



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Synthese neuer 5-Cycloaminopyridazin-3(2*H*)-one mit
4-Carbaldehydoxim-Funktion als potentielle Inhibitoren der humanen
SSAO

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Patrick Woda
Matrikel-Nummer:	0204968
Studienrichtung:	A 449 Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. pharm. Dr. Norbert Haider
Wien, im	März 2009

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien im Zeitraum von September 2007 bis Jänner 2008 durchgeführt.

Ganz speziell bedanken möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. pharm. Dr. Norbert Haider, der mich nicht nur aufgrund seiner ausgezeichneten Betreuung und seiner immensen Erfahrung, sondern vor allem auch durch seine menschlichen Qualitäten während der gesamten Diplomarbeit großartig unterstützt hat.

Auch bei meinen Kolleginnen Mag. pharm. Stephanie Parth und Angelika Ebner möchte ich mich für Ihre Herzlichkeit und Kollegialität bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die mir im Laufe des Studiums zur Seite gestanden sind und auf die ich jederzeit bauen konnte.

Meinen Eltern Elisabeth Nyitrai und Kurt Woda, sowie meiner Großmutter Christine Woda möchte ich ebenso für Ihre Liebe und Ihre Warmherzigkeit danken, wie meinen Geschwistern Kevin und Jenny Woda.

Für die Testungen der hergestellten Verbindungen auf ihre biologische Aktivität danke ich der Firma BIOTIE (Turku/Finnland).

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. EIGENSCHAFTEN, VORKOMMEN UND STRUKTUR VON SEMICARBAZID-SENSITIVEN AMINOXIDASEN (SSAO).....	1
1.2. SUBSTRATE DER SSAO UND DEREN PHYSIOLOGIE	5
1.3. PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE ASPEKTE DER SSAO	7
1.4. INHIBITOREN DER SSAO	10
1.5. ZIELSETZUNG	21
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	22
2.1. SYNTHESE NEUER PYRIDAZINE.....	22
2.1.1. SYNTHESE DER DIMORPHOLINO-VERBINDUNG	23
2.1.2. SYNTHESE DER PYRIDAZIN-3-(2 <i>H</i>)-ON-4-CARBALDEHYDOXIME MIT ORTHO-STÄNDIGEN CYCLISCHEN AMINOSUBSTITUENTEN	26
2.2. CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN VERBINDUNGEN	30
2.3. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER PYRIDAZINON-ALDEHYDOXIME	35
3. EXPERIMENTELLER TEIL.....	36
3.1. ALLGEMEINES	36
3.2. ARBEITSVORSCHRIFTEN	38
3.2.1.: ARBEITSVORSCHRIFTEN ZU ABSCHNITT 2.1.1.	38
3.2.2.: ARBEITSVORSCHRIFTEN ZU ABSCHNITT 2.1.2.	43
4. LITERATUR.....	58
5. ANHANG	62
5.1. SPEKTREN.....	62
5.2. ZUSAMMENFASSUNG	90
5.3. LEBENSLAUF	88

1. EINLEITUNG

1.1. Eigenschaften, Vorkommen und Struktur von Semicarbazid-sensitiven Aminoxidasen (SSAO)

Die Enzymgruppe der Aminoxidasen spielt eine Schlüsselrolle im Metabolismus vieler Mono-, Di- und Polyamine. Sie katalysiert deren oxidative Desaminierung. Sie kann in 2 Hauptgruppen, abhängig von der chemischen Struktur des Co-Faktors, unterteilt werden. Eine dieser Gruppen beinhaltet den Cofaktor Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) und umfasst die Monoaminoxidasen (MAO) A und B sowie die intrazelluläre Form der Polyaminoxidase (PAO). Zur zweiten Hauptgruppe gehören Gewebsenzyme wie die Diaminoxidase (DAO), Lysyloxidase (LO), eine gewebsgebundene Form der SSAO sowie eine im Plasma vorkommende lösliche Form der SSAO, die einen Co-Factor mit einer oder mehreren Carbonylgruppen enthalten. Da alle Enzyme der zweiten Hauptgruppe eine Empfindlichkeit gegenüber Semicarbazid aufweisen (während sie auch in Gegenwart eines MAO-Inhibitors fähig sind, Benzylamin zu Benzaldehyd zu konvertieren), werden sie als Semicarbazid-sensitive Aminoxidasen bezeichnet [1,2].

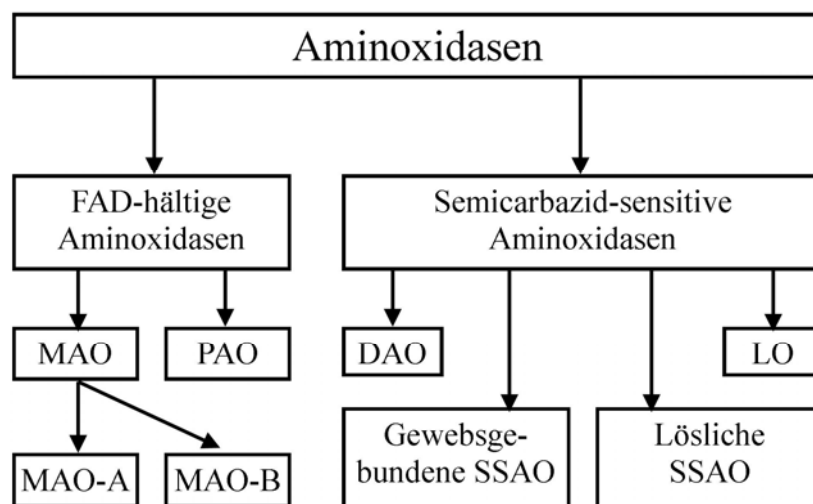


Abb.1 (nach Lit. [3])

Enzyme vom SSAO-Typ finden sich sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen. Sowohl bei Säugetieren als auch im Menschen können sie in praktisch allen Geweben nachgewiesen werden [1]. Sie enthalten ein Kupfer-Ion und

einen Topa-Chinon-(TPQ) Cofaktor in ihrem aktiven Zentrum zur oxidativen Desaminierung von primären Aminen [4]. Humane SSAO ist ein homodimeres Sialoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 170 – 180 kDa (je nach Grad der Glykosylierung). Das Enzym existiert sowohl als lösliches Protein als auch als Typ II Transmembranprotein, das über eine N-terminale Helix an die Zelloberfläche gebunden ist. Die gewebsgebundene Form der SSAO kann durch Loslösen aus der Membran in den Blutstrom übergehen. Die Gesamtstruktur und ihre Faltung ähneln anderen kupferhaltigen Aminoxydassen [5]. Sie besitzen ähnliches kinetisches Verhalten, etwa 25-35% ihrer Sequenz stimmen überein [2], ebenso besitzen alle dieselben Domänen D2, D3 und D4 [5]. Die seit kurzem bekannte 3D-Struktur der SSAO könnte die Entwicklung von hochwirksamen und insbesondere hochspezifischen Hemmstoffen mittels „Rational Drug Design“ erleichtern.

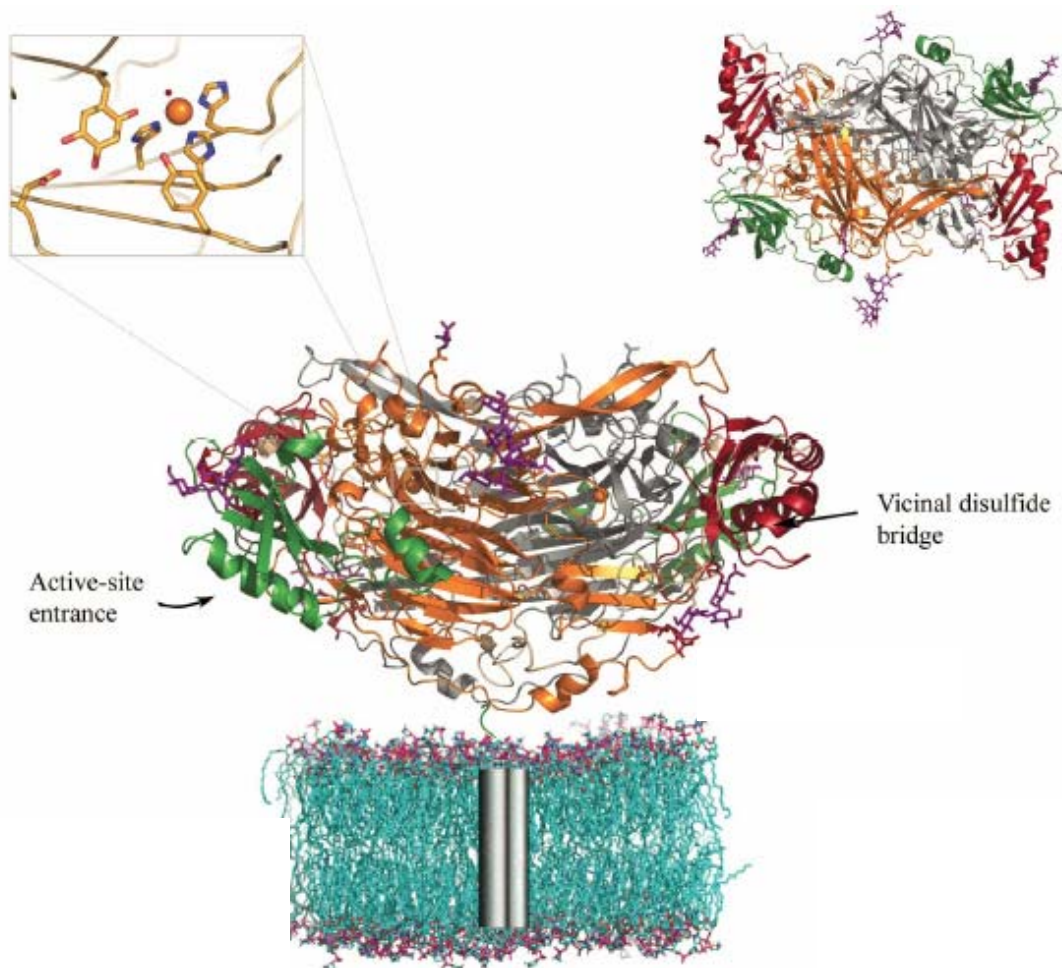


Abb.2 (nach Lit. [5])

Abb. 2 gibt einen Überblick über die 3D-Struktur der SSAO [5]. Domain D2 wird in grün, Domain D3 in rot und Domain D4 in orange (Monomer A) oder grau (Monomer B) gezeigt. Zucker sind stabförmig in violetter Farbe abgebildet. Die Lipiddoppelschicht dient zur Veranschaulichung der vermutlichen Position des Moleküls im Bezug auf die Membran. Die grauen Zylinder repräsentieren dabei die membrangebundenen Helices [5].

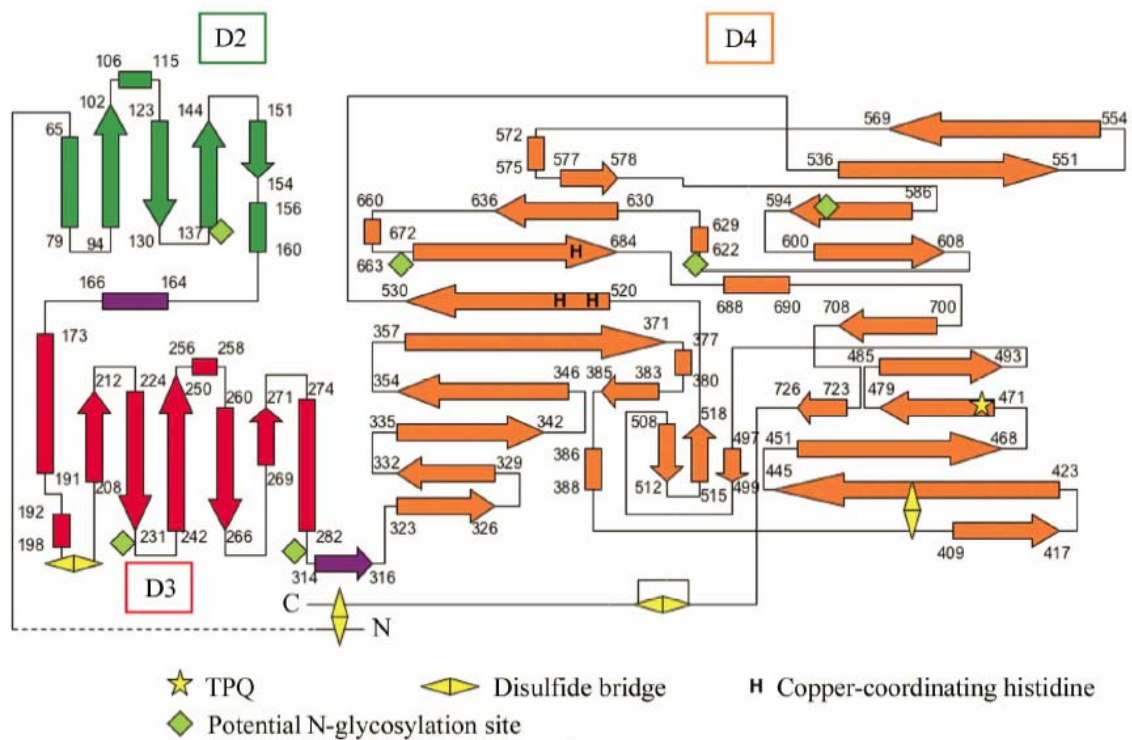


Abb.3 (nach Lit. [5])

Abb. 3 zeigt die Topologie der humanen SSAO. Die Nummern bezeichnen den Beginn und das Ende der Sekundärstrukturelemente, die Farben bezeichnen die Domänen wie in Abb. 1 beschrieben [5].

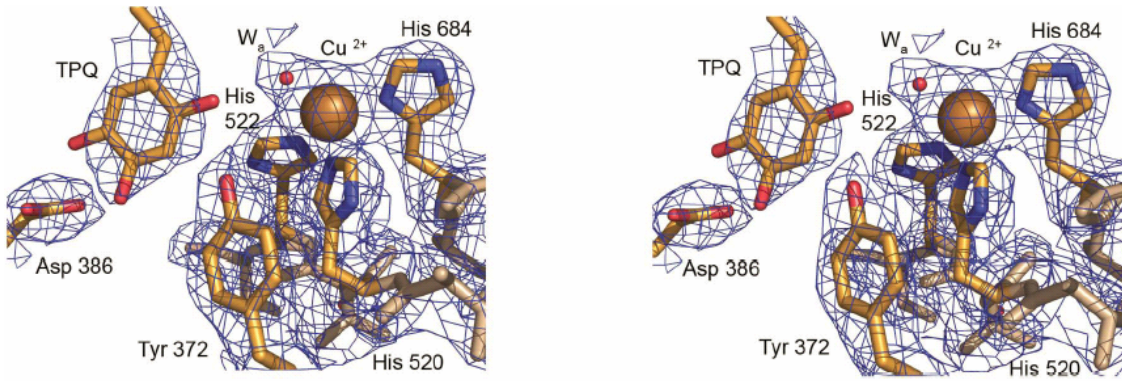
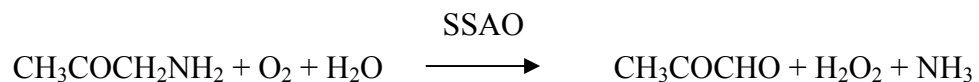


Abb.4 (nach Lit. [5])

Abb. 4 gibt einen Einblick in die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums. Dieses liegt in der Domain D4 und enthält den Topachinon-Cofaktor, sowie die 3 Histidine (His520, His684 und His522), die das Cu^{2+} -Ion räumlich fixieren. Ebenso erkennbar ist die Base des aktiven Zentrums Asp386 [5].

1.2. Substrate der SSAO und deren Physiologie

Die physiologischen Substrate der SSAO sind unbekannt, die aliphatischen Amine Methylamin (MA) und Aminoaceton (AA) wurden als endogene physiologische Substrate identifiziert. Methylamin, das nicht von der MAO deaminiert wird, entsteht aus dem Epinephrin-, Sarcosin- oder Creatin-Katabolismus. Aminoaceton ist ein Produkt des Glycin- und Threonin-Metabolismus [1,2].



Es konnte gezeigt werden, dass Methylamin in unmetabolisierter Form bei gleichzeitiger Hemmung der SSAO keine Zellschäden verursacht und daher selbst relativ untoxisch ist. Das lässt darauf schließen, dass Formaldehyd für die Zelltoxizität verantwortlich sein könnte. Formaldehyd reagiert bekanntlich mit Lysinresten von Proteinen, was irreversible Addukte entstehen lässt, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Ebenso kann es zu „Cross-Linking“ von Proteinen und DNA führen [6].

Das aus Aminoaceton gebildete Methylglyoxal reagiert mit der Guanidinseitenkette von Arginin-, dem ϵ -Aminorest von Lysin- und der Sulfhydrylgruppe von Cysteinresten von Proteinen. Das führt, mit Ausnahme der Bildung des Cystein-Methylglyoxal-Addukts zu einer irreversiblen Bildung von Arginyl-Pyrimidinen, Carboxymethyl-Lysinen und Imidazol-Crosslinks. Solche Reaktionen führen oftmals zu einer Reduktion oder Blockade der Funktion von Enzymen, Rezeptoren oder Träger- und Strukturproteinen [7,8]. Man vermutet daher, dass die gebildeten Metaboliten durch Reaktion von Proteinen diabetische Spätkomplikationen hervorrufen [9].

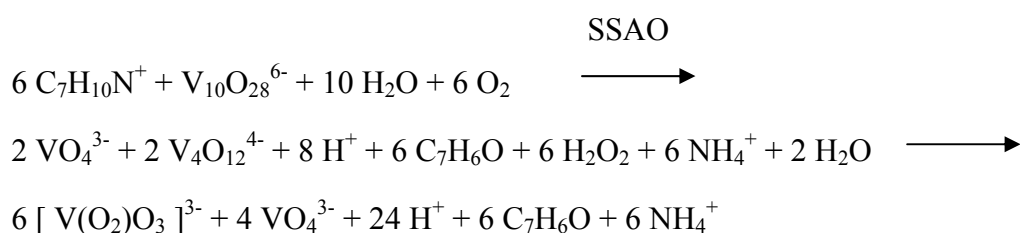
SSAO ist, wie bereits erwähnt, auch gegenüber körperfremden Aminen wie zum Beispiel Benzylamin aktiv [1,2,5,10]. Messungen der SSAO-Aktivität basieren auch auf der Fähigkeit des Enzyms, Benzylamin zu Benzaldehyd, Ammoniak und Wasserstoffperoxid zu metabolisieren.



Aktuelle *in-vivo*-Studien belegen eine Wirksamkeit der Kombination von Benzylamin oder anderen Arylalkylaminen mit Vanadium bei Diabetes Typ I & II. Weiters konnten die Verbindungen 4-Fluorbenzylamin, 3-Fluor-4-methylbenzylamin und 4-Phenylbutylamin als neue potente SSAO-Substrate gefunden werden. Eine hohe Affinität sowohl zu Mäuse- als auch humaner SSAO wurde nachgewiesen [11].

4-Phenylbutylamin besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit der Seitenkette von Lysin, einer endogenen Aminosäure, die mit dem katalytischen Zentrum der humanen SSAO interagiert. Darüber hinaus zeigte 4-Phenylbutylamin auch eine stimulierende Wirkung auf den Glucose-Transport in Maus-Adipocyten [11].

Erst kürzlich wurde ein neues SSAO-Substrat, $(\text{C}_7\text{NH}_{10})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ein Arylalkylamin-Vanadium-Salz, abgeleitet von Benzylamin und Vanadat, synthetisiert. Dieses Substrat dissoziiert *in-vitro* unter physiologischen Bedingungen in verschiedene Anionen und Benzylamin. Das durch die Oxidation durch die SSAO gebildete H_2O_2 reagiert mit den Anionen zu aktiven Peroxovanadaten ($[\text{V}(\text{O}_2)\text{O}_3]^{3-}$), die als Insulinomimetika fungieren [12].



1.3. Physiologische und pathophysiologische Aspekte der SSAO

Obwohl die genaue Funktion der SSAO noch nicht zur Gänze geklärt ist, konnten in den letzten Jahren Anhaltspunkte für folgende Funktionen beschrieben werden:

- Schutz vor exogenen/endogenen Aminen: Durch diese Schutzfunktion können wie bereits erwähnt manchmal auch giftigere Produkte produziert werden [13].
- „Cross-Linking“ von Proteinen durch Formaldehyd. Dies kann eventuell zu Advanced Glycation Endprodukten (AGEs) führen, was bei Diabetespatienten durch ihren Überschuss an Glucose zur Bildung von toxischen Produkten führen kann [6].
- Induktion der Apoptose, wobei Formaldehyd für diese verantwortlich zu sein scheint [14].
- Einfluss auf die Atherogenese über die Bildung von H_2O_2 [9].
- Stimulation des Glucose-Transports in die Zellen über den GLUT4- und den GLUT1-Transporter. Die Bildung von H_2O_2 bewirkt dabei ein vermehrtes Auftreten der Insulinrezeptoren an der Zelloberfläche [15].
- Lymphozytenmigration, wobei vermutlich ein Oberflächenprotein der Lymphozyten für die Reaktion mit der SSAO verantwortlich ist [16].
- Eine Rolle bei der Adipogenese. Während der Adipogenese konnte erhöhte SSAO-Aktivität festgestellt werden [17].

Bei gesunden Erwachsenen beträgt die SSAO-Aktivität zwischen 150-550 mU/l. Sowohl bei Älteren, als auch bei Kindern bis zum 16. Lebensjahr ist die Plasma-SSAO-Aktivität höher [18].

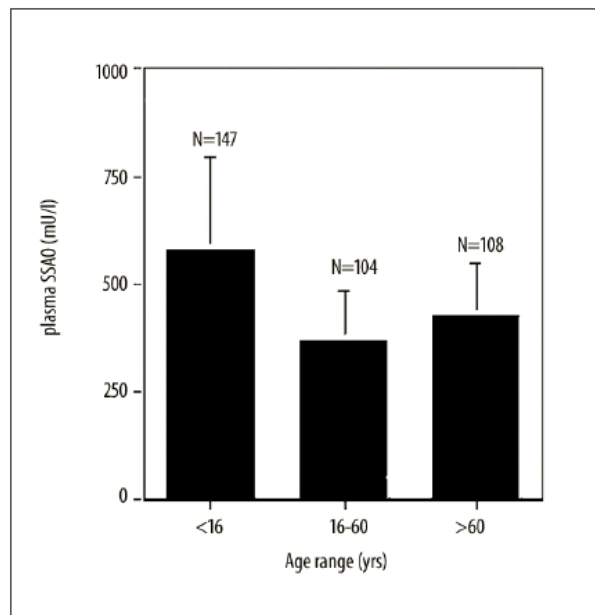


Abb.5 (nach Lit. [18])

Abb. 5 zeigt altersabhängig den Gehalt der Plasma-SSAO im Menschen.

Eine Minderung der Enzymaktivität tritt gelegentlich bei Brustkrebserkrankungen oder bei schweren Verbrennungen infolge einer Hyperproteinämie und reduziertem Kupfer-Serumspiegel auf [1,2]. Auch kann es bei Depressionen [19] und chronischer Niereninsuffizienz [1,18] zu verminderter SSAO-Aktivität kommen.

Die katalytische Serum-SSAO-Aktivität ist nachweislich bei unterschiedlichen Krankheiten erhöht. Zu diesen zählen der insulinabhängige Diabetes Mellitus vom Typ 1 und Typ 2, sowie der juvenile Diabetes. Eine Erhöhung der Serum-SSAO-Aktivität ist auch positiv korreliert mit der Schwere diabetischer Retinopathien, Nephropathien und Neuropathien [9]. Bei Diabetes und Urämie ist das Auftreten einer schweren Atherosklerose relativ früh zu beobachten. Dies stellt den Vorläufer für degenerative Erkrankungen wie Schlaganfall, koronare Herzkrankheit oder Demenz dar. Risikofaktoren wie Übergewicht, Hypercholesterinämie und die Bildung von Plaques korrelieren mit der erhöhten Aktivität der humanen Serum-SSAO. Der negative Einfluss auf atherosklerotische Gefäßveränderungen wird durch die katalysierende Wirkung der SSAO auf die Oxidation von LDL (Low Density Lipoprotein) erklärt. Daher könnte das Auftreten derartiger Komplikationen durch eine Hemmung der SSAO verlangsamt oder sogar verhindert werden [1]. Weiters tritt eine Erhöhung bei kongestiver Herzinsuffizienz, Hirninfarkt, Urämie, Leberzirrhose [20] (siehe Abb. 5) und multipler Sklerose [21] auf.

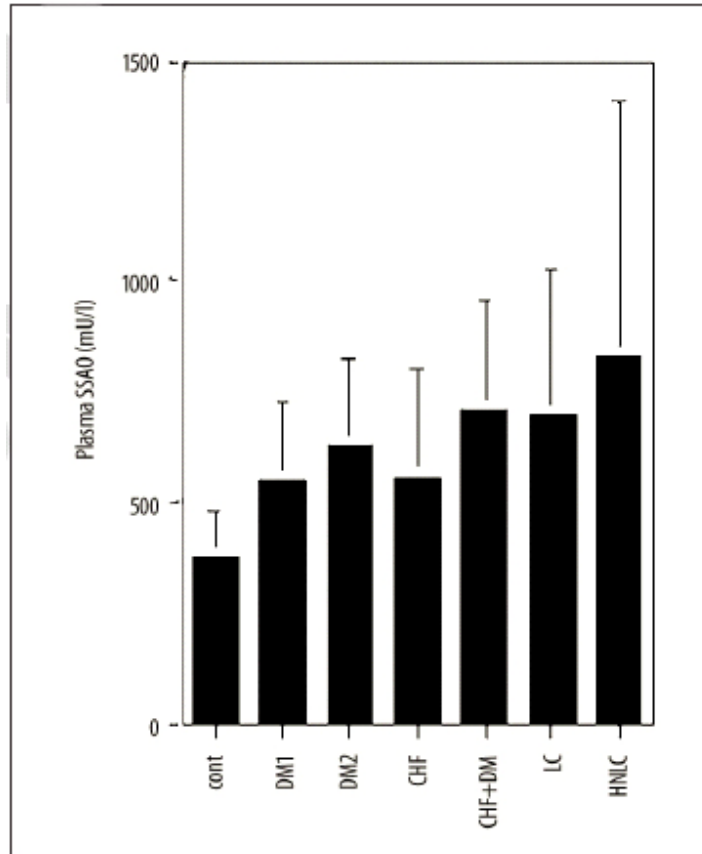


Abb.6 (nach Lit. [18])

Abb.6 zeigt den durchschnittlichen Plasma-SSAO-Spiegel bei Gesunden und verschiedenen Erkrankungen.

cont: Kontrollgruppe

DM1: Diabetes Mellitus Typ 1

DM2: Diabetes Mellitus Typ 2

CHF (+DM): Kongestive Herzinsuffizienz (+Diabetes Mellitus)

LC: Leberzirrhose

HNLC: Hyponatriämische Leberzirrhose

Erweiterte Studien über veränderte SSAO-Konzentrationen bei Patienten können auch im Rahmen der Diagnostik von Erkrankungen von Bedeutung sein. Die SSAO-Aktivität könnte als biochemischer Marker bei der Prüfung auf atherosklerotische Läsionen bei Patienten mit hohem Atheroskleroserisiko oder bei Diabetes-mellitus-Patienten dienen [1].

1.4. Inhibitoren der SSAO

Aufgrund der Beobachtungen über die durch erhöhte SSAO-Aktivität resultierenden Zellschäden beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der präventiven Wirkung von SSAO-Inhibitoren. Bis dato konnten Anforderungen wie hohe Wirksamkeit, Selektivität und geringe Toxizität nicht erfüllt werden. Aus therapeutischer Sicht ist es notwendig, möglichst selektive Inhibitoren zu finden, da die SSAO in einigen Spezies auch biogene Amine wie Tyramin, Tryptamin oder Dopamin, die gleichzeitig Substrate der MAO A und/oder der MAO B sind, metabolisiert. Dort, wo beide Enzymgruppen auftreten, ist eine Differenzierung von besonderer Bedeutung [20].

Es bestehen deutliche Spezies-abhängige Unterschiede zwischen den Enzymsystemen, was in unterschiedlicher Aktivität der bisher getesteten SSAO-Inhibitoren resultiert. Daher können aus Daten anderer Spezies keine zwingenden Rückschlüsse auf die Aktivität im menschlichen Gewebe gezogen werden. Mexiletin ist, um ein Beispiel zu nennen, ein guter Hemmstoff der Ratten- und Schaf-SSAO, es zeigt jedoch wenig bis gar keine Inhibition gegenüber humaner SSAO. Deshalb ist es zwingend notwendig, auch *in-vitro*-Messungen am humanen Enzym durchzuführen, um verlässliche Informationen zu erhalten [1].

