einmalhandschuhe	Purple Nitrile-XTRA, 30,5 cm; Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Einmalkittel	Kleengard [®] Typ 5,6; Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Glasfaserfilter	Glasfaserzuschnitte Whatman GF/B, Brandel P-240-2; Adi Hassel, München
Küvetten	Halbmikro-Einmalküvetten, 10 x 4 x 45 mm; 1,5-3,0 ml; Schichtdicke 10 mm; Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag Best.-Nr. 2712010
Mikrotiterplatten	greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf Research, Hamburg
Reagenzgläser	12 x 75 mm; Schott-Fiolax, Gallen, Art.-Nr. 261100803
Überschuhe	VWR Critical Cover [®] VWR Critical Cover [®] Aqua Trak [®] Shoe Covers, Art.-Nr. 113-0591
Scintillationsröhrchen	Typ Mini Vial B, 5 ml, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe; Art.-Nr. 02991

Zentrifugationsröhrchen Nalgene UltraBottle Polycarbonat mit Aluminiumverschluss, 25 x 89 mm, 26,3 ml, Art.-Nr. 3431; Thermo Fisher Scientific, Roskilde

7.1.1.3 Reagenzien

Albumin Bovines Serum Albumin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr. A-4378

Brillant Blue Coomassie Brilliant Blue G; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr. B-0770

D(+)-Sucrose Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

DMSO Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunnen, Art.-Nr. 802912

Glycin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Radioligand [³H]MDL-105,519; 1,25 ml 9,25 MBq 250 µCi; Lösung in Ethanol; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Art.-Nr. TRK1043-250UCI

Scintillationsflüssigkeit Ultima Gold™ MV; Packard Bioscience Company, Groningen/NL

TRIS Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr. 93349

Herstellung verschiedener Lösungen

Ethanol 95 % Ethanol bis zur Erreichen der Dichte $\delta = 0,8041-0,8042$) mit Millipor-Wasser auffüllen

Experimenteller Teil

[³ H]MDL-Lösung 20 nM	41 µl [³ H]MDL105,519-Stammlösung mit 50 mM TRIS-Puffer ad 6,0 ml
NaCl-Lösung 0,15 M	0,877 g mit Millipor-Wasser ad 100,0 ml
Protein-Reagenz	5,0 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 in 25,0 ml Ethanol 95% lösen. 5,0 ml Phosphorsäure 85% zugeben, mit Millipor-Wasser ad 50,0 ml
5 mM TRIS-Puffer	0,0606 g TRIS mit Millipor-Wasser ad 1000,0 ml. pH-Einstellung auf 8,0 mit 1 N HCl bei 4°C
50 mM TRIS-Puffer	6,06 g TRIS mit Millipor-Wasser ad 1000,0. pH-Einstellung auf 7,4 mit 1 N HCl bei 4 °C

7.1.2 XTT-Viabilitätsassay

7.1.2.1 Geräte

Analysenwaage	PB 210 D; Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	SANOclav; Adolf Wolf, Bad Überkingen-Hausen
Brutschränke	Heraeus BB 15; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
ELISA-Reader	Spectrafluor Plus; Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Kühl-/Gefrierkombination	KGK 3955-23; Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Laminar-Flow-Box	L 12, Gaz-vidé; Jouan, Unterhaching

Experimenteller Teil

Mikroskop	DMIRB mit Digitalkamera DC 200; Leica, Bensheim
Mikrotiterplatten-Schüttler	Titramax 100; Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Reagenzglasschüttler	Reax 2000; Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Reinstwasseranlage	Direct Q; Millipore GmbH, Schwalbach
Wasserbad	Certomat WR; Braun, Melsung
Zellzählung	Neubauer-Zählkammer; VWR International, Darmstadt

7.1.2.2 Material

Bechergläser	VWR International, Darmstadt
Caps	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipette 10 ml (graduiert, steril)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Art.-Nr. 607180
Einmalpipette 25 ml (graduiert, steril)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Art.-Nr. 760180
Einmalpipette 50 ml (graduiert, steril)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Art.-Nr. 768180
Gummischaber	VWR International, Darmstadt
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten (96-well)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Art.-Nr. 65518
Nalgene® Cryobox TM (5x5)	Thermo Fisher Scientific, Roskilden
Nalgene® Kryoröhrchen (1,8 ml-steril)	Thermo Fisher Scientific, Roskilden

Experimenteller Teil

Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen 75 cm ²	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Art.-Nr. 353136
Zentrifugenröhrchen	Schott Glas, Mainz

7.1.2.3 Reagenzien

Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Art.-Nr. 11465015001
DMSO (BioUltra)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr. 41639
Routinemedium für MM 6-Zellen	500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin 55 ml FCS (hitze-inaktiviert bei 56 °C für 45 min) 10 ml Aqua dest. 5 ml OPI Media Supplement (Oxalacetat, Pyruvat, Rin- derinsulin) 5 ml Penicillin/Streptomycin- Lösung 5 ml MEM Nichtessentielle Aminosäu- ren
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr. T8154

7.1.3 Log P-Wert-Bestimmungen

7.1.3.1 Geräte

HPLC-Anlage	Jasco PU-2080 Plus; Gross-Umstadt, Ser.-Nr. B026460962
-------------	---

Experimenteller Teil

Titration PCA200; Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex/UK

UV-Detektor Jasco UV-2075 Plus; Gross-Umstadt, Ser.-Nr. B114060866

7.1.3.2 Material

RP-Säule Nucleosil[®] 100 C₁₈-7 μm, 250 x 4,6 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Ser.-Nr. 18122524

Software (HPLC) Borwin HPLC software

Software (PCA200) Refine200[®], Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex/UK

Control 200[®]; Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex/UK

7.1.3.3 Reagenzien

DMSO Uvasol[®]; Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

0,5 M HCl Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

0,5 M KOH Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

ISA-Methanol 80 % Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

ISA Wasser Ionic Strength Adjusted Water; 0,15 M KCl

n-Octanol Fluca, Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim und Deisenhofen

Triton X-100[®]-Lösung (0,5 %) Acros, Fisher Scientific GmbH, Nidderau

7.2 Syntheseverfahren und Analytik

7.2.1 Allgemeine Angaben

7.2.1.1 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC) DC-Kunststofffolien Kieselgel 60 F₂₄₅,
Art. Nr. 1.05735, Merck, Darmstadt

Säulenchromatographie (SC) Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm),
Art.-Nr. 1.07734, Merck, Darmstadt
Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Art.-Nr.
815330.25, Düren

Die Mischungsverhältnisse der angegebenen Fließmittel beziehen sich auf die Volumenteile.

7.2.1.2 Elementaranalyse

Gerät: Haereus CHN rapid, Carlo Erba Strumentazione 1106

(Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Herr W. Dindorf,
Frau B. Müller)

7.2.1.3 Entfernung der Lösungsmittel

Die Entfernung der Lösungsmittel erfolgt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers

Gerät: RV 06-ML Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, mit Pumpe
vacuubrand CVC2; Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim

Lösungsmittelreste werden im Hochvakuum entfernt

Gerät: Chemie-Hybrid-Pumpe RC 5; vacuubrand GmbH & Co KG,
Wertheim

7.2.1.4 IR-Spektroskopie

Gerät: Thermo Nicolet Avatar 330 FT-IR

(Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Frau N. Heindl, Frau S. Maehrlein)

Messung der Reinsubstanz mittels ZnSe-Kristall (AMTIR)

Kennzeichnung der Schwingungen:

δ = Deformationsschwingungen

ν = Valenzschwingungen

7.2.1.5 Massenspektrometrie

Geräte: FD-MS: Finnigan MAT 7 FD-Massenspektrometer (5kV Ionisierungsenergie)

(Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Frau M. Eider)

EI-MS: Varian MAT 44S (80 eV Ionisierungsenergie)

(Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Herr Dr. J. Arend)

Bei allen FD-MS-Spektren sind die Isotopenaufspaltungen angegeben.

7.2.1.6 NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker AC 300 (300 MHz)

(Institut für Pharmazie; Universität Mainz)

Signalabkürzungen:

¹ H-NMR:	s:	Singulett	bs:	breites Singulett
	d:	Dublett	dd:	Dublett eines Dubletts
	t:	Triplett	J:	Kopplungskonstante
	q:	Quartett		
	m:	Multiplett		
	p:	pseudo (der nachfolgende Kennbuchstabe beschreibt lediglich den Signalhabitus)		

¹³C-NMR: Cq: quartäres C-Atom

Bei aromatischen Protonen wird aufgrund der Komplexität nicht die ursächlich begründbare Multiplizität angegeben. Stattdessen wird der Habitus genannt; "d" bedeutet also, dass das Signal als Dublett erscheint, es sich aber in der Regel um ein Signal höherer Multiplizität handelt. Die in diesem Zusammenhang angegebenen Kopplungskonstanten sind ebenso nur scheinbar.

Die chemischen Verschiebungen δ relativ zu dem verwendeten Standard Tetramethylsilan sind in ppm verzeichnet.

Als Lösungsmittel werden CDCl₃ sowie DMSO-d₆ der Firma Deutero, Kastellaun verwendet.

7.2.1.7 Schmelzpunkt-Bestimmung

Gerät: Apparatur nach Dr. Tottoli, Büchi, Flawil/CH

Angaben in °C; nicht korrigiert (Institut für Pharmazie, Universität Mainz)

7.2.1.8 Chemikalien und Lösungsmittel

Sofern nicht anders angegeben, werden für jede Reaktion Lösungsmittel des Reinheitsgrades pro analysi (p.a.) eingesetzt. Absolutes Dichlormethan wurde über Calciumhydrid getrocknet und direkt vor dem Gebrauch destilliert.

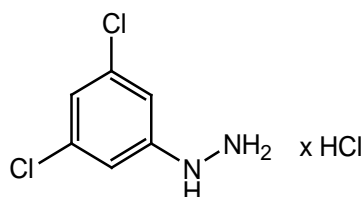
Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen

- Fluka, Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim und Deisenhofen
- Merck KGaA, Darmstadt
- Lancaster Synthesis, Mühlheim am Main
- Acros, Fisher Scientific GmbH, Nidderau

bezogen.

7.2.2 Synthesen

CED-1 3,5-Dichlorphenylhydrazin x HCl



$C_6H_7Cl_2N_2$

$M_r = 213,49$

Ansatz:	3,5-Dichloranilin	61,7 mmol	10,0 g
	Natriumnitrit	61,7 mmol	4,26 g
	Zinnchlorid x 2 H ₂ O	185 mmol	38,4 g
	Eisessig		200 ml
	HCl konz.		40 ml

Vorschrift: 3,5-Dichloranilin wird unter Stickstoffatmosphäre mit Eisessig versetzt. Es wird sofort mit dem Zutropfen von 40 ml konz. HCl begonnen, wobei im Eiswasserbad gekühlt wird. Dabei scheidet sich das Hydrochlorid kristallin ab. Nachdem der Ansatz mit Hilfe eines Eis/NaCl-Gemisches auf -5 °C abgekühlt wurde, wird eine vorgekühlte 2 M Natriumnitrit-Lösung in Wasser zugetropft wobei sich der Niederschlag wieder löst.

Dieser Diazoniumchlorid-Ansatz wird weiterhin unter Stickstoffatmosphäre sehr langsam (innerhalb 3 Stunden) zu einer Lösung von Zinnchlorid x 2 H₂O in 30 ml konz. HCl getropft, die mit Hilfe eines Aceton-Trockeneis-Gemisches auf unter

-15 °C abgekühlt wurde. Im Eisbad wird 20 Stunden gerührt, der entstandene Niederschlag abfiltriert. Der abfiltrierte Niederschlag wird unter Kühlung mit Eis bis zur alkalischen Reaktion in einer 2M NaOH-Lösung suspendiert und mit Ether extrahiert.

Aufarbeitung: Die Etherphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Hydrochlorid mit ethanolischer HCl ausgefällt.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 4,26 mmol = 6,9 % der Theorie

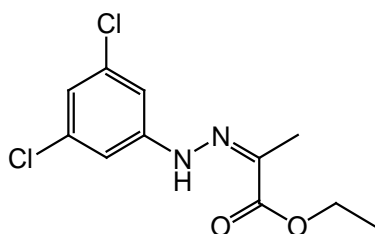
DC: R_f: 0,75 (Petrolether/Ethylacetat 4/1)

Schmelzpunkt: 207 °C (unter Zersetzung)

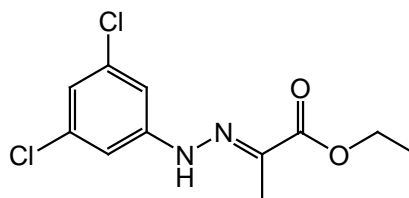
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3649 ν (N-H); 2978 ν (NH₃⁺); 1589 δ (N-H); 1482 ν (C=C); 833, 808

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 7,01 (pd, J=1,74 Hz, 2H, Ph-2,6H); 7,08 (pd, J=1,68 Hz, 1H, Ph-4H); 8,89 (s, 1H, NH); 10,50 (s, 3H, NH₃⁺)

CED-2 **2-[(E/Z)-2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono]propionsäure-
ethylester**



Z-Isomer



E-Isomer

C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₂

Mr = 275,13

Ansatz:	CED-1	28,2 mmol	5,0 g
	Brenztraubensäureethylester	28,2 mmol	3,11 ml
	Ethanol		55 ml

Vorschrift: CED-1 wird in 45 ml Ethanol gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Brenztraubensäureethylester in 10 ml Ethanol zugetropft. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt, bis nach 5 Stunden dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert wird. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung: Die entstandenen Isomere lassen sich säulenchromatographisch trennen. (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Ausbeute: Z-Isomer: 8,05 mmol = 28,6 % der Theorie

E-Isomer: 5,6 mmol = 19,9 % der Theorie

Aussehen: Z-Isomer: gelbe Kristalle

E-Isomer: orangefarbene Kristalle

DC: R_f: Z-Isomer: 0,75 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

R_f: *E*-Isomer: 0,28 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Schmelzpunkt: *Z*-Isomer: 60 °C

E-Isomer: 130 °C

FT-IR: *Z*-Isomer $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3653 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1659 ν (C=O); 1620 ν (C=N); 1385; 1160; 952

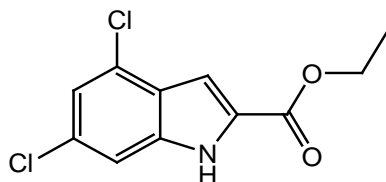
E-Isomer $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3657 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1677 ν (C=O); 1632 ν (C=N); 1385; 1156; 952

EI-MS: m/z (rel. Int.) 274 (74,5%, M⁺); 200 (100%); 159 (81,7%); 124 (54,3%); 90 (27,8%); 73 (38,4%)

¹H-NMR: *Z*-Isomer d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,28 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,1 (s, 3H, CH₃); 4,25 (q, ³J=7,07 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,03 (pt, J=1,85 Hz, 1H, Ph-4H); 7,32 (pd, J=1,85 Hz, 2H, Ph-2,6H); 11,81 (s, 1H, NH)

E-Isomer d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,25 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,05 (s, 3H, CH₃); 4,20 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,04 (pt, J=1,86 Hz, 1H, Ph-4H); 7,21 (pd, J=1,85 Hz, 2H, Ph-2,6H); 10,11 (s, 1H, NH)

CED-3 **4,6-Dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₁H₉Cl₂NO₂

M_r = 258,1

Ansatz: CED-2 13,3 mmol 3,67 g
 Polyphosphorsäure 15 ml

Vorschrift: Polyphosphorsäure wird in einem Becherglas vorgelegt und erhitzt, bis die Viskosität abnimmt. Das Hydrazon wird portionsweise eingerührt und dabei unter ständigem Rühren vorsichtig weiter erhitzt, bis die Reaktion bei ca. 120 °C exotherm einsetzt. Dabei ändert sich die Farbe des gelben Hydrazons zu beige. Im Fortlaufen der Reaktion nimmt der Ansatz eine immer dunklere bräunliche Farbe an. Dabei ist darauf zu achten, dass diese nicht zu dunkel wird. Es wird mit Eiswasser hydrolysiert, wobei sofort ein heller Niederschlag ausfällt. Dieser wird, nach Neutralisation mit NaOH-Plätzchen, unter Kühlung in Ethylacetat gelöst. Nach erschöpfender Extraktion werden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung: Umkristallisation in Dichlormethan/*n*-Hexan

Ausbeute: 11,7 mmol = 88,3 % der Theorie

Aussehen: weiße, filzartige Nadeln

DC: R_f: 0,21 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

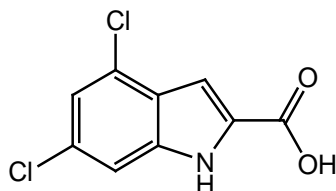
Schmelzpunkt: 179 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3350 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1667 ν (C=O); 1381; 1164; 959; 818

EI-MS: m/z (rel. Int.) 257 (47,2%, M⁺); 211 (100%); 183 (27,8%); 148 (31,5%); 87 (23,9%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,34 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₃); 4,35 (q, ³J=7,14 Hz, 2H, CH₂); 7,11 (pd, J=1,35 Hz, 1H, Indol-H); 7,30 (pd, J=1,54 Hz, 1H, Indol-H); 7,44 (s, 1H, Indol-H); 12,37 (s, 1H, Indol-NH)

CED-4 **4,6-Dichlorindol-1*H*-indol-2-carbonsäure**



C₉H₅Cl₂NO₂

$M_r = 230,05$

Ansatz:	CED-3	10,5 mmol	2,72 g
	LiOH x H ₂ O	15,75 mmol	0,38 g
			= 31,5 ml 0,5 M Lsg. in H ₂ O
	THF		20 ml

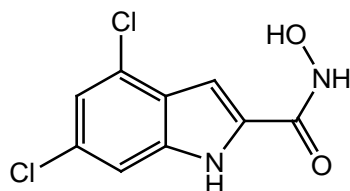
Vorschrift: Der Ester wird in THF gelöst und eine 0,5 molare Lösung von LiOH in Wasser so zugetropft, dass keine 2 Phasen entstehen. Nachdem nach 12 Stunden dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachweisbar ist, wird mit

10 %iger HCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum mit Hilfe des Rotationverdampfers entfernt.

- Aufarbeitung:** Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan
- Ausbeute:** 5,48 mmol = 52,19 % der Theorie
- Aussehen:** weiße Kristalle
- DC:** R_f: 0,24 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)
- Schmelzpunkt:** 238 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3200-2600 ν (O-H); 3440 ν (C-N); 2983 ν (C-H); 1683 ν (C=O); 1527; 1241; 1074; 837
- EI-MS:** m/z (rel. Int.) 229 (43,9%, M⁺); 211 (100%); 183 (44,7%); 157 (14,6%); 148 (47,6%); 123 (4,6%); 106 (16,5%)
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 7,05 (pd, J=2,01 Hz, 1H, Indol-3H); 7,26 (pd, J=1,53 Hz, 1H, Indol-H); 7,41 (s, 1H, Indol-H); 11,44 (s, 1H, Indol-NH); 12,32 (s, 1H, COOH)

CED-5

4,6-Dichlor-*N*-hydroxy-1*H*-indol-2-carbamid



$C_9H_6Cl_2N_2O_2$

$M_r = 245.06$

Ansatz:

Methode A:

CED-4	0,87 mmol	0,2 g
Thionylchlorid	1,34 mmol	0,1 ml
Hydroxylamin-HCl	3,48 mmol	0,24 g
THF		40 ml
Triethylamin		50 ml

Methode B:

CED-4	2,17 mmol	0,5 g
Oxalylchlorid	5,43 mmol	0,49 ml
Hydroxylamin-HCl	8,68 mmol	0,56 g
DMF	2,17 mmol	0,2 g
Triethylamin		50 ml
THF		8 ml
Wasser		2 ml

Vorschrift:

Methode A: Ein Gemisch aus Thionylchlorid und CED-4 in THF wird bis zum Ende der Gasentwicklung unter Rückfluss erhitzt. Danach wird überschüssiges Thionylchlorid entfernt, indem das ausgefallene Säurechlorid abfiltriert wird. In einem weiteren Schritt wird eine Lösung von Hydroxylamin-HCl und Triethylamin in Wasser 30 Minuten bei 0 °C gerührt,

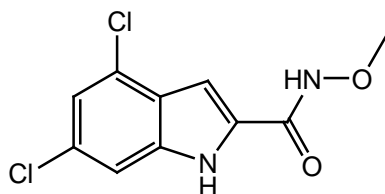
anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe des Säurechlorids in THF. Nach 1 Stunde wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt.

Methode B: Säure und DMF werden in Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt, wobei eine starke Gasentwicklung auftritt, die nach ca. 40 Minuten beendet ist. Diese Mischung wird sehr langsam zu einer vorher auf 0 °C gekühlten Lösung von Hydroxylamin-HCl und Triethylamin in Wasser getropft. Der Reaktionsansatz wird weitere 45 Minuten gerührt, anschließend in 2 ml 2N HCl gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Dabei fällt Triethylammoniumchlorid als blassrosa Kristalle aus, die abgetrennt und verworfen werden. Die Mutterlauge wird vollständig einrotiert, wobei ein braunes Öl zurück bleibt.

- Aufarbeitung:** **Methode A:** Umkristallisieren aus Petrolether/Dichlormethan
Methode B: Säulenchromatographie; zuerst erfolgt die Abtrennung von Verunreinigungen mit Diisopropylether, erst danach wird die Hydroxamsäure mit Ethylacetat eluiert. Das Produkt wird durch Zugabe von Diisopropylether schließlich sauber ausgefällt.
- Ausbeute:** **Methode A:** 0,11 mmol = 12,64 % der Theorie
Methode B: 1,41 mmol = 65 % der Theorie
- Aussehen:** gelbe Kristalle
- DC:** R_f : 0,82 (Ethylacetat/Methanol 2/1)
- Schmelzpunkt:** 192 °C

- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3453 ν (N-H); 3338 ν (O-H); 2983 ν (C-H); 1669 ν (C=O); 1646 δ (N-H); 1385; 1156; 952; 813
- EI-MS:** m/z (rel. Int.) 244 (33,8%, M⁺); 212 (100%); 200 (10,6%); 184 (24,7%); 157 (43,9%); 114 (10,6%); 87 (33,8%); 75 (37,2%)
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 7,08 (s, 1H, Indol-3H); 7,23 (pd, J=1,63 Hz, 1H, Indol-H); 7,40 (s, 1H, Indol-H), 9,27 (bs, 1H, OH); 11,41 (s, 1H, Indol-NH); 12,19 (bs, 1H, NH)

CED-6 **4,6-Dichlor-N-methoxy-1H-indol-2-carbamid**



C₁₀H₈Cl₂N₂O₂

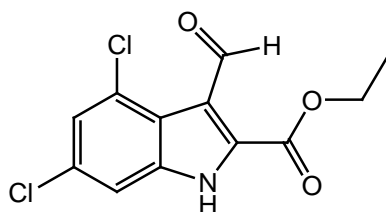
M_r = 259,09

Ansatz:	CED-4	2,17 mmol	0,5 g
	Oxalylchlorid	5,43 mmol	0,49 ml
	o-Methoxylamin x HCl	8,68 mmol	0,73 g
	DMF	2,17 mmol	0,2 g
	Triethylamin		50 ml
	THF		8 ml
	Wasser		2 ml

Vorschrift: Die Durchführung erfolgt analog zu Verbindung CED-5
Methode B.

- Aufarbeitung:** Säulenchromatographie; mit Hilfe von Diisopropylether werden durch Nebenreaktionen aufgetretene Verunreinigungen abgetrennt, danach wird das Produkt mit Ethylacetat eluiert.
- Aussehen:** hellbrauner Feststoff
- DC:** R_f: 0,71 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)
- Schmelzpunkt:** 118 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3385 ν (N-H); 2981 ν (aromat.C-H); 2948 ν (aliphatic.C-H); 1674 ν (C=O); 1624; 1382; 1161; 954; 816;
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 2,88 (s, 3H, CH₃); 7,36 (pd, 1H, Indol-H); 7,44 (m, 1H, Indol-H), 7,55 (m, 1H, Indol-H), 12,04 (s, 1H, Indol-NH)

CED-7 **4,6-Dichlor-3-formyl-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



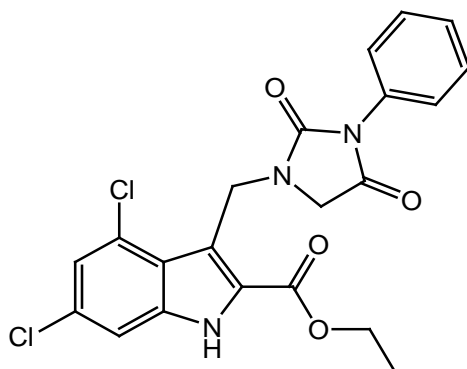
C₁₂H₉Cl₂NO₃

M_r = 286,11

Ansatz:	CED-3	9,69 mmol	2,5 g
	<i>N</i> -Methylformanilid	9,69 mmol	1,2 ml
	Phosphorylchlorid	9,69 mmol	0,91 ml
	Dichlorethan		10 ml
	Natriumacetat x 3H ₂ O		2,86 g

- Vorschrift:** Unter Schutzgasatmosphäre mit Stickstoff werden *N*-Methylformanilid und Phosphorylchlorid bei Raumtemperatur so lange gerührt, bis ein orangefarbener Feststoff entsteht. Das entstandene Chlormethyleniminium-Salz wird in Dichlorethan gelöst, der Ester zugegeben und 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird auf eine eiskalte Lösung von Natriumacetat x 3 H₂O gegeben und geschüttelt, wobei augenblicklich aus der dunkelbraunen Lösung ein gelber Feststoff ausfällt. Um diesen möglichst quantitativ auszufällen wird über Nacht im Kühlschrank stehenlassen. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet.
- Aufarbeitung:** Mehrfaches Umkristallisieren in Ethylacetat
- Ausbeute:** 6,43 mmol = 66,36% der Theorie
- Aussehen:** weiße, glänzende Kristalle
- DC:** R_f: 0,7 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)
- Schmelzpunkt:** 211 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3364 ν (N-H); 2978 ν (aromat.C-H); 2884 ν (aliphatic.C-H); 1729 ν (C=O_{Ester}); 1654 ν (C=O_{Aldehyd}); 1389; 1160; 952; 817
- EI-MS:** m/z (rel. Int.) 285 (22,5%, M⁺); 256 (100%); 238 (79,2%); 211 (20,1%); 183 (30,3%); 148 (41,1%); 114 (13,4%); 87 (33,4%); 73 (28,3%)
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,37 (t, ³J=7,09 Hz, 3H, CH₃); 4,42 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂); 7,41 (pd, J=1,74 Hz, 1H, Indol-H); 7,54 (pd, J=1,73 Hz, 1H, Indol-H); 10,61 (s; 1H, CHO); 11,64 (s, 1H, Indol-NH)

CED-8 **4,6-Dichlor-3[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₇Cl₂N₃O₄

M_r = 446,28

Ansatz:	CED-7	3,5 mmol	1,0 g
	Glycinmethylester-HCl	3,5 mmol	0,44 g
	Triethylamin	3,15 mmol	0,32 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	4,0 mmol	0,85 g
	Phenylisocyanat	3,5 mmol	0,42 g
	Dichlormethan		10 ml

Vorschrift: Das Aminosäureester-Hydrochlorid wird fein zermahlen und in wasserfreiem Dichlormethan suspendiert. Um die freie Base des Aminosäureesters freizusetzen wird Triethylamin zugegeben. Nach wenigen Minuten erfolgt die Zugabe von CED-7 und kurz danach die Zugabe des Natriumtriacetoxyborhydrids. Das Reaktionsgemisch wird für 24 Stunden gerührt. In einem nächsten Schritt wird mit Phenylisocyanat versetzt und weiterhin für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, erneut Triethylamin zugegeben und 24 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung wird mit Dichlormethan versetzt und anschließend nacheinander mit 5 %iger HCl, gesättigter Natriumhydrogen-

carbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert.

