

Diss. ETH No. 19062

Total Synthesis of Valerenic Acid and SAR Studies

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences ETH
Dr. sc. ETH

Presented by

Sascha Kopp
Dipl. Chem. ETH

born July 6th, 1976
Citizen of Fischingen TG (CH)

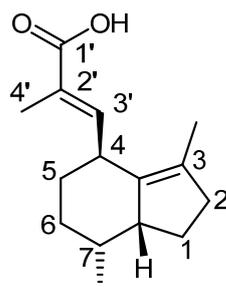
Accepted by the recommendation of

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann
Prof. Dr. Jonathan Hall

Zurich, May 2010

Summary

Valerenic acid (**1**, Fig. A-1) is a naturally occurring sesquiterpene acid first isolated in 1957. **1** is a major constituent of *Valeriana officinalis* L. (valerian) and is primarily found in the root and the rhizome of this long known medicinal plant. **1** is used as an analytical standard for herbal extracts derived from valerian, for which anxiolytic and sedative properties have been reported.

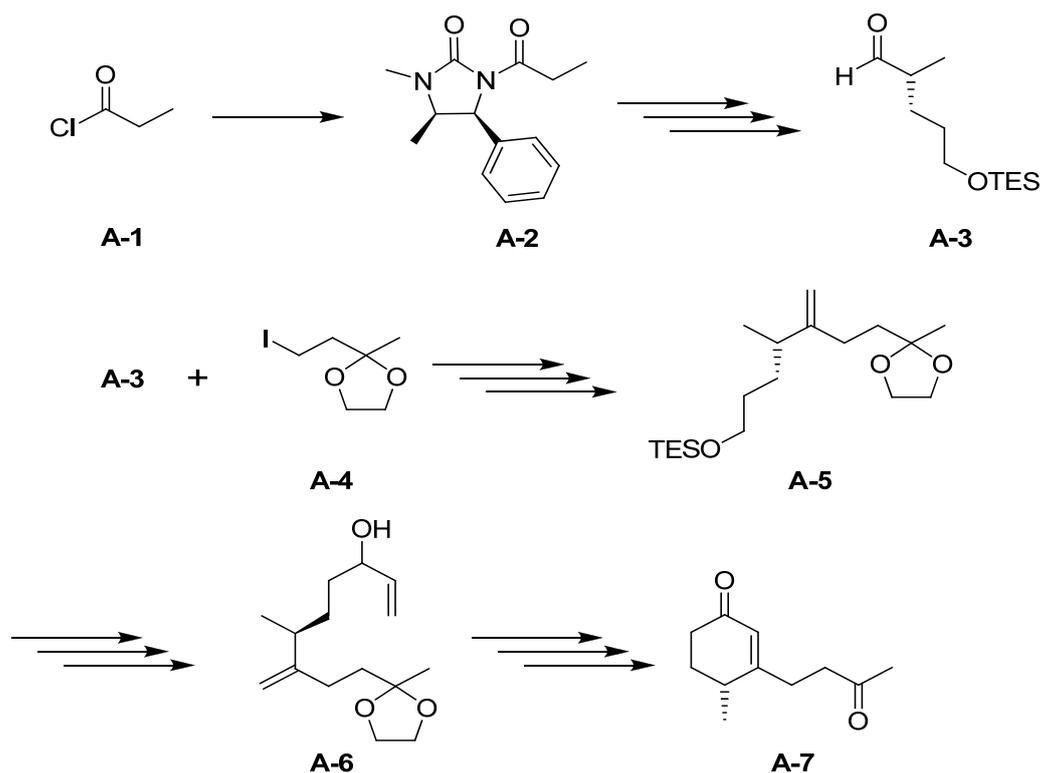


valerenic acid (**1**)

Figure A-1: Structure of valerenic acid (**1**), a constituent of *Valeriana officinalis* L.

Valerenic acid (**1**) has been shown to act on at least two central nervous system (CNS) receptors, namely as a positive allosteric modulator on the γ -aminobutyric acid receptor subtype A (GABA_A receptor) and as an inverse agonist on the serotonin receptor subtype 5a (5-HT_{5a} receptor). The GABAergic system is the main inhibitory system in the mammalian brain, while the less studied 5-HT_{5a} receptor is associated with the circadian clock.

