

**Synthese und Charakterisierung von
dualen γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulatoren
als potentielle Wirkstoffe
zur Therapie von Morbus Alzheimer**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und
Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von
Martina Hieke
aus Nürnberg

Frankfurt, 2011
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz
Prof. Dr. Sascha Weggen

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1. ZIELSETZUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Morbus Alzheimer	3
2.1.1 Definition und Statistik.....	3
2.1.2 Charakteristika von Morbus Alzheimer.....	4
2.1.3 Verfügbare Therapiemöglichkeiten.....	5
2.2 Pathophysiologie von Morbus Alzheimer	6
2.2.1 Risikofaktoren und Genetik.....	7
2.2.2 Amyloid-Hypothese.....	9
2.2.3 Weitere pathologische Charakteristika.....	12
2.3 Neue Therapieansätze für Morbus Alzheimer	12
2.4 γ-Sekretase	14
2.4.1 Struktur und Funktion der γ -Sekretase.....	14
2.4.2 Physiologische Funktionen.....	17
2.4.3 γ -Sekretase als <i>drug target</i>	19
2.5 PPARγ	31
2.5.1 Struktur und Funktion von PPAR γ	31
2.5.2 PPAR γ und Morbus Alzheimer.....	35
2.5.3 Medizinische Chemie von PPAR γ -Agonisten.....	36
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
3.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen	44
3.1.1 Thiobarbitursäure-Derivate.....	45
3.1.2 Trisubstituierte Benzenderivate.....	51
3.2 Diskussion	57
3.3 Chemische Synthesen	58
3.3.1 Synthese der Thiobarbitursäure-Derivate.....	58
3.3.2 Synthese von substituierten 2-Benzyl- und 2-Benzylidenhexansäuren.....	58
3.3.3 Synthese von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure 25	60
3.3.4 Synthese von 2-(3,5-Diphenethoxyphenoxy)hexansäure 26	61
3.4 <i>In vitro</i>-pharmakologische Charakterisierung	62
3.4.1 γ -Sekretase-Assay.....	62
3.4.2 PPAR-Transaktivierungs-Assay.....	63
3.4.3 Messung von <i>off-target</i> Effekten und Zytotoxizität.....	63

4. ZUSAMMENFASSUNG	65
5. EXPERIMENTELLER TEIL.....	67
5.1 Allgemeine Angaben.....	67
5.2 Synthese und Charakterisierung der Thiobarbitursäure-Derivate	68
5.2.1 Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Thioether-Vorstufe	68
5.2.2 Charakterisierung der Zwischenstufen 39 und 40	69
5.2.3 Arbeitsvorschrift zur Veretherung der Hydroxygruppen	70
5.2.4 Charakterisierung der Zwischenstufen 41-55	72
5.2.5 Arbeitsvorschrift zur Verseifung der Estergruppe.....	81
5.2.6 Charakterisierung der Thiobarbitursäure-Derivate 5, 8-9, 11-22	82
5.3 Synthese und Charakterisierung der substiierten 2-Benzyl- und 2-Benzyliden- hexansäuren.....	90
5.3.1 Arbeitsvorschrift zur <i>Arbuzov</i> -Reaktion	91
5.3.2 Charakterisierung von Zwischenstufe 56	91
5.3.3 Arbeitsvorschrift zur Synthese von Dialkoxybenzaldehyden.....	92
5.3.4 Charakterisierung der Zwischenstufen 57-71	94
5.3.5 Arbeitsvorschrift zur <i>Wittig-Horner</i> -Synthese	102
5.3.6 Charakterisierung der Zwischenstufen 72-83	103
5.3.7 Arbeitsvorschrift zur Hydrierung der exozyklischen Doppelbindung	110
5.3.8 Charakterisierung der Zwischenstufen 84-91	111
5.3.9 Arbeitsvorschrift zur Verseifung der Estergruppe.....	115
5.3.10 Charakterisierung der Endprodukte 23-38	116
5.4 Synthese und Charakterisierung von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]- hexansäure 25.....	125
5.4.1 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 92	126
5.4.2 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 93	126
5.4.3 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 94	127
5.4.4 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 95	128
5.4.5 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 96	128
5.4.5 Synthese und Charakterisierung von Endprodukt 25	129
5.5 Synthese und Charakterisierung von 2-(3,5-Diphenethoxyphenoxy)-hexansäure 26	131
5.5.1 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 97	131
5.5.2 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 98	132
5.5.3 Synthese und Charakterisierung von Endprodukt 26	133

6. BIBLIOGRAPHIE	134
7. PUBLIKATIONSLISTE.....	145
7.1 Publikationen in <i>peer-reviewed Journals</i>.....	145
7.2 Konferenzbeiträge und Posterpräsentationen.....	146
7.2.1 Vorträge	146
7.2.2 Posterpräsentationen	146
8. LEBENSLAUF	147
9. DANKSAGUNG	149
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	151
11. ANHANG.....	152
11.1 Abkürzungsverzeichnis.....	152
11.2 Nachdruck der Publikation.....	153

1. ZIELSETZUNG

Morbus Alzheimer ist weltweit die häufigste neurodegenerative Erkrankung, deren größter Risikofaktor neben genetischer Prädisposition das Lebensalter ist. Folglich erwartet man aufgrund der steigenden Lebenserwartung in den Industrieländern für die nächsten Jahrzehnte eine enorm ansteigende Patientenzahl. Trotz der großen Fortschritte in der Aufklärung der pathologischen Zusammenhänge ist es bisher nicht gelungen, eine Therapie zu entwickeln, mit der das Voranschreiten der Krankheit deutlich verlangsamt oder sogar gestoppt werden kann.

Die vorliegende Arbeit verfolgt einen medizinisch-chemischen Ansatz, in der die Entwicklung von dualen γ -Sekretase- und PPAR γ (Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor γ)-Modulatoren als potentielle Arzneistoffe gegen Morbus Alzheimer im Fokus steht. Bei der **γ -Sekretase** handelt es sich um eine Aspartylprotease, die im Rahmen der Amyloid-Kaskade an der carboxyterminalen Spaltung von APP (Amyloid Precursor Protein) und damit unmittelbar an der Bildung der pathogenen Amyloid- β 42-Fragmente beteiligt ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diverse Punktmutationen in ihrer katalytischen Untereinheit Presenilin eine genetisch bedingte *early-onset* Alzheimer-Demenz auslösen können. Das therapeutische Potential von γ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren konnte in der Folge in zahlreichen präklinischen Studien bestätigt werden.

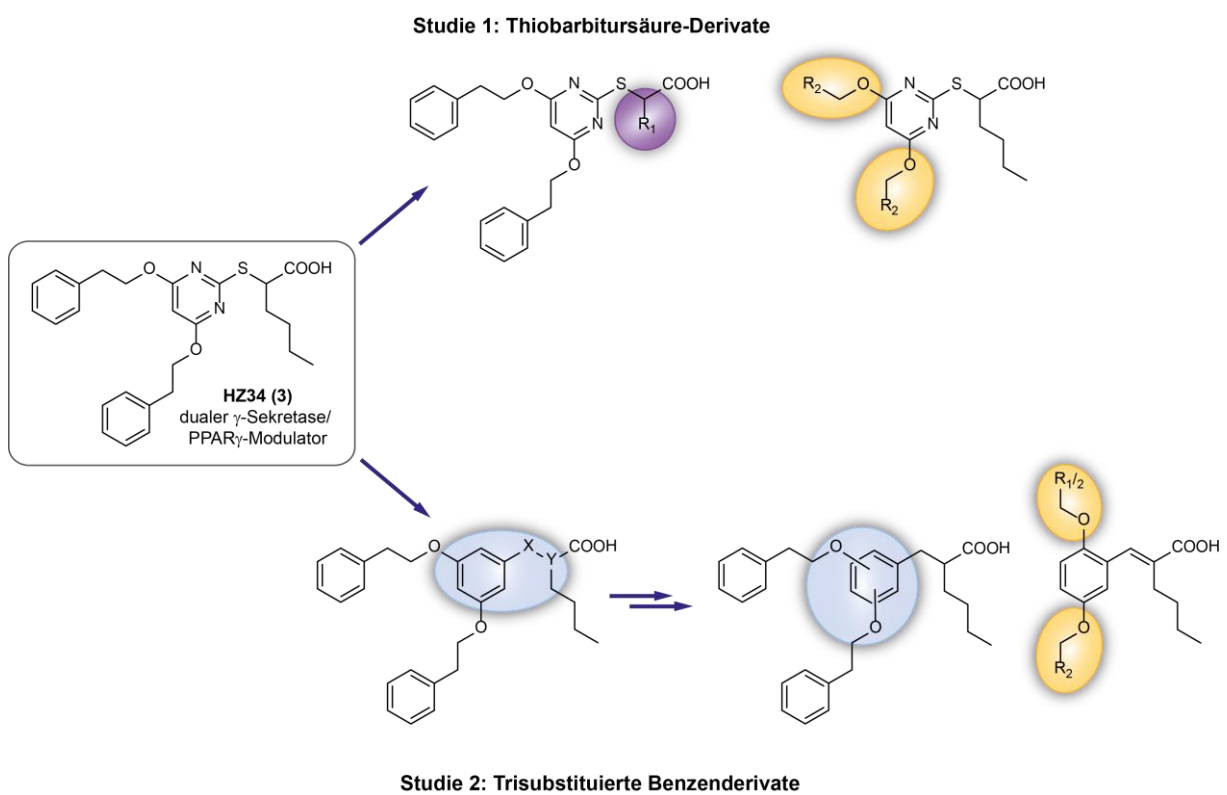
PPAR γ gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und gilt als wichtiger Regulator der Lipid- und Glucosehomöostase. Mit Pioglitazon ist in Deutschland derzeit ein PPAR γ -Agonist für die Therapie von Typ-II Diabetes Mellitus zugelassen. Da Erkrankungen mit Störungen im Lipid- und Glucosehaushalt wichtige epidemiologische Risikofaktoren für Morbus Alzheimer darstellen, wurde die Rolle von PPAR γ auch in diesem Kontext untersucht. In zahlreichen *in vivo*-Studien wurden PPAR γ -Agonisten aufgrund vielfältiger Mechanismen mit positiven Effekten bei Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Duale γ -Sekretase-/ PPAR γ -Modulatoren könnten somit insbesondere bei Typ-II-Diabetikern, die einen wachsenden Anteil der Bevölkerung darstellen und ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Morbus Alzheimer haben, eine attraktive Option zur Prävention und Behandlung von Morbus Alzheimer darstellen.

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Substanz HZ34 (**3**; 2-{{[4,6-Bis(phenethoxy)-pyrimidin-2-yl]thio}hexansäure), welche als Subtyp-selektiver PPAR γ -Modulator (EC_{50} PPAR γ = 8.3 μ M, maximale Aktivierung 61%) als erster Vertreter seiner Klasse zusätzlich auch γ -Sekretase-modulierende Eigenschaften (IC_{50} A β 42 = 22.4 μ M) zeigte. Die Zielsetzung war dabei eine umfangreiche Untersuchung der zugrunde liegenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie eine Optimierung beider pharmakologischer Aktivitäten. In der ersten Studie standen zunächst Strukturvariationen der α -Substituenten sowie der beiden lipophilen Phenethoxy-Reste im

Vordergrund. Insgesamt wurden hierfür 20 verschiedene Derivate synthetisiert und umfangreich *in vitro*-pharmakologisch charakterisiert.

In einer zweiten Studie folgte die Entwicklung einer neuen Synthesestrategie, die den Austausch und die breite Modifikation des zentralen aromatischen Molekülteils erlaubte. Basierend auf den Struktur-Wirkungsbeziehungen der ersten Studie konnten somit Substanzen entwickelt werden, die eine Kombination aus den besten Strukturelementen beider Studien darstellen. Insgesamt wurden innerhalb der zweiten Studie weitere 16 Derivate synthetisiert und charakterisiert.

Strukturoptimierung der dualen γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulatoren:



2. EINLEITUNG

2.1 Morbus Alzheimer

2.1.1 Definition und Statistik

Mit Morbus Alzheimer (= Alzheimer-Demenz, AD) bezeichnet man eine neurodegenerative Erkrankung, die mit ca. 50-60% die häufigste Ursache einer Demenz darstellt.¹ Erstmals wurden die klinischen Symptome von Morbus Alzheimer (u.a. Gedächtnisverlust, Verwirrung, Halluzinationen und Depression) an der Patientin Auguste D. im Jahre 1906 von Alois Alzheimer beschrieben und in einer *post mortem*-Analyse mit charakteristischen Proteinablagerungen im Gehirn in Verbindung gebracht.²

Heutzutage ist Morbus Alzheimer die vierthäufigste Todesursache in den Industrienationen und es leiden weltweit ca. 26.6 Millionen Menschen darunter.^{3,4} Der Großteil der Patienten hat dabei ein Lebensalter von 65 Jahren oder höher. Die Prävalenz der Erkrankung steigt im Folgenden mit jedem weiteren Lebensjahr, so dass von den 85-Jährigen bereits ca. 20% betroffen sind (siehe Abb. 1A).⁵⁻⁷ Da das Altern per se den größten Risikofaktor für die Erkrankung darstellt, geht man bei der steigenden Lebenserwartung in den Industriestaaten davon aus, dass sich die Zahl der Alzheimer-Patienten künftig dramatisch erhöhen und die Krankheit massiv an Bedeutung gewinnen wird. Für das Jahr 2050 ist bereits eine weltweite Patientenzahl von ca. 100 Mio. vorhergesagt (siehe Abb. 1B).^{4,8}

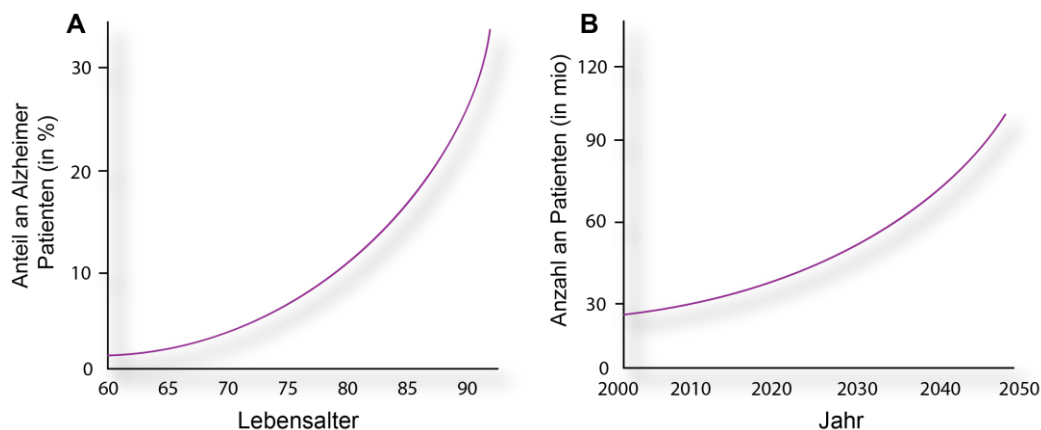


Abbildung 1 A) Häufigkeit von Morbus Alzheimer in Abhängigkeit vom Lebensalter. B) Weltweite Prognose bis zum Jahr 2050.⁹ Die vorliegenden Daten basieren auf der Delphi Consensus Studie von Ferri et al.⁵

Trotz großer Fortschritte in der Erforschung von Morbus Alzheimer gilt die Erkrankung bis dato immer noch als unheilbar. Eine symptomatische Therapie kann das Voranschreiten der Symptomatik zwar kurzfristig hinauszögern, ein medikamentöser Eingriff in die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse ist jedoch bisher nicht möglich. Aufgrund des intensiven Pflege- und Betreuungsbedarfs der Patienten zählt Morbus Alzheimer zu den kostenintensivsten Erkrankungen im Alter. Sollte die Suche nach einer geeigneten Therapie auch weiterhin keinen Erfolg zeigen, so geht man bei den immer weiter steigenden Patientenzahlen in Zukunft von einer enormen sozioökonomischen Belastung aus.

2.1.2 Charakteristika von Morbus Alzheimer

Von Morbus Alzheimer kennt man zwei unterschiedliche Formen, die familiäre *early-onset* AD mit einem Anteil von 5-10% und die deutlich häufiger vorkommende sporadische AD. Im Gegensatz zur sporadischen AD tritt die familiäre Form oft schon im mittleren Lebensalter (unter 65 Jahren) auf und ist durch genetische Ursachen bedingt (siehe Kap. 2.2.1). Anhand von Pathologie und Symptomatik sind die beiden Formen allerdings kaum zu unterscheiden.¹⁰

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist durch einen irreversibel progradienten Verlust kognitiver Fähigkeiten bis hin zum vollständigen Verlust von Gedächtnis, Orientierung sowie Persönlichkeit und Kontrolle über Körperfunktionen charakterisiert. Dies ist häufig von Aggressionen, Halluzinationen, Depressionen sowie Störungen der motorischen Fähigkeiten und Sprachverlust begleitet. Letztendlich nimmt die Erkrankung nach durchschnittlich 8 Jahren einen tödlichen Ausgang.⁴

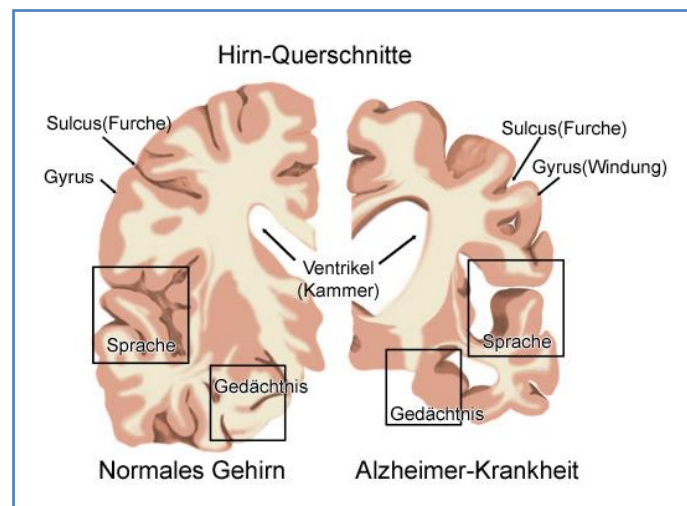


Abbildung 2 Vergleich eines gesunden Hirns mit dem eines Alzheimer-Patienten.⁴

Histopathologische Grundlage der Symptomatik ist ein fortschreitender Neuronen- und Synapsenverlust (v.a. der cholinergen Neuronen) sowie ein ubiquitäres Schrumpfen der Hirnmasse mit charakteristischen Vertiefungen der Hirnfurchen und Erweiterung der Hirnkammern (siehe Abb. 2). Es gibt Hinweise, dass der Beginn der Neurodegeneration bereits 20-30 Jahre vor der Symptomatik der Alzheimer-Demenz eintritt.¹

Daneben gibt es zwei Charakteristika, die Morbus Alzheimer von anderen Demenzen abgrenzt: die massive extrazelluläre Ablagerung von **Amyloid-Plaques** und die intrazelluläre Bildung von **neurofibrillären Bündeln**. Diese stellen krankheitstypische, aber keine spezifischen Merkmale von AD dar. Ihr Vorkommen ist bei Morbus Alzheimer jedoch besonders stark ausgeprägt und zeigt eine typische Verteilung, worauf auch die *post mortem*-Diagnose begründet ist.^{1,4}

Auf zellulärer Ebene sind die Proteinablagerungen von extensiver Neuroinflammation, einer gestörten Calcium-Homöostase, der vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sowie einer eingeschränkten Mitochondriefunktion, einem Mangel an Wachstumsfaktoren und

der Induktion von Apoptose begleitet. Den Neurotransmitterhaushalt betreffend sind Störungen in der cholinergen, dopaminergen und glutamergen Signalübertragung charakteristisch.¹¹

Eine besondere Schwierigkeit liegt in der Diagnostik von AD, da die Degeneration der Hirnmasse mittels bildgebender Verfahren wie CT oder MRT erst im Stadium einer mittleren Demenz möglich ist und die gesicherte Diagnose von Morbus Alzheimer immer noch auf der *post mortem*-Analyse beruht.¹ Um den Krankheitsverlauf jedoch nachhaltig beeinflussen zu können, müsste eine potentielle Therapie bereits mit dem Eintritt der Neurodegeneration, also weit vor den ersten Krankheitssymptomen begonnen werden. Zur Darstellung der Pathologie und des Krankheitsverlaufs wäre daher ein geeigneter, für Morbus Alzheimer spezifischer Biomarker dringend von Nöten. Derzeit befinden sich einige solcher Biomarker in der Entwicklung, deren Potential für Diagnostik, Therapie und Wirkstoffentwicklung untersucht wird.¹²⁻¹⁵

2.1.3 Verfügbare Therapiemöglichkeiten

Im Bereich der symptomatischen Therapie sind einzelne Arzneistoffe verfügbar, die im frühen Stadium der Alzheimer-Demenz eingesetzt werden um die Progression der Erkrankung zu verlangsamen. In Abb. 3 ist deren Einfluss auf den klinischen Verlauf von AD im Vergleich zu einer *disease modifying*-Therapie schematisch dargestellt.

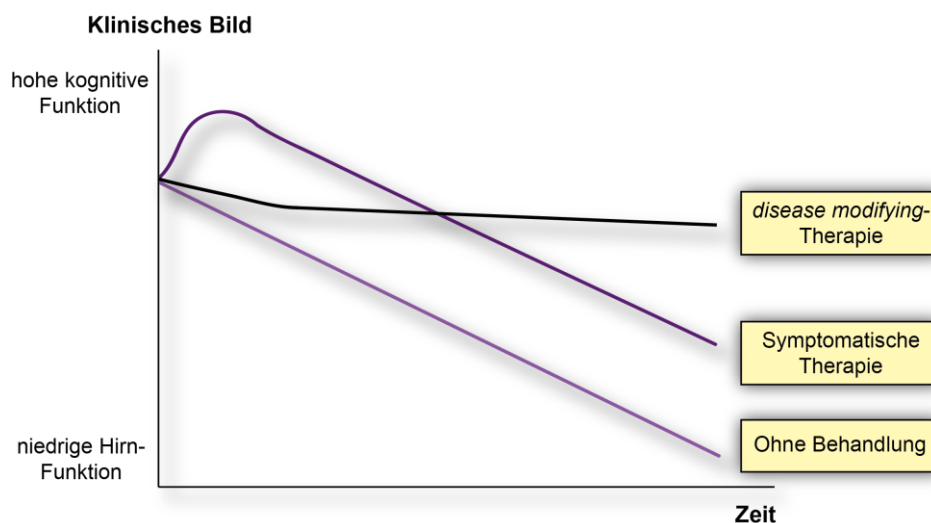


Abbildung 3 Symptomatische vs. *disease modifying* Therapie.¹⁶

Eine kurzfristige Verbesserung der kognitiven Eigenschaften ist seit nunmehr 10-15 Jahren durch den Einsatz verschiedener **Acetylcholinesterase-Inhibitoren** (AChEI) möglich (siehe Abb. 4). Der vorliegende Mangel an Acetylcholin (ACh) soll dadurch ausgeglichen werden, dass dessen Abbau im synaptischen Spalt verhindert wird. Folglich erfordert dieser Therapieansatz eine gewisse Restaktivität von ACh, so dass der Einsatz von AChEIs nur in den Anfangsstadien von Morbus Alzheimer empfohlen wird. Mit dem **Calcium-Antagonisten** Nimodipin ist außerdem ein Antidementivum verfügbar, das die gestörte Calcium-Homöostase über eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms in die

Nervenzelle beeinflussen soll. Bei Memantin handelt es sich um einen nicht-kompetitiven ***N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonisten**, der ebenfalls einen verminderten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt.¹¹ Der NMDA-Rezeptor wird bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen überstimuliert und führt dadurch zu einer Überladung der Nervenzellen mit Calcium (sog. Exzitotoxizität). Als Phytopharmakon steht darüber hinaus ein standardisierter Extrakt von **Ginkgo Biloba** (EGb 761[®]) zu Verfügung, dessen Wirksamkeit als Multitarget-Extrakt allerdings kontrovers diskutiert wird.¹⁷

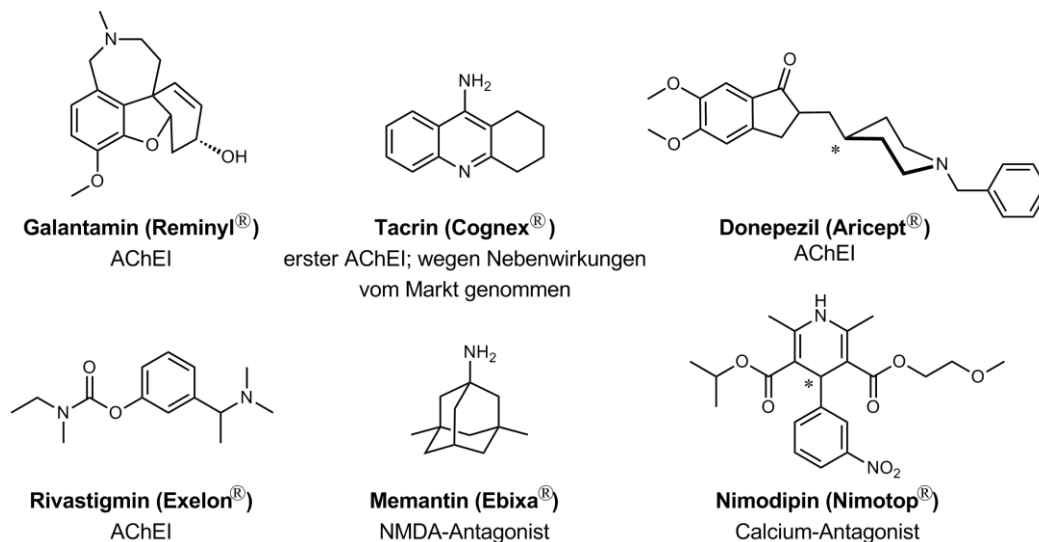


Abbildung 4 Strukturen zugelassener, symptomatisch wirksamer Arzneistoffe

2.2 Pathophysiologie von Morbus Alzheimer

Ein detailliertes Verständnis der pathologischen Zusammenhänge von Morbus Alzheimer ist die unerlässliche Grundlage für eine erfolgreiche Arzneistoff-Entwicklung. Seit nunmehr knapp 20 Jahren gilt die sogenannte „**Amyloid-Hypothese**“ von Hardy und Selkoe mit einigen Modifikationen als anerkannte Grundlage der Alzheimer-Pathologie. Diese sieht die Freisetzung und Aggregation von Amyloid-Fragmenten zu Amyloid-Plaques hervorgerufen durch eine gestörte Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP) als zentralen Bestandteil der Pathologie. Die resultierenden Amyloid-Plaques stellen faserige Aggregate dar, die sich vor allem aus Amyloid- β (A β) Fragmenten einer Länge von 39-43 Aminosäuren (AS) zusammensetzen.¹⁸⁻²¹ Die Entstehung des zweiten Charakteristikums, der neurofibrillären Bündel, findet über eine weitere Kaskade statt (Taupathologie), die in engem Zusammenhang mit der Amyloid-Kaskade steht. Es handelt sich dabei um helikal gewundene Fragmente, die in Nervenzellen und Dendriten unlösliche Bündel bilden und aus hyperphosphorylierten, glykosylierten Tauproteinen bestehen.^{22,23} Die pathologischen Zusammenhänge sind in Abb. 5 zusammengefasst und sollen in diesem Kapitel unter besonderer Berücksichtigung der Amyloid-Kaskade dargestellt werden.

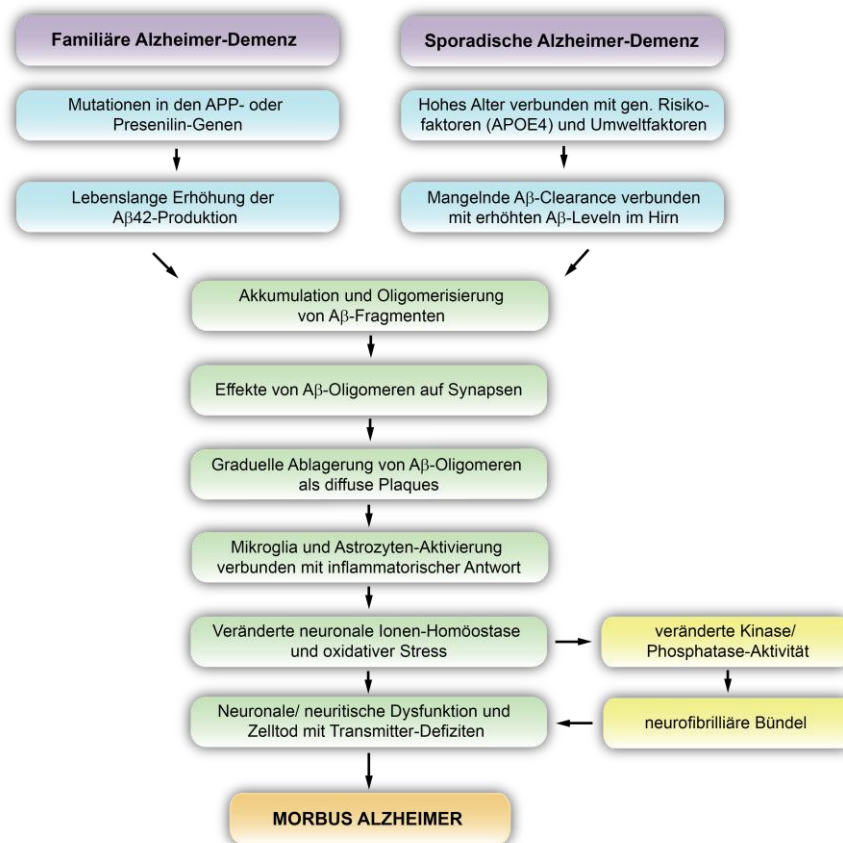


Abbildung 5 Amyloid-Hypothese und deren Konsequenzen, modifiziert nach Citron²⁴ und Blennow¹.

2.2.1 Risikofaktoren und Genetik

Genetik

Einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Amyloid-Hypothese lieferte die Entdeckung, dass Punktmutationen in drei Genen, die für APP oder die APP-prozessierende Protease Presenilin (PS)-1 und PS-2 (katalytische Einheit der γ -Sekretase) codieren, zur Entwicklung der seltenen und aggressiven *early-onset AD* führen. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die in einer vermehrten Freisetzung von A β 42-Fragmenten resultieren, alle Charakteristika von Morbus Alzheimer inklusive der neurofibrillären Bündel aus der Taupathologie zur Folge haben. Mittlerweile kennt man ca. 30 Mutationen in APP und mehr als 180 weitere in **PS-1/-2**, die Auslöser einer familiären AD sein können.²⁵

Auch die Ausprägung der **sporadischen AD** ist zum Großteil von genetischen Faktoren bestimmt. Diese sind allerdings nicht so klar definiert wie bei der familiären Form. Bereits 1993 wurde ein erhöhtes Alzheimer-Risiko bei Vorhandensein von mindestens einem ϵ 4-Allel von Apolipoprotein E (**APOE4**) festgestellt, das auf 65-80% aller Patienten mit sporadischer AD zutrifft und somit als wichtigster genetischer Faktor gilt.²⁶ APOE hat eine zentrale Rolle in der Cholesteroll-Homöostase und dem lokalen Lipidtransport. Der APOE4-Genotyp geht im Hirn mit einer beschleunigten Ablagerung von Amyloid- β einher,⁷ was mit einem gestörten Cholesterollaushalt²⁷ sowie Veränderungen in der Amyloid-Kaskade in Zusammenhang gebracht wird.^{28,29} Bei Vorliegen eines APOE4-Allels konnte

eine bis zu 50%-ige Reduktion des A β -prozessierenden Enzyms *insulin-degrading enzyme* (IDE) gezeigt werden.³⁰ Darüber hinaus ist APOE4 auch mit verminderter neuronaler Plastizität, Stimulation der Tau-Hyperphosphorylierung und verstärkter mitochondrialer Dysfunktion verknüpft.^{31,32}

Neben APOE4 wurden erst kürzlich anhand von mehreren tausend Patientendaten drei weitere Risikogene für sporadische AD identifiziert: **CLU** für den Lipidcarrier Clusterin (= Apolipoprotein J), **CR-1** für den Komplementfaktor 3b/4b-Rezeptor 1 und **PICALM** für ein intrazelluläres Transportprotein. Alle drei Gene sind direkt oder indirekt mit der Amyloid-Kaskade, Neuroinflammation oder dem Fettstoffwechsel verknüpft.³³⁻³⁵

Epidemiologische Faktoren: Das metabolische Syndrom und Morbus Alzheimer

Neben genetischen Faktoren und dem Alter konnten auch eine Reihe epidemiologischer Faktoren identifiziert werden, die die Wahrscheinlichkeit für eine Alzheimer-Demenz erhöhen können. Als Risikofaktoren sind neben direkten Beeinträchtigungen des Gehirns (Ischämie, Schädeltrauma) vor allem die typischen Symptome des **metabolischen Syndroms** wie Adipositas, Hypertonie oder Hypercholesterinämie und deren Folgeerkrankungen Atherosklerose und Typ-II Diabetes Mellitus (T2DM) hervorzuheben.^{1,36} Es konnte gezeigt werden, dass gerade Störungen im Lipid- und Glucosestoffwechsel eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von AD spielen können.

So wurde eine Korrelation zwischen erhöhten **Serumcholesterol**-Spiegeln und einem steigenden AD-Risiko gezeigt. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass der Cholesterolmetabolismus und -transport im Hirn mechanistisch eng mit dem Amyloid-Metabolismus verknüpft ist.³⁷ Erwähnenswert ist die Tatsache, dass Veränderungen im Cholesterolanteil der Zellmembran Einfluss auf die Aktivität der membranständigen Proteasen BACE-1 (*β -site of APP-cleaving enzyme-1*) und γ -Sekretase nehmen können. Eine Cholesterol-bedingte Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme könnte somit in der Folge zu Störungen in APP-Prozessierung und Amyloid-Haushalt führen.³⁸⁻⁴²

Zahlreiche Untersuchungen stellten außerdem einen Zusammenhang zwischen einem gestörten **Insulinhaushalt** und AD her. So zeigten epidemiologische Studien, dass Patienten mit T2DM (Hyperinsulinämie, Insulinresistenz) ein erhöhtes AD-Risiko haben.⁴³ Mechanistische Untersuchungen konnten belegen, dass es bei Vorliegen einer Insulinresistenz auch im Hirn zur Herabregulation von Insulin-Rezeptoren kommt. Darüber hinaus resultierte eine Insulinresistenz in erhöhten A β -Spiegeln und -Plaques, was unter anderem auf eine erhöhte γ -Sekretase- und verminderte IDE-Aktivität zurückzuführen ist. IDE ist sowohl für den Abbau von Insulin als auch von A β verantwortlich. Insulin stellt dabei einen kompetitiven Inhibitor des A β -Abbaus dar, so dass erhöhte Insulinlevel zu Veränderungen im A β -Haushalt führen.^{44,45} Weiterhin konnte bei T2DM eine Erhöhung des Transkriptionsfaktors NF κ B gezeigt werden, welcher zur vermehrten Expression proinflammatorischer Mediatoren führt.⁴⁶ In einem Mausmodell von Takeda et al. resultierte das Vorliegen von Diabetes in beschleunigter kognitiver Dysfunktion, hervorgerufen durch cerebrovaskuläre Entzündung und A β -Ablagerung.⁴⁷

2.2.2 Amyloid-Hypothese

Die Vermutung, dass die Aggregation von Amyloid-Fragmenten als Resultat der Amyloid-Kaskade substantiell mit der Ausprägung von Morbus Alzheimer verknüpft ist, beruht auf einer Reihe verschiedener Beobachtungen. Dies sind in erster Linie folgende:

1. Diverse genetische Mutationen in APP oder PS führen zu einer besonders amyloidogenen Form der familiären AD (siehe Kap. 2.2.1). Dies kommt auch bei Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) zum Tragen, bei denen das Vorliegen eines dritten APP-Allels eng mit der Ausbildung von Morbus Alzheimer verknüpft ist. Liegen dagegen Mutationen im Gen für das Tauprotein vor, so kommt es zur frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus ohne Ausbildung von Amyloid-Plaques.²⁰ **2.** In verschiedenen peripheren Amyloidosen können Amyloid-Ablagerungen dramatische Gewebeschäden und organische Dysfunktionen auslösen. **3.** Die Ablagerung von A β ist eines der ersten neuropathologischen Ereignisse von AD. Bei Patienten mit Down-Syndrom kann die A β -Ablagerung bereits bis zu 20-30 Jahre vor der Tau-Pathologie entstehen. **4.** A β zeigt auch in gezüchteten Neuronen Toxizität. **5.** Neurofibrilläre Bündel sind an einer Reihe von Demenzen beteiligt, wohingegen Amyloid-Plaques charakteristisch für Morbus Alzheimer und den Alterungsprozess sind.^{3,20}

2.2.2.1 Struktur und physiologische Eigenschaften von APP

Das Amyloid Precursor Protein ist ein Typ I-transmembranäres Glykoprotein, das zur Familie der APP-like Proteine (APLP) gehört und aus einer großen Ektodomäne sowie einem kürzeren carboxy-terminalen Bereich besteht. Neben seiner monomeren Form wird auch ein Vorliegen als Dimer und Oligomer diskutiert.^{48,49} Während die Proteinstrukturen innerhalb der APLP-Familie weitgehend homolog sind, ist die A β -Domäne von APP nicht konserviert und sehr spezifisch für APP.^{20,50}

APP ist vor allem im Hirn angereichert, wird aber auch in nahezu allen anderen Geweben exprimiert. Durch alternatives mRNA-Splicing wird es vorwiegend in den Isoformen APP695, APP751 und APP770 produziert.⁵⁰ Posttranslational gelangt APP auf einem konstitutiv sekretorischen Weg ins endoplasmatische Retikulum und über Golgi-Vesikel zur Zellmembran.⁵¹ Die nachfolgende proteolytische Prozessierung von APP findet dann an der Plasmamembran sowie intrazellulär am Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum und den endosomalen, lysosomalen und mitochondrialen Membranen statt.⁵²

Während man in Neuronen fast ausschließlich APP695 vorfindet, liegt in nichtneuronalen Geweben überwiegend APP751/770 vor. Die physiologische Rolle von APP ist dabei noch weitgehend ungeklärt. APP751 und APP770 sind in Thrombozyten lokalisiert und fungieren in der Gerinnungskaskade als Faktor XIa-Inhibitoren. Von APP695 vermutet man eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems, der Regulation des Neuritenwachstums, der synaptischen Plastizität und der Zelladhäsion.⁵³

2.2.2.2 Prozessierung von APP

Den initialen Schritt der Amyloid-Kaskade stellt die proteolytische Prozessierung von APP dar. Dieses kann durch die drei Proteasen α -, β - und γ -Sekretase auf zwei Wegen gespalten werden, dem nicht-amyloidogenen und dem amyloidogenen Weg (siehe Abb. 6). Ungleichgewichte zwischen Produktion und Clearance von Amyloid- β stellen den Ausgangspunkt für die Pathologie von AD dar.

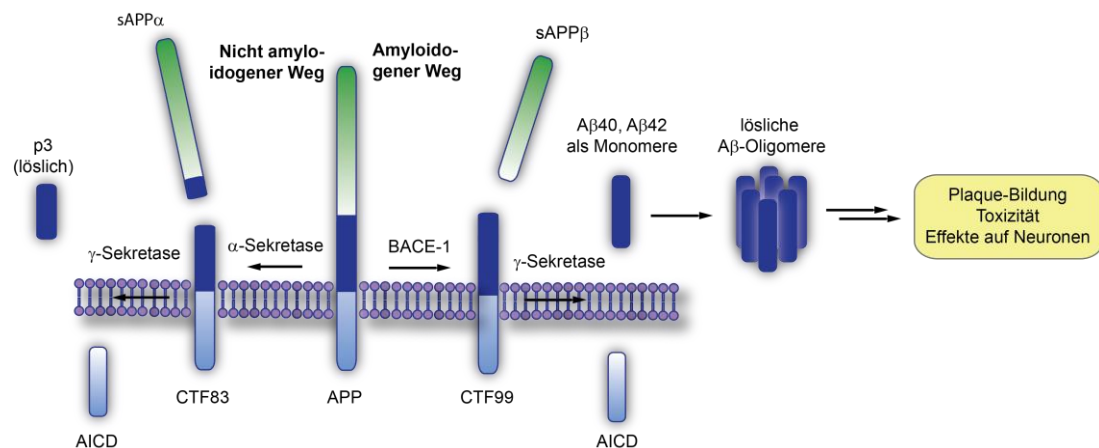


Abbildung 6 Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.

Der größte Teil von APP wird über den **nicht-amyloidogenen Weg** prozessiert. Hierbei wird APP zunächst extrazellulär durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne zwischen den Aminosäuren Lys16 und Leu17 gespalten. Die Spaltung an der α -Sekretase-Schnittstelle wird hauptsächlich über membrangebundene Zink-Metalloproteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Familie vermittelt. Es resultieren eine extrazelluläre, lösliche Ektodomäne (APPs α) und membrangebundene α -carboxyterminale Fragmente (CTF α , C83). APPs α soll neuroprotektive und Synapsen-bildende Eigenschaften besitzen. CTF α wird dagegen in der Folge transmembranär durch die Aspartylprotease γ -Sekretase durch ihre katalytische Einheit Presenilin gespalten. Dadurch werden extrazelluläre, lösliche p3-Fragmente (v.a. p3₁₇₋₄₀ und p3₁₇₋₄₂) mit unbekannter Funktion sowie die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) freigesetzt. Von AICD vermutet man eine Rolle als nukleäres Signalmolekül.²⁵

Über den **amyloidogenen Weg** findet eine alternative APP-Spaltung statt, die in der Freisetzung von Amyloid- β Fragmenten resultiert. Dieser gilt als pathogener, zu Morbus Alzheimer führender Weg. Die initiale Proteolyse von APP findet hier über die β -Sekretase (= BACE-1) statt. Diese befindet sich im Gegensatz zur α -Schnittstelle am Rande der A β -Region um 17 AS verschoben. So resultieren ein lösliches APPs β -Derivat mit unbekannter Funktion sowie ein carboxyterminales C99-Fragment (CTF β , C99), welches in der Membran verbleibt und in einem zweiten Schritt über γ -Sekretase prozessiert wird. Diese spaltet CTF β an mehreren Stellen innerhalb der transmembranären Domäne von APP. Dadurch erhält man ca. 4 kDa schwere A β -Fragmente einer Länge von 37-49 AS sowie die AICD. Der Mechanismus der APP-Prozessierung durch γ -Sekretase ist in Kap. 2.4.2.1 dargestellt.

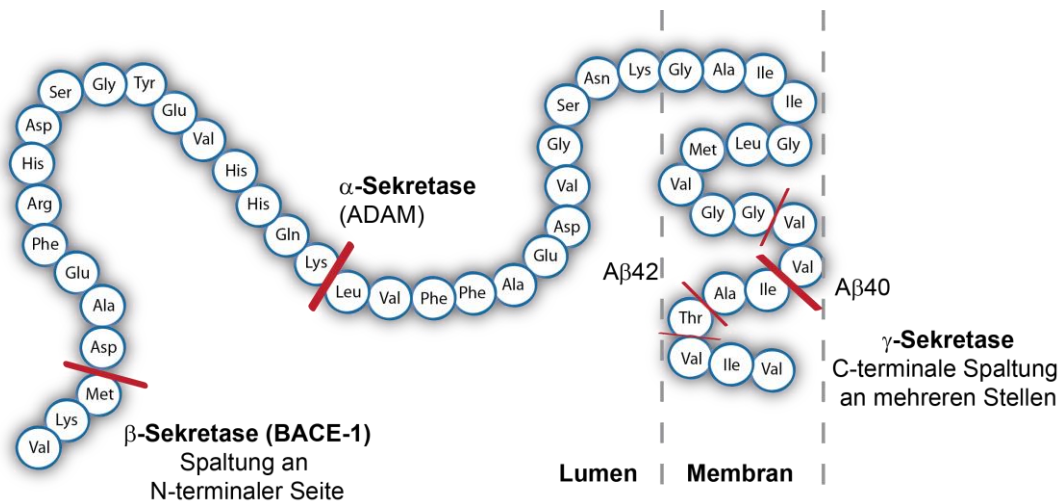


Abbildung 7 Aβ-Sequenz (bis AS 46) inklusive der Sekretase-Schnittstellen, modifiziert nach Carter.³ Aβ42 zeigt im Vergleich zu Aβ40 eine um zwei AS verlängerte Sequenz (Ile41 und Ala42).

Ca. 60-90% der resultierenden Aβ-Fragmente werden durch Aβ40 repräsentiert, wohingegen das hoch pathogene Aβ42 nur zu etwa 5-20% entsteht. Die AS-Sequenz von Aβ ist in Abb. 7 dargestellt. Liegt eine Mutation in APP oder PS vor, so kann der relative Anteil der längeren Aβ42-Fragmente im Gegensatz zu Aβ40 erhöht werden und die Plasma-Aβ42-Level können um 30-100% steigen.⁵⁴ Aufgrund der veränderten Tertiärstruktur aggregiert Aβ42 in der Folge deutlich schneller als Aβ40 zu Oligomeren und den charakteristischen Amyloid-Plaques.

Während die extrazellulären Amyloid-Plaques früher als eigentlich pathogene Spezies verdächtigt wurden, geht man heute davon aus, dass vor allem intrazellulär angesiedelte Aβ-Oligomere neurotoxisch wirken. So zeigten Aβ-Oligomere in verschiedenen transgenen Mausmodellen Einflüsse auf Lernen, synaptische Funktion und Langzeit-Potenzierung (LTP).⁵⁵⁻⁵⁷ Darüber hinaus konnte die Oligomeren-Toxizität auch *in vitro* nachgewiesen werden.⁵⁸ Die Bildung von Plaques wird heute dagegen als Detoxifikationsmechanismus vermutet.

Nach der Freisetzung von Aβ-Fragmenten findet deren Clearance statt. Für die proteolytische Prozessierung von Aβ sind im Hirn verschiedene Peptidasen wie IDE, Neprilysin oder das Endothelin-konvertierende Enzym verantwortlich. Der Efflux von Aβ vom Hirn ins Blut wird durch *low-density lipoprotein (LDL) receptor related protein* oder den VLDL-Rezeptor vermittelt.^{1,59} Folglich können nicht nur Störungen in der APP-Prozessierung, sondern auch in der Aβ-Clearance ein Ungleichgewicht auslösen und so zu einer vermehrten Aβ-Ablagerung führen. Eine aktuelle Studie untersuchte die Produktionsrate und Clearance von Aβ im ZNS von Patienten mit sporadischer AD im Vergleich zu gesunden Probanden (je 12 Probanden pro Gruppe). Interessanterweise konnten dabei keine Unterschiede in der Produktion von Aβ40/42, jedoch aber in deren Clearance nachgewiesen werden. Diese war bei AD-Patienten um 30% vermindert und führte bei Aβ42 und Aβ40 zu einem Produktions-Clearance-Verhältnis von 1.35-1.37 (gesunder Proband: 0.95-0.99). Die Studie bestätigt somit die Rolle der Aβ-Clearance bei der Ausbildung der sporadischen AD.⁶⁰

2.2.3 Weitere pathologische Charakteristika

Nach der Amyloid-Hypothese haben Störungen in der A β -Homöostase dramatische Auswirkungen auf den neuronalen Haushalt. Eine ausführliche Darstellung der weiteren pathologischen Charakteristika ist dem Review von Querfurth und LaFerla zu entnehmen.⁶

So kommt es als Resultat der Amyloid-Kaskade zu einer massiven, über Mikroglia und Astrozyten vermittelten **Neuroinflammation**, die ebenfalls zentraler Bestandteil von Morbus Alzheimer ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren IL-6 und TNF- α durch A β -Fragmente stimuliert wird.⁶¹ Darüber hinaus liegen unter pathologischen Bedingungen nicht nur IL-6 und TNF- α , sondern auch eine Reihe weiterer proinflammatorischer Cytokine und Chemokine wie IL-1 β oder MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein-1) erhöht vor. Die Entzündungsmediatoren stehen im Verdacht den Krankheitsverlauf zu beschleunigen, was letztlich zu einem vermehrten neuronalen Zelltod führt.⁶²

Des Weiteren kommt es über eine veränderte Kinase-Aktivität zur Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen (**Taupathologie**). Daraus resultiert das zweite wichtige histopathologische Charakteristikum von Morbus Alzheimer, die intrazelluläre Ablagerung von neurofibrillären Bündeln. Die Taupathologie soll an dieser Stelle nicht tiefergehend dargestellt werden. Es gilt allerdings zu beachten, dass bisher noch nicht geklärt werden konnte, ob die Taupathologie tatsächlich als Folge der Amyloid-Kaskade stattfindet oder ob sie ebenso bedeutend für das Krankheitsgeschehen ist.⁶³ In letzter Konsequenz kommt es dann zur **mitochondrialen Dysfunktion**: Im Alzheimer-Hirn liegen die Mitochondrien üblicherweise morphologisch verändert und in drastisch verringerter Anzahl vor, so dass es zum deutlichen lokalen Hypometabolismus kommt.⁶⁴ Dem folgt letztendlich der neuronale Zelltod im Hirn.