Die heute bekannten Inhibitoren der SSAO können in folgende Gruppen unterteilt werden:

- Hydrazinderivate
- Arylalkylamine
- Propenyl- und Propargylamine
- Halogenalkylamine
- Oxazolidinone
- Antidepressiva unterschiedlicher Struktur

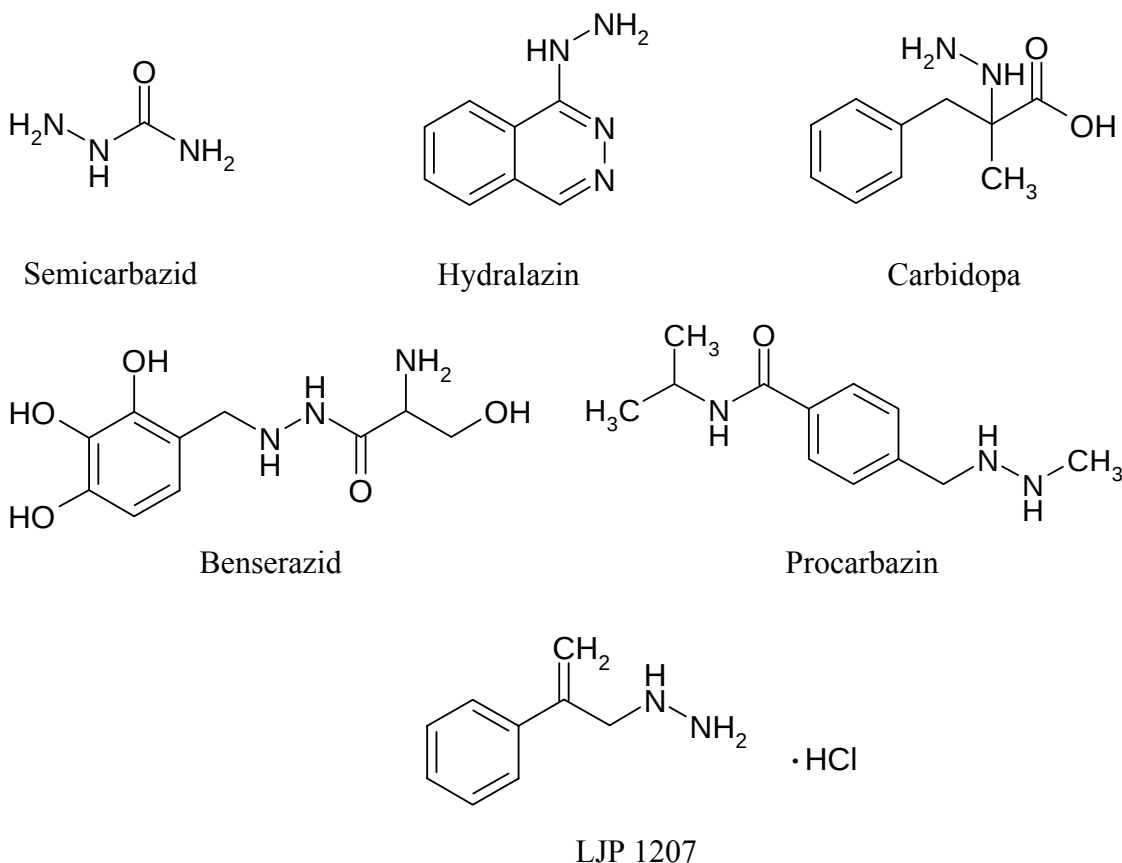
Hydrazinderivate

Semicarbazid war der erste – relativ schwache – Hemmstoff. Davon ausgehend wurde eine Reihe von Hydrazinderivaten auf ihre SSAO-Aktivität untersucht. Die wichtigsten Vertreter (Schema 1) sind Carbonylreagentien und führen zu einer starken, teils irreversiblen Hemmung von SSAO-Enzymen [1].

Das Antihypertensivum Hydralazin hemmt die humane SSAO *in-vitro* und *in-vivo*. Die in der Parkinsontherapie verwendeten DOPA-Decarboxylase-Hemmer Carbidopa und Benserazid zeigten *in-vitro* eine wirksame Inhibition der SSAO aus unterschiedlichen Geweben [4], ebenso wie das zytostatisch wirksame Procarbazin [1].

Erst kürzlich konnte mit LJP 1207 [N'-(2-Phenylallyl)hydrazin Hydrochlorid] ein neuer potenter und oral anwendbarer Hemmer der humanen SSAO gefunden werden. Bei Versuchen mit Mäusen wurde eine signifikante Senkung der Mortalitätsrate bei Ulcerativer Colitis festgestellt. In *in-vitro*-Tests zeigte LJP 1207 eine selektive Inhibition der SSAO und auch eine Blockade der SSAO-vermittelten Zelladhäsion, was die Vermutung zulässt, dass das aktive Zentrum des Enzyms direkt an der Adhäsion beteiligt sein könnte [22].

Aufgrund ihrer beträchtlichen Toxizität stellen Hydrazinderivate kein vorrangiges Ziel aktueller Wirkstoffentwicklungen dar [1].



Schema 1 (nach Lit. [1])

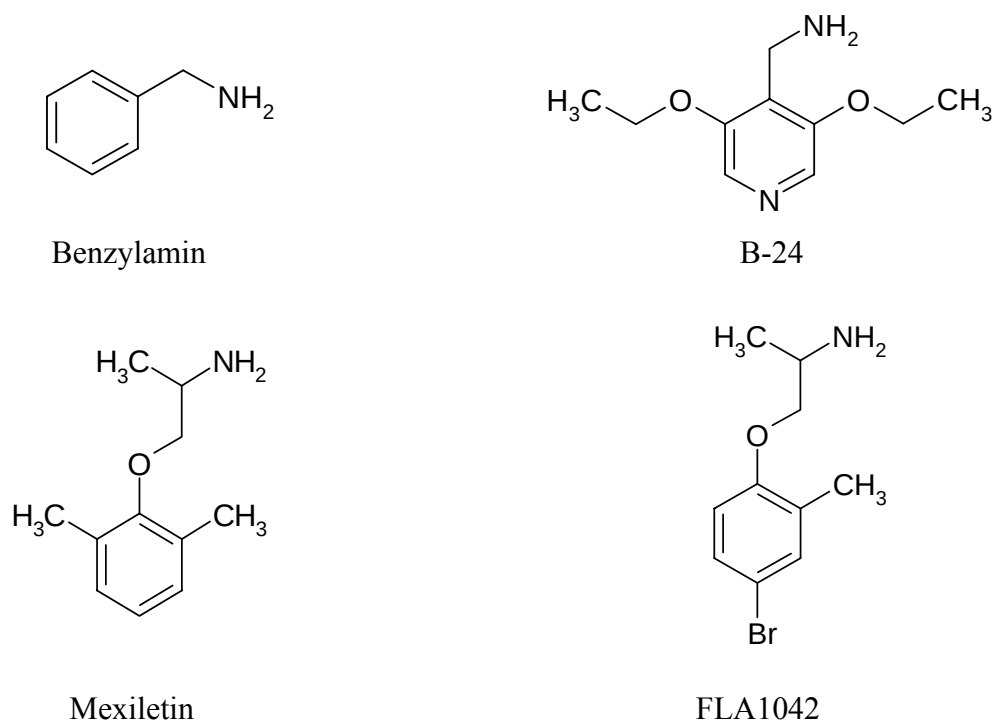
Arylalkylaminderivate

Ausgehend von der Leitsubstanz Benzylamin wurden diverse strukturell verwandte Arylalkylamine auf ihre Verwendbarkeit als Substrate oder Inhibitoren der SSAO untersucht (Schema 2). Die Verbindung B-24 (3,5-Diethoxy-4-Aminomethylpyridin) wurde daraufhin als potentiell selektiver Inhibitor der Plasma- und Gewebe-SSAO gefunden, wobei die Hemmwirkung vom molaren Verhältnis B-24/SSAO abhängt [1,23]. Obwohl sich B-24 als hochselektiver Inhibitor der Schweineplasma-SSAO erwies, konnte eine vergleichbare Hemmung gegenüber der humanen SSAO nicht nachgewiesen werden [7].

Phenylethylamine und Phenoxyethylamine wurden, weil sie bekanntlich Inhibitoren der MAO sind, auch auf eine mögliche Hemmwirkung gegenüber der SSAO untersucht. Beispielsweise zeigte sich bei Mexiletin eine reversible, kompetitive Hemmung auf die MAO A sowie eine reversible, nicht kompetitive Hemmung auf die Gewebe-SSAO, wenngleich mit geringerer Aktivität [10].

Ein Analogon des Mexiletins (FLA 1042) zeigte die höchste SSAO-Aktivität unter den Arylalkylaminen [1], allerdings wird ausschließlich die Ratten-SSAO inhibiert.

Die Gründe für das variable Inhibitionspotential derartiger Verbindungen können einerseits auf den Unterschieden zwischen Gewebe- und Plasma-SSAO, andererseits auf der Heterogenität der SSAO innerhalb der einzelnen Spezies beruhen.



Schema 2 (nach Lit. [1])

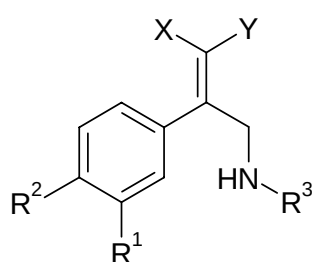
Propenylamin- und Propargylaminderivate

Allylamine können durch die Gefäß-SSAO zum toxischen Acrolein metabolisiert werden, das kardiovaskuläre Schäden verursachen kann. Dies kann durch klassische SSAO Inhibitoren wie zum Beispiel Semicarbazid verhindert werden.

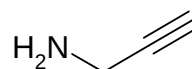


Von den bisher untersuchten Propenylaminen wirken vor allem 3-Halogen-2-phenylallylamine stark inhibitorisch, darunter Verbindungen der Firma MDL wie MDL 72161 und das p-Fluor-Analogon MDL 72974A (Schema 3) [1]. Untersuchungen beim Menschen belegten eine unterschiedliche Sensibilität

gegenüber MDL 72974A und Semicarbazid. Humanes Serum zeigte weniger Reaktivität als vaskuläres Gewebe. Aus diesen Ergebnissen resultiert die Hypothese, dass im menschlichen Serum ein endogener SSAO-Inhibitor vorkommt, weswegen die SSAO-Aktivität im humanen Serum geringer ist als in den Gefäßen [1]. MDL 72974A wirkte nachgewiesenermaßen in klinischen Untersuchungen bei Parkinson-Patienten. Ob hier ein Zusammenhang mit der SSAO-Hemmwirkung besteht, ist jedoch nicht geklärt. Das aliphatische Propargylamin hemmt die humane Plasma-SSAO [1].



Grundstruktur der
MDL-Verbindungen

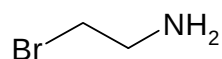


Propargylamin

Schema 3 (nach Lit. [1])

Halogenalkylaminderivate

Der angeblich erste selektive Inhibitor der SSAO, 2-Bromethylamin, fällt in die Gruppe der Halogenalkylamine (Schema 4) [1]. Es ist auch *in-vivo* aktiv und führt zu einer vermehrten Methylaminausscheidung über den Harn. Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen ergaben, dass die Anwesenheit des Bromsubstituenten sowie der Abstand von zwei Kohlenstoffatomen zwischen der Aminogruppe und dem Bromatom entscheidend für die hemmende Wirkung sind [24]. Es konnte gezeigt werden, dass Analoga mit anderen Halogenatomen anstelle von Brom oder einer längeren Kohlenstoffkette deutlich geringere Wirksamkeit aufweisen [1].



2-Bromethylamin

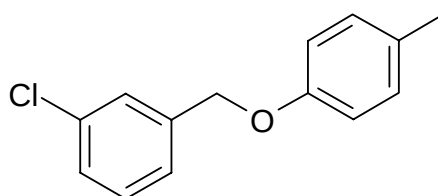
Schema 4 (nach Lit. [1])

Oxazolidinonderivate

Bei den Verbindungen dieser Substanzgruppe handelte es sich ursprünglich um MAO-B-Inhibitoren, jedoch wurden auch sie auf ihre SSAO-Hemmwirkung untersucht. Bei MD 220662 konnte die stärkste Hemmwirkung beobachtet werden (Schema 5). Aus den Untersuchungen geht weiters hervor, dass MD 220662 nicht nur ein Inhibitor sondern auch ein Substrat der SSAO ist [1].



R:

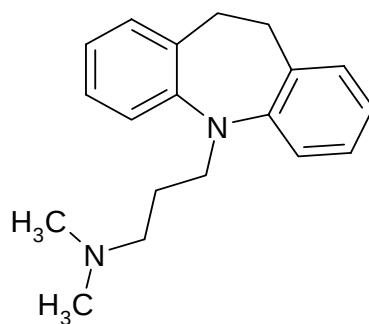


Schema 5 (nach Lit. [1])

Antidepressiva unterschiedlicher Struktur

Erst kürzlich wurden auch einige klassische Antidepressiva (Schema 6) auf eine potentielle SSAO-Inhibition untersucht. Von den an der Affenhirn-SSAO getesteten Verbindungen zeigte Imipramin die höchste Hemmwirkung, während Maprotilin, Zimeldin und Nomifensin nur eine moderate Hemmung aufwiesen [1].

Erst kürzlich wurde auch Tranylcypromin unter anderem als SSAO-Inhibitor getestet, hierbei zeigte sich allerdings keine inhibitorische Wirkung [25].



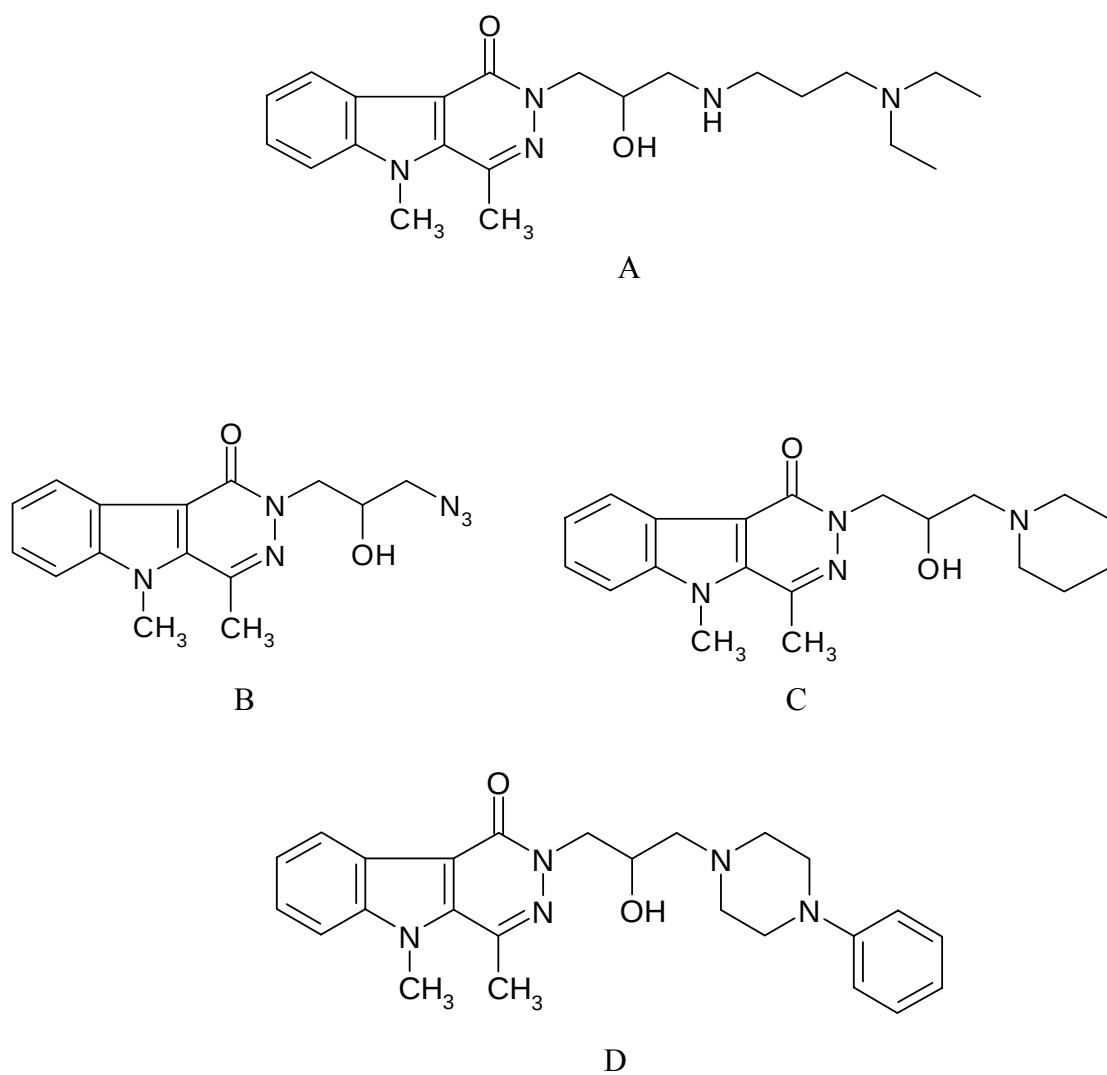
Imipramin

Schema 6 (nach Lit. [1])

Aktuelle Entwicklungen

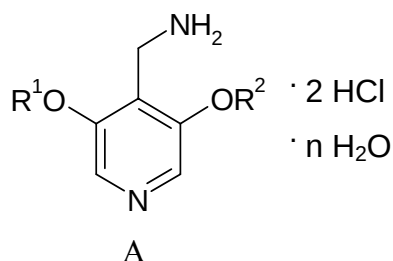
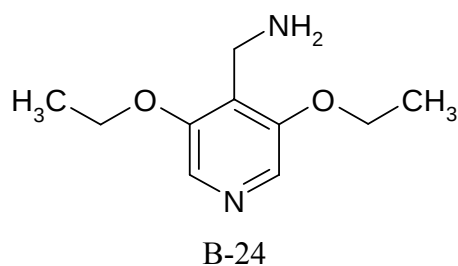
Es besteht, wie bereits eingangs diskutiert, zum gegenwärtigen Zeitpunkt großer Bedarf an selektiven potenten SSAO-Inhibitoren.

Im Rahmen einer Dissertation wurden von A. A. H. Farghaly verschiedene Pyridazino[4,5-*b*]indol-1-on-Derivate (Schema 7) hergestellt [26]. Diese zeigten eine schwache bis mäßige SSAO-Inhibition. *In-vitro*-Tests ergaben, dass die inhibitorische Wirkung in Zusammenhang mit der Kettenlänge der Aminoalkohol-Teilstruktur in Position 2 steht. Diese stieg mit zunehmender Kettenlänge an. Verbindung D (Phenylpiperazin-Teilstruktur) wies eine geringere Aktivität als Verbindung C (Piperidin-Teilstruktur) auf. Verbindung A (Diethylaminopropylamino-Teilstruktur) zeigte von den getesteten Substanzen die höchste Aktivität [26].



Schema 7 (nach Lit. [26])

Von der Arbeitsgruppe Bertini wurden unterschiedliche Alkylaminoderivate des 4-Aminomethylpyridins als „Substrat-ähnliche“ Enzym-Inhibitoren synthetisiert und getestet [27,28]. Es bestehen strukturelle Ähnlichkeiten mit der Verbindung B-24, die von derselben Arbeitsgruppe synthetisiert wurde. Diese Verbindungen besitzen teils beträchtliche Hemmwirkung auf verschiedene Aminoxidasen, darunter auch die SSAO (Schema 8).

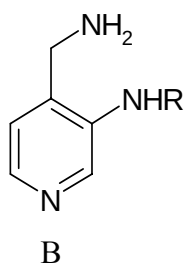


A1: $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$, $n = 0$

A2: $R^1 = R^2 = (\text{CH}_2)_3\text{OH}$, $n = 3$

A3: $R^1 = R^2 = (\text{CH}_2)_4\text{OH}$, $n = 0$

A4: $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $n = 0$



B1: $R = \text{H}$

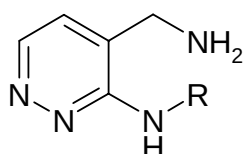
B2: $R = \text{CH}_3$

B3: $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$

B4: $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Schema 8 (nach Lit. [28])

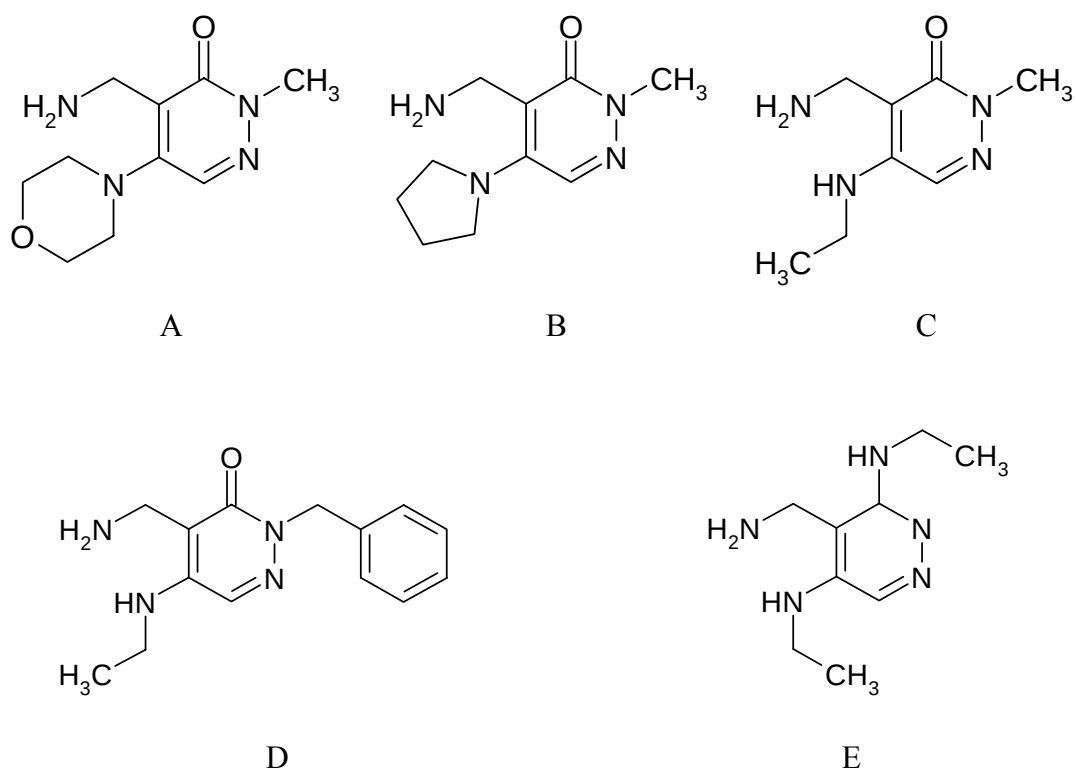
Von I. Hochholdinger wurden, auf diesen Erkenntnissen aufbauend, im Rahmen einer Diplomarbeit entsprechende 4-Aminomethylpyridazine mit Alkylaminosubstituenten unterschiedlicher Länge in Position 3 hergestellt (Schema 9). Nach dem Prinzip der Bioisosterie wurde der Pyridinring durch das 1,2-Diazinsystem ersetzt. Erste in-vitro-Messungen der biologischen Aktivität zeigten jedoch, dass die Verbindungen erst in höheren Konzentrationen hemmend auf die humane SSAO wirken [29].



$R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_4\text{H}_9$

Schema 9 (nach Lit. [29])

Erst kürzlich wurden im Rahmen einer Dissertation von A. Wobus 4-Aminomethylpyridazine synthetisiert, die auf ihre Hemmwirkung gegenüber rekombinanter humaner SSAO getestet wurden. Dabei zeigte sich, dass von den Pyridazinon-Derivaten lediglich die 5-Morpholino-Verbindung A eine deutliche SSAO-Hemmwirkung aufweist. Die stärkste Hemmung wurde für die Bis(ethylamino)-Verbindung E gefunden [20].



Schema 10 (nach Lit. [20])

Potentieller therapeutischer Nutzen von SSAO-Inhibitoren

Mehrere Untersuchungsergebnisse deuten auf eine Beteiligung der SSAO an diversen pathophysiologischen Prozessen hin. Ein Einsatz von Inhibitoren der SSAO könnte besonders bei entzündlichen Erkrankungen, Atherosklerose oder Diabetes mellitus von Nutzen sein. Selektive Hemmstoffe der humanen SSAO wären möglicherweise im Endothel zytoprotektiv wirksam. Vaskuläre Spätfolgen bei Diabetes-mellitus-Patienten könnten somit gehemmt oder zumindest hinausgezögert werden. Bei Diabetes mellitus Angiopathien, verursacht durch eine Schädigung des Gefäßendothels, könnte diese durch eine Langzeitbehandlung mit SSAO-Inhibitoren verhindert und dadurch die

Lebensqualität der betroffenen Patienten deutlich verbessert werden [1]. Vorangegangene Untersuchungen belegen die Vermutung, dass verschiedene SSAO-Subtypen existieren, weshalb die Entwicklung von Wirkstoffen, die spezifisch die SSAO hemmen, von besonderer Bedeutung ist. Ob sowohl die im Plasma gelöste, als auch die vaskuläre (auch als VAP-1 = vaskuläres Adhäsionsprotein-1 bekannt) oder nur eine der beiden Formen für therapeutische Zwecke bedeutsam ist, bedarf noch weiterer Studien [1].

1.5. Zielsetzung

Wie eingangs diskutiert, gibt es weiterhin einen Mangel an verfügbaren SSAO-Inhibitoren mit ausreichender Hemmwirkung und hoher Selektivität. Daher ist die Suche nach neuen geeigneten Wirkstoffen von großem pharmazeutischem Interesse. In Anknüpfung an frühere Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe sollten nun neue Verbindungen mit potentieller SSAO-Hemmwirkung synthetisiert werden.

Ausgangspunkt für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen bilden die Grundkörper mit Pyridazinon-Teilstruktur, welche durchaus Potential in Richtung SSAO-Hemmung erkennen lassen (siehe S. 19), sowie die Beobachtung, dass verschiedene (hetero-)aromatische Aldehyd-Oxime ebenfalls SSAO-inhibitorische Wirkung aufweisen können [30]. Dementsprechend sollten nun Verbindungen zugänglich gemacht werden, die eine Pyridazinon-Struktur mit einer (tertiären) Aminogruppe und eine Aldehyd-Oxim-Funktion in sich vereinen. Die Verbindungen sollten chemisch vollständig charakterisiert und letztlich auf ihre potentielle SSAO-Hemmwirkung untersucht werden.

Ziel des ersten Teils der geplanten Untersuchungen ist es, analog zu den Untersuchungen von Y.H. Wang [31] aus der Ausgangssubstanz 4,5-Dichlor-2-(4-methoxybenzyl)-pyridazin-3(2*H*)-on ein entsprechendes 4-Carbaldehydoxim in 7 Syntheseschritten herzustellen.

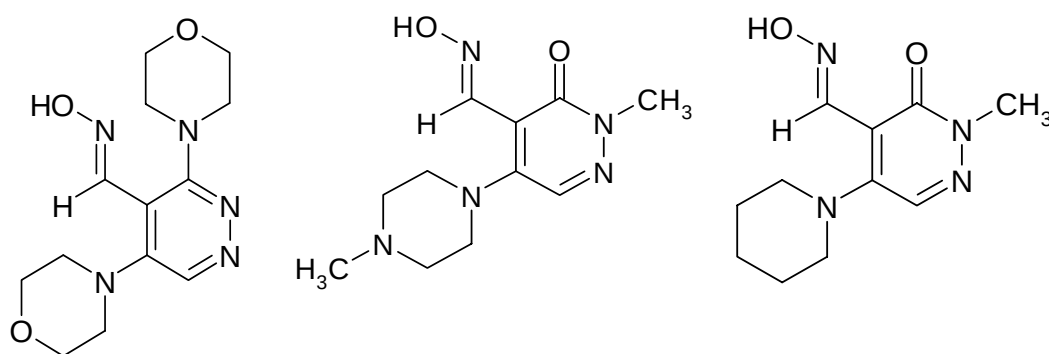
Ziel des zweiten Teils der geplanten Untersuchungen ist es, ausgehend von den kommerziell erhältlichen Substanzen Methylhydrazin und Mucoclorsäure an der Position 5 mit Piperidin- und 4-Methylpiperazin- substituierte Pyridazinon-4-carbaldehydoxime als potentielle Inhibitoren der SSAO herzustellen.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1. Synthese neuer Pyridazine

Das Pyridazin-System gehört zu den π -elektronenarmen Heteroaromaten. Es besitzt ein starkes Dipolmoment sowie eine im Vergleich zu Pyridin deutlich schwächere Basizität ($pK_a = 2.24$) [32], wobei (+)-M-Substituenten die Basizität reaktivieren können [33]. Die beiden Stickstoffatome im Ring fördern durch ihren (-)-M-Effekt die nucleophile Substituierbarkeit am Aromaten [33].

Wie eingangs berichtet, wurden von A. Wobus einige Pyridazinderivate mit hemmender Wirkung auf die humane SSAO hergestellt [20]. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollten im Zuge der vorliegenden Arbeit neue, modifizierte Hemmstoffe unter Beibehaltung des Grundkörpers zugänglich gemacht werden. Als Zielverbindungen wurden einerseits das 3,5-Dimorpholino-pyridazin-4-carbaldehydoxim, andererseits die Oxime 4-Hydroxyiminomethyl-2-methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on und 4-Hydroxyiminomethyl-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on ausgewählt (Schema 11). Es sollte untersucht werden, ob die Modifikationen der Substituenten am Grundkörper zu einer Veränderung der pharmakologischen Eigenschaften hinsichtlich der SSAO-Hemmwirkung führen.



Schema 11

2.1.1. Synthese der Dimorpholino-Verbindung

Als neuer SSAO-Inhibitor sollte das bisher unbekannte 3,5-Dimorpholinopyridazin-4-aldehydoxim zugänglich gemacht werden. Aus Lit. [34] geht hervor, dass das 3,5-Dimorpholinopyridazin aus 3,4,5-Trichlorpyridazin unter Einführung des Morpholinorests und anschließende Enthlogenierung des verbliebenen 4-Chlorsubstituenten zugänglich ist. Dieser Syntheseweg sollte so optimiert werden, dass die Möglichkeit besteht, an den Positionen 3 und 5 zwei verschiedene Amino-Reste einzuführen. Lit. [35] schlägt eine Umsetzung von 3,4-Dichlor-5-methoxypyridazin mit Morpholin im Überschuss vor. Da hier jedoch zu etwa 7% direkt die Dimorpholino-Struktur entsteht, die bei eventueller Substitution mit einem anderen Amino-Rest unter großem Aufwand und zu erwartenden Ausbeuteverlusten abgetrennt werden müsste, erscheint der Weg über das N-geschützte 4,5-Dichlorpyridazin-3(2*H*)-on am sinnvollsten.

Vom 4,5-Dichlor-2-(4-methoxybenzyl)pyridazin-3(2*H*)-on ausgehend sollte demnach das literaturbekannte 3,5-Dimorpholinopyridazin über einen einfachen Zugang zum 3,5-Dimorpholinopyridazin-4-aldehydoxim ermöglicht werden. Die Ausgangsverbindung ist aus Mucochlorsäure und Methylhydrazin mit darauffolgender Einbringung der 4-Methoxybenzyl-Schutzgruppe leicht zugänglich [36].

Durch Behandlung mit Morpholin in Wasser lässt sich die Ausgangsverbindung mit relativ hoher Regioselektivität in die literaturbekannte 5-Morpholino-Verbindung (**2**) überführen (siehe Schema 12).

Die Abspaltung der Schutzgruppe wurde mit Aluminiumtrichlorid/Toluol versucht. Dabei zeigte sich, dass die Verbindung (**3**) in geringer Ausbeute (47%) resultiert. Daher wurde versucht, diese Reaktion zu optimieren. Eine einfache Maßnahme brachte bereits eine deutliche Verbesserung: durch effizientes Rühren konnte die Ausbeute auf 70% erhöht und damit ein zufriedenstellendes Resultat erreicht werden.