In this thesis the enantioselective total synthesis of valerenic acid (**1**) is described based on cyclohexenone derivative **A-7** (Scheme A-1) as the key intermediate. Two different approaches were developed to build up key intermediate **A-7**. The first generation approach started from propionyl chloride (**A-1**) and used a ring closing metathesis (RCM) to build up the six-membered ring. The RCM precursor **A-6** was obtained based on Evans-type alkylation chemistry, via the acylated imidazolidinone **A-2**. Thus, diastereoselective allylation of **A-2** followed by hydroboration, TES protection, reductive cleavage of the imidazolidinone auxiliary and oxidation of the resulting alcohol provided aldehyde **A-3**. Reaction of **A-3** with the lithium-Grignard reagent derived from the protected C4 building block **A-4** followed by oxidation of the resulting secondary alcohol and Wittig olefination gave olefin **A-5**.

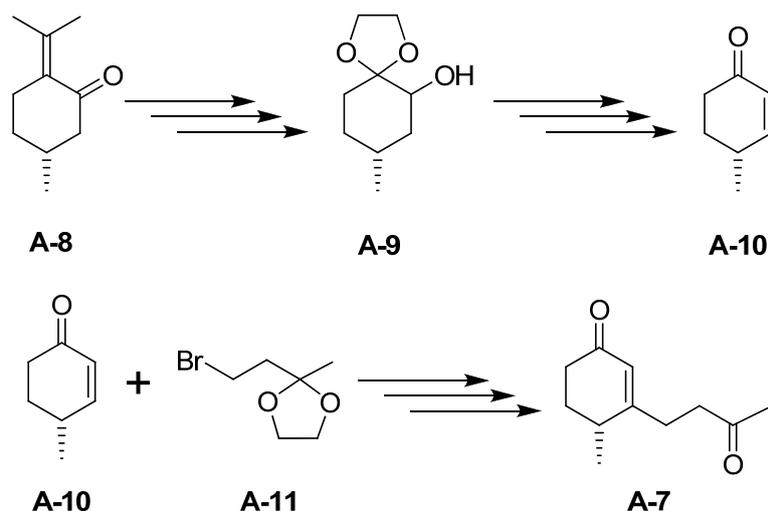


Scheme A-1: First generation synthesis of key intermediate **A-6**, starting from propionyl chloride (**A-1**).

Removing the TES group, oxidation of the primary alcohol and vinylation led to diene **A-6**, which underwent smooth RCM in the presence of Grubbs second generation catalyst. Oxidation of the allylic hydroxyl group in the resulting cyclohexene followed by deprotection of the ketone functionality of the side chain provided key intermediate **A-7**. This route was eventually deemed not to be suited for upscaling, due to its length. Therefore, another approach was sought, leading to the second generation approach, which is summarized in Scheme A-2.

The second generation approach to **A-7** used an entirely different strategy, starting with a member of the chiral pool, (*R*)-pulegone (**A-8**), and building up the second, five-membered ring by an intramolecular aldol condensation (Scheme A-2). Thus, the first stereocenter at C7 of valerenic acid (**1**) together with the six-membered ring was provided by (*R*)-pulegone (**A-8**), which was converted to the cyclohexenone derivative **A-10** by a known sequence. The protected C4 building block **A-11** was attached to **A-10** in a copper-mediated 1,4-addition, providing, after reoxidation and deprotection, key intermediate **A-7**.

While the first generation approach involved a rather elaborate synthetic route, which

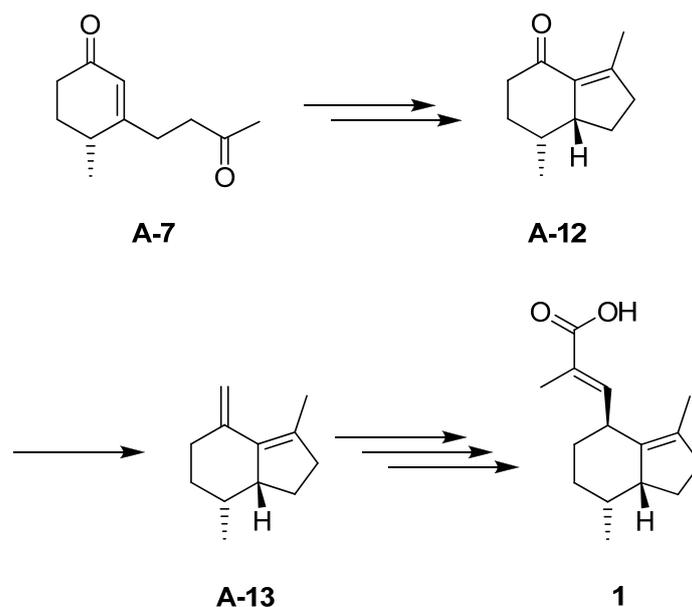


Scheme A-2: Second generation synthesis of key intermediate **A-7**, starting from (*R*)-pulegone (**A-8**).