2.3 Neue Therapieansätze für Morbus Alzheimer

Die bisherige Kenntnis über die pathophysiologischen Zusammenhänge von AD legt eine Reihe von Targets nahe, über deren Beeinflussung eine *disease-modifying* Therapie möglich wäre. Derzeit befindet sich eine Reihe verschiedener Wirkstoffe in klinischen Studien. Dennoch ist es bisher nicht gelungen, einen solchen *disease-modifying* Wirkstoff erfolgreich bis zur Marktreife zu führen.

Eine Übersicht über klinische Kandidaten ist in Abb. 8 aufgeführt. Für eine ausführliche Darstellung wird auf aktuelle Reviews verwiesen.^{3,65,66} Ziel ist es möglichst in einen der ersten Schritte der Pathologie einzugreifen. Somit kommen als Targets in erster Linie Enzyme oder Rezeptoren in Frage, die an der A β -Homöostase beteiligt sind. Neben einer Adressierung der beiden APP-prozessierenden Proteasen BACE-1 und γ -Sekretase (derzeit mehrere Wirkstoffe in Phase I/ II)⁶⁷ stellt die aktive oder passive **Immunisierung** gegen Amyloid einen weiteren interessanten Ansatz dar. In ersten klinischen Studien mit dem aktiven Immuntherapeutikum AN1792 (Phase II) wurden allerdings unerwartete

Nebenwirkungen (erhöhtes Enzephalitis-Risiko) beobachtet. Nichtsdestotrotz befinden sich derzeit drei passive Immuntherapeutika (zwei monoklonale Antikörper, ein polyklonales Immunglobulin) in klinischen Phase III-Studien. Darüber hinaus werden auch die Inhibition der A β -Aggregation (verschiedene Wirkstoffe in Phase I-III) und die Aktivierung der A β -Clearance (ein Wirkstoff in Phase II) untersucht.⁶⁵

Neben dem Eingriff in die Amyloid-Kaskade sind eine Reihe weiterer Wirkstoffe in klinischer Entwicklung, die vor allem die **Taupathologie** (Kinase-Inhibitoren), die inflammatorische und mitochondriale Komponente der Erkrankung sowie epidemiologische Faktoren adressieren.

So wurden beispielsweise **NSAIDs** als AD-Therapeutika in klinischen Studien untersucht. Dies beruhte auf Beobachtungen in epidemiologischen Studien, dass die Einnahme von NSAIDs mit einem signifikant reduzierten Alzheimer-Risiko verbunden ist.^{1,65,68,69} Klinische Studien konnten einen Benefit für Alzheimer-Patienten allerdings nicht bestätigen.⁷⁰ Wegen des Einflusses des **Lipid- und Glucosestoffwechsels** auf die Entstehung von Morbus Alzheimer wurden auch eine Reihe an Wirkstoffen, die für verschiedene Erkrankungen im Bereich des metabolischen Syndroms zugelassen sind, auf ihre Eignung als Alzheimer-Wirkstoffe untersucht (Statine, PPAR γ -Agonisten, intranasales Insulin). Allerdings konnte auch hier kein Erfolg in klinischen Studien erzielt werden.⁶⁵

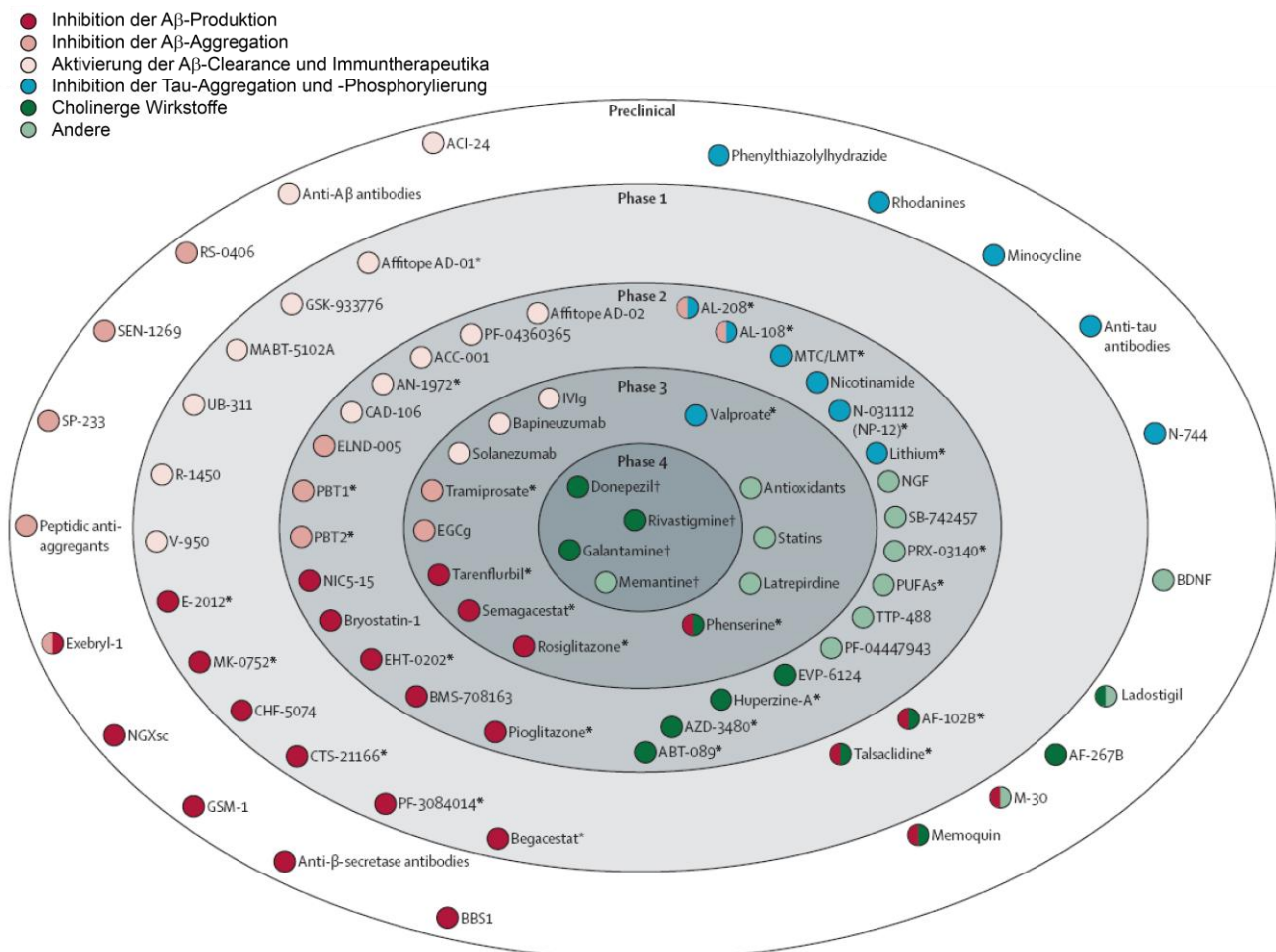


Abbildung 8 Übersicht über diverse Entwicklungs-Kandidaten für eine Alzheimer-Therapie. Die Weiterentwicklung der mit (*) markierten Wirkstoffe wurde eingestellt.⁶⁶

2.4 γ -Sekretase

Durch ihre zentrale Rolle in der Amyloid-Kaskade wurde die γ -Sekretase bereits in den früher 1990er Jahren als viel versprechendes Target identifiziert und seitdem ausgiebig untersucht. Besonders interessant ist sie durch die Erkenntnis geworden, dass Mutationen in den Presenilin-Genen PS-1 und PS-2 (katalytische Untereinheit der γ -Sekretase), einen direkten Auslöser der familiären Form von Morbus Alzheimer darstellen.

In diesem Kapitel sollen zunächst Struktur und biologische Eigenschaften der γ -Sekretase dargestellt werden. Im Folgenden soll ihre Eignung als Target inklusive des aktuellen Standes der Wirkstoffentwicklung von γ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren diskutiert werden.

2.4.1 Struktur und Funktion der γ -Sekretase

2.4.1.1 Struktureller Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes

γ -Sekretase zählt zur Familie der intramembranär spaltenden Proteasen (*intramembrane cleaving protease*, I-CLiPs). Trotz früher Erkenntnisse über die Rolle der Sekretasen bei der APP-Prozessierung waren Identität, Aufbau und Zusammensetzung der γ -Sekretase lange Zeit ungeklärt. Seit 2003 ist bekannt, dass es sich bei der γ -Sekretase um einen transmembranären Multiprotein-Komplex handelt, der aus mindestens vier integralen Membranproteinen besteht: dem katalytischen Kern **Presenilin** (PS) sowie **Nicastrin** (Nct), **Anterior pharynx-defective-1** (Aph1) und **Presenilin enhancer 2** (Pen-2).⁷¹⁻⁷⁴ PS und Aph1 werden jeweils von zwei Genen codiert, was in der Koexistenz der Subtypen PS-1 und PS-2 (Homologie auf AS-Level: 67%) sowie Aph1a und Aph1b (Homologie auf AS-Level: 57%) resultiert.²⁵

Alle Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes sind im endoplasmatischen Retikulum kolokalisiert und schließen sich in einem schrittweisen Prozess zusammen. Nachfolgend kommt es zur Endoproteolyse von PS und zur Konformationsänderung von Nct. Zuletzt wird der aktive Komplex über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert.^{23,75} Es wird vermutet, dass sich der γ -Sekretase-Komplex im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:1:1 zusammenschließt.⁷⁶ Somit ist die Ausbildung von mindestens vier verschiedenen tetrameren Komplexen möglich, die jeweils 19 transmembranäre Domänen (TMDs) aufweisen und damit eine extrem hohe Hydrophobie zeigen (siehe Abb. 9).²³

Bedingt durch die hohe Komplexität und Membranständigkeit des Komplexes ist es in naher Zukunft nicht absehbar, eine hoch aufgelöste Kristallstruktur für eine endgültige Strukturaufklärung zu erhalten. Eine niedrig aufgelöste Struktur des Komplexes (12 Å) konnte kürzlich mittels Kryoelektronen-Mikroskopie erhalten werden. Hierin wird eine globuläre Struktur mit glatter zytosolischer Seite, irregulärer, großer extrazellulärer Seite und großer wässriger Zentralkammer postuliert.⁷⁷

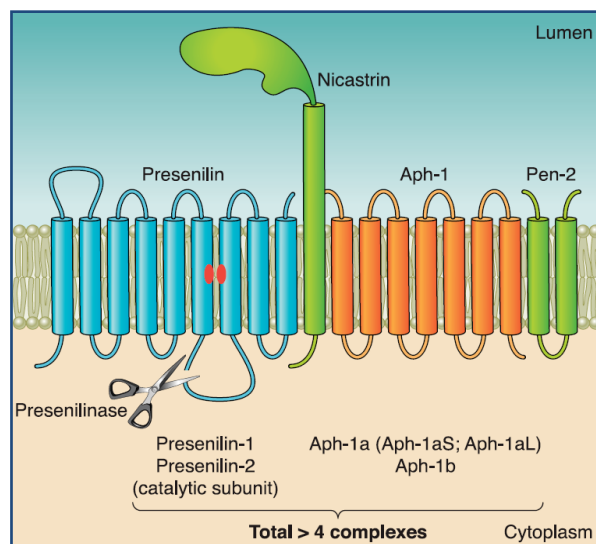


Abbildung 9 Struktur des γ -Sekretase-Komplexes.²⁵ Abgebildet sind die vier Untereinheiten PS, Aph1, Pen-2 und Nct. Zwischen TMD 6 und 7 ist das katalytische Zentrum sichtbar.

2.4.1.2 Presenilin als katalytisches Zentrum

Presenilin bildet als Aspartylprotease den katalytischen Kern der γ -Sekretase. Im direkten Vergleich der beiden Subtypen PS-1 und PS-2 ist das Vorliegen von PS-1 mit einer deutlich stärkeren APP-Prozessierung verknüpft. In Studien mit Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass für die proteolytische Funktionsfähigkeit von PS eine Stabilisierung durch alle drei Untereinheiten Nct, Aph1 und Pen-2 essentiell ist.⁷⁸ In einer aktuellen Studie von Ahn et al. konnte in Liposomen jedoch katalytisch aktives PS in Abwesenheit der anderen Untereinheiten generiert werden.⁷⁹ Strukturell stellt PS ein integrales Membranprotein mit 476 (PS-1) bzw. 473 (PS-2) AS, einer Masse von ca. 50 kDa und 9 TMDs dar. Im aktiven γ -Sekretase-Komplex wird Presenilin zwischen den Resten Asn292 und Val293 endoproteolysiert, was in der Entstehung eines N-terminalen (TMD 1-6) und eines C-terminalen Fragments (TMD 7-9) resultiert. Die endoproteolytischen Prozessierung findet vermutlich in einem (auto-)katalytischen Prozess durch Pen-2 statt^{73,79} und führt zu einer verminderten sterischen Hinderung. Sie ist jedoch keine zwingende Voraussetzung für die Aktivität der γ -Sekretase.⁸⁰

Der katalytische Prozess startet im aktiven Komplex mit der Erkennung und Bindung eines Substrats an der sog. **Docking-Stelle** von PS auf der zytosolischen Seite. Nachfolgend wird das Substrat zum katalytischen Zentrum (in TMD 6 und 7) weitertransportiert. Für die Proteolyse sind zwei Aspartat-Einheiten (Asp257, Asp385) sowie ein Wassermolekül als nukleophiles Agens erforderlich (siehe Abb. 10). Mutiert man einen der beiden Aspartatreste, so findet keine Proteolyse mehr statt und die γ -Sekretase ist im inaktiven Zustand.^{81,82} Die Substratspaltung findet nicht wie für Proteasen üblich in wässriger Umgebung, sondern in der Zellmembran statt. Die Schnittstelle ist innerhalb der transmembranären Domäne des Substrats. Trotz der hoch lipophilen Umgebung kann ein Wassermolekül (sowie auch das Substrat) über eine große hydrophile Pore am aktiven Zentrum zwischen TMD 6 und 7 verfügbar gemacht werden.

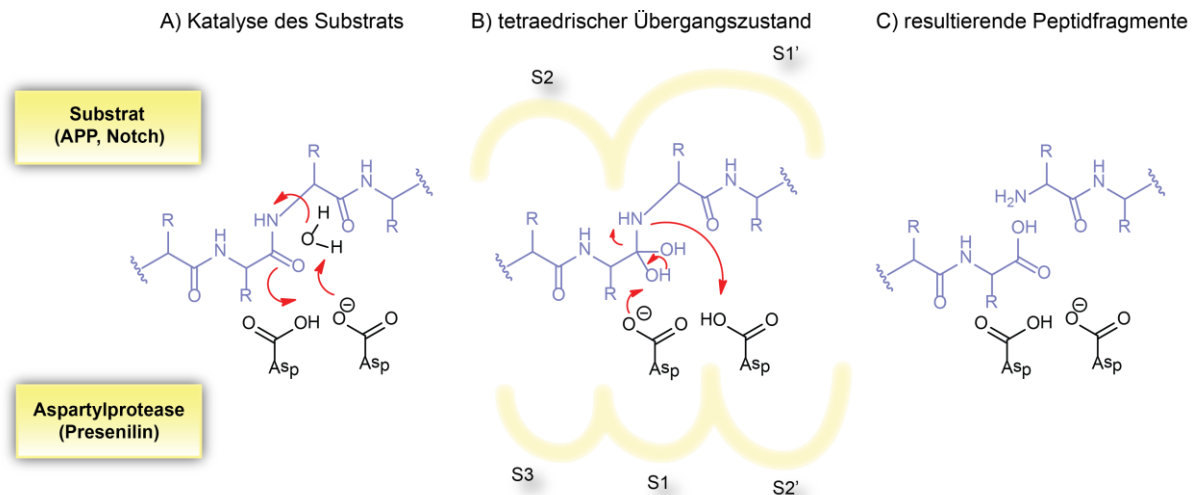


Abbildung 10 Mechanismus einer Aspartylprotease.⁸³ A) Das deprotonierte Aspartat polarisiert H₂O und gleichzeitig bildet der protonierte Rest eine H-Brücke zum Carbonyl der zu spaltenden Amidbindung. B) Instabiler Übergangszustand. Abgebildet sind hier auch die Bindetaschen in der Nähe des katalytischen Zentrums nach Standardnomenklatur (S1-S3, S1' und S2'). C) Bildung der Spaltprodukte.

Der katalytische Mechanismus ist in Abb. 10 dargestellt. Eine Inhibition des katalytischen Geschehens ist beispielsweise durch nicht-spaltbare Analoga des Übergangszustands in B möglich (siehe Kap. 2.4.3.1).⁸³⁻⁸⁵ Neben der Rolle im γ -Sekretase-Komplex sind für Preseniline noch weitere Funktionen beschrieben. Erwähnenswert ist eine Funktion als Ca²⁺-Ausfluss-Kanal im neuronalen Ca²⁺-Signalling und der Ca²⁺-Homöostase sowie als Stabilisator von β -Catenin. Darüber könnte Presenilin auch auf den gestörten Calcium-Haushalt bei Morbus Alzheimer einen Einfluss haben.³⁵

2.4.1.3 Nicastrin, Aph-1 und Pen-2

γ -Sekretase ist als einzige I-CLiP als Multiprotein-Komplex aufgebaut, daher liegt die Frage nach den Funktionen der einzelnen Teilnehmer nahe. Diese sind bisher nicht im Detail geklärt. **Nct** ist als Typ-I-transmembranäres Glykoprotein mit 130 kDa das größte Protein des γ -Sekretase-Komplexes (siehe Abb. 9). Es besitzt eine extrem große extrazelluläre Domäne, die im Laufe der γ -Sekretase-Translokation über den Golgi-Weg glykosyliert wird. Für Nct wird eine Rolle in der Substrat-Erkennung vermutet, weswegen es auch als „gatekeeper“ der γ -Sekretase bezeichnet wurde.^{86,87} Dagegen zeigen neuere Untersuchungen, dass Nct eher für den Aufbau und die Reifung des γ -Sekretase-Komplexes als für Substrat-Erkennung wichtig ist⁸⁸ bzw. keine essentielle Funktion für den Komplex hat.⁸⁹ **Aph1** besteht aus 7 TMDs und liegt als Subtyp Aph1a oder Aph1b im γ -Sekretase-Komplex vor. Hinsichtlich ihrer biochemischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden sich die Beiden: Während Aph1a für die sog. Notch-vermittelte Signaltransduktion essentiell ist (siehe Kap. 2.4.2.2), hat Aph1b in der normalen Hirnfunktion bei Neuregulin-abhängigen Entwicklungswegen eine Rolle. Interessanterweise konnte die Gesamtmenge an A β in Aph1b-Knockout-Mäusen Notch-unabhängig vermindert werden, weshalb die selektive Inhibition von Aph1b einen interessanten

Ansatz als Therapeutika für AD darstellen könnte.⁹⁰ **Pen-2** ist mit 2 TMDs das kleinste Protein des Komplexes.⁹¹ Es ist vermutlich an der endoproteolytischen Prozessierung von PS beteiligt.⁷⁹

2.4.2 Physiologische Funktionen

γ -Sekretase prozessiert auf die oben aufgeführte Weise (siehe Abb. 10) nicht nur APP, sondern auch eine ganze Reihe weiterer peptidischer Substrate. Strukturell sind diese vom Typ-I transmembranärer Proteine und besitzen eine kleine Ektodomäne, welche zumeist aus einer weiteren Spaltung durch Proteasen der ADAM-Familie (oder seltener BACE-1) resultiert. Mittlerweile sind über 80 verschiedene Substrate der γ -Sekretase bekannt,²³ weshalb sie auch als „Proteasom der Membran“ bezeichnet wurde.⁹² Unter diesen sind beispielsweise Notch, die Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und E-Cadherin, der Neurotrophin-Rezeptor p75 und Neuregulin (Rolle in Myelin-Formation).³⁵ In verschiedenen *in vitro* und *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der γ -Sekretase entscheidend von ihrer umgebenden Lipidmembran abhängig ist. Bei Erhöhung der Cholesterolkonzentration wurde die APP- und Notch-Prozessierung dosisabhängig gesteigert, wohingegen eine Erniedrigung von Cholesterolem zu einem gegenteiligen Effekt führte. *In vivo* könnte gerade diese Tatsache bei Patienten mit metabolischem Syndrom und Hypercholesterinämie entscheidend zum erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer beitragen (siehe Kap. 2.2.1).³⁹

2.4.2.1 Mechanismus der APP-Prozessierung

Aus der Spaltung von APP über BACE-1 und γ -Sekretase (siehe Kap. 2.2.2) resultiert die Freisetzung von unterschiedlichen Amyloid-Fragmenten (A β 37-49). Der Mechanismus, mit dem die Proteolyse an der sog. ζ -, ϵ - und γ -Schnittstelle der γ -Sekretase stattfindet, ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Das aktuelle Modell legt nahe, dass die Spaltung schrittweise in der Nähe des Zytoplasmas stattfindet. Zunächst wird dabei an der ϵ -Stelle geschnitten und dann entlang der α -helikalen TMD alle drei Aminosäuren wieder (entspricht einer Windung) bis zur γ -Stelle (siehe Abb. 11A). Ist das Peptid kurz genug, wird es letztendlich extrazellulär freigesetzt. Es werden dabei je nach Startpunkt an A β 48 oder A β 49 zwei verschiedene Produktserien produziert: A β 49 (ϵ), 43 (ζ), 40 und 37 (γ) sowie A β 48 (ϵ), 45 (ζ), 42 und 39 (γ). Die Freisetzung von A β 38 wird als Teil der A β 48-Reihe vermutet (siehe Abb. 11A).^{25,93}

Daneben gibt es ein Modell der Gruppe von Multhaup, das die über GxxxG-Motive (x = beliebige AS) vermittelte Dimerisierung der APP-TMD für einen wichtigen Mechanismus bei der A β 42-Freisetzung nahelegt. Kommt es dabei zu Störungen, so kann die Freisetzung von A β 42 ohne Beeinflussung von A β 40 selektiv reduziert werden (siehe Abb. 11B).⁴⁹

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Aktivität, sondern auch das Proteolyse-Profil der γ -Sekretase von ihrer umgebenden Lipidmembran abhängig ist: Während eine sphingo-

lipidreiche, eher dicke Membran fast ausschließlich an der A β 40-Schnittstelle schneidet, verschiebt sich das Profil bei Vorliegen einer dünneren, cholesterolhaltigeren Membran in Richtung A β 42.³⁹

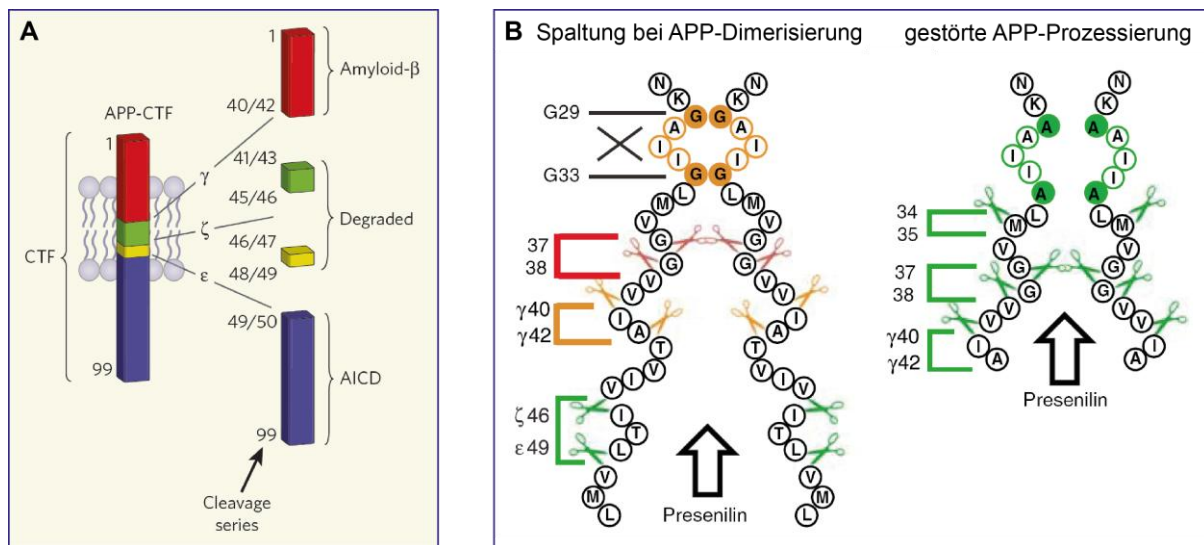


Abbildung 11 A) γ -Sekretase-Schnittstellen innerhalb der Membran. Für die Proteolyse von APP wird eine konsekutive Weise vermutet.⁹³ B) Dimerisierung von APP. Bei Blockade der Dimerisierung kommt es zu einem *shift* weg von der A β 42-Entstehung hin zu vermehrter A β 38-Produktion.⁴⁹

2.4.2.2 Notch-Prozessierung

Neben APP ist der Notch-Rezeptor der prominenteste Vertreter der γ -Sekretase-Substrate. Dessen Prozessierung trägt die mit am weitreichendsten pathophysiologischen Konsequenzen. Notch wird nach der Bindung eines seiner Liganden (Delta oder Serrate) zunächst über eine Protease der ADAM-Familie gespalten. Nachfolgend wird das resultierende C-terminale Fragment NEXT (*Notch extracellular truncation*) über die γ -Sekretase prozessiert. Dabei werden N β -Fragmente (keine Aggregation; Funktion unklar) sowie die Notch-intrazelluläre Domäne (NICD) freigesetzt, die nachfolgend in den Zellkern gelangt. Dort reguliert die NICD die Transkription einer Reihe von Target-Genen, die in Entwicklung und Differenzierung involviert sind. Notch ist somit an der Differenzierung von vielen Zelltypen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im Erwachsenenalter beteiligt. Inhibiert man die Notch-Prozessierung, so kommt es zu einer massiven Beeinträchtigung der Embryogenese, was zunächst am Tod von PS-Knockout-Mäusen sichtbar wurde. Zudem dient Notch der Regulation einiger Onkogene und onkogener Signaltransduktionswege (inkl. Myc und Akt). Daher werden γ -Sekretase-Inhibitoren auch als mögliche **Krebstherapeutika** diskutiert und untersucht. Im Kontext einer möglichen Alzheimer-Therapie wird die Inhibition der Notch-Prozessierung allerdings mit Mechanismus-basierten Nebenwirkungen wie gastrointestinalen Blutungen, Störungen im Immunsystem und Haarausfall assoziiert und muss beim Wirkstoffdesign berücksichtigt werden.³⁵

2.4.3 γ -Sekretase als *drug target*

Die Inhibition der A β 42-Freisetzung durch Adressierung der γ -Sekretase ist eine naheliegende Konsequenz aus den pathophysiologischen Grundlagen von Morbus Alzheimer. Obwohl die hochkomplexe Struktur des Enzyms für ein gezieltes Wirkstoffdesign noch nicht aufgeklärt werden konnte, wurden dennoch bereits in den 1990er Jahren erste nanomolar aktive γ -Sekretase-Inhibitoren (GSIs) über High-Throughput-Screenings (HTS) identifiziert. Betrachtet man den heutigen Stand des Wissens über die γ -Sekretase-Physiologie, so bringt die Adressierung dieses Enzyms extrem hohe Anforderungen an das Selektivitätsprofil der Substanzen mit sich. Dies scheint mit den beiden Gruppen der selektiven γ -**Sekretase-Modulatoren** und der **Notch-selektiven GSIs** möglich zu sein, ein klinischer Beweis steht allerdings immer noch aus.

2.4.3.1 Medizinische Chemie & klinische Relevanz der γ -Sekretase-Inhibitoren

Unter den GSIs gibt es in Abhängigkeit vom Bindemodus vier verschiedene Substanzklassen: peptidische Inhibitoren des katalytischen Zentrums oder der Docking-Position, allosterisch bindende semi-peptidische und nicht-peptidische GSIs sowie Inhibitoren der Nukleotid-Bindestelle. Alle genannten Substanzklassen adressieren die PS-Untereinheit der γ -Sekretase.

Unselektive γ -Sekretase-Inhibitoren

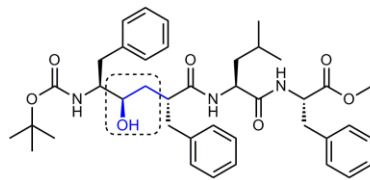
Eine Übersicht über Strukturen und *in vitro*-Aktivitäten diverser GSIs ist in Abb.12 aufgeführt. Zu den ersten Inhibitoren zählen eine Reihe peptidischer Übergangszustands-Analoga, die von bekannten HIV-Protease-Inhibitoren abgeleitet wurden und anhand der Kenntnis des katalytischen Mechanismus von Aspartylproteasen konstruiert wurden (siehe Kap. 2.4.1.2).⁹⁴ Anforderungen an einen solchen Wirkstoff sind proteolytische Stabilität und ein geeignetes Strukturelement für die molekulare Mimikry einer Peptidbindung (z.B. Difluorketon, Difluoralkohol oder Hydroxyethylen).

Ein äußerst potenter Inhibitor des aktiven Zentrums wurde mit der peptidischen Verbindung **L-685,458** von *Merck Sharp and Dome* entwickelt, bei der die Amid-Bindung durch eine Hydroxyethylen-Einheit ersetzt wurde.⁹⁵ Mit der Einführung α -Helix-induzierender Reste in die AS-Sequenz konnte eine weitere Gruppe GSIs hervorgebracht werden (**D-10**, **D-13**),⁹⁶ die an die Substrat-Docking-Stelle von Presenilin binden.⁹⁷ Obwohl die frühen peptidischen GSIs geeignete Werkzeuge für funktionelle Studien mit PS bzw. dem γ -Sekretase-Komplex darstellen, sind sie durch ihre Größe, metabolische Instabilität und unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften (insbesondere der mangelnden Hirngängigkeit) nicht als Arzneimittel geeignet.

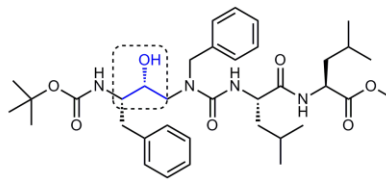
Daher versuchte man die Weiterentwicklung in Richtung kleinerer und ZNS-gängigerer Moleküle zu steuern. Ein solches stellt der semi-peptidische, allosterische Inhibitor **DAPT** (*N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin-tert-butylester) dar, von dem als erste Substanz *in vivo*-GSI-Aktivität berichtet wurde.⁹⁸ In transgenen Tg2576- (Überexpression von hAPP) und PDAPP-

Mäusen (Überexpression von APP_{V717F}) konnte die Produktion von A β 40 und A β 42 in Plasma und Hirn nach Verabreichung von 100 mg/kg DAPT zu 38-40% gehemmt werden. Die ZNS-Gängigkeit der Substanz ist allerdings umstritten.⁹⁹⁻¹⁰¹ In Folgestudien mit Zebrafischen wurde eine hohe *in vivo*-Toxizität beobachtet, die auf die Inhibition der Notch-Prozessierung zurückgeführt werden konnte.¹⁰²

a) peptidische Inhibitoren des aktiven Zentrums bzw der Docking-Stelle



L685,458
Merck Sharp and Dome
IC₅₀ = 17 nM



WPE III-31C
IC₅₀ = 300 nM

D-10 Boc-Val-Gly-Aib-Val-Val-Ile-Aib-Thr*-Val-Aib-OMe

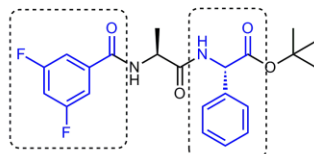
D-13 Ac-Val-Gly-Aib-Val-Val-Ile-Aib-Thr*-Val-Aib-Val-Val-Aib-NH₂

Aib = Aminoisobutyric acid, Helix-induzierend

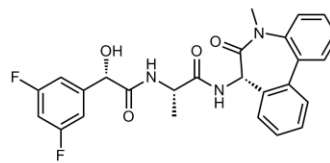
D-10 IC₅₀ = 100 nM

D-13 IC₅₀ = 30 nM

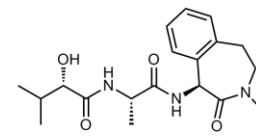
b) semipeptidische, allosterische Inhibitoren von Presenilin



DAPT (LY 374,973)
Eli Lilly
IC₅₀ = 20 nM



LY-411,575
Eli Lilly
IC₅₀ A β = 0.082 nM, Notch = 0.39 nM



Semagacestat (LY-450,139)
Eli Lilly
IC₅₀ A β = 26 nM, Notch = 15 nM
Scheitern in Phase III

Abbildung 12 Strukturen bekannter peptidischer und semipeptidischer GSIs

Durch Einführung von Benzodiazepin-artigen Resten am C-Terminus von DAPT wurden von *Eli Lilly* die Verbindung **LY-411,575** und der klinische Kandidat **LY-450,139** (Semagacestat) hervorgebracht (siehe Abb. 12). Der picomolar aktive GSI LY-411,575 konnte die A β -Level in Plasma und Hirn von Mäusen akut und chronisch senken.¹⁰³ Allerdings wurde auch bei dieser Substanz wegen des nur schmalen therapeutischen Fensters gegenüber der Notch-Inhibition in transgenen Mäusen gastrointestinale Toxizität und eine verringerte B- und T-Lymphozyten-Reifung beobachtet.¹⁰⁴

Trotz der Kenntnis über die möglichen Notch-bedingten Nebenwirkungen wurde Semagacestat als erster unselektiver GSI in klinischen Studien untersucht und zeigte zunächst eine gute Verträglichkeit sowie geringfügig gesenkte A β 40-Level in den Phasen I¹⁰⁵ und II^{106,107}. Daraufhin wurde die Substanz in zwei großen Phase-III Studien (IDENTITY und IDENTITY-2) an 2600 Patienten mit milder bis moderater AD untersucht. Umso enttäuschender waren die Resultate hier: Neben einem erhöhten Hautkrebsrisiko wurde sogar eine statistisch signifikante Verschlechterung der kognitiven Effekte trotz A β -Verringerung im Vergleich zu Placebo beobachtet.¹⁰⁸

Die Ergebnisse der IDENTITY-Studien lösten eine heftige Debatte über die Gründe des Scheiterns und somit über das generelle Konzept der Amyloid-Hypothese sowie der γ -Sekretase als Target aus. Vom heutigen Standpunkt aus kann noch keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob substanzspezifische Effekte von Semagacestat zu dessen Scheitern geführt haben oder ob es sich um einen Gruppeneffekt der GSIs handelt. Als mögliche substanzspezifische Gründe werden die

mangelnde Selektivität der Substanz (Einfluss der Notch-Inhibition auf das erhöhte Hautkrebsrisiko) sowie eine ungeeignete, zu hohe Dosierung von Semagacestat (140 mg pro Tag) diskutiert. Basierend auf dem Mechanismus der γ -Sekretase-Inhibition wäre es ebenso möglich, dass die verminderte Bildung von AICD und eine erhöhte Ansammlung von C99 (siehe Kap. 2.2.2.2) einen Einfluss haben. Ein weiterer, viel diskutierter Kritikpunkt ist der Zeitpunkt des Therapiebeginns. Da mit dem Auftreten der ersten Symptome von AD bereits ein Großteil der Neuronen zugrunde gegangen ist, ist ein Therapiestart bei leichter bis moderater AD möglicherweise bereits zu spät. Für einen früheren Start müssten Patienteneinschlusskriterien und Studienendpunkte künftig über valide Biomarker definiert werden.

Aus den Erfahrungen der präklinischen und klinischen Studien wird klar, dass ein potenter GSI nur mit geeignetem Selektivitätsprofil Chancen als mögliches Alzheimer-Therapeutikum hat. Um dies zu erreichen muss ein potentieller Wirkstoff selektiv in die A β -Produktion eingreifen und darf die Prozessierung der anderen Substrate der γ -Sekretase möglichst nicht beeinflussen. Substanzklassen, die ein solches Potential aufweisen und als Wirkstoffe in Frage kommen sind die **allosterischen, Notch-selektiven GSIs** sowie die selektiven **γ -Sekretase-Modulatoren** (siehe Kap. 2.4.3.2).

Neben diesen bereits fortgeschrittenen und *in vivo*-untersuchten Ansätzen sind kürzlich noch weitere potentielle Strategien berichtet worden. Diese beinhalten die Adressierung des γ -Sekretase-aktivierenden Proteins¹⁰⁹ oder eine selektive Blockade der Aph1b-Einheit, da diese keinen Einfluss auf Notch hat (siehe Kap. 2.4.1).⁹⁰ Ein dritter möglicher Angriffspunkt ist die APP-Substrat-inhibitorischen Domäne (ASID) von APP, die inhibierende Eigenschaften auf γ -Sekretase ausübt.¹¹⁰

Notch-selektive GSIs

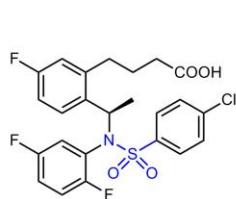
GSIs, die γ -Sekretase selektiv inhibieren und Notch in geringerem Ausmaß beeinflussen, sind bereits seit einiger Zeit in Entwicklung. Eine Übersicht über verschiedene Derivate und deren *in vitro*-Aktivität ist in Abb. 13 zu finden. Die meisten davon weisen eine charakteristische Sulfonamid-Partialstruktur auf und binden allosterisch an PS. In verschiedenen präklinischen *in vivo*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass solche Derivate in der Lage sind, A β -Level zu senken ohne dabei Notch-bedingte Nebenwirkungen hervorzurufen. Mit Imatinib (Gleevec[®], Kinase-Inhibitor; zugelassen für verschiedene maligne Erkrankungen) und Sirtinol wurden außerdem zwei strukturell andersartige Notch-selektive GSIs identifiziert, die mit der Inhibition der Nukleotid-Bindestelle (kompetitiv mit ATP) einen alternativen Bindemodus aufweisen.

Derzeit befinden sich drei Derivate in klinischen Studien (siehe Abb. 13). Die *Bristol-Myers Squibb* Substanz **BMS-708,163** (190-fache Notch-Selektivität; Phase II)¹¹¹ und zwei Verbindungen von *Elan Pharmaceuticals* (ELND-006) und *Merck* (MRK-X; beide Phase I), deren Strukturen nicht veröffentlicht sind.

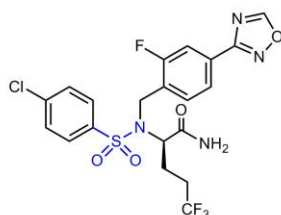
Zusammenfassend bieten die Notch-selektiven GSIs trotz des initialen Scheiterns der unselektiven GSIs ein viel versprechendes Profil als potentielle Therapeutika gegen Morbus Alzheimer. Um

allerdings eine abschließende Aussage über diesen Ansatz abzugeben, muss deren klinisches Profil bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit in weiteren Studien untersucht werden.

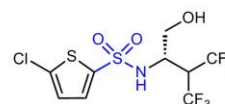
a) Sulfonamid-Derivate als allosterische PS-Inhibitoren



BMS-299897
Bristol-Myers Squibb
keine Weiterentwicklung nach Phase I
 IC_{50} A β = 7.1 nM, Notch = 105.9 nM

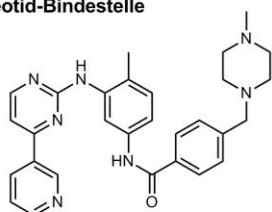


BMS-708163
Bristol-Myers Squibb
derzeit in Phase II
 IC_{50} A β = 0.3 nM, Notch = 58 nM

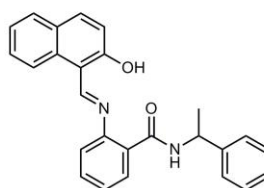


Begacestat
Wyeth/ Pfizer
keine Weiterentwicklung nach Phase I
 IC_{50} A β = 13 nM, Notch = 204 nM

b) Inhibitoren der Nukleotid-Bindestelle



Imatinib (Gleevec[®])
Novartis
 IC_{50} A β = 10-75 μ M
keine Inhibition von Notch



Sirtinol
 IC_{50} A β = 50 μ M
keine Inhibition von Notch

Abbildung 13 Strukturen von allosterischen, nicht-peptidischen Inhibitoren.

2.4.4.2 Medizinische Chemie & klinische Relevanz der γ -Sekretase-Modulatoren

Die Gruppe der γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) stellt einen äußerst viel versprechenden, selektiven Ansatz zur Inhibition der A β 42-Freisetzung dar. Strukturell gibt es innerhalb der GSMs zwei verschiedene Substanzklassen: **von NSAIDs abgeleitete GSMs**, die ein lipophiles Grundgerüst verbunden mit einer Carbonsäurefunktion aufweisen und **nicht-acide GSMs** mit einer charakteristischen Anordnung von meist vier aromatischen oder aliphatischen Einheiten.

Von NSAIDs abgeleitete GSMs

2001 wurde von Weggen et al. erstmalig beobachtet, dass Vertreter der NSAIDs wie Sulindac-Sulfid, Indomethacin oder Ibuprofen in der Lage sind, die Aktivität der γ -Sekretase zu modulieren (siehe Abb. 14). Sie konnten im mikromolaren Bereich eine charakteristische Inhibition von A β 42 bei gleichzeitiger Erhöhung von A β 38 auslösen, während andere NSAIDs wie ASS, Piroxicam oder Naproxen diese Effekte nicht zeigten.¹¹² Die Modulation der γ -Sekretase findet unabhängig von der Cyclooxygenase (COX)-Inhibition oder anderen nachgewiesenen NSAID-Targets wie PPAR γ , Lipoxygenasen oder NF κ B statt.¹¹³ Interessanterweise wird dabei die A β 40-Produktion und die Prozessierung von Notch nicht inhibiert, so dass die physiologisch relevanten Funktionen der γ -

Sekretase inklusive der Bildung von AICD und dem Abbau vom CTF99 resultierend aus der APP-Prozessierung im besten Fall aufrecht erhalten bleiben.^{114,115} Der Mechanismus der Modulation ist allerdings nicht vollständig aufgeklärt und soll im Folgenden noch ausführlich diskutiert werden.

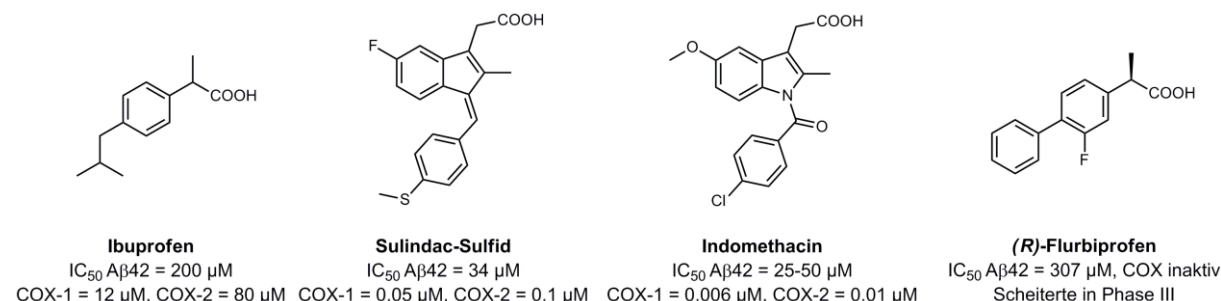


Abbildung 14. γ -Sekretase-modulierende NSAIDs

Eine Verringerung der Aβ42-Level durch GSMs konnte *in vivo* in transgenen Maus-Modellen ohne Notch-bedingte Nebenwirkungen bestätigt werden.^{112,116} Somit zeigen GSMs ein äußerst attraktives Profil zur Inhibition der Aβ42-Bildung. Die Eignung von NSAIDs als GSMs für eine Alzheimer-Therapie ist jedoch stark limitiert. Aufgrund ihrer hohen COX-Potenz (zumeist im nanomolaren Bereich, siehe Abb. 14) bei mikromolarer γ -Sekretase-Aktivität bedarf es einer deutlichen strukturellen Optimierung hin zu COX-selektiven GSMs. In einer Langzeittherapie wären die klassischen COX-bedingten Nebenwirkungen wie gastrointestinale Toxizität und kardiovaskuläre Komplikationen ein großes Hindernis.¹¹⁷

Mit dem (*R*)-Enantiomer von **Flurbiprofen** (Flurizan[®], siehe Abb. 14) konnte ein schwach aktiver GSM (IC₅₀ Aβ42 = 307 μM) ohne COX-Aktivität identifiziert werden. Die Substanz zeigte in transgenen Tg2576-Mäusen eine Senkung der Aβ42-Level sowie verminderte Lerndefizite ohne erkennbare Notch-bedingte Nebenwirkungen.¹¹⁸ Dies führte dazu, dass Flurbiprofen als erster GSM in klinischen Phase I und Phase II-Studien erfolgreich untersucht wurde.^{119,120} In einer Phase III-Studie an 1700 Patienten mit milder AD konnte (*R*)-Flurbiprofen die primären und sekundären Endpunkte jedoch nicht erreichen und zeigte keine Überlegenheit gegenüber Placebo.¹²¹ Als Begründung hierfür werden vor allem substanzspezifische Kriterien wie die niedrige γ -Sekretase-Potenz und die geringe ZNS-Gängigkeit (CSF (Cerebrospinal-Flüssigkeit)-Plasma-Verhältnis = 1.3%) diskutiert. Neben der Frage, ob die γ -Sekretase-Modulation einen geeigneten Wirkmechanismus darstellt, bleibt wie bei Semagacestat (siehe Kap. 2.4.4.1) die Diskussion, ob die Studienparameter richtig gewählt wurden und ob der Zeitpunkt für den Eingriff in das Krankheitsgeschehen bereits zu spät war. Auf Basis dieser Faktoren ist somit eine abschließende Beurteilung der GSMs anhand der Flurbiprofen-Studien nicht möglich.^{122,123}

Strukturelle Merkmale von γ -Sekretase-modulierenden NSAIDs sind eine Säuregruppe und ein lipophiles, aromatisches Grundgerüst. Zur Optimierung der substanzspezifischen Eigenschaften hinsichtlich γ -Sekretase-Aktivität, Selektivität und Pharmakokinetik wurden die NSAIDs Flurbi-

profen, Indomethacin und Carprofen vielfach als Vorlage genutzt. Die resultierenden Strukturen sind Teil diverser Patente und in zwei Reviews von Peretto et al. und Oehlich et al. zusammengefasst.^{124,125}

In der ersten Generation lag der Fokus vor allem darauf, die schwache γ -Sekretase-Aktivität zu erhöhen und die COX-Inhibition zu senken. Verschiedene Derivate sind exemplarisch in Abb. 15 abgebildet. Ein Großteil der Weiterentwicklungen basiert auf dem Grundgerüst von **Flurbiprofen**.