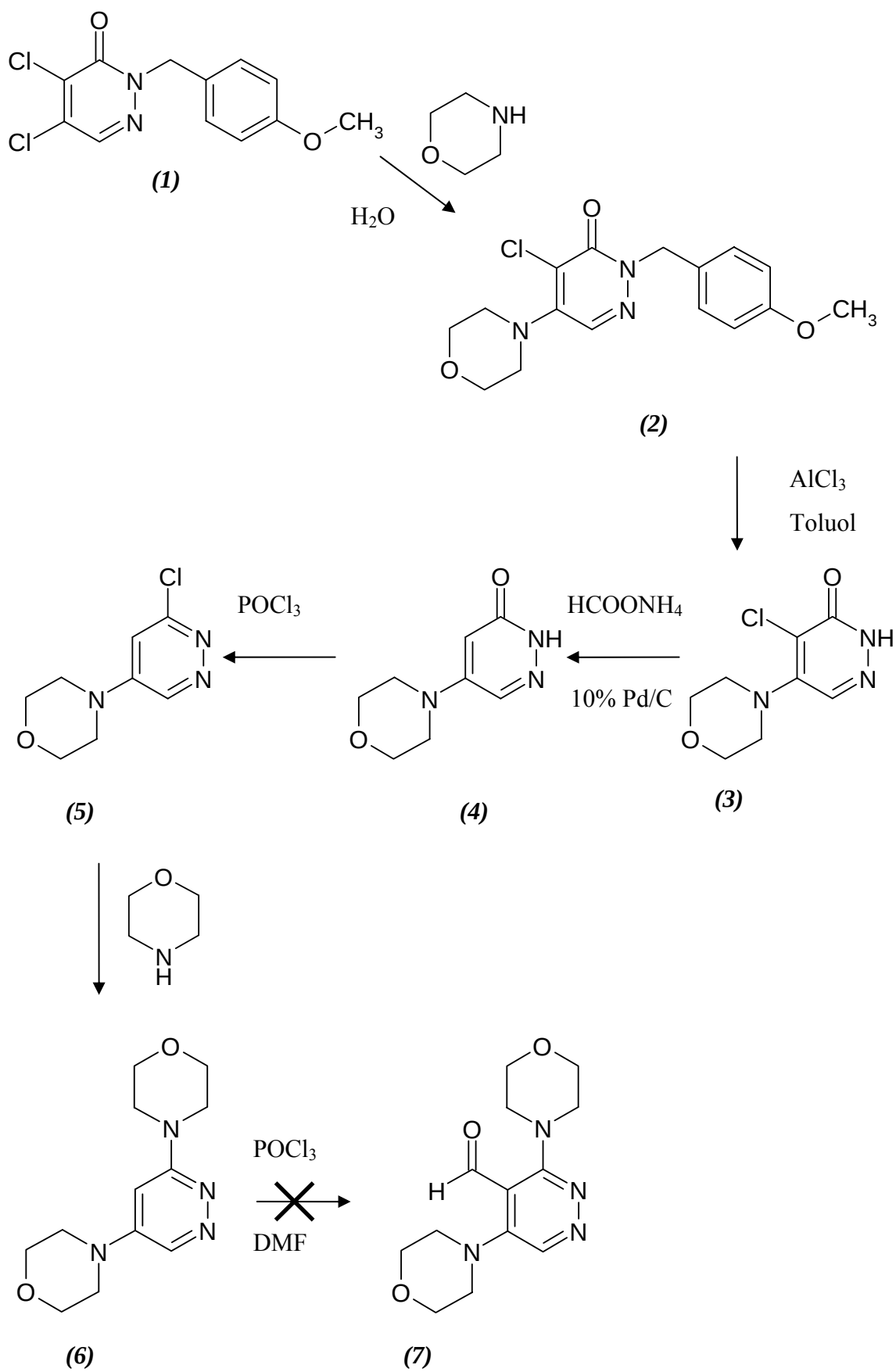
Reduktive Dehalogenierung von (**3**) mit Ammoniumformiat und Palladium/Kohle-Katalysator (10%) führt zur entsprechenden 4-unsubstituierten Verbindung (**4**).

In der Folge lässt sich Verbindung **(4)** durch Erhitzen mit Phosphoroxychlorid in mäßiger Ausbeute in das 3-Chlorpyridazin **(5)** überführen. Der Versuch, die Lösungsmittelreste anstatt durch Eindampfen am Rotavapor unter Anwendung von Wasserstrahlvakuum mittels klassischer Vakuumdestillation zu entfernen, verbessert die Ausbeute nur minimal.

Die erhaltene Substanz **(5)** wird mit einem Überschuss Morpholin unter Erhalt zufrieden stellender Ausbeute zur entsprechenden Dimorpholino-Verbindung **(6)** umgesetzt.

Auf die nunmehr mögliche Einführung anderer Dialkylamino-Reste wurde allerdings aufgrund des fehlgeschlagenen nächsten Schrittes (siehe unten) verzichtet.

Im darauffolgenden Schritt sollte versucht werden, **(6)** durch Formylierung mit dem Vilsmeier-Reagens in den entsprechenden Carbaldehyd **(7)** umzuwandeln. Trotz einer Variation der Reaktionsbedingungen konnte die angestrebte Verbindung auf diese Weise nicht synthetisiert werden. Möglicherweise kann der sich bildende Vilsmeier-Haack-Komplex aufgrund einer sterischen Hinderung durch die Morpholino-Reste an den Positionen 3 und 5 am C₄ des Pyridazins nicht angreifen, weshalb auf weitere Formylierungsversuche verzichtet wurde. Zwar bleiben daher alternative Wege zur Herstellung der Zielverbindung zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, jedoch konnte durch diese Untersuchungen ein neuer flexibler Syntheseweg zur Erweiterung der Substanzbibliothek potentieller SSAO-Inhibitoren erschlossen werden.



Schema 12

2.1.2. Synthese der Pyridazin-3-(2*H*)-on-4-carbaldehydoxime mit ortho-ständigen cyclischen Aminosubstituenten

Um die in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Substanzbibliothek zu erweitern, sollten nun Pyridazinon-4-carbaldehydoxime mit cyclischen Aminosubstituenten in Position 5 zugänglich gemacht werden. Als Ausgangsverbindung wurde das literaturbekannte N-methylierte 4,5-Dichlorpyridazinon (**8**) (siehe Schema 13) gewählt, welches sich durch Reaktion von Mucochlorsäure mit Methylhydrazin bequem herstellen lässt [37]. Um die Ausbeute zu optimieren, wird die Mutterlauge nach Umkristallisation abermals eingengt, abgekühlt, und das ausgefallene Material abfiltriert und abermals umkristallisiert.

Die erhaltene Substanz lässt sich durch Behandlung mit den cyclischen Aminen Piperidin bzw. N-Methylpiperazin in Wasser analog zu Verbindung (**1**) mit relativ hoher Regioselektivität in die literaturbekannte 5-Piperidino-Verbindung (**13**) [38] sowie die neue 5-N-Methylpiperazino-Verbindung (**9**) überführen. Wie aus dem ¹H-NMR-Spektrum zu entnehmen ist, entsteht dieses Produkt sowie das isomere 4-substituierte Produkt in einem Verhältnis von etwa 10:1. Dabei zeigte sich, dass Verbindung (**9**) 30 Stunden, Verbindung (**13**) hingegen 24 Stunden erhitzt werden muss, bis das Ausgangsmaterial nicht mehr nachweisbar ist. Verbindung (**13**) wird aus Ethanol umkristallisiert, Verbindung (**9**) lässt sich besser aus Ethylacetat umkristallisieren. Beide Produkte liegen nach Umkristallisation in guter Ausbeute und Reinheit vor.

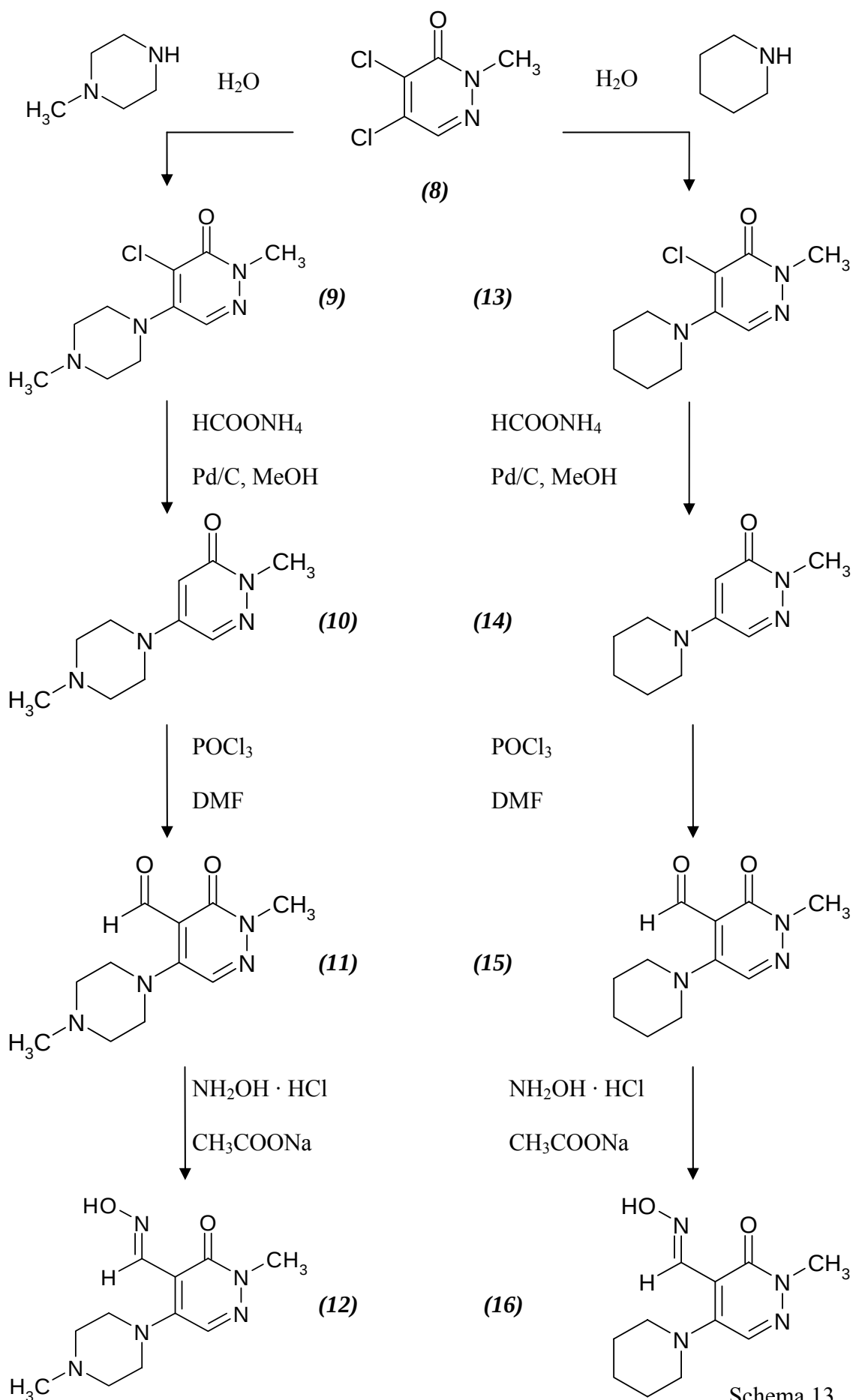
In weiterer Folge sollte der Chlor-Substituent in Position 4 in 3 Stufen durch eine Aldehydoximgruppe ersetzt werden. Eine sehr schonende Methode zur Dehalogenierung von Heteroaromaten ist die katalytische Transferhydrierung mittels Ammoniumformiat und Palladium/Kohle-Katalysator (10%) in Methanol. Unter diesen Bedingungen können aus den 4-Chlorpyridazinonen sowohl die entsprechende bisher unbekannte 4-unsubstituierte Verbindung (**10**) als auch die literaturbekannte Verbindung (**14**) [39] hergestellt werden. Bei Verbindung (**14**) bleibt das Ausgangsmaterial auch nach längerer Reaktionszeit (bis zu 24h) auf den Dünnschichtchromatogrammen sichtbar. Weitere Zugabe von Ammoniumformiat und Pd/C (10%) Katalysator führt auch nach weiteren 24 Stunden Reaktionszeit

offensichtlich zu keiner vollständigen Umsetzung. Durch die Aufarbeitung können bei Substanz **(14)** die Reste des Ausgangsmaterials problemlos entfernt werden. In der Folge bewährt sich bei beiden Verbindungen Ethylacetat als Lösungsmittel zur Umkristallisation, beide Produkte weisen in Ethanol eine deutlich höhere Löslichkeit auf. Als Resultat können zufrieden stellende Ausbeuten von etwa 60% erzielt werden.

Anschließend werden diese relativelektronenreichen Pyridazinone mit dem Vilsmeier-Haack-Reagens erhitzt. Dies führt im Gegensatz zu den erfolglosen Versuchen an Verbindung **(6)** (siehe Abschnitt 2.1.1.) jeweils in glatter Weise zu den neuen 4-formylierten Derivaten **(11)** und **(15)** (siehe Schema 13). Bei Verbindung **(11)** zeigten sich im Dünnschichtchromatogramm mehrere Nebenprodukte, die allerdings im Zuge der extraktiven Aufarbeitung weitestgehend abgetrennt werden. Verbindung **(15)** ist im Dünnschichtchromatogramm auch an Hand der gelben Farbe der Bande identifizierbar. Nach Eindampfen der Extrakte ließen sich sowohl Verbindung **(11)**, als auch Verbindung **(15)** nicht umkristallisieren, die Substanzen liegen nach dieser Aufarbeitung zunächst in öligem Zustand vor. Erst nach Entfernung letzter Lösungsmittelreste (Dimethylformamid) durch Kugelrohrdestillation sowie nach Lagerung über mehrere Tage im Tiefkühlschrank kristallisieren die Substanzen aus.

Die Umwandlung der Pyridazincarbaldehyde in die entsprechenden Oxime **(12)** und **(16)** erfolgt durch Behandlung mit Hydroxylamin-Hydrochlorid und Natriumacetat in wässrigem Ethanol. Die Reaktionszeit ist mit 3 Stunden bei beiden Edukten gleich. Bei der Synthese von Verbindung **(12)** zeigte sich beim Ausschütteln mit vergleichsweise geringen Mengen Dichlormethan (etwa 4x40 ml) ein offenbar geringer Verteilungskoeffizient und damit eine nicht zufriedenstellende Ausbeute. Auch der Versuch, über kontinuierliche Extraktion mit Ethylacetat in einem Rotationsperforator über 24 Stunden eine bessere Ausbeute zu erzielen, gelang nicht. Die Löslichkeit in Ethylacetat erwies sich als noch schlechter als jene in Dichlormethan. Durch oftmaliges Ausschütteln mit Dichlormethan (12x40 ml) kann jedoch eine zufrieden stellende Ausbeute erreicht werden. Diese Aufarbeitung könnte vermutlich durch Anwendung eines Rotationsperforators für spezifisch schwerere Lösungsmittel unter Anwendung von Dichlormethan weiter optimiert werden. Auf einen entsprechenden Versuch wurde jedoch verzichtet. Verbindung **(16)** hingegen lässt sich ohne Löslichkeitsprobleme unter Erhalt guter Ausbeuten synthetisieren.

Die angestrebte Oxim-Teilstruktur kann hier naturgemäß in Z- oder in E-Konfiguration vorliegen. Bei den durch Umkristallisation gereinigten Produkten handelt es sich jeweils um isomerenreine Verbindungen (zur Zuordnung s.u.). Bei Verbindung **(16)** wurde aus der Kristallisationsmutterlauge weiteres Material gewonnen, wobei es sich um ein Isomerengemisch der Zielsubstanz handelt. Das aus dem Gemisch aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum liefert Informationen über die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Z- bzw. der E-Form. Im isomerenrein erhaltenen Produkt liegt bei beiden Verbindungen die E-konfigurierte Form vor, was mit Differenz-NOE-Spektroskopie eindeutig zugeordnet werden konnte. So zeigt bei Einstrahlung auf das Oxim-OH des E-Isomers das entsprechende Aldehyd-H einen deutlich sichtbaren NOE (Tafel 14, Tafel 23).



Schema 13

2.2. Charakterisierung der neuen Verbindungen

Die Charakterisierung der neuen Verbindungen **(9)** – **(12)** sowie **(15)** und **(16)** erfolgte mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR, sowie Massenspektren. Die gefundenen Werte bezüglich ihrer Elementarzusammensetzung stehen ebenso in Einklang mit der Struktur, wie die aufgenommenen Spektren.

Schmelzpunkte

Ein Vergleich der Schmelzpunkte der synthetisierten Substanzen zeigt, dass die schlecht kristallisierbaren Verbindungen **(11)** und **(15)** einen relativ niedrigen Schmelzpunkt aufweisen. Verbindung **(11)** besitzt ein relativ breites Schmelzintervall, obwohl sie in analysenreiner Form erhalten wird. Weiters lässt sich erkennen, dass die entsprechenden Piperidin-substituierten Derivate **(13)** und **(14)** einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als die entsprechenden N-Methylpiperazin-substituierten Derivaten **(9)** und **(10)**, die beiden Endprodukte besitzen hingegen einen nahezu identischen Schmelzpunkt.

<i>Substanz</i>	<i>Schmelzpunkt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Schmelzpunkt</i>
<i>(4-Methylpiperazin)</i>		<i>(Piperidin)</i>	
9	132-133°C	13	62-63°C
10	127-128°C	14	94-95°C
11	85-102°C	15	78-79°C
12	168-169°C	16	170-171°C

^1H -NMR-Spektren

Das ^1H -NMR-Spektrum des Zwischenprodukts **(9)** (Tafel 1) zeigt bei tiefstem Feld (ca. 7.5 ppm) das Signal von H-6 als Singulett. Das Signal der Methylgruppe in Position 2 findet sich als Singulett bei ca. 3.7 ppm. Die H-Atome des N-Methylpiperazinsubstituenten in Position 5 erscheinen als Triplets bei ca. 3.3 ppm und 2.5 ppm. Die dem Heteroaromaten näher liegenden H-Atome sind aufgrund ihrer

Nachbarschaft zum Aromaten zu tieferem Feld verschoben. Schließlich lässt sich die Methylgruppe des Substituenten in Position 5 als Singulett bei ca. 2.3 ppm erkennen.

Das ^1H -NMR-Spektrum des Zwischenprodukts **(10)** (Tafel 5) weist zu jenem von **(9)** große Ähnlichkeiten auf. Hier lassen sich zwei Dubletts bei ca. 7.6 ppm und 5.9 ppm erkennen, die von den beiden H-Atomen des Pyridazinons stammen, welche miteinander koppeln ($J = 2.7\text{Hz}$). Bei ca. 3.7 ppm findet sich bei **(10)** sowie seinem Piperidin-Analogen **(14)** wie schon bei Verbindung **(9)** das Signal der Methylgruppe in Position 2. Bei Verbindung **(10)** finden sich analog zu Verbindung **(9)** wiederum die H-Atome des N-Methylpiperazinsubstituenten in Position 5 als Triplett bei ca. 3.3 ppm und 2.5 ppm. Der Peak der Methylgruppe des Substituenten in Position 5 tritt als Singulett bei ca. 2.3 ppm auf.

Die ^1H -NMR-Spektren der Carbaldehyde **(11)** (Tafel 9) und **(15)** (Tafel 18) zeigen das Aldehyd-H-Signal bei etwa 10.2 ppm als Singulett, sowie das Signal von H-6 des Pyridazin-Grundkörpers, das bei ca. 7.7 ppm ebenfalls als Singulett erscheint. Es folgt wie schon bei den vorangegangenen Verbindungen bei 3.7 ppm die Methylgruppe in Position 2. Verbindung **(11)** zeigt wie schon die Verbindungen **(9)** und **(10)** zwei Triplets und ein Singulett, vom N-Methylpiperazinrest stammend. Die Triplets sind bei circa 3.5 ppm und 2.6 ppm ersichtlich, das Singulett erscheint bei etwa 2.5 ppm. Das Singulett tritt bei höherem Feld (2.3 ppm) auf. Bei Verbindung **(15)** finden sich bei etwa 3.4 ppm 4 H-Atome, bei ca. 1.7 ppm ist ein Multiplett der 6 H-Atome des Piperidin-Substituenten sichtbar.

Aus den ^1H -NMR-Spektren der Endprodukte **(12)** (Tafel 13) und **(16)** (Tafel 22) lässt sich jeweils ein relativ breiter Oxim-OH-Peak bei 11.6 ppm für Verbindung **(12)** sowie bei 11.3 ppm für Verbindung **(16)** erkennen. Das Aldehyd-H tritt bei etwa 8.1 ppm **(16)** bzw. 8.2 ppm **(12)** auf. Nahezu ident hingegen erscheint bei beiden Verbindungen das H in Position 6 des Heteroaromaten bei 7.7 ppm. Die für die jeweiligen Substituenten in Position 5 typischen Peaks sind ebenso gut ersichtlich, wie die Methylgruppe in Position 2 bei etwa 3.7 ppm.

¹³C-NMR-Spektren

Das ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung **(9)** (Tafel 2) zeigt ein Signal bei 159 ppm, das vom C-3 stammt. Die Signale bei 148 ppm und 130 ppm sind C-5 bzw. C-6 des Pyridazins zuzuordnen. Das Signal von C-4, welches einen Chlorsubstituenten trägt, erscheint bei 117 ppm. Die C-Atome der Methylengruppen des N-Methylpiperazinrests erscheinen bei 55 ppm und 49 ppm. Die C-Atome der beiden N-Methylgruppen kommen bei 46- bzw. 40 ppm zur Resonanz.

Ähnliche Werte liefert das ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung **(10)** (Tafel 6) im aromatischen Bereich. Das C=O-Kohlenstoffatom des C-3 gibt ein Signal bei 162 ppm, C-5 bei 150 ppm, C-6 bei 129 ppm. C-4 tritt im Vergleich zu Verbindung **(9)** durch die Entfernung des Chlorsubstituenten bei höherem Feld (102 ppm) auf. Die 4 Methylen-C-Atome des N-Methylpiperazinrests geben analog zu Verbindung **(9)** Signale bei 54 ppm bzw. 46 ppm. Die beiden N-Methylgruppen erscheinen bei 46 ppm bzw. 39 ppm.

Die ¹³C-NMR-Spektren der Aldehyde **(11)** (Tafel 10) und **(15)** (Tafel 19) weisen eine große Ähnlichkeit im tieferen Feldbereich auf. Bei circa 187 ppm erscheint jeweils ein Signal, das dem Aldehyd-C zugeordnet werden kann. Das Pyridazinon-C=O tritt bei etwa 163 ppm auf. C-5 erscheint bei 148 ppm, das unsubstituierte Pyridazin-C-6-Atom bei ungefähr 130 ppm. Das C-4 erfährt durch die Formylierung eine Tieffeldverschiebung und gibt je bei ca. 108 ppm ein Signal. Im höheren Feld unterscheiden sich die Verbindungen aufgrund der unterschiedlichen Substituenten an C-4 jedoch stark. Beide Substanzen zeigen bei 39 ppm das für alle gemessenen Substanzen typische Signal der Methylgruppe an Position 2 des Pyridazins. Es finden sich bei Verbindung **(11)** weitere Signale bei 54 ppm und 51 ppm, die dem N-Methylpiperazinrest zugeordnet werden können. Das NCH₃-Kohlenstoffatom erscheint bei 46 ppm. Die Signale der Verbindung **(15)** finden sich bei 53 ppm, 26 ppm, sowie bei 23 ppm.

Ebenso zeigen die ¹³C-NMR-Spektren der Zielverbindungen **(12)** (Tafel 15) und **(16)** (Tafel 23) teilweise Ähnlichkeiten, die prototypischen fünf Signale im Spektrum von **(12)** sind im Spektrum von **(16)** bei beinahe identischer Verschiebung ersichtlich. Erkennbar sind das Signal von C-3 bei knapp 160 ppm, das von C-5 jeweils bei 151

ppm **(12)**, **(16)**, das Carbaldehydoxim-C bei etwa 143 ppm, das C-6-Signal bei 131 ppm und schließlich das Signal von C-4 bei 112 ppm. Die Methylgruppe an C-2 erscheint bei 40 ppm. Verbindung **(12)** zeigt Signale der Kohlenstoffatome des N-Methylpiperazinrests bei 55 ppm, 50 ppm, sowie für das N-CH₃-Kohlenstoffatom bei 46 ppm. Bei Verbindung **(16)** sind hingegen Signale um 52 ppm, 26 ppm und 24 ppm zu erkennen.

Massenspektren

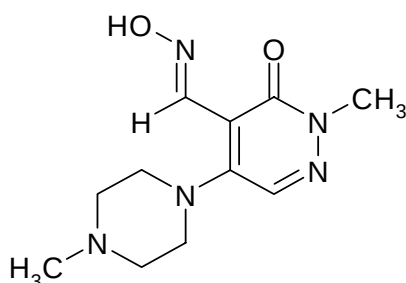
Die Massenspektren der Verbindungen **(9)** bis **(12)** (Tafel 4, 8, 12, 17) zeigen neben den durchwegs gut sichtbaren M⁺-Peaks auch (M+1)⁺-Peaks von sehr geringen Intensitäten zwischen 0% und 5%. In allen Massenspektren dieser Syntheseriehe sind weiters bei m/z = 43, m/z = 56 und m/z = 70 Peaks zu beobachten, die auf den N-Methylpiperazinrest hindeuten. Verbindung **(9)** (Tafel 4) zeigt aufgrund des ³⁷Cl-Isotops einen zweiten M⁺-Peak, der Basispeak ist bei m/z = 43 zu finden. Das Signal m/z = 207 resultiert offensichtlich durch den Verlust des Chlorsubstituenten. Verbindung **(10)** (Tafel 8) zeigt bei m/z = 208 den Molekülionenpeak (29%), der Basispeak befindet sich bei m/z = 43. Bei Verbindung **(11)** erscheint der Molekülionenpeak erwartungsgemäß bei m/z = 236, der Basispeak bei m/z = 70. Auffällig ist auch der Fragmentionen-Peak bei 208, der durch Verlust der Aldehydgruppierung resultieren könnte. Verbindung **(12)** (Tafel 17) hat einen Molekülionenpeak bei m/z = 251 mit sehr geringer Intensität, der Basispeak liegt bei m/z = 42, der Fragmentionen-Peak bei m/z = 234 deutet auf eine Abspaltung des -OH der Hydroxyimino-Gruppe hin. Verbindung **(15)** (Tafel 21) zeigt einen stark ausgeprägten (M+1)⁺-Peak (35%) bei m/z = 222, der noch intensivere Molekülionenpeak ist bei m/z = 221 zu finden. Der Fragmentionen-Peak bei 193 deutet analog zur Verbindung **(11)** auf einen Verlust der Aldehydgruppierung hin. Verbindung **(16)** (Tafel 27) hat einen sehr schwachen Molekülionenpeak bei m/z = 236 und einen (M+1)⁺-Peak bei m/z = 237 mit einer Intensität von knapp 3%. Der Basispeak liegt bei m/z = 219, der wie bei Verbindung **(12)** auf eine Abspaltung der OH-Gruppe aus der Hydroxyiminofunktion hindeutet. Die Verbindungen **(14)** und **(15)** haben weiters identische Fragmentionenpeaks bei m/z = 55 und 138.

IR-Spektren

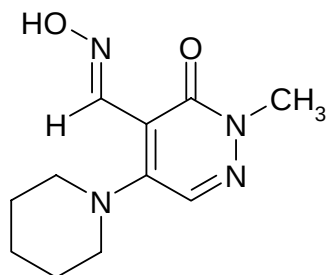
In den IR-Spektren der Verbindungen **(9)** – **(12)** (Tafel 3, 7, 11, 16) sowie **(15)** und **(16)** (Tafel 20, 26) finden sich wie erwartet die Signale der C-H-Valenzschwingungen des Aromaten oberhalb von 3000 cm^{-1} . Die Endprodukte **(12)** und **(16)** weisen zwischen 3200 cm^{-1} und 3300 cm^{-1} die Oxim-OH-Bande auf, bei Verbindung **(12)** in starker, bei Verbindung **(16)** in sehr starker Intensität. Die mittelstarke Absorptionsbande zwischen 2790 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} der Verbindungen **(9)** – **(12)** könnte der C-H-Valenzschwingung des N-Methylpiperazinsubstituenten zugeordnet werden. Die Carbonyl-C=O-Bande erscheint in sehr starker Intensität zwischen 1623 und 1631 cm^{-1} . Im Fingerprint-Bereich ist den Verbindungen **(9)** bis **(12)** eine Bande bei etwa 1450 cm^{-1} gemeinsam, auch andere ähnliche Banden können beobachtet werden. Die Aldehyd-C=O-Bande der Verbindungen **(11)** und **(15)** tritt bei 1661 cm^{-1} bzw. 1662 cm^{-1} auf.

2.3. Biologische Aktivität der Pyridazinon-Aldehydoxime

Die in Abschnitt 2.1.2. synthetisierten Pyridazinon-4-carbaldehydoxime wurden im Rahmen von in-vitro-Messungen auf ihre Hemmwirkung gegenüber rekombinanter humaner SSAO getestet. Dabei zeigte sich, dass die 5-(N-Methylpiperazino)-Verbindung (**12**) lediglich eine IC₅₀ von 1.2 mM aufweist, die 5-Piperidino-Verbindung (**16**) weist mit einem IC₅₀-Wert von 240µM hingegen eine deutlichere SSAO-Hemmwirkung auf. Auch wenn beide Zielverbindungen nicht als Leitsstrukturen in Betracht gezogen werden können, liefern diese Ergebnisse jedenfalls nützliche Informationen für zukünftige Strukturmodifikationen bei der Erstellung weiterführender Substanzbibliotheken.



(12) $IC_{50} = 1200\mu M$



(16) $IC_{50} = 240\mu M$

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Allgemeines

Chromatographie:

DC: Für Identitätsprüfungen und Reaktionskontrollen wurden DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Art.-Nr. 1.05554) und Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ (Art.-Nr. 1.05550) der Firma Merck verwendet. Mittels Fluoreszenzminderung unter UV₂₅₄ (Camag UV-Lampe) erfolgte die Detektion.

Schmelzpunkte:

Sämtliche Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Heiztischmikroskop der Firma Reichert bestimmt und sind unkorrigiert.

Elementaranalysen:

Sämtliche Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Mag. Johannes Theiner an der Fakultät für Chemie der Universität Wien durchgeführt.

Spektroskopie:

IR: Sämtliche Infrarotspektren wurden von Kaliumbromid-Presslingen auf einem Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT-IR Photometer gemessen.

MS: Massenspektren wurden auf einem Shimadzu QP5050A DI 50 Spektrometer oder einem Hewlett-Packard 5890A/5970B-GC/MSD Massenspektrometer gemessen.