provided the diketone **A-7** in a linear 14-step sequence with an overall yield of 4.7 %, the second generation approach provided the diketone **A-7** in 30 % yield over 9 steps, thus representing a clear improvement. With this more efficient synthetic route established, enough material of key intermediate **A-7** was accessible to complete the total synthesis of valerenic acid (**1**).

After stereoselective reduction of the olefinic double bond with Stryker's reagent, the five-membered ring was closed using an intramolecular aldol condensation (Scheme A-3), providing conjugated ketone **A-12**. The side chain was then installed in an incremental fashion, involving Wittig olefination (to give **A-13**) followed by hydroboration, oxidation and a subsequent microwave-assisted Wittig reaction. This sequence yielded the ethyl ester of valerenic acid (**1**), which was readily converted to **1** in virtually quantitative yield. The total synthesis was thus successfully completed in 16 steps with an overall yield of 6 % starting from *R*-pulegone (**A-8**). Quite remarkably, hydroboration of **A-13** gave only one single isomer in excellent yields (82 %). Attempts to convert the C4 keto group in **A-12** into a leaving group and then introduce the entire C3 side chain in a single step failed.

The product of the total synthesis could be crystallized and the obtained crystals were analyzed by X-ray crystallography. The crystallographic data confirmed the configuration of all stereocenters.



Scheme A-3: Synthesis of valeric acid (**1**), starting from the key intermediate **A-7**.

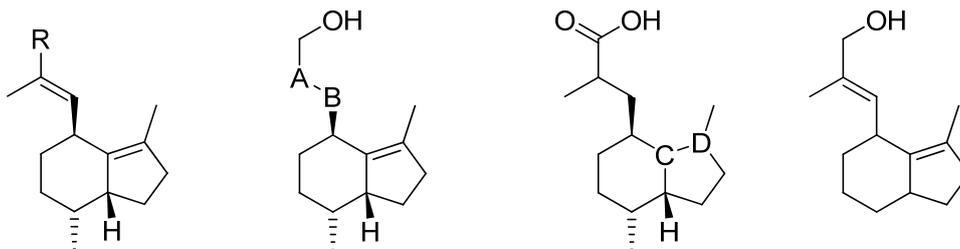
Valeric acid (**1**) was used to synthesize a series of analogs (**A-14** to **A-31**) for structure-activity relationship (SAR) studies.

To this end the compounds were tested *in vitro* for their ability to enhance the influx of chloride ions triggered by GABA binding to the GABA_A receptor complex. These experiments were carried out by the group of Prof. Erwin Sigel of the University of Bern on *Xenopus laevis* oocytes expressing the GABA_A(α 1)₂(β 2)₂ γ 2 receptor (which is the most abundant GABA_A receptor subtype) using a two electrode voltage clamp assay.

The biological data clearly indicate that the replacement of the carboxylate moiety in **1** in general does not produce a loss in modulatory activity on α 1 β 2 γ 2 receptors. On the contrary, reduction of **1** to **A-14** (valerenol) leads to substantially enhanced activity. A significant activity increase over **1** is also observed for nitrile **A-21**, as well as primary and secondary amides **A-22** and **A-23**, respectively.

Overall, the activity data obtained clearly point to the significance of a hydrogen donor (except for nitrile **A21** and valeric acid itself), the need for a C11-methyl group and a C10/C11 double bond for maximum GABA_A receptor-modulatory activity of valeric acid derivatives.