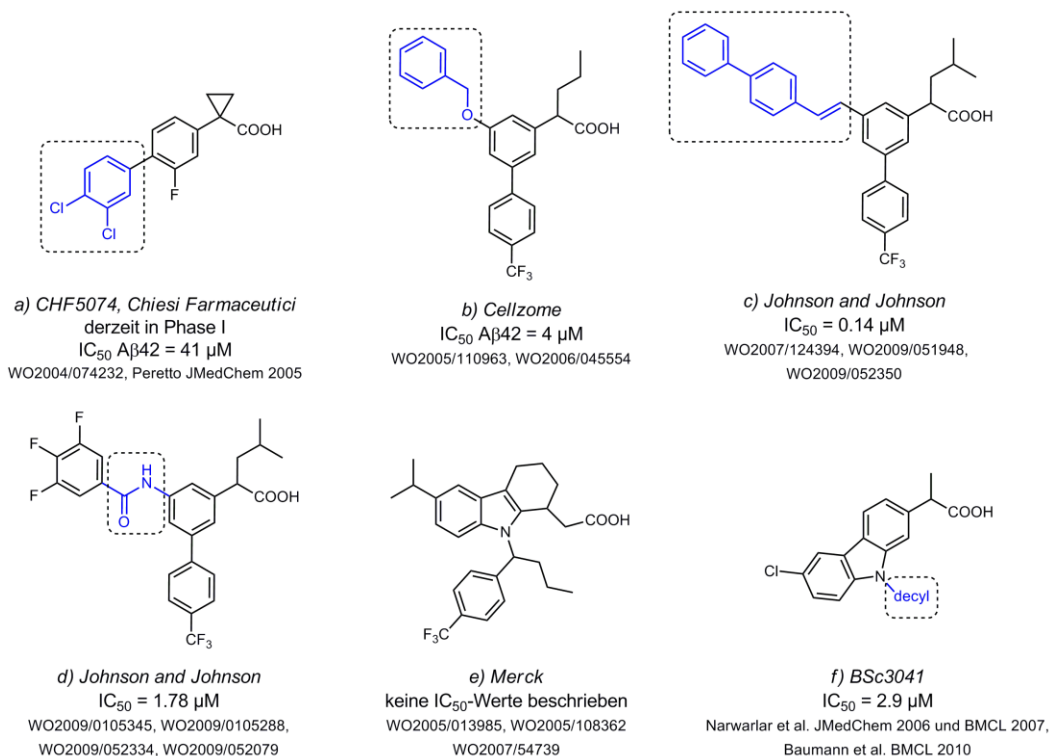


Abbildung 15 Erste Generation der NSAID-Analoga. Es sind jeweils repräsentative Strukturen und deren Aktivitäten angegeben. In den blau markierten Bereichen wurden besonders viele Strukturvariationen beschrieben. Patentnummern zu den jeweiligen Substanzklassen sind unterhalb der Struktur zu finden.

Eine einfache Möglichkeit der Optimierung ergab sich zunächst durch Einführung von Alkyl-Substituenten in α -Position zur Carboxylgruppe, was vielfach zu verminderter COX-Inhibition bei gleichbleibender oder höherer γ -Sekretase-Aktivität führte.

Von Chiesi Farmaceutici (siehe Abb. 15, a) wurden einige COX-inaktive Flurbiprofen-Derivate mit α -Cyclopropylrest entwickelt, deren γ -Sekretase-Modulation durch Substitutionen am terminalen Phenylring (z.B. Chlor, Fluor oder Phenyl) bis in den mittleren mikromolaren Bereich gesteigert werden konnte. Dennoch sind die Aktivitäten im Vergleich zu den hochpotenten GSIs eher gering.¹²⁶ Mit der in Abb. 15, a dargestellten Verbindung **CHF5074** wurde eine mikromolar aktive Substanz weiter charakterisiert, die sich derzeit in klinischer Prüfung Phase I befindet. Obwohl die Substanz ebenfalls eine geringe ZNS-Gängigkeit (CSF-Plasma-Verhältnis = 5%) aufweist, zeigte sie in Tg2576-Mäusen bei chronischer Behandlung (17 Wochen, perorale Gabe) eine signifikante Senkung der Amyloid-Plaques und der A β 42-Level. In zwei Langzeitstudien (6 bzw. 15 Monate) mit transgenen Mäusen konnten außerdem verbesserte Eigenschaften auf Gedächtnis und Lernen nachgewiesen werden. Toxizität durch Notch-Inhibition wurde dabei nicht beobachtet.¹²⁷⁻¹³⁰ Weitere **Flurbiprofen-**

Derivate wurden von *Cellzome* und *Johnson & Johnson* in mehreren Patenten (siehe Abb. 15, b-d) beschrieben. Eine deutliche Steigerung der A β 42-Inhibition bis in den nanomolaren Bereich konnte hier durch Erweiterung des aromatischen Systems und Einführung von Trifluormethyl-Gruppen an den terminalen Phenylringen erreicht werden.

Eher im Hintergrund standen Weiterentwicklungen auf Basis anderer NSAID-Strukturen als Flurbiprofen. Ausgehend von **Indomethacin** wurden von *Merck* (siehe Abb. 15, e) einige Derivate ohne Angabe von Aktivitäten patentiert. Diverse Modifikationen des schwachen GSMs **Carprofen** wurden von der Gruppe von Boris Schmidt (Abb. 15, f) durchgeführt.^{131,132} Auch hier erwies sich die Erweiterung des lipophilen Systems durch zusätzliche aliphatische oder aromatische Bereiche als vorteilhaft. γ -Sekretase-Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich wurde durch Einführung unterschiedlich langer Alkyl-Ketten (> C8) erreicht. Da Derivate mit langen Fettsäureresten (C16-18) ebenfalls γ -Sekretase-Aktivität zeigten, wurde von den Autoren darauf geschlossen, dass eine lipophile Verankerung in der Zellmembran möglich ist.¹³³

Eine Schwäche der ersten Generation von NSAID-analogen GSMs ist ihre hohe Lipophilie resultierend aus der Erweiterung des aromatischen Systems und – soweit beschrieben – eine geringe Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (in der Regel < 10%).

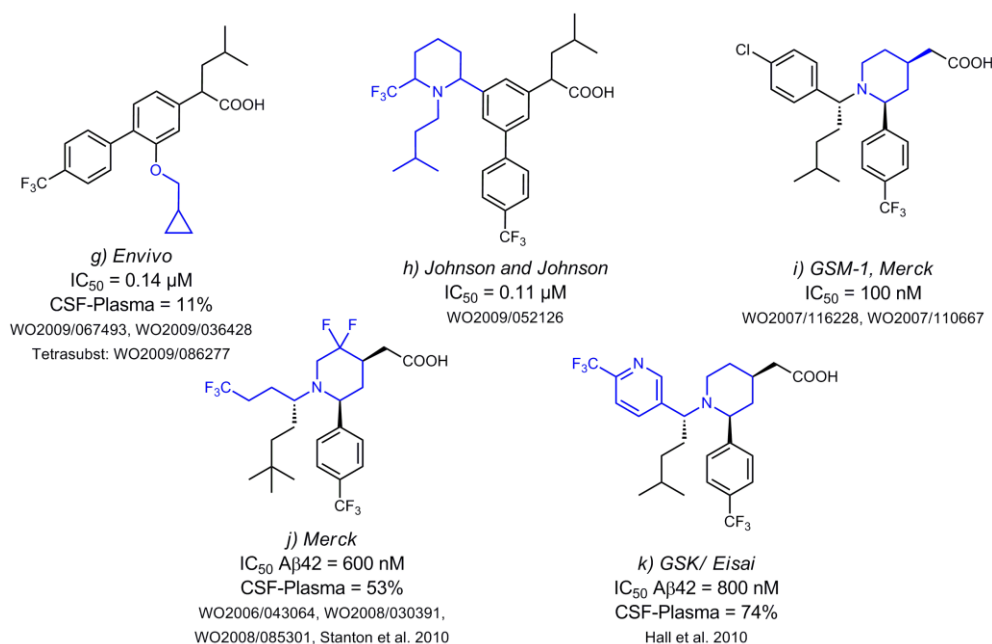


Abbildung 16 Zweite Generation der Flurbiprofen-Derivate. Optimierung pharmakokinetischer Eigenschaften. Molekülteile, die der Verminderung der Lipophilie dienen, wurden blau markiert. Die Patentnummern sind unterhalb der repräsentativen Verbindungen angegeben.

Ansätze zur Senkung der Lipophilie wurden beispielsweise mit der Einführung eines Piperidin-Rings anstelle des terminalen (siehe Abb. 16, h) oder zentralen Aromaten (i-k) beschrieben. Die bisher vorteilhaftesten pharmakokinetischen Eigenschaften wurden von GSM-1 und seinen Derivaten berichtet.¹³⁴ GSM-1 (Abb. 16, i) konnte zu über 50% im Hirn vorgefunden werden und zeigte in einer Studie von Page et al. in transgenen APP_{Swe}-Mäusen einen dosisabhängigen Anstieg der A β 38-Level sowie eine Verringerung von A β 42. Die A β 40-Werte sowie A β -total blieben dabei unverändert.¹³⁵

Auch für die fluorierte Verbindung j (Abb. 16) wurde in Ratten ein CSF-Plasma-Verhältnis von 53% beschrieben.¹³⁴ Basierend auf den Verbindungen i und j (Abb. 16) wurde von *GSK/ Eisai* ein Substanzset entwickelt, in dem zusätzlich noch ein Phenyl-Rest durch Pyridin ausgetauscht wurde. Die resultierende Verbindung k weist nanomolare Aktivität auf und deren CSF-Plasma-Verhältnis konnte in APP-YAC-Mäusen auf 74% erhöht werden. Damit wurde eine 84%-ige Reduktion der A β 42-Level erreicht. Daneben wurde berichtet, dass das Substanzset von *Eisai in vitro* keine Cytotoxizität zeigt und keines von fünf häufig vorkommenden CYP-Enzymen inhibiert.¹³⁶

Während am lipophilen Rückraum breite strukturelle Variationen möglich sind, hat die Carboxylgruppe für NSAID-analoge GSMs eine essentielle Funktion. Tauscht man diese zum Beispiel bei **Indomethacin** durch eine Ester- oder Amidgruppe aus, so erhält man ein inverses Profil mit verminderter A β 38- und erhöhter A β 42-Produktion. Eine solche inverse γ -Sekretase-Modulation konnte auch bei dem zugelassenen COX-2-Inhibitor Celecoxib, dem klinisch eingesetzten PPAR α -Agonisten Fenofibrat und dem LXR-Agonisten TO901317 beobachtet werden (siehe Abb. 17).¹³⁷

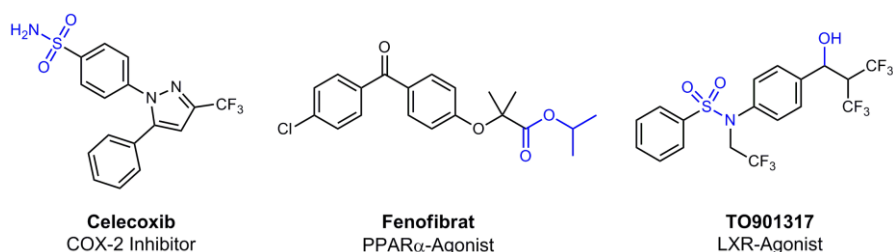


Abbildung 17 Strukturen inverser γ -Sekretase-Modulatoren. Als strukturelle Gemeinsamkeit besitzen sie ein NSAID-ähnliches Grundgerüst ohne Carboxylgruppe. Stattdessen enthalten sie Sulfonamid-, Ester- oder Hydroxygruppen (blau markiert).

Eine klinische Relevanz des inversen Mechanismus von Celecoxib im Sinne eines erhöhten Risikos für Morbus Alzheimer wurde allerdings in therapeutisch eingesetzten Dosierungen nicht beobachtet.¹³⁸ Gemeinsame strukturelle Merkmale inverser GSMs sind die Abwesenheit einer Carboxylgruppe und ein lipophiler Rückraum. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu NSAID-analogen GSMs stellen diese Derivate eine interessante Substanzklasse dar, die zur Aufklärung des GSM-Mechanismus beitragen könnte.

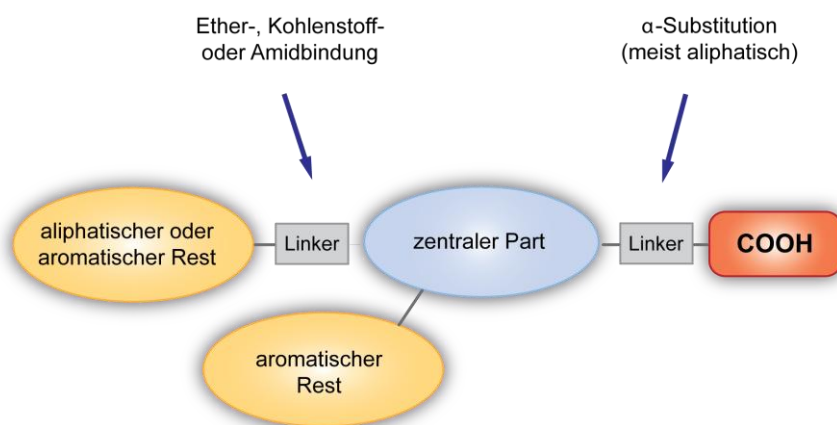


Abbildung 18 Genereller Aufbau der von NSAIDs abgeleiteten GSMs.

Zusammengefasst teilen NSAID-derivatisierte GSMs einen strukturellen Aufbau bestehend aus zwei oder mehr aromatischen Zentren, einer Substitution in α -Position (zur Senkung der COX-Inhibition) und einer Säuregruppe (siehe Abb. 18). Als vorteilhaft zeigten sich Trifluormethyl-Substituenten an den terminalen Aromaten. Eine deutlich gesteigerte Aufnahme ins Hirn (höher als 50%) konnte mit dem Ersatz einzelner Aromaten durch Piperidin oder andere (stickstoffhaltige) Heteroaromaten und somit einer Verringerung der Lipophilie erreicht werden. Solche Wirkstoffe zeigen besonders viel versprechende Charakteristika zur Weiterentwicklung in klinischen Studien. Dennoch steht derzeit mit CHF5074 (Abb. 15, a) nur ein einziger, moderat aktiver NSAID-analoger GSM in klinischen Studien.

Nicht-acide GSMs

Die NSAID-analogen GSMs wurden in jüngster Vergangenheit mehr und mehr von einer strukturell unterschiedlichen Klasse, den nicht-aciden GSMs verdrängt. In diesem Feld wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl neuer Verbindungen entwickelt und in zahlreichen Patenten zusammengefasst. Für eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Substanzklassen sei auf den Review von Oehlich et al. verwiesen.¹²⁵ Die ersten Derivate solcher nicht-acider γ -Sekretase-Modulatoren wurden von *TorreyPines Therapeutics* 2004 in einem High-Throughput-Screening identifiziert. Die beschriebenen Verbindungen besitzen einen linearen Aufbau von vier meist aromatischen Ringen (Ring A-D, siehe Abb. 19) und inhibieren A β 42 im mikromolaren bis nanomolaren Bereich. Das für bestimmte NSAIDs charakteristische γ -Sekretase-modulierende Profil konnte bestätigt werden.

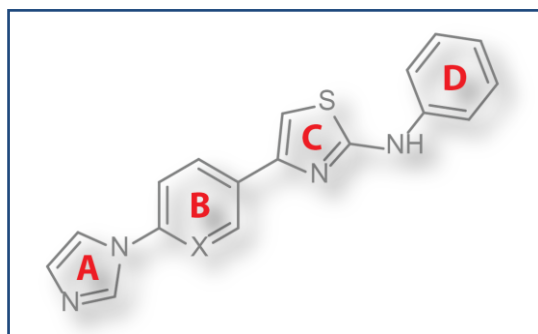


Abbildung 19 Generelle Struktur der nicht-aciden GSMs basierend auf den Derivaten von *TorreyPines*¹²⁵

Ein Austausch der Thiazol-Einheit in Ring C wurde von *Eisai* in Verbindungen unterschiedlicher Patente (siehe Abb. 20, b und c) vorgenommen. Es resultieren α,β -ungesättigte Amide, die die Substanzklasse der Diarylcinnamid-Derivate darstellen. Die Verbindungen zeigen ebenfalls eine lineare Anordnung von meist vier aromatischen Ringen und inhibieren die A β 42-Produktion im nanomolaren Bereich. Aus diesen frühen Derivaten resultierte der bisher einzige klinische Kandidat der nicht-aciden GSMs, **E2012** (siehe Abb. 20, b). Erste klinische Studien (Phase I) mit E2012 wurden 2006 begonnen,¹²⁵ nach Mangialasche et al. wurde die weitere Entwicklung der Substanz allerdings eingestellt.⁶⁶ Modifikationen der ersten Strukturen von *Eisai* und *TorreyPines* wurden in zahlreichen Patenten beschrieben. Eine Übersicht über die wichtigsten Substanzklassen ist in Abb. 20 zu finden.

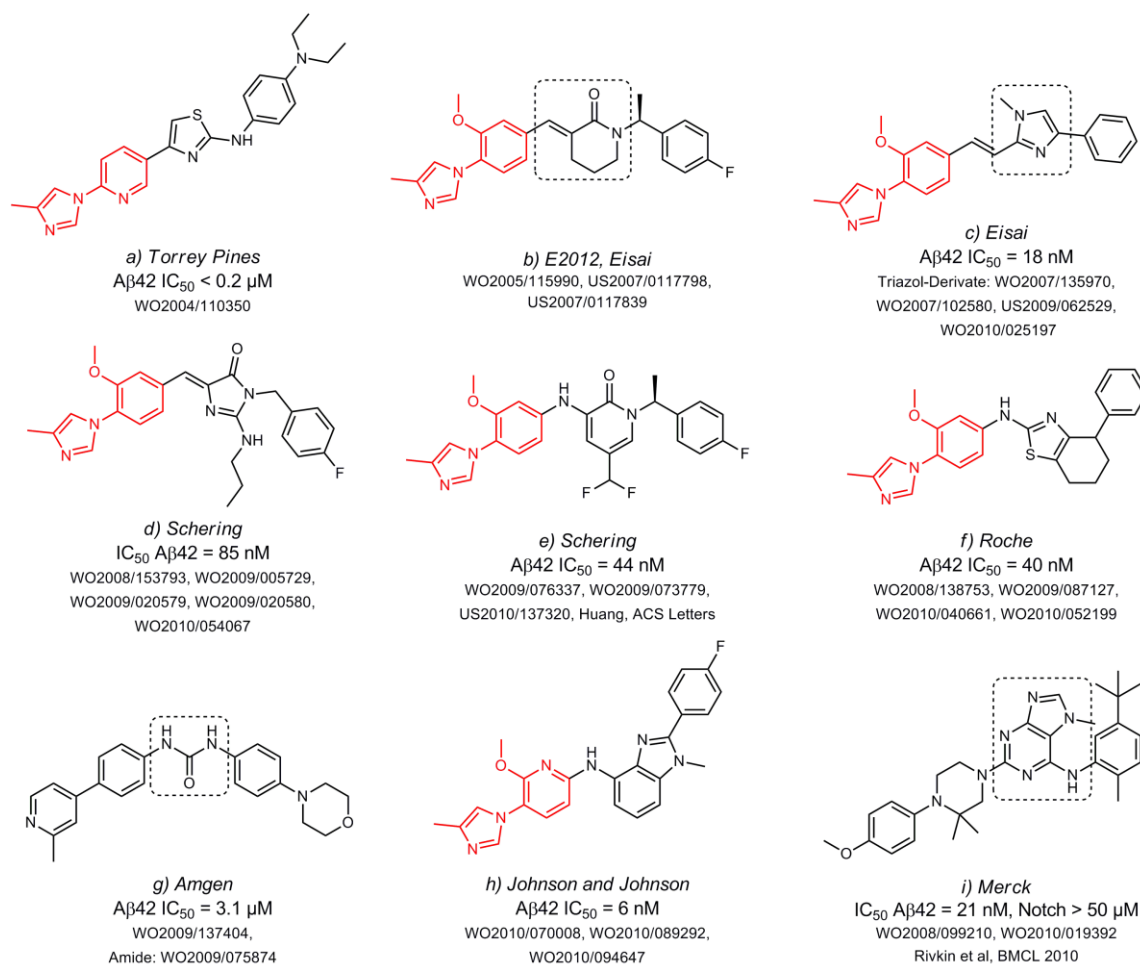


Abbildung 20 Strukturen nicht-acider GSMs. Homologe Strukturelemente sind rot gekennzeichnet.

Auffällig ist eine hohe strukturelle Homologie der Verbindungen im Bereich A und B. Ein Großteil der Substanzen teilt hier eine 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methyl-1*H*-imidazol-Partialstruktur (rot markiert, siehe Abb. 20), während in den Bereichen C und D breite Modifikationen beschrieben wurden. Da die Verbindungen eine relativ gleichbleibende Potenz aufweisen, geht man von einer hohen strukturellen Toleranz im Bereich C und D aus. Trotz der hohen Anzahl an bekannten Verbindungen wurden nur von wenigen Strukturen *in vivo*-Daten veröffentlicht. Der potente GSM (20h) von *Johnson & Johnson* konnte die A β 42-Level beispielsweise *in vivo* um 61% senken.¹²⁵ Auch von *Merck* wurden nicht-acide Verbindungen mit verschiedenen Pyrimidin¹³⁹- und Purin¹⁴⁰-Strukturelementen im Bereich C entwickelt. In zwei Publikationen von Rivkin et al. wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Derivate kürzlich beschrieben. Die Verbindung i (Abb. 20) konnte *in vivo* an APP-YAC-Mäusen (perorale Gabe) eine 73%-ige Reduktion von A β 42 ohne signifikanten Einfluss auf A β 40 hervorrufen, das CSF-Plasma-Verhältnis der Substanz beträgt 34%.

Zusammengefasst gibt es im Feld der nicht-aciden GSMs eine enorme Weiterentwicklung. In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl Verbindungen in diversen Patenten beschrieben. Ein bestehender Nachteil ist allerdings, dass die meisten Derivate immer noch eine recht hohe Lipophilie zeigen. Da alle bisher beschriebenen Verbindungen unter Patentschutz stehen, ist leider wenig über *in vivo*-Resultate oder Entwicklungskandidaten innerhalb der verschiedenen Firmen bekannt.

Mechanismus der GSMs

Obwohl die molekulare Wirkweise der GSMs bereits in einigen Studien untersucht wurde, konnte der exakte Mechanismus immer noch nicht geklärt werden. Eine aktuelle Diskussion der Thematik ist dem Review von Zettl et al. zu entnehmen.¹⁴¹ Als am wahrscheinlichsten gelten zwei Hypothesen, die eine direkte Interaktion mit dem Enzym γ -Sekretase oder aber dem Substrat APP postulieren. *Off-target* Effekte gelten als eher unwahrscheinlich, da die Modulation auch in zellfreien *in vitro*-Assays sichtbar wurde.¹⁴² Neben den beiden Hypothesen gibt es auch die Vermutung, dass GSMs wie Sulindac-Sulfid Änderungen in der Membranarchitektur hervorrufen können. Dadurch wäre ein konformationeller *shift* der Membran-eingebetteten Enzymkomplexe möglich, die dann bevorzugt kürzere A β -Peptide schneiden (siehe Kap. 2.4.2.2).¹⁴³

Einige Evidenz spricht dafür, dass GSMs eine direkte Interaktion mit der γ -Sekretase eingehen. Ein Hinweis auf eine allosterische Bindung an PS kam aus Radioligand-Bindungsstudien, in denen Sulindac-Sulfid und Flurbiprofen in der Lage waren, Übergangszustandsanaloge und GSIs vom Benzodiazepin-Typ durch nicht-kompetitiven Antagonismus zu verdrängen.^{144,145} In Studien mit *fluorescence lifetime imaging* wurde darüber hinaus eine konformationelle Änderung von PS-1 nach GSM-Gabe beobachtet, welche zu einer modifizierten APP-Bindung führen könnte.¹⁴⁶ Interessanterweise ergab eine Untersuchung des Spaltungsprofils der γ -Sekretase, dass durch GSMs nicht nur die Prozessierung von APP, sondern auch die von Notch beeinflusst wird. So konnten nach Gabe eines GSMs N β -Fragmente mit unterschiedlichen C-Termini identifiziert werden. Analog zu A β 42 wurde eine selektive Inhibition der N β 25-Produktion, nicht aber der N β 21-Bildung beobachtet. Bei PS1-Mutanten und inversen GSMs waren die N β 25-Level dagegen erhöht.¹⁴⁷

Entgegen der oben genannten Studien wurden von Kukar et al. die Ergebnisse einer Photo-Crosslinking-Studie publiziert, die eine Interaktion mit dem Substrat APP nahelegt. In dieser wurden die Affinitäten des GSMs Flurbiprofen und des inversen GSMs Fenofibrat untersucht, die jeweils mit einem Biotin-Rest und einer photoreaktiven Gruppe versehen wurden. Es stellte sich heraus, dass die resultierenden Derivate in einer Konzentration von 10-100 μ M an keine der vier γ -Sekretase-Untereinheiten binden, stattdessen aber an APP und seine C-terminalen Fragmente. Eine Aufklärung der Bindestelle legte die Aminosäuren 29-36 der A β -Sequenz nahe, die zwei konsekutive GxxxG-Motive beinhalten.¹⁴⁸ Die Theorie einer Substratinteraktion ist allerdings umstritten. Problematisch zu sehen ist insbesondere die niedrige Aktivität der in der Crosslinking-Studie verwendeten Photoproben basierend auf Flurbiprofen und Fenofibrat, die somit keine idealen Verbindungen für mechanistische Studien darstellen. Eine nachfolgende NMR-Studie von Beel et al., die eine Untersuchung der Wechselwirkungen von APP und GSMs beinhaltete, konnte keine spezifische Bindung zwischen APP und Flurbiprofen bzw. Fenofibrat feststellen.¹⁴⁹

Auch Untersuchungen der Gruppe von Gerd Multhaup legten nahe, dass GSMs mit APP interagieren. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass APP über zwei Stellen an der Ektodomäne und der Transmembransequenz (bestehend aus drei konsekutiven GxxxG-Motiven) dimerisiert (siehe

Kap. 2.3.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass solche Mutationen in der A β -Sequenz, die die Dimerisierungsfläche stören, in einer verminderten Bildung von A β 42 mit *shift* hin zu A β 38 resultieren.^{49,150} Einen analogen Mechanismus zeigten Sulindac-Sulfid und Indomethacin. Nach deren Zugabe wurde eine konzentrationsabhängige Destabilisierung der APP-TMS-Dimere und somit eine Reduktion der A β 42-Produktion beobachtet. Eine direkte Bindung von Sulindac-Sulfid an die A β -Sequenz konnte über NMR- und Plasma-Resonanz-Analysen nachgewiesen werden.¹⁵¹

In einer weiteren APP-Mutationsanalyse wurde die Hypothese der Substratinteraktion dagegen erneut in Frage gestellt. Verschiedene Mutationen von AS innerhalb der postulierten GSM-Bindestelle GxxxG (Gly29 und Gly33, Lys28) zeigten jeweils keinen Unterschied in der Aktivität des potenten, aciden γ -Sekretase-Modulators GSM-1 (siehe Abb. 16, i). Dagegen führten Mutationen in PS zu unterschiedlichen Aktivitäten von GSM-1,¹⁵² was in weiteren Studien bestätigt wurde.^{152,153} Hervorzuheben ist auch eine zellbiologische Studie von Hahn et al., die ein unterschiedliches Ansprechen von potenten GSMs beider Substanzklassen bei AD-relevanten PS-Mutationen zeigen konnte.¹⁵⁴ Die Ergebnisse einer Enzymkinetik-Studie mit Sulindac-Sulfid legten außerdem eine nicht-kompetitive γ -Sekretase-Modulation nahe, da Veränderungen in der Substrat-Konzentration nicht in der Lage waren die inhibitorische Konzentration von Sulindac-Sulfid zu beeinflussen.¹⁵⁵

Zusammenfassend gibt es widersprüchliche Resultate hinsichtlich des Mechanismus der γ -Sekretase-Modulation. Sowohl für die Adressierung des Substrats als auch des Enzyms gibt es deutliche Hinweise. Es wird außerdem diskutiert, ob die Effekte der GSMs in einem ternären Komplex an der Interphase zwischen APP, γ -Sekretase und GSM zum Tragen kommen. Generell haben die meisten mechanistischen Studien eine gemeinsame, aber entscheidende Schwäche: Sie wurden mit schwach aktiven GSMs wie Flurbiprofen (IC_{50} A β 42 = 307 μ M), Sulindac Sulfid (IC_{50} A β 42 = 34 μ M) oder anderen NSAIDs durchgeführt. Nur selten wurden Studien mit potenteren Verbindungen wie GSM-1 publiziert. Dies hat zur Folge, dass es in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen leicht zu unspezifischen Effekten auf Membran, Substrat oder aber auch das Enzym kommen kann. Zu beachten sei weiterhin, dass unterschiedliche GSMs nicht unbedingt auf die gleiche Weise agieren müssen. Künftige Studien mit potenten GSMs beider Strukturklassen sind daher nötig um weitere Rückschlüsse auf den Mechanismus zu erhalten.

2.5 PPAR γ

Das zweite Target, das an dieser Stelle ausführlich charakterisiert werden soll, ist der **Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor γ** (PPAR γ). PPAR γ hat essentielle Funktionen im Lipid- und Glucosestoffwechsel. Da gerade Dyslipidämien sowie die Erkrankung Typ-II Diabetes Mellitus zu einem erhöhten Risiko von Morbus Alzheimer führen können (siehe Kap. 2.2.1.1), wurde der Zusammenhang zwischen PPAR γ und Morbus Alzheimer genauer untersucht. Eine Übersicht über Struktur und Funktion von PPAR γ sowie eine Diskussion über dessen Eignung als Target für Morbus Alzheimer soll im Folgenden dargestellt werden.

2.5.1 Struktur und Funktion von PPAR γ

2.5.1.1 Struktureller Aufbau von PPARs

Die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) gehören mit 47 weiteren Rezeptor-Gruppen zur Familie der nukleären Rezeptoren. Als solche stellen sie intrazelluläre, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren dar, die auf Expressionsebene eine Vielzahl an Genen regulieren. Von der Unterfamilie PPAR gibt es drei verschiedene Subtypen (PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ), die sich hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion, Gewebeverteilung und Ligandenspezifität unterscheiden. Physiologisch agieren alle drei Subtypen als molekulare Sensoren des Lipid- und Glucosestoffwechsels. Nach der Nomenklatur für nukleäre Rezeptoren werden sie auch als NR1C1 (PPAR α), NR1C2 (PPAR β/δ) und NR1C3 (PPAR γ) bezeichnet. Vom Subtyp PPAR γ sind zwei Isoformen PPAR γ 1 und PPAR γ 2 bekannt, die vom gleichen Gen transkribiert werden und sich durch ein zusätzliches Motiv von 30 AS am N-Terminus von PPAR γ 2 unterscheiden.¹⁵⁶

Strukturell teilen PPARs mit den nukleären Rezeptoren einen weitgehend homologen Aufbau. Sie bestehen aus sechs Domänen (A-F), die eine konservierte Sequenz und Funktion besitzen (siehe Abb. 21). Die am besten charakterisierten Bereiche von PPAR sind die DNA- und die Ligandenbindungsdomäne.^{157,158}

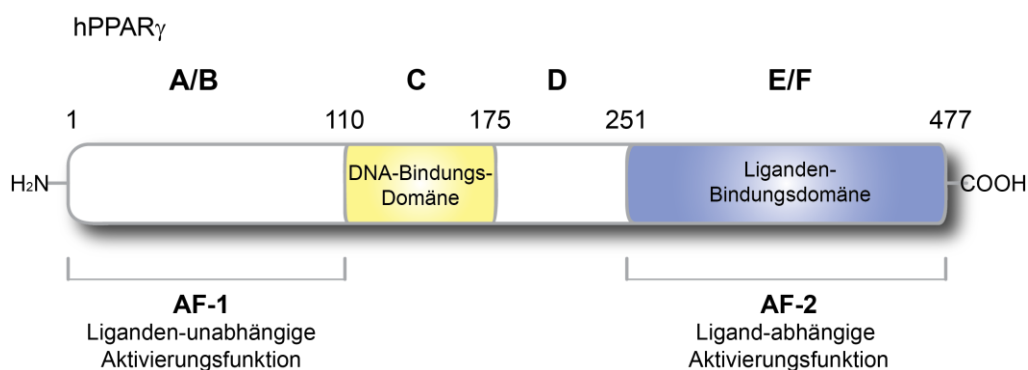
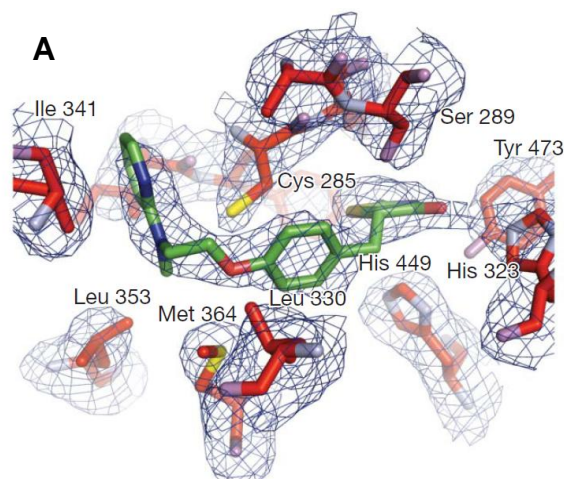


Abbildung 21 Struktureller Aufbau nukleärer Rezeptoren; abgebildet ist der humane PPAR γ -Rezeptor. Die Zahlen geben die jeweilige Aminosäure-Position an.

Die **DNA-Bindungsdomäne** (DBD; Region C) ist der am stärksten konservierte Bereich. Sie enthält zwei charakteristische Zinkfinger-Module, in denen jeweils ein Zn^{2+} über 4 Cystein-Reste komplexiert wird. Dadurch wird eine Bindung der DBD an spezielle Motive der DNA (sog. *PPAR-response element* = PPRE) ermöglicht. Die **Liganden-Bindungsdomäne** (LBD; Region E/F) ist dagegen auf AS-Level geringer konserviert. Sie enthält eine Liganden-regulierte transkriptionale Aktivierungsfunktion (AF-2), die eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Coaktivatoren hat.¹⁵⁹

Im Bereich der N-terminalen **A/B-Region** ist darüber hinaus eine sehr wenig konservierte (< 15%) zell- und promotorspezifische Transaktivierungsfunktion, genannt AF-1, lokalisiert. Über Phosphorylierung von AF-1 (an Ser-112) findet eine regulatorische Kontrolle der PPARs statt.¹⁶⁰ Die Region D wird als **hinge-Domäne** (engl. Scharnier) bezeichnet. Sie fungiert als flexibles Bindeglied zwischen DBD und LBD. Die *hinge*-Region ist ebenso eine Docking-Domäne für Cofaktoren. Ferner ist hier eine Phosphorylierung und somit ein Einfluss auf die Aktivität von PPAR möglich.¹⁵⁹

Während die Struktur der γ -Sekretase extrem komplex und weitgehend ungeklärt ist, konnte die LBD aller PPAR-Subtypen mittels Röntgen-Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden. Mittlerweile gibt es in der Proteindatenbank eine Vielzahl an PPAR-LBDs mit unterschiedlichen Liganden. Erste Kristallstrukturen der PPAR γ -LBD konnten ohne Ligand (apo-PPAR γ) sowie mit Rosiglitazone als Holo-PPAR γ im Jahr 1998 von Nolte et al. gewonnen werden.¹⁶¹ Weiterhin ist es 2008 von Chandra et al. erstmalig gelungen, die Struktur eines intakten nukleären Rezeptors aufzulösen. Die Autoren zeigten eine Strukturanalyse von PPAR γ im Komplex mit RXR α gebunden an DNA.¹⁶²



B

Subtyp	H3	H5	H11	H12
PPAR α	Ser280	Tyr314	His440	Tyr464
PPAR δ	Thr289	His323	His449	Tyr473
PPAR γ	Ser289	His323	His449	Tyr473

Abbildung 22 A) PPAR γ im Komplex mit Rosiglitazon.¹⁶² B) Darstellung der polaren AS in Abhängigkeit des Subtyps. Über diese Unterschiede ist eine selektive Adressierung einzelner PPAR-Subtypen möglich.¹⁶³

Eine Übersicht über die Ergebnisse verschiedener Strukturanalysen ist dem Review von Zoete et al. zu entnehmen.¹⁶³ Diese ergaben, dass die PPAR-LBD trotz der weniger konservierten AS-Sequenz eine hohe strukturelle Analogie innerhalb der drei PPAR-Subtypen sowie auch zu anderen nukleären Rezeptoren aufweisen. Die LBD von PPAR γ enthält 226 AS und besteht aus den α -Helices H1-H12 sowie einem kleinen 4-strängigen β -sheet (S1-S4). Einzigartig für PPARs ist die Ausbildung einer zusätzlichen 13. α -Helix (H2') zwischen H3 und dem ersten β -Strang. **Helix 12**, auf der auch die AF-2

lokalisiert ist, hat eine besondere Rolle innerhalb der LBD: sie erfährt bei Aktivierung einen konformationellen *switch* (Modell der „Mausefalle“¹⁶⁴), wodurch die Bindung von Coaktivatoren ermöglicht wird. Die aktive Konformation von Helix-12 wird durch PPAR γ -Agonisten stabilisiert und somit ist diese auch für die Aktivierung von PPAR γ entscheidend.

Die Bindung der jeweiligen Liganden findet im Inneren der LBD durch eine Y-artig geformte Bindetasche (*ligand binding pocket* = LBP) statt, die bei PPARs deutlich größer ist als bei anderen nukleären Rezeptoren (PPAR γ ~ 1300-1400 Å³). Generell zeichnet sich die PPAR-LBP durch ihre hohe Lipophilie aus. Aufgrund der Größe der LBP ist die Bindung strukturell diverser endogener und exogener Liganden möglich. Generelle Anforderungen an einen Liganden sind dabei eine saure Kopfgruppe und ein lipophiles System. Auffällig ist bei allen drei Subtypen außerdem das Vorhandensein von vier polaren Aminosäuren am Eingang der Bindetasche. Diese bilden bei Bindung eines Liganden ein charakteristisches Wasserstoff-Brückenbindungs-Netzwerk mit dessen saurer Kopfgruppe aus (siehe Abb. 22A).¹⁶⁵ Unterschiede in einzelnen Aminosäuren der LBP (siehe Abb. 22B) können eine wesentliche Rolle zur Selektivität der Liganden an einzelnen Subtypen beitragen.^{163,165} Die Thematik der Ligandenbindung wird unter Berücksichtigung der Subtypselektivität in Kapitel 2.5.3.2 adressiert.

2.5.1.2 Mechanismus der Genregulation

Die physiologischen Eigenschaften von PPAR γ werden über die Regulation der Genexpression verschiedener Targetgene ausgeübt. Dem liegt ein komplexer Mechanismus zugrunde. Kommt es zur Ligandenbindung, so bildet PPAR γ über drei verschiedene Verknüpfungspunkte der LBD einen heterodimeren Komplex mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), einem promiskuitiven Bindungspartner diverser nukleärer Rezeptoren. Dies gilt als Voraussetzung für die Bindung an die DNA.¹⁶²

Alternativ zur Ligandenbindung an die PPAR-LBD kann die Dimerisierung auch durch Phosphorylierung der AF-1 oder durch Agonisten von RXR (z.B. 9-cis-Retinsäure) stattfinden. Die Promotoren innerhalb des PPAR/ RXR-Komplexes erkennen auf der DNA zwei aufeinanderfolgende Hexanukleotid-Sequenzen (**AGGTCA-X-AGGTCA**), die durch eine unspezifische Base X voneinander getrennt sind und Teil des *PPAR-response elements* (PPRE) sind. Diese kanonische Basenfolge wird als sog. DR-1 (*direct repeat-1*) bezeichnet. Die Stimulation der Targetgen-Expression wird durch die Promotor-Region des PPREs vermittelt (siehe Abb. 23).

In Abwesenheit von Aktivatoren wird die Transkription von Genen durch die Bindung von Corepressoren wie N-CoR1 (*nuclear receptor corepressor-1*) oder SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*) an PPAR unterdrückt. Die Corepressoren sind für die Rekrutierung transkriptionaler Komplexe verantwortlich, die spezifische Histondeacetylasen (HDACs) enthalten. Diese generieren eine kondensierte Chromatin-Struktur um den Target-Promotor, wodurch die Gen-Transkription inhibiert wird.^{166,167}

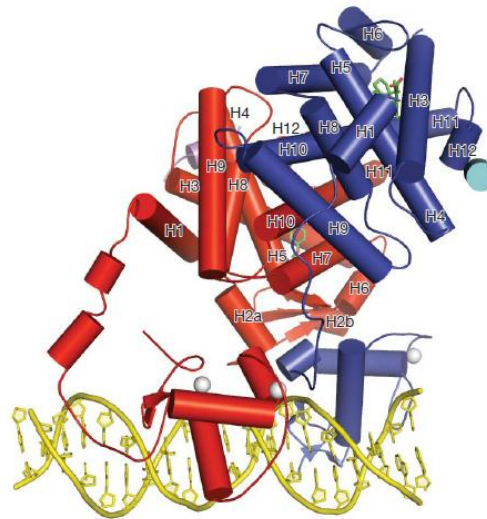


Abbildung 23 Struktur von PPAR γ im Komplex mit RXR α und DNA. PPAR γ liegt mit dem Liganden Rosiglitazon in seiner aktivierten Form vor. Jeweils ein Zinkfinger-Modul von PPAR γ und RXR α bindet an ein Hexanukleotid von PPRE. Die LDB von PPAR γ ist im Zentrum des Komplexes zu finden.¹⁶²

Sobald es dagegen zur Bindung eines Liganden kommt, werden die Corepressoren durch konformationelle Änderungen der LBD (Helix-12) freigesetzt und stattdessen Histon-acetylierende Coaktivatoren mit der AS-Sequenz **LxxLL** (x = beliebige AS) rekrutiert, die an die AF-2-Domäne von PPAR γ binden.¹⁵⁹ Beispiele für Coaktivatoren von PPAR γ sind CREB (*cAMP response element binding protein*), SRC1 (Steroid-Rezeptor Coaktivator) oder PBP (PPAR-bindendes Protein).¹⁶⁸ Der Coaktivator-Komplex enthält vielfältige enzymatische Aktivitäten wie Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität und Chromatin-remodulierende Eigenschaften. Durch Chromatin-Dekondensation resultiert eine aktive Struktur und es kommt zur Aktivierung der RNA-Polymerase, die dann zur subtyp-abhängigen Genexpression führt (siehe Abb. 24). Neben dem ligandenabhängigen und -unabhängigen Weg wird die Aktivität von PPAR auch über posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung bestimmt. Die Bedeutung der Phosphorylierung (z.B. durch Cdk5) für Wirkstoffe wie Rosiglitazon wurde in einer Arbeit von Choi et al. untersucht. Sie soll in Kap. 2.5.3.3 dargestellt werden.

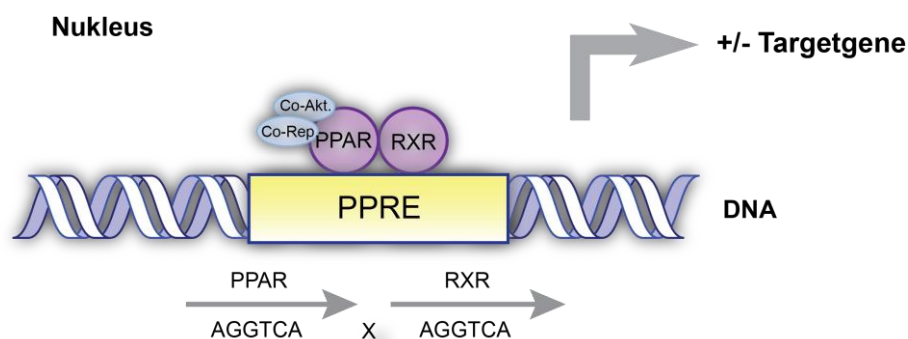


Abbildung 24 Regulation der Genexpression über PPAR γ

Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass PPAR γ in seiner aktiven Form nicht nur Transaktivierungs-Effekte ausübt, sondern auch für die **Transrepression** diverser Gene wie NF κ B

(Nukleärer Faktor-kappa B) oder AP-1 (Aktivator Protein-1) verantwortlich ist. Die Transrepression findet unabhängig von der PPRE-Bindung über indirekte regulatorische Effekte wie Protein-Protein-Interaktionen statt.^{169,170}

2.5.2 PPAR γ und Morbus Alzheimer

Im Folgenden soll der Fokus auf den für Morbus Alzheimer relevanten Eigenschaften von PPAR γ liegen. Diese sind in einer Reihe an Reviews zusammengefasst.^{44,170-175} Im Gegensatz zur γ -Sekretase ist die Rolle von PPAR γ bei Alzheimer deutlich weniger definiert.

Zum einen geht die Aktivierung von PPAR γ im **Lipidstoffwechsel** mit zahlreichen Effekten einher. Für Morbus Alzheimer ist beispielsweise die Expression eines weiteren nukleären Rezeptors, LXR α (*liver X receptor α*) relevant. Dieser wiederum reguliert selbst Gene des Lipidmetabolismus und des reversen Cholesterol-Transports. Dadurch konnten nach PPAR γ -Aktivierung erhöhte mRNA-Level von ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) und APOE gefunden werden. Für **APOE** selbst konnten *in vitro* und *in vivo* antiinflammatorische Effekte beobachtet werden.