¹H-NMR: ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Varian Unityplus 300 bei einer Messfrequenz von 300 MHz gemessen.

^{13}C -NMR: Die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte auf einem Varian Unityplus 300 - Spektrometer bei einer Messfrequenz von 75 MHz

Lösungsmittel:

Lösungsmittel der Firmen Merck und Aldrich in „reinst“ Qualität wurden verwendet.

Kontinuierliche Extraktion:

Für die kontinuierliche Extraktion wurde ein NORMAG-flüssig-flüssig-Extraktor (Rotationsperforator) für spezifisch leichtere Lösungsmittel verwendet.

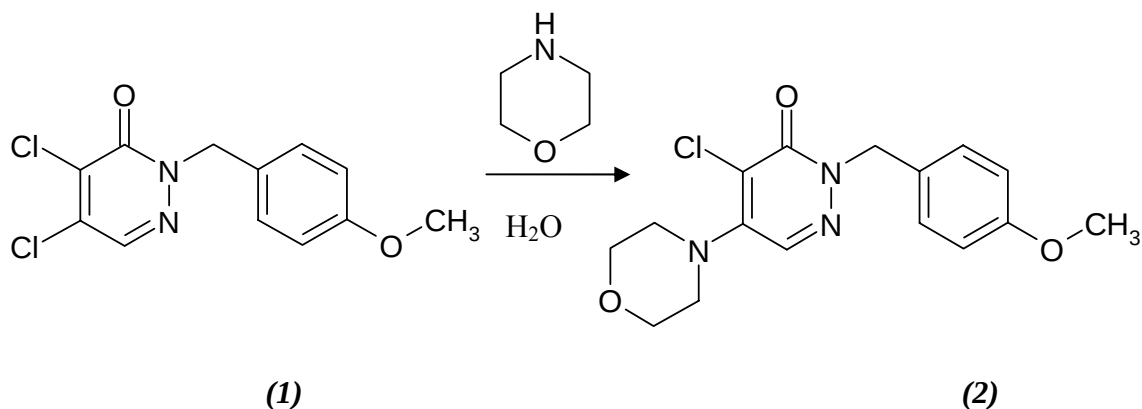
In-vitro-Untersuchungen auf SSAO-Hemmwirkung

Die Testung der Zielverbindungen auf Hemmwirkung gegenüber rekombinanter humaner SSAO unter Verwendung von ^{14}C -markiertem Benzylamin erfolgte in den Laboratorien der Firma Biotie in Turku (Finnland).

3.2. Arbeitsvorschriften

3.2.1.: Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 2.1.1.

4-Chlor-2-(4-methoxybenzyl)-5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2H)-on (2) [31]



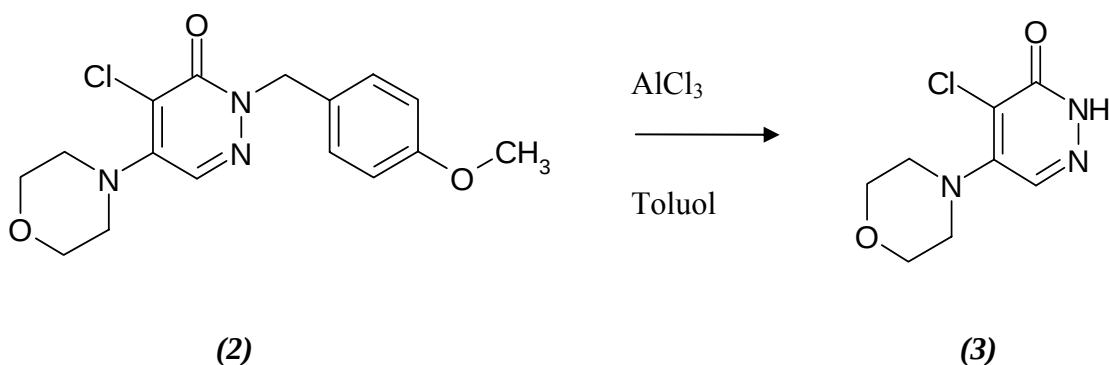
Ein Gemisch aus 10.19 g 4,5-Dichlor-2-(4-methoxybenzyl)pyridazin-3(2H)on [36] (35 mmol) und 9.15 g Morpholin (105 mmol) in 200 ml H₂O wird 18 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen extrahiert man mit etwa 4x40ml CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingedampft. Nach Umkristallisation aus EtOH erhält man weiße Kristalle.

Ausbeute: 10.11 g (84%)

Schmelzpunkt: 125-127°C

Summenformel: C₁₆H₁₈ClN₃O₃ **Molekulargewicht:** 335.79

4-Chlor-5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2H)-on (3) [35]



5.45 g (16.2 mmol) 4-Chlor-2-(4-methoxybenzyl)-5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2H)-on werden zu einer Lösung von 17.0 g AlCl_3 in 60 ml Toluol zugegeben und 2 h auf 80°C erhitzt. Das Gemisch verfärbt sich rötlich violett, klebt an der Kolbenwand und lässt sich nur schwer rühren. Effizientes und permanentes Rühren ist jedoch für eine vollständige Umsetzung essentiell. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 15 g Eiswasser behandelt. Danach extrahiert man mit etwa 4x40ml CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter reduziertem Druck eingedampft. Umkristallisation erfolgt aus EtOH.

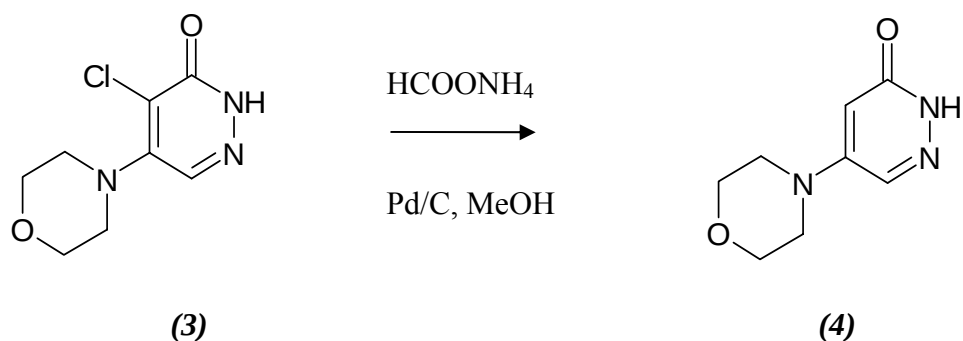
Ausbeute: 2.60 g (75%)

Schmelzpunkt: $224\text{--}226^\circ\text{C}$ (Lit. [35]: $223\text{--}224^\circ\text{C}$, Lit. [38]: 229°C)

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2$

Molekulargewicht: 215.64

5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2H)-on (4) [40]



Zu einem Gemisch von 2.15 g 4-Chlor-5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2H)-on (20 mmol), 85 ml MeOH und 1.16 g Pd/C-Katalysator (10%) werden 2.96 g Ammoniumformiat (46 mmol) portionsweise zugegeben. Unter Argon-Atmosphäre wird zum Rückfluß erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels DC (Fließmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9 : 1) kontrolliert. Weitere Mengen an Ammoniumformiat werden hinzugefügt, bis kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist. Der Katalysator wird ohne Abkühlen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in H_2O aufgenommen und mit etwa 4x40 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen (Na_2SO_4) und Eindampfen des Extraktes werden die erhaltenen farblosen Kristalle aus EtOH umkristallisiert.

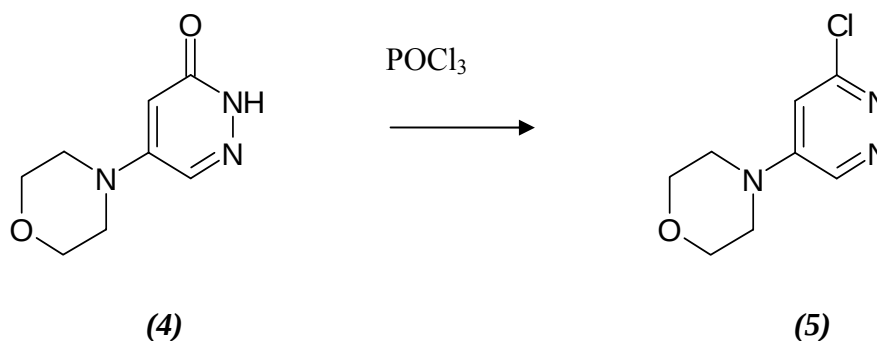
Ausbeute: 1.3 g (72%)

Schmelzpunkt: 265-266°C (Lit. [40]: 267-268°C)

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$

Molekulargewicht: 181.20

4-(6-Chlorpyridazin-4-yl)morpholin (5) [41]



0.81 g (4.5 mmol) 4-Chlor-5-(morpholin-4-yl)pyridazin-3(2*H*)-on werden mit 12.5 ml (38.25 mmol) POCl₃ versetzt und 3 h auf 110°C erhitzt. Anschließend wird das Reagens im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand mit 15 g Eis versetzt. Die erhaltene Lösung wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 7-8 eingestellt und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Dann trocknet man über Na₂SO₄ und dampft das Lösungsmittel ein. Durch Umkristallisation aus EtOH erhält man farblose Kristalle.

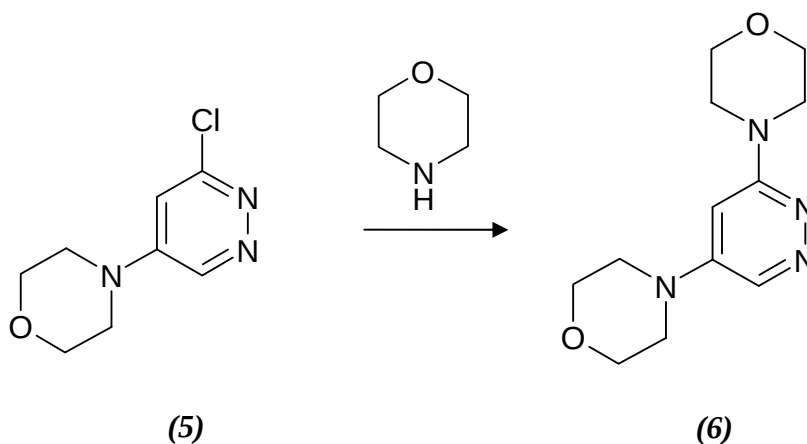
Ausbeute: 0.261 g (68%)

Schmelzpunkt: 118-120°C

Summenformel: C₈H₁₀ClN₃O

Molekulargewicht: 199.64

4,4'-Pyridazin-3,5-diylmorpholin (6) [42]



Eine Lösung von 0.26 g (1.3 mmol) 4-(6-Chlorpyridazin-4-yl)morpholin in Morpholin (10 ml) wird 50 h erhitzt. Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion mittels DC (Fließmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9 : 1), destilliert man das überschüssige Morpholin im Vakuum ab, neutralisiert mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und schüttelt mit etwa 4 x 40 ml CH_2Cl_2 aus. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Rückstand aus EtOH umkristallisiert. Es entstehen grünliche Kristalle.

Ausbeute: 0.14 g (43%)

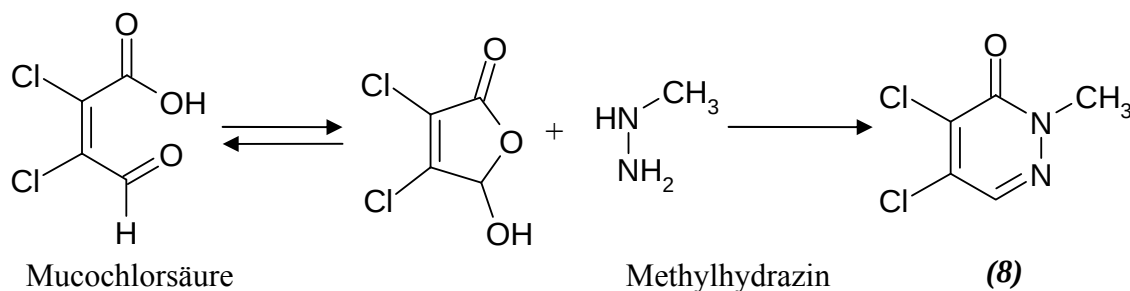
Schmelzpunkt: 258-259°C (Lit. [42]: 258-260°C)

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$

Molekulargewicht: 250.30

3.2.2.: Arbeitsvorschriften zu Abschnitt 2.1.2.

4,5-Dichlor-2-methylpyridazin-3(2H)-on (8) [37]



Zu einer Lösung von 25.0 g (150 mmol) Mucochlorsäure in 127.5 ml EtOH (96%) werden unter Eiskühlung 10.5 ml (150 mmol) Methylhydrazin zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wird unter Eiskühlung 1 h gerührt. Dabei bildet sich ein gelber Niederschlag. Anschließend wird 4 h zum Rückfluss erhitzt. Dann engt man die bräunlich gefärbte Lösung im Vakuum auf 75 ml ein und lässt abkühlen, worauf sich ein gelblicher Niederschlag bildet. Nach Filtration und Umkristallisation aus 90% EtOH erhält man farblose Kristalle.

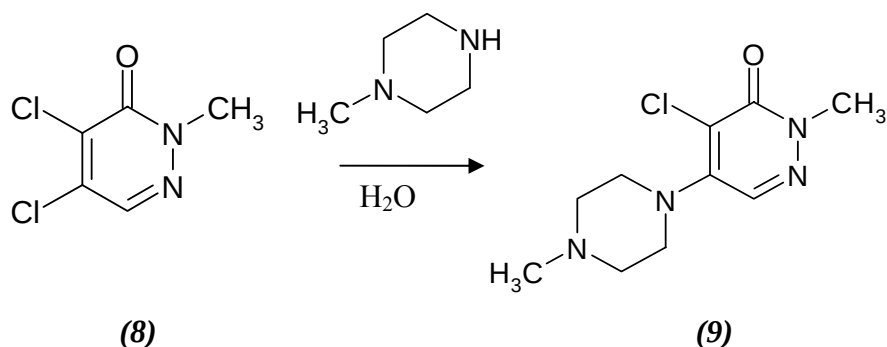
Ausbeute: 16.7 g (67%; Lit [37]: 72%)

Schmelzpunkt: 88°C (Lit [37]: 88-89°C)

Summenformel: C₅H₄Cl₂N₂O

Molekulargewicht: 179.01

4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on (9)



Ein Gemisch aus 8.95 g (50 mmol) 4,5-Dichlor-2-methylpyridazin-3(2H)-on [37] und 12.5 g 4-Methylpiperazin (125 mmol) in 150 ml H₂O wird 30 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Lösung im Vakuum eingedunstet, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 7-8 eingestellt und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingedampft. Die Substanz lässt man über Nacht im Kühlschrank auskristallisieren. Nach Umkristallisation aus EtOH erhält man farblose Kristalle.

Ausbeute: 7.97 g (66%)

Schmelzpunkt: 132-133°C

Summenformel: C₁₀H₁₅ClN₄O

Molekulargewicht: 242.71

Elementaranalyse:

berechnet	C = 49.49%	H = 6.23%	N = 23.08%
gefunden	C = 49.63%	H = 6.33%	N = 22.84%

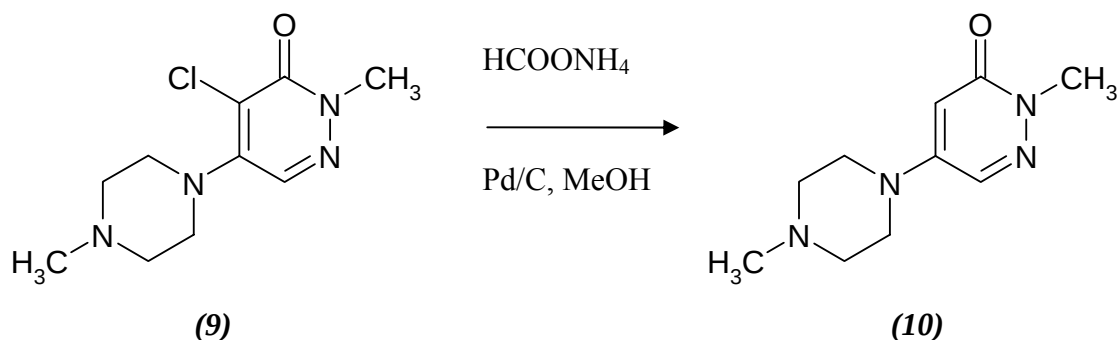
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 1) δ (ppm): 7.55 (s, 1H, H-6), 3.72 (s, 3H Pyridazin-NCH₃), 3.36-3.39 (m, 4H, CH₂), 2.50-2.53 (m, 4H, CH₂), 2.31 (s, 3H, Piperazin-NCH₃)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Tafel 2) δ (ppm): 158.5, 147.7, 130.4, 117.3, 54.7, 48.8, 46.0, 40.3

IR: (cm^{-1} , Tafel 3): 2952, 2935, 2842, 2790, 1631, 1588, 1457, 1403, 1190, 1146, 1007, 864, 667

MS: (Tafel 4): $m/z = 244$ (M^+ , 4%), 242 (M^+ , 18), 208 (4), 207 (35), 164 (5), 100 (7), 71 (26), 70 (17), 57 (14), 56 (19), 43 (100), 42 (70)

2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-3(2H)-on (10)



Zu einem Gemisch von 4.84 g (20 mmol) 4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-pyridazin-3(2H)-on und 1.14 g 10% Pd/C-Katalysator in 100 ml MeOH werden 2.90 g (46 mmol) Ammoniumformiat portionsweise zugegeben. Unter Argon-Atmosphäre wird zum Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels DC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) kontrolliert. Weitere Mengen an Ammoniumformiat werden hinzugefügt, bis kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist. Der Katalysator wird abfiltriert, mit MeOH gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wird in H₂O aufgenommen und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O gewaschen. Nach Trocknen (Na₂SO₄) und Eindampfen des Extraktes wird der farblose kristalline Rückstand aus einem Gemisch aus Ethylacetat und Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 2.57 g (62%)

Schmelzpunkt: 127-128°C

Summenformel: C₁₀H₁₆N₄O

Molekulargewicht: 208.27

Elementaranalyse:

berechnet	C = 57.67%	H = 7.74%	N = 26.90%
gefunden	C = 57.88%	H = 7.94%	N = 26.85%

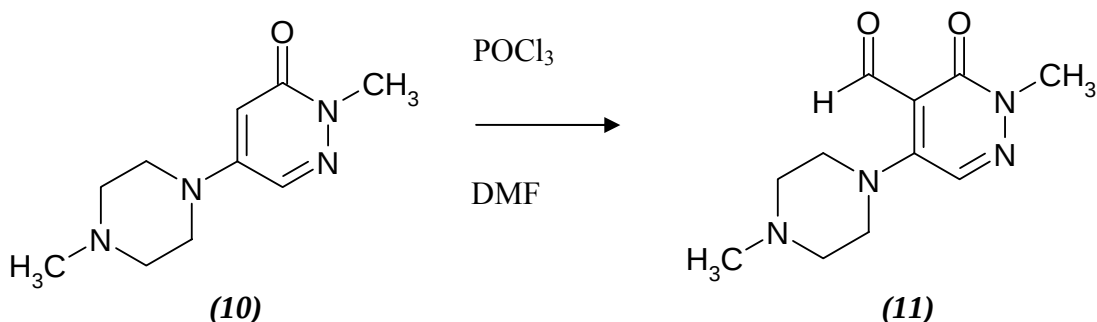
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 5) δ (ppm): 7.60 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-6), 5.88 (d, *J* = 2.7Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 3H, Pyridazin-NCH₃), 3.26-3.30 (m, 4H, CH₂), 2.46-2.49 (m, 4H, CH₂), 2.31 (s, 3H, Piperazin-NCH₃)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Tafel 6) δ (ppm): 161.7, 150.3, 128.8, 101.9, 54.1, 46.1, 46.0, 38.9

IR: (cm⁻¹, Tafel 7): 3068, 2945, 2846, 2792, 1633, 1586, 1444, 1336, 1241, 1143, 1005, 862, 686

MS: (Tafel 8): *m/z* = 209 (4%), 208 (M⁺, 29), 193 (4), 136 (9), 122 (6), 109 (7), 99 (7), 71 (33), 70 (94), 66 (23), 56 (20), 43 (100), 42 (67), 41 (12)

**2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd
(11)**



Eine Lösung von 416 mg (2 mmol) 2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on in 6.7 ml trockenem DMF wird im Eisbad auf etwa 5°C gekühlt. Eine Lösung von 0.41 ml (4.4 mmol) POCl₃ in 1.0 ml trockenem DMF wird tropfenweise zugegeben. Man lässt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt das Gemisch 10 min. Dann erwärmt man unter Rühren 75 min auf 70°C. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 15 g Eis versetzt und gerührt. Die erhaltene Lösung wird mit 2N NaOH auf pH 7-8 eingestellt und mit 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen des Extraktes entfernt man letzte Lösungsmittelreste bei 10⁻²mbar. Es verbleibt ein gelbliches wachsartiges Öl, das sich bei Lagerung im Tiefkühlschrank langsam verfestigt.

Ausbeute: 376 mg (80%)

Schmelzpunkt: 85-102°C

Summenformel: C₁₁H₁₆N₄O₂

Molekulargewicht: 236.28

Elementaranalyse:

berechnet	C = 55.92%	H = 6.83%	N = 23.71%
gefunden	C = 55.91%	H = 6.97%	N = 23.30%

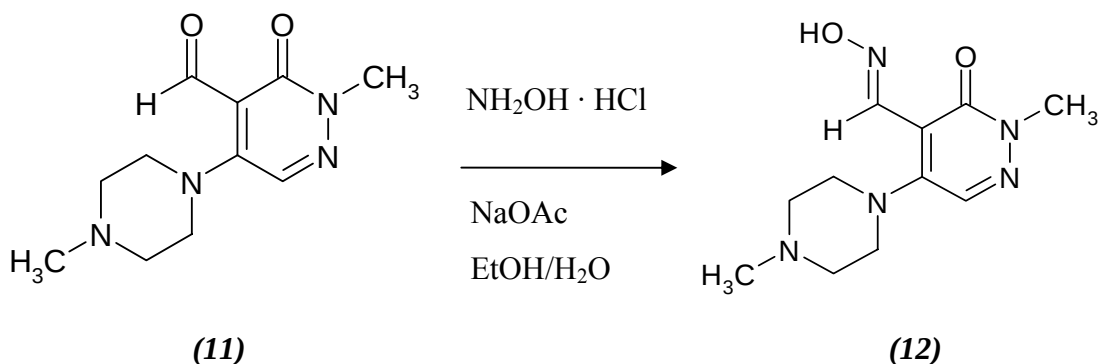
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 9) δ (ppm): 10.12 (s, 1H, CHO), 7.69 (s, 1H, H-6), 3.66 (s, 3H, Pyridazin-NCH₃), 3.47-3.50 (m, 4H, CH₂), 2.55-2.59 (m, 4H, CH₂), 2.32 (s, Piperazin-NCH₃)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Tafel 10) δ (ppm): 187.9, 162.8, 148.3, 129.6, 107.9, 54.9, 54.1, 51.5, 46.1, 45.8, 39.0

IR: (cm⁻¹, Tafel 11): 2946, 2919, 2799, 1662, 1623, 1516, 1457, 1304, 1144, 999, 919, 678

MS: (Tafel 12): m/z = 236 (12%), 208 (6), 138 (13), 110 (8), 71 (15), 70 (100), 58 (9), 56 (12), 43 (47), 42 (46)

***E*-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydoxim (12)**



472 mg (2 mmol) 2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd werden in 10 ml EtOH suspendiert, 181 mg (2.6 mmol) Hydroxylamin-HCl, sowie 213 mg (2.6 mmol) Natriumacetat in 3 ml H₂O zugegeben. Man erhitzt zum Rückfluss und kontrolliert den Reaktionsfortschritt mittels DC (CH₂Cl₂/MeOH, 9 : 1). Sobald kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist (etwa 3 h) wird das Gemisch im Vakuum eingeeengt, in 10 ml H₂O aufgenommen, mit konzentriertem NH₃ auf pH 7-8 eingestellt und mit etwa 12 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und nach Trocknung mit Na₂SO₄ unter vermindertem Druck eingedampft. Das ungereinigte Produkt enthält ein E/Z-Gemisch. Kristallisiert man es aus Ethylacetat um, so erhält man das reine *E*-Isomer als farblose Kristalle.

Ausbeute: 240 mg (48%)

Schmelzpunkt: 168-169°C

Summenformel: C₁₁H₁₇N₅O₂

Molekulargewicht: 251.29

Elementaranalyse:

berechnet	C = 52.58%	H = 6.82%	N = 27.87%
gefunden	C = 52.67%	H = 6.72%	N = 27.73%

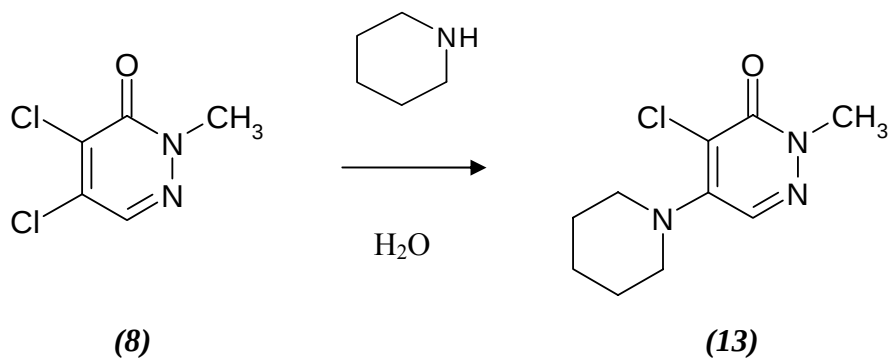
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 14) δ (ppm): 11.65 (br s, 1H, N-OH) 8.25 (s, 1H, HO-N=C-H; zeigt NOE bei Einstrahlung auf 11.65 ppm), 7.65 (s, 1H, H-6), 3.72 (s, 3H, Pyridazin-NCH₃), 3.33-3.36 (m, 4H, CH₂), 2.54-2.57 (m, 4H, CH₂), 2.35 (s, 3H, Piperazin NCH₃)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Tafel 15) δ (ppm): 160.2, 148.6, 143.6, 130.9, 111.1, 54.7, 50.3, 45.8, 39.9

IR: (cm⁻¹, Tafel 16): 3435, 3274, 2931, 2838, 2792, 1737, 1633, 1610, 1402, 1370, 1324, 1292, 1264, 1235, 1141, 1044, 1007, 971

MS: (Tafel 17): m/z = 252 (1%), 251 (1), 235 (8), 234 (62), 217 (16), 205 (8), 191 (12), 177 (25), 176 (16), 163 (18), 162 (13), 150 (14), 85 (37), 72 (50), 70 (69), 58 (43), 56 (27), 43 (86), 42 (100)

4-Chlor-2-methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on (13) [38]



Ein Gemisch aus 7.52 g (42 mmol) 4,5-Dichlor-2-methylpyridazin-3(2H)-on und 8.92 g (105 mmol) Piperidin in 150 ml H₂O wird 24 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 7-8 eingestellt und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingedampft. Nach Umkristallisation aus EtOH erhält man farblose Kristalle.

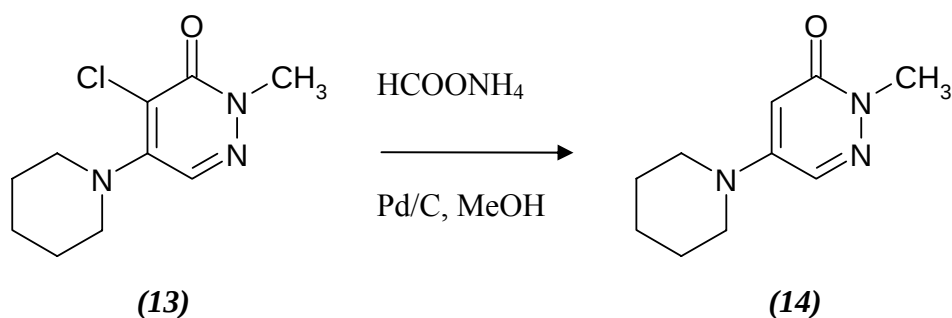
Ausbeute: 7.35 g (77%) (Lit [38]: 66-71%)

Schmelzpunkt: 62-63°C (Lit [38]: 62°C)

Summenformel: C₁₀H₁₄ClN₃O

Molekulargewicht: 227.70

2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on (14) [39]



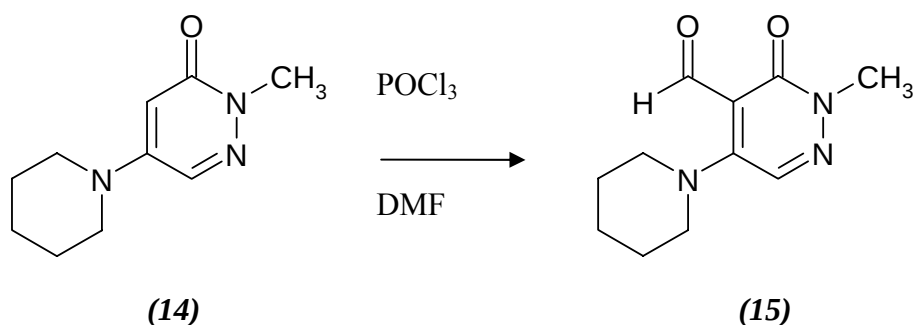
Zu einem Gemisch von 3.40 g (15 mmol) 4-Chlor-2-methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on, 75 ml MeOH und 855 mg Pd/C-Katalysator (10%) werden 290 mg (34.5 mmol) Ammoniumformiat portionsweise zugegeben. Unter Argon-Atmosphäre wird auf 70°C erwärmt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels DC (Fließmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 9 : 1) kontrolliert, bei Bedarf wird eine weitere Portion Ammoniumformiat zugegeben. Sobald kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist (etwa 4 h), wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in H₂O aufgenommen und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen des Extraktes unter vermindertem Druck wird der gelbe Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 2.05 g (72%)

Schmelzpunkt: 94-95°C (Lit [39]: 92-94°C)

Summenformel: C₁₀H₁₅N₃O

Molekulargewicht: 193.25

2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd (15)

Eine Lösung von 1.35 g (7 mmol) 2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on in 23.3 ml trockenem DMF wird im Eisbad auf etwa 5°C gekühlt. Eine Lösung von 1.44 ml (15.4 mmol) POCl₃ in 1 ml trockenem DMF wird tropfenweise zugegeben. Man lässt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt das Gemisch 10 min. Dann erwärmt man unter Rühren 75 min auf 70°C. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit etwa 15 g Eis versetzt und gerührt. Die erhaltene Lösung wird mit 2N NaOH auf pH 7-8 eingestellt und mit 4 x 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen des Extraktes entfernt man letzte Lösungsmittelreste bei 10⁻² mbar. Es verbleibt ein gelboranges wachsartiges Öl, das sich bei Lagerung im Tiefkühlschrank langsam verfestigt.