Aufarbeitung: Der entstandene Feststoff wird in Methanol suspendiert und in der Siedehitze auf wenige Milliliter eingengt. Beim Erkalten fällt das Produkt aus.

Aussehen: feine, weiße Nadeln

Ausbeute: 1,6 mmol = 60,84 % der Theorie

DC: R_f : 0,39 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/1)

Schmelzpunkt: 206 °C

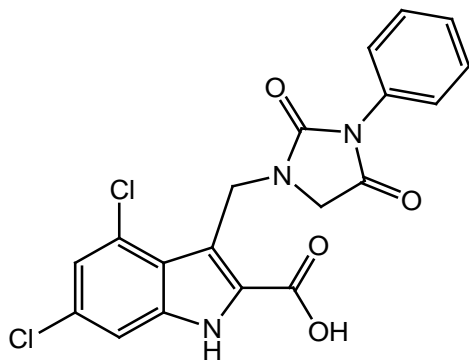
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3344 $\nu(\text{N-H})$; 2979 $\nu(\text{aromat.C-H})$; 2888 $\nu(\text{aliphatic.C-H})$; 2357; 1674 (C=O); 1475; 1385; 1156; 1070; 960; 813

EI-MS: m/z (rel. Int.) 445 (21,8%, M^+); 372 (100%); 298 (11,3%); 270 (32%); 224 (82,7%); 198 (53,5%); 161 (34%); 135 (14,7%); 119 (46,7%); 91 (38,8%); 77 (24,9%)

$^1\text{H-NMR}$: d_6 -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,37 (t, $^3J=7,1$ Hz, 3H, CH_3); 3,82 (s, 2H, NCH_2CO); 4,39 (q, $^3J=7,1$ Hz, 2H, CH_2); 5,25 (s, 2H, Indol- CH_2N); 7,25-7,47 (m, 7H, Ar-H); 12,37 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	56,52	3,84	9,42
gef.:	46,41	3,79	9,34

CED-9 **4,6-Dichlor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₃Cl₂N₃O₄

M_r = 418,23

Ansatz:

CED-8	1,34 mmol	0,6 g
LiOH x H ₂ O	2,02 mmol	0,09 g
		= 4,04 ml 0,5 M-Lsg. in H ₂ O
THF		12 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-4. Nach 40 Stunden ist dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar. Das Produkt fällt beim Ausschütteln mit Ethylacetat aus.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in n-Hexan/Ethylacetat

Ausbeute; 0,4 mmol = 30 % der Theorie

Aussehen: weiße Kristalle

DC: R_f: 0,06 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 281 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-2800 ν (O-H); 3250 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 2361; 1715 ν (C=O); 1446; 1311; 1249; 980; 837; 743; 690

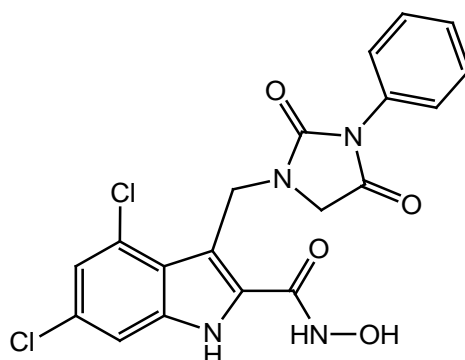
Experimenteller Teil

FD-MS: m/z (rel. Int.) 420 (6,5%); 418 (13,3%); 417 (15,6%); 416 (100%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,82 (s; 2H, NCH₂CO); 5,26 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,31-7,46 (m, 7H, Ar-H); 11,0 (s, 1H, Indol-NH); 12,36 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	54,56	3,13	10,05
gef.:	53,44	3,31	9,56

CED-10 **4,6-Dichlor-*N*-hydroxy-3-[(2,4-dioxo-3-phenyl-1-imidazolidinyl)methyl]-1*H*-indol-2-carbamid**



C₁₉H₁₄Cl₂N₄O₄

M_r = 433,24

Ansatz:	CED-9	0,2 mmol	0,082 g
	Oxalylchlorid	0,5 mmol	0,042 ml
	Hydroxylamin x HCl	0,8 mmol	0,056 g
	DMF		0,16 g
	Triethylamin		10 ml

Experimenteller Teil

Dichlormethan	3,2 ml
THF	1,3 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydroxamsäurebildung erfolgt analog zu Verbindung CED-5 **Methode B**.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; zuerst werden aufgetretene Verunreinigungen mit Diisopropylether abgetrennt, mit einer Methanol/Ethylacetat-Mischung 1/2 lässt sich schließlich das Produkt eluieren.

Aussehen: beigefarbene Kristalle

Ausbeute: 0,042 mmol = 48,5 % der Theorie

DC: R_f: 0,21 (Ethylacetat/Methanol 2/1)

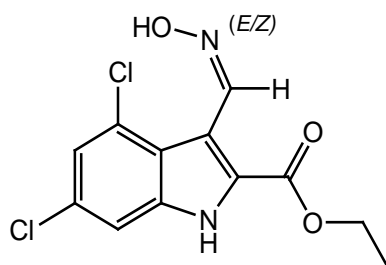
Schmelzpunkt: 214 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3600-2400 ν (O-H); 3325 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1678 ν (C=O); 1423; 1381; 837; 750

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,87 (s, 2H, NCH₂CO); 5,38 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,06 (pd, J=1,63 Hz, 1H, Ar-H); 7,32-7,47 (m, 6H, Ar-H), 11,67 (s, 1H, Indol-NH), 12,31 (bs, 1H, NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	52,67	3,26	12,93
gef.:	52,41	3,16	12,42

CED-11 **4,6-Dichlor-3-[(*E/Z*)hydroxyiminomethyl]-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₂H₁₀Cl₂N₂O₃

M_r = 301,12

Ansatz:	CED-7	7	mmol	2,1 g
	Hydroxylamin x HCl	17,52	mmol	1,22 g
	Pyridin			18 ml
	Ethanol			80 ml

Vorschrift: CED-7 wird zusammen mit Hydroxylamin x HCl und Pyridin mit Ethanol versetzt. Nach einstündigem Refluxieren wird die Reaktionsmischung mit Wasser verdünnt und mit 10 %iger HCl angesäuert. Anschließend wird mit Ether extrahiert, die vereinigten Extrakte mit 10 %iger HCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich am Rotationsverdampfer bis auf wenige Milliliter eingeeengt.

Aufarbeitung: Nach Zugabe von Petrolether fällt das Produkt als weißer Niederschlag aus und wird abfiltriert. Da noch Verunreinigungen vorhanden sind erfolgt eine Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 3/2)

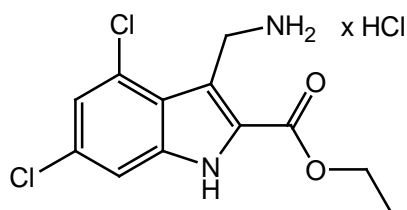
Aussehen: weißes, feines Pulver

Ausbeute: 1,06 mmol = 15,14 % der Theorie

DC: R_f: 0,6 (Petrolether/Ethylacetat 3/2)

- Schmelzpunkt:** 280 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3289 ν (N-H); 2991 ν (C-H); 1675 ν (C=O); 1328; 1242; 984; 833; 776; 698
- EI-MS:** m/z (rel. Int.) 300 (52%, M⁺); 283 (100%); 256 (61%); 227 (21%); 183 (17%)
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,33 (t, ³J=7,07 Hz, 3H, CH₃); 4,34 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂); 7,27 (pd, J=1,73 Hz, 1H, Indol-H); 7,42 (pd, J=1,64 Hz, 1H, Indol-H); 8,53 (s, 1H, CH=N), 11,24 (s, 1H, OH), 12,29 (s, 1H, Indol-NH)

CED-12 **3-(Aminomethyl)-4,6-dichlor-1H-indol-2-carbonsäure-ethylester x HCl**



C₁₂H₁₃Cl₃N₂O₂

M_r = 323,61

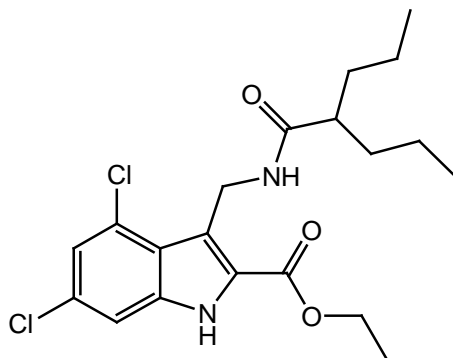
Ansatz:	CED-11	0,46 mmol	0,15 g
	Zinkpulver		0,46 g
	Natriumacetat		0,78 g
	Eisessig		15 ml

Vorschrift: Zu einer Suspension aus CED-11 und wasserfreiem Natriumacetat in Eisessig wird Zinkpulver gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine klare Lösung

entsteht und sich das Zink zu Kügelchen zusammenlagert. Der Reaktionsansatz wird anschließend in eine eisgekühlte 2 molare NaOH-Lösung dekantiert und mit Ether extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und der Ether im Vakuum entfernt.

- Aufarbeitung:** Der weiße Rückstand wird in Ethanol suspendiert und mit ethanolischer HCl versetzt wobei sich die Trübung auflöst. Das Lösungsmittel wird auf wenige Milliliter eingeeengt und mit Ether versetzt. Ein weißer Niederschlag fällt aus der abgesaugt wird.
- Aussehen:** beigefarbene Kristalle
- Ausbeute:** 0,48 mmol = 96 % der Theorie
- DC:** R_f : 0,06 (Petrolether/Ethylacetat 1/1 + 3 % Triethylamin)
- Schmelzpunkt:** 280 °C (unter Zersetzung)
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3134 ν (N-H); 3250-2400 ν (NH_3^+); 2978 ν (C-H); 1691 ν (C=O); 1556; 1438; 1246; 984; 837; 755
- EI-MS:** m/z (rel. Int.) 285 (22%, M^+ freie Base); 256 (100%); 228 (51%); 213 (11%)
- $^1\text{H-NMR}$:** d_6 -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,39 (t, $^3J=7,09$ Hz, 3H, CH_3), 4,40 (q, $^3J=7,11$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4,65 (s, 2H, CH_2N); 7,35 (pd, $J=1,70$ Hz, 1H, Indol-H); 7,51 (pd, $J=1,69$ Hz, 1H, Indol-H); 8,38 (s, 3H, NH_3^+); 12,08 (s, 1H, Indol-NH)

CED-13 **4,6-Dichlor-3[(2-Propylpentanamido)methyl]-1*H*-indol-carbonsäureethylester**



C₂₀H₂₆Cl₂N₂O₃

M_r = 413,34

Ansatz:	CED-12	0,46 mmol	0,15 g
	2-Propylvaleriansäure	0,42 mmol	0,06 g
	EDCI	1,05 mmol	0,2 g
	HOBt	0,42 mmol	0,057 g
	DMF		10 ml

Vorschrift: Unter Schutzgasatmosphäre mit Stickstoff werden EDCI und HOBt in trockenem DMF gelöst und anschließend das Amin CED-12 zugegeben. Zuletzt wird Valproinsäure langsam mit einer Spritze über ein Septum zugetropft. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, nach erfolgter Umsetzung mit 30 ml Wasser hydrolysiert und schließlich mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden zweimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird mit Hilfe des Rotationsverdampfers unter Vakuum eingengt, wobei das Produkt ausfällt.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat 1/2)

Experimenteller Teil

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,15 mmol = 35,71 % der Theorie

DC: R_f: 0,84 (Petrolether/Ethylacetat 1/2)

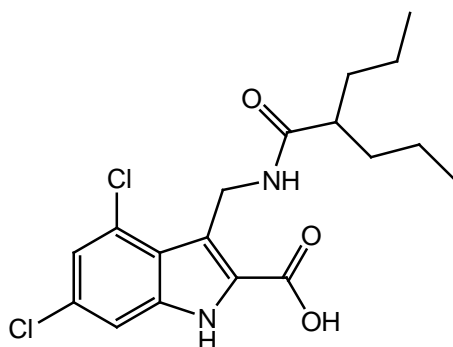
Schmelzpunkt: 223 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3330 ν (N-H); 2958 ν (C-H); 1675 ν (C=O_{Ester}); 1630 ν (C=O_{Amid}); 1238; 980; 837; 776; 678

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 0,77 (t, 6H, CH₂CH₂CH₃); 1,30 (tq, 4H, CH₂CH₂CH₃); 1,32 (t, ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1,34 (dt, 4H, CH₂CH₂CH₃); 1,42 (dd, 1H, CH); 4,34 (q, ³J=7,13 Hz, 2H, CH₂CH₃); 4,83 (d, ³J=3,61 Hz, 2H CH₂NH); 7,23 (pd, J=1,24 Hz, 1H, Indol-H); 7,43 (pd, J=1,38 Hz, 1H, Indol-H); 7,78 (s, 1H, CH₂NH); 12,29 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	% C	%H	%N
ber.:	58,12	6,34	6,78
gef.:	58,37	6,88	6,27

CED-14 **4,6-Dichlor-3[(propylpentanamido)methyl]-1H-indolcarbonsäure**



C₁₈H₂₂Cl₂N₂O₃

M_r = 385,28

Ansatz:	CED-13	0,12 mmol	0,05 g
	LiOH x H ₂ O	0,18 mmol	0,008 g
		= 0,36 ml 0,5 M Lsg. in H ₂ O	
	THF		10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-4

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/n-Hexan

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,062 mmol = 51,67 % der Theorie

DC: R_f: 0,07 (Petrolether/Ethylacetat 1/2 + 3 % Ameisensäure)

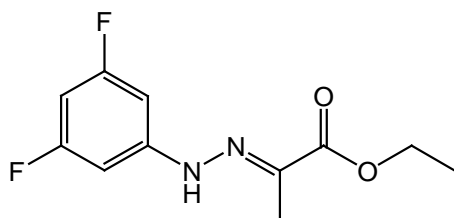
Schmelzpunkt: 245 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-3100 ν (O-H); 3340 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1679 ν (C=O_{Säure}); 1630 ν (C=O_{Amid}); 1385; 1152; 1074; 948; 666

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 0,79 (t, 6H, CH₂CH₂CH₃); 1,17 (q, 4H, CH₂CH₂CH₃); 1,35 (dt, 4H, CH₂CH₂CH₃); 1,41 (m, 1H, CH); 4,83 (d, 2H CH₂NH); 7,24 (s, 1H, Indol-H); 7,44 (s, 1H, Indol-H); 7,78 (s, 1H, CH₂NH); 11,43 (s, 1H, COOH); 12,29 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	56,11	5,76	7,27
gef.:	56,2	4,98	6,9

CED-15 **2-[(E/Z)-2-(3,5-Difluorphenyl)hydrazono]propionsäure-ethylester**



C₁₁H₁₂F₂N₂O₂

M_r = 242,22

Ansatz:	3,5-Difluorphenylhydrazin-HCl	12,0 mmol	2,24 g
	Ethylpyruvat	12,0 mmol	1,4 ml
	Eisessig		27 ml

Vorschrift: Da sich das fluorierte Phenylhydrazin-Hydrochlorid nur sehr schlecht in Ethanol lösen lässt, wird bei dieser Hydrazonbildung Eisessig als Lösungsmittel gewählt. Zu dem gelösten Hydrazin wird langsam Ethylpyruvat in Eisessig getropft und der Reaktionsansatz anschließend für 1 Stunde

unter Rückfluss erhitzt. Nach Hydrolyse mit Wasser fällt beim Abkühlen ein hellgelber Niederschlag aus, der abgesaugt und nacheinander mit eiskaltem Eisessig und Wasser gewaschen wird.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 9/1; wobei sich die entstandenen Isomere voneinander abtrennen lassen

Aussehen: gelbe Kristalle

Ausbeute: 9,7 mmol = 81,19 % der Theorie

DC: R_f: *Z*-Isomer: 0,62 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

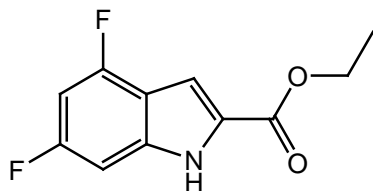
R_f: *E*-Isomer: 0,19 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Schmelzpunkt: Enantiomerengemisch: 159 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 1699 ν (C=O); 1605 ν (C=N); 1303; 1151; 1106; 984; 849; 755; 686

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,25 (t, ³J=7,09 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,05 (s, 3H, CH₃); 4,19 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,67 (m, 1H, Ph-H), 6,84 (m, 2H, Ph-H); 10,15 (s, 1H, Indol-NH)

CED-16 **4,6-Difluor-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₁H₉F₂NO₂

M_r = 225,19

Ansatz: CED-15 9,33 mmol 2,26 g
 Polyphosphorsäure 12 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Indolsynthese erfolgt analog zu Verbindung CED-3

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Dichlormethan/*n*-Hexan

Aussehen: leicht rötlich-beige Nadeln

Ausbeute: 8,17 mmol = 87,57 % der Theorie

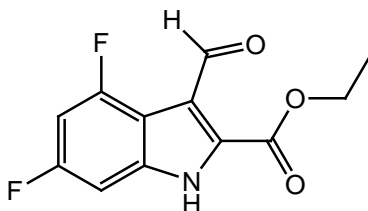
DC: R_f: 0,24 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Schmelzpunkt: 147 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3314 ν (N-H); 2923 ν (C-H); 1703 ν (C=O); 1589; 1283; 1213; 1115; 820

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,11 Hz, 3H, CH₂CH₃), 4,33 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,94 (m, 1H, Indol-H); 7,04 (pd, J=9,33 Hz, 1H, Indol-H); 7,16 (dp, J=1,3 Hz, 1H, Indol-H); 12,34 (s, 1H, Indol-NH)

CED-17 **4,6-Difluor-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₂H₉F₂NO₃

M_r = 253,2

Ansatz:	CED-16	4,44 mmol	1,0 g
	N-Methylformanilid	4,44 mmol	0,55 ml
	Phosphorylchlorid	4,44 mmol	0,41 ml
	Dichlorethan		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Formylierung erfolgt analog zu Verbindung CED-7

Aufarbeitung: Mehrfaches Umkristallisieren in Ethylacetat

Aussehen: beigefarbene Kristalle

Ausbeute: 2,25 mmol = 50,68 % der Theorie

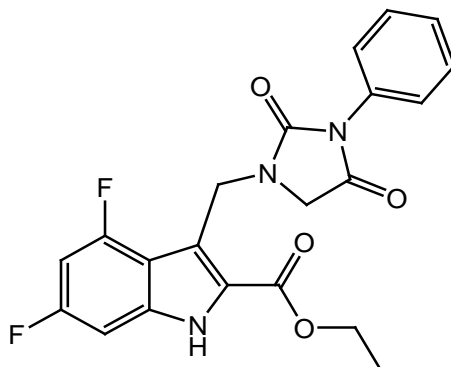
DC: R_f: 0,43 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)

Schmelzpunkt: 268 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 1723 ν (C=O_{Ester}); 1650 ν (C=O_{Aldehyd}); 1421; 1278; 1213; 1111; 853; 718; 665

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,38 (t, ³J=7,09 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,44 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,07 (m, 1H, Indol-H); 7,15 (m, 1H, Indol-H); 10,56 (s 1H, CHO); 11,68 (s, 1H, Indol-NH)

CED-18 **4,6-Difluor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₇F₂N₃O₄

M_r = 413,37

Ansatz:	CED-17	1,91 mmol	0,48 g
	Glycinmethylester-HCl	1,91 mmol	0,24 g
	Triethylamin	1,72 mmol	0,17 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,19 mmol	0,46 g
	Phenylisocyanat	1,91 mmol	0,21 ml
	Dichlormethan		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8

Aufarbeitung: Der einrotierte Reaktionsansatz wird in Methanol aufgenommen und in der Siedehitze bis auf wenige Milliliter eingeeengt. Beim Erkalten fällt das Produkt in weißen Nadeln aus.

Aussehen: weiße Nadeln

Ausbeute: 0,77 mmol = 40,31 % der Theorie

DC: R_f: 0,48 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/2)

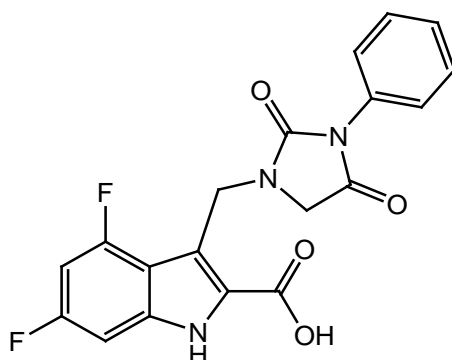
Schmelzpunkt: 191 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3304 ν (N-H); 2978 ν (aromat.C-H); 2880 ν (aliphatic.C-H); 1715 ν (C=O); 1476; 1082; 939; 829; 666

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,37 (t, ³J=7,05 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,88 (s, 2H, NCH₂CO); 4,39 (q, ³J=7,06 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,08 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,92-7,49 (m, 7H, Ar-H); 12,21 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	61,02	4,15	10,17
gef.:	60,19	4,28	9,81

CED-19 **4,6-Difluor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₃F₂N₃O₄

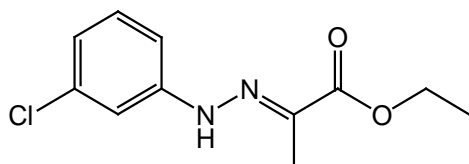
M_r = 385,32

Ansatz:	CED-18	0,11 mmol	0,044 g
	LiOH x H ₂ O	0,17 mmol	0,007 g
			= 0,33 ml 0,5 M LiOH-Lsg.
	THF		10 ml

Experimenteller Teil

Vorschrift:	Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-4. Nach 20 Stunde ist dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachweisbar.		
Aufarbeitung:	Umkristallisieren in Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan		
Aussehen:	weiße Kristalle		
Ausbeute:	0,08 mmol = 72,7 % der Theorie		
DC:	R _f : 0,07 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)		
Schmelzpunkt:	229 °C (unter Zersetzung)		
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3600-2700 ν (O-H); 3322 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1711 ν (C=O); 1585; 1454; 1237; 1205; 837; 769		
FD-MS:	m/z (rel. Int.) 386,2 (24,45 %); 385,2 (100 %)		
¹H-NMR:	d ₆ -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,88 (s, 2H, NCH ₂ CO); 5,09 (s, 2H, Indol-CH ₂ N); 6,89-7,49 (m, 7H, Ar-H); 12,21 (s, 1H, Indol-NH); 12,9 (s; 1H, COOH)		
EA:	%C	%H	%N
	ber.: 59,22	3,40	10,91
	gef.: 59,16	3,37	10,29

CED-20 **2-[(E/Z)-2-(5-Chlorphenyl)hydrazono]propionsäure-ethylester**



C₁₁H₁₃ClN₂O₂

M_r = 240,69

Ansatz:	3-Chlorphenylhydrazin x HCl	28,2 mmol	5,05 g
	Ethylpyruvat	28,2 mmol	3,1 ml
	Ethanol		25 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydrazonbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-2

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 9/1

Aussehen: hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 25,8 mmol = 91,48 % der Theorie

DC: R_f: Z-Isomer: 0,66 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

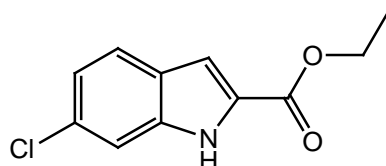
R_f: E-Isomer: 0,23 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Schmelzpunkt: Enantiomergemisch: 151 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3223 ν (N-H); 2998 ν (C-H); 1699 ν (C=O); 1472; 1299; 1238; 1131; 1029; 878; 768; 735; 690

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,25 (t; ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,04 (d, J=7,42 Hz, 3H, CH₃); 4,19 (q, ³J=7,13 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,9 (pd, J=7,75 Hz, 1H, Ph-H); 7,19 (pd, J=8,33 Hz, 1H, Ph-H); 7,28 (m, 2H, Ph-H); 9,97 (s, 1H, Indol-NH)

CED-21 **6-Chlor-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₁H₁₀ClNO₂

M_r = 223,66

Ansatz: CED-20 13,3 mmol 3,2 g
 Polyphosphorsäure 20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Indolsynthese erfolgt analog zu Verbindung CED-3

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Dichlormethan/*n*-Hexan

Aussehen: weiße Nadeln

Ausbeute: 11,18 mmol = 84,06 % der Theorie

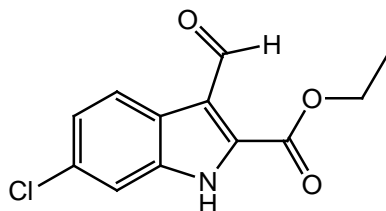
DC: R_f: 0,33 (Petrolether/Ethylacetat 4/1)

Schmelzpunkt: 214 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3294 ν (N-H); 2944 ν (C-H); 1678 ν (C=O); 1543; 1358; 1172; 1079; 867; 791

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,34 (t, ³J=7,12 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,33 (q, ³J=7,12 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,1 (pd, 1H, Indol-4H); 7,16 (s, 1H, Indol-7H); 7,4 (s, 1H, Indol-3H); 7,7 (pd, 1H, Indol-5H); 12,02 (s, 1H, Indol-NH)

CED-22 **6-Chlor-3-formyl-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₂H₁₀ClNO₃

M_r = 251,67

Ansatz:	CED-21	9,69 mmol	2,17 g
	N-Methylformanilid	9,69 mmol	1,2 ml
	Phosphorylchlorid	9,69 mmol	0,9 ml
	Dichlormethan		15 ml
	Natriumacetat x 3 H ₂ O		2,5 g

Vorschrift: Die Durchführung der Formylierung erfolgt analog zu Verbindung CED-7

Aufarbeitung: Umkristallisieren mit Ethylacetat

Aussehen: hellbrauner Feststoff

Ausbeute: 5,19 mmol = 53,56 % der Theorie

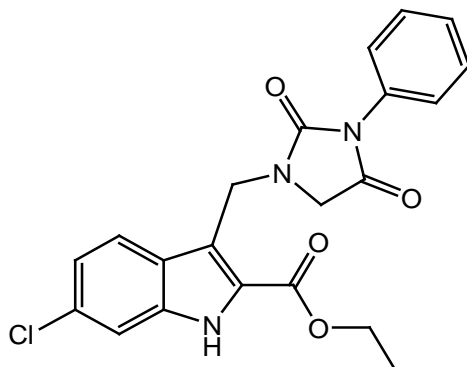
DC: R_f: 0,54 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)

Schmelzpunkt: 235 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3166 ν (N-H); 2964 ν (C-H); 1723 ν (C=O_{Ester}); 1642 ν (C=O_{Aldehyd}); 1430; 1299; 1217; 1029; 914; 784; 694

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,39 (t, ³J=7,07 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,45 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,33 (m, 1H, Indol-H); 7,56 (pd, 1H, Indol-H); 8,22 (pd, 1H, Indol-H); 10,58 (s, 1H, CHO); 11,89 (s, 1H, Indol-NH)

CED-23 **6-Chlor-3[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-
1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₈ClN₃O₄

M_r = 411,84

Ansatz:	CED-22	3,97 mmol	1,0 g
	Glycinmethylester x HCl	3,97 mmol	0,5 g
	Triethylamin	3,57 mmol	0,36 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	4,54 mmol	0,96 g
	Phenylisocyanat	3,97 mmol	0,43 ml
	Dichlormethan		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8

Aufarbeitung: Der einrotierte Rückstand wird in Methanol suspendiert und anschließend in der Siedehitze eingeengt bis ein feiner, weißer Niederschlag ausfällt.