Daneben vermutet man eine Relevanz von PPAR γ in der **Amyloid-Kaskade**. Es werden direkte und indirekte Möglichkeiten der Beeinflussung des A β -Haushalts diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass die PPAR γ -Aktivierung mit einer Unterdrückung der Transkription von **BACE-1** und **APP** in Zusammenhang steht,¹⁷⁶ wohingegen die Expression von BACE-1 und APP durch verschiedene Cytokine stimuliert wird. Als Resultat liegt unter inflammatorischen Bedingungen eine erhöhte A β -Produktion vor, die durch Aktivierung von PPAR γ unterdrückt werden kann.^{61,177} Darüber hinaus wird vermutet, dass PPAR γ nicht nur die Produktion, sondern auch den Abbau von A β beeinflusst. D'Abramo et al. zeigten, dass die Überexpression von PPAR γ über eine Stimulation der Ubiquitinierung und somit des Abbaus von APP zu einer verminderten A β -Produktion führt.¹⁷⁸ Zudem wird eine positive Regulation des A β -prozessierenden **IDE** (siehe Kap. 2.2.1 und 2.2.2) vermutet.¹⁷⁹ Für den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon konnte eine erhöhte Expression von IDE im Hirn von Tg2576-Mäusen bestätigt werden.¹⁸⁰ Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Espuny-Camacho et al. zeigte dagegen die Inhibition einer Metalloprotease analog zu IDE, nicht aber von IDE selbst.^{181,182} Als weiteren Nachweis für die Rolle von PPAR γ in der Amyloid-Homöostase konnte von Du et al. gezeigt werden, dass die Antagonisierung von PPAR γ mit GW9662 in APP/PS-1 transgenen Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der A β -Level und zur Verminderung von IDE führt.¹⁸³

Auch wegen seiner **antiinflammatorischen** Eigenschaften ist PPAR γ in den Fokus der Alzheimer-Forschung geraten. Die Wirksamkeit von PPAR γ -Agonisten konnte in *in vitro*- und *in vivo*-Studien bei Morbus Alzheimer und weiteren ZNS-Erkrankungen mit neuroinflammatorischer Komponente gezeigt werden. Derzeit werden PPAR γ -Agonisten bei Multipler Sklerose, Schlaganfall, Morbus Parkinson und Alzheimer untersucht. Als wichtiger Mechanismus gilt die Transrepression des Transkriptions-

faktors NF κ B (daneben auch von COX-2), der für die Regulation der Genexpression verschiedener Cytokine und Chemokine verantwortlich ist.¹⁸⁴

Schließlich hat PPAR γ auch im Hinblick auf den Energiestoffwechsel eine kritische Rolle. Über seinen Coaktivator PGC-1 α konnten **Mitochondrien-fördernde** Effekte und damit eine erhöhte ATP-Produktion gezeigt werden. Von Strum et al. konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon die mitochondriale Biosynthese trotz fehlender ZNS-Gängigkeit auch im Hirn stimuliert.¹⁸⁵

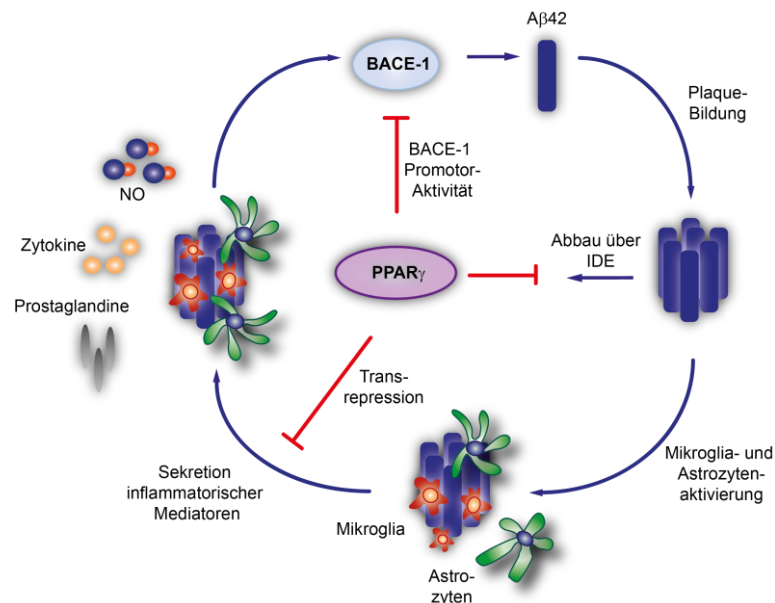


Abbildung 25 Die Rolle von PPAR γ bei Amyloid-Kaskade und Neuroinflammation.¹⁷²

Eine Zusammenfassung verschiedener PPAR γ -Effekte auf den Amyloid-Haushalt ist in Abb. 25 dargestellt. Die Aktivierung dieses nukleären Rezeptors stellt über seine vielfältigen Eigenschaften einen interessanten, wenn auch unspezifischen Ansatz zur *disease-modifying* Therapie von Morbus Alzheimer dar. Unter Verwendung geeigneter, ausreichend hirngängiger Wirkstoffe wäre ein Benefit durch PPAR γ -Aktivierung für Alzheimer-Patienten möglich. Ein klinischer Nachweis dessen steht allerdings noch aus.

2.5.3 Medizinische Chemie von PPAR γ -Agonisten

2.5.3.1 Natürliche Liganden

Als endogene Liganden von PPAR γ fungieren entsprechend seiner Funktion im Fettstoffwechsel langkettige ungesättigte Fettsäuren sowie Eicosanoide, Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure-Kaskade. Diese sind über die Cyclooxygenase (COX) gebildete Prostaglandine (15d-PGJ₂, Metabolit von PGD₂) oder über die 5-Lipoxygenase (5-LO) entstandene Leukotriene (15-HETE, 13-(S)-HODE). Die meisten Derivate zeigen dabei keine Subtyp-Selektivität zu PPAR γ , sondern binden vielmehr an

alle PPAR-Rezeptoren. Eine Übersicht über diverse natürliche Liganden von PPAR γ ist in Abb. 26 dargestellt.

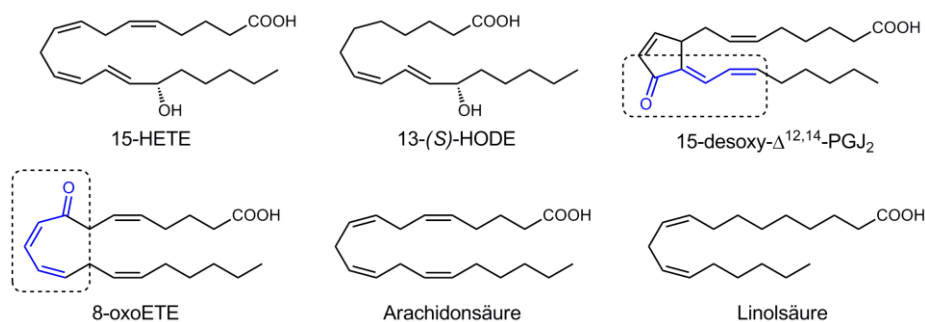


Abbildung 26 Endogene Liganden von PPAR γ ; das Michael-System der α,β -ungesättigten Ketone wurde blau markiert.

Interessanterweise konnte in einer Strukturanalyse mit 9-(S)-HODE und 13-(S)-HODE gezeigt werden, dass die LBD auch von zwei Fettsäurederivaten besetzt werden kann.¹⁸⁶ Ferner gingen α,β -ungesättigte Ketone wie 15d-PGJ₂ oder die aus dem COX/ LOX-Weg resultierenden oxidierten Eicosatetraen-Säuren 5-, 8-, 9-, 11-, 12- und 15-oxoETE über eine Michael-Addition eine kovalente Bindung mit Cys285 ein (sog. *locked state*). Dabei konnte vor allem in der Helix H2' ein signifikanter konformationeller Shift erzeugt werden, dessen Ausmaß innerhalb der Gruppe der oxoETEs mit der transkriptionalen Aktivität korrelierte.¹⁸⁷ Durch Mutation von Cys285 konnte darüber hinaus auch eine nicht-kovalente Bindung mit 15d-PGJ₂ hergestellt werden (sog. *docked state*), welcher sich hinsichtlich der transkriptionalen Aktivität als inaktiver Zustand herausstellte.¹⁸⁸

2.5.3.2 Pharmakophor-Modell

Die Kenntnis des chemischen Raums und der möglichen Interaktionspunkte an der Liganden-Bindestelle ist für ein rationales Wirkstoffdesign von großer Bedeutung. Die Bindetasche aller PPAR-Subtypen konnte mittlerweile in insgesamt über 100 Kristallstruktur-Analysen mit verschiedenen Liganden (siehe *protein database; www.pdb.org*) aufgeklärt werden. Mit den gewonnenen Erkenntnissen können Struktur-Wirkungsbeziehungen neuer Liganden durch Docking-Studien mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden. Für die Ligandenbindung ist das in Kapitel 2.5.1.1 beschriebene Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk von Bedeutung. Die generellen Anforderungen an einen selektiven PPAR γ -Agonisten sollen in diesem Abschnitt aufgeklärt werden.

Liganden von PPAR besitzen in der Regel analog zu den natürlichen Derivaten eine saure Kopfgruppe verbunden mit einem lipophilen Grundgerüst. Dieses besteht allerdings im Gegensatz zu den endogenen Liganden zumeist aus einem aromatischen System mit Linker-Gruppen. Ein Vorschlag für die generelle Struktur von PPAR-Agonisten wurde von Kuhn et al. publiziert (siehe Abb. 27).¹⁸⁹

Für die strukturelle Einteilung der PPAR-LBP gibt es in der Literatur verschiedene Vorschläge. Pirard lieferte einen Ansatz, der im Folgenden als Grundlage verwendet werden soll. Demnach besteht die

Bindetasche der PPARs aus einer linken und rechten distalen Bindetasche sowie einer linken proximalen Seitentasche.¹⁹⁰

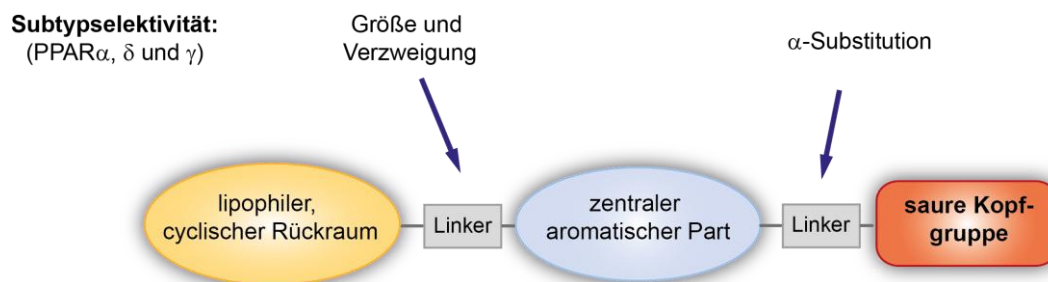


Abbildung 27 Generelle Struktur der PPAR-Agonisten. Die Subtypselektivität kann durch Größe und Verzweigung des lipophilen Rückraums sowie die α -Substitution bestimmt werden.^{189,191}

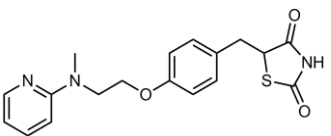
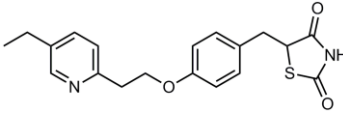
Zur Erhöhung der Selektivität für PPAR γ gibt es folgende Möglichkeiten. Führt man nahe der Säuregruppe eine zusätzliche Verzweigung mit lipophilen Substituenten wie Alkylketten oder Aromaten ein, so resultiert dies an PPAR α oder PPAR γ meist in einer erhöhten Aktivität während die Aktivität an PPAR δ durch größere Substituenten als Dimethyl ausgeschlossen wird. Dort kann die linke proximale Seitentasche durch das vergleichsweise große Met453 (PPAR α : Val444, PPAR γ : **Leu453**) nicht besetzt werden. Dies konnte mit den im Arbeitskreis synthetisierten 2-Mercaptohexansäure-Derivaten in Zettl et al. bestätigt werden.¹⁹¹ Die größten Substituenten werden von PPAR γ toleriert, da hier Cys275 im Vergleich zu PPAR α gegen **Gly284** ausgetauscht ist. Führt man beispielsweise einen 1-Naphthylrest in die α -Position verschiedener Pirinixinsäure-Derivate ein, so erhält man wie in Thieme et al. beschrieben subtypselektive PPAR γ -Modulatoren.¹⁹²

Neben der α -Substitution ist der raumgreifende lipophile Molekülteil, der in die linke distale Tasche ragt, eine wichtige Möglichkeit zur Erhöhung der Selektivität. Als wichtige begrenzende Aminosäuren werden von Pirard für PPAR α Ile272 und Met330 und für PPAR γ **Ile281** und **Val339** vorgeschlagen. Die möglichen Interaktionspunkte in den distalen Taschen sind allerdings schlechter charakterisiert als die der polaren Kopfgruppe. Sie bieten daher einen breiten Synthespielraum zur Entwicklung neuer PPAR-Agonisten.

2.5.3.3 Medizinische Chemie der PPAR γ -Agonisten & klinische Relevanz bei AD

Abgeleitet von den natürlichen Liganden wurden synthetische Liganden von PPAR γ als sogenannte „*Fettsäure-Mimetika*“ entwickelt. Dabei findet sich in der Literatur eine enorme Anzahl an PPAR γ -Agonisten, auf deren Darstellung im Folgenden verzichtet werden soll. Bisher wurden nur die beiden zugelassenen Thiazolidindione Pioglitazon und Rosiglitazon (siehe Tab. 1) auf ihre Effekte bei Morbus Alzheimer in verschiedenen präklinischen und klinischen Studien untersucht. Von einer gezielten Optimierung weiterer PPAR γ -Agonisten für Morbus Alzheimer wurde allerdings in der Literatur nicht berichtet.

Tabelle 1 Glitazone und deren in vitro-Aktivität¹⁹³

Substanz	Struktur	PPAR EC ₅₀ [μM]			Status	ZNS-Gängigkeit
		α	β/δ	γ		
Rosiglitazon (Avandia®)		i.a.*	i.a.	0.043	USA: Einschränkung der Zulassung Europa: Rücknahme der Zulassung	Nicht
Pioglitazon (Actos®)		i.a.	i.a.	0.58	Zugelassen für T2DM	18% nach 6h ¹⁹⁴

* i.a. = inaktiv

Der strukturelle Aufbau der Glitazone entspricht dem von Kuhn et al. publizierten Modell (siehe Abb. 27). Sie teilen eine saure Thiazolidindion-Kopfgruppe, die durch ihren sterischen Anspruch für die Subtyp-Selektivität an PPAR γ verantwortlich ist. Die Besetzung mit der raumgreifenden aciden Kopfgruppe ist nur bei PPAR γ möglich, da dieses in der polaren Region der Bindetasche einen vergleichsweise kleinen Histidin-Rest (**His323**) aufweist, wohingegen PPAR α eine sterische Hinderung durch die Anwesenheit von **Tyr314** zeigt. In der Folge geht die Thiazolidindion-Gruppe Wasserstoff-Brückenbindungen mit drei Aminosäuren (His323, Tyr473 und His449) ein. Am lipophilen Rückraum ist mit dem Pyridin-Ring von Pioglitazon und Rosiglitazon ein Wasserstoff-Brückenbindungs-Akzeptor auffällig, der zu einer gesteigerten Aktivität führt.¹⁹⁵

Die möglichen Effekte von PPAR γ -Agonisten bei Morbus Alzheimer wurden in Kap. 2.5.2 dargestellt. Auf dieser Basis wurden Rosiglitazon und Pioglitazon in verschiedenen präklinischen und klinischen Studien untersucht. **Rosiglitazon** zeigte in verschiedenen Mausmodellen eine erhöhte Mitochondrien-Aktivität¹⁸⁵ sowie verbesserte Effekte auf Lernen und Gedächtnis.^{180,196,197} Somit wurde die Substanz in klinischen Studien untersucht und die Ergebnisse einer Phase-II Studie von Risner et al. veröffentlicht. Eine 6-monatige Behandlung von Patienten mit milder AD resultierte im Vergleich zu Placebo in verbesserter Gedächtnisleistung und Aufmerksamkeit.¹⁹⁸ Allerdings war es auffällig, dass Patienten mit APOE4-Allel nicht auf die Therapie reagierten. Dies stimmt mit weiteren Studien überein, die zeigten, dass es eine funktionelle Interaktion des Vorhandenseins verschiedener APOE-Isoformen mit der Effektivität von Insulin auf das Gedächtnis gibt.^{199,200} Eine große Phase-III Studie konnte diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zu Placebo sichtbar.²⁰¹

Pioglitazon zeigte zunächst in einer Studie von Yan et al. konnte in Tg2576-Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf Amyloid-Plaques oder A β 42-Level, während die Positivkontrolle Ibuprofen (COX-Inhibitor, γ -Sekretase-Modulator und PPAR γ -Agonist) eine deutliche Reduktion von A β -Plaques und löslichem A β 42 auslöste.²⁰² Die Verwendung der doppelten Dosis Pioglitazon (240 mg/kg/Tag) resultierte nach Heneka et al. jedoch an einem Mausmodell mit Überexpression von APP mit London-Mutation (APP-V7171) in 20-25%-iger Reduktion der Amyloid-Plaques und A β 42-Level

im Hirn.²⁰³ Daher wurde die klinische Prüfung von Pioglitazon vorangebracht, bei der in einer Pilotstudie zunächst Überlegenheit gegenüber Placebo festgestellt wurde.^{204,205} Kürzlich publizierte Ergebnisse einer Phase-II Studie konnten zwar die Sicherheit von Pioglitazon bestätigen, nicht aber eine Wirksamkeit bei Alzheimer-Patienten.²⁰⁶ Als möglicher Effekt ist auch hier die mangelnde ZNS-Gängigkeit der Substanz zu diskutieren.

Zusammengefasst konnten beide PPAR γ -Agonisten in klinischen Studien keinen Benefit zeigen. Neben den Fragen nach den Studienparametern und dem Zeitpunkt der Behandlung ist die mangelnde ZNS-Gängigkeit der Substanzen wohl der größte Kritikpunkt.

Ein weiteres generelles Problem der **Glitazone** sind ihre Langzeit-Nebenwirkungen. Sie führen zu einer Erhöhung des Körpergewichts, Flüssigkeitsretention und einem erhöhten Risiko für Herzversagen,^{207,208} was in der Einschränkung (USA) bzw. in der Rücknahme der Zulassung (EU) von Rosiglitazon resultierte. Eine aktuelle Studie von Choi et al. ergab, dass eine Phosphorylierung von PPAR γ (an Ser273) über die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) durch Modifikation des Expressionsprofils spezifischer Gene eine Rolle bei der Ausbildung von Übergewicht und Typ-II Diabetes Mellitus spielt. Interessanterweise hat dies auch Relevanz für verschiedene PPAR γ -Agonisten. So zeigte Rosiglitazon neben der Aktivierung von PPAR γ auch eine Inhibition der Phosphorylierung durch Cdk5 (IC₅₀ ~ 30 nM). Die Cdk5-Aktivität gegenüber weiteren Substraten blieb dabei erhalten, weswegen substratspezifische Interaktionen als Mechanismus vermutet wurden und auch gezeigt werden konnten. Über die Aktivität von Pioglitazon wurden jedoch keine Informationen publiziert. In wieweit dies mit den beschriebenen Nebenwirkungen zusammenhängt oder ob eine selektive Inhibition der Phosphorylierung wünschenswert wäre, bleibt noch zu untersuchen.

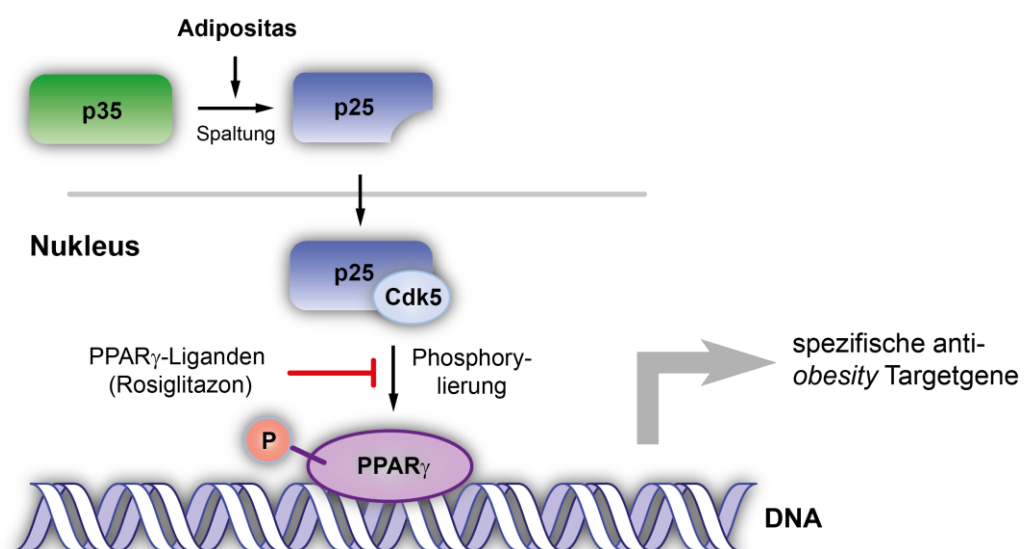
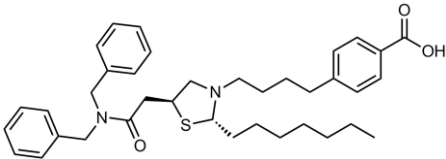
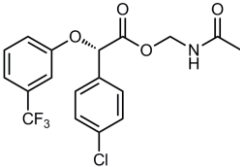
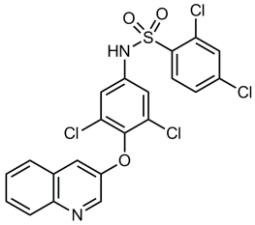


Abbildung 28 Phosphorylierung von PPAR γ über Cdk5. Cdk5 selbst wird über die Spaltung von p35 zu p25 aktiviert.²⁰⁹

2.5.3.4 Medizinische Chemie der selektiven PPAR γ -Modulatoren

Aus der Problematik der Langzeit-Nebenwirkungen der Glitazone resultierte der Ansatz, anstelle von Vollagonisten Verbindungen zu entwickeln, die nur bestimmte Gene aktivieren bzw. unterdrücken und dadurch ein verbessertes Nebenwirkungsprofil aufweisen. Dieses Konzept wurde von selektiven Modulatoren des Estrogen-Rezeptors (SERM) übertragen. Die resultierenden Verbindungen werden als selektive PPAR γ -Modulatoren (sPPAR γ M) bezeichnet. Bisher wurden allerdings von den sPPAR γ Ms keine Derivate zur Adressierung von Morbus Alzheimer beschrieben.

Tabelle 2 sPPAR γ Ms und deren *in vitro*-Aktivität.^{193,210}

Substanz	Struktur	PPAR γ	
		EC ₅₀ [μ M]	Max. Aktivierung*
GW0072 (GSK)		0.2	20-40%
Metaglidasen (Metabolex, Ortho-McNeil)		8	10-15%
INT131 (InteKrin Therapeutics Inc)		0.015	10%

* bezogen auf die PPAR γ -Aktivierung des Vollagonisten Rosiglitazon oder Pioglitazon

Die erste Verbindung, die als sPPAR γ M publiziert wurde, ist **GW0072** (siehe Tab. 2). Sie bindet im Gegensatz zu den PPAR γ -Agonisten in solcher Weise, dass die Helix-12 nicht stabilisiert wird und es nachfolgend nicht zur Rekrutierung von Coaktivatoren kommt.²¹¹ Detaillierte Untersuchungen dieses Mechanismus konnten zeigen, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung zu **Tyr473** für die Aktivierung der AF-2 (H12) essentiell ist. Diese wird von der Gruppe der sPPAR γ Ms nicht ausgebildet.^{212,213}

Eine in der klinischen Entwicklung weit fortgeschrittene Verbindung (Lizensierung an *Ortho-McNeil* nach erfolgreichen Phase-II Studien) ist **Metaglidasen** (MBX-102). Es handelt sich dabei um das (*S*)-Enantiomer von Halofenat, einem in den 1970er Jahren untersuchten hypolipidämischen und hypouricämischen Wirkstoff.²¹⁴ Aufgrund seiner metabolisch empfindlichen Esterstruktur stellt

Metaglidasen ein Prodrug von Halofensäure dar. Wie die anderen Derivate ist auch diese Verbindung nicht in der Lage, Coaktivatoren zu rekrutieren. Stattdessen ermöglicht es aber die Verdrängung der Corepressoren aus dem PPAR γ /RXR-Komplex.

INT131 ist eine weitere viel versprechende Substanz, die in der Entwicklung bereits weit fortgeschritten ist. Im Gegensatz zu GW0072 und Metaglidasen trägt sie keine Carboxylgruppe, sondern ein zentrales Sulfonamid-Element. In präklinischen Studien konnten Wirksamkeit und Sicherheit von INT131 bestätigt werden. In klinischer Prüfung konnte in Phase IIb eine Überlegenheit gegenüber Pioglitazon gezeigt werden, so dass die Verbindung nun in Phase III untersucht wird. Aufgrund der Tatsache, dass INT131 im Gegensatz zu Pioglitazon keine Ödembildung aufwies, vermutet man, dass eine Trennung von Effektivität und Nebenwirkungen möglich ist.²¹⁵⁻²¹⁷

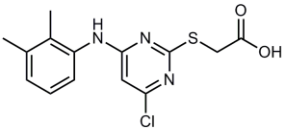
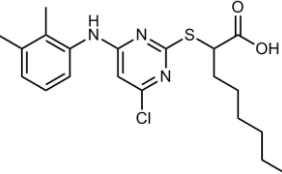
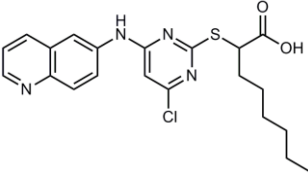
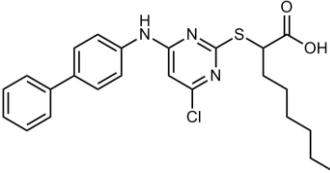
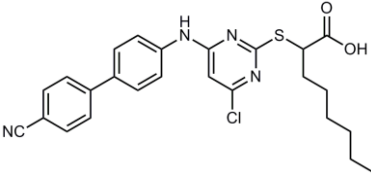
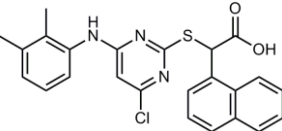
sPPAR γ M stellen einen attraktiven Ansatz zur Verminderung der Langzeitnebenwirkungen der PPAR γ -Vollagonisten dar. Aus der Rationale heraus, dass bei einer Alzheimer-Therapie ein möglichst frühes Eingreifen in die Erkrankung angestrebt wird, ist der Ansatz der sPPAR γ M durchaus auch für Alzheimer attraktiv. Hierbei müssen potentielle Wirkstoffe über einen langen Zeitraum eingenommen werden und somit auch ein geeignetes Sicherheitsprofil aufweisen. Allerdings bedarf es gerade wegen der Substanz-spezifischen Genaktivierung einer intensiven und individuellen Untersuchung in Alzheimer-Modellen sowie in klinischen Studien. Da bisher noch keine sPPAR γ Ms für Alzheimer entwickelt und untersucht wurden, kann vom heutigen Standpunkt aus noch kein Rückschluss auf einen Benefit in der Alzheimer-Therapie gezogen werden.

2.5.3.5 Pirinixinsäure-Derivate als PPAR-Agonisten

Als moderat aktiver, dualer Agonist von PPAR α und PPAR γ fungiert die Pirinixinsäure, die bereits in den 1980er Jahren mit hypolipidämischen Effekten in Verbindung gebracht wurde.²¹⁸ Auf Basis dieser Substanz wurden breite Struktur-Wirkungsbeziehungen im Arbeitskreis von Prof. Schubert-Zsilavecz untersucht (siehe Tab. 3). Die Einführung von Alkylresten in α -Position zur Säure resultierte in einer deutlichen Steigerung der PPAR α - und PPAR γ -Aktivität, deren Optimum bei einer Kettenlänge von 4-6 Kohlenstoffen liegt.²¹⁹ In zwei weiteren Studien wurde der Einfluss verschiedener aromatischer Reste anstelle der 2,3-Dimethylphenyl-Gruppe untersucht. So ging ein Austausch gegen 6-Chinolinyl mit gleichbleibender Aktivität einher (LP121),²²⁰ wohingegen eine deutliche Aktivitätssteigerung insbesondere an PPAR α durch die Einführung verschiedener Biphenyl-Reste (HZ52 und HZ56) erreicht wurde.²²¹

Darüber hinaus konnte das Selektivitätsprofil der Substanzen durch Einführung eines 1-Naphthylrestes in α -Position dahingehend modifiziert werden, dass PPAR γ in niedrig mikromolaren Konzentrationen ohne Beeinflussung der anderen beiden Subtypen aktiviert wird (YS124). Durch Strukturvariationen im Bereich der 2,3-Dimethylphenyl-Gruppe konnte darauf basierend ein Substanzset von subtypeselektiven PPAR γ -Agonisten hervorgebracht werden.¹⁹²

Tabelle 3 Strukturen und PPAR-Aktivitäten verschiedener Pirinixinsäure-Derivate^{192,219-221}

Substanz	Struktur	Aktivierung von PPAR (EC ₅₀ in µM)		
		PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
Pirinixinsäure (WY14,643)		36.3	> 100 µM	53.2
YS121		1.0	inaktiv	3.6
LP121		2.2	inaktiv	3.5
HZ52		0.32	inaktiv	2.4
HZ56		0.19	inaktiv	1.5
YS124		inaktiv	inaktiv	6.2

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Derivate stellen Weiterentwicklungen der Leitstruktur HZ34 (**3**) dar, welche ausgehend von Pirinixinsäure im Arbeitskreis von Prof. Schubert-Zsilavecz entwickelt wurde (Ergebnisse sind Bestandteil der Publikation Hieke et al.).²²² Die Zielsetzung war es dabei, die Aktivierung der verschiedenen PPAR-Subtypen (v.a. PPAR α und γ) zu optimieren. Durch die Einführung von zwei lipophilen Phenethoxy-Resten und einer α -*n*-Butylkette konnte nicht nur die Aktivität an PPAR γ zu einem EC₅₀-Wert von 8.3 μ M gesteigert werden, sondern man erhält dadurch auch Subtypselektivität (inaktiv an PPAR α und δ ; siehe Abb. 29). An PPAR γ zeigt HZ34 (**3**) eine maximale Aktivierung von 61% im Vergleich zum Vollagonisten Pioglitazon und kann somit als PPAR γ -Modulator bezeichnet werden. Es muss allerdings an dieser Stelle erwähnt werden, dass detaillierte Auswirkungen auf die Expression von PPAR γ -Targetgenen nicht untersucht wurden.

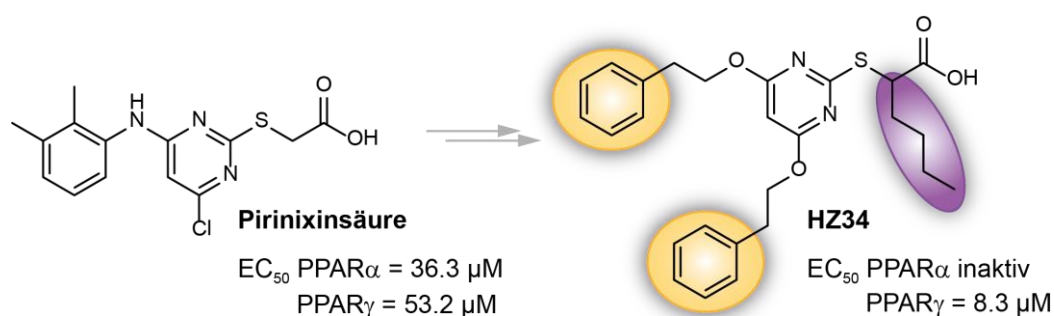


Abbildung 29 Entwicklung von HZ34 (**3**). Gekennzeichnet sind die lipophilen Molekülteile als potentielle Möglichkeiten der Strukturoptimierung.

In einem Screening von 13 repräsentativen Strukturen der Substanzbibliothek des Arbeitskreises Schubert-Zsilavecz (siehe Tab. 4) konnte HZ34 (**3**) als γ -Sekretase-Modulator identifiziert werden, der die A β 42-Produktion mit einem IC₅₀-Wert von 22.8 μ M inhibiert und die von A β 38 mit einem EC₅₀ von 11.3 μ M aktiviert (siehe Abb. 30).

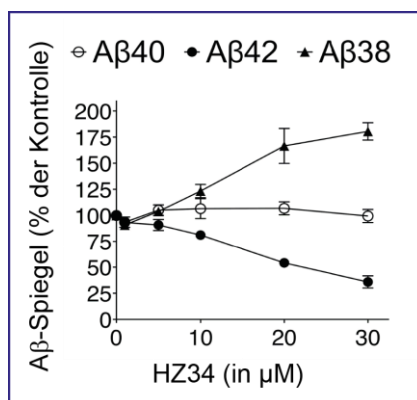
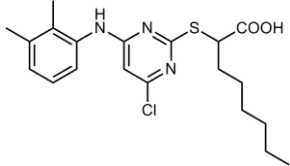
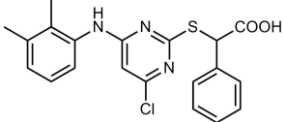
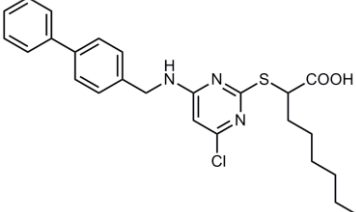
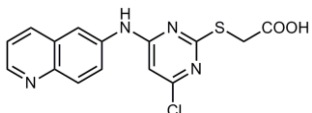
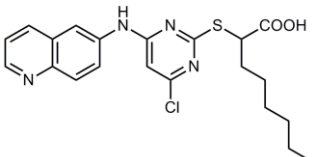
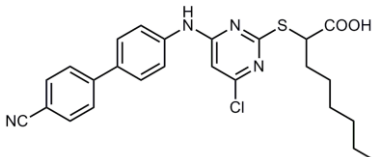
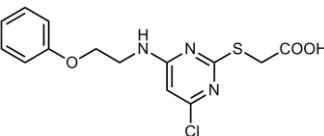
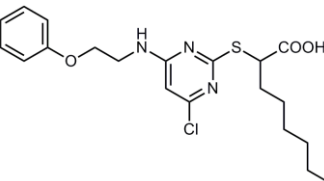
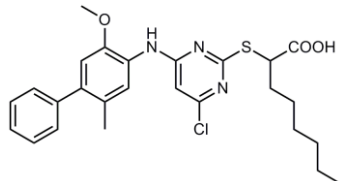
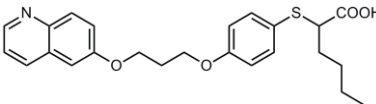
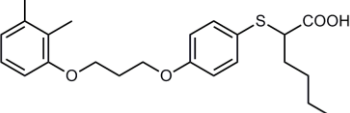
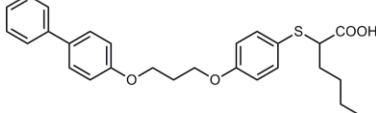


Abbildung 30 A β -Profil von HZ34 (**3**). HZ34 zeigt das klassische Profil eines γ -Sekretase-Modulators mit konzentrationsabhängiger Aktivierung von A β 38 und Inhibition von A β 42.

Eine entscheidende Rolle für die γ -Sekretase-Aktivität scheint das *Diphenethoxy*-Substitutionsmuster am zentralen Aromaten zu spielen, da die inaktiven Derivate jeweils nur *einen* lipophilen Rest in *meta*- oder *para*-Position zur Thioether-Gruppe tragen.

Tabelle 4 Strukturen und PPAR-Aktivität der weiteren Screening-Kandidaten. Alle Derivate sind γ -Sekretase-inaktiv

<p style="text-align: center;">YS121</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 1.0 μM, PPARδ i.a.* PPARγ EC₅₀ = 3.6 μM</p>	<p style="text-align: center;">YS83</p>  <p style="text-align: center;">PPARα und γ < 50% @ 10μM PPARδ i.a.</p>	<p style="text-align: center;">HZ42</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 6.0 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 12.2 μM</p>
<p style="text-align: center;">LP114</p>  <p style="text-align: center;">PPARα, δ und γ i.a.</p>	<p style="text-align: center;">LP121</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 2.2 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 3.5 μM</p>	<p style="text-align: center;">HZ56</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 0.19 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 1.5 μM</p>
<p style="text-align: center;">HZ10</p>  <p style="text-align: center;">PPARα/ δ i.a. PPARγ = 17 \pm 6 % @ 10μM</p>	<p style="text-align: center;">HZ28</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 6.7 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 6.1 μM</p>	<p style="text-align: center;">HZ65</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 0.63 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 3.1 μM</p>
<p style="text-align: center;">HZ55</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 0.22 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 1.3 μM</p>	<p style="text-align: center;">HZ64</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 0.056 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 3.0 μM</p>	<p style="text-align: center;">HZ75</p>  <p style="text-align: center;">PPARα EC₅₀ = 0.11 μM, PPARδ i.a. PPARγ EC₅₀ = 0.54 μM</p>

* i.a. = inaktiv bei einer Testkonzentration von 10 μ M

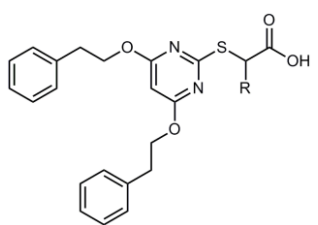
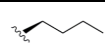
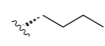
3.1.1 Thiobarbitursäure-Derivate

Basierend auf Grundstruktur HZ34 (**3**; siehe Abb. 29) wurde eine systematische Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen durch die Modifikation aller relevanten Strukturelemente durchgeführt. Da die Adressierung der beiden Targets γ -Sekretase und PPAR γ viel versprechende

Ansätze für eine *disease-modifying*-Therapie von Morbus Alzheimer darstellen (siehe Kap. 2.3 und 2.4), war die Zielsetzung eine Optimierung hin zu potenteren dualen γ -Sekretase- und PPAR γ -Modulatoren. Das Hauptaugenmerk soll allerdings aufgrund der deutlich valideren Studienlage auf der Optimierung der γ -Sekretase-Modulation liegen.

In der ersten SAR-Studie wurde dabei der Einfluss der α -Substituenten und der lipophilen Reste am zentralen Pyrimidinring untersucht. Alle daraus resultierenden Verbindungen werden aufgrund ihres zentralen Strukturteils im Folgenden als „Thiobarbitursäure-Derivate“ bezeichnet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in den Tabellen 5-7 aufgeführt und entsprechen den publizierten Resultaten aus Hieke et al.²²² Die Substanzen **2**, **4** und **10** wurden von Frau Michaela Dittrich synthetisiert, **1** und **3** stammen aus dem Substanzset von Herrn Dr. Heiko Zettl.

Tabelle 5 Variation der α -Position und Charakterisierung an PPAR γ und γ -Sekretase

Substanz		PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
Variation der α-Substitution					
1 (HZ27)	-H	3.7 \pm 1.0	111 \pm 22	> 40	Inaktiv
2 (MD72)	-Ethyl	6.1 \pm 0.2	57 \pm 2	41.6	31.1
3 (HZ34)	- <i>n</i> -Butyl	8.3 \pm 0.1	61 \pm 1	22.8	11.3
4 (MD74)	- <i>n</i> -Hexyl	8.8 \pm 0.4	59 \pm 5	30.4	24.2
5 (MH43)	-Phenyl	inaktiv*		29.3	12.8
Trennung der Enantiomere von 3					
6 (HZ34R)		22% @ 10 μ M		21.5	8.4
7 (HZ34S)		10.4 \pm 0.4	62 \pm 3	32.6	13.5

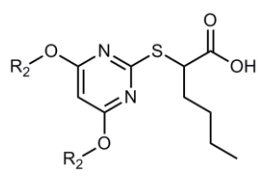
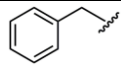
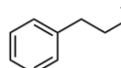
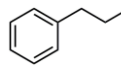
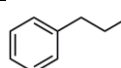
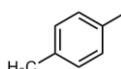
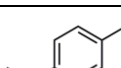
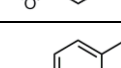
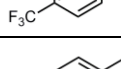
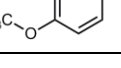
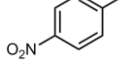
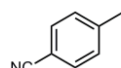
* Testkonzentration: 10 μ M

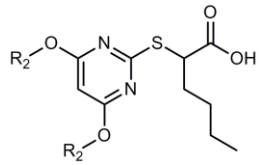
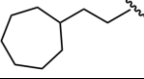
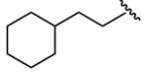
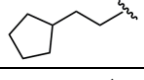
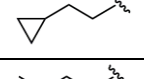
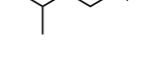
In der SAR-Studie wurde zunächst der Einfluss des α -*n*-Butyl-Rests untersucht (siehe Tab. 5). Dabei wurde die aliphatische Kette verlängert, verkürzt und gegen einen Phenyl-Rest ausgetauscht. Im Hinblick auf die γ -Sekretase-Modulation stellte sich heraus, dass die Kettenverkürzung zu Ethyl (**2**) zu einer abgeschwächten Wirkung und das unsubstituierte Derivat **1** schließlich zur Inaktivität führen. Als potenteste Substanz erwies sich Ausgangssubstanz **3**, deren Aktivität auch durch Kettenverlängerung (**4**) oder Austausch gegen einen Phenylrest (**5**) nicht gesteigert werden kann. Alle aliphatisch substituierten Derivate stellen duale γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulatoren dar. Das Aktivitätsprofil wird mit dem Ersatz durch Phenyl (**5**) dahingehend modifiziert, dass diese Substanz

eine selektive γ -Sekretase-Modulation (IC_{50} A β 42 = 29.3 μ M) zeigt, da sie an PPAR γ bei einer Testkonzentration von 10 μ M inaktiv ist.

Um den Einfluss der Stereochemie am α -Kohlenstoff-Atom zu untersuchen, wurde die Leitstruktur **3** exemplarisch mittels enantioselektiver präparativer HPLC (Arbeitskreis Prof. Dr. Lämmerhofer, Universität Wien) in ihre beiden Enantiomere getrennt.²²³ Hierbei zeigte sich an der γ -Sekretase eine leichte Überlegenheit des (*R*)-Enantiomers **6** (IC_{50} A β 42 = 21.5 μ M) gegenüber dem (*S*)-Enantiomer **7** (IC_{50} A β 42 = 32.6 μ M). An PPAR γ ist dagegen (*S*)-Enantiomer **7** (EC_{50} = 10.4 μ M) potenter als **6** (22% Aktivierung bei 10 μ M). Somit war es nicht möglich mit der Trennung ein pharmakologisch überlegenes Enantiomer zu identifizieren. Folglich war der Fokus auch bei den weiteren Derivaten jeweils auf die Untersuchung des Racemates gerichtet.

Tabelle 6 Variation der lipophilen Phenethoxy-Reste und Charakterisierung an PPAR γ und γ -Sekretase.

Substanz		PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC_{50} in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC_{50} in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC_{50} in μ M)
Variation des Ethyl-Spacers zwischen terminalem Phenyl und Ether					
8 (MH41)		31% @ 20 μ M		25.2	24.2
3 (HZ34)		8.3 \pm 0.1	61 \pm 1	22.8	11.3
9 (MH44)		8.9 \pm 2.1	71 \pm 14	30.9	16.4
10 (MD73)		10.0 \pm 1.2	55 \pm 7	22.9	16.4
Einführung von verschiedenen para-Phenyl-Substituenten					
11 (MH137)		7.5 \pm 1.4	63 \pm 17	13.0	6.4
12 (MH56)		23% @ 10 μ M		19.3	6.2
13 (MH84)		11.0 \pm 0.3	112 \pm 2	6.0	1.8
14 (MH99)		10.3 \pm 1.6	115 \pm 21	8.6	5.5
15 (MH60)		33% @ 6 μ M		31.2	n.b.*
16 (MH104)		7.0 \pm 0.9	65 \pm 7	> 40	n.b.*
17 (MH138)		32% @ 10 μ M		37.7	17.5

Substanz		PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
Einführung von aliphatischen Resten					
18 (MH111)		inaktiv**		11.3	1.9
19 (MH49)		6.6 \pm 0.4	71 \pm 5	5.1	4.6
20 (MH100)		12.1 \pm 0.2	127 \pm 2	17.2	9.0
21 (MH92)		4.3 \pm 0.9	79 \pm 8	> 40	24.0
22 (MH93)		11.0 \pm 0.1	69 \pm 1	28.2	10.9

*n.b. nicht bestimmt, **Testkonzentration: 10 μ M

Das größte Potential zur Strukturoptimierung stellen die beiden Phenethoxy-Reste von **3** dar. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass aufgrund von synthetischen Einschränkungen innerhalb der ersten Studie stets *beide* lipophilen Reste auf gleiche Weise modifiziert wurden. Zunächst wurden drei Derivate mit verkürzten (Methylen **8**) sowie verlängerten (*n*-Propylen **9** und *n*-Butylen **10**) Spacern zwischen Phenyl und der Ethergruppe synthetisiert. Dabei liegen die beiden Derivate mit verlängertem Spacer (**9**, **10**) an γ -Sekretase und PPAR γ in gleichem Aktivitätsbereich wie **3**. Auch Substanz **8** mit verkürztem Spacer zeigt equipotente γ -Sekretase-Modulation, allerdings mit verringerter PPAR γ -Aktivierung. Zusammenfassend konnte durch die Modifikation keine Verbesserung erreicht werden, so dass der initiale Ethylen-Spacer für die nächste Optimierungsrunde beibehalten wurde.

Eine Steigerung der Aktivität konnte mit der Einführung von verschiedenen *p*-Phenyl-Substituenten erreicht werden. Während die Einführung von *p*-Nitro- (**15**) oder *p*-Cyanogruppen (**16**) sowie der Austausch von Phenyl gegen sein Bioisoster Thiophen (**17**) zu einer verminderten γ -Sekretase-Aktivität im Vergleich zu **3** führen, konnte die Aktivität durch *p*-Methyl- (**11**), *p*-Methoxy- (**12**), *p*-Trifluormethyl- (**13**) oder *p*-Trifluormethoxy (**14**)-Substitution gesteigert werden. Unter diesen zeigte die *p*-Trifluormethyl-substituierte Substanz **13** eines der vielversprechendsten Profile mit IC₅₀ A β 42 = 6.0 μ M und EC₅₀ PPAR γ = 11.0 μ M. Im letzten Substanzset der Studie wurden die beiden Phenyl-Reste durch aliphatische Substituenten variabler Grösse ausgetauscht. Während die Einführung von Cyclopropyl- (**21**) und Isopropyl- (**22**) Resten nur zu schwachen γ -Sekretase-Modulatoren führt, konnten mit dem Ersatz durch Cyclopentyl (**20**), Cyclohexyl (**19**) und Cycloheptyl (**18**) drei Derivate dargestellt werden, die ebenfalls zu den aktivsten GSMs dieser Studie zählen.

Besonders erwähnenswert ist die Aktivität des Cyclohexylethoxy-Derivates **19**, welches eine potente duale Modulation von PPAR γ (EC₅₀ = 6.0 μ M) und γ -Sekretase (IC₅₀ A β 42 = 5.1 μ M) aufweist. Zusammen mit der *p*-(Trifluormethyl)phenethoxy-substituierten Verbindung (**13**) stellen die beiden Derivate die potentesten dualen Modulatoren der Studie dar.

Selektivitätsprofil

Zur Bestimmung des Selektivitätsprofils der Substanzen wurde deren Einfluss auf die **COX-Isoenzyme** COX-1 und COX-2 untersucht. Dies beruht auf der Tatsache, dass die dargestellten Derivate charakteristische Strukturelemente von sauren GSMs aufweisen (siehe Kap. 2.4.4.2), welche ursprünglich von bekannten NSAIDs abgeleitet wurden. Da mit der Säuregruppe und dem lipophilen Grundgerüst alle strukturellen Anforderungen von COX-Inhibitoren erfüllt werden, erfolgte eine Charakterisierung aller Substanzen an COX, um potentielle *off-target* Effekte auszuschließen und bei der Strukturoptimierung zu berücksichtigen.

Die COX-Inhibition aller Substanzen wurde bei einer Testkonzentration von 10 μM untersucht. Die resultierenden enzymalen Restaktivitäten sind für die Substanzen **1-22** in Tabelle 7 angegeben. In Summe zeigen beide COX-Isoenzyme (COX-1 und COX-2) nach Zugabe von 10 μM der jeweiligen Substanz Restaktivitäten von höher als 50%. Somit stellen die hier charakterisierten Thiobarbitursäure-Derivate im Vergleich zu den klassischen NSAIDs (meist nanomolare COX-Inhibition) nur schwache COX-Inhibitoren dar und sind diesbezüglich für eine Weiterentwicklung als potentielle Alzheimer-Therapeutika geeignet. IC_{50} -Werte wurden für die drei Leitstrukturen **3**, **13** und **19** berechnet. Die beiden Verbindungen **3** und **13** zeigen an COX-1 IC_{50} -Werte von 17-19 μM und an COX-2 $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{M}$. Der Austausch gegen zwei Cyclohexylethoxy-Reste in **19** führte zu stärkerer Inhibition von COX-1 und COX-2 mit IC_{50} -Werten von 10-13 μM .