Ausbeute: 1.35 g (87%)

Schmelzpunkt: 78-79°C

Summenformel: C₁₁H₁₅N₃O₂

Molekulargewicht: 221.26

Elementaranalyse:

berechnet	C = 59.71%	H = 6.83%	N = 18.99%
gefunden	C = 59.80%	H = 6.83%	N = 18.81%

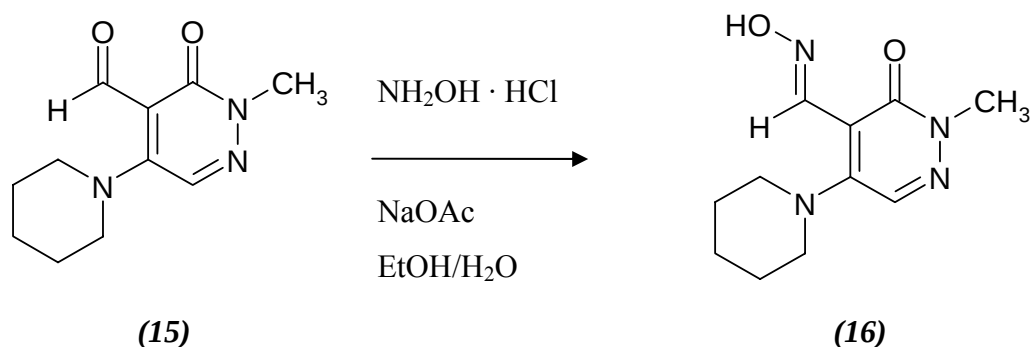
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 18) δ (ppm): 10.16 (s, 1H, CHO), 7.69 (s, 1H, H-6), 3.64 (s, 3H, NCH₃), 3.39-3.42 (m, 4H, NCH₂), 1.70-1.74 (m, 6H, CH₂)

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Tafel 19) δ (ppm): 187.7, 162.9, 148.4, 129.9, 107.3, 52.8, 38.8, 26.3, 23.4

IR: (cm^{-1} , Tafel 20): 2934, 2866, 1661, 1623, 1512, 1440, 1277, 1151, 1016, 861, 756, 669

MS: (Tafel 21): m/z = 222 (36%), 221 (M^+ , 87), 193 (38), 192 (35), 178 (14), 164 (66), 138 (48), 137 (34), 110 (100), 84 (36), 55 (34)

E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydoxim
(16)



Zu einer gut durchmischten Suspension von 663 mg (3 mmol) 2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd in 15 ml EtOH werden 320 mg (3.90 mmol) Natriumacetat, 271 mg (3.90 mmol) Hydroxylamin-HCl, sowie 3 ml H₂O zugegeben. Man erhitzt zum Rückfluss und kontrolliert den Reaktionsfortschritt mittels DC (Fließmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 9 : 1). Sobald kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist (ca. 3 h) wird im Vakuum eingeeengt, in 10 ml H₂O aufgenommen, mit NH₃ konz. auf pH 7-8 eingestellt und mit etwa 4 x 40 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingedampft. Nach Umkristallisieren aus Ethylacetat erhält man das reine E-Isomer als gelbliche Kristalle.

Ausbeute: 630 mg (89%)

Schmelzpunkt: 170-171°C

Summenformel: C₁₁H₁₆N₄O₂

Molekulargewicht: 236.28

Elementaranalyse:

berechnet	C = 55.92%	H = 6.83%	N = 23.71%
gefunden	C = 56.12%	H = 6.80%	N = 23.68%

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Tafel 22) δ (ppm): Signal des E-Isomers 11.31 (br s, 1H, N-OH), 8.06 (s, 1H, HO-N=C-H; zeigt NOE bei Einstrahlung auf 11.31 ppm), 7.65 (s, 1H, H-6), 3.73 (s, 3H, NCH₃), 3.18-3.22 (m, 4H, NCH₂), 1.60-1.70 (m, 6H, CH₂)

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Tafel 25) δ (ppm): 159.3, 150.6, 142.7, 130.6, 111.8, 77.4, 77.0, 76.58, 52.28, 40.10, 25.89, 23.77

IR: (cm^{-1} , Tafel 26): 3235, 2947, 2850, 1589, 1528, 1448, 1402, 1368, 1268, 1127, 1028, 969, 916, 706

MS: (Tafel 27): m/z = 237 (3%), 236 (M^+ , 6), 220 (14), 219 (100), 202 (20), 176 (23), 163 (8), 138 (20), 123 (18), 82 (16), 55 (21)

4. Literatur

- [1] P. Mátyus, B. Dajka Halász, Á Földi, N. Haider, D. Barlocco, K. Magyar: *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1285-1298 (2004).
- [2] P. Dunkel, A. Gelain, D. Barlocco, N. Haider, K. Gyires, B. Sperlágh, K. Magyar, E. Maccioni, A. Fadda, P. Mátyus: *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1827-1839 (2008).
- [3] S. Jalkanen, M. Salmi: *Embo J.*, **20**, 3893–3901 (2001).
- [4] J. Öhman, E. Jakobsson, U. Källström, A. Elmblad, A. Ansari, C. Kalderén, E. Robertson, E. Danielsson, A. Gustavsson, A. Varadi, J. Eklom, E. Holmgren, M. Doverskog, L. Abrahmsén, J. Nilsson: *Protein Expr. Purif.* , **46**, 321-331 (2006).
- [5] E. Jakobsson, J. Nilsson, U. Källström, D. Ogg, G. J. Kleywegt: *Acta Cryst.* F61, 274-278 (2005).
- [6] T. Obata: *Life Sci.*, **79**, 417-422 (2006).
- [7] J. Eklom: *Pharmacol. Res.*, **37**, 87-92 (1998).
- [8] M. P. Kalapos: *Chem-Biol. Interact.*, **171**, 251-271 (2008).
- [9] P. H. Yu, S. Wright, E. H. Fan, Z. R. Lun, D. Gubisne-Harberle: *Biochim. Biophys. Acta*, **1647**, 193– 199, (2003).
- [10] G. A. Lyles: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 259-274 (1996).
- [11] F. Yraola, S. Garcia-Vicente, J. Fernandez-Recio, F. Albericio, A. Zorzano, L. Marti, M. Royo: *J. Med Chem.*, **49**, 6197-6208 (2006).

- [12] F. Yraloa, S. Garcia-Vicente, L. Marti, F. Alberico, A. Zorzano, M. Royo: *Chem. Biol. Drug Des.*, **69**, 423-428 (2007).
- [13] F. Boomsma, U. M. Bhaggoe, A. M.B. van der Houwen, A. H. van den Meiracker: *Biochim. Biophys. Acta* **1647**, 193– 199 (2003).
- [14] M. Hernandez, M. Solé, M. Boada and M. Unzeta: *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1763**, 164-173 (2006).
- [15] A. Mc Donald, K. Tipton, J. O’Sullivan, A.Olivieri, G.Davey, A.M. Coonan, W. Fu – *J. Neural Transm.*, **114**, 783-786, (2007).
- [16] M. Salmi, G. G. Yegutkin, R. Lehvonen, K. Koskinen, T. Salminen and S. Jalkanen: *Immunity*, **14**, 265-276 (2001).
- [17] S. Bour, D. Daviaud, S. Gres, C. Lefort, D. Prévot, A. Zorzano, M. Wabitsch, J.-S. Saulnier-Blache, P. Valet, C. Carpéné: *Biochimie*, **89**, 916-925 (2007).
- [18] F. Boomsma, H. Hut, U. Bhaggoe, A. van der Houwen, A. van der Meiracker: *Med. Sci. Monitor*, **11**, RA122-126 (2005).
- [19] V. Roessner, A. Weber, A. Becker, G. Beck, J. Kornhuber, H. Frieling, S. Bleich – *Prog. Neuro-Psychoph.*, **30**, 906-909 (2006).
- [20] A. Wobus, Dissertation, Universität Wien, 2007.
- [21] L. Airas, J. Mikkola, J. M. Vainio, I. Elovaara, D. J. Smith: *J. Neuroimmunol.*, **177**, 132-135 (2006).
- [22] L. M. Salter-Cid, E. Wang, A. M. O’Rourke, A. Miller, H. Gao, L. Huang, A. Garcia, M. D. Linnik: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 553-562, (2005).
- [23] F. Buffoni, V. Bertini, G. Dini: *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **13**, 253-266 (1998).

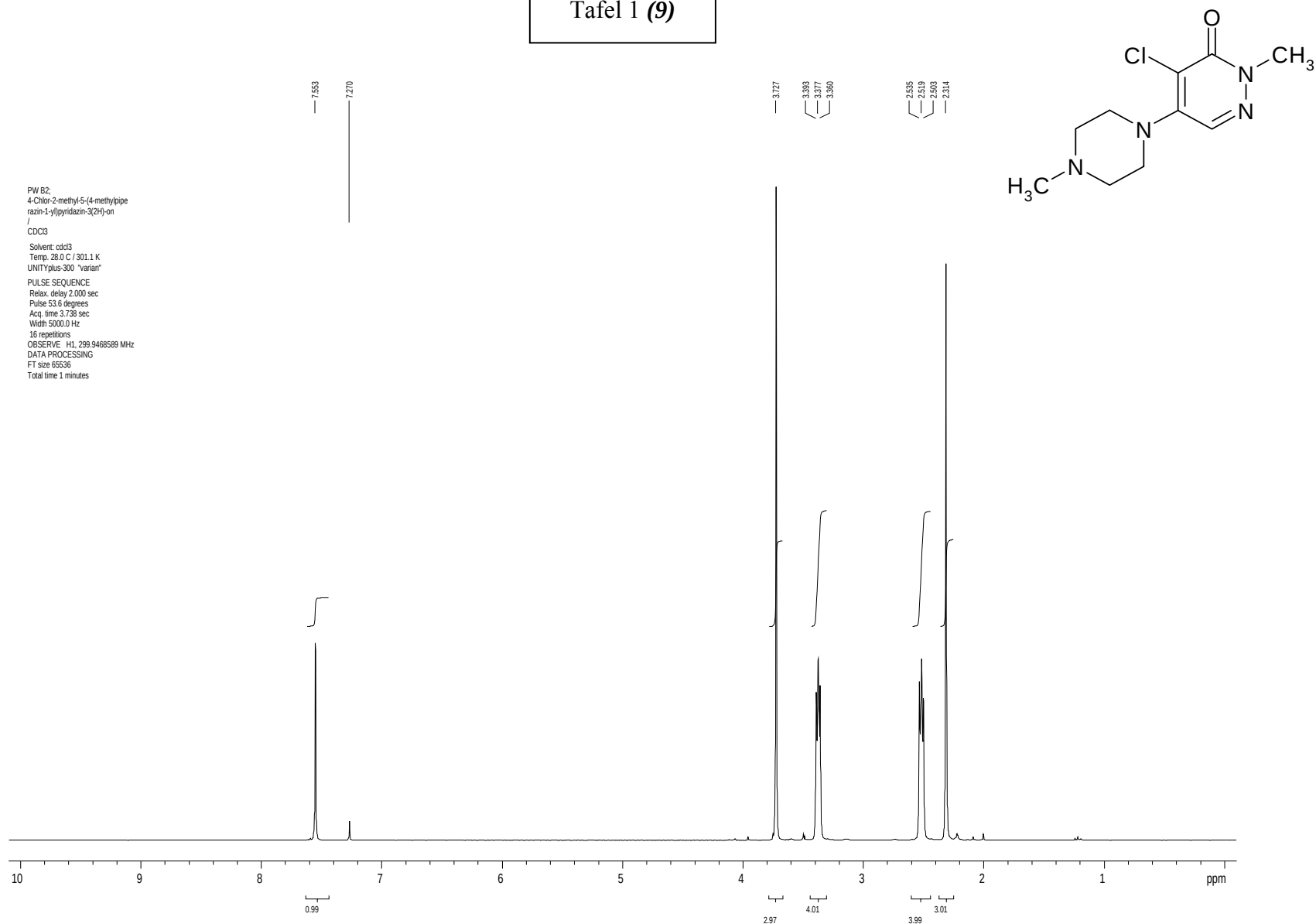
- [24] P. H. Yu, B. Davis, Y. Deng: *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 741 (2001).
- [25] E. M. Shepard, H. Heggem, G. A. Juda, D. M. Dooley: *Biochim. Biophys. Acta*, **1647**, 252– 259, (2003).
- [26] A. A. H. Farghaly, Dissertation, Universität Assiut, 2001
- [27] V. Bertini, F. Lucchesini, M. Pocci, A. De Munno: *Heterocycles*, **41**, 675-688 (1995).
- [28] V. Bertini, F. Buffoni, G. Ignesti, N. Picci, S. Trombino, F. Iemma, S. Alfei, M. Pocci, F. Lucchesini, A. De Munno: *J. Med. Chem.*, **48**, 664-670 (2005).
- [29] I. Hochholdinger, Diplomarbeit, Universität Wien, 2005.
- [30] P. Mátyus, persönliche Mitteilung.
- [31] N. Haider, Y.H. Wang, unpublizierte Ergebnisse
- [32] E. Breitmaier, G. Jung, Organische Chemie – Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (2005), S. 689-690.
- [33] W. Beyer, Lehrbuch der organischen Chemie, 24. Auflage (2004), S. Hirzel Verlag, Stuttgart, S. 837.
- [34] N. P. Peet: *J. Heterocycl. Chem.*, **21**, 1389-1392 (1983).
- [35] H. Nagashima, H. Oda, T. Hayakawa, K. Kaji: *Heterocycles* **26**, 1-4 (1987).
- [36] P. Mátyus, G. Rabloczky, L. Jaszlits, J. Kosary, M. Kurthy, B. Papp Behr, D. Zara, E. Karpati, A. Kovacs et al.: *PCT Int. Appl.*, WO9212137 (1992); *Chem. Abstr.* 117:234029.

- [37] S.-F. Chen, R. P. Panzica: *J. Org. Chem.*, **46**, 2467-2473 (1981).
- [38] J. Bourdais: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1964**, 2124-2132
- [39] F. Farina, M. V. Martin, A. Tito: *An. Quim.*, **77**, 188-195 (1981).
- [40] M. Takaya, M. Sato, K. Terashima, H. Tanizawa, Y. Maki, *J. Med. Chem.* **22**, 53-58 (1979)
- [41] K. Kaju, H. Mori, I. Yoshida, T. Ichii, H. Nagashima, R. N. Castle: *Gifu Yakka Daigaku Kiyo* **17**, 66-82 (1967)
- [42] R. S. Fenton, J. K. Landquist, S. E. Meek: *J. Chem. Soc.*, **1972**, 2323-2326

5. Anhang

5.1. Spektren

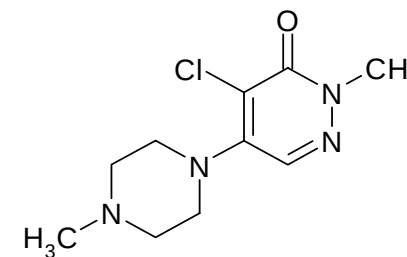
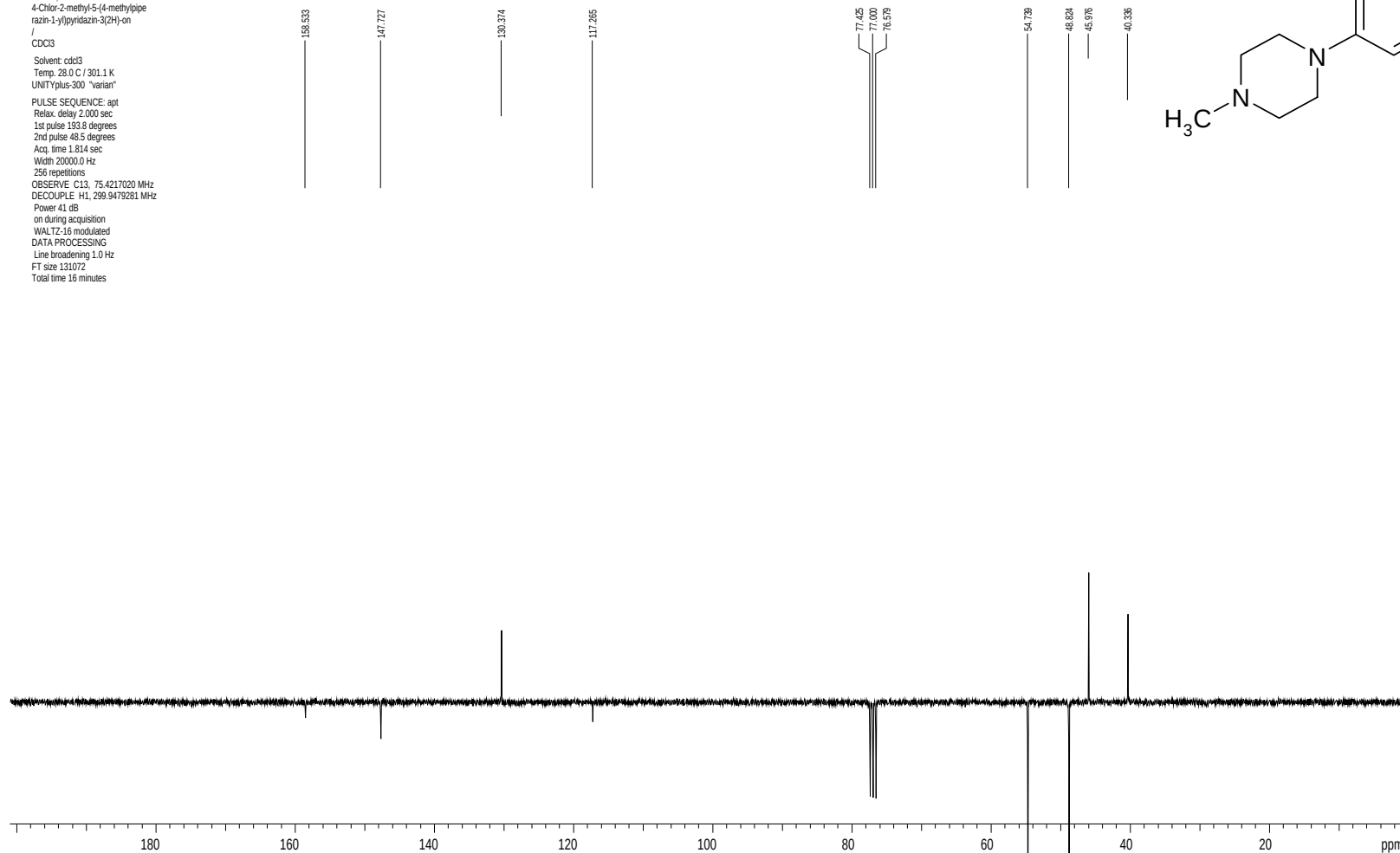
Tafel 1 (9)



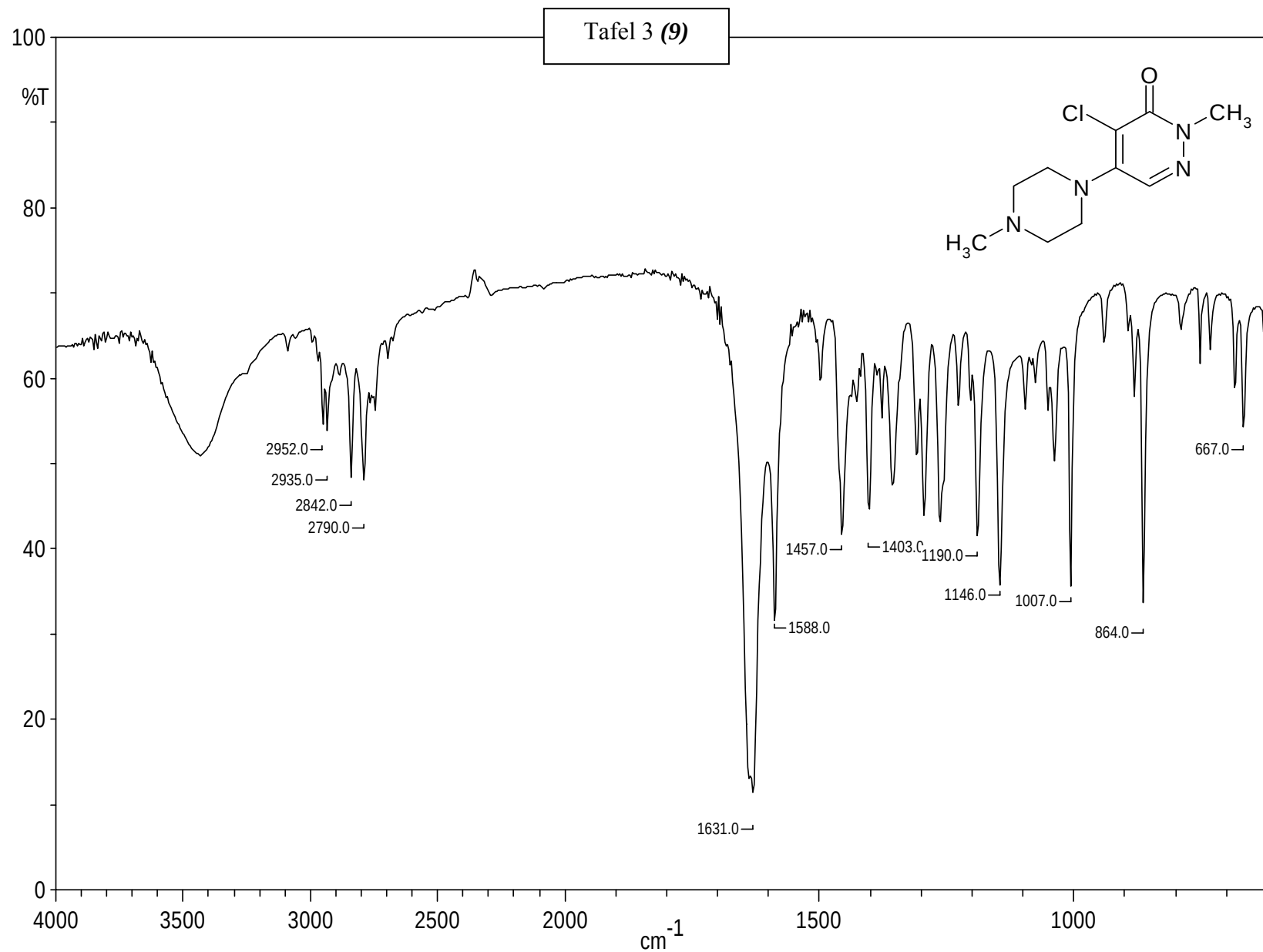
4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on

Tafel 2 (9)

PW B2:
4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on
/
CDCl₃
Solvent: cdc13
Temp. 28.0 C / 301.1 K
UNITYplus-300 "varian"
PULSE SEQUENCE: apt
Relax. delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq. time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217020 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 16 minutes

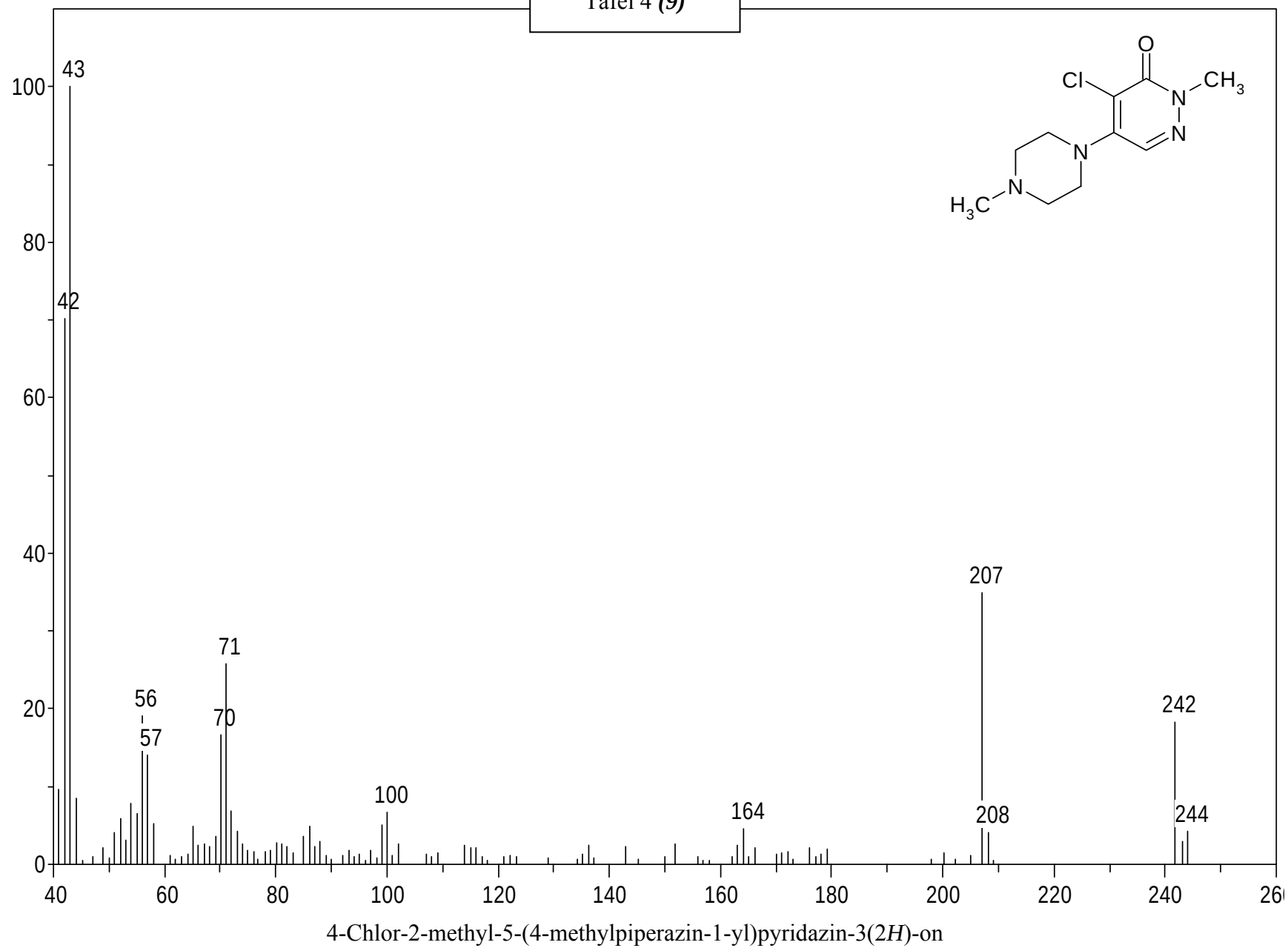


4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on

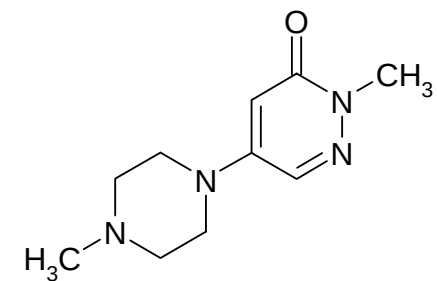
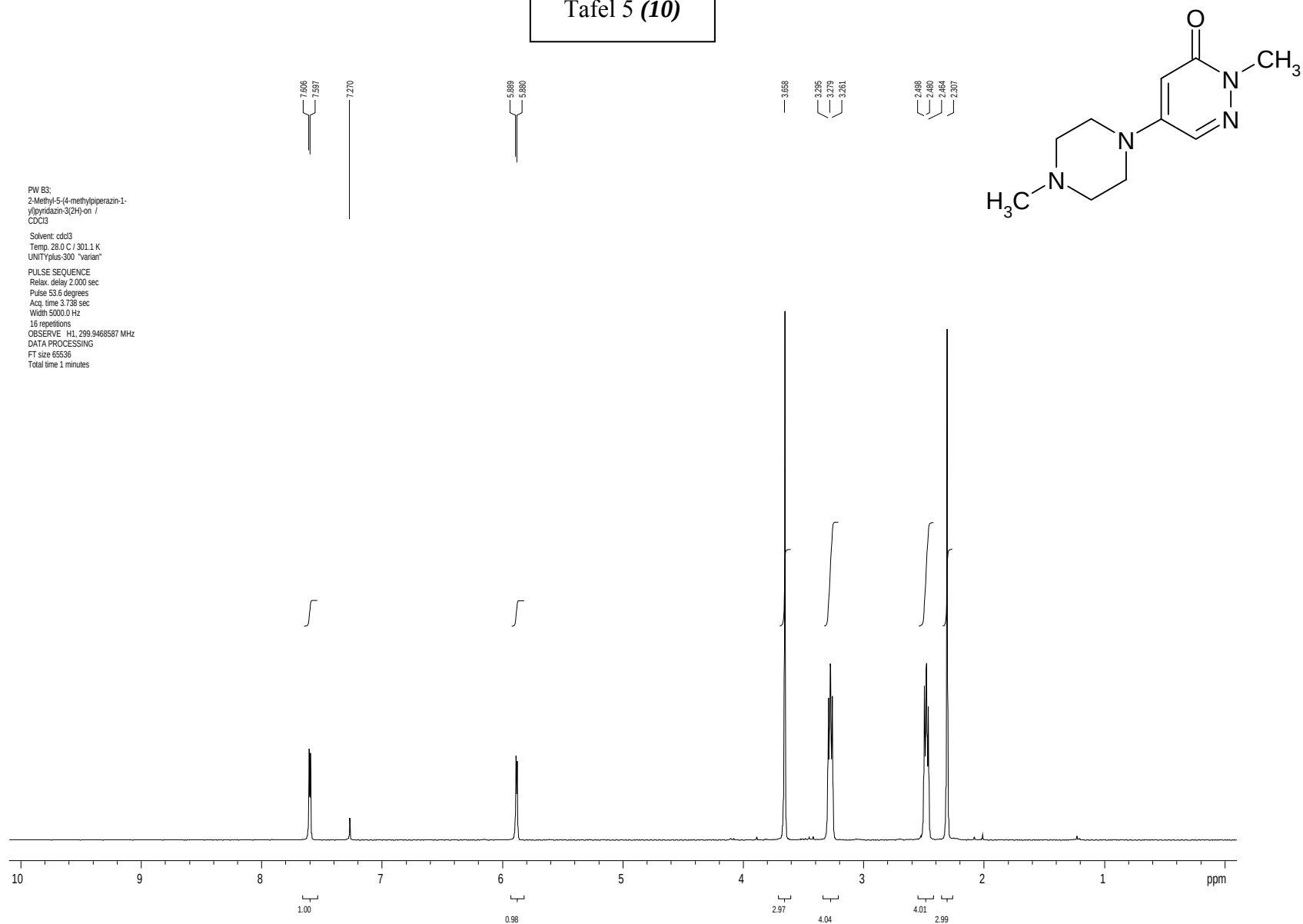