Most significantly, a rather spectacular increase in GABA-modulatory activity (over 20-fold at 1 μ M modulator concentration) is associated with the substitution of a tetrazole



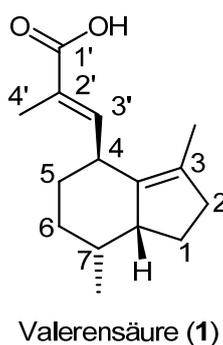
- 1:** R = CO₂H
A-14: R = CH₂OH
A-15: R = CHO
A-16: R = CO₂Me
A-17: R = CO₂Et
A-18: R = tetrazoyl
A-19: R = CH₂OMe
A-20: R = CH₂OBn
A-21: R = CN
A-22: R = CONH₂
A-23: R = CONHMe
A-24: R = CONMe₂
A-25: R = CH₂N₃
- A-26:** A-B = CH=CH (*E*)
A-27: A-B = CH=CH (*Z*)
A-28: A-B = CH₂-CH₂
- A-29:** C-D = C=C
A-30: C-D = CH-CH
- A-31**

moiety for the natural carboxyl group in valerenic acid (**1**), with the corresponding analog **A-18** being by far the most active allosteric modulator at the GABA_A receptor investigated in this thesis.

In addition to the above *in vitro* SAR studies, *in vivo* experiments in mice were conducted with valerenol (**A-14**). These experiments were carried out in the group of Prof. Hanns Möhler at the University and ETH of Zurich. Like valerenic acid (**1**) itself valerenol (**A-14**) showed significant anxiolytic activity.

Zusammenfassung

Valerensäure (**1**, Fig. A-1) ist eine natürliche Sesquiterpensäure, die zum ersten Mal im Jahre 1957 isoliert wurde. **1** ist ein Hauptinhaltsstoff von *Valeriana officinalis* L. (Baldrian), der vor allem im Wurzelstock (Rhizom und Wurzel) dieser seit langem bekannten Medizinalpflanze gefunden wird. **1** wird als Standard in der Analytik von Pflanzenextrakten verwendet, die aus Baldrian gewonnen werden und für ihre angstlösenden und sedierenden Eigenschaften bekannt sind.

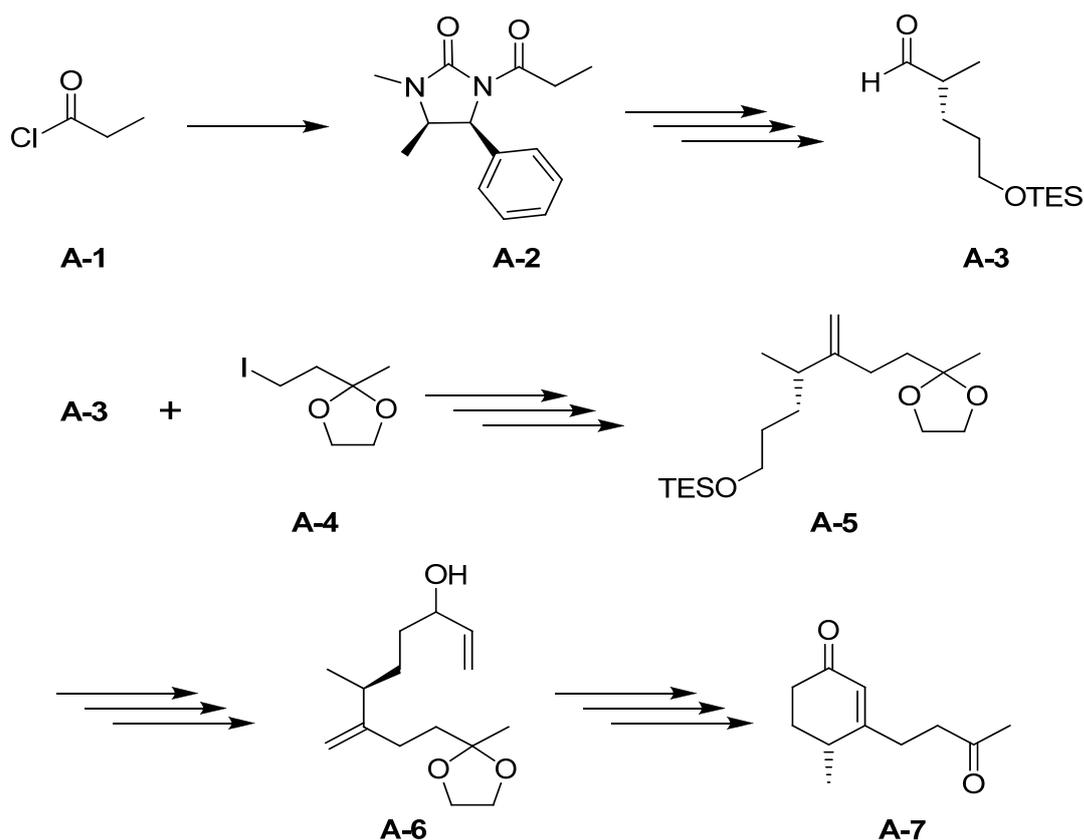


Figur A-1: Struktur der Valerensäure (**1**), einem Inhaltsstoff von *Valeriana officinalis* L.