Tabelle 7 Inhibition der COX-Isoenzyme COX-1/-2

Substanz	COX-1 Restaktivität [%] bei 10 μM	COX-2 Restaktivität [%] bei 10 μM	Substanz	COX-1 Restaktivität [%] bei 10 μM	COX-2 Restaktivität [%] bei 10 μM
1	91.8 \pm 5.5	91.7 \pm 15.6	12	72.8 \pm 29.1	94.6 \pm 33.0
2	84.6 \pm 5.5	56.9 \pm 1.4	13	54.4 \pm 23.6 $\text{IC}_{50} = 16.9 \mu\text{M}$	69.0 \pm 27.7 $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{M}$
3	64.2 \pm 24.8 $\text{IC}_{50} = 18.7 \mu\text{M}$	90.9 \pm 28.8 $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{M}$	14	73.0 \pm 11.5	75.8 \pm 8.7
4	61.8 \pm 17.0	63.8 \pm 16.8	15	82.1 \pm 12.2	91.6 \pm 14.6
5	72.2 \pm 13.3	86.0 \pm 21.8	16	88.8 \pm 16.6	82.6 \pm 24.3
6	73.9 \pm 15.8	98.5 \pm 11.1	17	76.6 \pm 6.9	102.4 \pm 16.9
7	83.5 \pm 12.6	92.8 \pm 2.1	18	56.1 \pm 8.8	50.1 \pm 9.3
8	88.9 \pm 21.3	61.6 \pm 2.4	19	52.7 \pm 11.1 $\text{IC}_{50} = 13.4 \mu\text{M}$	49.5 \pm 18.5 $\text{IC}_{50} = 10.9 \mu\text{M}$
9	78.8 \pm 14.9	51.9 \pm 11.3	20	68.2 \pm 6.9	84.7 \pm 3.5
10	78.8 \pm 14.0	53.9 \pm 14.2	21	97.7 \pm 17.4	87.9 \pm 5.8
11	57.2 \pm 12.7	93.3 \pm 20.0	22	72.4 \pm 31.3	80.5 \pm 25.5

Des Weiteren wurde untersucht, ob die vorliegenden Substanzen eine Inhibition der Notch-Prozessierung zeigen. Notch ist neben APP eines der Substrate der γ -Sekretase (siehe Kap. 2.4.2.2). In

der Konsequenz war die unselektive Inhibition der γ -Sekretase durch GSIs in präklinischen und klinischen Studien mit Mechanismus-bedingten Toxizitäten hervorgerufen durch deren Notch-Inhibition verbunden (siehe Kap. 2.4.3.1). Ein entscheidender Vorteil der Klasse der GSMs liegt darin, dass die Notch-Prozessierung mechanistisch nicht beeinträchtigt wird. Um dies zu verifizieren, wurden die beiden Leitstrukturen **13** und **19** ebenfalls auf ihre *in vitro*-Notch-Effekte hin untersucht. Dabei wurde die inhibitorische Aktivität mittels der aus der Notch-Prozessierung resultierenden NICD in einem Luciferase-Reportergen-Assay gemessen. Die Resultate der Untersuchung sind in Abb. 31 dargestellt. Es konnte bis zu einer Konzentration von 40 μM keine Inhibition von Notch beobachtet werden.

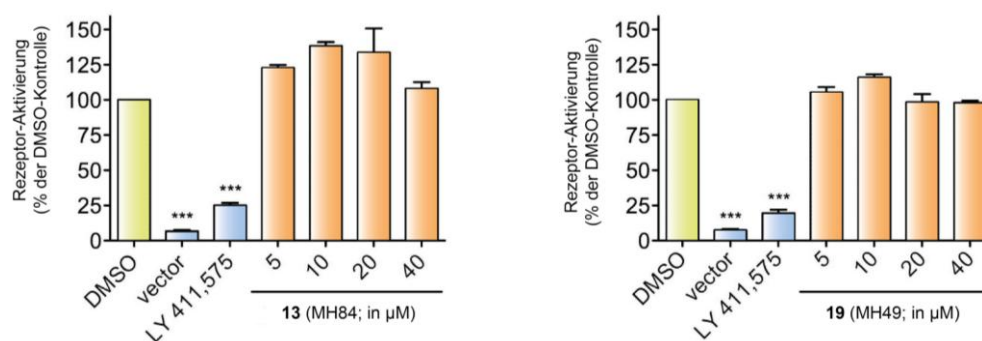


Abbildung 31 Notch-Inhibition der beiden Leitstrukturen **13** und **19**.

Um die Substanz-spezifischen Eigenschaften noch genauer zu untersuchen und deren Eignung für *in vivo*-Studien abzuschätzen, wurde von jeder Substanz ein Zytotoxizitätsprofil erstellt. Dazu wurden CHO-Zellen und Alamar Blue Reagenz[®] verwendet und die Viabilität der Zellen anhand einer Farbreaktion gemessen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Substanzen ein günstiges Zytotoxizitäts-Profil zeigten, da erst in hohen Konzentrationen (ab 60 μM) Effekte auf die Viabilität erkennbar waren. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen sind in Abb. 32 dargestellt.

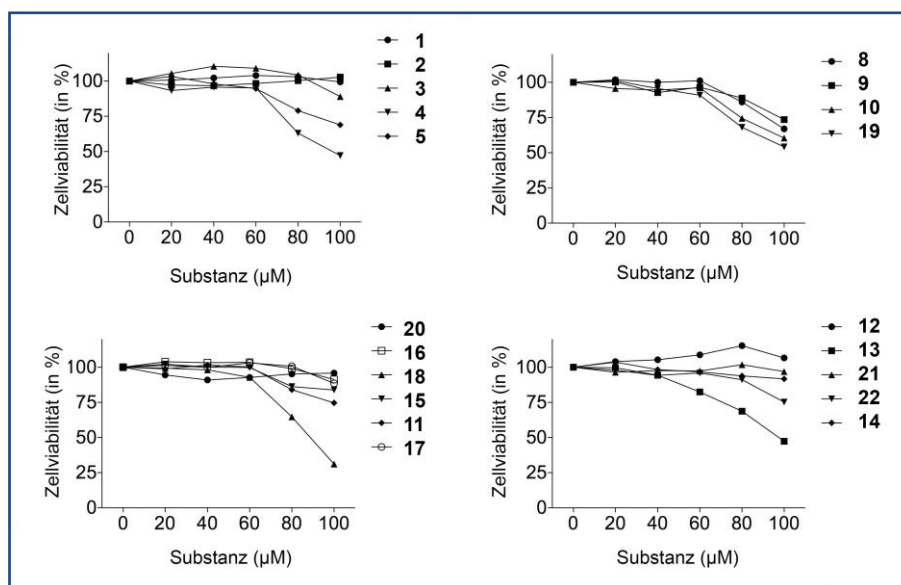


Abbildung 32 Zytotoxizität der Thiobarbitursäure-Derivate.

3.1.2 Trisubstituierte Benzenderivate

Auf der Basis von Substanz **3** wurde eine zweite Studie zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen des zentralen Molekülteils durchgeführt. Dabei wurde der zentrale 2-Thiopyrimidin-Teil zunächst gegen ein reines Kohlenstoffgerüst (Methylbenzen-Einheit) ausgetauscht und die restlichen Strukturelemente der Verbindung **3** beibehalten (siehe Abb. 33).

Dafür war die Entwicklung einer neuen Synthesestrategie erforderlich. Diese (siehe Kapitel 3.3.2) erlaubte vielfältige Strukturvariationen, von denen besonders die Variation des Substitutionsmusters am zentralen Aromaten hervorzuheben ist. Alle synthetisierten Verbindungen sowie deren *in vitro*-pharmakologische Charakterisierung sind in den Tabellen 8-11 dargestellt.

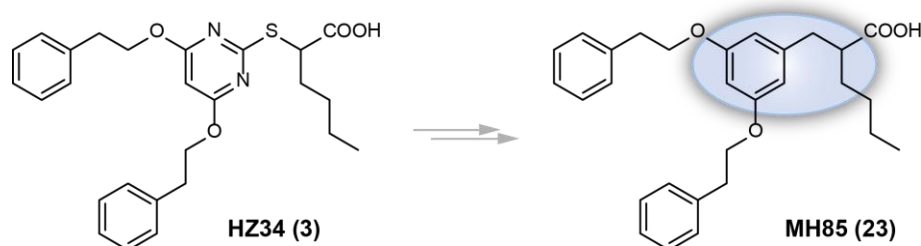
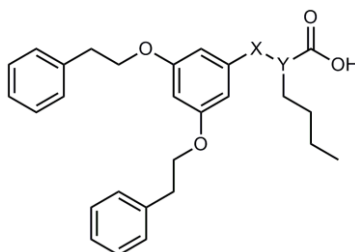


Abbildung 33 Entwicklung der neuen Leitstruktur

Den strukturellen Ausgangspunkt für die Entwicklung der trisubstituierten Benzenderivate stellt 2-(3,5-Diphenethoxybenzyl)hexansäure **23** dar. Diese ist ebenso eine dualer γ -Sekretase- und PPAR γ -Modulator, die allerdings im Vergleich zum initialen Hit **3** etwas schwächere Aktivität an γ -Sekretase ($IC_{50} = 38.1 \mu M$) aufweist.

Tabelle 8 Variation der exozyklischen Positionen

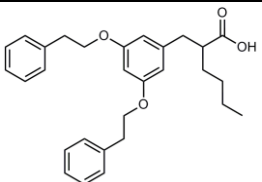
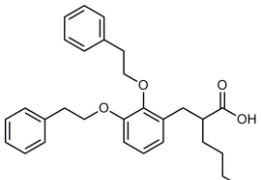
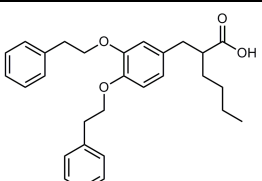


Substanz	X	Y	PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
			EC $_{50}$ in μM	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC $_{50}$ in μM)	Aktivierung von A β 38 (EC $_{50}$ in μM)
23 (MH85)	CH $_2$ -	CH	4.7 \pm 1.8	71 \pm 10	38.1	29.1
24 (MH95)	CH=	C	7.8 \pm 2.7	95 \pm 15	36.7	20.0
25 (MH139)	S	CH	3.4 \pm 0.1	73 \pm 1	32.8	21.7
26 (MH125)	O	CH	4.8 \pm 0.9	46 \pm 4	33.8	26.5

Folglich wurde zunächst untersucht, auf welche Strukturelemente dies zurückzuführen ist. Es wurden zwei Derivate mit exozyklischer Thioether- (**25**) oder Ethergruppe (**26**) synthetisiert, bei denen der zentrale Benzenring beibehalten wurde. Durch diesen Austausch kann die Potenz an γ -Sekretase bei beiden Derivaten um 5-6 μM gesteigert werden (IC_{50} 33-34 μM), allerdings stellt Verbindung **3** immer noch das aktivste Derivat innerhalb der drei Verbindungen dar (siehe Tab. 8). Daher kann man schlussfolgern, dass sich nicht nur die Anwesenheit eines exozyklischen Heteroatoms, sondern auch die des zentralen Pyrimidin-Rings positiv auf die γ -Sekretase-Aktivität auswirkt. Resultierend aus Synthesewechselstufe C (siehe Kapitel 3.3.2) wurde zusätzlich die Aktivität von 2-(3,5-Diphenethoxybenzyliden)hexansäure (**24**) untersucht, welches eine Zimtsäure-Partialstruktur enthält. Derivate mit einer solchen Struktureinheit werden im Folgenden als „Zimtsäure-Derivate“ bezeichnet. Bezüglich ihrer *in vitro*-pharmakologischen Resultate an $\text{PPAR}\gamma$ und γ -Sekretase ähnelt diese der Leitstruktur **23** stark.

Im zweiten Teil der Studie wurde das 3,5-Diphenethoxy-Muster am zentralen Benzen modifiziert. Als Ausgangssubstanzen für die Synthese dienten dabei kommerziell erhältliche strukturisomere Dihydroxybenzaldehyde. Es resultierte ein Substanzset, welches in Abhängigkeit der Positionen der Diphenethoxy-Reste unterschiedliche *in vitro*-pharmakologische Eigenschaften aufwies (siehe Tab. 9). Verschiebt man die beiden Phenethoxyreste von ihrer ursprünglichen 3,5-Position in die 2,3- bzw. 3,4-Position (**27**, **28**), so resultiert dies in potenten $\text{PPAR}\gamma$ -Agonisten, welche jedoch keine γ -Sekretase-Aktivität mehr aufweisen.

Tabelle 9 Variation des Diphenethoxy-Substitutionsmusters

Substanz	Struktur	PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μM	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μM)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μM)
23 (MH85) 3,5-Substitution		4.7 \pm 1.8	71 \pm 10	38.1	29.1
27 (MH78) 2,3-Substitution		3.7 \pm 0.8	79 \pm 7	> 40	> 40
28 (MH73) 3,4-Substitution		2.2 \pm 0.7	100 \pm 9	> 40	> 40

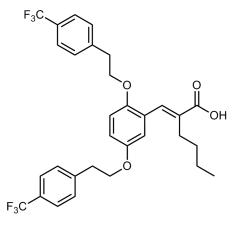
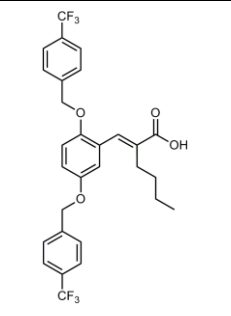
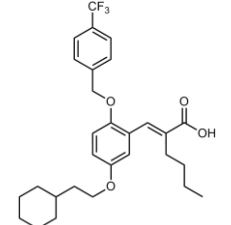
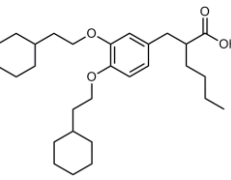
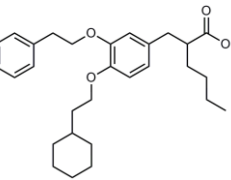
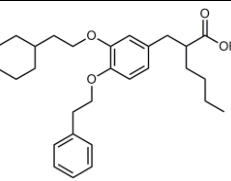
Substanz	Struktur	PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
29 (MH74) 2,4-Substitution		Inaktiv @ 10 μ M		Inverser Modulator: IC ₅₀ A β 38 ~ 5 μ M	
30 (MH77) 2,5-Substitution		10.8 \pm 0.8	97 \pm 5	21.9	14.2

Verschiebt man die Reste dagegen in 2,4-Position, so wird die PPAR γ -Aktivität gänzlich aufgehoben (inaktiv bei 10 μ M) und man erhält stattdessen einen potenten inversen γ -Sekretase-Modulator, der A β 38 mit einem IC₅₀ von ca. 5 μ M inhibiert und A β 42 aktiviert. Damit stellt Verbindung **29** den ersten literaturbeschriebenen inversen Modulator dar, der eine Carbonsäure-Funktion trägt (siehe Kap. 2.4.4.2). Damit könnte er Beiträge zur Aufklärung des Mechanismus der GSMs liefern.

Mit der 2,5-substituierten Verbindung **30** wurde der potenteste duale PPAR γ / γ -Sekretase-Modulator innerhalb dieses Substanzsets identifiziert. Diese zeigte einen EC₅₀-Wert an PPAR γ von 10.8 μ M und eine γ -Sekretase-Modulation von IC₅₀ = 21.9 μ M. Somit diene diese Substanz als Vorlage zur weiteren Optimierung. Die resultierenden Strukturen sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Strukturoptimierung der Substanzen **28** und **30**

Substanz	Struktur	PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
Strukturoptimierung basierend auf Verbindung 30					
31 (MH147)		1.8 \pm 0.5	47 \pm 6	16.9	7.8
32 (MH164)		75 \pm 8 % Aktivierung @ 10 μ M		3.6	2.8

Substanz	Struktur	PPAR γ Aktivierung		γ -Sekretase-Modulation	
		EC ₅₀ in μ M	Maximale Aktivierung in [%]	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
33 (MH166)		7.2 \pm 1.3	86 \pm 12	2.0	1.7
34 (MH163)		28 \pm 8 Aktivierung @ 10 μ M		1.1	0.6
35 (MH167)		27 \pm 5 Aktivierung @ 10 μ M		2.5	2.9
Strukturoptimierung basierend auf Verbindung 28					
36 (MH115)		1.1 \pm 0.1	69 \pm 3	> 40	> 40
37 (MH118)		2.5 \pm 0.4	61 \pm 5	> 40	> 40
38 (MH127)		1.5 \pm 0.5	128 \pm 18	> 40	> 40

Zunächst wurde das korrespondierende Zimtsäure-Derivat zu **30** synthetisiert. Da dieses (**31**) an γ -Sekretase mit einem IC₅₀-Wert von 16.9 μ M um weitere 5 μ M potenter ist, wurden im Folgenden jeweils die korrespondierenden Zimtsäuren synthetisiert. Bei den Derivaten **32** und **33** wurde die neue zentrale Einheit von **31** mit den beiden potentesten Resten aus der ersten Studie, den Cyclohexylethoxy- und *p*-(Trifluormethyl)phenoxy-Resten kombiniert. Damit konnten die IC₅₀-

Werte für A β 42 auf 3.6 μ M (**32**) bzw. 2.0 μ M (**33**) gesenkt werden. PPAR γ wird von den beiden Verbindungen ebenfalls im niedrig mikromolaren Bereich ($EC_{50} < 10 \mu$ M) aktiviert.

Aufgrund des neuen Syntheschemas (siehe Kap. 3.3.2) war es für die Klasse der trisubstituierten Benzen-Derivaten des Weiteren möglich, ein Derivat zu synthetisieren, welches mit 5-Cyclohexylethyl und 2-*p*-(Trifluormethyl)benzyl zwei unterschiedliche Ether-Reste am zentralen Benzen besitzt. Auch dieses Derivat ist mit IC_{50} A β 42 = 2.5 μ M eines der aktivsten γ -Sekretase-Modulatoren, allerdings mit schwächerer Aktivität an PPAR γ (27% Aktivierung bei 10 μ M). Zuletzt wurde ein weiteres Derivat mit zwei verkürzten *p*-(Trifluormethyl)benzyl-Resten synthetisiert, das den potentesten GSM dieser Arbeit mit einem IC_{50} -Wert von 1.1 μ M darstellt (PPAR γ 28% Aktivierung bei 10 μ M). Aufgrund der *in vitro*-pharmakologischen Aktivität der Substanzen **32** und **33** stellen diese beiden Verbindungen die potentesten dualen γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulatoren dieser Studie dar. Auf Basis der PPAR γ -selektiven Substanz **28** wurden darüber hinaus drei weitere Derivate synthetisiert. Dies sind die Dicyclohexylethoxy-substituierte Substanz **36** sowie zwei Derivate mit jeweils einem Cyclohexylethoxy- und einem Phenethoxy-Rest (**37**, **38**). Zusammengefasst stellen alle drei Derivate die aktivsten, selektiven PPAR γ -Modulatoren dieser Arbeit dar.

Selektivitätsprofil

Analog zur ersten Studie wurde auch hier das Selektivitätsprofil der Substanzen hinsichtlich COX- und Notch-Inhibition sowie Zytotoxizität erstellt. Die Inhibition der beiden **COX-Isoenzyme** kann mit dem Austausch des zentralen Rings bei fast allen Derivaten gesenkt werden (siehe Tab. 11). Besonders interessant sind die Werte der vier potentesten GSMs (**32-35**). Auffällig ist dabei, dass keine der Substanzen eine Inhibition von COX-2 zeigt (Restaktivität > 100%). Auch die COX-1-Inhibition wird gesenkt, so dass COX-1 nur noch eine Restaktivität von 76-92% aufweist.

Tabelle 11 COX-Inhibition

Substanz	COX-1 Restaktivität [%] bei 10 μ M	COX-2 Restaktivität [%] bei 10 μ M	Substanz	COX-1 Restaktivität [%] bei 10 μ M	COX-2 Restaktivität [%] bei 10 μ M
23	78.7 \pm 34.1	78.4 \pm 26.7	31	68.0 \pm 21.0	94.4 \pm 18.5
24	81.4 \pm 17.1	81.4 \pm 15.5	32	76.4 \pm 12.7	123.4 \pm 33.7
25	71.3 \pm 3.6	109.7 \pm 8.5	33	81.0 \pm 20.4	102.4 \pm 12.6
26	71.6 \pm 6.4	92.5 \pm 4.7	34	82.6 \pm 8.2	102.0 \pm 9.6
27	66.1 \pm 27.6	89.6 \pm 35.6	35	92.3 \pm 16.0	106.1 \pm 20.6
28	95.8 \pm 57.5	86.4 \pm 28.9	36	73.8 \pm 15.1	79.1 \pm 13.2
29	99.1 \pm 20.9	110.3 \pm 10.1	37	69.1 \pm 6.9	91.5 \pm 5.7
30	63.8 \pm 25.9	66.5 \pm 24.5	38	82.0 \pm 11.7	96.6 \pm 16.4

Für die potentesten dualen γ -Sekretase-/ PPAR γ -Modulatoren **32** und **33** wurde die Inhibition der **Notch-Prozessierung** untersucht. Diese kann bis zu einer Konzentration von 30 μ M ausgeschlossen werden (siehe Abb. 34).

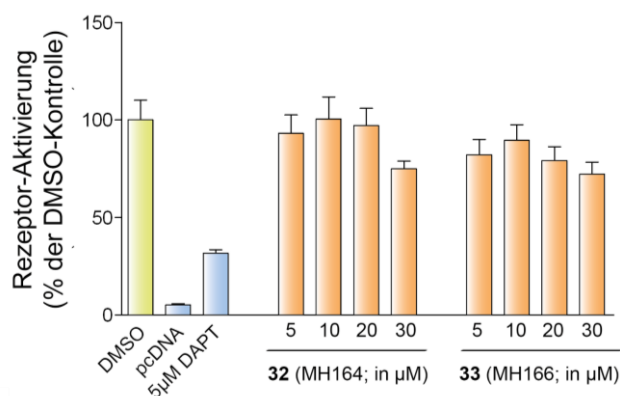


Abbildung 34 Notch-Inhibition der Verbindungen **32** und **33**

Zuletzt wurde die Zytotoxizität der Substanzen überprüft. Diese zeigt ein ähnliches Bild wie in der vorherigen Studie. Keine der Substanzen weist bis 40 μ M einen Einfluss auf das Zellüberleben auf, erst bei höheren Konzentrationen kommen zytotoxische Effekte zum Tragen (siehe Abb. 35).

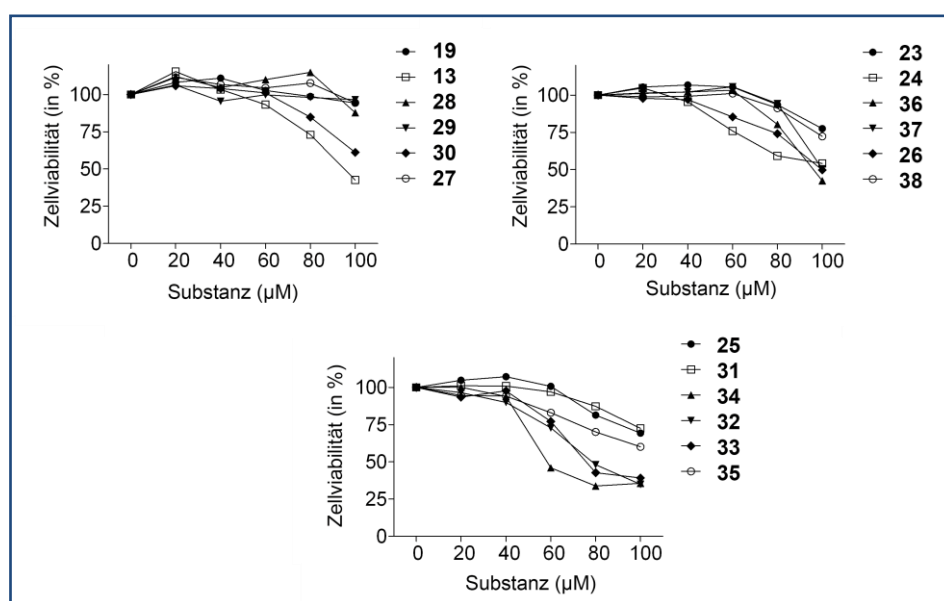


Abbildung 35 Zytotoxizität der Derivate aus der zweiten Studie.

Zusammenfassend war es in dieser Studie nicht nur möglich, die γ -Sekretase-Potenz bei gleichbleibender PPAR γ -Modulation noch einmal zu erhöhen, sondern auch die COX-Aktivität weiter zu senken. Verbunden mit ihren günstigen Notch- und Zytotoxizitätsprofilen stellen die Leitstrukturen dieses Sets ideale Kandidaten für eine Weiterentwicklung dar.

3.2 Diskussion

In den beiden oben dargestellten Studien wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen von dualen γ -Sekretase- und PPAR γ -Modulatoren untersucht, welche einen neuartigen Ansatz zur Therapie von AD darstellen. Gerade für Patienten mit Typ-II Diabetes Mellitus, die einen wachsenden Anteil der Bevölkerung darstellen und ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Morbus Alzheimer haben, würde ein solcher Wirkstoff eine attraktive Behandlungsmöglichkeit darstellen. Trotz der ähnlichen strukturellen Anforderungen von γ -Sekretase und PPAR γ (siehe Kap. 2.4.4.2 und 2.5.3.2) wurde bisher kein dualer Modulator in der Literatur beschrieben, mit dem die beiden Targets gezielt adressiert wurden. Bei den in Kapitel 3.1 aufgeführten Verbindungen handelt es sich folglich um die ersten Substanzen, die hinsichtlich beider Targets optimiert wurden. Darüber hinaus wurden die Substanzen ausführlich auf ihre möglichen *off-target* Effekte (COX- und Notch-Inhibition) und Zytotoxizität untersucht.

Innerhalb der beiden Studien war es möglich, umfangreiche Struktur-Wirkungsbeziehungen aller Strukturelemente von HZ34 (**3**) zu erhalten. Dabei zeigte sich folgendes Bild:

1. In α -Position ist die Anwesenheit eines Substituenten für die γ -Sekretase-Aktivität erforderlich. Die Einführung von aliphatischen Ketten resultiert in steigender Aktivität, wobei das Optimum in der *n*-Butyl-Kette liegt. Ein Austausch gegen Phenyl (**5**) resultiert in einem selektiven GSM ohne PPAR-Aktivität. **2.** Im Bereich der lipophilen Phenethoxy-Reste werden breite strukturelle Variationen toleriert und die Struktur-Wirkungsbeziehungen sind weniger steil. Als besonders vorteilhaft hat sich die Einführung von *p*-Trifluormethyl-Resten (**13**) oder der Austausch gegen Cyclohexyl-Reste (**19**) erwiesen. **3.** Der Austausch der Thiobarbitursäure-Partialstruktur gegen eine 3,5-Diphenethoxy-substituierte 2-Benzyl- (**23**) oder 2-Benzylidenhexansäure (**24**) geht mit Wirkverlusten an der γ -Sekretase einher. Die Aktivität kann jedoch gesteigert werden, wenn die beiden Phenylethoxy-Reste von den Positionen 3,5- nach 2,5- (**30** und **31**) verschoben werden. **4.** Die Kombination des 2,5-Substitutionsmusters von **30** und **31** mit den beiden lipophilen Resten der Verbindungen **13** und **19** resultierte in einem Substanzset von vier Verbindungen (**32-35**). Diese stellen die potentesten γ -Sekretase-Modulatoren der Studie dar, allerdings mit einem leichten Verlust der PPAR γ -Aktivität.

Im Hinblick auf die COX-Inhibition konnten keine steilen SAR festgestellt werden. Alle Substanzen der ersten Studie zeigen eine schwache COX-Aktivität ($IC_{50} > 10 \mu M$), wohingegen diese innerhalb der zweiten Studie mit den vier Verbindungen **32-35** gesenkt werden konnte. Dabei zeigen die Substanzen keine zytotoxischen Eigenschaften und die Leitstrukturen inhibieren die Notch-Prozessierung nicht. Zusammenfassend war es innerhalb beider Studien möglich, durch gezielte Strukturvariationen eine Optimierung der dualen Aktivität zu erreichen. Mit den vorliegenden *in vitro*-Charakteristika zeigen die Verbindungen ein viel versprechendes Profil zur Weiterentwicklung in präklinischen Studien. Diese könnte zudem weiteren Aufschluss über die therapeutische Eignung des Konzepts der dualen γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulation liefern.

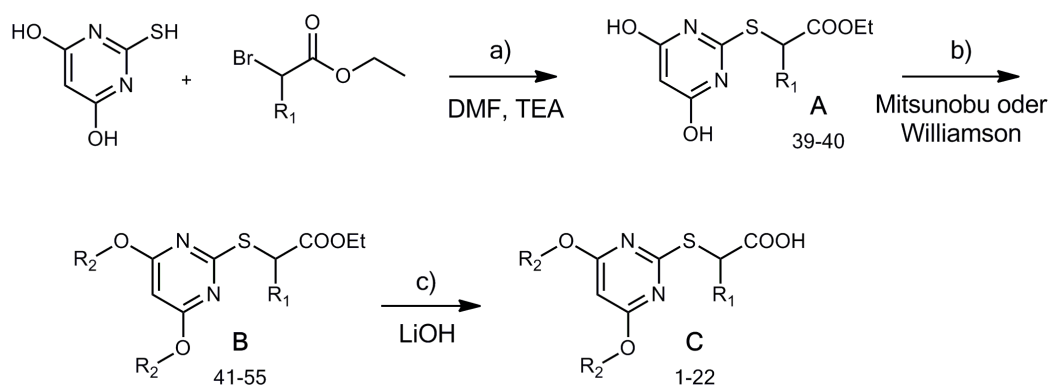
3.3 Chemische Synthesen

3.3.1 Synthese der Thiobarbitursäure-Derivate

Die Synthese aller beschriebenen Thiobarbitursäure-Derivate der ersten Studie folgte dem im Arbeitskreis etablierten Schema, das nach der Vorlage von d'Atri et al. (1984)²¹⁸ modifiziert und in der Publikation von Koeberle et al. beschrieben wurde.²²⁴

Ausgehend von Thiobarbitursäure als Edukt wird die Thiolgruppe zunächst mit einem α -Brom-Ethylester verethert und man erhält die Vorstufen **39** bzw. **40**. Nachfolgend werden die beiden freien Hydroxylgruppen der resultierenden Zwischenstufe in einem Schritt mittels einer *Williamson*-artigen oder *Mitsunobu*-Ethersynthese (unter Verwendung von kommerziellen erhältlichen Halogen- oder Alkoholderivaten) zu den jeweiligen Dialkoxy-Derivaten verethert. Mit Lithiumhydroxid als Base erfolgt im letzten Schritt schließlich die Hydrolyse zur freien Carbonsäure.

Schema 1 Synthese der Thiobarbitursäure-Derivate



Reagenzien und Bedingungen: a) R₁ = -*n*-Butyl oder -Phenyl: Thiobarbitursäure (1 eq), α -Brom-Ethylhexanoat (1.2 eq) oder α -Brom-Phenylethylacetat (1.2 eq), Triethylamin (3 eq), DMF (q.s.), 80°C, 3-4 h. b) *Mitsunobu*-Bedingungen: **A** (1 eq), R₂-OH (2.1 eq), TPP (2.5 eq), DEAD (2.5 eq), THF, Raumtemperatur, 1-24 h. *Williamson*-artige Bedingungen: **A** (1 eq), R₂-Halogen (2.1 eq), K₂CO₃ (2.3 eq), DMF, 80-90°C, 3-28 h. c) **B** (1 eq), LiOH·H₂O (5 eq), THF/ H₂O, 1.5-24 h.

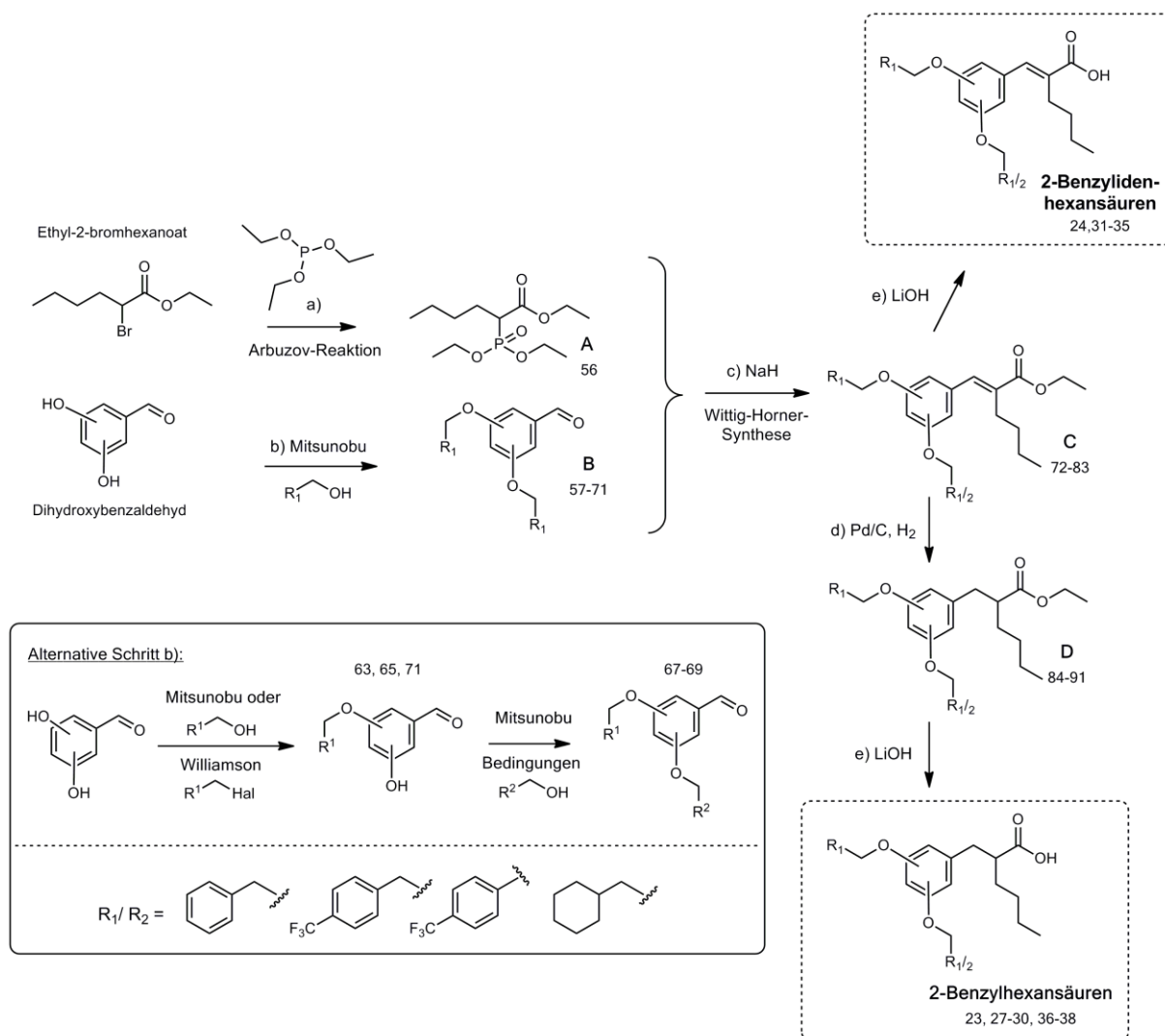
3.3.2 Synthese von substituierten 2-Benzyl- und 2-Benzylidenhexansäuren

Zur weiteren Strukturoptimierung der Substanzen wurde das zentrale Thiobarbitursäure-Element durch ein reines Kohlenstoffgerüst ersetzt und das Phenethoxy-Substitutionsmuster variiert. Die jeweiligen Substanzen wurden nach modifizierter Vorschrift von Zettl et al. wie folgt dargestellt:¹⁹¹

Zunächst wird die Phosphonat-Vorstufe **A** in einer *Arbuzov*-Reaktion durch gemeinsames Erhitzen von α -Brom-Ethylhexanoat und Triethylphosphit hergestellt. Parallel dazu werden die beiden Hydroxylgruppen der strukturisomeren Dihydroxybenzaldehyde **B** verethert. Je nachdem ob zwei unterschiedliche oder gleiche Ether-Reste eingeführt werden, verläuft die Reaktion in ein oder zwei

Veretherungs-Schritten. In einer *Wittig-Horner*-Reaktion werden die beiden Vorstufen **A** und **B** unter Verwendung von Natriumhydrid in THF zu den jeweiligen Esterderivaten umgesetzt. Diese können danach mit Lithiumhydroxid direkt zur freien Zimtsäure hydrolysiert werden. Alternativ ist auch eine Hydrierung der exozyklischen Doppelbindung mittels Pd/C und Wasserstoff im Autoklaven zu Ethyl 2-(Benzyl)hexanoat-Derivaten möglich, die dann im Anschluss verseift werden.

Schema 2 Synthese der 2-Benzyl- und 2-Benzylidenhexansäure-Derivate

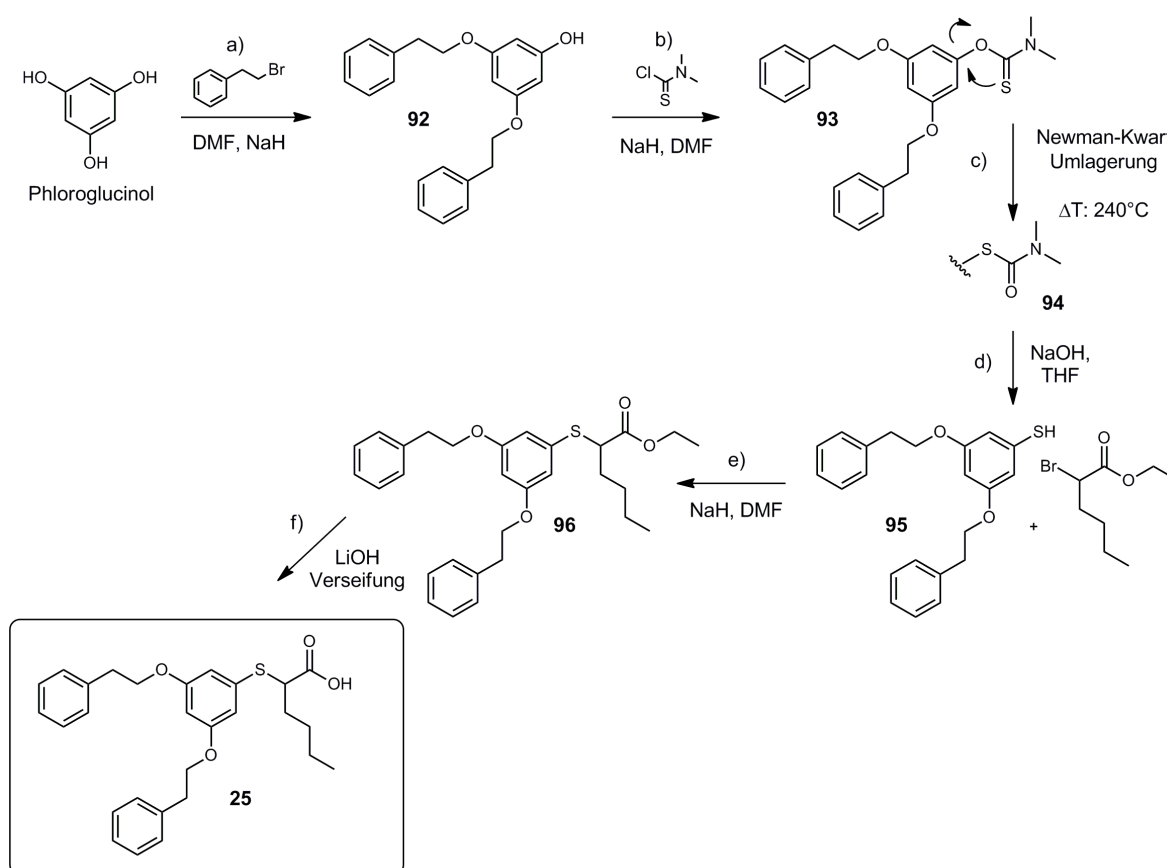


Reagenzien und Bedingungen: a) Triethylphosphit (1 eq), α -Brom-Ethylhexanoat (1 eq), 120°C, 12 h. b) *Mitsunobu*- oder *Williamson*-artige Bedingungen (siehe Kap. 3.3.1, Schema 1). c) **A** (1.3 eq), **B** (1 eq), NaH (1.3 eq), THF, Raumtemperatur, 2-22 h. d) **C**, Pd/ C (10%), Ethanol, 24 h, Raumtemperatur. e) Vorstufe **C** oder **D** (1 eq), LiOHxH₂O (5 eq), THF/ H₂O, 50-60°C, 6-40 h.

3.3.3 Synthese von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure 25

Zur Untersuchung des Einflusses eines exozyklischen Schwefel-Atoms auf die Aktivität an γ -Sekretase wurde eine Synthese zur Darstellung von 2-[(3,5-diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure entwickelt. Diese verläuft über sechs Stufen ausgehend von kommerziell erhältlichem Phloroglucinol. Zunächst werden dabei zwei der drei Hydroxylgruppen von Phloroglucinol mittels einer *Williamson*-Ethersynthese mit Phenethylbromid umgesetzt.²²⁵ Die Verbindung **92** kann aus einem Gemisch von mono-, di- und trisubstituierten Phloroglucinolethern in niedriger Ausbeute isoliert werden. Die verbleibende Hydroxylgruppe wird darauffolgend mit *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid aktiviert. In einer *Newman-Kwart*-Umlagerung bei 240°C erfolgt der Austausch von Sauerstoff mit Schwefel und somit die Einführung der Thiolgruppe.²²⁶ Diese wird nun im nächsten Schritt mittels Natronlauge geschützt und kann danach unter Verwendung von Standardmethoden verethert werden. Den letzten Schritt stellt auch hier die Verseifung zur freien Carbonsäure dar.²²⁷

Schema 3 Synthese von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure **25**

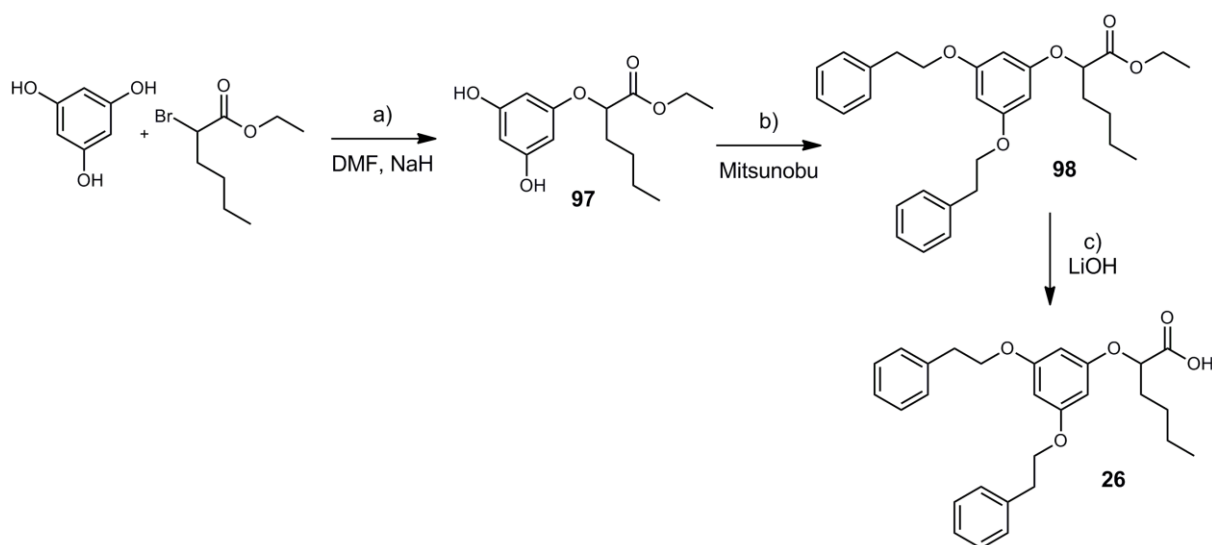


Reagenzien und Bedingungen: a) Phloroglucinol (1 eq), Phenethylbromid (2.1 eq), NaH (3 eq), DMF, Raumtemperatur, 20 h. b) **92** (1eq), *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid (1 eq), NaH (1.2 eq), DMF, 60°C, 5 h. c) **93**, 240°C, 5 h. d) **94** (1 eq), 1M NaOH (10 ml), THF/ MeOH 2:5, 80°C, 3 h. e) **95** (1 eq), α -Brom-Ethylhexanoat (1.2 eq), NaH (1.2 eq), DMF, Raumtemperatur, 3 h. f) **96** (1 eq), LiOHxH₂O (5 eq), THF/H₂O, 50°C, 3 h.

3.3.4 Synthese von 2-(3,5-Diphenethoxyphenoxy)hexansäure **26**

Im Rahmen der Untersuchung der exozyklischen Position wurde mit Verbindung **26** eine weitere Alternative synthetisiert. Ausgehend von Phloroglucinol erfolgt die Synthese hierbei auf ähnliche Weise wie bei den vorher beschriebenen Thiobarbitursäure-Derivaten. Zunächst wird eine Hydroxylgruppe von Phloroglucinol unter *Williamson*-Bedingungen mit α -Brom-Ethylhexanoat und NaH verethert.²²⁵ Daraufhin findet die Veretherung der beiden weiteren Hydroxylgruppen unter *Mitsunobu*-Bedingungen statt. Zuletzt wird auch hier die Estergruppe hydrolysiert.

Schema 4 Synthese von 2-(3,5-Diphenethoxyphenoxy)hexansäure **26**



Reagenzien und Bedingungen: a) Phloroglucinol (1 eq), NaH (1.6 eq), α -Brom-Ethylhexanoat (0.8 eq), DMF, Raumtemperatur, 8 h. b) **97** (1 eq), Phenylethanol (2.1 eq), DEAD (2.5 eq), TPP (2.5 eq), THF, Raumtemperatur, 4 h. c) **98** (1 eq), LiOHxH₂O (5 eq), THF/H₂O, 50°C, 24 h.

3.4 *In vitro*-pharmakologische Charakterisierung

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Endverbindungen **1-38** wurden in verschiedenen *in vitro*-pharmakologischen Testsystemen auf ihre biochemischen Eigenschaften und somit auf den Einsatz als potentielle Wirkstoffe für die Behandlung von Morbus Alzheimer hin geprüft. Untersucht wurden Effekte auf γ -Sekretase sowie auf alle Subtypen von PPAR. Zusätzlich wurde ein Selektivitätsprofil hinsichtlich der Inhibition von COX (COX- 1 und COX-2) und Notch erstellt und die Zytotoxizität der Substanzen bestimmt.

Die Durchführung des γ -Sekretase-Assays, des Notch-Assays und der Messung der Zytotoxizität erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Weggen (Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), die Transaktivierung von PPAR wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Schubert-Zsilavecz und die COX-Inhibition der Verbindungen wurde an der Universität Tübingen, Arbeitskreis Prof. Dr. Oliver Werz, untersucht.

3.4.1 γ -Sekretase-Assay

Die Untersuchung der γ -Sekretase-Aktivität wurde indirekt über die Freisetzung der Amyloidfragmente A β 40, A β 42 und A β 38 in einem zellulären ELISA-Assay bestimmt. Die praktischen Arbeiten wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Weggen von Frau Julia Ness am Universitätsklinikum in Düsseldorf nach publizierter Methode durchgeführt.²²⁸

Über das hier verwendete A β -Profiling ist eine Unterscheidung in γ -Sekretase-Inhibitoren, -Modulatoren oder inverse Modulatoren möglich. Für den Assay werden CHO (*chinese hamster ovar*)-Zellen mit stabiler Überexpression von humanem Wildtyp-APP und humanem Wildtyp-Presenilin-1 zusammen mit der jeweiligen Testsubstanz in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert.

Die konditionierten Überstände werden auf IC16-gecoatete ELISA-Platten gegeben. Der IC16-Antikörper bindet an A β ₁₋₁₅ und immobilisiert alle A β -Peptide auf der Platte. Zur Quantifizierung der einzelnen Amyloid-Fragmente werden mit Meerrettich-Peroxidase-gelabelte Antikörper hinzugefügt, die spezifisch an das jeweilige C-terminale Ende von A β 38, A β 40 und A β 42 binden. Nachfolgend findet eine Farbreaktion mit einem Peroxidase-Kit statt. Die Absorption wird bei 450 nm ausgewertet. Als Vergleichswerte werden synthetische A β 38-, A β 40- und A β 42-Fragmente verwendet.