4-Chlor-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on

Tafel 4 (9)



Tafel 5 (10)

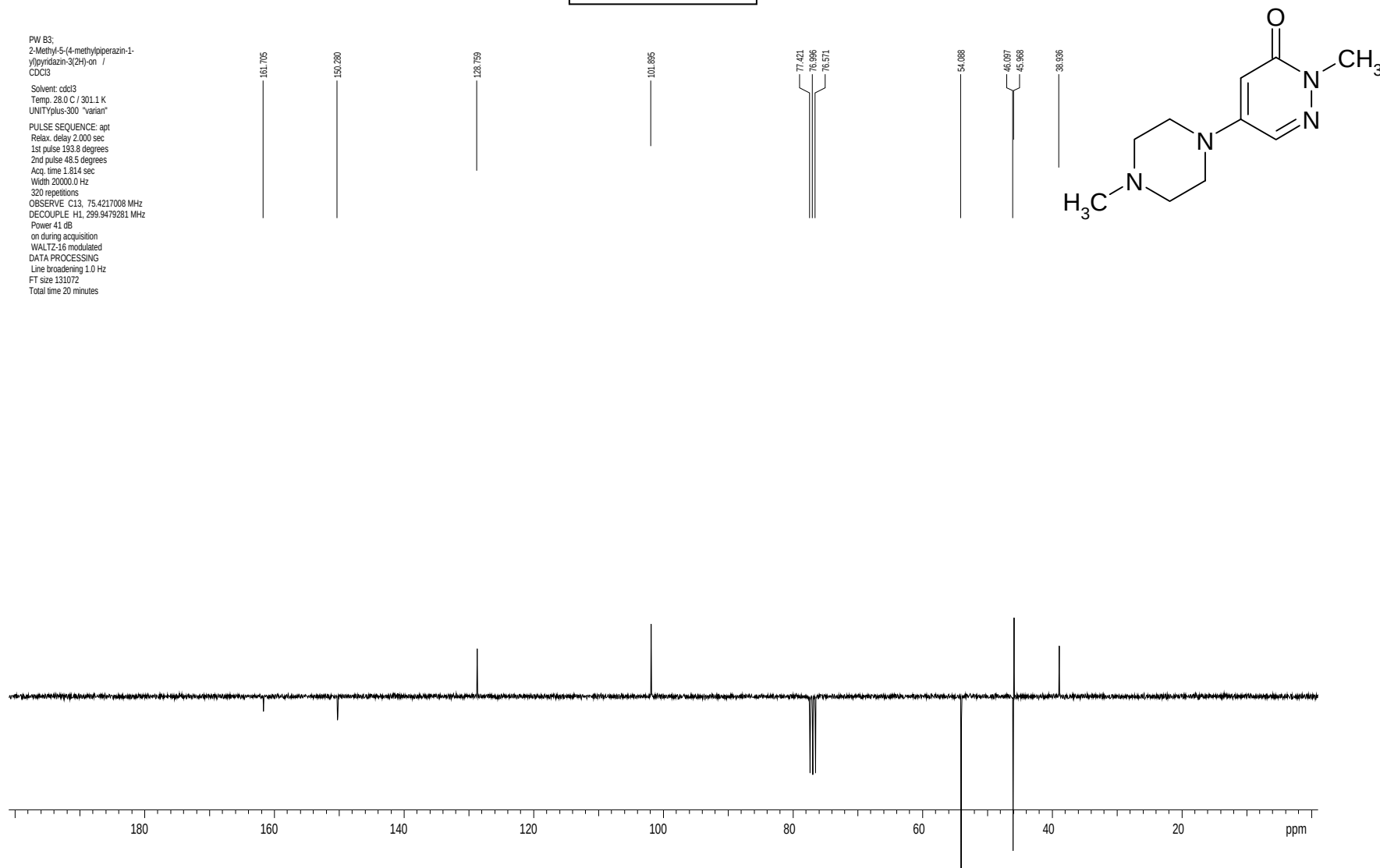


2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-3(2H)-on

Tafel 6 (10)

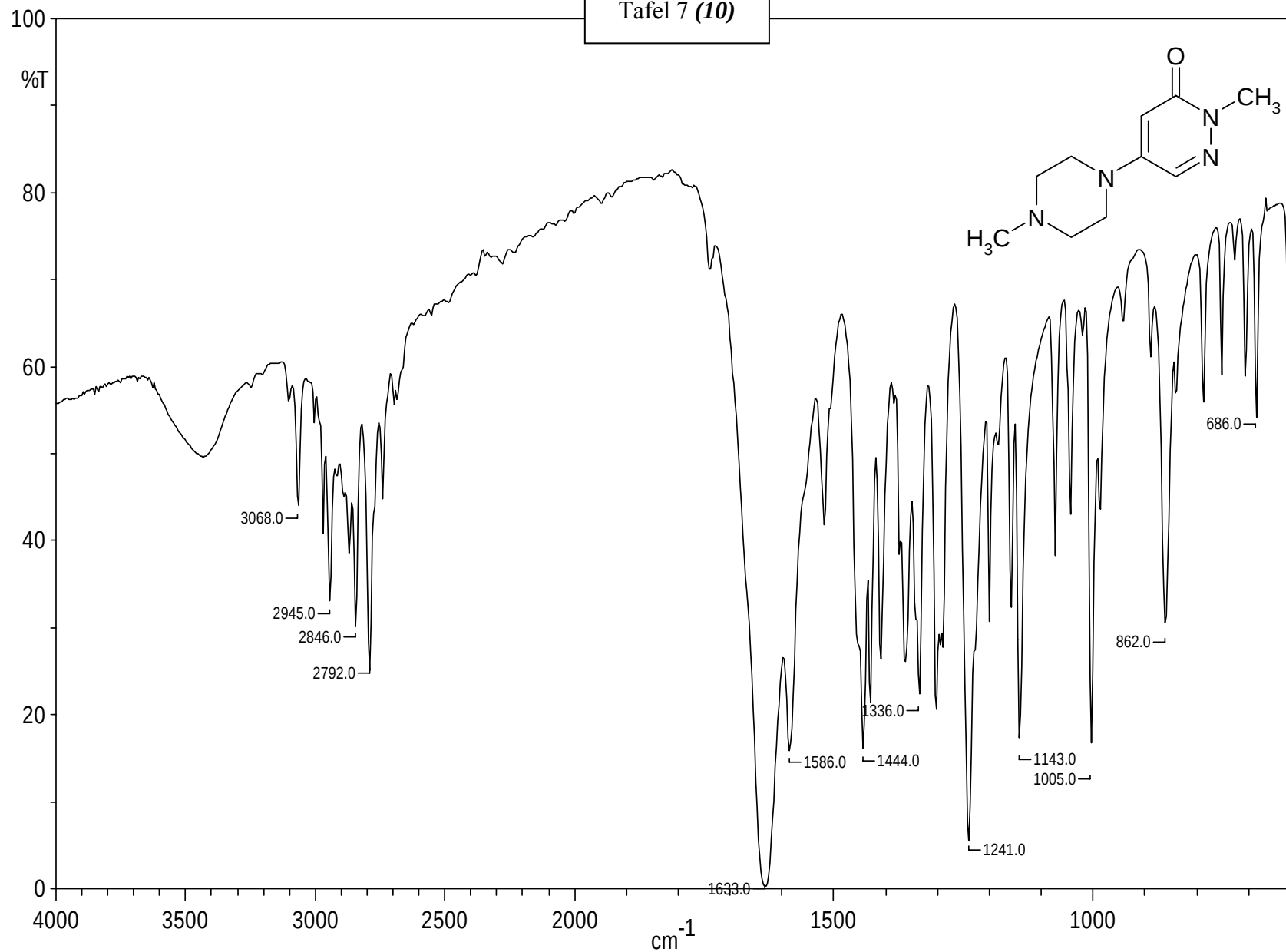
PW B3;
2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on /
CDCl₃

Solvent: cdcl₃
Temp. 28.0 C / 301.1 K
UNITYplus-300 "varian"
PULSE SEQUENCE: apt
Relax. delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq. time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
320 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217008 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 20 minutes



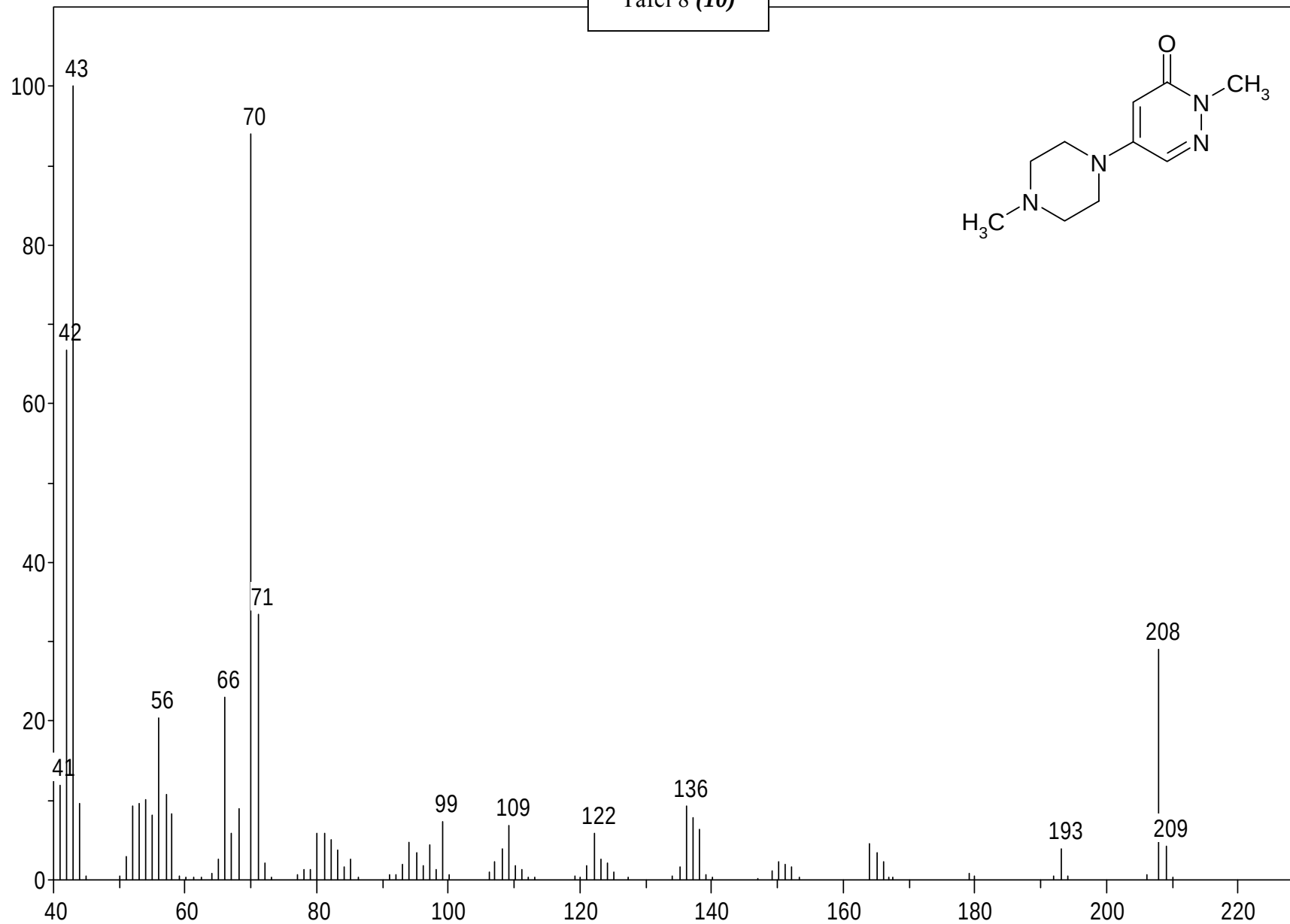
2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-3(2H)-on

Tafel 7 (10)



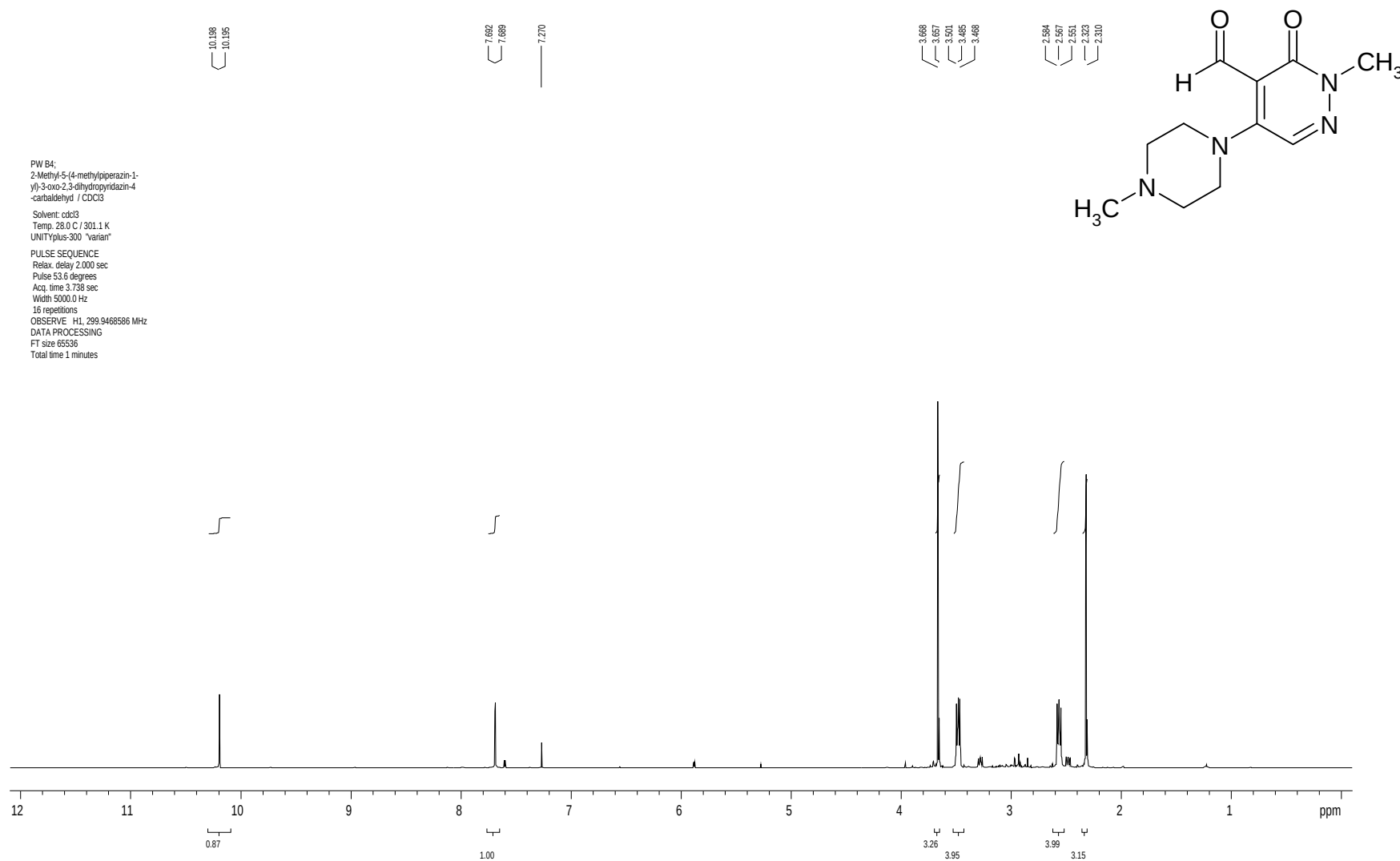
2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-3(2H)-on

Tafel 8 (10)



2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-3(2H)-on

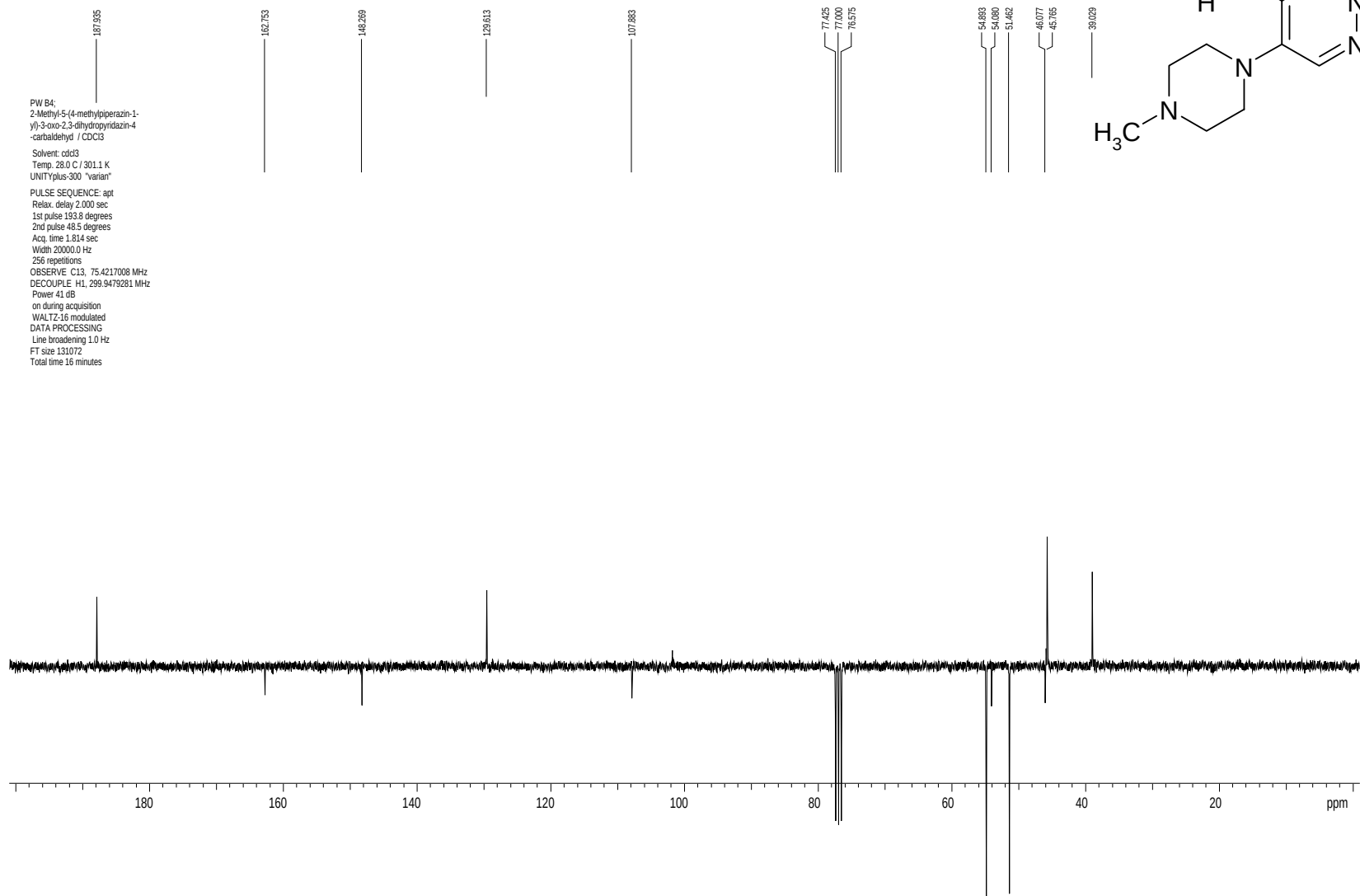
Tafel 9 (11)



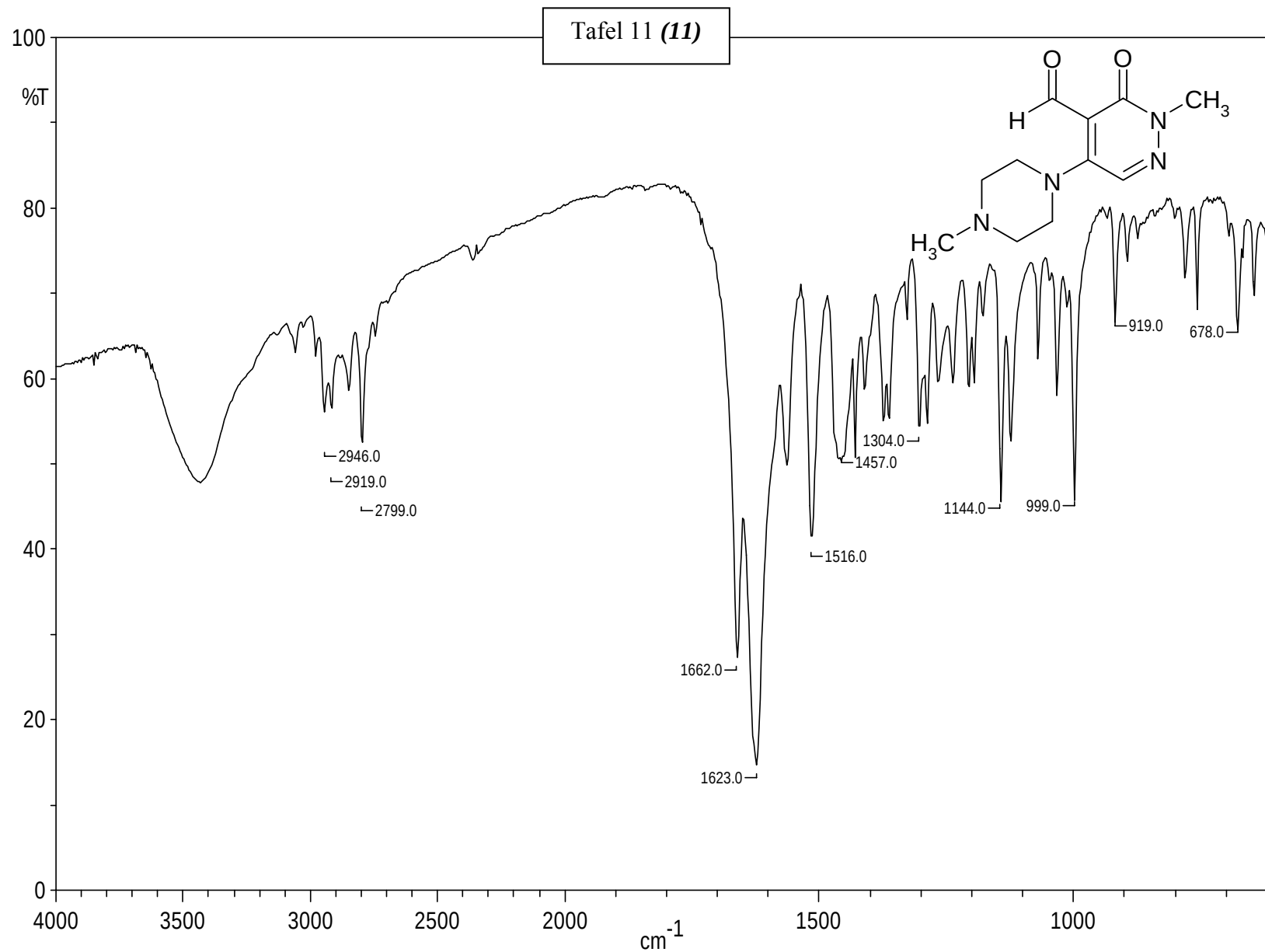
2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

Tafel 10 (**11**)

PW B4:
2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd / CDCl₃
Solvent: cdc3
Temp. 28.0 C / 301.1 K
UNITYplus-300 "varian"
PULSE SEQUENCE: apt
Relax. delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq. time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217008 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 16 minutes

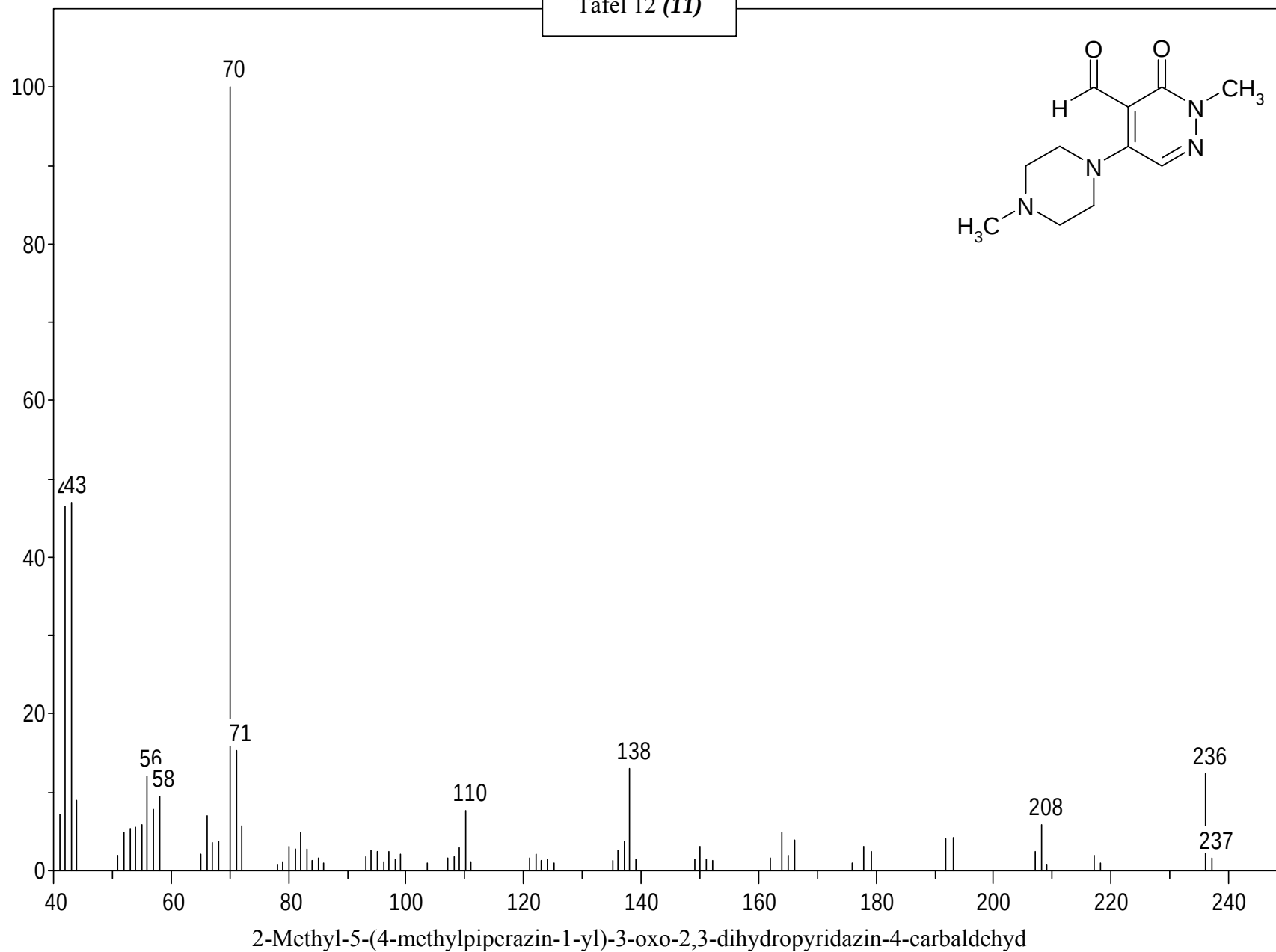


2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

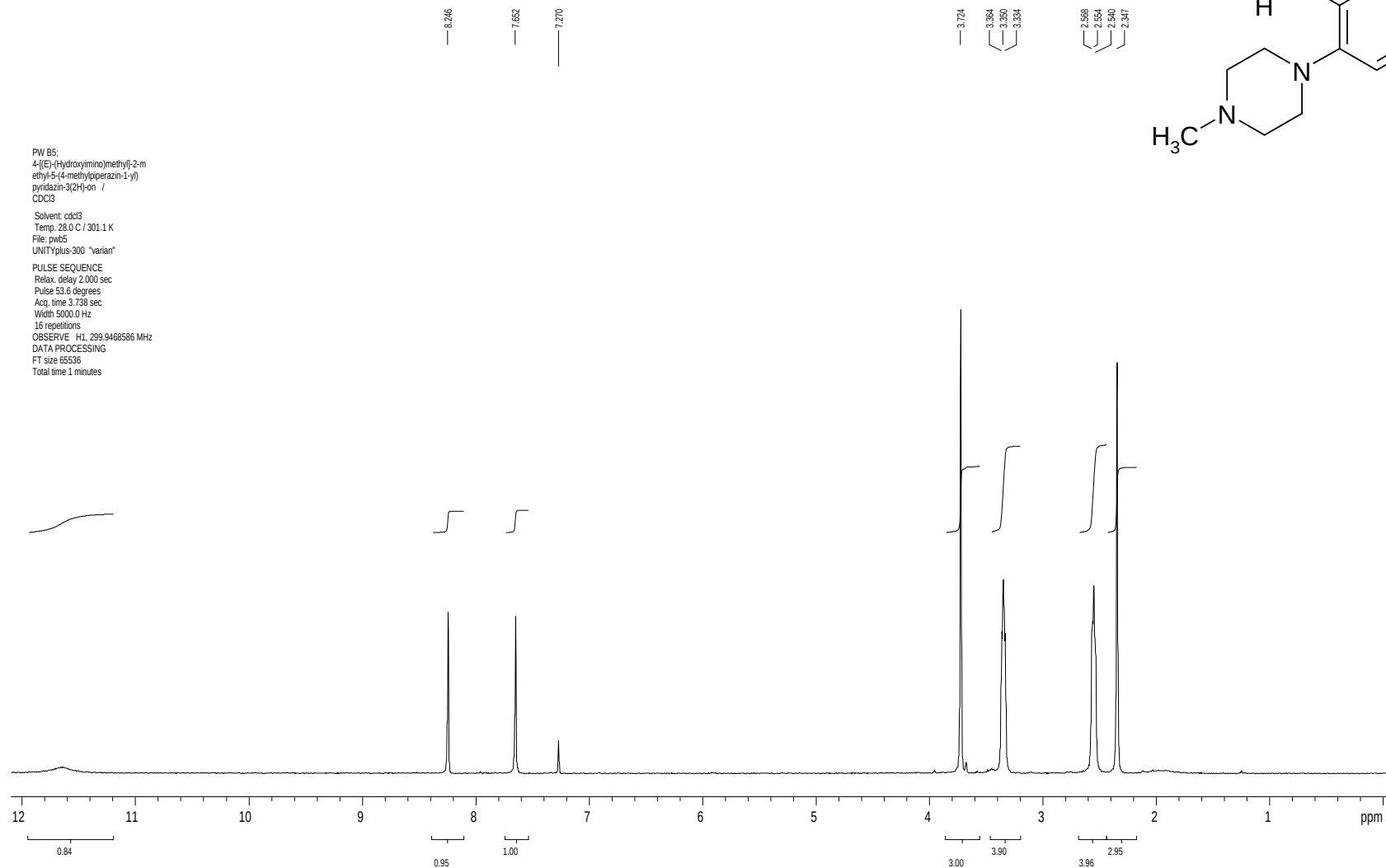


2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

Tafel 12 (**11**)