Valerensäure (**1**) interagiert mit mindestens zwei Rezeptoren im Zentralnervensystem (ZNS): Am γ -Aminobuttersäure-Rezeptorsubtyp A (GABA_A-Rezeptor) als positiv-allosterischer Modulator und am Serotonin-Rezeptorsubtyp 5a (5-HT_{5a}-Rezeptor) als inverser Agonist. Das GABAerge System ist das Hauptdämpfungssystem im Säugerhirn, während der weniger gut untersuchte 5-HT_{5a}-Rezeptor mit dem zirkadianen Rhythmus in Verbindung gebracht wird.

In dieser Doktorarbeit wird die enantioselektive Totalsynthese der Valerensäure (**1**) beschrieben, basierend auf dem Cyclohexenonderivat **A-7** (Schema A-1) als Schlüsselverbindung der Synthese. Es wurden zwei unterschiedliche Routen entwickelt, um die Schlüsselverbindung **A-7** aufzubauen. Die erste Route ging von Propansäurechlorid (**A-1**) aus und verwendete eine Ringschlussmetathese (RCM) um den Sechsring zu schliessen. Der RCM-Vorläufer **A-6** wurde aus dem acylierten Imidazolidinon **A-2** durch Evans-Chemie aufgebaut.

Durch die diastereoselektive Allylierung von **A-2**, gefolgt von einer Hydroborierung mit oxidativer Aufarbeitung, einer TES-Schätzung des erhaltenen Alkohols, einer



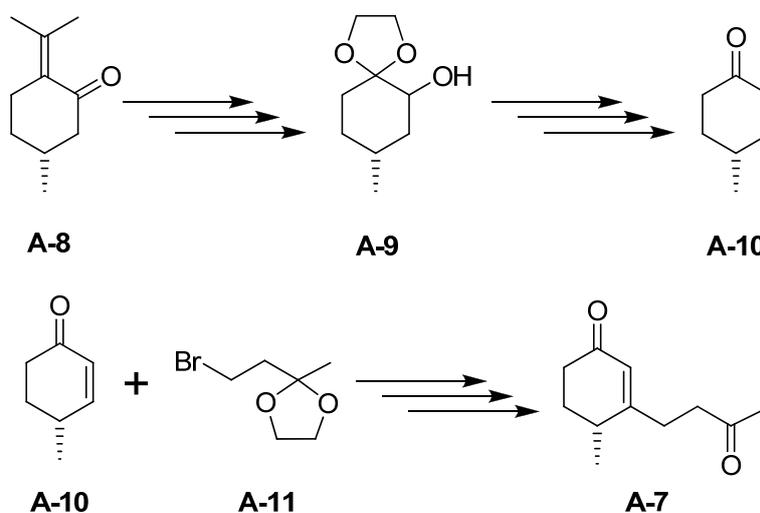
Schema A-1: Erste Syntheseroute zur Schlüsselverbindung **A-7**, ausgehend von Propansäurechlorid (**A-1**).

reduktiven Abspaltung des Imidazolidinons und abschliessender Oxidation der Hydroxylfunktion wurde Aldehyd **A-3** erhalten. Die Reaktion von **A-3** mit dem aus der geschützten C4-Einheit **A-4** erhaltenen Lithium-Grignardreagenz, gefolgt von einer Oxidation des so erhaltenen sekundären Alkohols und anschliessender Wittig-Olefinierung ergab das Olefin **A-5**. Die Entschützung und anschliessende Oxidation des primären Alkohols, sowie eine Allylierung führten zum Dien **A-6**, welches unter Anwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation eine RCM einging. Oxidation der allylischen Hydroxylgruppe im so entstandenen Cyclohexen und Entschützung der Ketofunktion der Seitenkette ergaben schliesslich die Schlüsselverbindung **A-7**.

Aufgrund seiner Länge erwies sich dieser Syntheseweg als ungeeignet für die Herstellung grösserer Mengen. Deshalb wurde nach einer Alternative gesucht, was in der in Schema A-2 gezeigten Synthese mündete.