Aussehen: beigefarbene, agglomerierende Kristalle

Ausbeute: 1,56 mmol = 39,29 % der Theorie

DC: R_f: 0,35 (Petrolether/Ethylacetat 3/2)

Schmelzpunkt: 243 °C

Experimenteller Teil

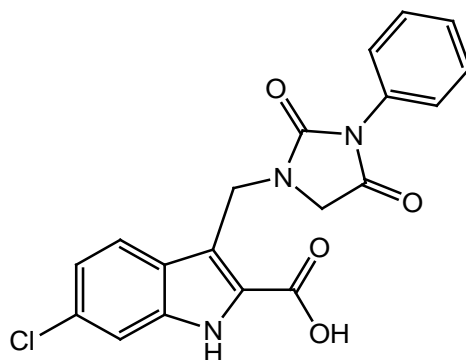
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3277 ν (N-H); 2986 (C-H); 1691 ν (C=O); 1577; 1454; 1422; 1225; 1099; 919; 682

FD-MS: m/z [rel. Int.] 415,3 (0,54%); 414,3 (7,09%); 413,3 (35,26%); 412,3 (21,03%); 411,3 (100%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,39 (t, ³J=7,07 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,98 (s, 2H, NCH₂CO); 4,41 (q, ³J=7,04 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,02 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,15 (m, 5H, Ar-H); 7,32 (pd, 1H, Ar-H); 7,39 (pd, 1H, Ar-H); 7,84 (pd, 1H, Ar-H); 12,03 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	61,24	4,41	10,20
gef.:	61,22	4,55	10,13

CED-24 **6-Chlor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-
1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₄ClN₃O₄

M_r = 383,79

Ansatz:	CED-23	1,21 mmol	0,5 g
	NaOH-Lsg. 2 N in H ₂ O		1,2 ml
	THF		15 ml

Vorschrift: Der Ester wird in THF gelöst und tropfenweise die wässrige NaOH-Lösung zugegeben, so dass keine 2 Phasen entstehen. Nach ein paar Minuten tritt eine intensive Gelbfärbung auf, allerdings lässt sich dünnschichtchromatographisch noch keine Umsetzung feststellen. Nach 48 Stunden ist kein Edukt mehr detektierbar, daher wird mit 10 %iger HCl angesäuert und der Reaktionsansatz mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

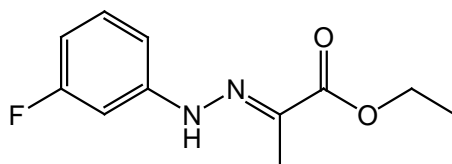
Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,97 mmol = 80,5 % der Theorie

Experimenteller Teil

DC:	R _f : 0,08 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)			
Schmelzpunkt:	275 °C (unter Zersetzung)			
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3653 ν (O-H); 3309 ν (N-H); 2974 ν (aromat.C-H); 2880 ν (aliphatic.C-H); 1691 (C=O); 1536; 1462; 1381; 1189; 1074; 956; 764; 694			
FD-MS:	m/z [rel. Int.] 386,2 (5,05 %); 385,2 (39,63 %); 384,2 (20,36 %); 383,2 (100 %); 381,2 (2,11 %)			
¹H-NMR:	d ₆ -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,95 (s, 2H, NCH ₂ CO); 5,02 (s, 2H, Indol-CH ₂ N); 7,12 (pd, 1H, Ar-H); 7,35-7,5 (m, 6H, Ar-H); 7,81 (pd, 1H, Ar-H); 11,27 (s, 1H, Indol-NH); 11,95 (bs, 1H, COOH)			
¹³C-NMR:	d ₆ -DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 36,11 (CH ₂); 49,65 (CH ₂); 112,21 (CH); 115,75 (Cq); 120,98 (CH); 122,42 (CH); 125,47 (Cq); 126,88 (2xCH); 127,39 (Cq); 128,05 (CH); 129,04 (2xCH); 129,75 (Cq); 132,55 (Cq); 136,6 (Cq); 155,45 (Cq); 163,0 (Cq); 169,46 (Cq)			
EA:	%C	%H	%N	
	ber.:	59,46	3,68	10,95
	gef.:	58,88	3,67	10,21

CED-25 **2-[(E/Z)-2-(5-Fluorphenyl)hydrazono]propionsäure-
ethylester**



C₁₁H₁₃FN₂O₂

M_r = 224,23

Ansatz:

3-Fluorphenylhydrazin-HCl	31 mmol	5,0 g
Ethylpyruvat	31 mmol	3,41 ml
Ethanol		50 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydrazonbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-2

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 9/1, wobei sich die Isomere voneinander trennen lassen.

Aussehen: hellgelber Feststoff

Ausbeute: 25,7 mmol = 82,9 % der Theorie

DC: R_f: Z-Isomer: 0,6 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

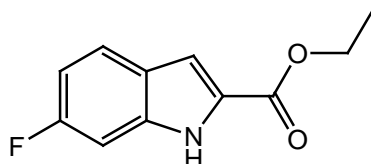
R_f: E-Isomer: 0,18 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

Schmelzpunkt: Enantiomerengemisch: 141 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3204 ν (N-H); 2991 ν (C-H); 1689 ν (C=O); 1438; 1321; 1231; 1128; 987; 870; 759; 730

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,25 (t, ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,06 (d, 3H, CH₃); 4,18 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,67 (m, 1H, Ph-H); 7,0-7,07 (m, 2H, Ph-H); 7,28 (m, 1H, Ph-H); 9,99 (s, 1H, NH)

CED-26 **6-Fluor-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₁H₁₀FNO₂

M_r = 207,2

Ansatz: CED-25 13,3 mmol 2,75 g
 Polyphosphorsäure 21 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Indolsynthese erfolgt analog zu Verbindung CED-3

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 3/1

Ausbeute: 12,1 mmol = 90,9 % der Theorie

DC: R_f: 0,33 (Petrolether/Ethylacetat 3/1)

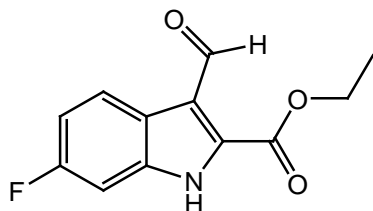
Schmelzpunkt: 141 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3309 ν (N-H); 2996 ν (C-H); 1683 ν (C=O); 1622; 1528; 1254; 1201; 1136; 1017; 817; 731

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,32 (q, ³J=7,06 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,95 (m, 1H, Indol-H); 7,14 (m, 2H, Indol-H); 7,67 (m, 1H, Indol-H); 11,96 (s, 1H, Indol-NH)

CED-27

6-Fluor-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester



$C_{12}H_{10}FNO_3$

$M_r = 235,21$

Ansatz:	CED-26	9,69 mmol	2,27 g
	<i>N</i> -Methylformanilid	9,69 mmol	1,19 ml
	Phosphorylchlorid	9,69 mmol	0,6 ml
	Dichlormethan		20 ml
	Natriumacetat x 3H ₂ O		2,5 g

Vorschrift: Die Durchführung der Formylierung erfolgt analog zu Verbindung CED 7

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 3/1

Ausbeute: 2,3 mmol = 23,7 % der Theorie

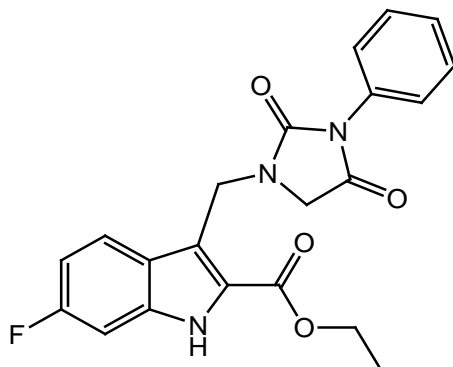
DC: R_f : 0,48 (Petrolether/Ethylacetat 3/1)

Schmelzpunkt: 272 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3657 ν (N-H); 2974 ν (aromat.C-H); 2893 ν (aliphatic.C-H); 1723 ν (C=O_{Ester}); 1634 ν (C=O_{Aldehyd}); 1589; 1389; 1262; 1131; 956; 841; 723

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,39 (t, ³J=7,11 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,43 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,19 (s, 1H, Indol-H); 7,28 (m, 1H, Indol-H); 8,25 (pd, 1H, Indol-H); 10,59 (s, 1H, CHO); 11,95 (s, 1H, Indol-NH)

CED-28 **6-Fluor-3[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₈FN₃O₄

M_r = 395,38

Ansatz:	CED-27	2,13 mmol	0,5 g
	Glycinmethylester-HCl	2,13 mmol	0,27 g
	Triethylamin	1,92 mmol	0,19 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,43 mmol	0,51 g
	Phenylisocyanat	2,13 mmol	0,23 ml
	Dichlormethan		25 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8

Aufarbeitung: Nachdem der Rückstand des Reaktionsansatzes in Methanol suspendiert und in der Siedehitze eingeeengt wurde, lässt man über Nacht im Kühlschrank stehen. Es fällt ein dichter, weißer, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt wird.

Aussehen: weißer, filzartiger Feststoff

Ausbeute: 0,65 mmol = 30,5 % der Theorie

DC: R_f: 0,32 (Petrolether/Ethylacetat 3/1)

Schmelzpunkt: 212 °C

Experimenteller Teil

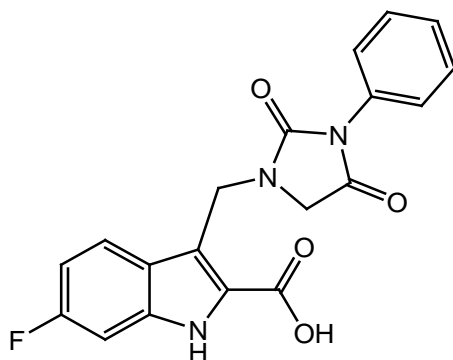
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3314 ν (N-H); 2987 ν (aromat.C-H); 2888 ν (aliphatic.C-H); 1720 ν (C=O); 1708 ν (C=O); 1565; 1458; 1422; 1234

FD-MS: m/z [rel. Int] 397,2 (3,08%); 396,2 (23,48%); 395,2 (100%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,38 (t, ³J=7,07 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,98 (s, 2H, NCH₂CO); 4,39 (q, ³J=7,16, 2H, CH₂CH₃); 5,02 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,01 (m, 1H, Ar-H); 7,16 (pd, 1H, Ar-H); 7,36-7,47 (m, 5H, Ar-H); 7,85 (m, 1H, Ar-H); 11,98 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	63,79	4,59	10,63
gef.:	63,63	3,95	10,30

CED-29 **6-Fluor-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-
1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₄FN₃O₄

M_r = 367,33

Ansatz:	CED-28	0,54 mmol	0,2 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		0,8 ml
	THF		10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24. Der Reaktionsansatz wird 36 Stunden rühren gelassen, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar ist.

Aufarbeitung: Der angesäuerte Rückstand wird mehrfach mit Ethylacetat ausgeschüttelt, das Lösungsmittel getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Zugabe von *n*-Hexan fällt das Produkt als beigefarbener Niederschlag aus.

Aussehen: beigefarbene Kristalle

Ausbeute: 0,43 mmol = 79,6 % der Theorie

DC: R_f: 0,06 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 234 °C (unter Zersetzung)

Experimenteller Teil

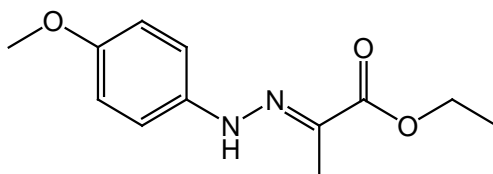
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3400-2800 ν (O-H); 3301 ν (N-H); 2952 ν (C-H); 1765 ν (C=O); 1687 ν (C=O); 1548; 1458; 1242; 1193

FD-MS: m/z [rel. Int.] 369,1 (3,04%); 368,1 (19,49%); 367,1 (100%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,95 (s, 2H, NCH₂CO); 5,03 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,99 (m, 1H, Ar-H); 7,13 (pd, 1H, Ar-H); 7,29-7,41 (m, 5H, Ar-H); 7,82 (m, 1H, Ar-H); 11,88 (s, 1H, Indol-NH); 12,02 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	62,12	3,84	11,44
gef.:	61,84	3,81	11,09

CED-30 2-[(E/Z)-2-(4-Methoxyphenyl)hydrazono]propionsäureethylester



C₁₂H₁₆N₂O₃

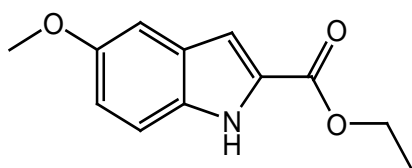
M_r = 236,27

Ansatz:	4-Methoxyphenylhydrazin-HCl	14,4 mmol	2,5 g
	Ethylpyruvat	14,4 mmol	1,67 ml
	Ethanol		45 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydrazonbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-2

- Aufarbeitung:** Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 9/1
- Aussehen:** weiße Kristalle
- Ausbeute:** 9,54 mmol = 66,3 % der Theorie
- DC:** R_f: *Z*-Isomer: 0,63 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)
 R_f: *E*-Isomer: 0,2 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)
- Schmelzpunkt:** Enantiomerengemisch: 150 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3231 ν (N-H); 2991 ν (C-H); 1692 ν (C=O); 1534; 1342; 876; 790
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,09 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,16 (s, 3H, CH₃); 3,74 (s, 3H, OCH₃); 4,31 (q, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,88-7,34 (m, 4H, Ph-H); 11,74 (s, 1H, NH)

CED-31 5-Methoxy-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester



C₁₂H₁₃NO₃

M_r = 219,24

Ansatz: CED-30 6,44 mmol 1,52 g
 Polyphosphorsäure 10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Indolsynthese erfolgt analog zu Verbindung CED-3

Experimenteller Teil

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 9/1

Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 5,54 mmol = 86 % der Theorie

DC: R_f: 0,23 (Petrolether/Ethylacetat 9/1)

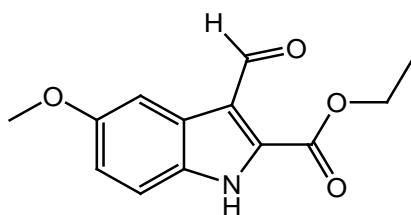
Schmelzpunkt: 156 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3323 ν (N-H); 2981 ν (C-H); 1671 ν (C=O); 1530; 1380; 1161; 877; 810

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,74 (s, 3H, OCH₃); 4,31 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,89 (pq, 1H, Indol-H); 7,03 (pd, J=2,2 Hz, 1H, Indol-H); 7,08 (pd, J=2,28 Hz, 1H, Indol-H); 7,33 (pd, J=9,01 Hz, 1H, Indol-H); 11,73 (s, 1H, Indol-NH)

CED-32

5-Methoxy-3-formyl-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester



C₁₃H₁₃NO₄

M_r = 247,25

Ansatz:	CED-31	4,56 mmol	1,0 g
	N-Methylformanilid	4,56 mmol	0,56 ml
	Phosporylchlorid	4,56 mmol	0,7 g
	Dichlorethan		20 ml

Natriumacetat x 3 H₂O 3 g

Vorschrift: Die Durchführung der Formylierung erfolgt analog zu Verbindung CED-7

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat

Aussehen: sonnengelber Feststoff

Ausbeute: 3,63 mmol = 80% der Theorie

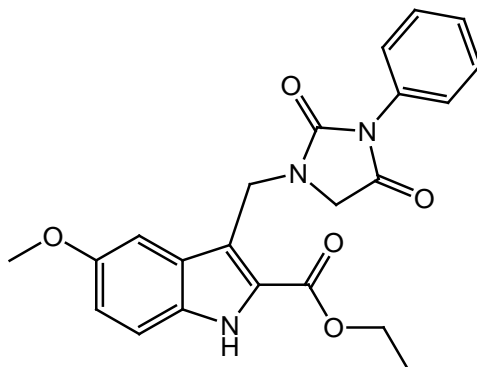
DC: R_f: 0,24 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)

Schmelzpunkt: 223 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305 ν (N-H); 3146 ν (C-H); 2835 ν (C-H); 1695 ν (C=O); 1642; 1532; 1438; 1364; 1164; 1029; 980; 800

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,38 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,79 (s, 3H, OCH₃); 4,42 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,02 (pq, 1H, Indol-H); 7,45 (pd, 1H, Indol-H); 7,68 (s, 1H, Indol-H); 10,58 (s, 1H, CHO); 12,06 (s, 1H, Indol-NH)

CED-33 **5-Methoxy-3[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-
1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₂H₂₁N₃O₅

M_r = 407,42

Ansatz:	CED-32	3,54 mmol	0,88 g
	Glycinmethylester-HCl	3,54 mmol	0,44 g
	Triethylamin	3,19 mmol	0,32 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	4,05 mmol	0,86 g
	Phenylisocyanat	3,54 mmol	0,38 ml
	Dichlormethan		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: beigefarbener Feststoff

Ausbeute: 0,8 mmol = 22,6 % der Theorie

DC: R_f: 0,84 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)

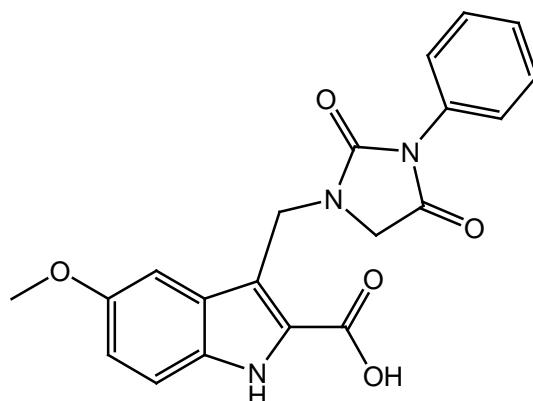
Schmelzpunkt: 193 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3330 ν (N-H); 2987 ν (C-H); 2827 ν (C-H); 1707 (C=O_{Ester}); 1670 ν (C=O); 1544; 1450; 1417; 1221; 1123; 854; 768

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,38 (t, ³J=7,05 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,72 (s, 3H, OCH₃); 3,96 (s, 2H, NCH₂CO); 4,38 (q, ³J=7,14 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,02 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,95 7,54 (m, 8 H, Ar-H); 11,78 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	64,86	5,20	10,31
gef.:	64,87	5,16	10,31

CED-34 **5-Methoxy-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₂₀H₁₇N₃O₅

M_r = 379,37

Ansatz:	CED-33	0,66 mmol	0,27 g
	LiOH x H ₂ O	1,0 mmol	0,042 g
		= 2 ml 0,5 M Lsg. in H ₂ O	

Experimenteller Teil

THF 15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-4

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,38 mmol = 57,6% der Theorie

DC-Wert: R_f: 0,06 (Petrolether/Ethylacetat 2/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 213 °C unter Zersetzung

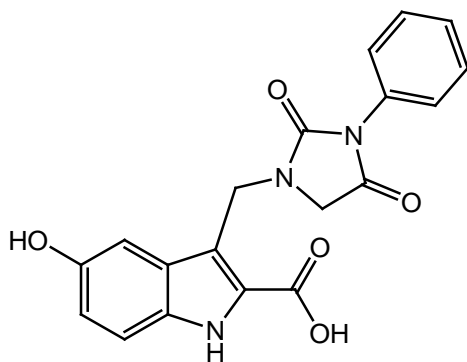
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3600-2600 ν (O-H); 3330 ν (N-H); 2982 ν (C-H); 2855 ν (O-C); 1699 ν (C=O); 1556; 1446; 1209; 1123; 845; 760

FD-MS: m/z [rel. Int.] 380,3 (21,24 %); 379,3 (100 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,7 (s, 3H, OCH₃); 3,93 (s, 2H, NCH₂CO); 5,02 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,93-7,47 (m, 8H, Ar-H); 11,66 (s, 1H, Indol-NH); 12, 21 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	63,32	4,52	11,08
gef.:	62,93	4,95	10,66

CED-35 **5-Hydroxy-3-[(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₅N₃O₅

M_r = 365,34

Ansatz:	CED-34	0,079 mmol	0,03 g
	Bortribromid	0,316 mmol	0,29 ml
	Dichlormethan		10 ml

Vorschrift: CED-34 wird unter Stickstoffatmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit Hilfe eines Trockeneis/Aceton-Gemisches auf -78 °C abgekühlt. Anschließend wird langsam das in wenig Dichlormethan gelöste Bortribromid über ein Septum zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 2 Stunden gekühlt und unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Der Reaktionsansatz wird auf Eis gegeben und mehrfach mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden vereint, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

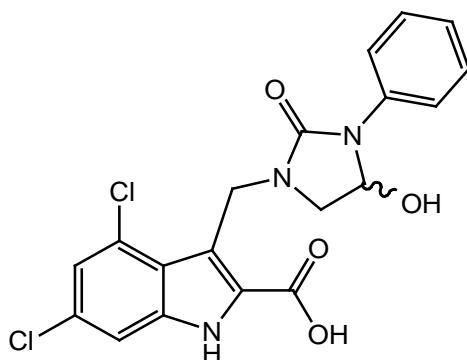
Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 1/1 + 2 % Ameisensäure

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,051 mmol = 64,6 % der Theorie

- DC:** R_f: 0,75 (Petrolether/Ethylacetat 1/1 + 2% Ameisensäure)
- Schmelzpunkt:** 233 °C (unter Zersetzung)
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3650-2500 ν (O-H); 3256 ν (N-H); 3148 ν (C-H); 1681 ν (C=O); 1528; 1441; 1389; 1134; 978; 862; 734
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,97 (s, 2H, NCH₂CO); 5,18 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,09 (s, 1H, OH); 6,81-7,34 (m, 8H, Ar-H); 11,6 (s, 1H, Indol-NH); 12,2 (s, 1H, COOH)

CED-36 **4,6-Dichlor-3-[(4-hydroxy-2-oxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₅Cl₂N₃O₄

M_r = 419,25

Ansatz:	CED-9	0,31 mmol	0,13 g
	Natriumborhydrid	1,86 mmol	0,07 g
	Ethanol abs.		15 ml

Vorschrift: Unter Stickstoffatmosphäre wird CED-9 in Ethanol suspendiert und langsam eine Lösung des Natriumborhydrids in Ethanol über ein Septum zugetropft. Aus der weißen Suspension entsteht unter Gasentwicklung eine klare, leicht rosa

schimmernde Lösung. Anschließend wird so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis sich nach 24 Stunden dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektieren lässt. Zum Reaktionsansatz wird bis zur Neutralisation 2N NaOH-Lösung gegeben, der Ethanol im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mehrfach mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf wenige Milliliter gelblichen Rückstandes eingeengt.