Tafel 13 (12)



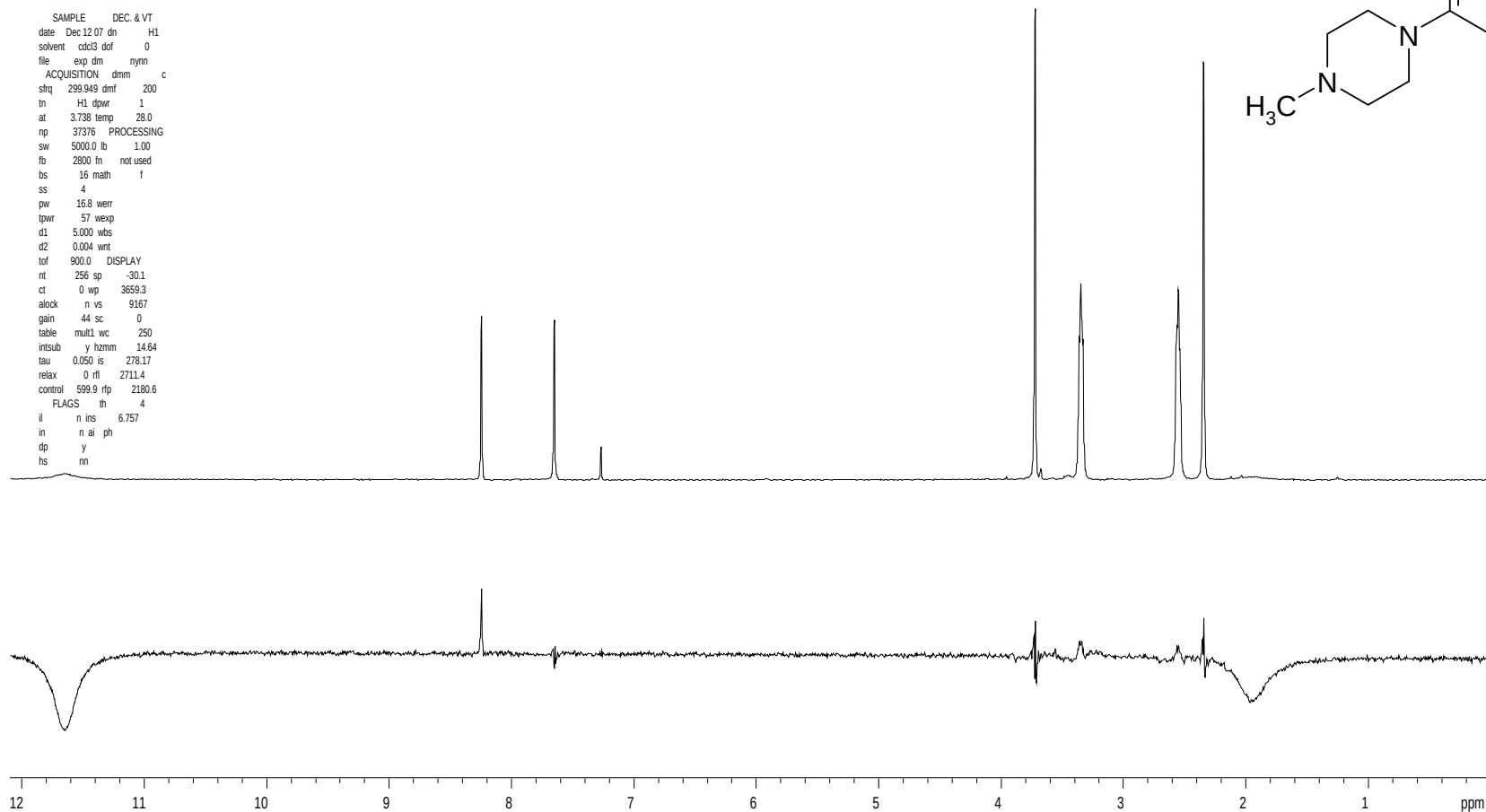
E-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydixim

Tafel 14 (12)

PW 85, 4-[(E)-(Hydroxyimino)methyl]-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on / CDCl₃

exp3 noeph

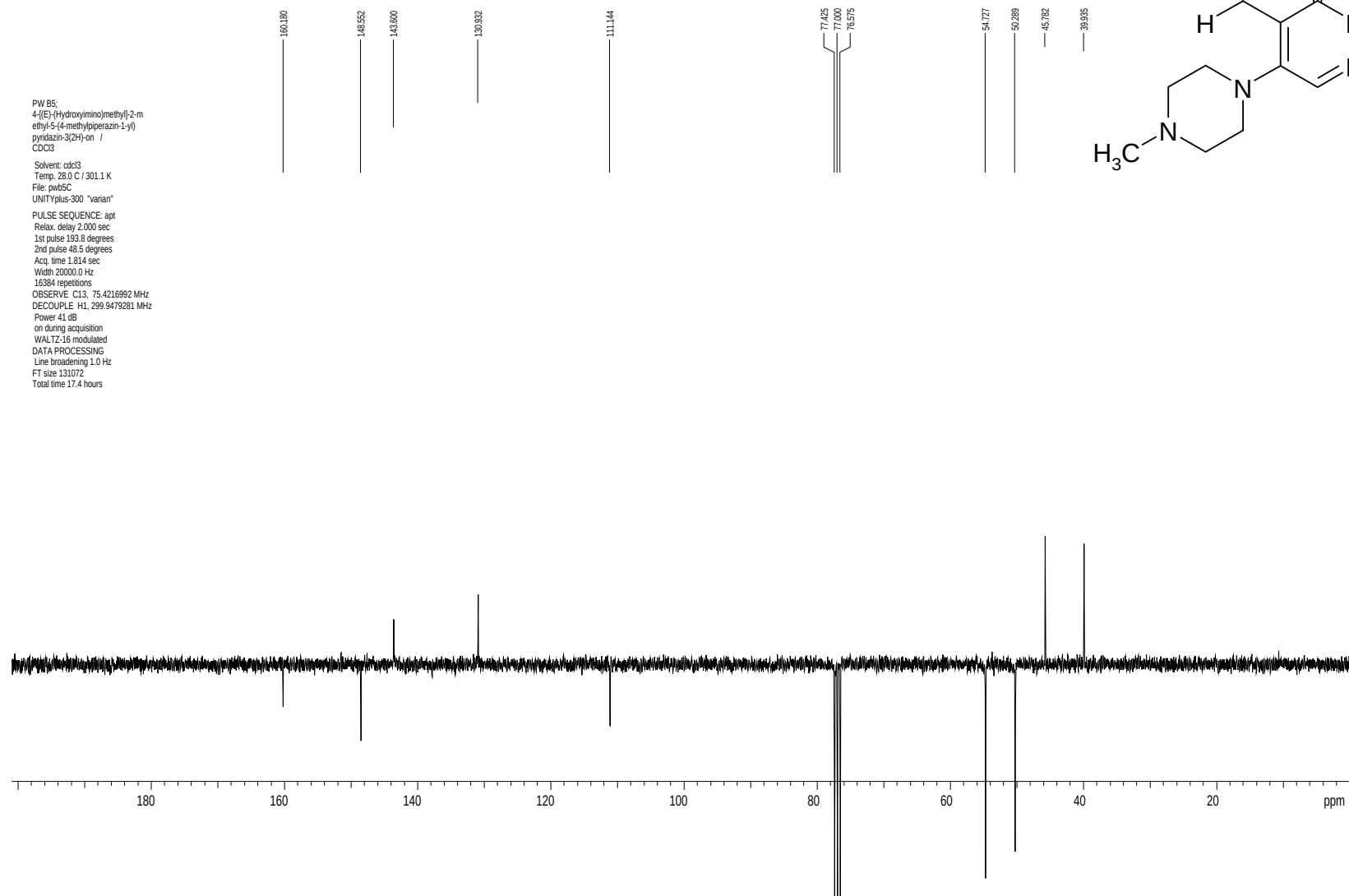
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 12 07 dn H1
solvent cdcl3 dof 0
file exp dm nynn
ACQUISITION dnm c
sfreq 299.949 dmf 200
tn H1 dpwr 1
at 3.738 temp 28.0
np 37376 PROCESSING
sw 5000.0 lb 1.00
fb 2800 fn not used
bs 16 math f
ss 4
pw 16.8 werr
tpwr 57 wexp
d1 5.000 vbs
d2 0.004 wmt
tof 900.0 DISPLAY
nt 256 sp -30.1
ct 0 wp 3659.3
alock n vs 9167
gain 44 sc 0
table mult1 wc 250
intsub y hznm 14.64
tau 0.050 is 278.17
relax 0 rfi 2711.4
control 599.9 rfp 2180.6
FLAGS th 4
il n ins 6.757
in n ai ph
dp y
hs nn



E-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydroxim

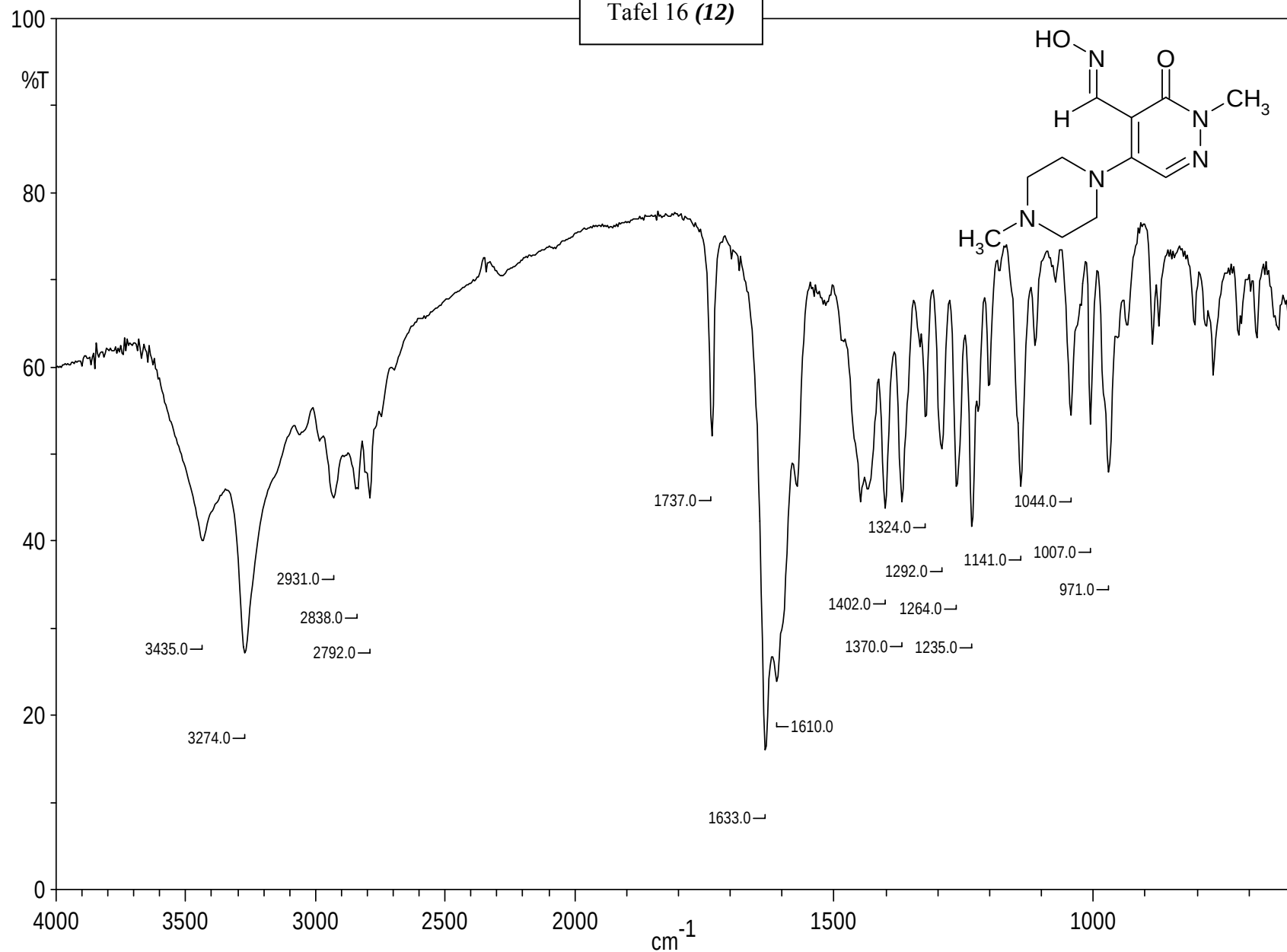
Tafel 15 (12)

PW 85;
4-[(E)-(Hydroxyimino)methyl]-2-methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on / CDCl₃
Solvent: cdcl₃
Temp. 28.0 C / 301.1 K
File: pw85C
UNITYplus-300 "variant"
PULSE SEQUENCE: apt
Relax. delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq. time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
16384 repetitions
OBSERVE C13, 75.4216992 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 17.4 hours



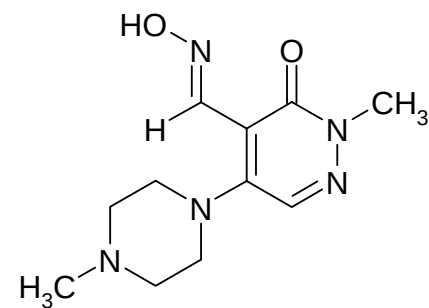
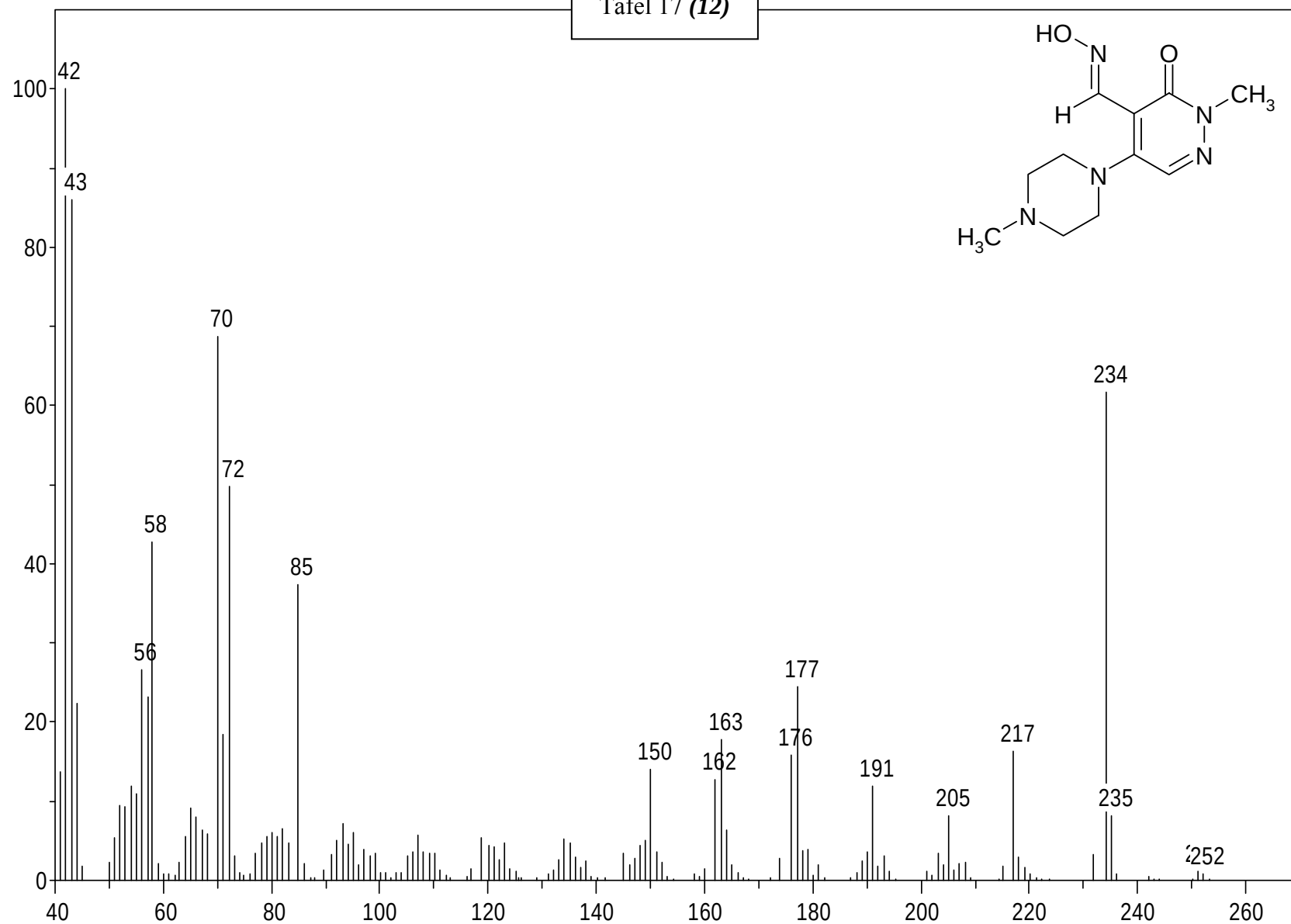
E-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydoxim

Tafel 16 (12)



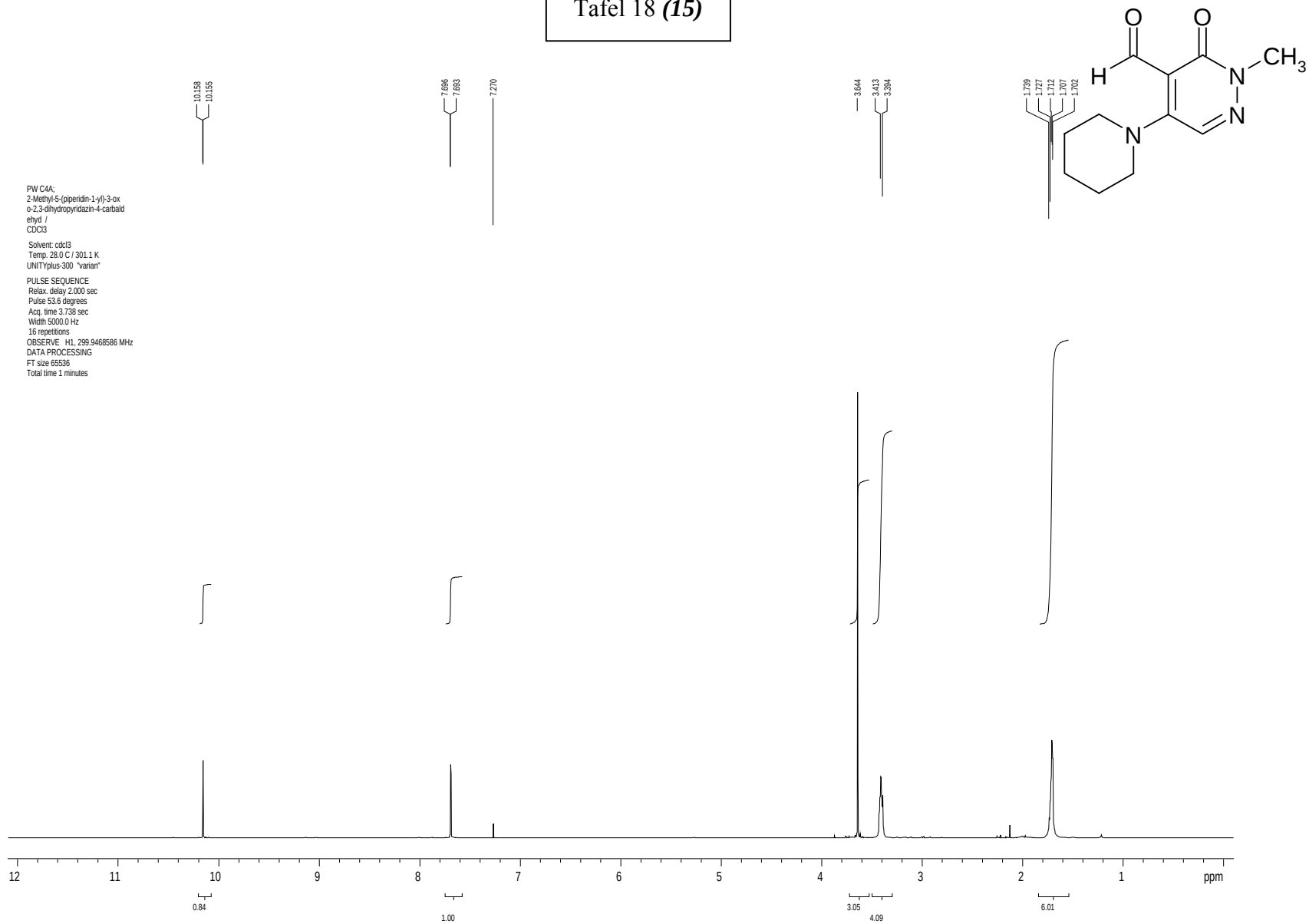
E-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydoxime

Tafel 17 (12)



E-2-Methyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehydooxim

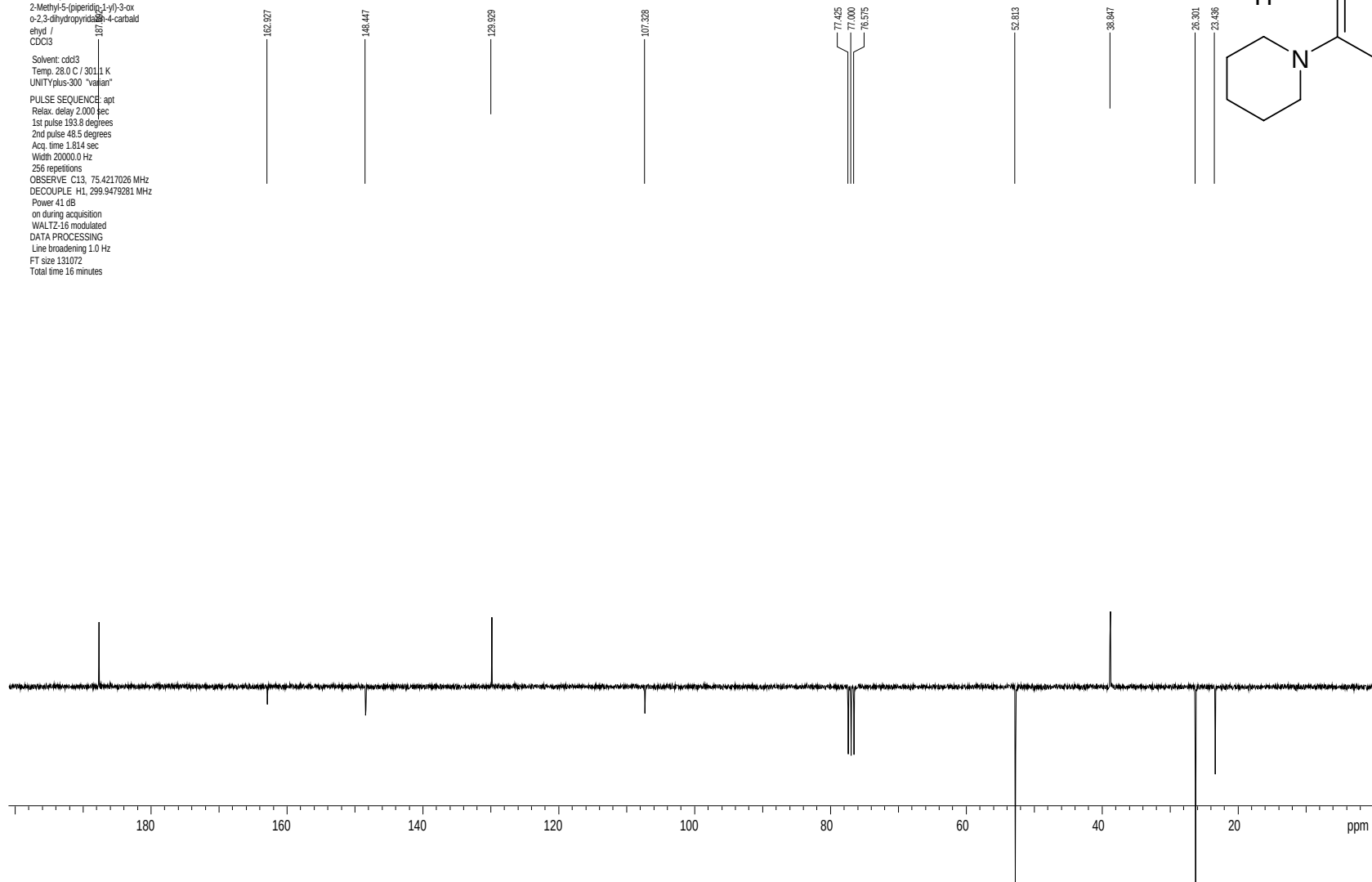
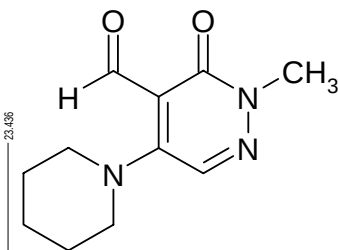
Tafel 18 (15)



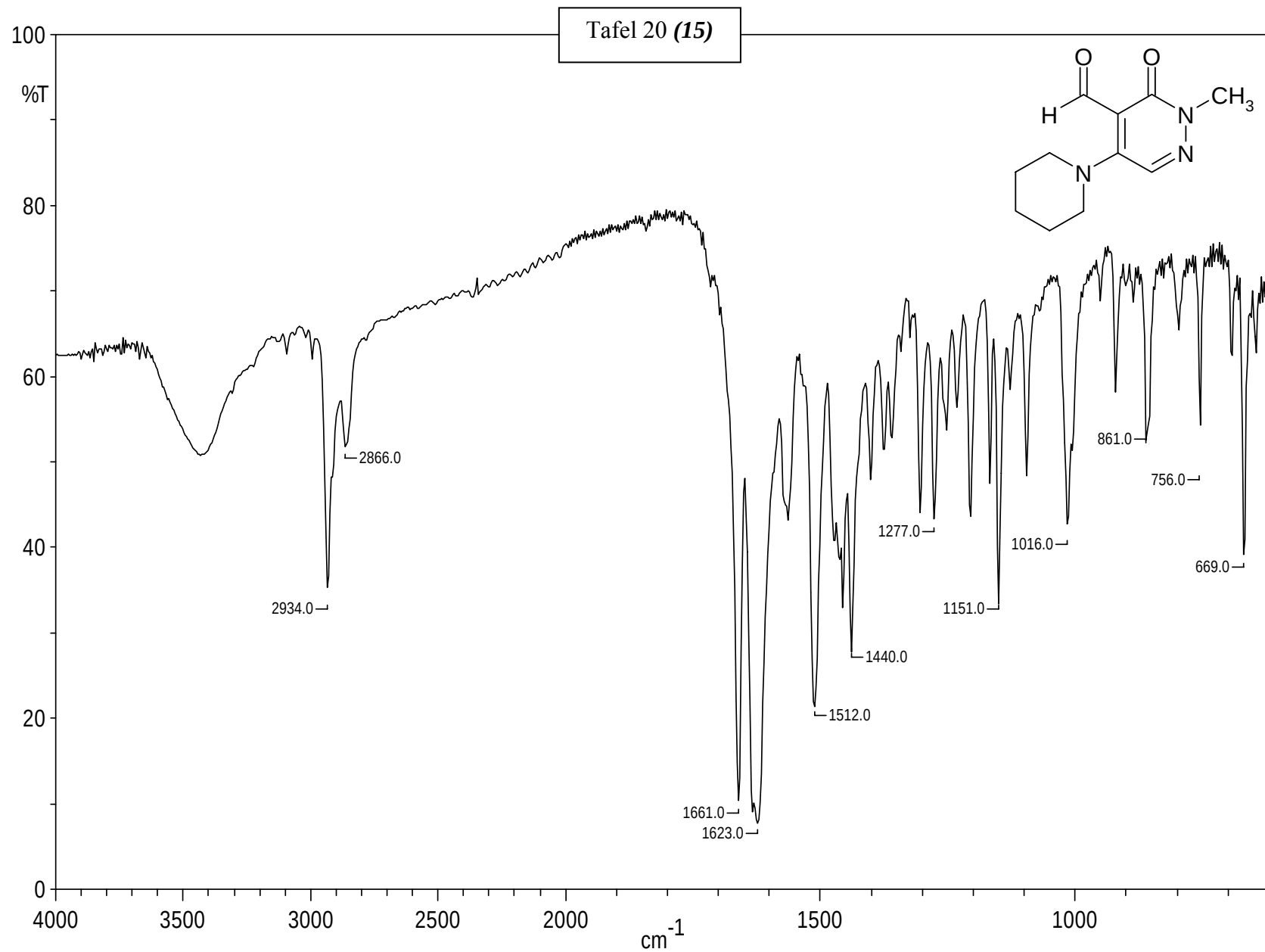
2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

Tafel 19 (15)

PW C4A:
2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-
o-2,3-dihydropyridazin-4-carbalde
ehyd /
CDCl3
187
Solvent: cdd3
Temp: 28.0 C / 301.1 K
UNITYplus-300 "varian"
PULSE SEQUENCE: apt
Relax. delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq. time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217026 MHz
DECOUPLE: H1, 299.9478261 MHz
Power 41.0B
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 16 minutes