Die zweite Route zu **A-7** basierte auf einer Strategie, die sich grundlegend von der vorherigen unterscheidet. Sie verwendete als Startmaterial (*R*)-Pulegon (**A-8**), eine in

der Natur vorkommende, chirale Verbindung; um den zweiten, fünfgliedrigen Ring aufzubauen kam eine intramolekulare Aldolkondensation zur Anwendung (siehe Schema A-2). Das erste Stereozentrum am Kohlenstoff C7 der Valerensäure (**1**) und der sechsgliedrige Ring sind bereits in (*R*)-Pulegon (**A-8**) vorhanden, welches durch eine literaturbekannte Sequenz in das Cyclohexenonderivat **A-10** umgewandelt wurde. Der geschützte C4-Baustein **A-11** wurde in einer kupfervermittelten 1,4-Addition mit **A-10** verknüpft; das Additionsprodukt lieferte nach erneuter Oxidation und Entschützung die gewünschte Schlüsselverbindung **A-7**.



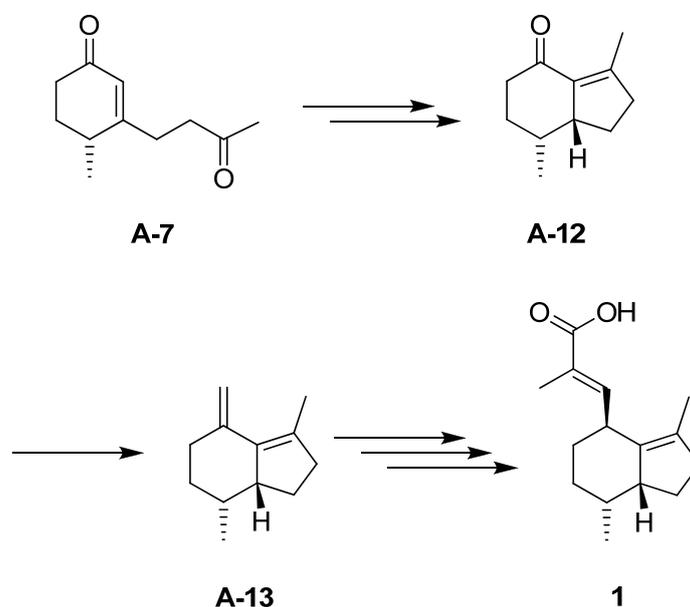
Schema A-2: Zweite Syntheseroute zur Schlüsselverbindung **A-6**, ausgehend von (*R*)-Pulegon (**A-8**).

Während die erste, vergleichsweise aufwändige Syntheseroute das Diketon **A-7** in einer linearen, 14-stufigen Sequenz mit einer Ausbeute von 4.7 % lieferte, betrug die Ausbeute durch die zweite Syntheseroute gute 30 % über 9 Stufen (ausgehend von (*R*)-Pulegon), was eine deutliche Verbesserung gegenüber dem ersten Syntheseweg darstellt. Durch diese effizientere Synthese konnte die Schlüsselverbindung **A-7** in genügender Menge hergestellt werden, um die Totalsynthese der Valerensäure (**1**) erfolgreich abschliessen zu können.

Nach einer stereoselektiven Reduktion der Doppelbindung mit Hilfe des Stryker-Reagenz, wurde der Fünfring durch eine intramolekulare Aldolkondensation geschlossen (siehe Schema A-3), wodurch das konjugierte Keton **A-12** gebildet wurde. Die Seitenkette wurde dann schrittweise aufgebaut. Dabei wurden eine Wittig-Reaktion (die zu **A-13** führte), gefolgt von einer Hydroborierung, Oxidation und einer weiteren,

mikrowellen-unterstützten Wittig-Reaktion durchgeführt. Der durch diese Reaktionsfolge hergestellte Valerensäureethylester wurde abschliessend verseift, wodurch die Valerensäure (**1**) in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten wurde. Auf diese Weise wurde die Totalsynthese mit einer Ausbeute von 6 % über 16 Stufen, ausgehend von (*R*)-Pulegon (**A-8**), erfolgreich abgeschlossen.

Besonders positiv zu erwähnen ist im Rahmen der zweiten Syntheseroute zu **A-7**, dass die Hydroborierung von **A-13** mit einer guten Ausbeute (82 %) selektiv ein Stereoisomer ergibt. Andererseits schlugen sämtliche Versuche fehl, die gesamte C3-Seitenkette in einem Schritt mit einem von **A-12** abgeleiteten und mit einer Abgangsgruppe ausgestatteten Bicyklus zu verknüpfen.