Aufarbeitung: Das Produkt wird durch Zugabe von Petrolether als weißer Niederschlag gefällt.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,24 mmol = 77,4 % der Theorie

DC: R_f: 0,45 (Chloroform/Aceton 4/2 + 2 % Ameisensäure)

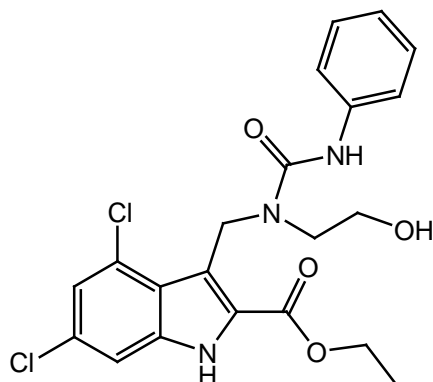
Schmelzpunkt: 245 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-2500 ν (O-H); 3252 ν (N-H); 3142 ν (C-H); 1675 ν (C=O); 1601 ν (C=O); 1507; 1438; 1376; 1328; 1254; 1082; 833; 751

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 2,02 (q, 2H, NCH₂CHOH); 5,23 (q, 1H, CHOH); 5,53 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,36 (s, 1H, OH); 6,86-7,13 (m, 2H, Ar-H); 7,0-7,61 (m, 5 H, Ar-H); 11,99 (s, 1H, Indol-NH); 12, 21 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	54,3	3,60	10,0
gef.:	53,9	3,50	9,50

CED-37 **3-[[((Anilinocarbonyl)(2-hydroxyethyl)amino)methyl]-4,6-dichlor-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₂₁Cl₂N₃O₄

M_r = 450,32

Ansatz:	CED-7	10,5 mmol	0,64 g
	2-Aminoethanol	10,5 mmol	2,71 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	12,0 mmol	2,54 g
	Phenylisocyanat	10,5 mmol	1,25 g
	Dichlormethan abs.		30 ml

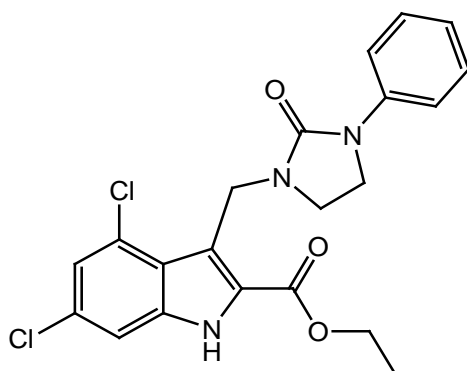
Vorschrift: Unter Stickstoffatmosphäre wird eine Suspension von CED-7 in absolutem Dichlormethan zu einer Lösung des 2-Aminoethanols in Dichlormethan getropft und bei Raumtemperatur gerührt, woraufhin sich ein gelber Niederschlag bildet. Nach 2 Stunden erfolgt die Zugabe des Natriumtriacetoxyborhydrids in Dichlormethan. Der Reaktionsansatz wird für weitere 24 Stunden gerührt, bevor das Phenylisocyanat zugetropft wird. Anschließend wird für ca. 5 Stunden zum Sieden erhitzt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat

Aussehen: weiße Kristalle

- Ausbeute:** 6,09 mmol = 58 % der Theorie
- DC:** R_f: 0,18 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)
- Schmelzpunkt:** 205 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3309 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 2901 ν (C-H); 1679 ν (C=O); 1630; 1556; 1389; 1234; 1152; 1082; 980; 743
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,34 (t, 3H, CH₂CH₃); 3,07 (d, ³J=4,54 Hz; 2H, CH₂CH₂OH); 3,2 (d, ³J=4,95 Hz, 2H, CH₂CH₂OH); 4,39 (q, 2H, CH₂CH₃); 5,15 (s, 3H, Indol-CH₂N); 6,91 (s, 1H, Ar-H); 7,23 (pd, J=7,92 6,16 Hz, 3H, Ar-H); 7,42 (m, 2H, Ar-H); 7,47 (s, 1H, Ar-H); 8,96 (s, 1H, CONH); 12,35 (s, 1H, Indol-NH)

CED-38 **4,6-Dichlor-3-[(2-oxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₉Cl₂N₃O₃

M_r = 432,31

Ansatz:	CED-37	4,5 mmol	2,03 g
	Kalium- <i>tert</i> -butylat	10,8 mmol	1,21 g
	<i>p</i> -Toluolsulfonylchlorid	5,4 mmol	1,03 g
	THF abs.		25 ml

Vorschrift: Unter Stickstoffatmosphäre werden CED-37 und Kalium-*tert*-butylat in THF gelöst, wobei im Eisbad gekühlt wird. Anschließend wird eine Lösung von *p*-Toluolsulfonylchlorid in THF langsam zugetropft und weiterhin unter Kühlung gerührt. Nach 20 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt und mit Ethylacetat mehrfach extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 2/1

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 0,95 mmol = 21,1 % der Theorie

DC: R_f: 0,3 (Petrolether/Ethylacetat 2/1)

Schmelzpunkt: 201 °C

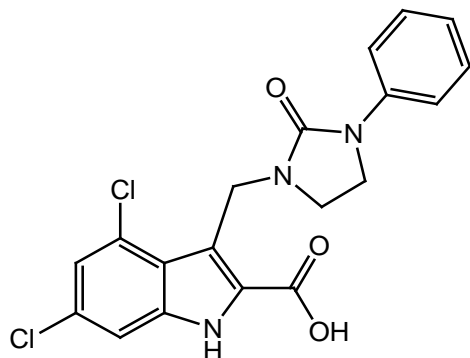
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3297 ν (N-H); 2983 ν (C-H); 2876 ν (C-H); 1687 ν (C=O); 1507; 1413; 1246; 1144; 972; 833; 747

FD-MS: m/z [rel. Int.] 435,2 (9,52 %); 434,2 (13,88 %); 433,2 (56,69 %); 432,2 (25,87 %); 431,2 (100 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,35 (t, ³J=7,06 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,16 (t, ³J=7,66 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 3,72 (m, 2H, NCH₂CH₂N), 4,39 (q, ³J=7,06 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,05 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,97 (pt, J=7,67 Hz, 1H, Ar-H); 7,23 (s, 1H, Ar-H); 7,3 (pt, J=7,67 Hz, 2H, Ar-H); 7,47 (pd, J=0,75 Hz, 1H, Indol-H); 7,55 (pd, J=7,92 Hz, 2H, Ar-H); 12,38 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	58,34	4,43	9,72
gef.:	58,14	3,74	9,66

CED-39 **4,6-Dichlor-3-[(2-oxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₅Cl₂N₃O₃

M_r = 404,25

Ansatz:	CED-38	0,32 mmol	0,14 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		0,3 ml
	THF		10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24

Aufarbeitung: Umkristallisieren aus Ethylacetat

Ausbeute: 0,18 mmol = 61 % der Theorie

Aussehen: weiße Kristalle

DC: R_f: 0,2 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 271 °C (unter Zersetzung)

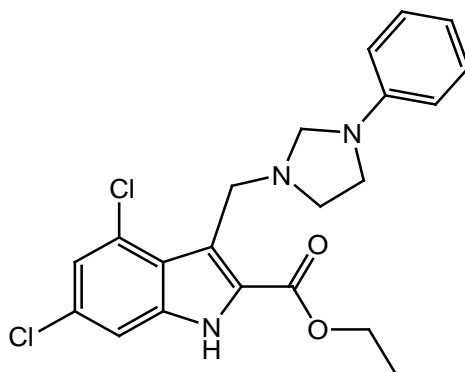
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-2600 ν (O-H); 3284 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 1691 ν (C=O); 1560; 1483; 1430; 1246; 984; 751; 686

FD-MS: m/z [rel. Int.] 406,2 (7,93 %); 405,2 (35,9 %); 404,2 (23,58 %); 403,2 (100 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,15 (t, ³J=7,7 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 3,66 (t, ³J=7,63 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 5,06 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,97 (pt, J=6,85 Hz, 1H, Ar-H); 7,19 (s, 1H, Ar-H); 7,3 (pt, J=7,61 Hz, 2H, Ar-H); 7,43 (pd, J=1,58 Hz, 1H Indol-H); 7,55 (pd, J=8,53 Hz, 2H, Ar-H); 12,25 (s, 1H, Indol-NH); 13,69 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	56,45	3,74	10,39
gef.:	55,74	2,69	9,94

CED-40 **4,6-Dichlor-3-[(3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₂₁Cl₂N₃O₂

M_r = 418,32

Ansatz:	CED-38	0,81 mmol	0,35 g
	Boran-THF-Komplex-Lsg. (1M)	2,33 mmol	2,33 ml
	THF		10 ml

Vorschrift: CED-38 wird in trockenem THF gelöst und der Reaktionsansatz auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgt unter Stickstoffatmosphäre die tropfenweise Zugabe des Boran-THF-

Komplexes. Nach vollständiger Zugabe wird der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht rühren gelassen. Unter Kühlung mit Eiswasser erfolgt schließlich die tropfenweise Zugabe von 6 N HCl, worauf 1 Stunde gerührt wird. Das THF wird mit Hilfe des Rotationsverdampfers unter Vakuum entfernt, die zurückbleibende wässrige Phase mit Natriumcarbonat gesättigt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; zuerst werden Verunreinigungen mit Diisopropylether abgetrennt, anschließend erfolgt die Elution des Produktes mit Petrolether/Ethylacetat 1/2

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,04 mmol = 5,6 % der Theorie

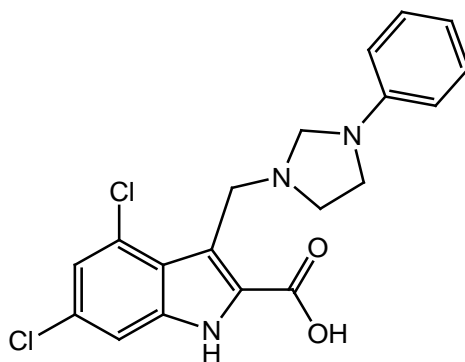
DC: R_f: 0,46 (Petrolether/Ethylacetat 1/2)

Schmelzpunkt: 168 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3299 ν (N-H); 2987 ν (C-H); 2875 ν (C-H); 1683 ν (C=O); 1512; 1419; 1256; 1136; 830

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,35 (t, ³J=7,06 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,11 (t, ³J=7,7 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 3,60 (t, ³J=7,63 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 4,38 (q, ³J=7,06 Hz, 2H, CH₂CH₃); 4,82 (s, 2H, NCH₂N); 5,08 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,99 (pt, J=6,85 Hz, 1H, Ar-H); 7,21 (s, 1H, Ar-H); 7,3 (pt, J=7,61 Hz, 2H, Ar-H); 7,43 (pd, J=1,58 Hz, 1H, Indol-H); 7,53 (d, J=8,53 Hz, 2H, Ar-H); 12,31 (s, 1H, Indol-NH)

CED-41 **4,6-Dichlor-3-[(3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₇Cl₂N₃O₂

M_r = 390,26

Ansatz:

CED-40	0,04 mmol	0,017 g
NaOH-Lsg. 2N		0,5 ml
THF		5 ml

Vorschrift: Die basische Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24

Aufarbeitung: Umkristallisieren aus Ethylacetat

Aussehen: weiße Kristalle

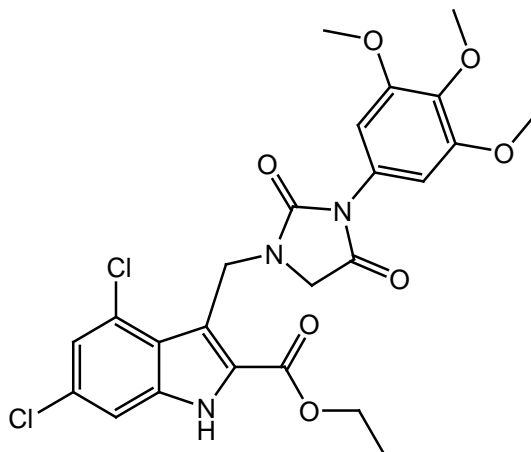
Ausbeute: 73 % der Theorie

DC: R_f: 0,14 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 231 °C (unter Zersetzung)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,12 (t, ³J=7,7 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 3,60 (t, ³J=7,63 Hz, 2H, NCH₂CH₂N); 4,83 (s, 2H, NCH₂N); 5,08 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,0 (pt, J=6,85 Hz, 1H, Ar-H); 7,2 (s, 1H, Ar-H); 7,3 (pt, J=7,61 Hz, 2H, Ar-H); 7,43 (pd, J=1,58 Hz, 1H, Indol-H); 7,53 (pd, J=8,53 Hz, 2H, Ar-H); 12,31 (s, 1H, Indol-NH); 13,21 (bs, 1H, COOH)

CED-42 **4,6-Dichlor-3[(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl]-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₄H₂₃Cl₂N₃O₇

M_r = 536,36

Ansatz:	CED-7	2,45 mmol	0,7 g
	Glycinmethylester-HCl	2,54 mmol	0,31 g
	Triethylamin	2,21 mmol	0,22 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,8 mmol	0,59 g
	3,4,5-Trimethoxyphenyl- isocyanat	2,45 mmol	0,51 g
	Dichlormethan abs.		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8. Nach Zugabe des Isocyanats wird 20 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

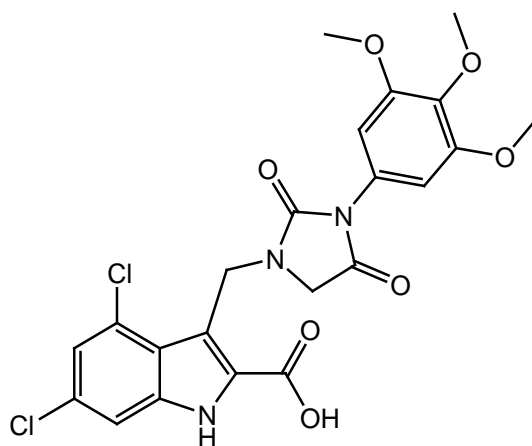
Aussehen: weiße, feine Kristalle

Ausbeute: 1,03 mmol = 55,9 % der Theorie

Experimenteller Teil

DC:	R _f : 0,54 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)		
Schmelzpunkt:	237 °C		
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3285 ν (N-H); 2946 ν (C-H); 1712 ν (C=O _{Ester}); 1675; 1605; 1442; 1323; 1233; 1127; 1001; 837; 662		
FD-MS:	m/z [rel. Int.] 539,3 (26,18 %); 538,3 (37,76 %); 537,3 (100 %); 536,3 (34,48 %); 535,3 (84,93 %)		
¹H-NMR:	d ₆ -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,37 (t, ³ J=7,12 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃); 3,67 (s, 3H, OCH ₃); 3,74 (s, 6H, 2x OCH ₃); 3,79 (s, 2H, NCH ₂ CO); 4,4 (q, ³ J=7,12, 2H, CH ₂ CH ₃); 5,24 (s, 2H, Indol-CH ₂ N); 6,64 (s, 2H, Ar-H); 7,27 (pd, J=1,18 Hz, 1H; Indol-H); 7,47 (pd, J=1,25 Hz, 1H, Indol-H); 12,36 (s, 1H, Indol-NH)		
EA:	%C	%H	%N
	ber.: 53,74	4,32	7,83
	gef.: 53,52	4,38	7,73

CED-43 **4,6-Dichlor-3[(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl]-1*H*-indol-2-carbonsäure**



C₂₂H₁₉Cl₂N₃O₇

M_r = 508,31

Ansatz: CED-40 0,47 mmol 0,25 g
 NaOH-Lsg. 2M in H₂O 0,35 ml
 THF 20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24

Aufarbeitung: mehrfaches Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

Aussehen: gelbe, feine Kristalle

Ausbeute: 0,45 mmol = 96,57 % der Theorie

DC: R_f: 0,2 (Chloroform/Aceton 4/1 + 2 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 258 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-2700 ν (O-H); 3670 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 2884 ν (C-H); 1704 ν (C=O_{Säure}); 1597; 1503; 1458; 1319; 1225; 1123; 943; 825; 678

Experimenteller Teil

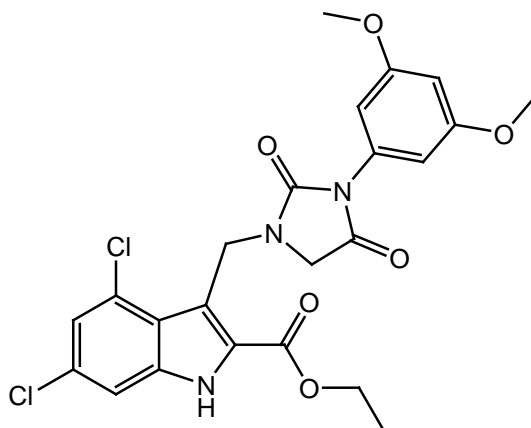
FD-MS: m/z [rel. Int.] 512 (1,43%); 511 (9,69%); 510 (12,78%); 509 (68,42%); 508 (29,22%); 507 (100%)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,67 (s, 3H, OCH₃); 3,74 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,79 (s, 2H, NCH₂CO); 5,25 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,65 (pd, J=2,36 Hz; 2H, Ar-H); 7,26 (pd, J=8,54 Hz, 1H; Ind-H); 7,46 (pd, J=9,56 Hz, 1H, Ind-H); 12,37 (s, 1H, Indol-NH); 12,92 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 36,3 (CH₂); 48,9 (CH₂); 56,4 (2xCH₃); 60,4 (CH₃); 105,3 (2xCH); 111,8 (CH); 113,7 (Cq); 121,6 (CH); 122,3 (Cq); 127,4 (Cq); 128,3 (Cq), 129,2 (Cq), 137,4 (Cq); 137,5 (Cq), 137,7 (Cq), 153,1 (Cq); 155 (Cq); 161,1 (Cq); 162,7 (Cq); 169,5 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	51,98	3,77	8,27
gef.:	52,03	3,56	8,28

CED-44 **4,6-Dichlor-3[(3-(3,5-dimethoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl]-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₃H₂₁Cl₂N₃O₆

M_r = 506,34

Ansatz:	CED-7	2,45 mmol	0,7 g
	Glycinmethylester-HCl	2,54 mmol	0,31 g
	Triethylamin	2,21 mmol	0,22 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,8 mmol	0,59 g
	3,5-Dimethoxyphenyl- isocyanat	2,45 mmol	0,44 g
	Dichlormethan abs.		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8. Nach Zugabe des Isocyanats wird 32 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: weiße, glänzende Kristalle

Ausbeute: 1,16 mmol = 63,1 % der Theorie

DC: R_f: 5,56 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/2)

Experimenteller Teil

Schmelzpunkt: 204 °C

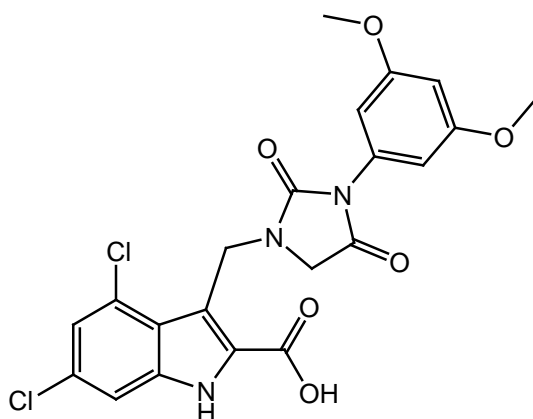
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3301 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 1708 ν (C=O); 1671 ν (C=O); 1605; 1446; 1205; 1152; 1058; 833; 690

FD-MS: m/z [rel. Int.] 510,4 (0,9 %); 509,3 (10,84 %); 508,3 (11,99 %); 507,3 (59,99 %); 505,3 (100 %);

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,37 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,73 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,79 (s, 2H, NCH₂CO); 4,4 (q, ³J=7,12, 2H, CH₂CH₃); 5,24 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,5 (s, 2H, Ar-H); 6,52-6,55 (m, 1H, Ar-H); 7,27 (pd, J=1,75 Hz, 1H; Indol-H); 7,47 (pd, J=1,78 Hz, 1H, Indol-H); 12,36 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	54,56	4,18	8,3
gef.:	54,33	3,66	8,31

CED-45 **4,6-Dichlor-3[(3-(3,5-dimethoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl) methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₂₁H₁₇Cl₂N₃O₆

M_r = 478,28

Ansatz: CED-42 0,49 mmol 0,25 g
 NaOH-Lsg. 2M in H₂O 0,37 ml
 THF 15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24

Aufarbeitung: Der aufgearbeitete Reaktionsrückstand wird in Aceton gelöst. Nach Zugabe von *n*-Hexan fällt ein weißer Niederschlag aus.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,4 mmol =81,6 % der Theorie

DC: R_f: 0,07 (Chloroform/Aceton 4/1 + 2 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 251 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-2600 ν (O-H); 1764 ν (C=O); 1720 ν (C=O); 1610; 1438; 1324; 1221; 1156; 1058; 833; 682

Experimenteller Teil

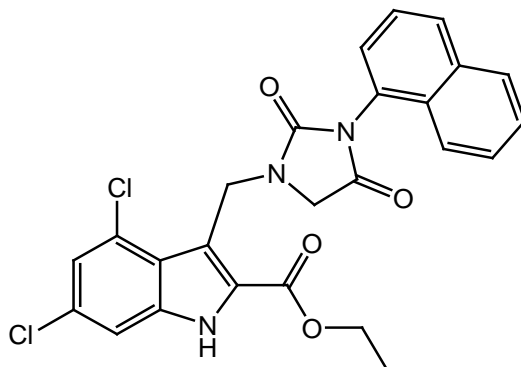
FD-MS: m/z [rel. Int.] 481,1 (12,93 %); 480,1 (2,38 %); 479,1 (82,13 %); 178,1 (19,56 %); 477,1 (100 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,73 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,78 (s, 2H, NCH₂CO); 5,25 (s, 2H, Indol-CH₂N); (pd, J=2,14 Hz, 2H, Ar-H); 6,52-6,55 (m, 1H, Ar-H); 7,25 (pd, J=1,74 Hz, 1H; Ind-H); 7,44 (pd, J=1,77 Hz, 1H, Indol-H); 12,37 (s, 1H, Indol-NH), (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 37,2 (CH₂); 48,8 (CH₂); 55,7 (2xCH₃); 99,8 (CH); 105,5 (2xCH); 111,9 (CH); 114,0 (Cq); 121,6 (Cq); 122,4 (CH); 127,5 (Cq); 128,3 (Cq); 129,3 (Cq); 129,5 (Cq); 137,1 (Cq); 137,6 (Cq); 153,0 (Cq); 155,1 (Cq); 160,6 (Cq); 169,3 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	52,74	3,58	8,79
gef.:	52,26	3,08	8,76

CED-46 **4,6-Dichlor-3[(3-naphtalen-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₅H₁₉Cl₂N₃O₄

M_r = 496,34

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Glycinmethylester-HCl	1,75 mmol	0,22 g
	Triethylamin	1,58 mmol	0,16 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,0 mmol	0,42 g
	1-Naphtylisocyanat	1,75 mmol	0,3 g
	Dichlormethan abs.		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8. Nach Zugabe des Natriumtriacetoxyborhydrids wird der Reaktionsansatz für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 1,2 mmol = 73,6 % der Theorie

DC: R_f: 0,2 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/2)

Schmelzpunkt: 272 °C

Experimenteller Teil

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3659 $\nu(\text{N-H})$; 2978 $\nu(\text{C-H})$; 2893 $\nu(\text{C-H})$; 1738 $\nu(\text{C=O}_{\text{Ester}})$; 1289; 1272; 1164; 1071; 967

FD-MS: m/z [rel. Int.] 500,3 (2,49 %); 499,3 (13,47 %); 498,3 (15,31 %); 197,3 (66,99 %); 496,3 (29,35 %); 495,3 (100 %)

$^1\text{H-NMR}$: $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 300 MHz, δ [ppm] = 1,39 (t, $^3\text{J}=7,08$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 3,99 (dd, 2H, NCH_2CO); 4,43 (q, $^3\text{J}=7,09$; 2H, CH_2CH_3); 5,31 (dd, 2H, Indol- CH_2N); 7,32 (pd, $\text{J}=1,67$ Hz, 1H, Ar-H); 7,49 (m, 2H, Ar-H); 7,66 (m, 3H, Ar-H); 7,77 (pd, 1H, Ar-H); 8,05 (m, 2H, Ar-H); 12,32 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	60,5	3,86	8,47
gef.:	60,3	3,40	8,41

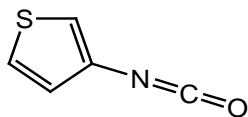
Experimenteller Teil

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,98 (dd, 2H; NCH₂CO); 5,32 (dd, 2H, Indol-CH₂N); 7,29 (pd, J=1,64 Hz, 1H, Ar-H); 7,51 (m, 2H, Ar-H); 7,59 (m, 3H, Ar-H); 7,77 (pd, 1H, Ar-H); 8,09 (m, 2H, Ar-H), 12,35 (s, 1H, Indol-NH); 13,23 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 36,4 (CH₂); 49,3 (CH₂); 111,7 (CH); 113,8 (Cq); 121,5 (CH); 123,0 (CH); 125,9 (2xCH); 126,8 (CH); 127,2 (2xCH); 127,4 (CH); 127,5 (Cq); 128,5 (Cq); 129,2 (Cq); 129,5 (Cq); 129,6 (Cq); 130,3 (Cq); 134,1 (Cq); 137,6 (Cq); 155,2 (Cq); 162,7 (Cq); 170,2 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	58,99	3,23	8,97
gef.:	58,61	3,31	8,46

CED-48 **3-Thiophenisocyanat**



C₅H₃NOS

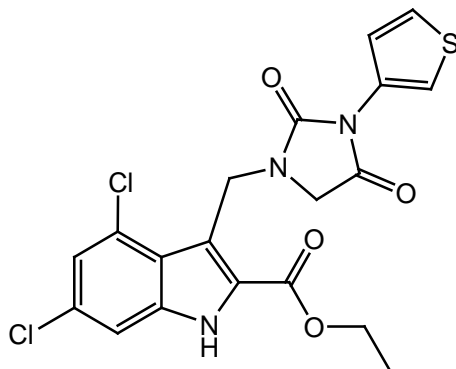
$M_r = 125,15$

Ansatz:	3-Thiophencarbonsäure	22,0 mmol	2,73 g
	Chlorameisensäureethylester	28,0 mmol	2,63 ml
	Natriumazid	32,5 mmol	2,11 g
	Triethylamin	25,0 mmol	2,53 g
	Aceton		25 ml
	Dichlormethan		30 ml
	Wasser		5 ml

Vorschrift: Die Lösung der 3-Thiophencarbonsäure in Aceton wird mit Hilfe einer Eis-Kochsalz-Mischung auf 0 °C gebracht und nacheinander Triethylamin in Aceton und Chlorameisensäureethylester in Aceton langsam zugetropft, wobei eine Suspension entsteht. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei gleichbleibender Temperatur gerührt und anschließend eine gekühlte wässrige Natriumazidlösung sehr langsam zugegeben. Nach 1,5 Stunden weiterer Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eiswasser überführt und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter weiterer Kühlung über MgSO₄ getrocknet.