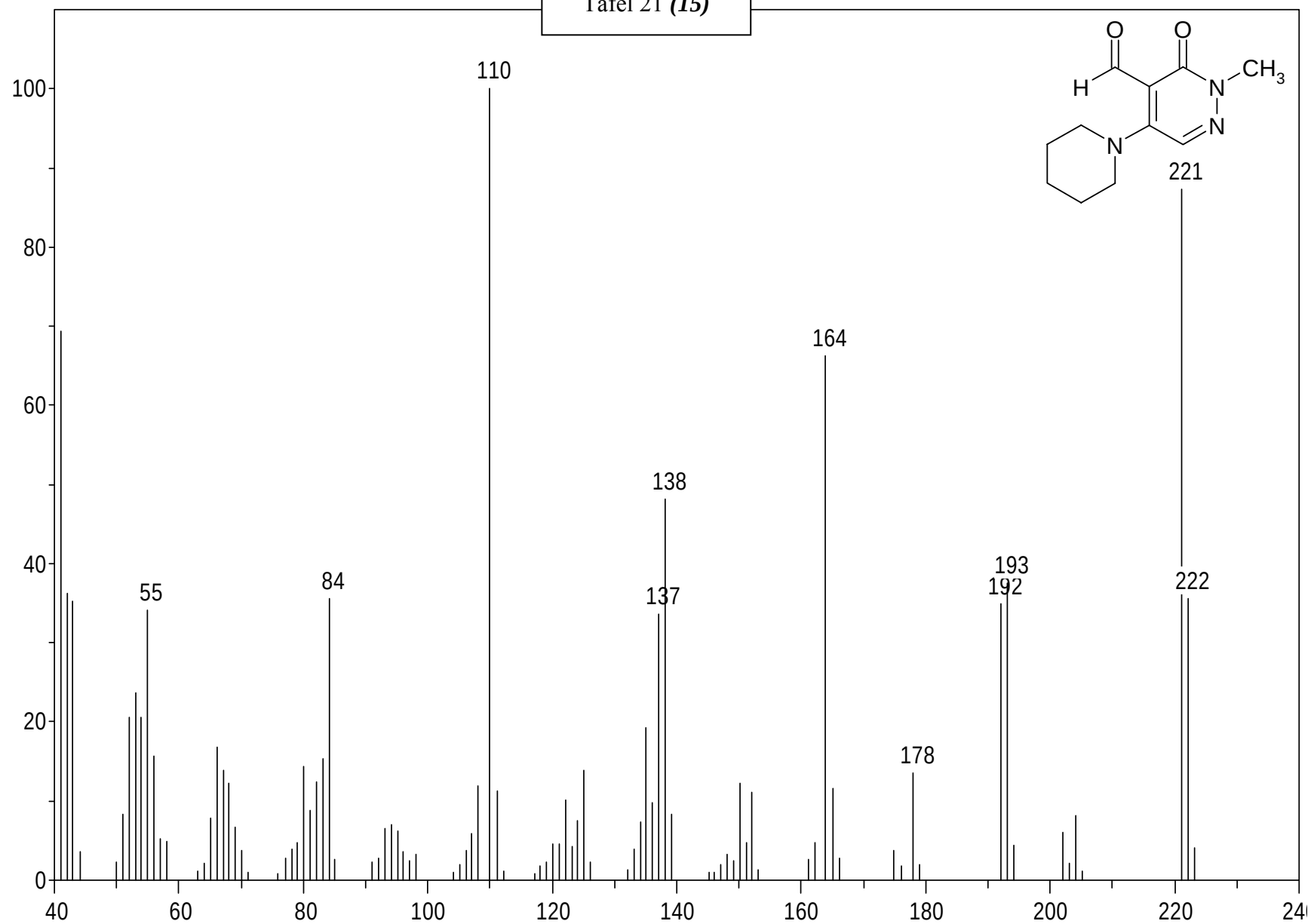


2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd



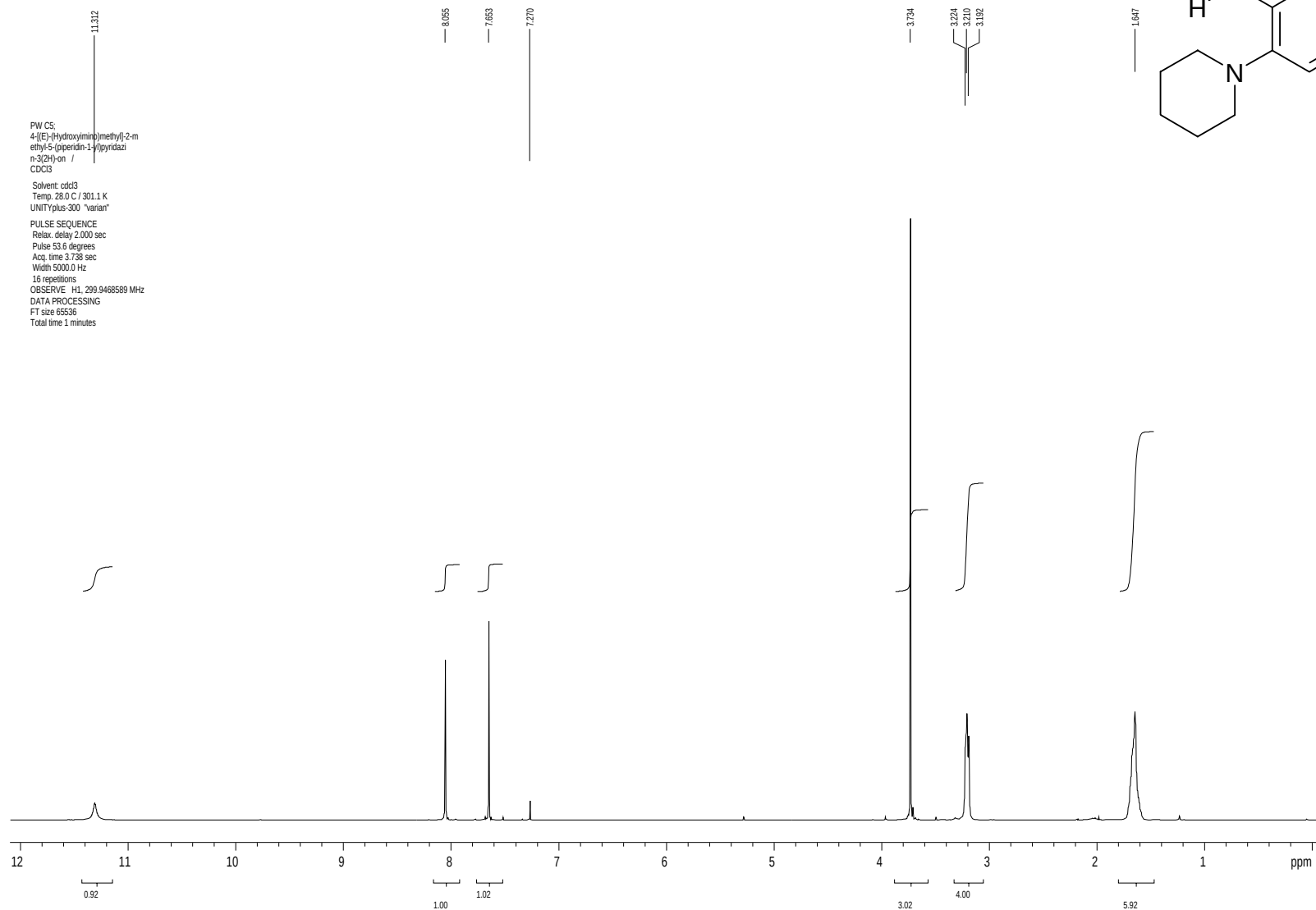
2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

Tafel 21 (15)



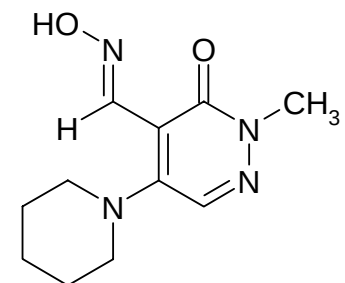
2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazin-4-carbaldehyd

Tafel 22 (16)



E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydoxim

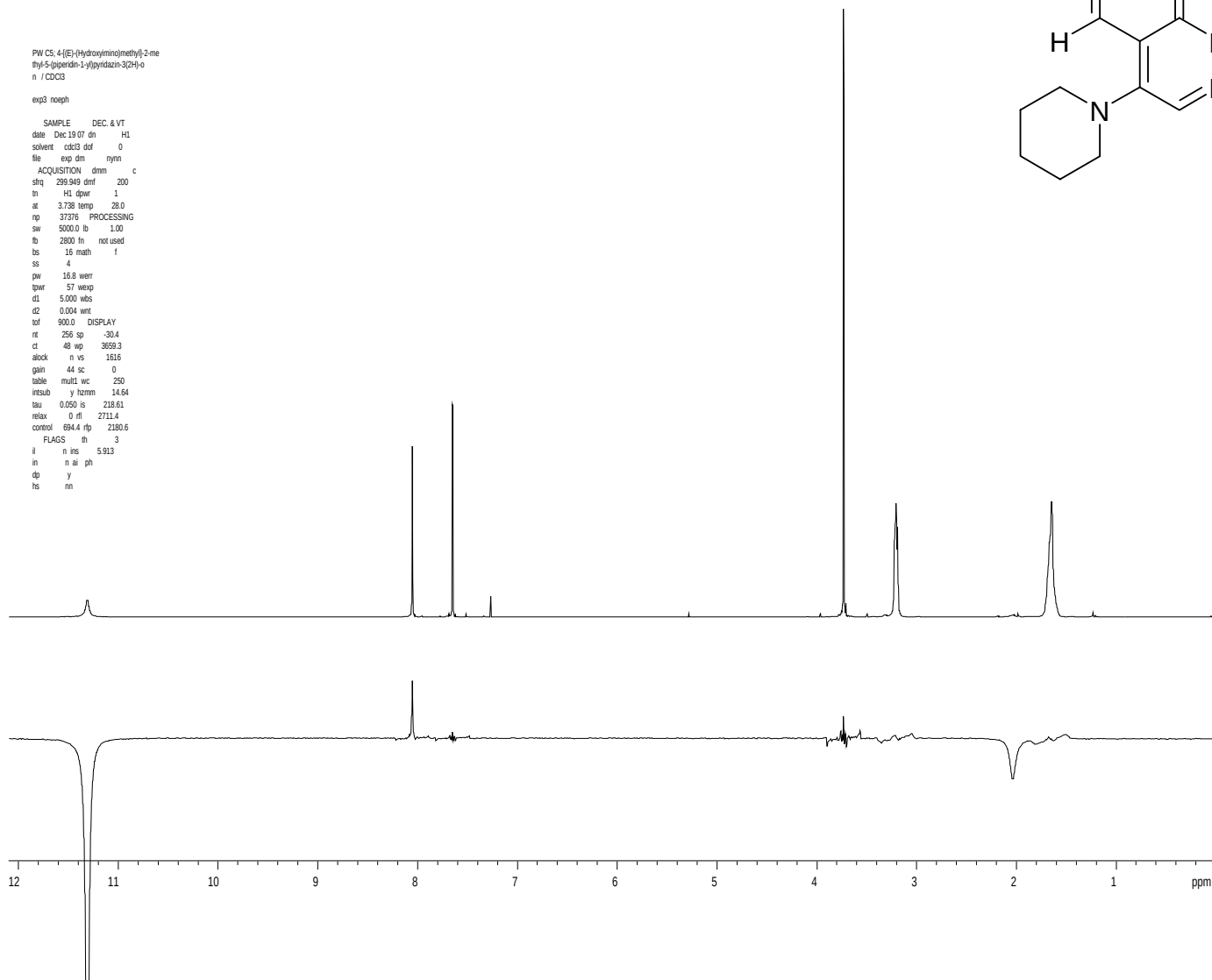
Tafel 23 (16)



PW C5, 4-[E]-(Hydroxyimino)methyl-2-methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-one / CDCl3

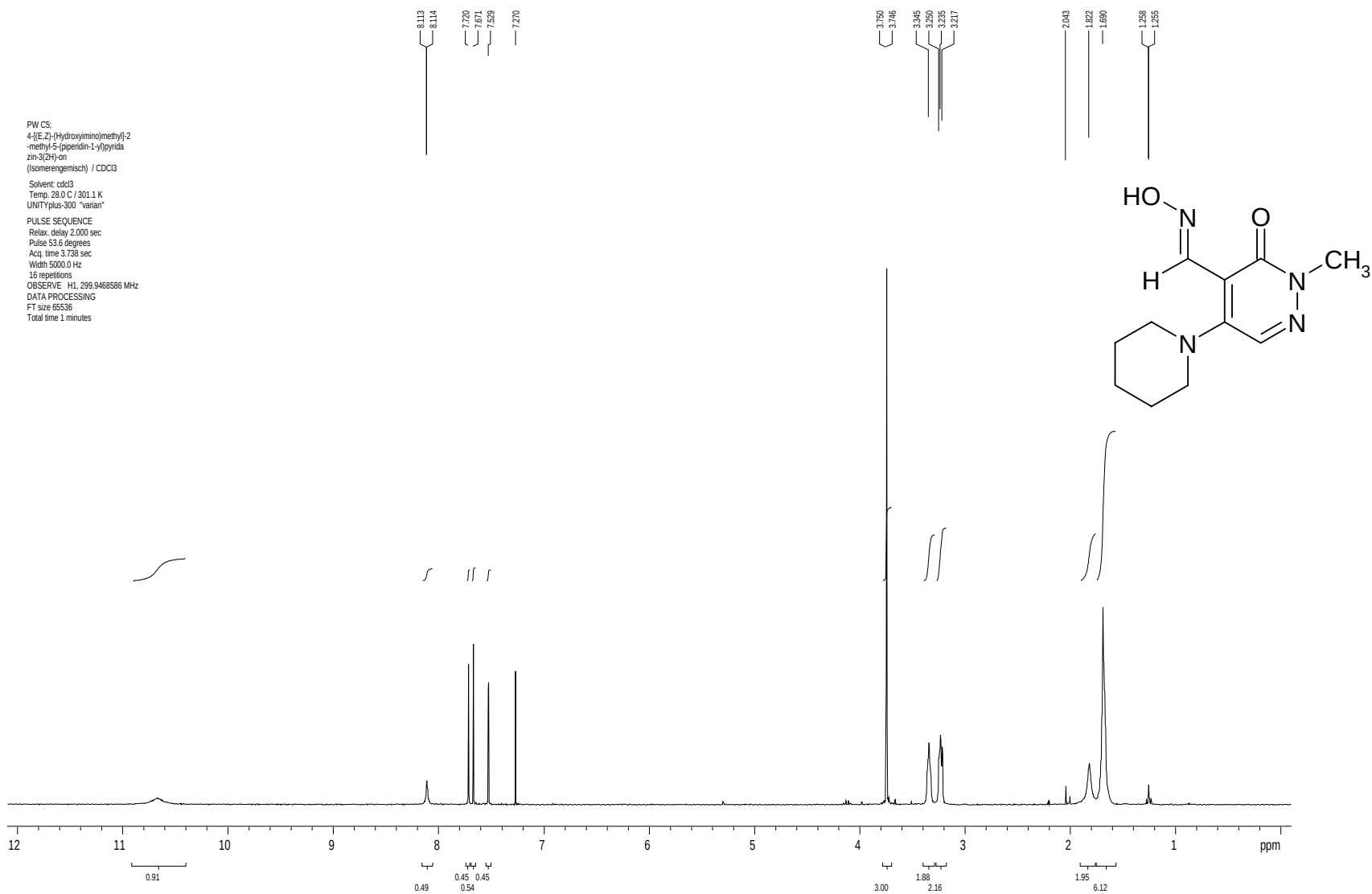
exp3 noeph

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Dec 19 07	dn	H1
solvent	cdcl3	dof	0
file	exp3	dm	nyrn
ACQUISITION			
sfreq	299.949	dmf	200
tn	H1	dpwr	1
at	3.738	temp	28.0
rp	37376	PROCESSING	
sw	5000.0	fb	1.00
fb	2800	tn	not used
ts	16	math	1
ss	4		
pw	16.8	werr	
tpwr	57	wexp	
d1	5.000	mb	
cz	0.004	wrt	
tol	900.0	DISPLAY	
rt	256	sp	-30.4
ct	48	wp	3659.3
alock	n	vs	1616
gain	44	sc	0
table	mult1	wc	250
intsub	y	hzmm	14.64
tau	0.050	ls	218.61
relax	0	rl	2711.4
control	694.4	rfp	2180.6
FLAGS			
il	n	ins	5.913
in	n	ai	ph
dp	y		
ts	nn		



E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydoxim

Tafel 24 (16)



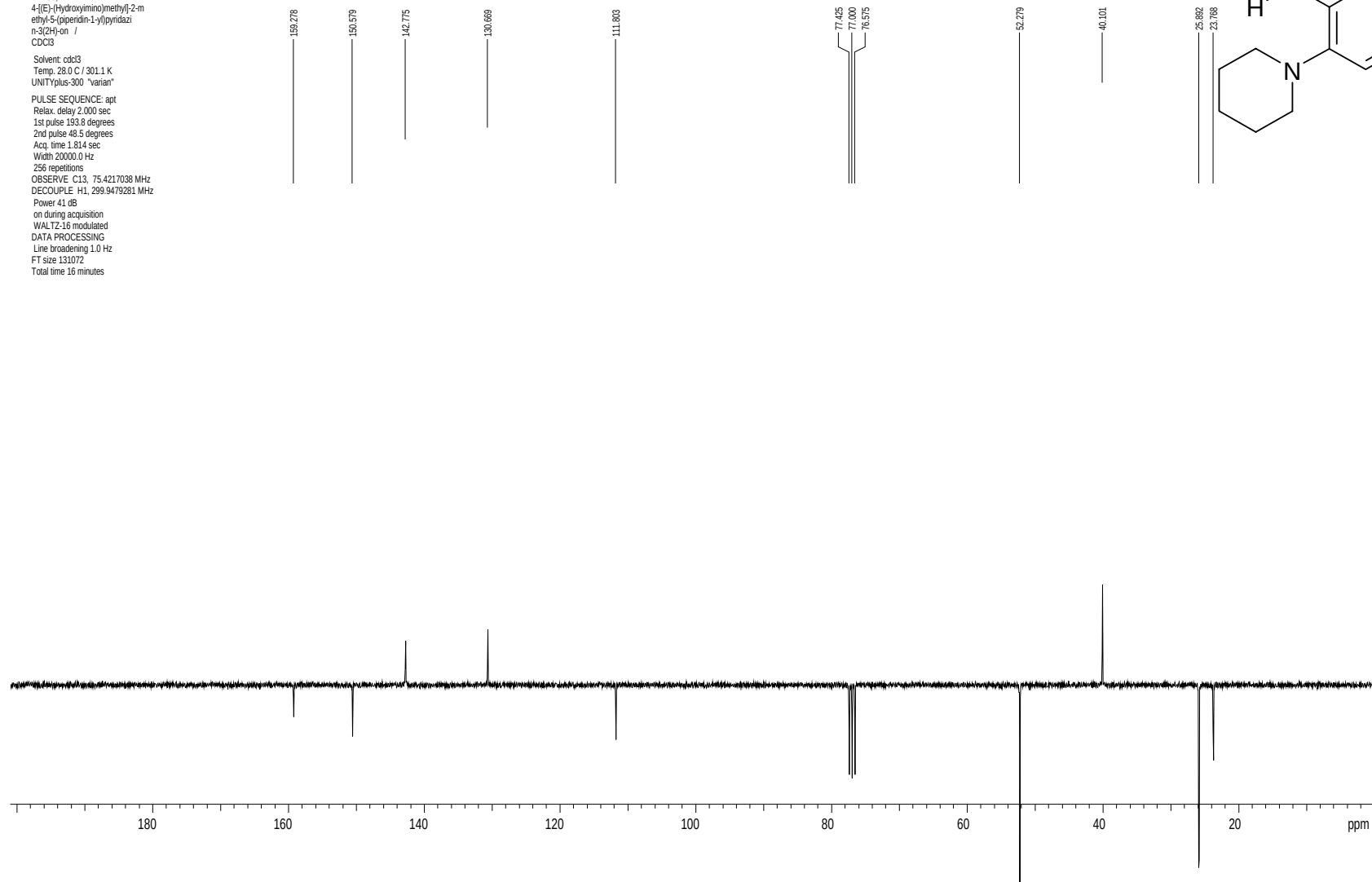
E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydixim

Tafel 25 (16)

PW C5;
4-[(E)-(Hydroxyimino)methyl]-2-methyl-5-(piperidin-1-yl)pyridazin-3(2H)-on /
CDCl3

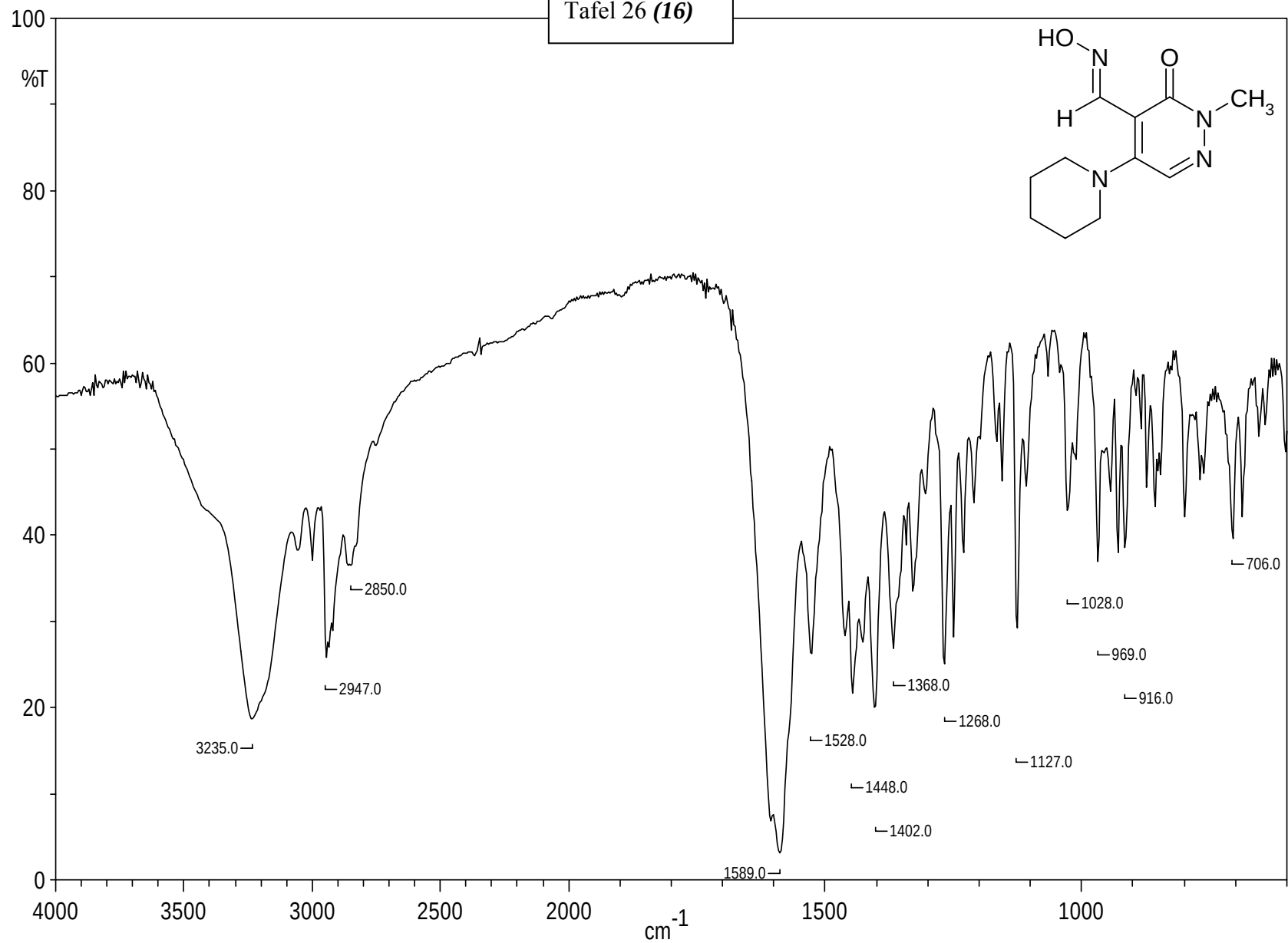
Solvent: cdcl3
Temp: 28.0 C / 301.1 K
UNITYplus-300 "varian"

PULSE SEQUENCE: apt
Relax: delay 2.000 sec
1st pulse 193.8 degrees
2nd pulse 48.5 degrees
Acq: time 1.814 sec
Width 20000.0 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 75.4217038 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 41.05
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 16 minutes



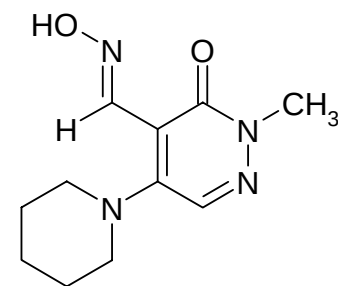
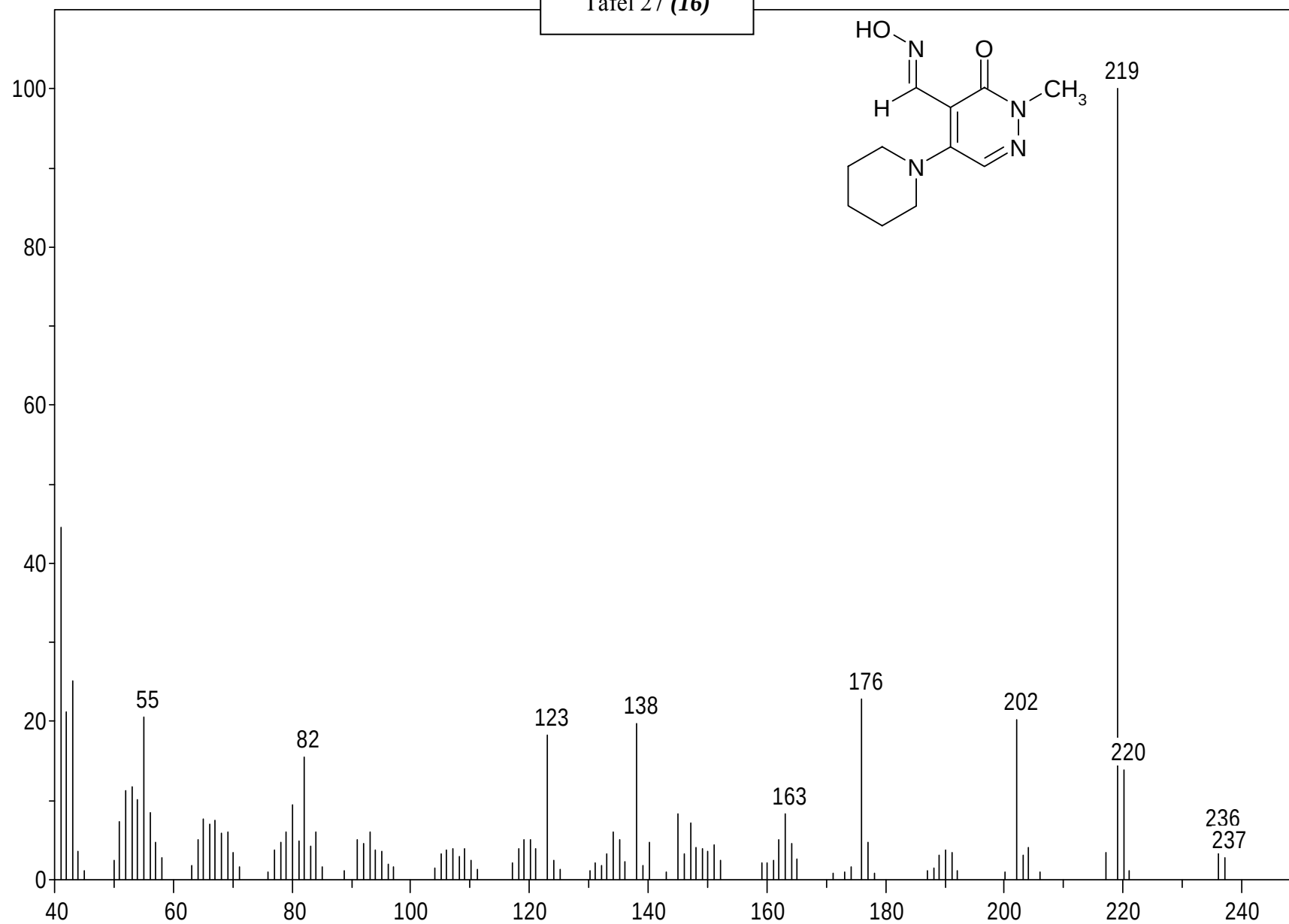
E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydioxim

Tafel 26 (16)



E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydohydrate

Tafel 27 (16)



E-2-Methyl-5-(piperidin-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-pyridazin-4-carbaldehydioxim

5.2. Zusammenfassung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden neue 5-Cycloaminopyridazin-3(2*H*)-one mit 4-Carbaldehydoxim-Funktion zugänglich gemacht. Dabei fungieren 4-Methylpiperazin und Pyridin als cyclische tertiäre Amin-Substituenten in Position 5 des Heteroaromaten. Die Strukturen lehnen sich an verwandte Pyridin-Derivate mit bekannter Hemmwirkung auf verschiedene Aminoxidasen an, ihr Design basiert auf Ergebnissen früherer Untersuchungen, die vermuten lassen, dass die Carbaldehydoximgruppe am Heteroaromaten eine Hemmwirkung auf die Semicarbazid-sensitive Aminoxidase (SSAO) ausübt. Diese Erkenntnis, verknüpft mit dem Austausch des Pyridinrings durch einen Pyridazin-Heteroaromaten, dem Prinzip der Bioisosterie folgend, steht im Zentrum der durchgeführten Untersuchungen.

Die zwei Zielverbindungen **(12)** und **(16)** wurden auf ihre Hemmwirkung auf humane SSAO getestet. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmwirkung erst in höheren Konzentrationen einsetzt. Desweiteren kann festgehalten werden, dass die Verbindung mit einem Piperidinyrest in Position 5 bei der Testung eine deutlichere Hemmwirkung aufweist als das Analogon mit einem N-Methylpiperazinyrest. Auch wenn sich diese Verbindungen nicht als Leitstrukturen herausgestellt haben, liefern die Ergebnisse dennoch ergänzende Informationen, die zu einem besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von SSAO-Inhibitoren führen und die Synthese neuer Wirkstoffe mit verbesserter Wirksamkeit erleichtern könnten.

5.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Patrick Woda
Geburtsdatum:	04.07.1984
Geburtsort:	Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig
E-Mail:	patrick.woda@gmx.at

Ausbildung

1990 - 1994	Volksschule II Alterlaa
1994 - 2002	AHS GRG 23
2002 - 2009	Studium der Pharmazie an der Universität Wien