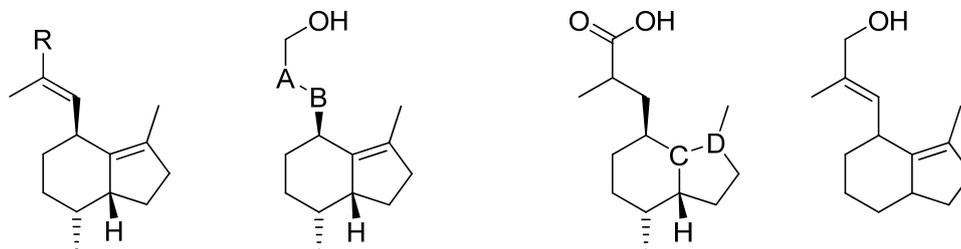
Schema A-3: Von Schlüsselverbindung **A-7** ausgehende Synthese der Valerensäure (**1**).

Von der erhaltenen Valerensäure (**1**) konnten erfolgreich Kristalle gewonnen werden, von denen eine Röntgenstruktur bestimmt wurde, welche die Konfiguration sämtlicher Stereozentren bestätigte.

Valerensäure (**1**) wurde für die Synthese der Analoga **A-14** bis **A-31** verwendet, welche der Erstellung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) dienen.

Die Analoga wurden *in vitro* auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den durch GABA ausgelösten Chloridionen-Strom durch den GABA_A-Rezeptor zu erhöhen. Diese

elektrophysiologischen Experimente wurden in der Gruppe von Prof. Erwin Sigel an der Universität Bern mit Hilfe von Oozyten von *Xenopus laevis* durchgeführt, welche den GABA_A(α 1)₂(β 2)₂ γ 2 Rezeptor exprimieren (häufigster GABA_A-Rezeptorsubtyp).



- 1:** R = CO₂H
A-14: R = CH₂OH
A-15: R = CHO
A-16: R = CO₂Me
A-17: R = CO₂Et
A-18: R = tetrazoyl
A-19: R = CH₂OMe
A-20: R = CH₂OBn
A-21: R = CN
A-22: R = CONH₂
A-23: R = CONHMe
A-24: R = CONMe₂
A-25: R = CH₂N₃
- A-26:** A-B = CH=CH (*E*)
A-27: A-B = CH=CH (*Z*)
A-28: A-B = CH₂-CH₂
- A-29:** C-D = C=C
A-30: C-D = CH-CH
- A-31**

Die biologischen Daten zeigen unmissverständlich, dass ein Ersetzen der Säurefunktion in **1** nicht *per se* zu einer Reduktion der Aktivität als Modulator am α 1 β 2 γ 2-Rezeptor führt. Die Reduktion von **1** zu **A-14** (Valerenol) führt im Gegenteil zu einer stark erhöhten Modulatoraktivität, was in geringerem Ausmass auch auf das Nitril **A-21**, das primäre Amid **A-22** und das sekundäre Amid **A-23** zutrifft.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die biologischen Daten auf die Wichtigkeit eines Wasserstoffdonors (mit Ausnahme des Nitrils **A21** und der Valerensäure selbst), der C11-Methylgruppe, sowie der C10/C11-Doppelbindung der Valerenan-Strukturanaloga hinweisen, die für einen maximalen Effekt am GABA_A-Rezeptor entscheidend sind. Besonders hervorzuheben ist der substantielle Anstieg in der Modulatoraktivität (über 20-fach bei 1 μ M) bei der Substitution der Säurefunktion mit einem Tetrazolring. Das Tetrazol **A-18** ist mit Abstand der stärkste positiv-allosterische Modulator am GABA_A-Rezeptor, der im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde.

Zusätzlich zu den *in vitro* SAR Untersuchungen wurde der Effekt von Valerenol

(**A-13**) auch *in vivo* in Mäusen untersucht. Diese Experimente wurden in der Gruppe von Prof. Hanns Möhler an der Universität und ETH Zürich durchgeführt und zeigten, dass Valerenol (**A-14**) eine signifikante anxiolytische Aktivität besitzt, was auch für Valerensäure (**1**) selbst gezeigt werden konnte.