Aufarbeitung: Da es schon durch geringe Spuren von Wasser zu einer Dimerisierung des Produktes kommt, wird der Rohansatz ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

CED-49 **4,6-Dichlor-3[(2,4-dioxo-3-thiophenimidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₈H₁₅Cl₂N₃O₄S

M_r = 437,28

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Glycinmethylester-HCl	1,75 mmol	0,22 g
	Triethylamin	1,58 mmol	0,16 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2,0 mmol	0,42 g
	3-Thiophenisocyanat		
	bzw. Rohansatz CED-43		

Vorschrift: Das Aminosäure-Hydrochlorid wird unter Stickstoffatmosphäre in absolutem Dichlormethan suspendiert und mit Triethylamin versetzt. Nachdem nach ca. 10 Minuten aus der trüben Suspension eine klare Lösung entstanden ist, wird CED-7 in Dichlormethan über ein Septum zugegeben. Anschließend wird das Hydrid in Dichlormethan gelöst zuge tropft und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgt eine weitere Zugabe von Triethylamin. Während dann sehr langsam der getrocknete CED-43-Ansatz zugetropft wird, erfolgt eine vorsichtige Erwärmung des Reaktionsansatzes mit Hilfe eines Wasserbades, wobei es zu einer ausgeprägten Gasentwicklung kommt. Nach Ende der Gas-

entwicklung und der vollständigen Zugabe des CED-43-Ansatzes wird 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Ethylacetat versetzt und nacheinander mit 5 %iger HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung: Der einrotierte Rückstand wird in Methanol aufgenommen und in der Siedehitze eingeeengt. Über Nacht fällt im Kühlschrank ein weißer, kristalliner Niederschlag aus.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,46 mmol = 26,3 % der Theorie

DC: R_f: 0,24 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

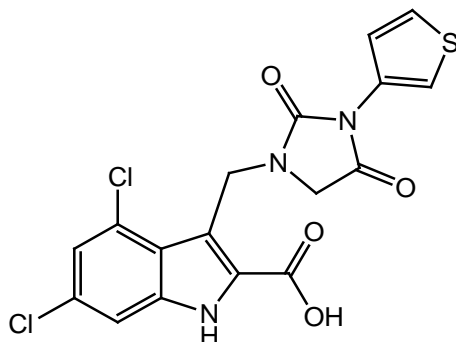
Schmelzpunkt: 213 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 ν(N-H); 2962 ν(C-H); 2357 ν(); 1695 ν(C=O); 1536; 1434; 1324; 1225; 807

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,36 (t, ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,8 (s, 2H, NCH₂CO); 4,4 (q, ³J=7,08 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,25 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,26 (pd, J=1,63 Hz, 1H, Ar-H); 7,36 (pd, J=5,18 Hz, 1H, Ar-H); 7,47 (pd, J=1,67 Hz, 1H, Ar-H); 7,6 (m, 1H, Ar-H); 7,66 (m, 1H, Ar-H), 12,39 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N	%S
ber.:	49,44	2,77	9,61	7,33
gef.:	49,68	3,11	8,99	6,99

CED-50 **4,6-Dichlor-3[(2,4-dioxo-3-thiophenimidazolidin-1-yl) methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₇H₁₁Cl₂N₃O₄S

$M_r = 424,26$

Ansatz:	CED-47	0,34 mmol	0,15 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		0,4 ml
	THF		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24. Der Reaktionsansatz wird 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren mit Ethylacetat; nach Zugabe von *n*-Hexan erfolgt eine quantitative Fällung des Produktes

Aussehen: beigefarbener Feststoff

Ausbeute: 0,25 mmol = 73,5 % der Theorie

DC: R_f : 0,07 (Chloroform/Aceton 4/1 + 2 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 248 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3700-3000 ν (O-H); 3669 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 1689 ν (C=O); 1589; 1499; 1372; 1332; 1164

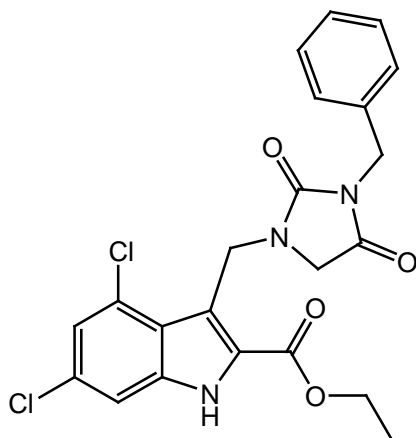
Experimenteller Teil

EI-MS: m/z [rel. Int.] 424,2 (30,51 %, M⁺); 320,2 (94,92 %); 243,2 (38,98 %); 218,3 (100 %); 209,2 (11,86 %); 184,3 (45,76 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,72 (d, 2H, NCH₂CO); 5,14 (d, 2H, Indol-CH₂N); 7,01 (s, 1H, Ar-H); 7,15 (pd, 2H, Ar-H); 7,29 (m, 1H, Ar-H); 7,33 (s, 1H, Ar-H); 11,49 (s, 1H, Indol-NH); 12,97 (s, 1H, COOH)

EA:	%C	%H	%N	%S
ber.:	48,13	2,61	9,90	7,56
gef.:	47,89	2,39	9,10	6,86

CED-51 **4,6-Dichlor-3[(3-benzyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl) methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₂H₁₉Cl₂N₃O₄

M_r = 460,31

Ansatz:	CED-7	3,5 mmol	1,0 g
	Glycinmethylester-HCl	3,5 mmol	0,44 g
	Triethylamin	3,15 mmol	0,32 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	4,0 mmol	0,85 g
	Benzylisocyanat	3,5 mmol	0,47 g
	Dichlormethan abs.		25 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 1/1; aus den das Produkt enthaltenen Fraktionen fällt beim Einrotieren ein weißer Feststoff aus. Nach Zugabe von *n*-Hexan wird dieser quantitativ erhalten.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,46 mmol = 13,1 % der Theorie

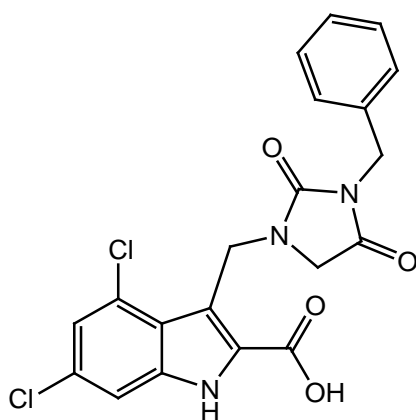
DC: R_f: 0,27 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

Schmelzpunkt: 184 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3310 ν (N-H); 2970 ν (aromat.C-H); 2878 ν (aliphatic.C-H); 1713 ν (C=O); 1454; 1023; 954; 812

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,08 Hz, 3H, CH₂CH₃); 3,72 (s, 2H, NCH₂CO); 4,36 (q, ³J=7,09 Hz, 2H, CH₂CH₃); 4,54 (s, 2H, Indol-CH₂N); 5,18 (s, 2H, CH₂-Ph); 7,37 (m, 5H, Ar-H); 7,55 (s, 1H, Ar-H); 7,77 (s, 1H, Ar-H); 12,4 (s, 1H, Indol-NH)

CED-52 **4,6-Dichlor-3[(3-benzyl-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₂₀H₁₅Cl₂N₃O₄

M_r = 432,26

Ansatz:	CED-49	0,33 mmol	0,15 g
	NaOH-Lsg. 2 N in Wasser		0,25 ml
	THF		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24; nach 3 Tagen lässt sich dünnschicht-

Experimenteller Teil

chromatographisch immer noch Edukt nachweisen. Es wird erneut 2N NaOH-Lösung zugegeben und weitere 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/n-Hexan

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,24 mmol = 72,7 % der Theorie

DC: R_f: 0,1 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 265 °C (unter Zersetzung)

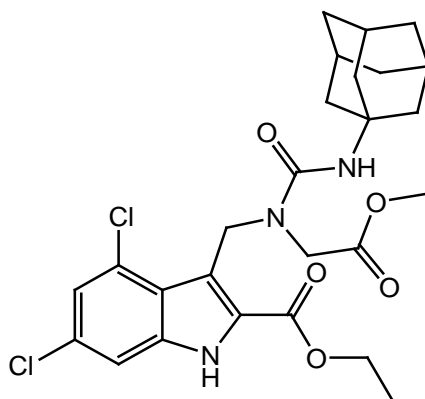
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3600-2700 ν (O-H); 3232 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 1691 (C=O); 1634; 1540; 1450; 1324; 1234; 1082; 972; 837; 694

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,72 (s, 2H, NCH₂CO); 4,53 (s, 2H, Indol-CH₂N); 5,1 (s, 2H, CH₂-Ph); 7,31 (m, 6H, Ar-H); 8,98 (m, 1H, Ar-H); 12,14 (s, 1H, Indol-NH); 13,21 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 37,2 (CH₂); 41,7 (CH₂); 49,1 (CH₂); 110,3 (Cq); 111,5 (CH); 121,3 (CH); 122,8 (Cq); 126,7 (Cq); 127,3 (CH); 127,7 (2xCH); 127,9 (Cq); 128,3 (2xCH); 133,6 (Cq); 137,0 (Cq); 139,1 (Cq); 156,0 (Cq); 161,2 (Cq); 170,3 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	55,57	3,50	9,72
gef.:	56,01	4,03	9,17

CED-53 **4,6-Dichlor-3{[(adamantylaminocarbonyl)(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]methyl}-1H-indol-2-carbonsäure-ethylester**



C₂₆H₃₁Cl₂N₃O₅

M_r = 536,45

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Glycinmethylester-HCl	1,75 mmol	0,22 g
	Triethylamin	1,58 mmol	0,16 g
	Natriumtriacetoxyborhydrid	2 mmol	0,42 g
	1-Adamantylisocyanat	1,75 mmol	0,31 g
	Dichlormethan abs.		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Synthese erfolgt analog der Hydantoinbildung von CED-8. Der Ringschluss bleibt in diesem Fall aus.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: weißer Feststoff

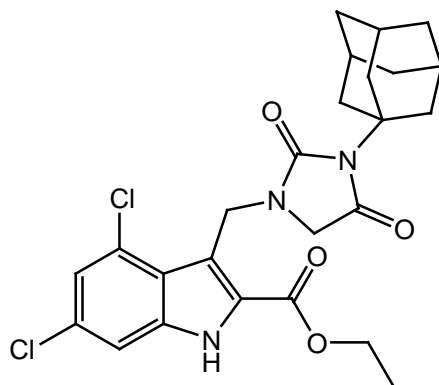
Ausbeute: 1,48 mmol = 84,6 % der Theorie

DC: R_f: 0,13 (*n*-Hexan/Ethylacetat 3/2)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, ³J=7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1,6 (s, 6H, Adamantyl-H); 1,96 (d, 6H, Adamantyl-H); 1,99 (s, 3H, Adamantyl-H); 3,41 (s, 3H, COOCH₃); 3,69 (s, 2H, NCH₂CO) 4,31 (q, ³J=7,11 Hz, 2H, CH₂CH₃); 5,2 (s, 2H, Indol-CH₂N); 6,4 (d, 1H, CONH); 7,2 (pd, J=1,61 Hz, 1H, Indol-H); 7,4 (pd, J=1,62 Hz, 1H, Indol-H); 12,3 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	58,21	5,82	7,83
gef.:	58,06	6,30	8,03

CED-54 **4,6-Dichlor-3[(3-adamantyl-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl]-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₅H₂₇Cl₂N₃O₄

M_r = 504,41

Ansatz:	CED-51	1,3 mmol	0,7 g
	Natriumethanolat	0,5 mmol	0,5 ml
	Ethanol		15 ml

Vorschrift: Eine frisch hergestellte Natriumethanolat-Lösung wird unter Stickstoffatmosphäre zu einer Suspension von CED-52 in Ethanol gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzer Zeit lässt sich die Bildung eines Niederschlags erkennen. Nach 12 Stunden wird der Reaktionsansatz mit 10 %iger HCl angesäuert und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 1,37 mmol = 78,3 % der Theorie

DC: R_f : 0,21 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

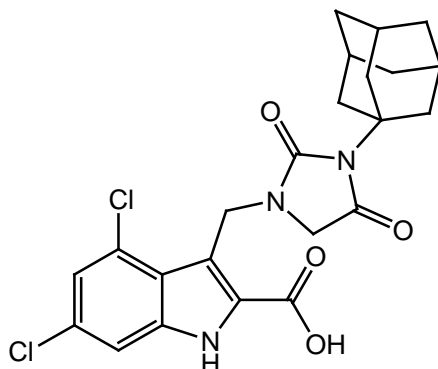
Schmelzpunkt: 178 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3367 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 2909 ν (C-H); 1708 ν (C=O); 1658; 1552; 1540; 1438; 1217; 768

$^1\text{H-NMR}$: d_6 -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,33 (t, $^3J=7,08$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 1,6 (s, 6H, Adamantyl-H); 1,95 (d, 6H, Adamantyl-H); 1,99 (s, 3H, Adamantyl-H); 3,68 (s, 2H, NCH_2CO); 4,33 (q, $^3J=7,12$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 5,0 (s, 2H, Indol- CH_2N); 7,2 (pd, $J=1,61$ Hz, 1H, Indol-H); 7,43 (pd, $J=1,62$ Hz, 1H, Indol-H); 12,29 (s, 1H, Indol-NH)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	59,53	5,40	8,33
gef.:	59,12	5,38	7,83

CED-55 **4,6-Dichlor-3[(3-adamantyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl) methyl]-1H-indol-2-carbonsäure**



C₂₃H₂₃Cl₂N₃O₄

M_r = 476,35

Ansatz:	CED-52	0,99 mmol	0,5 g
	NaOH-Lsg. 2 N in H ₂ O		0,7 ml
	THF		20 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-42

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/n-Hexan

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,846 mmol = 85,5 % der Theorie

DC: R_f: 0,11 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 274 °C (unter Zersetzung)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3900-2800 ν (O-H); 3642 ν (N-H); 2983 ν (C-H); 2905 ν (C-H); 1683 ν (C=O); 1569; 1450; 1417; 1254

FD-MS: m/z [rel. Int.] 480,1 (1,47%); 479,1 (11,41%); 478,1 (14,4%); 477,1 (69,69%); 476,1 (27,37%); 475,1 (100%)

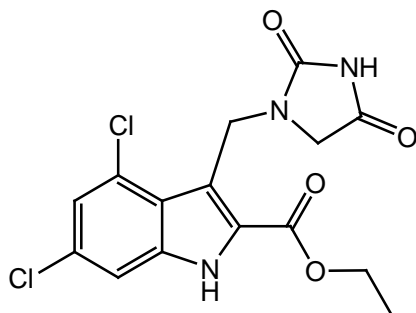
Experimenteller Teil

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,63 (m, 6H, Adamantyl-H); 2,01 (d, 3H, Adamantyl-H); 2,32 (m, 6H, Adamantyl-H); 3,43 (s, 2H, NCH₂CO); 5,1 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,21 (pd, J=1,32 Hz, 1H, Indol-H); 7,42 (pd, J=1,45 Hz, 1H, Indol-H); 12,3 (s, 1H, Indol-NH); 13,21 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 29,37 (3xCH); 35,9 (Cq); 40,1 (6xCH₂); 48,2 (CH₂); 59,0 (CH₂); 111,7 (CH); 113,7 (Cq); 121,2 (CH); 122,9 (Cq); 127,3 (Cq); 129,1 (Cq); 129,6 (Cq); 137,5 (Cq); 156,3 (Cq); 162,6 (Cq); 171,0 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	57,99	4,87	8,82
gef.:	57,25	4,56	8,46

CED-56 **4,6-Dichlor-3[(2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl]-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₅H₁₃Cl₂N₃O₄

M_r = 370,19

Ansatz:	CED-7	3,5 mmol	1,0 g
	Glycinmethylester-HCl	3,5 mmol	0,44 g
	Triethylamin	3,15 mmol	0,32 g
	Natriumtriacetoxymborhydrid	4,0 mmol	0,85 g
	Natriumcyanat	3,5 mmol	0,22 g
	Dichlormethan abs.		25 ml

Durchführung: Die Durchführung der Hydantoinbildung erfolgt analog zu Verbindung CED-8.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Methanol

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 2,86 mmol = 81,71 % der Theorie

DC: R_f: 0,31 (n-Hexan/Ethylacetat 3/2)

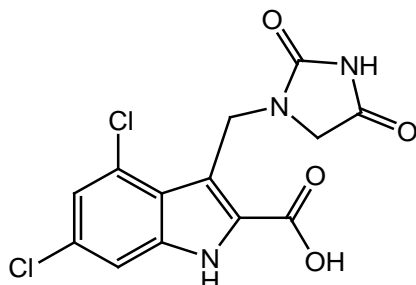
Schmelzpunkt: > 300 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3324 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 2884 ν (C-H); 1712 ν (C=O); 1475; 1397; 1221; 1078; 956; 837

Experimenteller Teil

FD-MS:	m/z [rel. Int.] 371,1 (24,09 %); 369,2 (100 %)		
¹H-NMR:	d ₆ -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,36 (t, ³ J=7,07 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃); 3,58 (s, 2H, NCH ₂ CO); 4,38 (q, ³ J=7,08 Hz, 2H, CH ₂ CH ₃); 5,1 (s, 2H, Indol-CH ₂ N); 7,24 (pd, J=1,74 Hz, 1H, Indol-H); 7,45 (pd, J=1,73 Hz, 1H, Indol-H); 10,75 (s, 1H, Hydantoin-NH); 12,38 (s, 1H, Indol-NH)		
¹³C-NMR:	d ₆ -DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 14,5 (CH ₃); 35,6 (CH ₂); 49,9 (CH ₂); 61,5 (CH ₂); 111,8 (CH); 114,5 (Cq); 121,6 (CH); 122,8 (Cq); 127,5 (Cq); 128,3 (Cq), 129,4 (Cq); 127,7 (Cq); 156,3 (Cq); 161,1 (Cq); 171,9 (Cq)		
EA:	%C	%H	%N
ber.:	48,67	3,54	11,35
gef.:	48,7	3,47	10,98

CED-57 **4,6-Dichlor-3-[(2,4-dioxomidazolidin-1-yl)methyl]-1*H*-indol-2-carbonsäure**



C₁₃H₉Cl₂N₃O₄

M_r = 342,13

Ansatz:	CED-54	0,63 mmol	0,17 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		0,47 ml
	THF		15 ml

Durchführung: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24.

Aufarbeitung: Der weiße Rückstand wird in Ethylacetat suspendiert. Nach Zugabe von Aceton löst sich dieser. Das Produkt lässt sich schließlich mit *n*-Hexan sauber ausfällen.

Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,31 mmol = 49,3 % der Theorie

DC: R_f: 0,09 (Ethylacetat/Petrolether 9/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: > 300 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3500-2600 ν (O-H); 3322 ν (N-H); 1720 ν (C=O); 1683 ν (C=O); 1569; 1467; 1197; 1107; 976

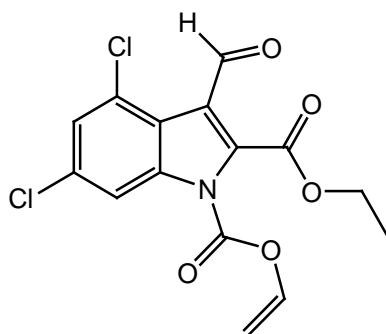
FD-MS: m/z [rel. Int.] 345,1 (8,82 %); 344,1 (13,95 %); 343,1 (63,64 %); 342,1 (15,24 %); 341,1 (100 %)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,57 (s, 2H, NCH₂CO); 5,11 (s, 2H, Indol-CH₂N); 7,22 (pd, J=1,43 Hz, 1H, Indol-H); 7,42 (pd, J=1,43 Hz, 1H, Indol-H); 10,74 (s, 1H, Hydantoin-NH); 12,31 (s, 1H, Indol-NH); 13,53 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR: d₆-DMSO, 75 MHz, δ [ppm] = 35,7 (CH₂); 49,9 (CH₂); 111,7 (CH); 114,5 (Cq); 121,6 (CH); 122,7 (Cq); 127,3 (Cq); 128,3 (Cq); 129,4 (Cq); 137,7 (Cq); 156,3 (Cq); 161,3 (Cq); 171,9 (Cq)

EA:	%C	%H	%N
ber.:	45,64	2,65	12,28
gef.:	45,57	1,86	11,83

CED-58 4,6-Dichlor-3-formyl-1-(vinylcarbonyl)-indol-2-carbonsäureethylester



C₁₅H₁₁Cl₂NO₅

Mr = 356,16

Ansatz:	CED-7	0,7 mmol	0,2 g
	Vinylchloroformiat	0,73 mmol	0,066 ml
	DMAP		2 Spatelspitzen

Chloroform

20 ml

Vorschrift: CED-7 wird in Chloroform gelöst und anschließend eine Lösung des Vinylchloroformiats ebenfalls in Chloroform langsam über 15 Minuten zugetropft. Anschließend werden 2 Spatelspitzen DMAP zugegeben. Nach beendeter Gasentwicklung lässt sich dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektieren. Der Reaktionsansatz wird mit Wasser verdünnt und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt.

Aufarbeitung: Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 1/1

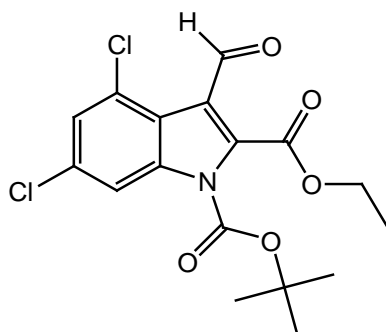
Aussehen: weiße Kristalle

Ausbeute: 0,45 mmol = 64,3 % der Theorie

DC: R_f : 0,46 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

$^1\text{H-NMR}$: d_6 -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, $^3J=7,11$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 4,41 (q, $^3J=7,13$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 5,01 (dd, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$); 5,21 (dd, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$); 7,78 (pd, $J=1,71$ Hz, 1H, Indol-H); 8,13 (pd, $J=1,73$ Hz, 1H; Indol-H); 10,63 (s, 1H, CHO)

CED-59 **4,6-Dichlor-3-formyl-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₈H₁₉Cl₂NO₅

M_r = 400,25

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	2,63 mmol	0,57 g
	DMAP		3 Spatelspitzen
	Dichlormethan		25 ml

Vorschrift: CED-7 wird in Dichlormethan gelöst. Anschließend wird das Di-*tert*-butyldicarbonat ebenfalls in Dichlormethan gelöst und langsam zu dem Indol getropft. Es wird soviel DMAP zugegeben bis der Reaktionsansatz klar wird, wobei sofort eine Gasentwicklung einsetzt. Nach ca. 20 Minuten ist unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle kein Edukt mehr vorhanden und es wird mit Wasser verdünnt. Anschließend wird 2 Mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, bevor das Dichlormethan unter Vakuum mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt wird.

Aufarbeitung. Säulenchromatographie; Petrolether/Ethylacetat 1/1

Aussehen: weiße Kristalle

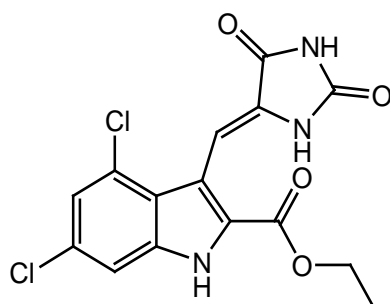
Ausbeute: 1,14 mmol = 65,1 % der Theorie

DC: R_f: 0,86 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

Schmelzpunkt: 165 °C

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,59 (t, ³J=7,13 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1,59 (s, 9H, Boc-H); 4,4 (q, ³J=7,13 Hz, 2H, CH₂CH₃); 7,74 (pd, J=1,8 Hz, 1H, Indol-H); 8,14 (pd, J=1,71 Hz, 1H, Indol-H); 10,62 (d, J=0,81 Hz, 1H, CHO)

CED-60 **4,6-Dichlor-3-(E/Z)-(2,4-dioxoimidazolidin-5-ylidenmethyl)-1H-indol-2-carbonsäureethylester**



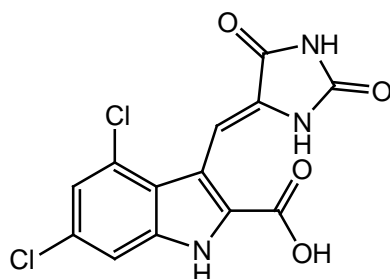
C₁₅H₁₁Cl₂N₃O₄

M_r = 368,17

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Hydantoin	1,75 mmol	0,18 g
	Ethanolamin		0,18 ml
	Natriumhydrogencarbonat-Lsg.		4 Trpf.
	Ethanol		10 ml
	Wasser		15 ml

- Vorschrift:** Hydantoin wird in Wasser gelöst und auf ca. 70 °C erwärmt. Nachdem es sich vollständig gelöst hat, wird der pH-Wert mit wenigen Tropfen einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird das Ethanolamin zugegeben und der Reaktionsansatz im Wasserbad auf 90 °C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur erfolgt die tropfenweise Zugabe einer äquimolaren Menge des CED-7 in Ethanol und es wird für ca. 10 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der beim Abkühlen entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit einem Ethanol/Wasser(1/5)-Gemisch gewaschen.
- Aufarbeitung:** Umkristallisieren in Ethanol/*n*-Hexan
- Aussehen:** gelbe Kristalle
- Ausbeute:** 0,67 mmol = 38,5 % der Theorie
- DC:** R_f: 0,21 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)
- Schmelzpunkt:** > 300 °C
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3665 ν (N-H); 2978 ν (C-H); 2889 ν (C-H); 1719 ν (C=O); 1642 ν (C=O); 1462; 1385; 1254; 1152; 1070; 958; 833
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,04 (t, ³J=6,95 Hz, 3H, CH₂CH₃); 4,36 (q, 2H, CH₂CH₃); 7,43 (pd, J=6,59 Hz, 1H, Indol-H); 7,52 (m, 1H, Indol-H), 9,36 (s, 1H, Indol-CH=C); 10,1 (m, 1H, NH); 11,1 (m, 1H, NH); 12,19 (s, 1H, Indol-NH)

CED-61 **4,6-Dichlor-3-(*E/Z*)-(2,4-dioxoimidazolidin-5-ylidenmethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäure**



C₁₃H₇Cl₂N₃O₄

M_r = 340,12

Ansatz:	CED-60	0,54 mmol	0,2 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		2,5 ml
	THF		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

Aussehen: gelbe Kristalle

Ausbeute: 0,32 mmol = 59,3 % der Theorie

DC: R_f: 0,1 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: > 300 °C

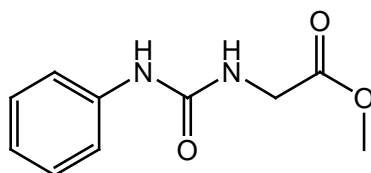
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3500-2500 ν (O-H); 3239 ν (N-H); 1732 ν (C=O); 1659 ν (C=O); 1507; 1393; 1234; 1078; 980; 837; 747

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 7,23 (pd, J=1,61 Hz, 1H, Indol-H); 7,42 (pd, J=1,73 Hz; 1H, Indol-H), 9,37 (s, 1H, Indol-CH=C); 10,1 (m, 1H, NH); 11,08 (m, 1H, NH); 12,06 (s, 1H, Indol-NH); 12,34 (s, 1H, COOH)

Experimenteller Teil

EA:	%C	%H	%N
ber.:	45,91	2,07	12,35
gef.:	45,56	2,14	11,89

CED-62 2-(3-Phenylureido)essigsäuremethylester



C₁₀H₁₂N₂O₂

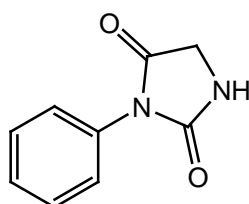
M_r = 192,21

Ansatz:	Glycinmethylester-HCl	16 mmol	2,0 g
	Triethylamin	16 mmol	1,62 g
	Phenylisocyanat	16 mmol	1,74 ml
	Dichlormethan abs.		30 ml

Vorschrift: Der Aminosäureester wird in absolutem Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin entsteht nach wenigen Minuten ein dichter, weißer Niederschlag. Anschließend wird das Phenylisocyanat zugetropft und der Reaktionsansatz unter Rückfluss 6 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird Ethylacetat zugegeben und nacheinander mit 10 %iger HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum mit Hilfe des Rotationverdampfers entfernt.