Jede Substanz wird dreifach gemessen und mit einer DMSO-Kontrolle normalisiert. Für die Bestimmung von IC₅₀-Werten werden die Werte von 8 Konzentrationen herangezogen und eine nicht-lineare Kurve erstellt. Eine statistische Auswertung erfolgt mittels GraphPadPrism (GraphPad Software).

3.4.2 PPAR-Transaktivierungs-Assay

Die Aktivierung von humanem PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ wurde in einem Reporter-Gen-Assay in COS-7-Zellen (Nierenzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze) bestimmt. Die praktischen Arbeiten wurden von Frau Ramona Steri im Arbeitskreis Prof. Dr. Schubert-Zsilavec nach publizierter Vorschrift durchgeführt.¹⁹¹

Dabei werden COS-7 Zellen mit dem Plasmid pFA-CMV-PPAR-LBD transfiziert, das anstelle des PPAR-Vollrezeptors ein Fusionsprotein codiert, das aus einer Gal4-DNA-Bindedomäne (anstelle der DNA-Bindedomäne von PPAR), der *hinge*-Region und der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) des jeweiligen humanen PPAR-Subtyps besteht. Der CMV (Cytomegalovirus)-Promotor sorgt dabei für ein hohes konstitutives Expressionsniveau des Fusionsproteins. Für Gal4 ist auf dem Reporterplasmid außerdem ein passendes Response-Element (UAC) vorhanden. Bei Bindung eines Liganden an die LBD wird die Transkription von Genen (im Speziellen des Firefly-Luciferase-Gens) aktiviert, die unter der Kontrolle eines Gal4-Responseelements stehen. Das Firefly-Luciferase-Gen ist auf dem Reporter-Plasmid enthalten und wird unter Kontrolle eines Promotors (bestehend aus der fünffachen Wiederholung des Gal4-Responseelements und einer TATA-Box) nach PPAR-Aktivierung transkribiert. Die Luciferase-Expression kann somit als direktes Maß für die Aktivierung von PPAR verwendet werden. Als vorteilhaft hat sich hier vor allem die hohe Subtypspezifität erwiesen, da die Aktivierung endogener PPARs aufgrund der fehlenden PPAR-Response-Elemente auf dem Reporter-Plasmid nicht erfasst wird. Für die Normalisierung der Werte hinsichtlich Faktoren wie Zellzahl, Zellüberleben und Proteinexpressionsrate wird ein weiteres Kontrollplasmid zugegeben, welches das Renilla-Luciferase-Gen beinhaltet. Die Detektion und Quantifizierung der Firefly-Luciferase-Aktivität erfolgt über Lumineszenzmessung. Hierfür wird nach Lyse der Zellen das Substrat Luciferin zugegeben, welches durch die Firefly-Luciferase unter Lumineszenz in Oxyluciferin umgewandelt wird. Um die Normalisierung über Renilla-Luciferase mit einzubeziehen, wird Coelenterazin zugegeben und ebenfalls über Lumineszenz quantifiziert. Die resultierenden Werte der Firefly-Luciferase werden dann durch die resultierenden Werte der Renilla-Kontrollen geteilt und man erhält als normierte Größe sogenannte relative Light Units (rLU). Als Positiv-Kontrolle dienen Pioglitazon (PPAR γ), GW7647 (PPAR α) und für L165,041 (PPAR δ) in einer Konz. von 1 μ M.

3.4.3 Messung von *off-target* Effekten und Zytotoxizität

3.4.3.1 COX-Inhibition

Die COX-Inhibition der Substanzen wurde am reinen Enzym im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Werz von Frau Christine Greiner an der Universität Tübingen nach publizierter Vorschrift getestet.²²⁴ Für COX-1 wird dabei isolierte, ovine COX-1 (aufgereinigt, 50 Einheiten) verwendet und für COX-2 das humane rekombinante Enzym (20 Einheiten). Zu diesen wird bei 4°C jeweils eine Mischung aus

Tris-Puffer (pH 8), Glutathion, Hämoglobin und EDTA zugegeben und 5 min mit den jeweiligen Testverbindungen inkubiert. Im Folgenden werden die Proben für 60 Sekunden auf 37°C erwärmt und Arachidonsäure als Substrat zugegeben (5 µM für COX-1 und 2 µM für COX-2). Nach weiteren 5 min bei 37°C wird das COX-Produkt 12-HHT (12-Hydroxyheptadecatriensäure) extrahiert. Die Umsetzung zu 12-HHT wird schließlich mittels einer HPLC-Methode quantifiziert.

3.4.3.2 Notch-Assay

Die Messung der Notch-Inhibition und der Zytotoxizität wurde ebenfalls an der Universität Düsseldorf von Frau Julia Ness durchgeführt. Die Inhibition von Notch wurde mittels eines Reporter-gen-Assays (Gal4, Renilla-Luciferase und Firefly-Luciferase) in CHO-Zellen gemessen. Dabei wurden CHO-Zellen transient mit dem pCDNA3-Notch-ΔE-GVP-Plasmid, welches für einen Teil des Notch-Rezeptors verbunden mit einer Gal4-DNA-Bindungs/ VP16-Transaktivierungs-Domäne codiert, und mit dem MH100-Reporterplasmid, welches die Firefly Luciferase unter der Kontrolle des AUS-Promotors codiert, unter Verwendung des GeneJuice-Transfektions-Reagenzes (MerckChemicals Ltd.) transfiziert. Eine Cotransfektion des MH100-Reporters mit einem leeren pcDNA3-Plasmid dient dabei als Negativkontrolle. Zusätzlich werden 5 ng des Plasmids pRL-TK, das für die Renilla-Luciferase codiert, zu dem Plasmid-Mix als Kontrolle der Transfektions-Effizienz zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen für weitere 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen der Testverbindungen inkubiert. Als Positivkontrolle dient der γ-Sekretase-Inhibitor LY-411,575 (0.5 µM) bzw. DAPT (5 µM) und als Negativkontrolle DMSO. Die Zellen werden danach lysiert und die Firefly- bzw. Renilla-Luciferase-Aktivitäten mittels eines Dual Glo-Luciferase-Assay-Systems (Promega) und einem PARADIGM-Mikroplatten-Leser (Beckman-Coulter) quantifiziert. Die Normalisierung hinsichtlich Zellzahl, Zellüberleben und Proteinexpressionsrate wird wie beim PPAR-Assay dadurch erreicht, dass die Firefly-Luciferase-Werte durch die Renilla-Luciferase-Werte geteilt werden. Die prozentuale Aktivierung des Reporters wird über die Normalisierung von je drei Messungen im Vergleich zu den Werten der DMSO-Kontrolle berechnet. Eine t-Test-Analyse wurde von zwei unabhängigen Experimenten mittels GraphPad Prism durchgeführt ($p < 0.001$).

3.4.3.3 Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizität der Substanzen wurde an CHO-Zellen mit stabiler Überexpression von humanem APP und humanem Wildtyp-PS-1 gemessen. Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen werden diese mit steigenden Konzentrationen an Wirkstoff (0-100 µM, gelöst in DMSO) versehen. Nach Inkubation (24 h) wird die Zellviabilität mittels einer Farbreaktion mit Alamar Blue Reagenz (Invitrogen) untersucht. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen, als Referenzwellenlänge wird 600 nm verwendet. Die resultierenden Viabilitäts-Werte sind Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die weltweit die häufigste Ursache einer Demenz darstellt. Da neben genetischer Prädisposition vor allem ein hohes Lebensalter einen Hauptrisikofaktor für die Erkrankung darstellt, erwartet man für die Industrieländer in den nächsten Jahrzehnten eine enorm ansteigende Patientenzahl. Trotz der großen Fortschritte in der Aufklärung der pathologischen Zusammenhänge ist es bisher noch nicht gelungen, eine Therapie zu entwickeln, mit der das Voranschreiten der Krankheit deutlich verlangsamt oder sogar gestoppt werden kann.

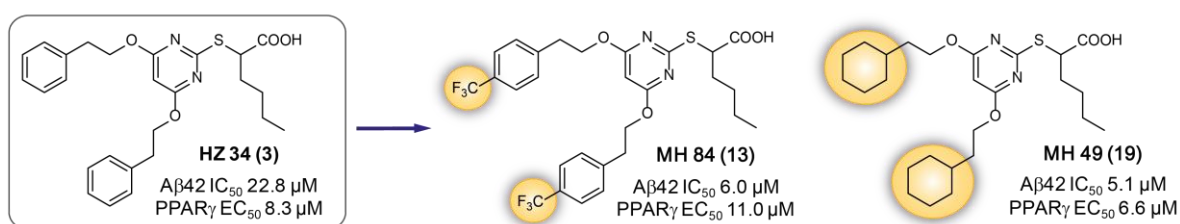
Die vorliegende Arbeit verfolgt einen medizinisch-chemischen Ansatz, in der die Entwicklung von dualen γ -Sekretase- und PPAR γ (Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor γ)-Modulatoren als potentielle Arzneistoffe gegen Morbus Alzheimer im Fokus steht. Bei der γ -**Sekretase** handelt es sich um eine Aspartylprotease, die im Rahmen der Amyloid-Kaskade an der carboxyterminalen Spaltung von Amyloid Precursor Protein und damit unmittelbar an der Bildung der pathogenen Amyloid- β 42-Fragmente beteiligt ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diverse Punktmutationen in ihrer katalytischen Untereinheit Presenilin eine genetisch bedingte *early-onset* Alzheimer-Demenz auslösen können. Das therapeutische Potential von γ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren konnte in der Folge in zahlreichen präklinischen Studien bestätigt werden.

PPAR γ gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und gilt als wichtiger Regulator der Lipid- und Glucosehomöostase. Mit Pioglitazon ist in Deutschland derzeit ein PPAR γ -Agonist für die Therapie von Typ-II Diabetes Mellitus zugelassen. Da Erkrankungen mit Störungen im Lipid- und Glucosehaushalt wichtige epidemiologische Risikofaktoren für Morbus Alzheimer darstellen, wurde die Rolle von PPAR γ auch in diesem Kontext untersucht. In zahlreichen *in vivo*-Studien wurden PPAR γ -Agonisten aufgrund vielfältiger Mechanismen mit positiven Effekten bei Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Duale γ -Sekretase-/ PPAR γ -Modulatoren könnten somit insbesondere bei Typ-II-Diabetikern, die einen wachsenden Anteil der Bevölkerung darstellen und ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Morbus Alzheimer haben, eine attraktive Option zur Prävention und Behandlung von Morbus Alzheimer darstellen.

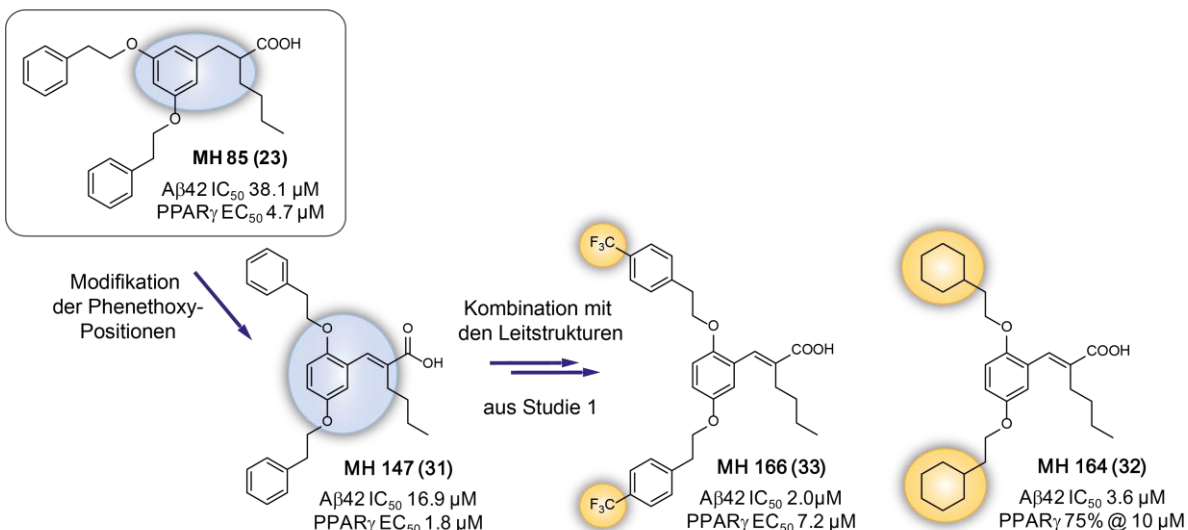
Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Verbindung HZ34 (**3**), die als subtypselektiver PPAR γ -Modulator als erste Verbindung ihrer Klasse zusätzlich auch γ -Sekretase-Modulation zeigte. Die Zielsetzung war dabei eine umfangreiche Untersuchung der zugrunde liegenden Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie eine Optimierung beider pharmakologischer Aktivitäten. In der ersten Studie wurde zunächst der Einfluss der α -Kette sowie der beiden lipophilen Phenethoxy-Reste untersucht und deren Resultate in der Publikation *Hieke et al., J.Med.Chem. 2010* zusammengefasst. Eine signifikante Steigerung der Aktivität an beiden Targets war durch Modifikation der beiden lipophilen Reste, insbesondere durch Einführung von *p*-Trifluormethyl-Substituenten (**13**) und durch Ersatz der Phenethoxyreste durch Cyclohexylethoxy (**19**), möglich. In der zweiten Studie wurde eine

Synthesestrategie entwickelt, die den Ersatz der zentralen Thiobarbitursäure-Partialstruktur von **3** erlaubte und zu trisubstituierten Benzenderivaten führte. Die zu **3** analoge Verbindung 2-(3,5-Diphenethoxybenzyl)hexansäure **23** führte zunächst zu schwächerer γ -Sekretase-Modulation. Eine Steigerung der Aktivität konnte jedoch durch Verschiebung der Phenethoxy-Reste von 3,5- (**23**) auf 2,5-Positionen und Einführung einer exozyklischen Doppelbindung (**31**) erreicht werden. Unter Beibehaltung der neuen zentralen Einheit von **31** konnte die Potenz an γ -Sekretase zuletzt durch Austausch der beiden Phenethoxy-Reste gegen die in der ersten Studie identifizierten potentesten Reste in **33** (*p*-(Trifluormethyl)phenethoxy) und **32** (Cyclohexylethoxy) deutlich gesteigert werden.

Studie 1: Thiobarbitursäure-Derivate



Studie 2: Trisubstituierte Benzenderivate



Zusammengefasst wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen ausgehend von HZ34 (**3**) in zwei umfangreichen Studien untersucht. Dabei konnte eine Optimierung hinsichtlich dualer γ -Sekretase und $PPAR_{\gamma}$ -Modulation gezeigt werden. Trotz der ähnlichen strukturellen Anforderungen von γ -Sekretase und $PPAR_{\gamma}$ (saure Kopfgruppe verbunden mit einem lipophilen Grundgerüst) wurde bisher kein dualer Modulator in der Literatur beschrieben, mit dem die beiden Targets gezielt adressiert wurden. Somit stellen die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen die ersten Substanzen dar, die hinsichtlich beider Targets optimiert wurden. Alle synthetisierten Derivate wurden darüber hinaus auf Inhibition von Notch (physiologisch relevantes Substrat der γ -Sekretase) und der Cyclooxygenase (COX)-Isoenzyme 1 und 2 getestet. Da Notch nicht signifikant und COX-1/-2 nur moderat gehemmt wird und die Verbindungen *in vitro* keine Cytotoxizität aufweisen, stellen sie ideale Strukturen zur Weiterentwicklung als Alzheimer-Wirkstoffe dar.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Allgemeine Angaben

Dünnschichtchromatographie: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Firma Merck KGaA), Schichtdicke 0.2 mm. Die Chromatogramme wurden entweder über Fluoreszenzlöschung (254 nm), Fluoreszenz bei 366 nm oder Ansprühen mit Ninhydrin-Reagenz visualisiert.

Säulenchromatographie: MN Kieselgel 60 (Firma Macherey-Nagel GmbH und CoKG), Korngröße 0.04-0.063 mm.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren erfolgte am Spektrometer Bruker ARX 300 (300 MHz). ¹³C-NMR-Spektren wurden am Spektrometer AC 200 E (50 MHz). Die chemischen Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Spektren wurden auf DMSO-*d*₆ (2.50 ppm: ¹H-NMR und 39.5 ppm: ¹³C-NMR) oder CDCl₃ (7.26 ppm: ¹H-NMR und 77.2 ppm: ¹³C-NMR) geeicht und beziehen sich auf eine Temperatur von 25°C. Die Kopplungskonstante *J* wird in der Einheit Hertz (Hz) angegeben und bezeichnet eine ³J_{HH}-Kopplung über drei Bindungen benachbarter H-Atome.

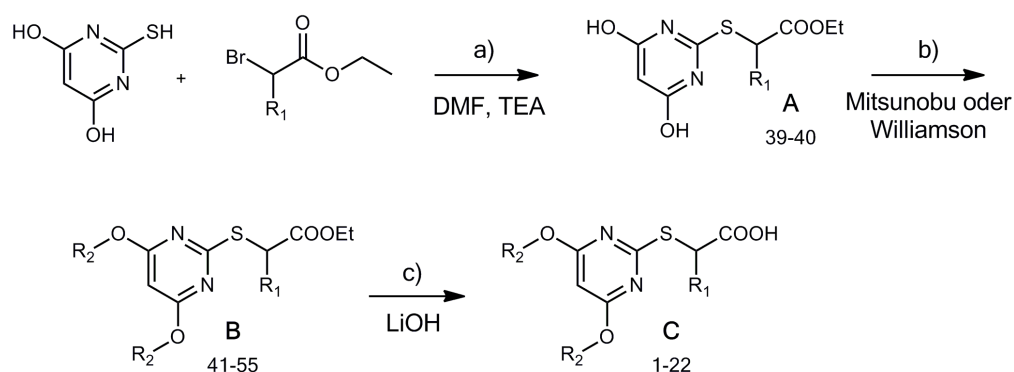
Massenspektrometrie (MS): Die Massenspektren wurden am Institut für organische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt aufgenommen. Verwendete Methode war die Elektronensprayionisation (ESI), die im negativen (ESI-) oder positiven Modus (ESI+) auf dem Gerät Fisous Instruments VG Platform 2 durchgeführt wurde.

Elementaranalysen (EA): Die Elementarzusammensetzung der Substanzen wurde ebenfalls vom Institut für organische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt untersucht. Dabei wurde entweder das Gerät Foss Heraeus CHN-O-Rapid oder Elementar Vario Micro Cube verwendet.

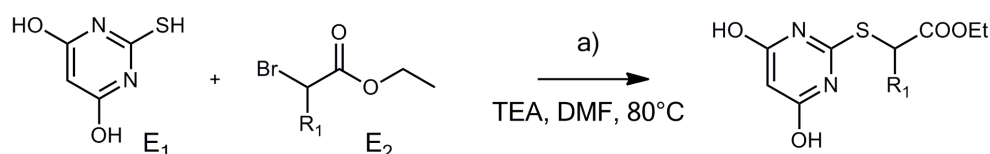
Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien: Die meisten Lösungsmittel wurden in technischer Form eingesetzt. Absolute Lösungsmittel sowie weitere Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich Chemie GmbH, Alfa Aesar GmbH und CoKG, Merck Chemicals, Acros Organics oder Matrix Scientific bezogen.

5.2 Synthese und Charakterisierung der Thiobarbitursäure-Derivate

Syntheschema:



5.2.1 Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Thioether-Vorstufe



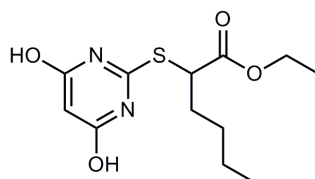
Für die Synthese der Vorstufen **39** und **40** wird 2-Thiobarbitursäure (E₁) in wasserfreiem DMF (quantum satis; ca. 50 ml) suspendiert und nachfolgend Triethylamin (TEA) zugegeben. Erhitzen auf 80-90°C resultiert in einer klaren Lösung, die tropfenweise mit dem jeweiligen 2-Brom-Ethylester (E₂) versetzt wird. Nach Verbrauch der Thiobarbitursäure nach 3-4-stündigem Erhitzen (80°C; DC-Kontrolle) wird das Reaktionsgemisch mit 4-5 Teilen Wasser gequentscht. Im Anschluss wird die resultierende wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Nach Evaporation des organischen Lösungsmittels wird das Rohprodukt durch Umkristallisation aus *n*-Hexan/ Ethylacetat oder Säulenchromatographie (mobile Phase: *n*-Hexan/ Ethylacetat) aufgereinigt, so dass das gereinigte Produkt als weißer Feststoff isoliert werden kann.

Tabelle 12 Synthesebedingungen

Substanz	E ₁ Menge in g (mmol)	E ₂		TEA Menge in g (mmol)	Reaktionsdauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
		R ₁ =	Menge in g (mmol)			in %	in g	
39 (MH38)	4.3 (30.0)	<i>n</i> -butyl	10.0 (45.0)	4.6 (45.0)	3	55.9	4.8	Weißer Feststoff
40 (MH01)	3.6 (24.7)	phenyl	9.0 (37.0)	3.7 (37.0)	4	85.1	6.4	Weißer Feststoff

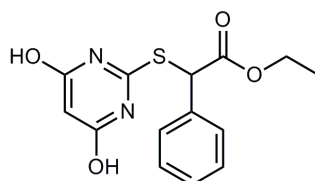
5.2.2 Charakterisierung der Zwischenstufen 39 und 40

Charakterisierung von Ethyl 2-[(4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)thio]hexanoat 39 (MH38)



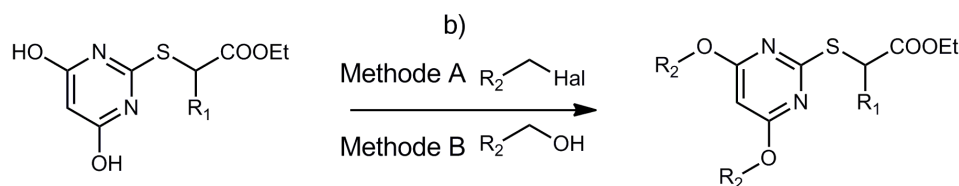
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.82-0.87 (t, 3H, J = 6.9 Hz, Bu-CH₃), 1.14-1.19 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.28-1.31 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.72-1.92 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.08-4.15 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂), 4.47-4.52 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 5.22 (s, 1H, Pyr-CH), 11.75 (s, br, Pyr-OH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.63 (Et-CH₃), 13.89 (Bu-CH₃), 21.59 (Bu-CH₂), 28.49 (Bu-CH₂), 31.27 (Bu-CH₂), 46.39 (S-CH), 61.06 (O-CH₂), 85.62 (Pyr-C₅), 167.79 (Pyr-C₂), 170.86 (COO). **MS (ESI-):** m/e = 284.9 [M-1]⁻

Charakterisierung von Ethyl 2-[(4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)thio]-2-phenylacetat 40 (MH01)



¹H-NMR (250.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 1.10-1.13 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 4.0-4.2 (m, 2H, O-CH₂), 5.2 (s, 1H, S-CH), 5.6 (s, 1H, Pyr-CH), 7.27-7.44 (m, 5H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.81 (Et-CH₃), 51.21 (S-CH), 61.66 (O-CH₂), 85.74 (Pyr-C₅), 128.32 (Ph'-C₄), 128.58 (2C, Ph'-C_{3/5}), 129.0 (2C, Ph'-C_{2/6}), 134.62 (Ph'-C₁), 162.88 (Pyr-C₂), 167.98 (2C, Pyr-C_{4/6}), 169.30 (COO). **MS (ESI+):** m/e = 307.0 [M+1]⁺. **Anal. (C₁₄H₁₄N₂O₄S [306.34])** C, H, N: ber. C: 54.89, H: 4.61, N: 9.14, gef. C: 54.85, H: 4.60, N: 9.09 Abw. C: 0.05 H: 0.01 N: 0.05.

5.2.3 Arbeitsvorschrift zur Veretherung der Hydroxygruppen



Methode A.

Die Substanzen **41-47** wurden unter *Williamson*-artigen Bedingungen hergestellt. Dazu wird Vorstufe **39** oder **40** (E_1 ; 1 eq) zusammen mit Alkylhalogenid (E_2 : 2.1 eq) in wasserfreiem DMF suspendiert und auf 80-90°C erhitzt. Nach portionsweiser Zugabe von K_2CO_3 (2.3 eq) wird die resultierende Suspension für mehrere Stunden bei 80°C gerührt. Ist E_1 vollständig verbraucht (DC-Kontrolle), wird DMF bei 60°C evaporiert und der Rückstand mit 100 ml Wasser verdünnt. Nach Neutralisation mit 2N HCl auf pH 7 wird die wässrige Phase zweifach mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Fraktionen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen sowie über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Einrotieren des Lösungsmittels wird das Rohprodukt schließlich unter Verwendung von Säulenchromatographie und *n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase aufgereinigt.

Tabelle 13 Synthesebedingungen

Substanz	E_1 Menge in g (mmol)	E_2		K_2CO_3 Menge in g (mmol)	Reaktions-Dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
		Edukt	Menge in g (mmol)			in %	in g	
41 (MH40)	39 : 1.0 (3.3)	2-Phenethylbromid	1.27 (6.8)	1.04 (7.6)	28	15.0	0.25	Oranges Öl
42 (MH39)	40 : 0.7 (2.4)	Benzylchlorid	0.65 (5.1)	0.78 (5.7)	7.5	56.0	0.65	Farbloses Öl
43 (MH42)	40 : 0.8 (3.0)	1-Brom-3-phenylpropan	1.25 (6.3)	0.96 (6.9)	4	65.0	1.02	Farbloses Öl
44 (MH54)	40 : 0.6 (2.1)	4-Methoxy-Phenylethylbromid	0.95 (4.4)	0.67 (4.9)	21	60.3	0.70	Farbloses Öl
45 (MH107)	40 : 0.7 (2.4)	Cycloheptyl-Ethylchlorid	0.82 (5.1)	0.76 (5.7)	20	20.0	0.25	Farbloses Öl
46 (MH47)	40 : 0.7 (2.4)	Cyclohexyl-Ethylbromid	0.98 (5.1)	0.76 (5.7)	3	66.9	0.80	Farbloses Öl
47 (MH91)	40 : 0.7 (2.4)	Isopentylbromid	0.78 (5.1)	0.76 (5.7)	3	62.3	0.65	Farbloses Öl

Methode B.

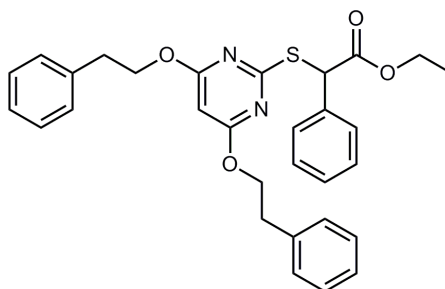
Die Substanzen **48-55** wurden mittels *Mitsunobu*-Synthese hergestellt. Dabei wird Vorstufe **40** (E₁; 1 eq), der jeweilige Alkohol (E₂; 2.1 eq) und Triphenylphosphin (TPP, 2.5 eq) zusammen in einem Dreihalskolben in wasserfreiem THF gelöst. Nach Erzeugen einer Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wird Diethylazodicarboxylat (DEAD, 2.5 eq; in 5 ml THF gelöst) tropfenweise über ein Septum zugegeben und die resultierende Lösung für mehrere Stunden bis zum Verbrauch beider Edukte gerührt. Im Anschluss wird THF einrotiert und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase) aufgereinigt.

Tabelle 14 Synthesebedingungen

Sub-Stanz	E ₁ : 40 Menge in g (mmol)	E ₂		TPP Menge in g (mmol)	DEAD Menge in g (mmol)	Reaktions-dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
		Edukt	Menge in g (mmol)				in %	in g	
48 (MH135)	0.7 (2.4)	4-Methyl-Phenylethanol	0.7 (4.9)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	24	75.9	0.97	Farbloses Öl
49 (MH82)	0.4 (1.6)	4-Trifluor-methyl-Phenylethanol	0.6 (3.2)	1.2 (4.6)	0.8 (4.6)	1	64.3	0.64	Farbloses Öl
50 (MH96)	0.7 (2.4)	4-Trifluor-methoxy-Phenylethanol	1.0 (4.9)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	2	74.1	1.20	Farbloses Öl
51 (MH55)	0.6 (2.1)	4-Nitro-phenylethanol	0.7 (4.2)	1.4 (5.2)	0.9 (5.2)	2.5	63.9	0.79	Gelbes Öl
52 (MH102)	0.7 (2.4)	4-Cyano-Phenylethanol	0.7 (4.9)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	3	71.4	0.95	Farbloses Öl
53 (MH136)	0.7 (2.4)	3-Thiophenyl-Ethanol	0.6 (4.9)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	18	80.6	1.24	Farbloses Öl
54 (MH98)	0.7 (2.4)	Cyclopentyl-Ethanol	0.5 (4.7)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	3	55.3	0.63	Farbloses Öl
55 (MH88)	0.7 (2.4)	Cyclopropyl-Ethanol	0.4 (4.9)	1.6 (6.1)	1.1 (6.1)	3	63.1	0.65	Farbloses Öl

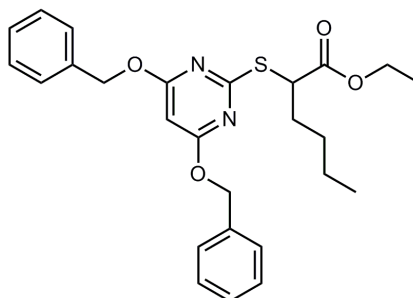
5.2.4 Charakterisierung der Zwischenstufen 41-55

Charakterisierung von Ethyl 2-[(4,6-bis(phenethoxy)pyrimidin-2-yl)thio]-2-phenylacetat 41 (MH40)



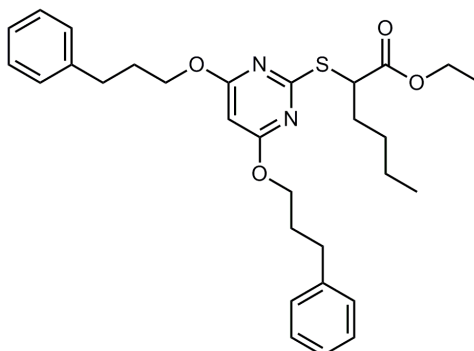
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.99-1.05 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 3.03-3.09 (t, 4H, J = 8.2 Hz, Ph-CH₂), 3.95-4.16 (m, 2H, O-CH₂), 4.44-4.58 (s, 1H, S-CH), 4.44-4.58 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 6.00 (s, 1H, Pyr-CH), 7.25-7.52 (m, 15H, Ph-H + Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 14.04 (Et-CH₃), 34.45 (2C, Ph-CH₂), 51.96 (S-CH), 59.70 (O-CH₂), 67.21 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.15 (Pyr-C₅), 126.34 (2C, Ph-C₄), 128.29 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.31 (Ph'-C₄), 128.54 (4C, Ph-C_{3/5}), 128.87 (2C, Ph'-C_{2/6}), 129.01 (2C, Ph'-C_{3/5}), 133.93 (Ph'-C₁), 137.83 (2C, Ph-C₁), 168.49 (Pyr-C₂), 169.69 (Pyr-C_{4/6}), 170.12 (COO-). **MS (ESI+):** *m/e* = 515.4 [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₀N₂O₄S [514.19])** C, H, N: ber. C: 70.01, H: 5.88, N: 5.44, gef. C: 69.89, H: 6.04, N: 5.61, Abw. C: 0.12, H: 0.16, N: 0.15.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(benzyloxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 42 (MH39)



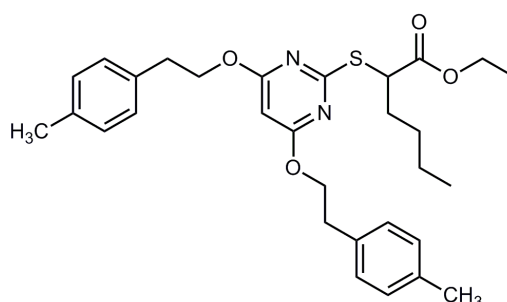
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.81-0.86 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.10-1.15 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.26-1.31 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.79-1.87 (m, 2H, n-Bu-CH₂), 4.06-4.13 (m, 2H, O-CH₂), 4.33-4.37 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 5.28-5.39 (m, 4H, Ph-CH₂-O), 6.08 (s, 1H, Pyr-CH), 7.30-7.42 (m, 10 H, Ph-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.64 (Bu-CH₃), 13.91 (Et-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 28.72 (Bu-CH₂), 30.65 (Bu-CH₂), 47.22 (S-CH), 60.98 (O-CH₂), 68.02 (2C, Ph-CH₂), 86.47 (Pyr-C₅), 127.87 (2C, Ph-C₄), 127.93 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.16 (4C, Ph-C_{3/5}), 136.45 (2C, Ph-C₁), 167.03 (Pyr-C₂), 170.06 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.47 (COO-). **MS (ESI+):** *m/e* = 467.4 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₆H₃₀N₂O₄S [466.19])** C, H, N: ber. C: 66.93, H: 6.48, N: 6.00, gef. C: 67.22, H: 6.37, N: 5.94, Abw. C: 0.29, H: 0.11, N: 0.06.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(3-phenylpropoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 43 (MH42)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-0.85 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.08-1.13 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.26-1.33 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.86-1.95 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.95-2.02 (m, 4H, C₂H₂), 2.65-2.70 (m, 4H, Ph-CH₂), 4.00-4.07 (m, 2H, O-CH₂), 4.17-4.31 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.93 (s, 1H, Pyr-CH), 7.14-7.29 (m, 10 H, Ph-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.63 (Et-CH₃), 13.91 (Bu-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 28.76 (Bu-CH₂), 29.65 (2C, C₂H₂), 30.69 (Bu-CH₂), 31.14 (2C, Ph-CH₂), 47.13 (S-CH), 60.87 (O-CH₂), 65.96 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.95 (Pyr-C₅), 125.83 (2C, Ph-C₄), 128.10 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.28 (4C, Ph-C_{3/5}), 141.07 (2C, Ph-C₁), 168.45 (Pyr-C₂), 170.23 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.31 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 523.5 [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₈N₂O₄S [522.26])** C, H, N: ber. C: 68.93, H: 7.33, N: 5.36, gef. C: 69.16, H: 7.30, N: 5.52, Abw. C: 0.23, H: 0.03, N: 0.16.

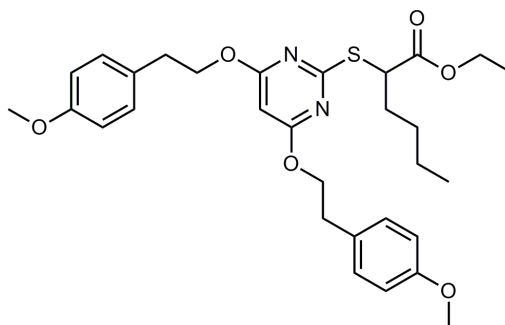
Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-methylphenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 48 (MH135)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.04-1.09 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.25-1.38 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.75-1.95 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.25 (s, 6H, Ph-CH₃), 2.90-2.95 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph-CH₂), 3.96-4.09 (m, 2H, O-CH₂), 4.31-4.44 (m, 5H, S-CH + Pyr-O-CH₂), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 7.07-7.16 (m, 8H, Ph-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.65 (Bu-CH₃), 13.86 (Et-CH₃), 20.60 (Ph-CH₃), 21.64 (Bu-CH₂), 28.82 (Bu-CH₂), 30.76 (Bu-CH₂), 34.05 (2C, Ph-CH₂), 47.14 (S-CH), 60.92 (O-CH₂), 67.25 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.01 (Pyr-C₅), 128.73 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.90 (4C, Ph-C_{3/5}), 134.66 (2C, Ph-C₁), 135.32 (2C, Ph-C₄), 168.53 (Pyr-C₂), 170.08 (2C, Pyr-C_{4/6}),

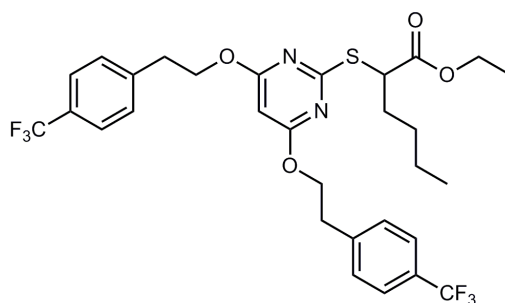
171.35 (COO⁻). **MS (ESI⁺):** $m/e = 523.5$ [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₈N₂O₄S [522.7])** C, H, N, S: ber. C: 68.93, H: 7.33, N: 5.36, S: 6.13, gef. C: 68.73, H: 7.31, N: 5.22, S: 6.38, Abw. C: 0.20, H: 0.02, N: 0.14, S: 0.25.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-methoxyphenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 44 (MH54)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.79$ -0.84 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.03-1.08 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.26-1.33 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.82-1.87 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.88-2.93 (t, 4H, J = 6.9 Hz, Ph-CH₂), 3.74 (s, 6H, Ph-O-CH₃), 3.96-4.12 (m, 2H, O-CH₂), 4.31-4.43 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 6.84-6.86 (d, 4H, J = 8.6 Hz, Ph-C_{3/5}), 7.16-7.19 (d, 4H, J = 8.6 Hz, Ph-C_{2/6}). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.82$ (Et-CH₃), 14.02 (Bu-CH₃), 21.59 (Bu-CH₂), 28.78 (Bu-CH₂), 30.73 (Bu-CH₂), 33.57 (2C, Ph-CH₂), 47.12 (S-CH), 54.95 (2C, Ph-O-CH₃), 59.68 (O-CH₂), 67.36 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.97 (Pyr-C₅), 113.76 (4C, Ph-C_{3/5}), 129.58 (2C, Ph-C1), 129.81 (4C, Ph-C_{2/6}), 157.86 (2C, Ph-C₄), 168.51 (Pyr-C₂), 170.27 (Pyr-C_{4/6}), 171.32 (COO⁻). **MS (ESI⁺):** $m/e = 555.4$ [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₈N₂O₆S [554.25])** C, H, N: ber. C: 64.96, H: 6.90, N: 5.05, gef. C: 65.16, H: 7.09, N: 4.86, Abw. C: 0.20, H: 0.19, N: 0.29.

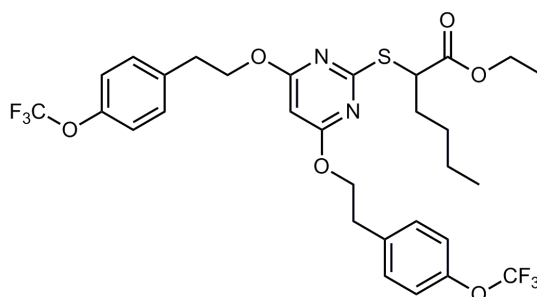
Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-(trifluoromethyl)phenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 49 (MH82)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.79$ -0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.02-1.06 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.29-1.40 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.84-1.92 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.07-3.11 (t, 4H, J = 6.6 Hz,

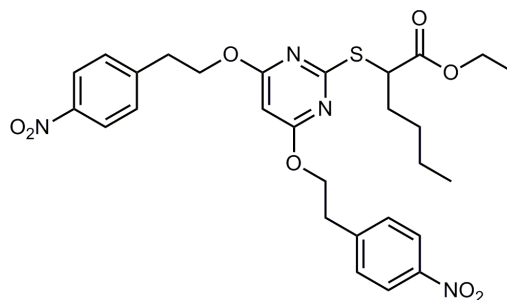
Ph-CH₂), 3.97-4.08 (m, 2H, O-CH₂), 4.29-4.35 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.47-4.53 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH), 7.49-7.52 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.63-7.66 (d, 4H, J = 8.1 Hz, Ph-C_{3/5}). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.60 (Bu-CH₃), 14.07 (Et-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 28.79 (Bu-CH₂), 30.64 (Bu-CH₂), 34.15 (2C, Ph-CH₂), 47.16 (S-CH), 60.88 (O-CH₂), 66.59 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.06 (Pyr-C₅), 125.11 (4C, Ph-C_{3/5}), 126.13-127.35 (2C, -CF₃), 129.71 (4C, Ph-C_{2/6}), 143.01 (2C, Ph-C₁), 168.59 (Pyr-C₂), 169.99 (Pyr-C_{4/6}), 171.31 (COO-). **MS (ESI+):** *m/e* = 631.6 [M+1]⁺, **Anal. (C₃₀H₃₂F₆N₂O₄S[630.20])** C, H, N, S: ber. C: 57.14, H: 5.11, N: 4.44, S: 5.03, gef. C: 57.12, H: 5.06, N: 4.45, S: 5.08, Abw. C: 0.02, H: 0.05, N: 0.01, S: 0.05.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-(trifluoromethoxy)phenethoxy)pyrimidin-2-yl]-thio}hexanoat 50 (MH96)



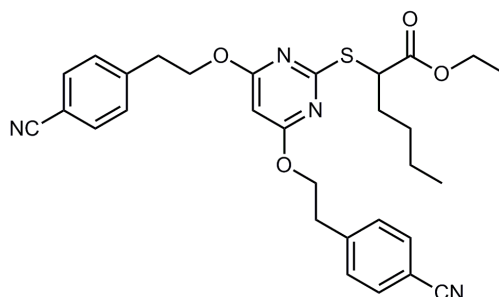
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.02-1.07 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.19-1.33 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.85-1.99 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.99-3.04 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-CH₂), 3.96-4.08 (m, 2H, O-CH₂), 4.30-4.35 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.40-4.48 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 5.90 (s, 1H, Pyr-CH), 7.26-7.29 (d, 4H, J = 7.9 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.38-7.43 (m, 4H, Ph-C_{3/5}). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.57 (Bu-CH₃), 13.76 (Et-CH₃), 21.59 (Bu-CH₂), 28.79 (Bu-CH₂), 30.70 (Bu-CH₂), 33.66 (2C, Ph-CH₂), 47.16 (S-CH), 60.87 (O-CH₂), 66.82 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.04 (Pyr-C₅), 120.88 (4C, Ph-C_{3/5}), 121.75 (2C, -CF₃), 130.69 (4C, Ph-C_{2/6}), 137.49 (2C, Ph-C₁), 146.96 (2C, Ph-C₄), 168.58 (Pyr-C₂), 170.02 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.33 (COO-). **MS (ESI+):** *m/e* = 663.6 [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₂F₆N₂O₆S [662.19])** C, H, N, S: ber. C: 54.38, H: 4.87, N: 4.23, S: 4.84, gef. C: 54.39, H: 5.00, N: 4.25, S: 5.09, Abw. C: 0.01, H: 0.13, N: 0.02, S: 0.25.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-nitrophenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 51 (MH55)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.04-1.09 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.22-1.34 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.76-1.89 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.12-3.16 (t, 4H, J = 6.5 Hz, Ph-CH₂), 3.96-4.05 (m, 2H, O-CH₂), 4.29-4.34 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.45-4.55 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 5.88 (s, 1H, Pyr-CH), 7.55-7.57 (d, 4H, J = 8.8 Hz, Ph-C_{2/6}), 8.13-8.17 (d, 4H, J = 8.8 Hz, Ph-C_{3/5}). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.85 (Bu-CH₃), 14.03 (Et-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 28.80 (Bu-CH₂), 30.67 (Bu-CH₂), 34.18 (2C, Ph-CH₂), 47.18 (S-CH), 60.92 (O-CH₂), 66.32 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.09 (Pyr-C₅), 123.33 (4C, Ph-C_{3/5}), 130.19 (4C, Ph-C_{2/6}), 146.25 (2C, Ph-C₁), 146.47 (2C, Ph-C₄), 168.59 (Pyr-C₂), 170.28 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.30 (COO⁻). **MS (ESI⁺):** *m/e* = 585.4 [M+1]⁺, **Anal. (C₂₈H₃₂N₄O₈S [584.19])** C, H, N: ber. C: 57.52, H: 5.52, N: 9.58, gef. C: 57.38, H: 5.53, N: 9.35, Abw. C: 0.14, H: 0.01, N: 0.23.

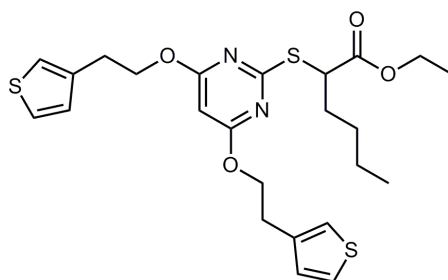
Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(4-cyanophenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 52 (MH102)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.04-1.09 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.20-1.39 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.75-1.89 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.06-3.11 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph-CH₂), 3.99-4.09 (m, 2H, O-CH₂), 4.26-4.31 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.44-4.51 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 7.47-7.50 (d, 4H, J = 8.2 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.74-7.78 (d, 4H, Ph-C_{3/5}). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.62 (Bu-CH₃), 13.85 (Et-CH₃), 21.61 (Bu-CH₂), 28.78 (Bu-CH₂), 30.68 (Bu-CH₂), 34.41 (2C, Ph-CH₂), 47.18 (S-CH), 60.91 (O-CH₂), 66.38 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.05 (Pyr-C₅), 109.28 (2C, Ph-C₄), 118-83 (2C, -CN), 129.99 (4C, Ph-C_{2/6}), 132.17 (4C, Ph-C_{3/5}),

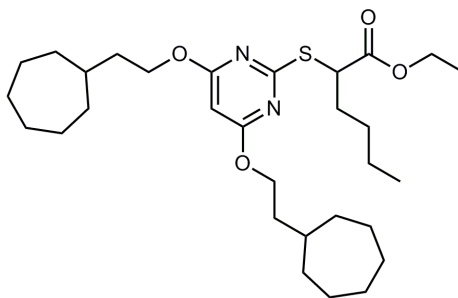
144.13 (2C, Ph-C₁), 168.59 (Pyr-C₂), 169.96 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.30 (COO-). **MS (ESI+):** $m/e = 545.5$ [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₂N₄O₄S [544.21])** C, H, N, S: ber. C: 66.15, H: 5.92, N: 10.29, S: 5.89, gef. C: 65.94, H: 6.21, N: 10.15, S: 5.77, Abw. C: 0.21, H: 0.29, N: 0.14, S: 0.12.

Charakterisierung von Ethyl 2-{{[4,6-bis(3-thiophenyl)pyrimidin-2-yl]thio}hexanoat 53 (MH136)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.80-0.85$ (t, 3H, J = 6.9 Hz, Bu-CH₃), 1.06-1.11 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.28-1.35 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.75-1.98 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.98-3.03 (t, 4H, J = 6.8 Hz, TP-CH₂), 3.99-4.10 (m, 2H, O-CH₂), 4.32-4.48 (m, 5H, S-CH + Pyr-O-CH₂), 5.94 (s, 1H, Pyr-CH), 7.05-7.07 (dd, 2H, J = 1.2; 4.9 Hz, TP-C₄H), 7.26-7.27 (dd, 2H, J = 1.0; 2.7 Hz, TP-C₂H), 7.46-7.47 (dd, 2H, J = 3.0; 4.9 Hz, TP-C₅H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.67$ (Bu-CH₃), 13.88 (Et-CH₃), 21.66 (Bu-CH₂), 28.82 (Bu-CH₂), 29.10 (2C, TP-CH₂), 30.72 (Bu-CH₂), 47.19 (S-CH), 60.94 (O-CH₂), 66.60 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.07 (Pyr-C₅), 121.87 (2C, TP-C₂), 125.93 (2C, TP-C₅), 128.52 (2C, TP-C₄), 138.02 (2C, TP-C₃), 168.56 (Pyr-C₂), 170.10 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.39 (COO-). **MS (ESI+):** $m/e = 507.5$ [M+1]⁺. **Anal. (C₂₄H₃₀N₂O₄S₃ [506.70])** C, H, N, S: ber. C: 56.89, H: 5.97, N: 5.53, S: 18.98, gef. C: 57.12, H: 5.84, N: 5.50, S: 18.89, Abw. C: 0.23, H: 0.13, N: 0.03, S: 0.12.