- Aufarbeitung:** Umkristallisieren in Methanol; nach dem Abkühlen fallen sehr langsam gelbe Kristalle aus.
- Aussehen:** gelbe Kristalle
- Ausbeute:** 14,24 mmol = 89,0 % der Theorie
- DC:** R_f: 0,35 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 2,08 (s, 3H, CH₃); 4,06 (s, 2H, NHCH₂CO); 7,41-7,51 (m, 3H, Ph-H); 7,36 (pt, 2H, Ph-H); 8,3 (s, 1H, NH); 8,81 (m, 1H, Ph-NHCO)

CED-63 3-Phenylimidazolidin-2,4-dion



C₉H₈N₂O₂

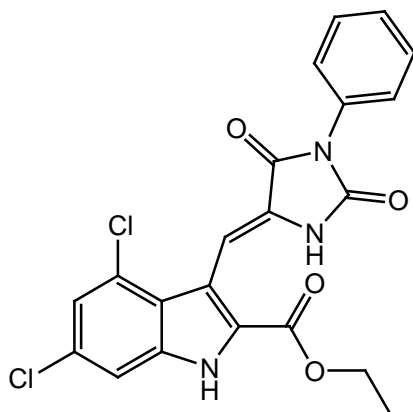
M_r = 176,17

Ansatz: CED-62 10,4 mmol 0,2 g
 Natriumethanolat-Lsg. 0,5 ml

Vorschrift: CED-61 wird unter Stickstoffatmosphäre in absolutem Ethanol gelöst und langsam mit einer frisch hergestellten Natriumethanolat-Lösung versetzt. Der Reaktionsansatz wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 10 %iger HCl angesäuert. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel vollständig entfernt.

- Aufarbeitung:** Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen. Um eine komplette Lösung zu erreichen werden wenige Tropfen Methanol zugegeben. Nach Zugabe von *n*-Hexan fällt das Produkt sauber aus.
- Aussehen:** weiße Kristalle
- Ausbeute:** 9,57 mmol = 92,0 % der Theorie
- DC:** R_f: 0,45 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)
- FT-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3653 ν (N-H); 2974 ν (C-H); 2888 ν (C-H); 1699 ν (C=O); 1507; 1430; 1324; 1180; 706
- ¹H-NMR:** d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 4,07 (d, ³J=7,66 Hz, 2H, COCH₂NH); 7,31-7,36 (m, 3H, Ph-H); 7,44-7,49 (m, 2H, Ph-H); 8,31 (s, 1H, NH)

CED-64 **4,6-Dichlor-3-(*E/Z*)-(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-5-ylidenmethyl)-1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₂₁H₁₅Cl₂N₃O₄

M_r = 444,27

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,31 g
	CED-63	1,75 mmol	0,5 g
	Ethanolamin		0,18 ml
	NaHCO ₃ -Lsg.		6 Trpf.
	Ethanol		7 ml
	Wasser		10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Aldolreaktion erfolgt analog zu Verbindung CED-59

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethanol

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 0,54 mmol = 31,0 % der Theorie

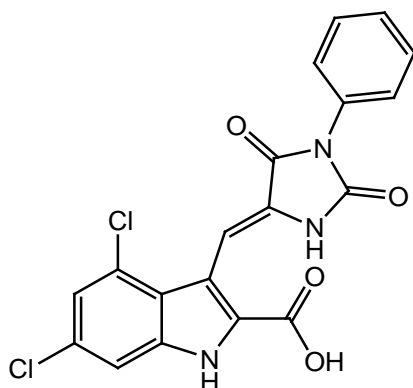
DC: R_f: 0,34 (Petrolether/Ethylacetat 1/1)

Schmelzpunkt: 278 °C

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3179 ν (N-H); 2983 ν (C-H); 1880 ν (C-H); 1625 ν (C=O); 1438; 1266, 1070, 976, 841, 772

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,04 (t, 3H, CH₂CH₃); 4,38 (q, 2H, CH₂CH₃); 7,28 (s, 1H, Ar-H); 7,49-7,52 (m, 3H, Ar-H); 7,58 (pd, J=1,64 Hz, 2H, Ar-H), 7,62 (pd, J=1,64 Hz, 1H, Ar-H); 9,36 (pd, J=11,79 Hz; 1H, Indol-CH=C); 11,55 (s, 1H, NH); 12,19 (s, 1H, Indol-NH)

CED-65 **4,6-Dichlor-3-(E/Z)-(2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-5-ylidenmethyl)-1H-indol-2-carbonsäure**



C₁₉H₁₁Cl₂N₃O₄

M_r = 416,21

Ansatz:	CED-64	4,5 mmol	0,2 g
	NaOH-Lsg. 2N		1 ml
	THF		10 ml

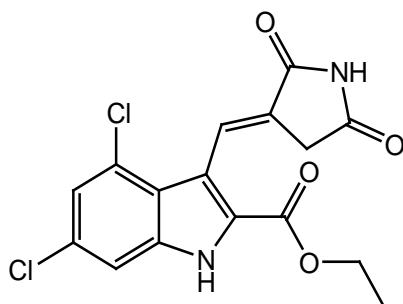
Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

Experimenteller Teil

Aussehen:	gelber Feststoff		
Ausbeute:	2,88 mmol = 64,0 % der Theorie		
DC:	R _f : 0,12 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)		
Schmelzpunkt:	298 °C (unter Zersetzung)		
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3550-2500 ν (O-H); 3182 ν (N-H); 2984 ν (C-H); 1609 ν (C=O); 1438; 1268, 1127, 909, 876		
¹H-NMR:	d ₆ -DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 7,28 (s, 1H, Ar-H); 7,49-7,51 (m, 3H, Ar-H); 7,58 (pd, J=1,64 Hz, 2H, Ar-H), 7,62 (pd, J=1,64 Hz, 1H, Ar-H); 9,37 (pd, J=11,79 Hz; 1H, Indol- CH=C); 11,5 (s, 1H, NH); 12,2 (s, 1H, Indol-NH); 12,87 (s, 1H, COOH)		
EA:	%C	%H	%N
	ber.: 54,83	2,66	17,04
	gef.: 54,21	2,12	17,21

CED-66 **4,6-Dichlor-3-(*E/Z*)-(2,5-dioxopyrrolidin-3-yliden-methyl)-
1*H*-indol-2-carbonsäureethylester**



C₁₆H₁₂Cl₂N₂O₄

M_r = 339,13

Ansatz:	CED-7	1,75 mmol	0,5 g
	Succinimid	1,75 mmol	0,17 g
	Ethanolamin		0,18 ml
	Natriumhydrogencarbonat-Lsg.		3 Trpf.
	Ethanol		5 ml
	Wasser		15 ml

Vorschrift: Die Durchführung der Aldolreaktion erfolgt analog zu Verbindung CED-59

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethanol

Aussehen: blassgelber Feststoff

Ausbeute: 0,4 mmol = 23,1 % der Theorie

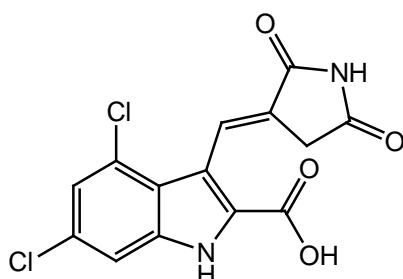
DC: R_f: 0,2 (Petrolether/Ethylacetat 1/2)

Schmelzpunkt: 279 °C

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 1,32 (t, 3H, CH₂CH₃); 3,88 (s, 2H, CCH₂CO); 4,38 (q, 2H, CH₂CH₃); 7,43 (pd, J=6,59 Hz,

1H, Indol-H); 7,52 (m, 1H, Indol-H), 9,36 (s, 1H, Indol-CH=C);
10,67 (m, 1H, NH); 11,86 (s, 1H, Indol-NH)

CED-67 **4,6-Dichlor-3-(*E/Z*)-(2,5-dioxopyrrolidin-3-yliden-methyl)-
1*H*-indol-2-carbonsäure**



$C_{14}H_8Cl_2N_2O_4$

$M_r = 367,18$

Ansatz:	CED-66	0,3 mmol	0,1 g
	NaOH-Lsg. 2N in H ₂ O		1,5 ml
	THF		10 ml

Vorschrift: Die Durchführung der basischen Esterhydrolyse erfolgt analog zu Verbindung CED-24.

Aufarbeitung: Umkristallisieren in Ethylacetat/*n*-Hexan

Aussehen: weißer Feststoff

Ausbeute: 0,19 mmol = 63,3 % der Theorie

DC: R_f : 0,12 (Chloroform/Aceton 4/1 + 3 % Ameisensäure)

Schmelzpunkt: 290 °C (unter Zersetzung)

¹H-NMR: d₆-DMSO, 300 MHz, δ [ppm] = 3,89 (s, 2H, CCH₂CO); 7,43 (pd, $J=6,59$ Hz, 1H, Indol-H); 7,52 (m, 1H, Indol-H), 9,36

(s, 1H, Indol-CH=C); 10,67 (m, 1H, NH); 11,8 (s, 1H, Indol-NH); 12,21 (bs, 1H, COOH)

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding-cassette
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
aliphatic	aliphatisch
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
Ar	Aryl
Arg	Arginin
aromat	aromatisch
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast cancer resistance protein
ber	berechnet
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BOC	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
ca	circa
CaM	Calmodulin
CaMPK-II	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CIP	Cahn-Ingold-Prelog
CKII	Caseinkinase II
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCKA	5,7-Dichlor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-2-carbonsäure
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
dpm	decays per minute
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EA	Elementaranalyse
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-)carbodiimid
EI-MS	Electron Impact Mass Spectroscopy
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FD-MS	Field Desorption Mass Spectroscopy
FT-IR	Fourier Transformations Infrarotspektroskopie
GABA	γ -Aminobuttersäure
gef	gefunden
Gly	Glycin
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GS	Glutamat-Synthase
GTL-1	Glutamat-Transporter-1
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-performance Liquid Chromatographie
iGlu	ionotroper Glutamat-Rezeptor
Int	Intensität
IP ₃	1,4,5-Inositoltriphosphat
IR	Infrarot-Spektroskopie
ISA	Ionic Strength Adjusted
i.v.	intravenös
konz	konzentriert
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LDA	Lithium Diisopropylamid
LiHMDS	Lithium Hexamethyldisilazid
LSC	Liquid Scintillation Counting

Anhang

Lsg	Lösung
Ltd	Limited
LTP	Long Term Potentiation
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
MCR	Multi Component Reaction
mGlu	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MM 6	Mono Mac 6
M _r	relative Molare Masse
MRP	Multi resistance Protein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NMDA	N-Methyl- <i>D</i> -Aspartat
NMDAR	N-Methyl- <i>D</i> -Aspartat-Rezeptor
NMR	Kernresonanzspektroskopie
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
NSB	Non-Specific Bound
NTB	N-terminale Domäne
OECD	Organization for Cooperation and Development
p.a.	pro analysis
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PCP	Phencyclidin
PDZ	PSD-95/Discs large/Zona occludens-1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pgp	P-Glycoprotein
Phe	Phenyl
PKC	Proteinkinase
PLA ₂	Phospholipase P ₂
PMS	1-Methoxy-5-methylphenazinium-Methylsulfat
Pos	Position
PPI	Protein-Protein-Interactions
ppm	parts per million
Pro	Prolin

PSD-95	Postsynaptic Density-95
rel	relativ
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Reversed Phase High-performance Liquid Chromatographie
SB	Specific Bound
SC	Säulenchromatographie
Ser	Serin
Ser.-Nr.	Serien-Nummer
SSC	Survival Signal-complex
TB	Total Bound
<i>t</i> -BuOK	<i>tert.</i> -Kaliumbutoxid
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TJ	Tight Junction
t_0	Totzeit
t_r	Retentionszeit
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Try	Tyrosin
TsCl	p-Toluolsulfonylchlorid
vgl	vergleiche
vs	versus
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)- carbonyl)-2 <i>H</i> -tetrazoliumhydroxid
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung der Glutamat-Rezeptoren.....	3
Abbildung 2: Strukturen der namensgebenden Liganden ionotroper Glutamat-rezeptoren	3
Abbildung 3: Schema des heterotetrameren NMDA-Rezeptorkomplexes	5
Abbildung 4: Topologie einer NMDA-Rezeptor-Untereinheit nach Sobolevsky.	7
Abbildung 5: Prinzip der durch L-Glutamat vermittelten Exzitotoxizität modifiziert nach Stark <i>et al.</i>	10
Abbildung 6: Übersicht der Ligandenbindungsstellen des NMDA-Rezeptor-komplexes nach Leeson <i>et al.</i>	12
Abbildung 7: Agonisten und Antagonisten der L-Glutamat-Bindungsstelle	13
Abbildung 8: Agonisten und partielle Agonisten der strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle	15
Abbildung 9: Antagonisten der strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle..	16
Abbildung 10: Struktur-Wirkungsbeziehung des Antagonisten L-689,560, basierend auf dem Pharmakophormodell nach Leeson <i>et al.</i>	17
Abbildung 11: endogene Agonisten und inverse Agonisten der Polyamin-Bindungsstelle	18
Abbildung 12: allosterische Modulatoren der Polyamin-Bindungsstelle NR2B-untereinheit-enthaltender NMDA-Rezeptoren.....	19
Abbildung 13: Strukturen verschiedener Kanalblocker des NMDA-Rezeptors.	21
Abbildung 14: Affinitätsbeeinflussungen der Ligandenbindungsstellen des NMDA-Rezeptors modifiziert nach Stark <i>et al.</i>	23
Abbildung 15: A: Kolokalisierung von NMDA-Rezeptoren und nNOS vermittelt durch das Gerüstprotein PSD-95; B: Inhibition des exzitotoxischen Signalweges von NMDAR durch Verwendung eines zellpermeablen NR2B-Peptids nach Aarts <i>et al.</i>	25
Abbildung 16: Vereinfachter Überblick der pathologischen Mechanismen im fokalen ischämischen Zustand des Gehirns nach Dirnagel <i>et al.</i>	27
Abbildung 17: Mutmaßlicher Verlauf der schädigenden Ereignisse nach fokaler zerebraler Ischämie	28

Abbildung 18: Strukturen von Felbamat und Fluorfelbamat	30
Abbildung 19: Struktur des AMPA-Rezeptor-Antagonisten Talampanel.....	30
Abbildung 20: Stuktur von Riluzol.....	33
Abbildung 21: Struktur des NMDA-Rezeptor-Glycin-Antagonist GV197661...	35
Abbildung 22: Struktur von MJD-118 (CED-9).....	37
Abbildung 23: Pharmakophor Modell von MJD-118 (CED-9) und seine Interaktionen mit dem Rezeptorprotein basierend auf dem Pharmakophor Modell nach Leeson <i>et al.</i>	39
Abbildung 24: Leitstruktur MJD-118 (CED-9); in rot dargestellt ist die in das Molekül integrierte Glycin-Teilstruktur	39
Abbildung 25: Übersicht über die im Rahmen der Dissertationsarbeit vorzunehmenden strukturellen Modifikationen der Leitstruktur	40
Abbildung 26: Allgemeiner Überblick zur Synthese des Indolgrundkörpers ...	41
Abbildung 27: Entstehung des Diazoniumsalzes unter salzsauren Bedingungen	43
Abbildung 28: Reduktion des Diazoniumsalzes zum Phenylhydrazin·HCl mit Zinn(II)-chlorid	44
Abbildung 29: Bildung des Phenylhydrazons CED-2.....	44
Abbildung 30: Unterschiedliche π -Diastereomere am Beispiel von CED-2.....	45
Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchung des <i>Z</i> -Isomers von CED-2	46
Abbildung 32: $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchung des <i>E</i> -Isomers von CED-2	46
Abbildung 33: Reaktionsmechanismus der protonenkatalysierten Fischer Indol- Synthese am Beispiel von CED-3	48
Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchung zur Klärung der Regioselektivität monohalogener Indolderivate am Beispiel von CED-21 ...	50
Abbildung 35: Einfache Resonanzbeschreibung des Indols.....	51
Abbildung 36: Formylierung des Indolgrundkörpers an Position 3	51
Abbildung 37: Mechanismus der Formylierung nach Vilsmeier	52
Abbildung 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum an Position 3 formylierter Indolderivate am Beispiel von CED-7	53

Abbildung 39: Überblick über die Strukturvariationen an Position 3 des Indolgrundkörpers	54
Abbildung 40: Edukte der Multikomponentenmethode zur Synthese der Hydantoinderivate nach Sim und Ganesan.....	58
Abbildung 41: Allgemeiner Reaktionsmechanismus zur Darstellung der Imidazolidin-2,4-dione durch eine Multikomponentenmethode nach Sim und Ganesan	59
Abbildung 42: Ringschluss von CED-53 mit Natriumethanolat	60
Abbildung 43: ¹³ C-NMR-Spektrum eines Spin-Echo Experiments von CED-55	61
Abbildung 44: Isocyanatbildung nach <i>Curtius</i> unter thermischen Bedingungen..	62
Abbildung 45: Folgereaktion bei der Isocyanatbildung nach <i>Curtius</i>	62
Abbildung 46: Entstehung des identifizierten Hauptproduktes bei der Isocyanatbildung nach <i>Curtius</i>	63
Abbildung 47: ¹ H-NMR-Spektrum des beim Curtius-Abbau entstehenden Hauptproduktes	63
Abbildung 48: Basenkatalysierte Esterhydrolyse am Beispiel von CED-8	64
Abbildung 49: Etherspaltung der Methoxygruppe von CED-34 zur Hydroxylfunktion mit BBr ₃	65
Abbildung 50: Mechanismus der Etherspaltung mit Bortribromid	66
Abbildung 51: ¹ H-spektroskopische Untersuchung zum Beweis der Etherspaltung	67
Abbildung 52: Reduktion mit Natriumborhydrid.....	70
Abbildung 53: Reduktion der 4-Carbonylfunktion des Imidazolidin-2,4-dions durch Hydridtransfer mit Natriumborhydrid in abs. Ethanol.....	70
Abbildung 54: ¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchung zur Reduktion der 4-Carbonylfunktion des Hydantoins zum Alkohol.....	72
Abbildung 55: Übersicht über mögliche Reduktionsprodukte von Hydantoinderivaten mit Lithiumaluminiumhydrid.....	73
Abbildung 56: Edukte der Multikomponentenmethode zur Synthese des Imidazolidin-2-on-Derivates nach Abdel-Magid	74

Abbildung 57: Reaktionsmechanismus der Cyclisierung zum Imidazolidin -2-on-Derivat	75
Abbildung 58: Reduktion mit Boran-THF-Komplex.....	76
Abbildung 59: Reaktionsmechanismus der Reduktion von Carbonylgruppen zum Alkan mit Boran-THF-Komplex.....	76
Abbildung 60: Synthese des 3-Phenylhydantoin	78
Abbildung 61: Übersicht der durchgeführten Aldolkondensation bei verschiedenen Reaktionsbedingungen	79
Abbildung 62: Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Aldolkondensation	80
Abbildung 63: CED-7 mit unter basischen Bedingungen stabilen Schutzgruppen an N-1	81
Abbildung 64: Mögliche entstandene Diastereomere durch basenkatalysierte Aldolkondensation.....	82
Abbildung 65: Übersicht der Hydroxamsäure- bzw. Methylether-Bildung mit Oxalylchlorid	85
Abbildung 66: Erster Schritt der retrosynthetischen Betrachtung des Hybridmoleküls CED-13.....	86
Abbildung 67: Schema der Überführung des Aldehyds in eine Aminomethylfunktion.....	86
Abbildung 68: 1,3-sigmatrope Umlagerung des O-Acylisoharnstoffderivat zum inaktiven N-Acylharnstoffderivat.....	87
Abbildung 69: Reaktionsmechanismus der Amidbildung mit EDCI und HOBt.	88
Abbildung 70: Struktur des Radioliganden [³ H]MDL-105,519.....	91
Abbildung 71: Strukturen von MDL100,748 und MDL100,458	92
Abbildung 72: A: unspezifischen Bindung B: spezifische Bindung	94
Abbildung 73: Schematischer Überblick der Szintillationsmethode	95
Abbildung 74: Formel zur Bestimmung der Spezifischen Bindung SB	101
Abbildung 75: Verlauf der Hemmungskurve bei halblogarithmischer Auftragung der Konzentrationen der Testsubstanz gegen die spezifische Bindung in %.	102
Abbildung 76: Formel zur Bestimmung der Inhibitions-Konstante K_i	102

Abbildung 77: Metabolisierung des gelben Tetrazolium-Salzes XTT zum orangefarbenen Formazan-Derivat durch lebende Zellen.....	104
Abbildung 78: Blut-Hirn-Schranke.....	107
Abbildung 79: Transportmechanismen durch die Blut-Hirn-Schranke nach Abbott	108
Abbildung 80: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> -Modells der Blut-Hirn-Schranke	112
Abbildung 81: Formel zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten log P ..	113
Abbildung 82: Formel zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten D einer Molekülspezies	113
Abbildung 83: Formel zur Bestimmung der Ionisationskonstante pK_a	114
Abbildung 84: Yasuda-Shedlovsky-Gleichung	115
Abbildung 85: Dissoziations- und Diffusionsgleichgewicht bei der Titration einer einprotonigen Säure.....	116
Abbildung 86: Formel zur Bestimmung des Kapazitätsfaktors K.....	118
Abbildung 87: Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie ⁽²²⁶⁾	120
Abbildung 88: Bindung von Liganden an der Ligandenbindungsstelle (S1-S2) der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors	124
Abbildung 89: Graphische Darstellung der Testergebnisse des XTT-Viabilitätsassays zur Bestimmung der Zytotoxizität	150
Abbildung 90: Transversalaufnahmen der Aktivitätsverteilung von [¹⁸ F]34 in verschiedenen Hirnregionen im μ PET-Experiment	157
Abbildung 91: Aufnahme der Aktivitätsverteilung von [¹⁸ F]31 in verschiedenen Hirnregionen im μ PET-Experiment	158
Abbildung 92: verschiedene Transversalaufnahmen der Aktivitätsverteilung von [¹⁸ F]31 im μ PET-Experiment	159
Abbildung 93: mögliche Prodrugs nach dem CDS-Prinzip.....	163

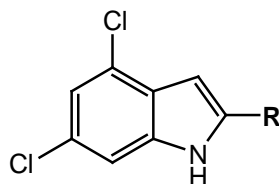
8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl von in der Entwicklung befindlichen Substanzklassen mit neuroprotektiven Eigenschaften.....	28
Tabelle 2: Variation des Substituentenmusters am Indolgrundgerüst.....	42
Tabelle 3: Übersicht der Hydantoinderivate mit Dichlorsubstitution und unterschiedlichen Resten am Imidazolidin-2,4-dion-Ring.....	55
Tabelle 4: Übersicht der Strukturveränderung durch Reduktion der Carbonylfunktionen ausgehend vom Hydantoin	68
Tabelle 5 : Reduktionen von Carbonylfunktionen zum Alkohol bzw. Amin mit komplexen Hydriden.....	69
Tabelle 6: Übersicht der Methylenimidazolidin-2,4-on- bzw. Methylenpyrrolidin - 2,4-on-Derivate	77
Tabelle 7: Übersicht der 4,6-Dichlorindolcarbonsäurederivate mit unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2	84
Tabelle 8: Pipettierschema zur Durchführung des [³ H]MDL105,519-Assays.	100
Tabelle 9: Experimentell bestimmte Retentionszeiten der Referenzsubstanzen; Fließmittel Acetonitril/Wasser 2:1	118
Tabelle 10: Experimentell bestimmte Retentionszeiten der Referenzverbindungen; Fließmittel Methanol/Wasser 1:1 + 10 % Essigsäure	119
Tabelle 11: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay von allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Testsubstanzen.....	126
Tabelle 12: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit einem unterschiedlichen Substitutionsmuster am Indolgrundgerüst	130
Tabelle 13: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen Resten an Position 3 des Hydantoins.....	132
Tabelle 14: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen Wasserstoff-Brücken-Donor- und -Akzeptor-Funktionen ausgehend von der Hydantointeilstruktur.	135

Tabelle 15: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit Methylenbrücke zwischen Indol und Imidazolidin-2,4-dion- bzw. Pyrrol-2,5-dion-Struktur.....	136
Tabelle 16: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Strukturen mit unterschiedlichen sauren Funktionen an Position 2.....	138
Tabelle 17: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Hybridstruktur aus 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure und Valproinsäure über eine Amidbindung.	140
Tabelle 18: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der im Rahmen der Diplomarbeit C. Heyl synthetisierten Strukturen.....	142
Tabelle 19: Testergebnisse aus dem [³ H]MDL105,519-Bindungsassay der Gavestinel-Derivate	144
Tabelle 20: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays zur Bestimmung der Zytotoxizität	148
Tabelle 21: Strukturen von zentral wirksamen Arzneistoffen mit..... log P-Werten < 2.....	151
Tabelle 22: Ergebnisse der pK _a - sowie log P-Wert-Bestimmungen ausgewählter Indolderivate mit Hydantointeilstruktur und Esterfunktion	153
Tabelle 23: Ergebnisse der pK _a - sowie log P-Wert-Bestimmungen ausgewählter Indolderivate mit Hydantointeilstruktur und Carbonsäurefunktion	154

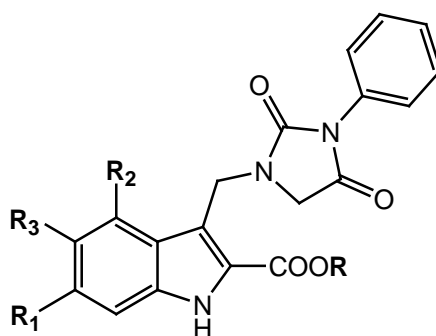
8.4 Formelverzeichnis

Testverbindungen

CED-3 R = -COOCH₂CH₃

CED-4 -COOH

CED-5 -CONHOH

CED-6 -CONHOCH₃CED-18 R = -CH₂CH₃ R₁ = -F R₂ = -F R₃ = -H

CED-19 -H -F -F -H

CED-23 -CH₂CH₃ -Cl -H -H

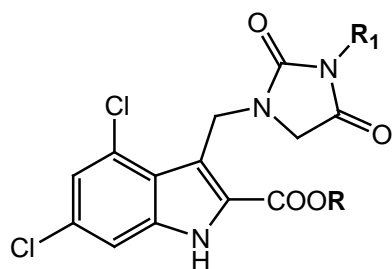
CED-24 -H -Cl -H -H

CED-28 -CH₂CH₃ -F -H -H

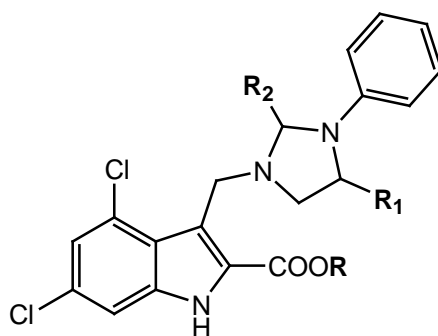
CED-29 -H -F -H -H

CED-33 -CH₂CH₃ -H -H -OCH₃CED-34 -H -H -H -OCH₃

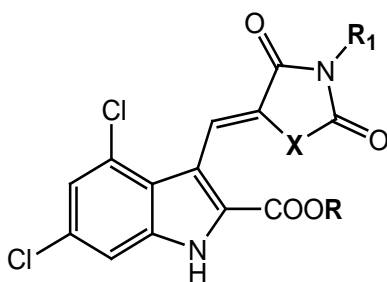
CED-35 -H -H -H -OH



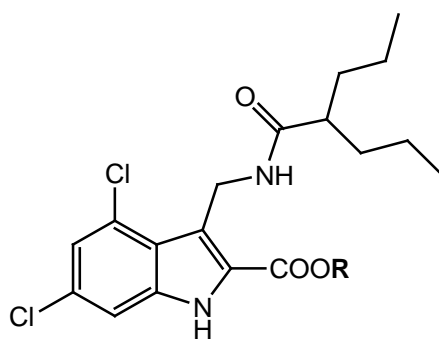
CED-8	R = -CH ₂ CH ₃	R₁ = -Phenyl
CED-9	-H	-Phenyl
CED-10	-NHOH	-Phenyl
CED-42	-CH ₂ CH ₃	-3,4,5-Trimethoxyphenyl
CED-43	-H	-3,4,5-Trimethoxyphenyl
CED-44	-CH ₂ CH ₃	-3,5-Dimethoxyphenyl
CED-45	-H	-3,5-Dimethoxyphenyl
CED-46	-CH ₂ CH ₃	-Naphtyl
CED-47	-H	-Naphtyl
CED-49	-CH ₂ CH ₃	-Thiophen
CED-50	-H	-Thiophen
CED-51	-CH ₂ CH ₃	-Benzyl
CED-52	-H	-Benzyl
CED-54	-CH ₂ CH ₃	-Adamantyl
CED-55	-H	-Adamantyl
CED-56	-CH ₂ CH ₃	-H
CED-57	-H	-H



CED-36	$R = -H$	$R_1 = -OH$	$R_2 = =O$
CED-38	$-CH_2CH_3$	$-H$	$=O$
CED-39	$-H$	$-H$	$=O$
CED-40	$-H$	$-H$	$-H$



CED-60	$R = -CH_2CH_3$	$R_1 = -H$	$X = -NH-$
CED-61	$-H$	$-H$	$-NH-$
CED-64	$-CH_2CH_3$	$-Phenyl$	$-NH-$
CED-65	$-H$	$-Phenyl$	$-NH-$
CED-67	$-H$	$-H$	$-CH_2-$



CED-13

R = -CH₂CH₃

CED-14

-H

8.5 Literaturverzeichnis

- ¹ Stark, H.; Graßmann, S., Reichert, U.: Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren Teil 1: Architektur und Modulation der Rezeptoren. *Pharm. Unserer Zeit.* (2000) 29, 159-166
- ² Bräuner-Osborne, H.; Egebjerg, J.; Nielsen, E.O.; Krogsgaard-Larsen, P.: Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *J. Med. Chem.* (2000) 43, 2609-2645
- ³ Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H.J.: Medizinische Chemie Targets und Arzneistoffe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, (2005). 3-7692-3483-9
- ⁴ Xu, T.-L.; Gong, N.: Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: Diversity, function and regulation. *Prog. Neurobiol.* (2010) 91, 349-361
- ⁵ Betz, H.: Ligand-gated Ion Channels in the Brain: The Amino Acid Receptor Superfamily. *Neuron* (1990) 5, 383-392
- ⁶ Wollmuth, L.P.; Sakmann, B.: Different mechanisms of Ca²⁺ transport in NMDA and Ca²⁺-permeable AMPA glutamate receptor channels. *J. Gen. Physiol.* (1998) 112, 623-636
- ⁷ Mori, H.; Mishina, M.: Structure and Function of the NMDA Receptor Channel. *Neuropharmacol.* (1995) 34, 1219-1237
- ⁸ Rambhadran, A.; Gonzalez, J.; Jayaraman, V.: Subunit Arrangement in N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors. *J. Biol. Chem.* (2010) 285, 15296-15301
- ⁹ Madry, C.: Dissertation, Struktur-Wirkungsbeziehungen von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Untereinheiten, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2008)
- ¹⁰ Furukawa, H.; Singh, S.K.; Mancusso, R.; Gouaux, E.: Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature.* (2005) 438, 185-192

- ¹¹ Madry, C.; Mesic, I.; Bartholomäus, I.; Nicke, A.; Betz, H.; Laube, B.: Principle role of NR3 subunit in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2006) 354, 102-108
- ¹² Yao, Y.; Mayer, M.L.: Charakterization of a Soluble Ligand Binding Domain of the NMDA Receptor Regulatory Subunit NR3A. *J. Neurosci.* (2006) 26, 4559-4566
- ¹³ Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F.: The Glutamate Receptor Ion Channel. *Pharmacolog. Rev.* (1999) 51, 7-61
- ¹⁴ Lummis, S.C.R.; Fletcher, E.J.; Green, T.: Identification of a new site in the S1 ligand binding region of the NMDA receptor NR2A subunit involved in receptor activation by glutamate. *Neuropharmacol.* (2002) 42, 437-443
- ¹⁵ Sobolevsky, A.I.; Podromou, M.L.; Yelshansky, M.V.; Wollmuth, L.P.: Subunit-specific Contribution of Pore-forming Domains to NMDA Receptor Channel Structure and Gating. *J. Gen. Physiol.* (2007) 129, 509-525
- ¹⁶ Seeber, S.; Becker, K.; Rau, T.; Eschenhagen, T.; Becker, C.M.; Herkert, M.: Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the developing rat heart. *J. Neurochem.* (2000) 75, 2472-2477
- ¹⁷ Shen, L.; Li, L.; She, H.; Yue, S.; Li, C.; Luo, Z.: Inhibition of Pulmonary Surfactants Synthesis during N-Methyl-D-Aspartate-Induced Lung Injury. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2010) 107, 751-757
- ¹⁸ Corless, M.; Kieley, A.; McClenaghan, N.H.; Flatt, P.R.; Newsholme, P.: Glutamine regulates expression of key transcription factor, signal transduction, metabolic gene, and protein expression in a clonal pancreatic beta-cell line. *J. Endocrinol.* (2006) 190, 719-727
- ¹⁹ Morley, P.; P.; MacLean, S.; Gendron, T.F.; Small, D.L.; Tremblay, R.; Durkin, J.P.; Mealing, G.: Pharmacological and molecular charakterisation of glutamate receptors in the MIN6 beta-cell line. *Neurol. Res.* (2000) 22, 379-385

- ²⁰ Patton, A.J.; Genever, P.G.; Birch, M.A.; Suva, L.J.; Skerry, T.M.: Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggest a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone*. (1998) 22, 645-649
- ²¹ Carlton, S.M.; Hargett, G.L.; Coggeshall, R.E.: Localisation and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci. Lett.* (1995) 197, 25-28
- ²² Malone, J.D.; Richards, M.; Kahn, A.J.: Human peripheral monocytes express putative receptors for neuroexcitatory amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1986) 83, 3307-3310
- ²³ Genever, P.G.; Wilkinson, D.J.; Patton, A.J.; Peet, N.M.; Hong, Y.; Mathur, A.; Erusalimsky, J.D.; Skerry, T.M.: Expression of a functional N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor by bone marrow megakaryocytes. *Blood*. (1999) 93, 2876-2883
- ²⁴ Sack, J.S.; Saper, M.A.; Quijcho, F.A.: Periplasmic binding protein structure and function. Refinement X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J. Mol. Biol.* (1989) 206, 171-191
- ²⁵ Sobolevsky, A.I.; Rooney, L.A.; Wollmuth, L.P.: Staggering of Subunits in NMDAR Channels. *Biophysical Journal*. (2002) 83, 3304-3314
- ²⁶ Stephenson, F.A.; Cousins, S.L.; Kenny, A.V.: Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review). *Mol. Mem. Biol.* (2008) 25, 311-320
- ²⁷ Nakanishi, S.; Nakajima, Y.; Masu, M.; Ueda, Y.; Nakahara, K.; Watanabe, D.; Yamaguchi, S.; Kawabata, S.; Okada, M.: Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* (1998) 26, 230-235
- ²⁸ Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* (1984) 307, 462-465

- ²⁹ Wollmuth, L.P.; Kuner, T.; Sakmann, B.: Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular Mg²⁺. *J. Physiol.* (1998) 506, 13-32
- ³⁰ Yu, F.H.; Yarov-Yarovoy, V.; Gutman, G.A.; Catterall, W.A.: Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol. Rev.* (2005) 57, 387-395
- ³¹ Wollmuth, L.P.; Sobolevsky, A.I.: Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *TRENDS in Neurosci.* (2004) 27, 321-328
- ³² Böhme, I.; Lüddens, H.: Molekulare Neurobiologie der Epilepsie: Zielstrukturen für Antiepileptika. *Pharm. Unserer Zeit.* (2007) 36, 262-268
- ³³ Henson, M.A.; Roberts, A.C.; Perez-Otano, I.; Philpot, B.D.: Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor function. *Prog. Neurobiol.* (2010) 91, 23-37
- ³⁴ Nilsson, A.; Duan, J.; Mo-Blomquist, L.-L.; Benedikz, E.; Sundström, E.: Charakterisation of the human NMDA receptor subunit NR3A glycine binding site. *Neuropharmacology.* (2006) 52, 1151-1159
- ³⁵ Schüler, T.; Mesic, I.; Madry, C.; Bartholomäus, I.; Laube, B.: Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in N-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly. *J. Biol. Chem.* (2007) 283, 37-46
- ³⁶ Hebb, D.O.: *The Organisation of Behaviour.* New York: Wiley (1949)
- ³⁷ Prakash, S.; Ambrosio, E.; Alguacil, L.F.; Del Olmo, N.: Genetic Differences in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neurosci.* (2009) 161, 342-346
- ³⁸ Li, R.; Huang, F.-S.; Abbas, A.-K.; Wigström, H.: Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. *BMC Neurosc.* (2007) 8, 1-12
- ³⁹ Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* (1993) 361, 31-39

- ⁴⁰ Lau, C.G., Takeuchi, K.; Rodenas-Ruano, A.; Takajasu, Y.; Murphy, J.; Bennett, M.V.L.; Zukin, R.S.: Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem. Soc. Trans.* (2009) 37, 1369-1374
- ⁴¹ Hardingham, G.E.; Bading, H.: The Ying and Yang of NMDA receptor signaling. *Trends in Neurosciences.* (2003) 26, 81-89
- ⁴² Paul, S.; Connor, J.A.: NR2B-NMDA receptor-mediated increases in intracellular Ca²⁺ concentration regulate the tyrosine phosphatase, STEP, and ERK MAP kinase signaling. *J. Neurochem.* (2010) 114, 1107-1118
- ⁴³ Olney, J.W.: Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* (1969) 164, 719-721
- ⁴⁴ Lester, R.A.J.; Tong, G.; Jahr, C.E.: Interactions between the Glycine and Glutamate Binding Site of the NMDA Receptor. *J. Neurosci.* (1993) 13, 1088-1096
- ⁴⁵ Pivovarova, N.B.; Andrews, S.B.: Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS Journal* (2010) 1-15
- ⁴⁶ Lynch, D.R.; Guttman, R.P.: Excitotoxicity: Perspectives Based on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2001) 300, 717-723
- ⁴⁷ Arundine, M.; Tymianski, M.: Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell. Mol. Life Sci.* (2004) 61, 657-668
- ⁴⁸ Tymianski, M.; Charlton, M.P.; Carlen, P.L.; Tator, C.H.: Source Specificity of Early Calcium Neurotoxicity in Cultured Embryonic Spinal Neurons. *J. Neurosci.* (1993) 13, 2085-2104
- ⁴⁹ von Engelhardt, J.; Coserea, I.; Pawlak, V.; Fuchs, E.C.; Köhr, G.; Seeburg, P.H.; Monyer, H.: Excitotoxicity *in vitro* by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology.* (2007) 53, 10-17

- ⁵⁰ Liu, Y.; Wong, T.P.; Aarts, M.; Rooyakkers, A.; Liu, L.; Lai, T.W.; Wu, D.C.; Lu, J.; Tymianski, M.; Craig, A.M.; Wang, Y.T.: NMDA Receptor Subunits Have Different Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Neurosci.* (2007) 27, 2846-2857
- ⁵¹ Tovar, K.R.; Westbrook, G.L.: Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron.* (2002) 34, 255-264
- ⁵² Leeson, P.D.; Iversen, L.L.: The Glycine Site on the NMDA Receptor: Structure-Activity Relationship and Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* (1994) 37, 4053-4067
- ⁵³ Bennett, D.A.; Lehmann, J.; Bernard, P.S.; Liebman, J.M.; Williams, M.; Wood, P.L.; Boast, C.A.; Hutchison, A.J.: CGS 19755: a novel competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist with anticonvulsant, anxiolytic and anti-ischemic properties. *Prog. Clin. Biol. Res.* (1990) 361, 519-524
- ⁵⁴ Morris, G.F.; Bullock, R.; Marshall, S.B.; Marmarou, R.; Maas, A.; Marshall, L.F.: Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury. results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J. Neurosurg.* (1999) 91, 737-743
- ⁵⁵ Daniels, B.A.; Baldrige, W.H.: D-Serine enhancement of NMDA receptor-mediated calcium increases in rat retinal ganglion cells. *J. Neurochem.* (2010) 112, 1180-1189
- ⁵⁶ Stark, H.; Reichert, U.; Graßmann, S.: Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren Teil 2: Therapiekonzepte und neue Rezeptorliganden. *Pharm. unserer Zeit* (2000)
- ⁵⁷ Fray, M.J.; Bull, D.J.; Carr, C.L.; Gautier, E.C.L.; Mowbray, C.E.; Stobie, A.: Structure-Activity Relationship of 1,4-Dihydro-(1*H*,4*H*)-quinoaline-2,3-diones as N-Methyl-D-aspartate (Glycine Site) Receptor Antagonists. 1. Heterocyclic Substituted 5-Alkyl Derivatives. *J. Med. Chem.* (2001) 44, 1951-1962

- ⁵⁸ Dannhardt, G.; Kohl, B.K.: Benzimidazoles as NMDA Glycine-Site Antagonists: Study on the Structural Requirements in 2-Position of the Ligand. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* (2000) 333, 123-129
- ⁵⁹ Jansen, M.; Dannhardt, G.: Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDA receptor for therapeutic interventions. *Eur. J. Med. Chem.* (2003) 38, 661-670
- ⁶⁰ Frank, I.: Dissertation. Synthese von dualen NMDA-Rezeptor-/Dopamin-Rezeptor-Liganden. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main (2005)
- ⁶¹ Bence, A.K.; Roger, D.T.; Worthen, D.R.; Fu, M.; Lettleton, J.M.; Crooks, P.A.: Aminoanthraquinone as Novel Ligands at the Polyamine Binding Site on the N-Methyl-D-aspartate Receptor Complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2621-2623
- ⁶² Mony, L.; Kew, J.N.C.; Gunthorpe, M.J.; Paoletti, P.: Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* (2009) 157, 1301-1317
- ⁶³ Bergeron, R.J.; Weimar, W.R.; Wu, Q.; Kramer Austin Jr., J.; McManis, J.S.: Impact of Polyamine Analogues on the NMDA Receptor. *J. Med. Chem.* (1995) 38, 425-428
- ⁶⁴ Williams, K.; Dawson, V.L., Romana, C.; Dichter, M.A.; Molinoff, P.B.: Characterisation of Polyamine Having Agonist, Antagonist, and Inverse Agonist Effects at the NMDA Receptor. *Neuron.* (1990) 5, 199-208
- ⁶⁵ Berger, M.L.; Schödl, C.; Noe, C.R.: Inverse agonists at the polyamin-sensitive modulatory site of the NMDA receptor: 50-fold increase in potency by insertion of an aromatic ring into an alkanediamine chain. *Eur. J. Med. Chem.* (1998) 33, 3-14
- ⁶⁶ Ransom, R.W.: Polyamine and ifenprodil interactions with the NMDA receptor's glycine site. *Eur. J. Pharmacol.* (1991) 208, 67-71

- ⁶⁷ Han, X.; Tomitori, H.; Mizuno, S.; Higashi, K.; Füll, C.; Fukiwake, T.; Terui, Y.; Leewanich, P.; Nishimura, K.; Toida, T.; Williams, K.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K.: Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Neurochem.* (2008) 107, 1566-1577
- ⁶⁸ Mosley, C.A.; Myers, S.J., Murray, E.E., Santangelo, R.; Tahirovic, Y.A.; Kurtkaya, N., Mullasseril, P.; Yuan, H., Lyuboslavsky, P.; Le, P., Wilson, L.J.; Yepes, M.; Dingeline, R.; Traynelis, S.F.; Liotta, D.C.: Synthesis, structural activity-relationships, and biological evaluation of novel amide-based allosteric binding site antagonists in NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptors. *Bioorg. Med. Chem.*(2009) 17, 6463-6480
- ⁶⁹ Gogas, K.R.: Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2006) 6, 68-74
- ⁷⁰ Gitto, R.; De Luca, L.; Ferro, S.; Citaro, R., De Sarro, G.; Costa, L.; Ciranna, L.; Chimirri, A.: Development of 3-substituted-1H-indole derivatives as NR2B/NMDA receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* (2009) 17, 1640-1647
- ⁷¹ Mosley, C.A.; Acker, T.M.; Hansen, K.B.; Mullasseril, P.; Andersen, K.T.; Le, P.; Vellano, K.M.; Bräuner-Osborne, H.; Liotta, D.C.; Traynelis, S.F.: Quinazolin-4-One Derivatives: A Novel Class of Noncompetitive NR2C/D Subunit-Selective N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* (2010) 53, 5476-5490
- ⁷² Parsons, C.G.; Gruner, R.; Rozental, J.; Millar, J.; Lodge, D.: Patch Clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology.* (1993) 32, 1337-1350
- ⁷³ Shanthanna, H.; Huilgol, M.; Manivackam, V.K.: Early and effective use of ketamine for treatment of phantom limb pain. *Indian J. Anaesth.* (2010) 54, 157-159

- ⁷⁴ Rammes, G.; Danysz, W.; Parsons, C.G.: Pharmacodynamics of Memantine: An Update. *Curr. Neuropharmacol.* (2008) 6, 55-78
- ⁷⁵ Gilling, K.E.; Jatzke, C.; Hechenberger, M.; Parsons, C.G.: Potency, voltage-dependency, agonist concentration-dependency, blocking kinetics and partial untrapping of the uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) channel blocker memantine at human NMDA (GluN1/GluN2A) receptors. *Neuropharmacology.* (2009) 56, 866-875
- ⁷⁶ Plazas, P.V.; Savino, J.; Kracun, S.; Gomez-Casati, M.E.; Katz, E.; Parsons, C.G.; Millar, N.S.; Elgoyhen, A.B.: Inhibition of the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic cholinergic receptor by neramexane, an open channel blocker of N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* (2007) 566, 11-19
- ⁷⁷ Choi, D.: Neuroprotective agents and cerebral ischemia. *Trends Neurosci.* (1998) 21, 363
- ⁷⁸ Mott, D.D.; Doherty, J.J.; Zhang, S.; Washburn, M.S.; Fendley, M.J.; Lyuboslasky, P.; Traynelis, S.F.; Dingline, R.: Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat. Neurosci.* (1998) 1, 659-667
- ⁷⁹ Baranano, D.E.; Ferris, C.D.; Snyder, S.H.: Atypical neural messenger. *Trends Neurosci.* (2001) 24, 99-106
- ⁸⁰ Madry, C.; Mesic, I.; Betz, H.; Laube, B.: The N-Terminal Domains of both NR1 and NR2 Subunits Determine Allosteric Zn^{2+} Inhibition and Glycine Affinity of N-Methyl-D-aspartate Receptors. *Mol. Pharmacol.* (2007) 72, 1535-1544
- ⁸¹ Stroebel, D.; Carvalho, S.; Paoletti, P.: Functional evidence for a twisted conformation of the NMDA receptor GluN2A subunit N-terminal domain. *Neuropharmacology.* (2010) 1-8
- ⁸² Omerovic, A.; Chen, S.-J.; Leonard, J.P.; Kelso, S.R.: Subunit-Specific Redox Modulation Of NMDA Receptors Expressed In *Xenopus* Oocytes. *J. of Receptor & Signal Transduction Research.* (1995) 15, 811-827

- ⁸³ Choi, Y.-B.; Lipton, S.A.: Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell. Mol. Life Sci.*(2000) 57, 1535-1541
- ⁸⁴ Sucher, N.J.; Lipton, S.A.: Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: regulation by oxidized glutathione. *J. Neurosci. Res.* (1991) 30, 582-591
- ⁸⁵ Tang, L.H.; Aizenman, E.: Allosteric modulation of the NMDA receptor by dihydrolipoic and lipoic acid in rat cortical neurons in vitro. *Neuron.* (1993) 11, 857-863
- ⁸⁶ Anderson, J.M.: Cell signaling: MAGUK magic. *Curr. Biol.* (1996) 6, 382-384
- ⁸⁷ Bach, A.; Chi, C.N.; Olsen, T.B.; Pederson, S.W.; Roder, M.U.; Pang, G.F.; Clausen, R.P.; Jemth, P.; Stromgaard, K.: Modified Peptides as Potent Inhibitors of the Postsynaptic Density-95/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Interaction. *J. Med. Chem.*(2008) 51, 6450-6459
- ⁸⁸ Fan, J.; Cowan, C.M.; Zhang, L.Y.J.; Hayden, M.R.; Raymond, L.A.: Interactions of Postsynaptic Density Protein-95 with NMDA Receptors Influences Excitotoxicity in the Yeast Artificial Chromosome Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* (2009) 29, 10928-10938
- ⁸⁹ Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Bessho, S.; Arundine, M.; Gurd, J.W.; Wang, Y.T.; Salter, M.W.; Tymianski, M.: Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA-receptor-PSD-95 protein interactions. *Science.*(2002) 298, 846-850
- ⁹⁰ Cui, H.; Hayashi, A.; Sun, H.S.; Belmares, M.P.; Cobey, C.; Phan, T.; Schweizer, J.; Salter, M.W.; Wang, Y.T.; Tasker, R.A.; Garman, D.; Rabinowitz, J.; Lu, P.S.; Tymianski, M.: PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J. Neurosci.* (2007). 27, 9901-9915
- ⁹¹ Aarts, M.M.; Tymianski, M.: Peptide action in stroke therapy. *Exp. Opin. Biol. Ther.* (2003) 3, 1093-1104

- ⁹² Martin, H.G.S.; Wang, Y.T.: Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. *Cell.* (2010) 140, 174-176
- ⁹³ Statistisches Bundesamt: Sterbefälle insgesamt 2008 nach den 10 häufigsten Todesursachen der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems.* (2010)
- ⁹⁴ Dirnagel, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M.A.: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* (1999) 22, 391-397
- ⁹⁵ Yamaguchi, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Saito, I.; Shinohara, Y.; Asano, T.; Yasuhara, H.: Ebselen in Acute Ischemic Stroke - A Placebo-Controlled, Double-blind Clinical Trial. *Stroke.* (1998) 29, 12-17
- ⁹⁶ Higashi, Y.; Jitsuiki, D.; Chayama, K.; Yoshizumi, M.: Edaravone (3-Methyl-1-Phenyl-2-Pyrazolin-5-one), A Novel Free Radical Scavenger, for Treatment of Cardiovascular Diseases. *Recent Pat. Cardiovasc. Disc.* (2006) 1, 85-93
- ⁹⁷ Braun, J.S.; Prass, K.; Dirnagel, U.; Meisel, A.; Meisel, C.: Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. *Exp. Neurol.* (2007) 206, 183-191
- ⁹⁸ Ruscher, K.; Rzczinski, S.; Thein, E.; Freyer, D.; Victorov, I.V.; Lam, T.T.; Dirnagel, U.: Neuroprotective effects of the beta-carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. *Neuropharmacol.* (2007) 52, 1488-1495
- ⁹⁹ Isaev, N.K.; Stelmashook, E.V.; Dirnagel, U.; Andreeva, N.A.; Manuhova, L.; Vorobjen, V.S.; Sharonova, I.N.; Skrebitzky, V.G.; Victorov, I.V.; Katchanov, J.; Weih, M.; Zorov, D.B.: Neuroprotective Effects Of The Antifungal Drug Clotrimazol. *Neurosci.* (2002) 113, 47-53
- ¹⁰⁰ Prass, K.; Scharff, A.; Ruscher, K.; Löwl, D.; Muselmann, C.; Victorov, I.; Kapinya, K.; Dirnagel, U.; Meisel, A.: Hypoxia-Induced Stroke Tolerance in the Mouse Is Mediated by Erythropoietin. *Stroke.* (2003) 34, 1981-1986

- ¹⁰¹ Block, F.; Kosinski, C.M.: Glutamatantagonisten in der Neurologie. *Nervenarzt.* (2001) 72, 393-405
- ¹⁰² Köhling, R.: Pathomechanismen der Epilepsie. *Epileptol.* (2007) 20, 1-14
- ¹⁰³ Moshe, S.L.: Mechanisms of action of anticonvulsant agents. *Neurology.* (2000) 55, 32-40
- ¹⁰⁴ Dannhardt, G.; Kiefer, W.: Antiepileptika - Wirkprinzipien und strukturelle Parameter. *Pharm. Unserer Zeit.* (2007) 4, 270-281
- ¹⁰⁵ Stefan, H.; Feuerstein, T.J.: Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol. & Therapeutics.* (2007) 113, 165-183
- ¹⁰⁶ Dannhardt, G.; Kiefer, W.: Neue Antiepileptika in der Entwicklung. *Pharm. Unserer Zeit.* (2007) 4, 306-310
- ¹⁰⁷ Aujla, P.K.; Fetell, M.R.; Jensen, F.E.: Talampanel suppresses the acute and chronic effects of seizures in a rodent neonatal seizure model. *Epilepsia.* (2009) 50, 694-701
- ¹⁰⁸ Bagetta, V.; Ghiglieri, V.; Sgobio, C.; Calabresi, P.; Picconi, B.: Synaptic dysfunction in Parkinson`s disease. *Biochem. Soc. Trans.* (2010) 38, 493-497
- ¹⁰⁹ Büeler, H.: Die Parkinson-Krankheit. *Pharm. Unserer Zeit.* (2006) 3, 198-203
- ¹¹⁰ Rodriguez, M.C.; Obeso, J.A.; Olanow, C.W.: Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson`s disease: a target for neuroprotection. *Ann. Neurol.* (1998) 44, 175-188
- ¹¹¹ Böckler, F.: Rezeptor-vermittelte Parkinson-Therapeutika. *Pharm. Unserer Zeit.* (2006). 3, 204-216
- ¹¹² Litvinenko, I.V.; Odinak, M.M.; Mogil`naya, V.I.; Perstev, S.V.: Use of Memantine (akatinol) for the Correction of Cognitive Impairments in Parkinson`s Disease Complicated by Dementia. *Neurosci. Behav. Physiol.* (2010) 40, 149-155