Charakterisierung von Ethyl 2-{{[4,6-bis(2-cycloheptylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio}hexanoat 46 (MH107)

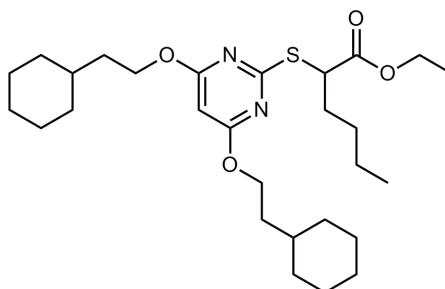


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.83-0.87$ (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 0.95-1.15 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.12-1.17 (t, 3H, Et-CH₃), 1.25-1.88 (m, 32H, Cyclohept-H + CH₂ + Bu-CH₂), 4.07-4.32 (m,

7H, -O-CH₂ + Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 13.66 (Bu-CH₃), 13.92 (Et-CH₃), 21.63 (Bu-CH₂), 24.45 (4C, Cyclohept-C_{4/5}), 24.66 (4C, Cyclohept-C_{3/6}), 28.48 (2C, Cyclohept-C₁), 28.83 (Bu-CH₂), 30.75 (Bu-CH₂), 32.13 (4C, Cyclohept-C_{2/7}), 35.18 (2C, Cyclohept-CH₂), 47.11 (S-CH), 60.91 (O-CH₂), 66.58 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.83 (Pyr-C₅), 168.38 (Pyr-C₂), 170.28 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.34 (COO⁻). MS (ESI⁺): *m/e* = 535.6 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(2-cyclohexylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat

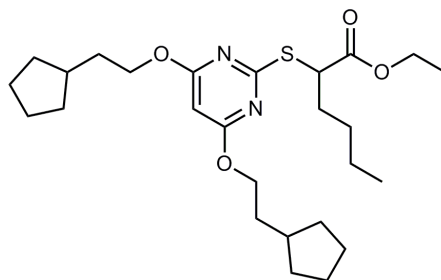
54 (MH47)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.83-0.87 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.12-1.17 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.20 (m, 2H, Cyclohex-H), 1.24-1.37 (m, 12H, Bu-CH₂ + Cyclohex-H + Cyclohex-CH₂), 1.51-1.71 (m, 16H, Cyclohex-H), 1.76-1.92 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.01-4.16 (m, 2H, O-CH₂), 4.20-4.37 (m, 5H, S-CH + Pyr-O-CH₂), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 13.63 (Bu-CH₃), 13.90 (Et-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 25.64 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 25.99 (2C, Cyclohex-C₄), 28.82 (Bu-CH₂), 30.83 (Bu-CH₂), 32.56 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.88 (2C, Cyclohex-C₁), 35.59 (2C, Cyclohex-CH₂), 47.05 (S-CH), 60.89 (O-CH₂), 64.74 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.87 (Pyr-C₅), 168.40 (Pyr-C₂), 170.26 (Pyr-C_{4/6}), 171.32 (COO⁻). MS (ESI⁺): *m/e* = 507.5 [M+1]⁺. Anal. (C₂₈H₄₆N₂O₄S [506.32]) C, H, N: ber. C: 66.37, H: 6.93, N: 5.53, gef. C: 66.51, H: 9.20, N: 5.48, Abw. C: 0.14, H: 0.05, N: 0.05.

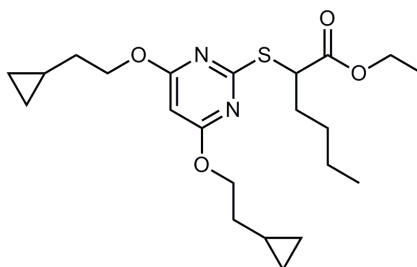
Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(2-cyclopentylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat

55 (MH98)

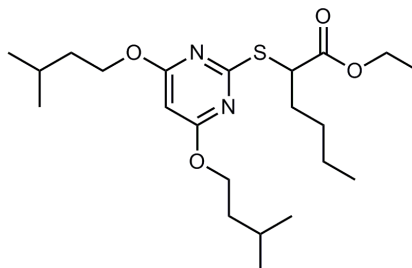


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.83-0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.11-1.18 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.17-1.47 (m, 8H, Bu-CH₂ + Cyclopent-H), 1.47-1.65 (m, 10H, Cyclopent-H), 1.65-1.98 (m, 10H, Bu-CH₂ + Cyclopent-H + CH₂), 4.07-4.13 (m, 2H, O-CH₂), 4.19-4.27 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 4.61-4.67 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 5.88 (s, 1H, Pyr-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.64 (Bu-CH₃), 13.91 (Et-CH₃), 21.62 (Bu-CH₂), 24.53 (4C, Cyclopent-C_{3/4}), 28.82 (Bu-CH₂), 30.81 (Bu-CH₂), 32.04 (4C, Cyclopent-C_{2/5}), 34.32 (2C, Cyclopent-CH₂), 36.24 (2C, Cyclopent-C₁), 47.06 (S-CH), 60.90 (O-CH₂), 66.10 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.91 (Pyr-C₅), 168.40 (Pyr-C₂), 170.23 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.31 (COO-). **MS (ESI +):** m/e = 479.5 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₆H₄₂N₂O₄S [478.29])** C, H, N, S: ber. C: 65.24, H: 8.84, N: 5.85, S: 6.70, gef. C: 65.32, H: 8.96, N: 5.73, S: 6.57, Abw. C: 0.08, H: 0.12, N: 0.12, S: 0.13.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(2-cyclopropylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat **56 (MH88)**

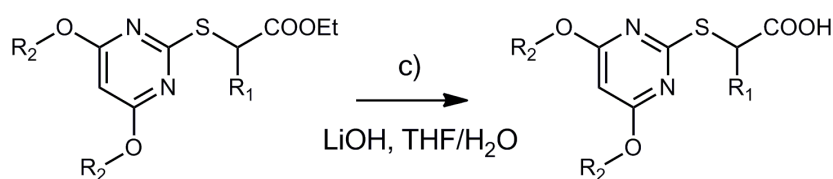


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.07-0.09 (m, 4H, Cycloprop-CH₂), 0.39-0.42 (m, 4H, Cyclopro-CH₂), 0.71-0.82 (m, 2H, Cycloprop-CH), 0.83-0.88 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.13-1.18 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.24-1.42 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.53-1.60 (q, 4H, J = 6.8 Hz, Cycloprop-CH₂), 1.75-1.94 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.08-4.14 (m, 2H, O-CH₂), 4.23-4.38 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 3.99 (4C, Cycloprop-C_{2/3}), 7.43 (2C, Cycloprop-C₁), 13.67 (Bu-CH₃), 13.95 (Et-CH₃), 21.65 (Bu-CH₂), 28.83 (Bu-CH₂), 30.77 (Bu-CH₂), 33.11 (2C, Cycloprop-CH₂), 47.13 (S-CH), 60.95 (O-CH₂), 66.74 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.92 (Pyr-C₅), 168.45 (Pyr-C₂), 170.25 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.38 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 423.3 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₂H₃₄N₂O₄S [422.22])** C, H, N, S: ber. C: 62.53, H: 8.11, N: 6.63, S: 7.59, gef. C: 62.69, H: 8.17, N: 6.68, S: 7.75, Abw. C: 0.16, H: 0.06, N: 0.05, S: 0.16.

Charakterisierung von Ethyl 2-[[4,6-bis(isopentyloxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoat 47**(MH91)**

¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.78-0.91 (m, 15H, Bu-CH₃ + Isopent-CH₃), 1.12-1.17 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.26-1.38 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.52-1.58 (q, 4H, J = 6.7 Hz, Isopent-CH₂), 1.62-1.77 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.79-1.95 (m, 2H, Isopent-CH), 4.02-4.16 (m, 2H, O-CH₂), 4.20-4.33 (m, 4H, Pyr-O-CH₂), 4.32-4.37 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.63 (Bu-CH₃), 13.91 (Et-CH₃), 21.62 (Bu-CH₂), 22.26 (4C, Isopent-C_{4/5}), 24.46 (2C, Isopent-C₃), 28.81 (Bu-CH₂), 30.76 (Bu-CH₂), 36.96 (2C, Isopent-C₂), 47.08 (S-CH), 60.89 (O-CH₂), 65.12 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.87 (Pyr-C₅), 168.42 (Pyr-C₂), 170.24 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.33 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 427.3 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₂H₃₈N₂O₄S [426.26])** C, H, N, S: ber. C: 61.94, H: 8.98, N: 6.57, S: 7.52, gef. C: 62.28, H: 9.26, N: 6.48, S: 7.55, Abw. C: 0.34, H: 0.28, N: 0.09, S: 0.03.

5.2.5 Arbeitsvorschrift zur Verseifung der Estergruppe



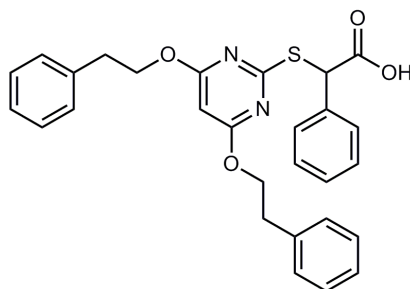
Die Verbindungen **41-55** werden in 5 ml THF und 10 ml MeOH gelöst. Dazu wird eine Lösung aus $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in 3 ml H_2O tropfenweise zugegeben. Die Lösung wird bei 50°C gerührt, bis sich der Ester vollkommen zur Säure umgesetzt hat (DC-Kontrolle, Reaktionsdauer 2-24 h). Nach Evaporation des Lösungsmittels wird der Rückstand in Wasser gelöst (unter Erhitzen; falls nötig unter Zugabe von kleinen Mengen Methanol) und mit 2N HCl bis zum Ausfall der freien Säure angesäuert. Der Niederschlag wird abfiltriert und jeweils mit Wasser und *n*-Hexan gewaschen. Ist der Niederschlag ölig, so wird die wässrige Phase noch einmal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Aufreinigung findet mittels Säulenchromatographie oder Umkristallisation aus *n*-Hexan/ Ethylacetat statt.

Tabelle 15 Synthesebedingungen

Substanz	E		LiOH·H ₂ O Menge in g (mmol)	Reaktions- dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)			in %	in g	
5 (MH43)	41	0.20 (0.4)	0.08 (1.9)	5	80.2	0.77	Weißer Feststoff
8 (MH41)	42	0.50 (1.0)	0.45 (10.7)	17	20.0	0.10	Farbloses Öl
9 (MH44)	43	1.02 (1.9)	0.40 (9.6)	7	68.4	0.13	Weißer Feststoff
11 (MH137)	48	0.70 (1.3)	0.28 (5.7)	4	98.1	0.65	Weißer Feststoff
12 (MH56)	44	0.40 (0.7)	0.17 (3.6)	5	89.4	0.34	Farbloses Öl
13 (MH84)	49	0.40 (0.6)	0.13 (3.2)	24	92.2	0.35	Gelbes Öl
14 (MH99)	50	0.86 (1.3)	0.27 (6.5)	2	97.0	0.80	Farbloses Öl
15 (MH60)	51	0.35 (0.6)	0.12 (3.0)	20	64.3	0.21	Gelber Feststoff
16 (MH104)	52	0.50 (0.9)	0.19 (4.6)	3	74.0	0.30	Weißer Feststoff
17 (MH138)	53	0.29 (0.6)	0.12 (2.9)	1.5	88.0	0.24	Farbloses Öl
18 (MH111)	45	0.40 (0.7)	0.15 (3.7)	2	54.7	0.21	Farbloses Öl
19 (MH49)	46	0.44 (0.9)	0.18 (4.3)	4	84.1	0.35	Farbloses Öl
20 (MH100)	54	0.50 (1.0)	0.22 (5.2)	3	74.5	0.35	Farbloses Öl
21 (MH92)	55	0.40 (0.9)	0.19 (4.7)	6	74.3	0.28	Gelbes Öl
22 (MH93)	47	0.55 (1.3)	0.27 (6.5)	8	76.4	0.39	Farbloses Öl

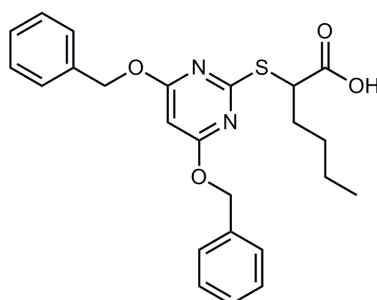
5.2.6 Charakterisierung der Thiobarbitursäure-Derivate 5, 8-9, 11-22

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(phenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]-2-phenyllessigsäure 5 (MH43)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 2.96-3.01 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-CH₂), 4.45-4.50 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Pyr-O-CH₂), 5.47 (s, 1H, S-CH), 5.89 (s, 1H, Pyr-CH), 7.17-7.48 (m, 15H, Ph-H + Ph'-H), 12.9 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 34.45 (2C, Ph-CH₂), 52.40 (S-CH), 67.18 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.08 (Pyr-CH₅), 126.30 (2C, Ph-C₄), 128.30 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.30 (Ph'-C₄), 128.34 (4C, Ph-C_{3/5}), 128.82 (2C, Ph'-C_{3/5}), 128.85 (2C, Ph'-C_{2/6}), 134.89 (Ph'-C₁), 137.95 (Ph-C₁), 168.79 (Pyr-C₂), 170.08 (2C, Pyr-C_{4/6}), 170.97 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 487.4 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₈H₂₆N₂O₄S [486.16])** C, H, N: ber. C: 69.11, H: 5.39, N: 5.76, gef. C: 68.90, H: 5.49, N: 5.73, Abw. C: 0.21, H: 0.10, N: 0.03.

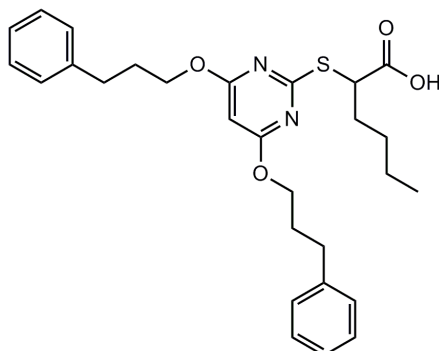
Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(benzyloxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 8 (MH41)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.81-0.86 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.10-1.15 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.26-1.31 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.79-1.87 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.06-4.13 (m, 2H, O-CH₂), 4.33-4.37 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 5.28-5.39 (m, 4H, Ph-CH₂), 6.08 (s, 1H, Pyr-CH), 7.30-7.42 (m, 10 H, Ph-CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.69 (Bu-CH₃), 20.71 (Bu-CH₂), 28.82 (Bu-CH₂), 30.80 (Bu-CH₂), 47.55 (S-CH), 59.70 (2C, Ph-CH₂), 86.35 (Pyr-C₅), 128.00 (2C, Ph-C₄), 128.19 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.41 (4C, Ph-C_{3/5}), 136.19 (2C, Ph-C₁), 168.95 (Pyr-C₂), 170.02 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.80 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 439.2 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₄H₂₆N₂O₄S [438.16])** C, H, N: ber. C: 65.73, H: 5.98, N: 6.39, gef. C: 65.88, H: 6.01, N: 6.52, Abw. C: 0.15, H: 0.03, N: 0.13.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(3-phenylpropoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 9

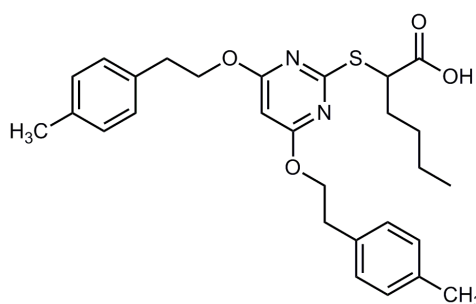
(MH44)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-0.86 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.23-1.35 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.72-1.87 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.94-2.02 (m, 4H, C₂H₂), 2.64-2.70 (m, 4H, Ph-CH₂), 4.22-4.27 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.91 (s, 1H, Pyr-CH), 7.14-7.30 (m, 10H, Ph-H), 12.77 (s/br, 1H, COOH).
¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 13.91 (Bu-CH₃), 21.60 (Bu-CH₂), 28.85 (Bu-CH₂), 29.46 (2C, C₂H₂), 30.93 (Bu-CH₂), 31.43 (2C, Ph-CH₂), 47.43 (S-CH), 66.00 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.84 (Pyr-C₅), 125.80 (2C, Ph-C₁), 128.11 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.27 (4C, Ph-C_{3/5}), 141.21 (2C, Ph-C₁), 167.19 (Pyr-C₂), 170.20 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.79 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 495.2 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₈H₃₄N₂O₄S [494.22])** C, H, N: ber. C: 67.99, H: 6.93, N: 5.66, gef. C: 67.76, H: 7.04, N: 5.42, Abw. C: 0.23, H: 0.11, N: 0.24.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(4-methylphenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 11

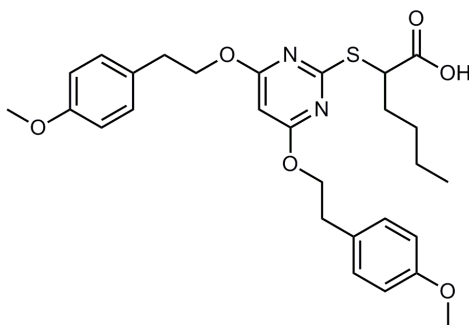
(MH137)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.26-1.37 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.79-1.88 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.25 (s, 6H, Ph-CH₃), 2.90-2.95 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph-CH₂), 4.26-4.31 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.39-4.44 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Pyr-O-CH₂), 5.86 (s, 1H, Pyr-CH), 7.07-7.19 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C_{3/5}), 7.13-7.16 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C_{2/6}), 12.83 (s/br, 1H, COOH).
¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 13.69 (Bu-CH₃), 20.59 (2C, Ph-CH₃), 21.70 (Bu-CH₂), 28.92 (Bu-CH₂), 30.98 (Bu-CH₂), 34.03 (2C, Ph-CH₂), 47.40 (S-CH), 67.20 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.89 (Pyr-C₅), 128.71 (4C, Ph-C_{2/6}), 128.88 (4C, Ph-C_{3/5}), 134.71 (2C, Ph-C₁), 135.27 (2C, Ph-C₄), 168.85 (Pyr-

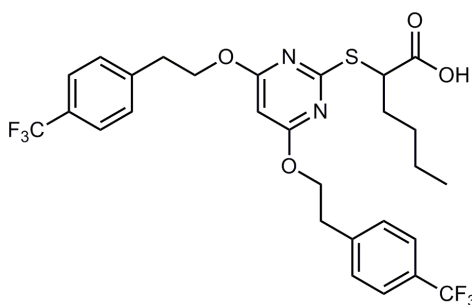
C₂), 170.05 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.72 (COOH). **MS (ESI-):** $m/e = 493.6$ [M-1]⁻. **Anal.** (C₂₈H₃₄N₂O₄S [494.22]) C, H, N: ber. C: 67.99, H: 6.93, N: 5.66, S: 6.48, gef. C: 67.78, H: 7.15, N: 5.51, S: 6.78, Abw. C: 0.21, H: 0.22, N: 0.15, S: 0.30.

Charakterisierung von 2-{{4,6-Bis(4-methoxyphenethoxy)pyrimidin-2-yl}thio}hexansäure 12 (MH56)



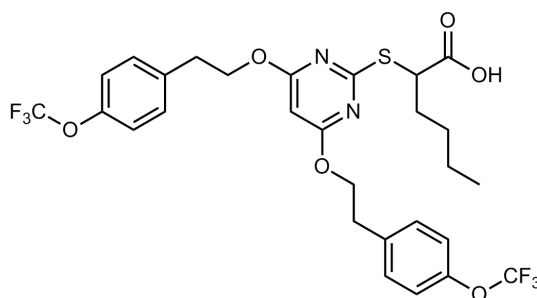
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.79-0.84$ (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, Bu-CH₃), 1.25-1.33 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.79-1.97 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.88-2.93 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz, Ph-CH₂), 3.70 (s, 6H, Ph-O-CH₃), 4.26-4.30 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, S-CH), 4.38-4.43 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz, Pyr-O-CH₂), 5.86 (s, 1H, Pyr-CH), 6.82-8.76 (d, 4H, $J = 8.6$ Hz, Ph-C_{3/5}), 7.15-7.19 (d, 4H, $J = 8.6$ Hz, Ph-C_{2/6}), 12.3 (s/br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.66$ (Bu-CH₃), 20.70 (Bu-CH₂), 28.91 (Bu-CH₂), 30.99 (Bu-CH₂), 33.58 (2C, Ph-CH₂), 47.41 (S-CH), 54.95 (2C, Ph-O-CH₃), 67.34 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.88 (Pyr-C₅), 113.76 (4C, Ph-C_{3/5}), 129.66 (2C, Ph-C₁), 129.81 (4C, Ph-C_{2/6}), 157.84 (2C, Ph-C₄), 168.87 (Pyr-C₂), 170.08 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.70 (COOH). **MS (ESI-):** $m/e = 525.4$ [M-1]⁻. **Anal.** (C₂₈H₃₄N₂O₆S [526.21]) C, H, N: ber. C: 63.86, H: 6.51, N: 5.32, gef. C: 63.72, H: 6.78, N: 5.06, Abw. C: 0.14, H: 0.27, N: 0.24.

Charakterisierung von 2-{{4,6-Bis(4-(trifluoromethyl)phenethoxy)pyrimidin-2-yl}thio}-hexansäure 13 (MH84)



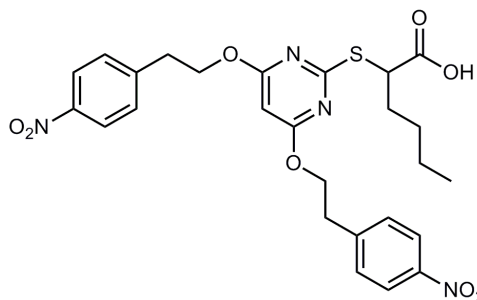
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.22-1.37 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.74-1.92 (m, 2H, Bu- CH_2), 3.06-3.11 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph- CH_2), 4.27-4.30 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.48-4.53 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Pyr-O- CH_2), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 7.49-7.52 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 7.63-7.66 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 12.82 (s/ br, 1H, COOH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.64 (Bu- CH_3), 21.67 (Bu- CH_2), 28.92 (Bu- CH_2), 30.91 (Bu- CH_2), 34.16 (2C, Ph- CH_2), 47.46 (S-CH), 66.54 (2C, Pyr-O- CH_2), 85.97 (Pyr- C_5), 124.99 (4C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 125.14-127.74 (2C, - CF_3), 129.69 (4C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 143.06 (2C, Ph- C_1), 168.95 (Pyr- C_2), 169.97 (2C, Pyr- $\text{C}_{4/6}$), 172.23 (COOH). **MS (ESI-):** m/e = 601.4 [M-1], **Anal. ($\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ [602.17])** C, H, N, S: ber. C: 55.81, H: 4.68, N: 4.65, S: 5.32, gef. C: 56.10, H: 4.86, N: 4.40, S: 5.40, Abw. C: 0.29, H: 0.18, N: 0.25, S: 0.08.

Charakterisierung von 2-{{4,6-Bis(4-(trifluoromethoxy)phenethoxy)pyrimidin-2-yl}thio}-hexansäure 14 (MH99)



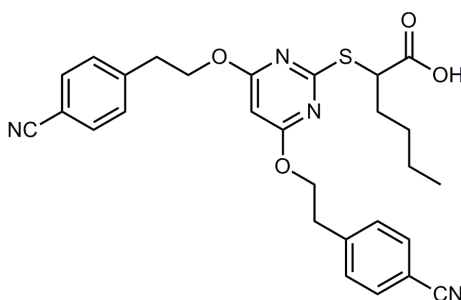
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.85 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.23-1.35 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.85-1.97 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.99-3.04 (t, 4H, J = 6.7 Hz, Ph- CH_2), 4.25-4.30 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.45-4.50 (t, 4H, J = 6.7 Hz, Pyr-O- CH_2), 5.88 (s, 1H, Pyr-CH), 7.26-7.29 (d, 4H, J = 7.9 Hz, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 7.38-7.41 (m, 4H, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 12.80 (s/ br, 1H, COOH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.63 (Bu- CH_3), 21.67 (Bu- CH_2), 28.91 (Bu- CH_2), 30.92 (Bu- CH_2), 33.66 (2C, Ph- CH_2), 47.43 (S-CH), 66.79 (2C, Pyr-O- CH_2), 85.96 (Pyr- C_5), 114.97+121.75 (2C, - CF_3), 120.86 (4C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 130.67 (4C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 137.56 (2C, Ph- C_1), 146.91 (2C, Ph- C_4), 168.92 (Pyr- C_2), 170.01 (2C, Pyr- $\text{C}_{4/6}$), 172.73 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 635.5 [M+1]⁺. **Anal. ($\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ [634.16])** C, H, N, S: ber. C: 53.00, H: 4.45, N: 4.41, S: 5.05, gef. C: 53.20, H: 4.50, N: 4.30, S: 5.31, Abw. C: 0.20, H: 0.05, N: 0.11, S: 0.26.

Charakterisierung von 2-{{4,6-Bis(4-nitrophenethoxy)pyrimidin-2-yl}thio}hexansäure 15 (MH60)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.22-1.36 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.79-1.89 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.11-3.15 (t, 4H, J = 6.4 Hz, Ph-CH₂), 4.23-4.28 (t, 4H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.50-4.55 (t, 4H, J = 6.4 Hz, Pyr-O-CH₂), 5.86 (s, 1H, Pyr-CH), 7.54-7.57 (d, 4H, J = 8.6 Hz, Ph-C_{2/6}), 8.13-8.16 (d, 4H, J = 8.6 Hz, Ph-C_{3/5}), 12.81 (s/br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.70 (Bu-CH₃), 21.72 (Bu-CH₂), 28.69 (Bu-CH₂), 30.85 (Bu-CH₂), 34.17 (2C, Ph-CH₂), 47.56 (S-CH), 66.32 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.99 (Pyr-C₅), 123.37 (4C, Ph-C_{3/5}), 130.21 (4C, Ph-C_{2/6}), 146.21 (2C, Ph-C₁), 146.55 (2C, Ph-C₄), 169.00 (Pyr-C₂), 169.92 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.79 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 557.4 [M+1]⁺. **Anal. (C₂₆H₂₈N₄O₈S [556.16])** C, H, N: ber. C: 56.11, H: 5.07, N: 10.07, S: 5.76, gef. C: 56.44, H: 5.36, N: 9.68, S: 5.82, Abw. C: 0.33, H: 0.29, N: 0.39, S: 0.11.

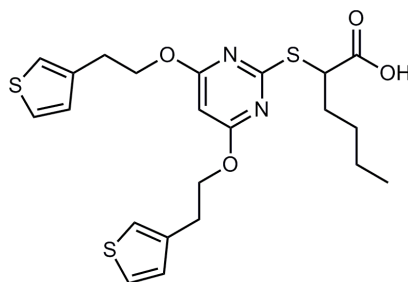
Charakterisierung von 2-{{4,6-Bis(4-cyanophenethoxy)pyrimidin-2-yl}thio}hexansäure 16 (MH104)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.21-1.40 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.72-1.92 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.06-3.10 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph-CH₂), 4.24-4.28 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.48-4.52 (t, 4H, J = 6.5 Hz, Pyr-O-CH₂), 5.85 (s, 1H, Pyr-CH), 7.47-7.50 (d, 4H, J = 8.2 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.74-7.81 (d, 4H, J = 8.2 Hz, Ph-C_{3/5}), 12.80 (s/br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.67 (Bu-CH₃), 21.68 (Bu-CH₂), 28.90 (Bu-CH₂), 30.84 (Bu-CH₂), 34.42 (2C, Ph-CH₂), 47.46 (S-CH), 66.36 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.96 (Pyr-C₅), 109.25 (2C, Ph-C₄), 118-85 (2C, -CN), 129.98 (4C, Ph-C_{2/6}), 132.16 (4C, Ph-C_{3/5}), 144.19 (2C, Ph-C₁), 168.96 (Pyr-C₂), 169.94 (2C, Pyr-

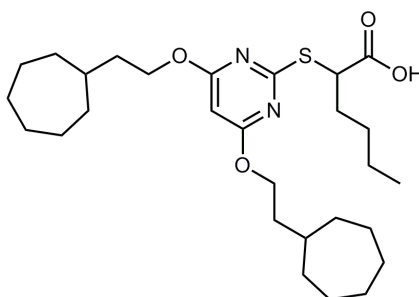
$C_{4/6}$), 172.73 (COOH). **MS (ESI+):** $m/e = 517.4 [M+1]^+$. **Anal. (C₃₀H₃₂N₄O₄S [516.18])** C, H, N, S: ber. C: 65.10, H: 5.46, N: 10.85, S: 6.21, gef. C: 64.82, H: 5.46, N: 10.67, S: 6.50, Abw. C: 0.28, H: 0.00, N: 0.18, S: 0.29.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(3-thiophenyl)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 17 (MH138)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.80-0.85$ (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, Bu-CH₃), 1.24-1.38 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.77-1.89 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.98-3.02 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, TP-CH₂), 4.26-4.29 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, S-CH), 4.43-4.48 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, Pyr-O-CH₂), 5.92 (s, 1H, Pyr-CH), 7.05-7.07 (dd, 2H, $J = 1.1$; 4.9 Hz, TP-C₄H), 7.26-7.27 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz, TP-C₂H), 7.45-7.47 (dd, 2H, $J = 2.9$; 4.9 Hz, TP-C₅H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.67$ (Bu-CH₃), 21.66 (Bu-CH₂), 28.82 (Bu-CH₂), 29.10 (2C, TP-CH₂), 30.72 (Bu-CH₂), 47.19 (S-CH), 66.60 (2C, Pyr-O-CH₂), 86.07 (Pyr-C₅), 121.87 (2C, TP-C₂), 125.93 (2C, TP-C₅), 128.52 (2C, TP-C₄), 138.02 (2C, TP-C₃), 168.56 (Pyr-C₂), 170.10 (2C, Pyr-C_{4/6}), 171.39 (COOH). **MS (ESI-):** $m/e = 477.5 [M-1]^-$. **Anal. (C₂₂H₂₆N₂O₄S₃ [478.11])** C, H, N: ber. C: 55.20, H: 5.48, N: 5.85, S: 20.10, gef. C: 55.48, H: 7.15, N: 5.53, S: 19.81, Abw. C: 0.28, H: 0.05, N: 0.13, S: 0.29.

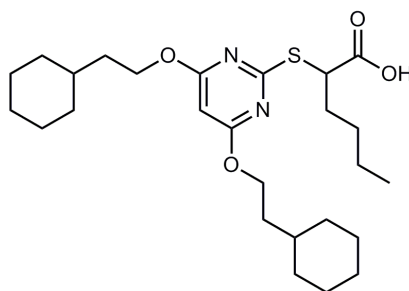
Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(2-cycloheptylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 18 (MH111)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.83-0.87$ (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, Bu-CH₃), 0.95-1.15 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.25-1.88 (m, 32H, Cyclohept-H + -CH₂ + Bu-CH₂), 4.19-4.29 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 12.79 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.71$ (Bu-CH₃), 21.72 (Bu-CH₂), 24.46 (4C, Cyclohept-C_{4/5}), 24.60 (4C, Cyclohept-C_{3/6}), 28.49 (2C, Cyclohept-

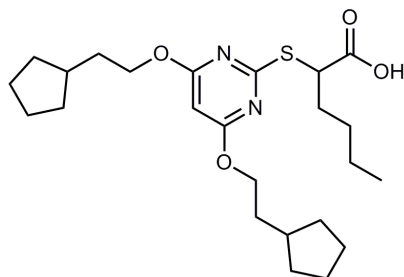
C₁), 28.94 (Bu-CH₂), 30.99 (Bu-CH₂), 32.13 (4C, Cyclohept-C_{2/7}), 35.19 (2C, Cyclohept-CH₂), 47.42 (S-CH), 66.61 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.72 (Pyr-C₅), 168.75 (Pyr-C₂), 170.24 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.74 (COOH). **MS (ESI+):** $m/e = 507.5$ [M+1]⁺. **Anal.** (C₂₈H₄₆N₂O₄S [506.32]) C, H, N: ber. C: 66.37, H: 9.15, N: 5.53, gef. C: 66.25, H: 9.30, N: 5.35, Abw. C: 0.12, H: 0.15, N: 0.18.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(2-cyclohexylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 19 (MH49)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.82-0.87$ (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.04-1.40 (m, 14H, Cyclohex-H + -CH₂, Bu-CH₂), 1.52-1.77 (m, 16H, Cyclohex-H), 1.77-1.94 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.21-4.33 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 12.4 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.63$ (Bu-CH₃), 21.99 (Bu-CH₂), 24.74 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 25.65 (2C, Cyclohex-C₄), 28.94 (Bu-CH₂), 30.89 (Bu-CH₂), 31.07 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 32.60 (2C, Cyclohex-C₁), 35.61 (2C, Cyclohex-CH₂), 47.36 (S-CH), 64.48 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.76 (Pyr-C₅), 167.12 (Pyr-C₂), 170.23 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.69 (COOH). **MS (ESI-):** $m/e = 477.6$ [M-1]⁻. **Anal.** (C₂₆H₄₂N₂O₄S [478.29]) C, H, N: ber. C: 65.24, H: 8.84, N: 5.85, gef. C: 65.08, H: 8.93, N: 5.74, Abw. C: 0.16, H: 0.09, N: 0.11.

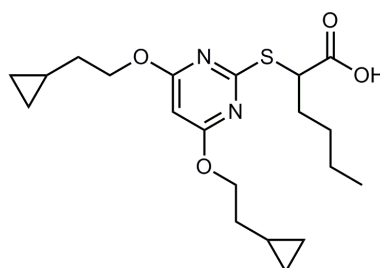
Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(2-cyclopentylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 20 (MH100)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.83-0.88$ (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.05-1.45 (m, 8H, Bu-CH₂ + Cyclopent-H), 1.46-1.86 (m, 20H, Bu-CH₂ + Cyclopent-H + CH₂), 4.21-4.31 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.86 (s, 1H, Pyr-CH), 12.76 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ

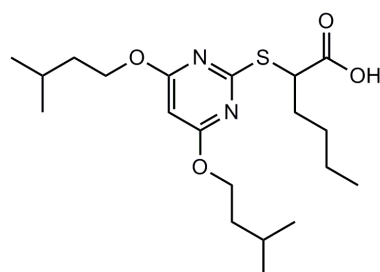
= 13.68 (Bu-CH₃), 21.71 (Bu-CH₂), 24.54 (4C, Cyclopent-C_{3/4}), 28.93 (Bu-CH₂), 31.82 (Bu-CH₂), 32.04 (4C, Cyclopent-C_{2/5}), 34.33 (2C, Cyclopent-CH₂), 36.25 (2C, Cyclopent-C₁), 47.36 (S-CH), 66.10 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.79 (Pyr-C₅), 168.76 (Pyr-C₂), 170.20 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.71 (COOH). **MS (ESI+):** $m/e = 451.5 [M+1]^+$. **Anal. (C₂₄H₃₈N₂O₄S [450.26])** C, H, N, S: ber. C: 63.97, H: 8.50, N: 6.22, S: 7.12, gef. C: 64.18, H: 8.44, N: 6.08, S: 7.17, Abw. C: 0.21, H: 0.06, N: 0.14, S: 0.05.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(2-cyclopropylethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 21 (MH92)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.06-0.11$ (m, 4H, Cycloprop-CH₂), 0.37-0.43 (m, 4H, Cyclopro-CH₂), 0.70-0.78 (m, 2H, Cycloprop-CH), 0.80-0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, Bu-CH₃), 1.22-1.46 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.53-1.60 (q, 4H, $J = 6.8$ Hz, Cycloprop-CH₂), 1.75-1.95 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.25-4.32 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.88 (s, 1H, Pyr-CH), 12.79 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 3.97$ (4C, Cycloprop-C_{2/3}), 7.42 (2C, Cycloprop-C₁), 13.70 (Bu-CH₃), 21.70 (Bu-CH₂), 28.92 (Bu-CH₂), 30.99 (Bu-CH₂), 33.10 (2, Cycloprop-CH₂), 47.39 (S-CH), 66.71 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.79 (Pyr-C₅), 168.78 (Pyr-C₂), 170.21 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.73 (COOH). **MS (ESI+):** $m/e = 423.3 [M+1]^+$, **Anal. (C₂₀H₃₀N₂O₄S [422.22])** C, H, N, S: ber. C: 60.89, H: 7.66, N: 7.10, S: 8.13, gef. C: 61.13, H: 7.82, N: 6.98, S: 8.10, Abw. C: 0.24, H: 0.16, N: 0.12, S: 0.03.

Charakterisierung von 2-[[4,6-Bis(isopentyloxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexansäure 22 (MH93)

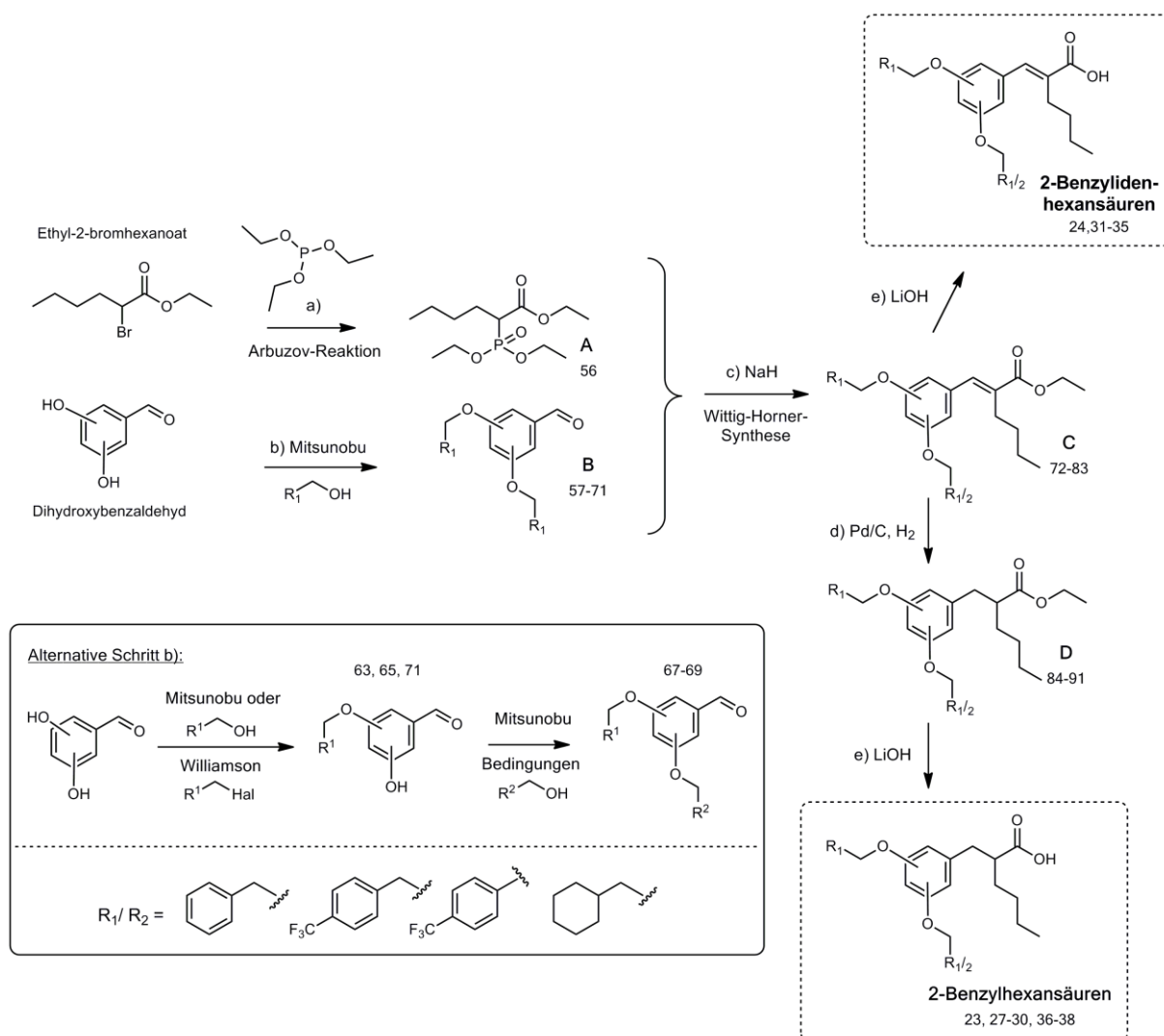


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.83-0.91$ (m, 15H, Bu-CH₃ + Isopent-CH₃), 1.21-1.43 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.51-1.56 (q, 4H, $J = 6.7$ Hz, Isopent-CH₂), 1.58-1.71 (m, 2H, Isopent-CH), 1.71-1.97 (m, 2H, Bu-CH₂), 4.20-4.31 (m, 5H, Pyr-O-CH₂ + S-CH), 5.87 (s, 1H, Pyr-CH), 12.73 (s/ br, 1H,

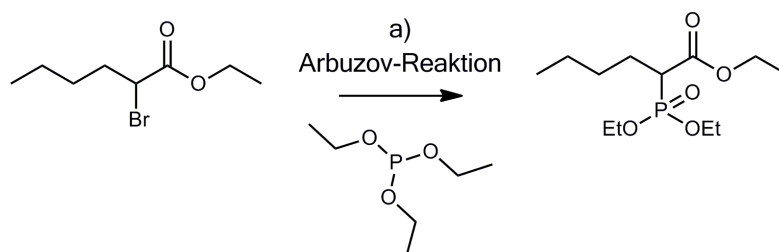
COOH). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 13.68$ (Bu-CH₃), 21.70 (Bu-CH₂), 22.27 (4C, Isopent-C_{4/5}), 24.48 (2C, Isopent-C₃), 28.92 (Bu-CH₂), 30.97 (Bu-CH₂), 36.97 (2C, Isopent-C₂), 47.38 (S-CH), 65.14 (2C, Pyr-O-CH₂), 85.76 (Pyr-C₅), 168.78 (Pyr-C₂), 170.21 (2C, Pyr-C_{4/6}), 172.73 (COOH). MS (ESI-): $m/e = 397.3$ [M-1]⁻. Anal. (C₂₀H₃₄N₂O₄S [398.22]) C, H, N, S: ber. C: 60.27, H: 8.60, N: 7.03, S: 8.05, gef. C: 60.60, H: 8.97, N: 6.82, S: 7.66, Abw. C: 0.33, H: 0.37, N: 0.21, S: 0.39.

5.3 Synthese und Charakterisierung der substiierten 2-Benzyl- und 2-Benzylidenhexansäuren

Syntheschema:



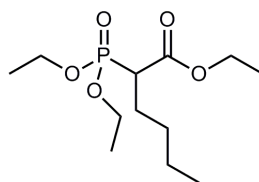
5.3.1 Arbeitsvorschrift zur *Arbuzov-Reaktion*



Zur Synthese von Ethyl 2-(diethoxyphosphoryl)hexanoat werden Triethylphosphit (18.2 g, 109 mmol) und α -Brom-Ethylhexanoat (12.2 g, 54.7 mmol; beide Edukte sind flüssig) zusammen gelöst und über Nacht bei 120°C gerührt. Darauf wird die Mischung destilliert. Als erstes wird dabei entstehendes Ethylbromid bei 40°C entfernt, das Produkt wird unter Vakuumdestillation (0.5 mbar) bei 100°C gewonnen. Produkt: farbloses Öl, Ausbeute: 6.5 g (42.4%).

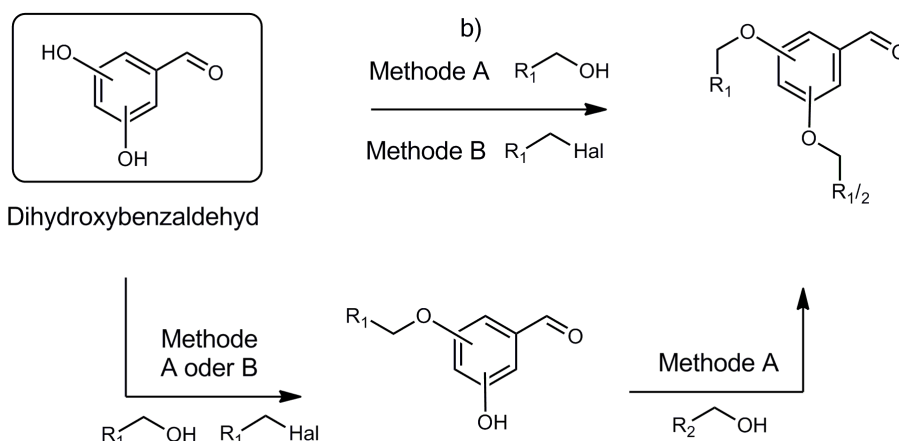
5.3.2 Charakterisierung von Zwischenstufe 56

Charakterisierung von Ethyl 2-(diethoxyphosphoryl)hexanoat 56 (MH89)



$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.81-0.85 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.15-1.24 (m, 13H, Et- CH_3 + Bu- CH_2), 1.61-1.82 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.91-3.04 (m, 1H, CH-COO-), 3.94-4.16 (m, 6H, O- CH_2). **MS (ESI+)**: m/e = 281.1 $[\text{M}+1]^+$.

5.3.3 Arbeitsvorschrift zur Synthese von Dialkoxybenzaldehyden



Die Dialkoxybenzaldehyd-Vorstufen **57-71** wurden durch Veretherung kommerziell erhältlicher Dihydroxybenzaldehyde (DHB) hergestellt. Verbindungen, die zwei gleiche lipophile Reste tragen, wurden in einem Schritt synthetisiert. Die Einführung von zwei verschiedenen Resten wurde in zwei nachfolgenden Ether-Synthesen dargestellt. Methodisch wurden sowohl die *Mitsunobu*-Synthese (Methoda A) als auch eine *Williamson*-artige Ether-Synthese (Methode B) verwendet.

Methode A

Die Einführung eines oder zweier gleicher lipophiler Reste wurde mittels *Mitsunobu*-Reaktion durchgeführt. Dabei wird das jeweilige Dihydroxy- oder Alkoxy-Hydroxybenzaldehyd (**65**, **66**, **71**; 1 eq), der jeweilige Alkohol (1.05 oder 2.1 eq) und Triphenylphosphin (1.2 oder 2.5 eq) zusammen in einem Dreihalskolben in wasserfreiem THF gelöst. Nach Erzeugen einer Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wird Diethylazodicarboxylat (DEAD, 1.2 oder 2.5 eq; in 5 ml THF gelöst; als Alternative kann auch ADDP (1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin) verwendet werden) tropfenweise über ein Septum zugegeben und die resultierende Lösung für 1-36 Stunden bis zum Verbrauch der Edukte gerührt. Im Anschluss wird THF evaporiert und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase) aufgereinigt.