- ¹¹³ Nash, J.E.; Fox, S.H.; Henry, B.; Hill, M.P.; Peggs, D.; McGuire, S.; Maneuf, Y.; Hille, C.; Brotchie, J.M.; Crossmann, A.R.: Antiparkinsonian actions of ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson`s disease. *Exp. Neurol.*(2000) 165, 136-142
- ¹¹⁴ Petralia, R.S.; Al-Hallaq, R.A.; Wenthold, R.J.: Trafficking and Targeting of NMDA Receptors. *Biology of the NMDA Receptor: CRC Press Frontiers in Neuroscience* (2009) 1-51
- ¹¹⁵ Heneka, M.T.; O`Banion, M.K.; Terwel, D.; Kummer, M.P.: Neuroinflammatory processes in Alzheimer`s disease. *J. Neural. Transm.* (2010) 117, 919-947
- ¹¹⁶ Selkoe, D.J.: Alzheimer`s Disease: Genes, Proteins and Therapy. *Physiol. Rev.* (2001) 81, 741-766
- ¹¹⁷ Alzheimer`s Disease Is a Synaptic Failure. *Science.*(2002) 298, 789-791
- ¹¹⁸ Goto, Y.; Niidome, T.; Akaike, A.; Kihara, T.; Sugimoto, H.: Amyloid beta-peptide preconditioning reduces glutamate-induced neurotoxicity by promoting endocytosis of NMDAR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006) 351, 259-265
- ¹¹⁹ Hyund, M.; Scott, H.; Dodd, P.: Differential expression of N-Methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer`s disease. *J. Neurochem.* (2004) 90, 913-919
- ¹²⁰ Hynd, M.R.; Scott, H.L.; Dodd, P.R.: Selective loss of NMDAR NR1 subunit isoforms in Alzheimer`s disease. *J. Neurochem.* (2004) 89, 240-247
- ¹²¹ Liu, H-P.; Lin, W.-Y.; Liu, S.-H.; Wang, W.-F.; Tsai, C.-H.; Wu, B.-T.; Wang, C.-K.; Tsai, F.-J.: Genetic Variation in N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit NR3A but not NR3B Influences Susceptibility to Alzheimer`s Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* (2009) 28, 521-527
- ¹²² Hynd, M.R.; Scott, H.L.; Dodd, P.R.: Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer`s disease. *Neurochem. Int.* (2004). 45, 583-595

- ¹²³ Jain, K.K.: Evaluation of memantine for neuroprotection in dementia. *Expert Opin. Investig. Drugs.* (2000) 9, 1397-1406
- ¹²⁴ Perry, J.J.; Shin, D.S.; Tainer, J.A.: Amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2010) 685, 9-20
- ¹²⁵ Bogaert, E.; d`Ydewalle, C.; Van den Bosch, L.: Amyotrophic Lateral Sclerosis and Excitotoxicity: From Pathological Mechanism to Therapeutic Target. *CNS & Neurolog. Disord. - Drug Targets.* (2010) 9, 297-304
- ¹²⁶ Doble, A.: The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy. *Pharmacol. Ther.* (1999) 81, 163-221
- ¹²⁷ Miller, R.G.; Mitchell, J.D.; Lyon, M.; Moore, D.H.: Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ motor neuron disease (MND). *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* (2003) 4, 191-206
- ¹²⁸ Pascuzzi, R.M.; Shefner, J.; Chappell, A.S.; Bjerke, J.S.; Tamura, R.; Chaudhry, V.; Clawson, L.; Haas, L.; Rothstein, J.D.A.: phase II trial of riluzole in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* (2010) 11, 266-271
- ¹²⁹ Andre, V.M.; Cepeda, C.; Levine, M.S.: Dopamine and glutamate in Huntington`s disease: A balancing act. *CNS Neurosci. Ther.* (2010) 16, 163-178
- ¹³⁰ Fan, M.M.; Raymond, L.A.: N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington`s disease. *Prog. Neurobiol.* (2007) 81, 272-293
- ¹³¹ Kaul, M.; Lipton, S.A.: Signaling pathways to neuronal damage and apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-associated dementia: chemokine receptors, excitotoxicity, and beyond. *J. Neurovirol.* (2004) 10, Suppl 1, 97-101
- ¹³² Kowal, C.; DeGiorgio, L.A.; Lee, J.Y.; Edgar, M.A.; Huerta, P.T.; Volpe, B.T.; Diamond, B.: Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *PNAS.* (2006) 103, 19854-19859

- ¹³³ Kulm, A.; Müller, J.; Schatton, T.; Stark, H.: Neuropathischer Schmerz - Klassifizierungen und Behandlungsoptionen. *Pharmaz. Z.* 2004, 42
- ¹³⁴ Chen, Z.; Muscoli, C.; Doyle, T.; Bryant, L.; Cuzzocrea, S.; Mollace, V.; Mastroianni, R.; Masini, E.; Salvemini, D.: NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamateric pathway during nociceptive processing. *Pain.* (2010) 149, 100-106
- ¹³⁵ Polli, J.W.; Baughman, T.M.; Humphreys, J.E.; Jordan, K.H.; Mote, A.L.; Webster, L.O.; Barnaby, R.J.; Vitulli, G.; Bertolotti, L.; Read, K.D.; Serabjit-Singh, C.J.: The Systemic Exposure Og An N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Is Limited In Mice By The P-Glycoprotein And Breast Cancer Resistance Protein Efflux Transporters. *DMD* (2004) 32, 722-726
- ¹³⁶ Rang, H.P.; Urban, L.: New molecules in analgesia. *Br. J. Anaesth.* (1995) 75, 145-156
- ¹³⁷ Iavarone, L.; Hoke, J.F.; Bottacini, M.; Barnaby, R.; Preston, G.C.: First Time in Human for GV196771: Interspecies Scaling Applied on Dose Selection. *J. Clin. Pharmacol.* (1999) 39, 560-566
- ¹³⁸ Wallace, M.S.; Rowbotham, M.C.; Katz, N.P.; Dworkin, R.H.; Dotson, R.M.; Galer, B.S.; Rauck, R.L.; Backonja, M.M.; Quessy, S.N.; Meisner, P.D.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a glycine antagonist in neurophatic pain. *Neurology.* (2002) 59, 1694-1700
- ¹³⁹ Polli, J.W.; Baughmann, T.M.; Humphreys, J.E.; Barnaby, R.J.; Vitulli, G.; Bertolotti, L.; Read, K.D.; Serabjit-Singh, C.J.: The Oral Bioavailability of an NMDA Receptor Antagonist is Limited by the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), *The AAPS Journal* (2003), 5
- ¹⁴⁰ Bleakman, D.; Alt, A.; Nisenbaum, E.S.: Glutamate receptors and pain. *Sem. Cell & Devel. Biol.* (2006) 17, 592-604
- ¹⁴¹ Goff, D.C.; Cather, C.; Gottlieb, J.D.; Evins, A.E.; Walsh, J.; Raeke, L.; Otto, M.W.; Schoenfeld, D.; Green, M.F.: Once-weekly D-Cycloserine effects on

negative symptoms and cognition in schizophrenia: an exploratory study. *Schizophr. Res.* (2008) 106, 320-327

¹⁴² Tsai, G.E.; Lin, P.Y.: Strategies to enhance N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in schizophrenia, a clinical review and meta-analysis. *Curr. Pharm. Des.* (2010) 16, 522-537

¹⁴³ Kemp, J.A.; Leeson, P.D.: The glycine site of the NMDA receptor - five years on. *TiPS.* (1993) 14, 20-25

¹⁴⁴ Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.; Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (2008) 9. Aufl., 3-804-71952-X

¹⁴⁵ Jansen, M. Dissertation, Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors Synthese, Analytik, pharmakologische Testung, Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (2001)

¹⁴⁶ Jansen, M.; Potschka, H.; Brandt, C.; Löscher, W.; Dannhardt, G.: Hydantoin-Substituted 4,6-Dichlorindole-2-carboxylic Acids as Ligands with High Affinity for the Glycine Binding Site of the NMDA Receptor. *J. Med. Chem.* (2003) 46, 64-73

¹⁴⁷ Jansen, M.; Dannhardt, G.: Variation of acidic functions at position 2 and substitution at position 4,5 and 6 of the indole moiety and their effect on NMDA-glycine site affinity. *Eur. J. Med. Chem.* (2003) 38, 855-865

¹⁴⁸ Challis, B.C.; Butler, A.R.: The Chemistry of the Amino Group. New York: Wiley (1968) 305-320

¹⁴⁹ Beyer; Walter.: Lehrbuch der Organischen Chemie, 23. überarb. und aktualisierte Aufl: S.Hirzel Verlag (1998)

¹⁵⁰ Hellwich, K.-H.: Stereochemie-Grundbegriffe. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag (2002) ISBN 3-540-42347-8

- ¹⁵¹ Friebolin, H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co KGaA (2006) 3-527-31571-3
- ¹⁵² Ockenden, D.W.; Schofield, K.: Indoles. Part V. The Fischer Cyclisation of Some meta-Substituted Arylhydrazones. *J. Chem. Soc.* (1957) 3175-3180
- ¹⁵³ Blomquist, A.T.: The Chemistry of Indoles. New York: Academic Press (1970). 71-107554
- ¹⁵⁴ Becker, H. G.: Organikum. Weinheim: Wiley-VCH (1999) 3-527-29719-7
- ¹⁵⁵ Sim M.M.; Ganesan A.: Solution-Phase Synthesis of a Combinatorial Thiohydantoin Library. *J. Org. Chem.* (1997) 62, 3230-3235
- ¹⁵⁶ Zhu, J.; Bienayme: Multicomponent Reactions. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA (2005)
- ¹⁵⁷ Hantzsch, A.: Justus Liebigs Annalen der Chemie. (1882) 215, 1-82
- ¹⁵⁸ Bucherer H.T.; Fischbeck H.T.: *J. Prakt. Chem.* (1934) 140, 151
- ¹⁵⁹ Montagne, C.; Shipman, M.: Modified Bucherer-Bergs Reaction for the One-Pot-Synthesis of 5,5'-Disubstituted Hydantoins from Nitriles and Organometallic Reagents. *Synlett.* (2006) 2203-2206
- ¹⁶⁰ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.: Organic Chemistry. Oxford University Press (2001) 978-0-19-850346-0
- ¹⁶¹ Lwowski, W.: Nitrenes and the Decomposition of Carbonylazides. *Angew. Chem. internat. Edit.* (1967) 6, 897-1012
- ¹⁶² Ninomya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S.: Phosphorus in organic Synthesis-VII, Diphenylphosporazidate (DPPA). A new convenient reagent for a modified Curtius reaction. *Tetrahedron.* (1974) 30, 2151-2157
- ¹⁶³ Fink, B E.; Vite, G D.; Mastalerz, H.; Kadow, J.F.; Kim, S.H.; Leavitt, K.J.; Du, K.; Crews, D.; Wong, T.W.; Hunt, J.T.; Vyas, D.M.; Tokarski, J.S.: New dual

inhibitors of EGFR and HER2 protein tyrosin kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. (2005) 15, 1429-1433

¹⁶⁴ Hartmann, J.S.; Miller, J.M.: Adducts of the Mixed Trihalides of Boron. *Advances in Inorganic Chemistry*. (1978) 21, 147-177

¹⁶⁵ Sessler, J.L.; Johnson, M.R.; Creager, S.E.; Fettinger, J.C.: Synthesis and Characterisation of Quinone-Substituted Octaalkyl Porphyrin Monomers and Dimers. *Journal of the American Chemical Society*. (1990) 112, 9310-9329

¹⁶⁶ Pesquet, A.; Daich, A.; Van Hijfte, L.: General and Versatile Entry to 4,5-Fused Polycyclic Imidazolones Systems. Use of the Tandem Transposition/-Cyclization of N-Acyliminium Species. *J. Org. Chem.* (2006) 71, 5303-5311

¹⁶⁷ Cortes, S.; Kohn, H.: Selective Reduction of 3-Substituted Hydantoins to 4-Hydroxy-2-imidazolidinones and Vicinal Diamines. *J. Org. Chem.* (1983) 48, 2246-2254

¹⁶⁸ Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R.D.: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.* (1996) 61, 3849-3862

¹⁶⁹ Kim, T.H.; Lee, G.J.: Regiocontrolled Cyclisation Reaction of N-(2-Hydroxyethyl)ureas by Transfer of Activation: One-Pot Synthesis of 2-Imidazolidinones. *J. Org. Chem.* (1999) 64, 2941-2943

¹⁷⁰ Brown, H.C.; Helm, P.: Selective Reductions. XVIII. The Fast Reaction of Primary, Secondary, and Tertiary Amides with Diborane. A Simple, Convenient Procedure for the Conversion of Amides to the Corresponding Amines. *J. Org. Chem.* (1973) 38, 912-916

¹⁷¹ Shetty, H.U.; Nelson, W.L.: Chemical and Stereochemical Aspects of Propranolol Metabolism. Diastomeric 1-(1-Hydroxy-2-propylamino)-3-(1-naphthoxy)-2-propranolols Produced by Rat Liver Microsomal w-Hydroxylation. *J. Med.Chem.* (1986) 29, 2004-2008

- ¹⁷² Batovska, D.; Parushev, S.; Stamboliyska, B.; Tsvetkova, I.; Ninova, M.; Najdenski, H.: Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur. J. Med. Chem.* (2009) 44, 2211-2218
- ¹⁷³ Kazzouli, S.E.; Lewin, N.E.; Blumberg, P.M.; Marquez, V.E.: Conformationally Constrained Analogues of Diacylglycerol. 30. An Investigation of Diacylglycerol-lactones Containing Heteroaryl Groups Reveals Compounds with High Selectivity for Ras Guanyl Nucleoside-Releasing Proteins. *J. Med. Chem.* (2008) 51, 5371-5386
- ¹⁷⁴ Thenmozhiyal, J. C.; Wong, P. T.-H.; Chui, W.-K.: Anticonvulsant Activity of Phenylenehydantoins: A Structure-Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* (2004) 47, 1527-1535
- ¹⁷⁵ Teng, X.; Degterev, A.; Jagtap, P.; Xing, X.; Choi, S.; Denu, R.; Yuan, J.; Cuny, G.D.: Structure-activity relationship study of novel necroptosis inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2005) 15, 5039-5044
- ¹⁷⁶ Augustine, J.K.; Naik, Y.A.; Mandal, A.B.; Chowdappa, N.; Praveen, V.B.: gem-Dibromomethylarenes: A Convenient Substitute for Noncommercial Aldehyds in the Knoevenagel-Doebner Reaction for the Synthesis of α,β -Unsaturated Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* (2007) 72, 9854-9856
- ¹⁷⁷ Tan, S.-F.; Au-Lung, P.-L.; Lee, L.-T.: *Z-E* Isomerism of 5-Cyclohexylmethylenehydantoins. *J. Phys. Org. Chem.* (1992) 5, 795-802
- ¹⁷⁸ Tan, S.-F.; Ang, K.-P.; Fong, Y.-F.: (*Z*)- and (*E*)-5-Arylmethylenehydantoins: Spectroscopic Properties and Configuration Assignment. *J. Chem. Soc. Perkin Transition.* (1986) 2, 1941-1944
- ¹⁷⁹ Lima, L.M.; Barreiro, E.J.: Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr. Med. Chem.* (2005) 12, 23-49

- ¹⁸⁰ Summers, J.B.; Mazdiyasni, H.; Holms, J.H.; Ratajczyk, J.D.; Dyer, R.D.: Hydroxamic Acid Inhibitors of 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* (1987) 30, 574-580
- ¹⁸¹ Clemmensen, E.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (1913) 46, 1837-1843
- ¹⁸² Kumar, R.; Lown, J.W.: Design, synthesis and in vitro cytotoxic studies of novel bis-pyrrolo [2,1][1,4]benzodiazepinepyrrole and imidazole polyamide conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* (2005) 40, 641-654
- ¹⁸³ Chan L.C.; Cox B.G.: Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings. *J. Org. Chem.* (2007) 72, 8863-8869.
- ¹⁸⁴ Bylund, D.B.; Toews, M.L. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* (1993) L421-L429
- ¹⁸⁵ Heusler, P.; Palmer, C.; Tardif, S.; Bernois, S.; Colpaert, F.C.; Cussac, D.: [(3)H]-F13640, a novel, selective and high efficacy serotonin 5-HT (1A) receptor agonist radioligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (2010) 383, 321-330
- ¹⁸⁶ Peet, N.P.; Lentz, N.L.; Meng, E.C.; Dudley, M.W.; Ogden, A.M.L.; Demeter, D.A.; Weintraub, H.J.R.; Bey, P.: 4-[(Carboxymethyl)oxy]-and 4-{Carboxymethyl}amino]-5,7-dichlorquinoline-2-carboxylic Acid: New Antagonists of the Strychnine-Insensitive Glycine Binding Site on the N-Methyl-D-aspartate Receptor Complex. *J. Med. Chem.* (1990) 33, 3130-3132
- ¹⁸⁷ King, F.D.; Dabbs, S.; Bermudez, J.; Sanger, G.J.: 3-(2-Carboxyindol-3-yl)propionic Acid Derivatives: Antagonists of the Strychnine-Insensitive Glycine Receptor Associated with the N-Methyl-D-aspartate Receptor Complex. *J. Med. Chem.* (1990) 33, 2944-2946
- ¹⁸⁸ Baron, B.M.; Harrison, B.L.; Kehne, J.H.; Schmidt, C.J.; Van Giersbergen, P.L.M.; White, H.S.; Siegel, B.W.; Senyah, Y.; McCloskey, T.C.; Fadayel, G.M.; Taylor, V.L.; Murawsky, M.K.; Nyce, P.; Salituro, F.G.: Pharmacological

characterization of MDL105,519, an NMDA receptor glycine site antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* (1997) 323, 181-192

¹⁸⁹ Siegel, B.W.; Baron, B.M.; Harrison, B.L.; Gross, R.S.; Hawes, C.; Towers, P.: [³H]MDL 105,519 a high affinity radioligand for the NMDA receptor-associated glycine recognition site. *Soc. Neurosci.* (1995) 21, 436

¹⁹⁰ Höfner, G.; Wanner, K.Th.: Kompetitive Bindungsstudien leicht gemacht-mit nativem Marker und massenspektroskopischer Quantifizierung. *Angew. Chem.* (2003) 115, 5393-5395

¹⁹¹ Wharton, J.; Polak, J.: *Receptor Autoradiography- Principles and Practice.* Oxford: Oxford Science Publication. ISBN 0-19-262209-9

¹⁹² Höfner, G.; Wanner, K.Th.: Characterisation of [³H]MK-801 Binding and its cooperative modulation by pig brain membranes. *J. Rec. Sig Trans Res.* (1996) 16, 297-313

¹⁹³ Marvizon, J.C.; Baudry, M.: [³H]Dizozilpine Association Kinetics Distinguish Stimulatory and Inhibitory Polyamine Sites of N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *J. Neurochem.* (1994) 63, 963-971

¹⁹⁴ Baron, B.M.; Siegel, B.W.; Slone, A.L.; Harrison, B.L.; Palfreyman, M.G.; Hurt, S.D.: [³H]5,7-Dichlorkynurenin acid, a novel radioligand labels NMDA receptor-associated glycine binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* (1991) 206, 149-154

¹⁹⁵ Wan, P.; Zhang, Y.P.; Yan, J.; Xu, Y.X.; Wang, H.Q.; Yang, R.; Zhu, C.Q.: Glutamate enhances the surface distribution and release of Munc18 in cerebral cortical neurons. *Neurosci. Bull.* (2010)26, 273-281

¹⁹⁶ Liu, L.; Piao, Y.S.; Wang, W.; Chen, L.; Wei, L.F.; Yang, H.; Lu, D.H.: Research on distribution and expression of NMDA receptors and parvalbumin-positive neurons in intractable epilepsy-related focal cortical dysplasia. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* (2008) 37, 16-20

¹⁹⁷ Bradford, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* (1976) 72, 248-254

¹⁹⁸ Prism, 3.03 GraphPad. GraphPad Software Inc. La Jolla, CA 92037, USA

¹⁹⁹ Cheng, Y.-C.; Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* (1973) 22, 3099-3108

²⁰⁰ Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S.: Tetrazolium dyes as tool in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotech. An. Rev.* (2005) 11, 127-152

²⁰¹ Scudiero, D.A.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd, M.R.: Evaluation of Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research.* (1988) 48, 4827-4833

²⁰² Paull, K.D.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R.; Parsons, J.L.; Risbood, P.A.; Barbera, W.A.; Sharma, M.N.; Baker, D.C.; Hand, E.; Scudiero, D.C.; Monks, A.; Alley, M.C.; Grote, M.: The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *J. Heteroc. Chem.* (1988) 25, 911-914

²⁰³ Roehm, N.W.; Rodgers, G.H.; Hatfield, S.H.; Glasebrook, A.L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immun. Meth.* (1991) 142, 257-265

²⁰⁴ Vistica, D.T.; Skehan, P.; Scudiero, D.; Monks, A.; Pittman, A.; Boyd, M.R.: Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research.* (1991) 51, 2515-2520

²⁰⁵ Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1999. 3-8047-1616-4

- ²⁰⁶ Abbott, N.J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E.: Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev. Neurosci.* (2006) 7, 41-53
- ²⁰⁷ Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J.: Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Disease.* (2010) 37, 13-25
- ²⁰⁸ Juliano, R.L.; Ling, V.: A Surface Glycoprotein Modulation Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* (1976) 455, 152-162
- ²⁰⁹ Rowley, M.; Kulagowski, J.J.; Watt, A.P.; Rathbone, D.; Stevenson, G.I.; Carling, R.W.; Baker, R.; Marshall, G.R.; Kemp, J.A.; Foster, A.C.; Grimwood, S.; Hargreaves, R.; Hurley, C.; Saywell, K.L.; Tricklebank, M.D.; Leeson, P.D.: Effect of Plasma Protein Binding on in Vivo Activity and Brain Penetration of Glycine/NMDA Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* (1997) 40, 4053-4068
- ²¹⁰ Pesai, B.S.; Monahan, A.J.; Carvey, P.M.; Hendey, B.: Blood-brain barrier pathology in Alzheimer`s ans Parkinson`s disease: implication for drug therapy. *Cell Transplant.* (2007) 16, 285-299
- ²¹¹ Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M.: The blood-brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Disease.* (2004) 16, 1-13
- ²¹² Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J.: Experimental and computational approaches to the estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. drug del. rev.* (2001) 46, 3-26
- ²¹³ Clark, D.E.: In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov. Today.* (2003) 8, 927-933
- ²¹⁴ Stolper, G.; Klausner, M.; Sheasgreen, J.; Hayden, P.: Development of an in vitro blood-brain barrier model for brain disposition screening of pharmaceuticals. *The Toxicologist.* (2005) 84, 1254

- ²¹⁵ Rubin, L.L.; Hall, D.E.; Porter, S.; Barbu, K.; Cannon, C.; Horner, H.C.; Janatpour, M.; Liaw, C.W.; Manning, K.; Morales, J.; Tanner, L.I.; Tomaselli, K.J.; Bard, F.: A Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *J. Cell Biol.* (1991) 115, 1725-1735
- ²¹⁶ Seelig, A.; Gottschlich, R.; Devant, R.M.: A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1994) 91, 68-72
- ²¹⁷ Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D.: Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* (1971) 71, 525-616
- ²¹⁸ OECD Guideline for testing of chemicals ; Partition Coefficient (*n*-octanol/water), High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) Method. (1989) 1-11
- ²¹⁹ Dyrssen, D.: Studies on the extraction of metal complexes. IV. The dissociation constants and partition coefficients of 8-quinolol (oxine) and N-nitroso-N-phenylhydroxylamine (cupferron). *Sv. Kem. Tidskr.* (1952) 64, 213-224
- ²²⁰ Application and Theory Guide to pH-Metric pKa and logP Determination. Ltd., Sirius Analytical Instruments. East Sussex, UK (1993)
- ²²¹ Yasuda, M.: Dissociation constants of some carboxylic acids in mixed aqueous solvents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1959) 32, 429-432
- ²²² Shedlovsky, T.; Kay, R.L.: The ionisation constant of acetic acid in water-methanol mixtures at 25 °C from conductance measurements. *J. Amer. Chem. Soc.* (1956) 60, 151-155
- ²²³ Avdeef, A.; Box, K.J.; Comer, J.E.A.; Gilges, M.; Hadley, M.; Hibbert, C.; Patterson, W.; Tam, K.Y.: PH-metric log P 11. pK_a determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1999) 20, 631-641

- ²²⁴ Scherrer, R.A.; Howard, S.M.: Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* (1977) 20, 53-58
- ²²⁵ Rösch, F.; Gründer, G.; Schreckenberger, M.; Dannhardt, G.: Diagnostik von ZNS-Erkrankungen mittels PET bzw. SPECT. *Pharm. Unserer Zeit.* (2005) 34, 474-482
- ²²⁶ Beer, S. www.fz-juelich.de. Zentrum für Elektronik (2010)
- ²²⁷ Moretti, L.; Pentikäinen, O.T.; Settimo, L.; Johnson, M.S.: Model structure of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 explain the molecular recognition og agonist and antagonist ligands. *J. Struct. Biol.* (2004) 145, 205-215
- ²²⁸ Furukawa, H.; Gouaux, E.: Mechanisms of activation, inhibition ans specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The EMBO Journal.* (2003) 22, 2873-2885
- ²²⁹ Heyl, C.: NMDA-Rezeptor-Antagonisten: Synthese und Testung. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (2008)
- ²³⁰ Betzel, T.:Dissertation. Synthese, Evaluierung und ¹⁸F-Markierung von neuen Liganden zur Visualisierung der strychnininsensitiven Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (2010)
- ²³¹ ChemAxon Marvin 5.3.3. ChemAxon Ltd., (1999-2010)
- ²³² Jain, R.K.; di Tamaso, E.; Duda, D.G.; Loeffler, J.S.; Sorensen, A.G.; Batchelor, T.T.: Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* (2007) 8, 610-622
- ²³³ Hanahan, D.; Folkman, J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* (1996) 86, 353-364
- ²³⁴ Perioli, L.; Ambrogi, V.; Bernardini, C.; Grandolini, G.; Ricci, M.; Giovagnoli, S.; Rossi, C.: Potential prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory agents for targeted drug delivery to the CNS. *Eur. J. Med. Chem.* (2004) 39, 715-727

²³⁵ Bodor, N.; Buchwald, P.: Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1999) 36, 229-254