Tabelle 16 Synthesebedingungen

Sub-Stanz	E ₁		E ₂ ¹ Menge in g (mmol)	TPP Menge in g (mmol)	DEAD Menge in g (mmol)	Reaktions-dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)					in %	in g	
57 (MH79)	3,5-DHB	0.9 (6.3)	1.5 (12.7)	3.7 (13.9)	3.4 ² (13.9)	36	54.7	1.20	Farbloses Öl
58 (MH63)	2,3-DHB	1.0 (7.2)	1.8 (14.5)	4.7 (18.1)	3.1 (18.1)	23	37.0	0.93	Braunes Öl
59 (MH57)	3,4-DHB	1.0 (7.2)	1.8 (14.5)	4.7 (18.1)	3.1 (18.1)	1.5	68.1	1.71	Farbloses Öl

Sub-Stanz	E ₁		E ₂ ¹ Menge in g (mmol)	TPP Menge in g (mmol)	DEAD Menge in g (mmol)	Reaktions-Dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)					in %	in g	
60 (MH58)	2,4-DHB	1.0 (7.2)	1.8 (14.5)	4.7 (18.1)	3.1 (18.1)	24	67.3	1.69	Weißer Feststoff
61 (MH61)	2,5-DHB	1.0 (7.2)	1.8 (14.5)	4.7 (18.1)	3.6 ^{2,3} (14.5)	24	56.0	1.40	Gelbes Öl
62 (MH157)	2,5-DHB	0.5 (3.9)	1.1 (8.7)	2.6 (9.9)	2.5 ² (9.9)	8	65.5	0.93	Weißer Feststoff
63 (MH160)	2,5-DHB	0.4 (2.7)	1.1 (5.9)	1.7 (6.7)	1.7 (6.7)	20	54.2	0.70	Farbloses Öl
64 (MH90)	3,4-DHB	1.0 (7.2)	0.9 (7.2)	2.4 (9.0)	1.6 (9.0)	3	13.0	0.38	Farbloses Öl
65 (MH97)	3,4-DHB	1.0 (7.2)	0.9 (7.2)	2.4 (9.0)	1.6 (9.0)	3	44.8	0.80	Farbloses Öl
66 (MH117)	3,4-DHB	1.5 (10.9)	1.3 (10.9)	3.4 (13.0)	2.3 (13.0)	1.5	57.8	1.52	Farbloses Öl
67 (MH159)	71	0.3 (0.9)	0.1 (1.0)	0.3 (1.1)	0.3 ² (1.1)	19	44.9	0.15	Weißer Feststoff
68 (MH109)	65	0.8 (3.2)	0.4 (3.6)	1.1 (4.0)	0.7 (4.0)	3	66.0	0.76	Farbloses Öl
69 (MH119)	66	0.8 (3.5)	0.5 (3.9)	1.1 (4.4)	0.8 (4.4)	4.5	56.4	0.70	Farbloses Öl

¹ verwendetes Edukt 2: **57-61; 66, 68:** 2-Phenylethanol
62, 64-65, 67: 2-Cyclohexylethanol
63: 2-(4-Trifluormethyl)phenylethanol

² hier wurde aufgrund der höheren Aktivität alternativ ADDP verwendet

³ unter Verwendung von DEAD (3.1 g, 18.1 mmol) alternativ zu ADDP konnten nur 21.6% (0.54 g) Produkt gewonnen werden.

Methode B

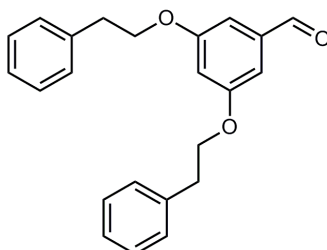
Die Verbindungen **70** (MH150) und **71** (MH151) wurden unter *Williamson*-artigen Synthesebedingungen hergestellt. Dabei wird zunächst 2,5-Dihydroxybenzaldehyd (0.50 g, 3.6 mmol) in DMF (ca. 10 ml) suspendiert und CsCO₃ (1.41 g, 4.3 mmol) als Base dazugegeben (unter Verwendung von K₂CO₃ konnte kein Produkt erhalten werden). Das Gemisch wird auf 40-50°C erhitzt und 4-(Trifluormethyl)benzylbromid (1.03 g, 4.3 mmol; in DMF gelöst) dazugetropft. Nach 5 h Erhitzen wird die Reaktion gestoppt.

Unter diesen Synthesebedingungen bildeten sich zwei verschiedene Produkte, die beide mittels Säulenchromatographie isoliert und aufgereinigt werden konnten. **70** (zweifach substituiert), Produkt: weißer Feststoff, Ausbeute: 18.2% (0.3 g). **71** (einfach substituiert), Produkt: gelber Feststoff, Ausbeute: 65.3% (0.7g).

5.3.4 Charakterisierung der Zwischenstufen 57-71

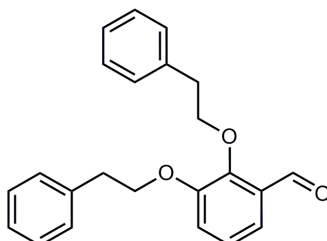
5.3.4.1 Zweifachsubstituierte Dialkoxybenzaldehyde 57-64, 70 (gleiche Reste)

Charakterisierung von 3,5-Diphenethoxybenzaldehyd 57 (MH79)

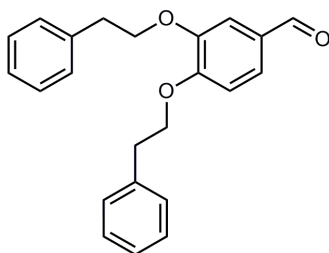


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 3.42-3.47 (t, 3H, J = 6.8 Hz, Ph'-CH₂), 4.64-4.68 (t, 3H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH₂), 7.20-7.21 (d, 1H, J = 2.2 Hz, Ph-C₄), 7.45-7.46 (d, 2H, J = 5.3 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.62-7.65 (m, 2H, Ph'-C₄), 7.66-7.75 (m, 8H, Ph'-H), 10.29 (s, 1H, CHO). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 35.19 (2C, Ph'-CH₂), 68.98 (2C, Ph-O-CH₂), 107.74 (Ph-C₄), 108.01 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.70 (2C, Ph'-C₄), 128.71 (4C, Ph'-C_{2/6}), 129.35 (4C, Ph'-C_{3/5}), 138.60 (2C, Ph'-C₁), 138.64 (Ph-C₁), 160.49 (2C, Ph-C_{3/5}), 193.18 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 361.2 [M+17]⁺.

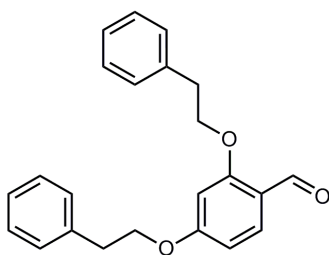
Charakterisierung von 2,3-Diphenethoxybenzaldehyd 58 (MH63)



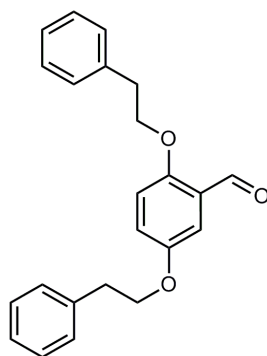
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 2.67-2.72 (t, 2H, J = 7.1 Hz, Ph'-CH₂), 2.92-2.97 (t, 1H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH), 3.05-3.09 (t, 1H, J = 6.4 Hz, Ph'-CH), 3.55-3.61 (q, 2H, J = 7.0; 5.4 Hz, Ph-O-CH₂), 4.17-4.21 (t, 1H, J = 6.7 Hz, Ph-O-CH), 4.25-4.30 (t, 1H, J = 6.4 Hz, Ph-O-CH), 7.12-7.38 (m, 13H, Ph'-H + Ph-H), 9.94 (s, 1H, CHO). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 34.89+35.62 (2C, Ph'-CH₂), 69.12+74.04 (2C, Ph-O-CH₂), 118.15 (Ph-C₅), 119.57 (Ph-C₄), 124.06 (Ph-C₆), 126.21+126.25 (2C, Ph'-C₄), 128.06 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.85 (4C, Ph'-C_{3/5}), 138.17+138.31 (2C, Ph'-C₁), 139.49 (Ph-C₂), 150.86 (Ph-C₃), 151.91 (Ph-C₁), 189.88 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 347.1 [M+1]⁺.

Charakterisierung von 3,4-Diphenethoxybenzaldehyd 59 (MH57)

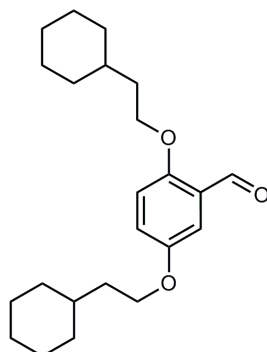
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 3.01-3.08 (dd, 4H, J = 6.6; 11.3 Hz, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 4.18-4.28 (m, 4H, Ph-O-CH_2), 7.09-7.39 (m, 12H, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$ + $\text{Ph-C}_{2/5}$), 7.48 (dd, 1H, Ph-C_6), 9.79 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.84+34.95 (2C, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 69.07+69.12 (2C, Ph-O-CH_2), 111.72 (Ph-C_5), 112.62 (Ph-C_2), 125.73 (Ph-C_6), 126.28 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_4$), 128.21 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{2/6}$), 129.01 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{3/5}$), 129.65 (Ph-C_1), 138.16+138.32 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_1$), 148.37 (Ph-C_3), 153.63 (Ph-C_4), 191.30 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 347.0 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von 2,4-Diphenethoxybenzaldehyd 60 (MH58)

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 3.01-3.08 (m, 4H, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 4.21-4.34 (m, 4H, Ph-O-CH_2), 6.58-6.61 (dd, 1H, J = 1.5; 8.7 Hz, Ph-C_5), 6.66-6.67 (d, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-C_3), 7.18-7.22 (m, 2H, $\text{Ph}'\text{-C}_4$), 7.24-7.31 (m, 8H, $\text{Ph}'\text{-H}$), 7.57-7.60 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Ph-C_6), 10.08 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.70 (2C, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 68.51+68.71 (2C, Ph-O-CH_2), 99.14 (Ph-C_3), 107.67 (Ph-C_5), 118.12 (Ph-C_1), 126.28 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_4$), 128.25 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{3/5}$), 128.23 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{2/6}$), 129.37 (Ph-C_6), 137.96+138.27 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_1$), 162.82 (Ph-C_4), 165.18 (Ph-C_2), 191.05 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 347.1 $[\text{M}+1]^+$.

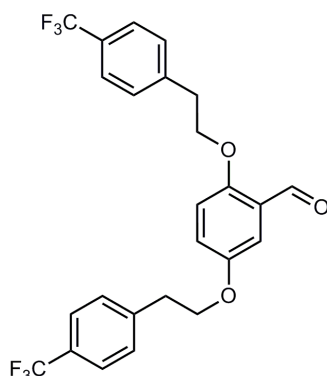
Charakterisierung von 2,5-Diphenethoxybenzaldehyd 61 (MH61)

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 2.96-3.01 (t, 2H, J = 6.8 Hz, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 3.03-3.07 (t, 2H, J = 6.5 Hz, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 4.13-4.17 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH_2), 4.26-4.30 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph-O-CH_2), 7.11 (m, 1H, Ph-C_3), 7.19-7.30 (m, 12H, $\text{Ph}'\text{-H} + \text{Ph-C}_{4/6}$), 10.18 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.84 (2C, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 68.66+69.57 (2C, Ph-O-CH_2), 110.94 (Ph-C_3), 115.59 (Ph-C_4), 123.59 (Ph-C_1), 126.26 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_4$), 133.03 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{3/5}$), 133.34 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{2/6}$), 138.29 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_1$), 152.27 (Ph-C_2), 155.41 (Ph-C_5), 188.79 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 347.1 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von 2,5-Bis-(2-cyclohexylethoxy)benzaldehyd 62 (MH157)

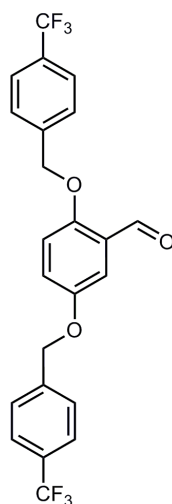
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.90-1.79 (m, 26H, Cyclohex-H + $-\text{CH}_2$), 3.93-3.98 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph-O-CH_2), 4.09-4.13 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH_2), 7.12-7.28 (m, 3H, Ph-H), 10.33 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 25.69 (4C, Cyclohex- $\text{C}_{3/5}$), 26.01 (2C, Cyclohex- C_4), 32.63 (4C, Cyclohex- $\text{C}_{2/6}$), 33.94+34.09 (2C, Cyclohex- CH_2), 35.88 (2C, Cyclohex- C_1), 64.96+65.94 (2C, Ph-O-CH_2), 110.65 (Ph-C_3), 115.41 (Ph-C_6), 123.68 (Ph-C_4), 124.45 (Ph-C_1), 152.38 (Ph-C_2), 155.60 (Ph-C_5), 188.83 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 359.3 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von 2,5-Bis-[4-(trifluormethyl)phenethoxy]benzaldehyd 63 (MH160)

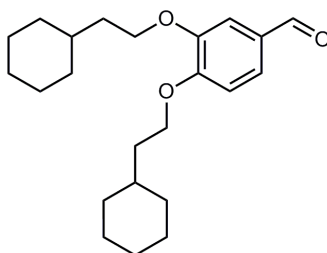


$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 3.07-3.11 (t, 2H, J = 6.4 Hz, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-CH}_2$), 3.14-3.18 (t, 2H, J = 6.2 Hz, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-CH}_2$), 4.18-4.23 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph-O-CH_2), 4.31-4.35 (t, 2H, J = 6.3 Hz, Ph-O-CH_2), 7.11-7.12 (d, 1H, J = 2.6 Hz, Ph-C_6), 7.16-7.23 (m, 2H, $\text{Ph-C}_{3/4\text{H}}$), 7.52-7.68 (m, 8H, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-H}$), 10.19 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.56 (2C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-CH}_2$), 68.09+69.05 (2C, Ph-O-CH_2), 111.02 (Ph-C_6), 115.56 (Ph-C_3), 119-126 (2C, $-\text{CF}_3$), 123.60 (Ph-C_4), 124.56 (Ph-C_1), 125.11 (4C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_{3/5}$), 129.77 (4C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_{2/6}$), 143.50 (2C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_1$), 152.26 (Ph-C_2), 155.36 (Ph-C_5), 188.74 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 483.4 $[\text{M}+1]^+$.

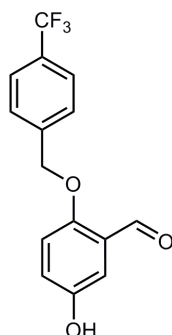
Charakterisierung von 2,5-Bis-[4-(trifluormethyl)benzyloxy]benzaldehyd 70 (MH150)



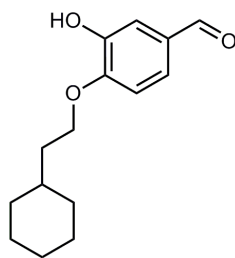
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 5.25 (s, 2H, Ph-O-CH_2), 5.37 (s, 2H, Ph-O-CH_2), 7.28-7.34 (m, 2H, $\text{Ph-C}_{3/6}$), 7.36-7.39 (dd, 1H, J = 1.8; 8.9 Hz, Ph-C_4), 7.65-7.80 (m, 8H, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-H}$), 10.42 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 69.92 (2C, Ph-O-CH_2), 112.48 (Ph-C_3), 115.91 (Ph-C_6), 123.36+125.30 (4C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_{3/5}$), 125.19 (Ph-C_4), 125.30 (2C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_4$), 127.96 (4C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_{2/6}$), 125-127 (2C, $-\text{CF}_3$), 135.36 (2C, $\text{Ph}^{\text{c}}\text{-C}_1$), 141.69 (Ph-C_1), 151.55 (Ph-C_2), 153.69 (Ph-C_5), 189.00 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 499.3 $[\text{M}+2\text{Na}]^+$.

Charakterisierung von 3,4-Bis-(2-cyclohexylethoxy)benzaldehyd 64 (MH90)

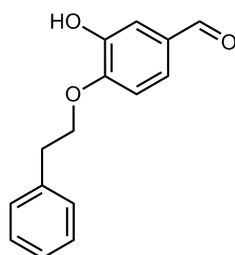
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.87-0.96 (m, 4H, Cyclohex-H), 1.13-1.20 (m, 6H, Cyclohex-H), 1.25-1.34 (m, 2H, Cyclohex-H), 1.58-1.77 (m, 16H, Cyclohex-H + -CH₂), 4.01-4.11 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 7.13-7.16 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ph-C₅), 7.36-7.37 (d, 1H, J = 1.8 Hz, Ph-C₂), 7.48-7.52 (dd, 1H, J = 1.8; 8.3 Hz, Ph-C₆), 9.80 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 25.74 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.02 (2C, Cyclohex-C₄), 32.65 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.09 (2C, Cyclohex-CH₂), 66.45+66.54 (2C, Ph-O-CH₂), 111.37 (Ph-C₅), 112.40 (Ph-C₂), 125.76 (Ph-C₆), 129.52 (Ph-C₁), 148.90 (Ph-C₃), 154.01 (Ph-C₄), 191.25 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 359.0 [M+1]⁺.

5.3.4.2 Einfachsubstituierte Hydroxy-Alkoxybenzaldehyde 65, 66 und 71**Charakterisierung von 5-Hydroxy-2-[4-(trifluormethyl)benzyloxy]benzaldehyd 71 (MH151)**

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 5.46 (s, 2H, Ph'-CH₂), 7.05-8.19 (m, 3H, Ph-H), 7.67-7.77 (dd, 4H, Ph'-H), 9.47 (s, 1H, -OH), 10.44 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 69.71 (O-CH₂), 112.57 (Ph-C₃), 115.98 (Ph-C₄), 122.06 (Ph-C₆), 123.42 (Ph-C₁), 123-127 (-CF₃), 125.43 (2C, Ph'-C_{3/5}), 126.93 (2C, Ph'-C_{2/6}), 135.36 (Ph'-C₁), 141.69 (Ph'-C₄), 151.52 (Ph-C₅), 153.70 (Ph-C₂), 189.0 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 296.2 [M+1]⁺.

Charakterisierung von 4-(2-Cyclohexylethoxy)-3-hydroxybenzaldehyd 65 (MH97)

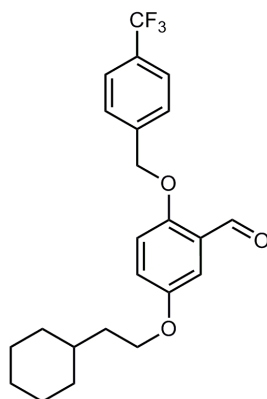
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.92-0.96 (m, 2H, Cyclohex-H), 1.13-1.20 (m, 3H, Cyclohex-H), 1.25-1.34 (m, 1H, Cyclohex-H), 1.58-1.77 (m, 8H, Cyclohex-H + $-\text{CH}_2$), 4.00-4.11 (m, 4H, Ph-O- CH_2), 7.10-7.12 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ph- C_5), 7.23-7.24 (d, 1H, J = 2.0 Hz, Ph- C_2), 7.37-7.38 (dd, 1H, J = 2.0; 8.2 Hz, Ph- C_6), 9.44 (s, 1H, $-\text{OH}$), 9.85 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 25.67 (2C, Cyclohex- $\text{C}_{3/5}$), 26.01 (Cyclohex- C_4), 32.61 (2C, Cyclohex- $\text{C}_{2/6}$), 33.80 (Cyclohex- C_1), 35.84 (Cyclohex- CH_2), 66.41 (Ph-O- CH_2), 112.44 (Ph- C_5), 113.55 (Ph- C_2), 124.29 (Ph- C_6), 129.65 (Ph- C_1), 147.08 (Ph- C_3), 152.73 (Ph- C_4), 191.33 (CHO). **MS (ESI-):** m/e = 246.9 [M-1].

Charakterisierung von 3-Hydroxy-4-phenethoxybenzaldehyd 66 (MH117)

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 3.05-3.10 (t, 2H, J = 7.0 Hz, Ph'- CH_2), 4.24-4.29 (t, 2H, J = 7.0 Hz, Ph-O- CH_2), 7.12-7.38 (m, 8H, Ph'-H + Ph-H), 9.55 (s/ br, 1H, Ph-OH), 9.79 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.83 (2C, Ph'- CH_2), 68.99 (Ph-O- CH_2), 112.58 (Ph- C_5), 113.54 (Ph- C_2), 124.34 (Ph- C_6), 126.31 (Ph'- C_4), 128.27 (2C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 129.02 (2C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 129.79 (Ph- C_1), 138.31 (Ph'- C_1), 147.07 (Ph- C_3), 152.45 (Ph- C_4), 191.42 (CHO). **MS (ESI-):** m/e = 240.9 [M-1].

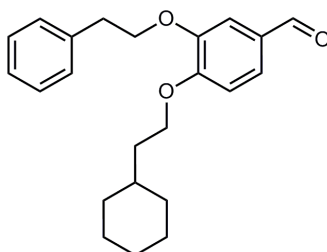
5.3.4.3 Zweifachsubstituierte Dialkoxybenzaldehyde 67-69 (verschiedene Reste)

Charakterisierung von 5-(2-Cyclohexylethoxy)-2-[(4-trifluormethyl)benzyloxy]benzaldehyd 67 (MH159)

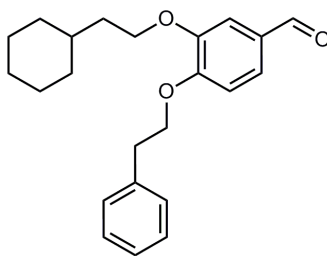


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.9-1.8 (m, 13H, Cyclohex-H + -CH₂), 3.99-4.05 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH₂), 5.38 (s, 2H, Ph'-CH₂), 7.17-7.32 (m, 3H, Ph-H), 7.70-7.88 (dd, 4H, J = 2.9; 9.0 Hz, Ph'-H), 10.44 (s, 1H, CHO). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 25.69 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.01 (Cyclohex-C₄), 32.65 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.94 (Cyclohex-CH₂), 35.96 (Cyclohex-C₁), 66.03 (Ph-C₅-CH₂), 69.44 (Ph'-CH₂), 111.25 (Ph-C₆), 115.87 (Ph-C₃), 123.38 (Ph-C₄), 124.91+125.27 (2C, Ph'-C_{3/5}), 125.37 (Ph-C₁), 127.92 (2C, Ph'-C_{2/6}), 132.01 (Ph'-C₄), 141.54 (Ph'-C₁), 152.82 (Ph-C₂), 154.82 (Ph-C₅), 188.88 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 407.3 [M+1]⁺.

Charakterisierung von 4-(2-Cyclohexylethoxy)-3-phenethoxybenzaldehyd 68 (MH109)

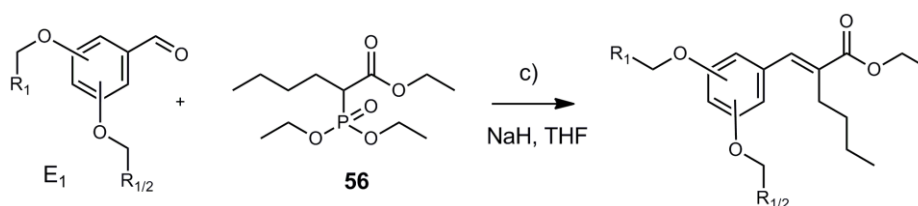


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.92-1.75 (m, 13H, Cyclohex-H + -CH₂), 3.02-3.06 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph'-CH₂), 4.05-4.09 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph-C₄-O-CH₂), 4.19-4.23 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph-C₃-O-CH₂), 7.14-7.38 (m, 7H, Ph-C_{2/5}H + Ph'-H), 7.49-7.52 (dd, 1H, J = 1.8, 8.3Hz, Ph-C₆), 9.79 (s, 1H, CHO). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 25.74 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.01 (Cyclohex-C₄), 32.64 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.96 (Cyclohex-C₁), 34.92 (Cyclohex-CH₂), 35.90 (Ph'-CH₂), 66.49 (Ph-C₄-O-CH₂), 68.94 (Ph-C₃-O-CH₂), 111.29 (Ph-C₅), 112.37 (Ph-C₂), 125.87 (Ph-C₆), 126.22 (Ph'-C₄), 128.13 (2C, Ph'-C_{2/6}), 129.07 (2C, Ph'-C_{3/5}), 129.43 (Ph-C₁), 138.42 (Ph'-C₁), 148.34 (Ph-C₃), 153.86 (Ph-C₄), 191.31 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 353.2 [M+1]⁺.

Charakterisierung von 3-(2-Cyclohexylethoxy)-4-phenethoxybenzaldehyd 69 (MH119)

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.92-1.76 (m, 13H, Cyclohex-H + -CH₂), 3.03-3.07 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph'-CH₂), 3.99-4.03 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph-C₃-O-CH₂), 4.24-4.29 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph-C₄-O-CH₂), 7.14-7.38 (m, 7H, Ph-C_{2/5}H + Ph'-H), 7.48-7.51 (dd, 1H, J = 1.8; 8.3 Hz, Ph-C₆), 9.80 (s, 1H, CHO). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 25.72 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.02 (Cyclohex-C₄), 32.68 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.98 (Cyclohex-C₁), 34.82 (Ph'-CH₂), 36.03 (Cyclohex-C₁), 66.37 (Ph-C₃-O-CH₂), 69.03 (Ph-C₄-O-CH₂), 111.26 (Ph-C₅), 112.39 (Ph-C₂), 125.75 (Ph-C₆), 126.28 (Ph'-C₄), 128.15 (2C, Ph'-C_{2/6}), 129.10 (2X, Ph'-C_{3/5}), 129.63 (Ph-C₁), 138.25 (Ph'-C₁), 148.60 (Ph-C₃), 153.63 (Ph-C₄), 191.34 (CHO). **MS (ESI+):** m/e = 353.3 [M+1]⁺.

5.3.5 Arbeitsvorschrift zur Wittig-Horner-Synthese



NaH (95%, 1.3 eq) wird in einem Dreihalskolben eingewogen und mit 5 ml wasserfreiem THF suspendiert. Es wird eine Argonatmosphäre erzeugt und unter Eisbadkühlung gerührt. Nach Zugabe des Phosphoresters **56** (1.3 eq, in 5 ml THF gelöst) wird die Suspension 1 h lang gerührt bis eine klare Lösung entsteht. Zu dieser wird der jeweilige Aldehyd (E_1 , 1 eq) zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch einrotiert und mittels Säulenchromatographie unter Nutzung von *n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase aufgereinigt.

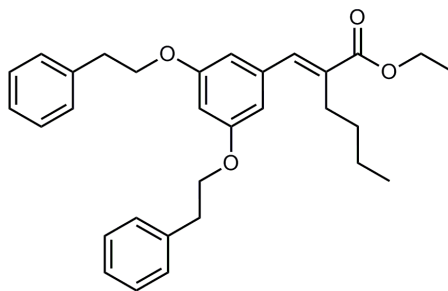
Tabelle 17 Synthesebedingungen

Substanz	E_1		E_2 : 56 Menge in g (mmol)	NaH (95%) Menge in g (mmol)	Reaktionsdauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)				in %	in g	
72 (MH80)	57	1.0 (2.9)	1.2 (4.3)	0.11 (4.3)	3	89.0	1.20	Farbloses Öl
73 (MH68)	58	1.0 (2.9)	1.0 (3.7)	0.09 (3.5)	18	61.5	0.84	Farbloses Öl
74 (MH62)	59	1.0 (2.9)	1.0 (3.7)	0.14 (3.5)*	22	48.5	0.66	Farbloses Öl
75 (MH64)	60	1.2 (3.5)	1.5 (5.2)	0.13 (5.2)	22	58.5	0.96	Farbloses Öl
76 (MH75)	61	1.2 (3.5)	1.5 (5.2)	0.13 (5.2)	6	87.3	1.43	Gelbes Öl
77 (MH158)	62	0.2 (1.4)	0.5 (1.8)	0.04 (1.8)	2	91.0	0.27	Farbloses Öl
78 (MH165)	63	0.6 (1.2)	0.4 (1.5)	0.04 (1.5)	5	89.0	0.63	Farbloses Öl
79 (MH161)	70	0.4 (0.8)	0.3 (1.0)	0.02 (1.0)	4	61.3	0.29	Weißer Feststoff
80 (MH162)	67	0.1 (0.3)	0.1 (0.4)	0.01 (0.4)	18	76.4	0.12	Weißer Feststoff
81 (MH112)	64	0.4 (1.1)	0.4 (1.4)	0.03 (1.4)	5	93.5	0.48	Farbloses Öl
82 (MH113)	68	0.7 (2.1)	0.8 (2.8)	0.07 (2.8)	3	88.2	0.90	Farbloses Öl
83 (MH121)	69	0.9 (1.4)	0.9 (1.8)	0.08 (1.8)	4	81.2	0.95	Farbloses Öl

* hier wurde 60%iges NaH (suspendiert in *n*-Hexan) verwendet

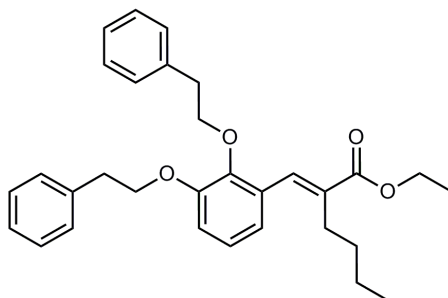
5.3.6 Charakterisierung der Zwischenstufen 72-83

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,5-diphenethoxybenzyliden)hexanoat 72 (MH80)



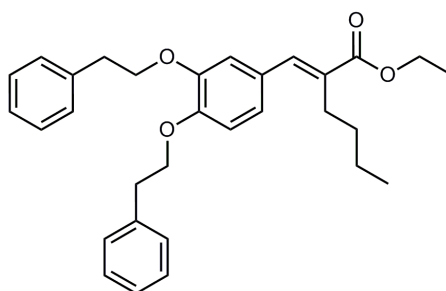
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.76-0.81 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.20-1.40 (m, 5H, Et- CH_3 + Bu- CH_2), 1.43-1.50 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.37-2.43 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.97-3.02 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'- CH_2), 4.10-4.19 (m, 6H, Ph-O- CH_2 + O- CH_2), 6.48-6.52 (dd, 3H, J = 1.7; 9.2 Hz, Ph-H), 7.16-7.29 (m, 10H, Ph'-H), 7.45 (s, 1H, C=CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.56 (Bu- CH_3), 13.91 (Et- CH_3), 22.01 (Bu- CH_2), 26.94 (Bu- CH_2), 30.91 (Bu- CH_2), 34.15 (2C, Ph'- CH_2), 60.40 (O- CH_2), 68.26 (2C, Ph-O- CH_2), 100.47 (Ph- C_4), 107.61 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 126.22 (2C, Ph'- C_4), 128.22 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.89 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 133.47 (Ph- C_1), 137.49 (COO-C=CH), 138.22 (Ph-C=C), 138.31 (Ph'- C_1), 159.54 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 167.33 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 473.1 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,3-diphenethoxybenzyliden)hexanoat 73 (MH68)



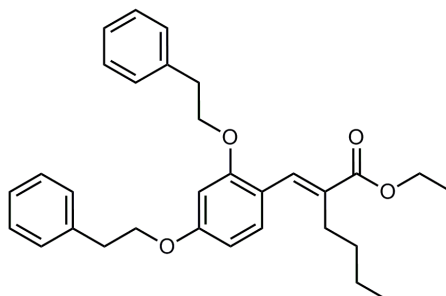
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.76-0.81 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 0.92-0.97 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et- CH_3), 1.19-1.35 (m, 4H, Bu- CH_2), 2.20-2.33 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.83-2.89 (q, 2H, J = 6.6 Hz, Ph'- CH_2), 3.00-3.04 (q, 2H, J = 6.4 Hz, Ph'- CH_2), 3.91-3.99 (m, 4H, Ph-O- CH_2 + O- CH_2), 4.16-4.23 (q, 2H, J = 6.4 Hz, Ph-O- CH_2), 6.57-6.60 (dd, 1H, J = 3.5; 5.6 Hz, Ph- C_6), 7.09-7.18 (m, 2H, Ph- $\text{C}_{4/5}$), 7.20-7.34 (m, 10H, Ph'-H), 7.58 (s, 1H, C=CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.65 (Bu- CH_3), 14.08 (Et- CH_3), 22.03 (Bu- CH_2), 26.69 (Bu- CH_2), 30.61 (Bu- CH_2), 35.04+35.85 (2C, Ph'- CH_2), 60.25 (O- CH_2), 72.25+73.11 (2C, Ph-O- CH_2), 113.27 (Ph- C_4), 114.17 (Ph- C_1), 120.71 (Ph- C_6), 123.71 (Ph- C_5), 126.04+126.16 (2C, Ph'- C_4), 128.12+128.17 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.73+128.84 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 134.13 (C=C-COO), 135.13 (Ph-C=C), 138.43+138.50 (2C, Ph'- C_1), 146.01 (Ph- C_3), 151.35 (Ph- C_2), 167.22 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 490.5 $[\text{M}+\text{OH}]^+$.

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,4-diphenethoxybenzyliden)hexanoat 74 (MH62)



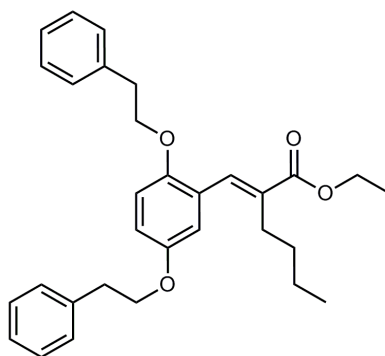
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.78-0.84 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.21-1.23 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.25-1.39 (m, 4H, Bu-CH₂), 2.47-2.49 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.99-3.01 (t, 4H, J = 7.0 Hz, Ph'-CH₂), 4.10-4.20 (m, 6H, Ph-O-CH₂ + O-CH₂), 6.88-7.01 (m, 3H, Ph-H), 7.20-7.32 (m, 10H, Ph'-H), 7.47 (s, 1H, C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.61 (Bu-CH₃), 14.12 (Et-CH₃), 22.41 (Bu-CH₂), 26.87 (Bu-CH₂), 30.71 (Bu-CH₂), 35.01+35.36 (2C, Ph'-CH₂), 60.22 (O-CH₂), 68.96+69.13 (2C, Ph-O-CH₂), 113.44 (Ph-C₂), 114.84 (Ph-C₅), 122.94 (Ph-C₆), 126.19 (2C, Ph'-C₄), 127.82 (Ph-C₁), 128.18 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.94+128.99 (4C, Ph'-C_{3/5}), 130.89 (C=C-COO), 137.93 (Ph-C=C), 138.29+138.36 (2C, Ph'-C₁), 147.89 (Ph-C₃), 148.81 (Ph-C₁), 167.65 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 473.2 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,4-diphenethoxybenzyliden)hexanoat 75 (MH64)



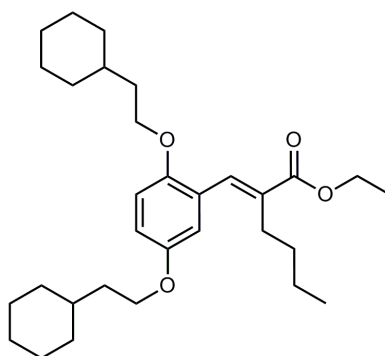
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.81-0.85 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.22-1.28 (m, 5H, Et-CH₃ + Bu-CH₂), 1.31-1.44 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.32-2.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Bu-CH₂), 2.97-3.04 (q, 4H, J = 6.4 Hz, Ph'-CH₂), 4.16-4.23 (q, 6H, J = 7.2 Hz, Ph-O-CH₂ + O-CH₂), 6.55-6.57 (d, 2H, J = 5.4 Hz, Ph-C_{3/5}), 7.15-7.29 (m, 11H, Ph'-H + Ph-C₆), 7.64 (s, 1H, C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.58 (Bu-CH₃), 14.03 (Et-CH₃), 22.09 (Bu-CH₂), 26.76 (Bu-CH₂), 30.74 (Bu-CH₂), 34.86+34.95 (2C, Ph'-CH₂), 60.06 (O-CH₂), 68.26+68.68 (2C, Ph-O-CH₂), 99.30 (Ph-C₃), 105.97 (Ph-C₅), 116.42 (Ph-C₁), 126.17+126.23 (2C, Ph'-C₄), 128.06+128.25 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.90+129.08 (4C, Ph'-C_{3/5}), 129.74 (Ph-C₆), 130.55 (C=C-COO), 133.48 (Ph-C=C), 138.21+138.51 (2C, Ph'-C₁), 157.83 (Ph-C₂), 160.31 (Ph-C₄), 167.62 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 473.4 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,5-diphenethoxybenzyliden)hexanoat 76 (MH75)



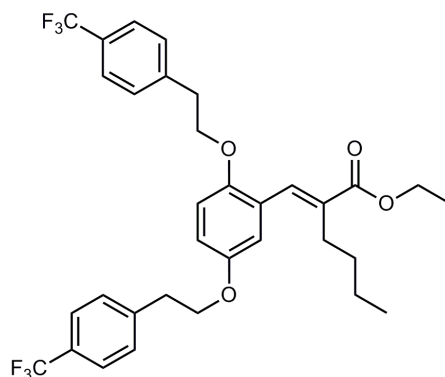
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.73-0.78 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Bu-CH₃), 1.14-1.24 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.25-1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.35-1.43 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.27-2.48 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.93-3.01 (m, 4H, Ph'-CH₂), 4.08-4.14 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 4.17-4.24 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂), 6.75-6.77 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Ph-C₆), 6.88-6.91 (m, 1H, Ph-C₄), 6.94-6.97 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ph-C₃), 7.16-7.31 (m, 10H, Ph'-H), 7.62 (s, 1H, C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.68 (Bu-CH₃), 14.14 (Et-CH₃), 22.13 (Bu-CH₂), 26.87 (Bu-CH₂), 30.81 (Bu-CH₂), 34.92+35.06 (2C, Ph'-CH₂), 60.28 (O-CH₂), 68.65+69.24 (2C, Ph-O-CH₂), 113.15 (Ph-C₆), 114.89 (Ph-C₄), 115.84 (Ph-C₃), 124.62 (Ph-C₁), 126.15+126.20 (2C, Ph'-C₄), 128.06+128.10 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.99+129.05 (4C, Ph'-C_{3/5}), 133.84 (COO-C=C), 134.51 (Ph-C=C), 138.27+138.55 (2C, Ph'-C₁), 149.79 (Ph-C₂), 151.72 (Ph-C₅), 167.27 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 473.4 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2,5-bis-[2-cyclohexylethoxy]benzyliden]hexanoat 77 (MH158)



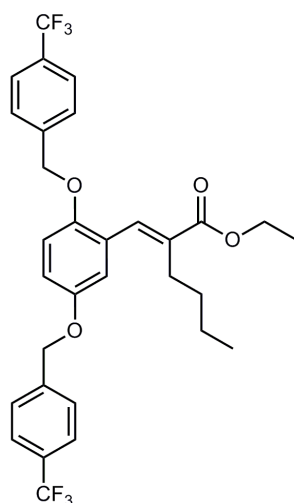
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-1.67 (m, 36H, Bu-CH₃/ -CH₂, Cyclohex-H + -CH₂ + Et-CH₃), 2.3 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.90-3.99 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 4.02-4.18 (m, 2H, O-CH₂), 6.5-6.98 (m, 3H, Ph-H), 7.66 (s, 1H, C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.66 (Bu-CH₃), 14.08 (Et-CH₃), 21.32 (Bu-CH₂), 25.72 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 25.75 (2C, Cyclohex-C₄), 26.01 (Bu-CH₂), 30.84 (Bu-CH₂), 32.64 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.99+34.05 (2C, Cyclohex-CH₂), 35.96 (2C, Cyclohex-C₁), 60.24 (O-CH₂), 65.96+66.56 (2C, Ph-O-CH₂), 113.67 (Ph-C₆), 116.06 (Ph-C₃), 124.73 (Ph-C₄), 126.01 (Ph-C₁), 132.68 (C=C-COO), 134.03 (Ph-C=C), 150.77 (Ph-C₂), 151.98 (Ph-C₅), 167.26 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 485.6 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2,5-bis-[4-[(trifluormethyl)phenethoxy]]benzyliden}hexanoat 78 (MH165)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.66-0.71 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Bu-CH₃), 1.06-1.35 (m, 7H, Bu-CH₂ + Et-CH₃), 2.24-2.29 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.06-3.11 (m, 4H, Ph'-CH₂), 4.13-4.22 (m, 6H, Ph-O-CH₂ + O-CH₂), 6.72-6.73 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Ph-C₆), 6.88-6.98 (m, 2H, Ph-C_{3/4}), 7.48-7.65 (m, 9H, Ph'-H + C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.39 (Bu-CH₃), 14.02 (Et-CH₃), 21.98 (Bu-CH₂), 26.71 (Bu-CH₂), 30.69 (Bu-CH₂), 34.36+34.70 (2C, Ph'-CH₂), 59.70 (O-CH₂), 68.05+68.31 (2C, Ph-O-CH₂), 113.09 (Ph-C₆), 115.01 (Ph-C₄), 115.68 (Ph-C₃), 122.56 (Ph-C₁), 122-127 (2C, -CF₃), 124.66+124.73 (4C, Ph'-C_{3/5}), 129.71+129.87 (4C, Ph'-C_{2/6}), 132.94 (C=C-COO), 133.84 (Ph-C=C), 134.60 (2C, Ph'-C₄), 143.60+143.73 (2C, Ph'-C₁), 151.47 (Ph-C₂), 152.36 (Ph-C₃), 167.23 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 610.0 [M+1]⁺.

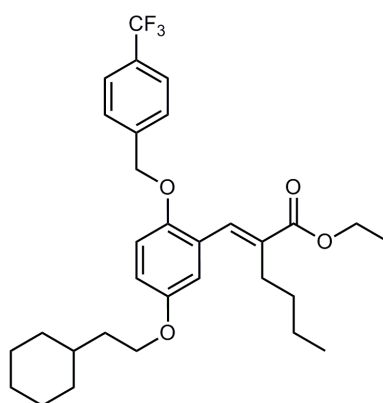
Charakterisierung von Ethyl 2-{2,5-bis-4-[(trifluormethyl)benzyloxy]benzyliden}hexanoat 79 (MH161)



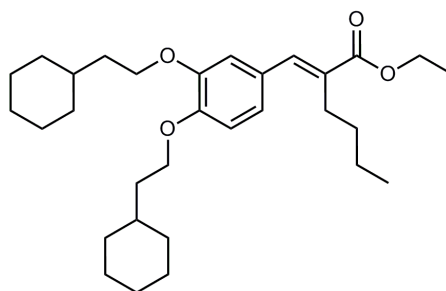
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.72-0.77 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Bu-CH₃), 1.11-1.37 (m, 7H, Bu-CH₂ + Et-CH₃), 2.27-2.32 (t, 2H, J = 8.1 Hz, Bu-CH₂), 4.14-4.21 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂), 5.21 (s, 4H, Ph'-CH₂), 6.88-6.89 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Ph-C₆), 6.99-7.09 (m, 2H, Ph-C_{3/4}), 7.58-7.63 (m, 4H, Ph'-

H), 7.68 (s, 1H, C=CH), 7.72-7.75 (m, 4H, Ph'-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.48 (Bu-CH₃), 14.04 (Et-CH₃), 21.92 (Bu-CH₂), 26.52 (Bu-CH₂), 30.56 (Bu-CH₂), 60.32 (O-CH₂), 68.67+69.29 (2C, Ph-O-CH₂), 114.29 (Ph-C₆), 115.52 (Ph-C₄), 116.34 (Ph-C₃), 122.05 (Ph-C₁), 122-127 (2C, -CF₃), 125.17 (4C, Ph'-C_{3/5}), 127.66 (4C, Ph'-C_{2/6}), 133.42 (C=C-COO), 133.67 (Ph-C=C), 135.06 (2C, Ph'-C₄), 142.10 (2C, Ph'-C₁), 150.30 (Ph-C₂), 151.69 (Ph-C₅), 167.19 (COO-). **MS (ESI+)**: m/e = 581.9 [M+1]⁺.

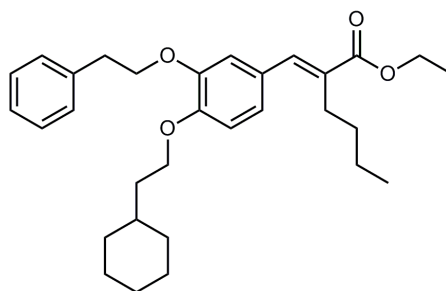
Charakterisierung von Ethyl 2-{5-(2-cyclohexylethoxy)-2-[4-(trifluormethyl)benzyloxy]-benzyliden}hexanoat 80 (MH162)



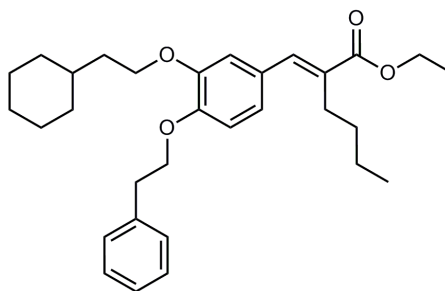
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.80-0.85 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 0.85-1.71 (m, 20H, Cyclohex-H + -CH₂ + Bu-CH₂), 2.35-2.40 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.91-3.98 (t, 2H, J = 8.1 Hz, Ph-O-CH₂), 4.14-4.21 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂), 5.20 (s, 2H, Ph'-CH₂), 6.79-7.82 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Ph-C₆), 6.89-6.93 (dd, 1H, J = 2.8; 8.9 Hz, Ph-C₄), 7.03-7.06 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ph-C₃), 7.59-7.75 (m, 5H, Ph'-H + C=CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.53 (Bu-CH₃), 14.04 (Et-CH₃), 21.23 (Bu-CH₂), 25.71 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 25.99 (Bu-CH₂), 26.90 (Cyclohex-C₄), 30.83 (Bu-CH₂), 32.66 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.97 (Cyclohex-CH₂), 36.00 (Cyclohex-C₁), 60.31 (O-CH₂), 65.95 (Ph-C₅-O-CH₂), 69.34 (Ph-C₂-O-CH₂), 113.87 (Ph-C₆), 114.88 (Ph-C₄), 115.97 (Ph-C₃), 122.37 (Ph-C₁), 125.12+125.17 (2C, Ph'-C_{3/5}), 127.66 (2C, Ph'-C_{2/6}), 133.13 (C=C-COO), 133.71 (Ph-C=C), 135.05 (Ph'-C₄), 142.07 (Ph'-C₁), 149.97 (Ph-C₂), 152.39 (Ph-C₅), 167.21 (COO-). **MS (ESI+)**: m/e = 533.9 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl-2-[3,4-bis(2-cyclohexylethoxy)benzyliden]hexanoat 81**(MH112)**

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.84-1.70 (m, 38H, Cyclohex-H + -CH₂, Bu-CH₃, Bu-CH₂ + Et-CH₃), 2.47-2.50 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.95-4.02 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 4.06-4.20 (m, 4H, O-CH₂), 6.96-7.02 (m, 3H, Ph-H), 7.49 (s, 1H, C=CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.68 (Bu-CH₃), 21.46 (Bu-CH₂), 25.77 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.04 (2C, Cyclohex-C₄), 26.89 (Bu-CH₂), 30.77 (Bu-CH₂), 32.70 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.76 (2C, Cyclohex-CH₂), 36.16 (2C, Cyclohex-C₁), 60.23 (O-CH₂), 66.36+66.49 (2C, Ph-O-CH₂), 113.36 (Ph-C₂), 114.69 (Ph-C₅), 121.63 (Ph-C₆), 127.63 (Ph-C₁), 130.72 (C=C-COO), 138.07 (Ph-C=C), 148.22 (Ph-C₃), 149.21 (Ph-C₄), 167.68 (COO⁻). **MS (ESI+):** m/e = 485.8 [M+1]⁺.

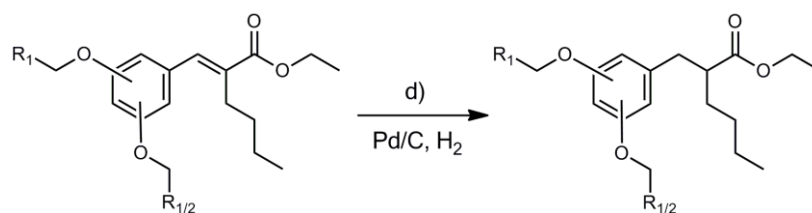
Charakterisierung von Ethyl 2-[4-(2-cyclohexylethoxy)-3-phenethoxybenzyliden]hexanoat**82 (MH113)**

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.80-0.85 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 0.91-1.32 (m, 10H, Et-CH₃ + Bu-CH₂ + Cyclohex-H), 1.41-1.75 (m, 10H, Cyclohex-H + -CH₂), 2.43-2.50 (m, 1H, Bu-CH₂), 3.00-3.04 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH₂), 3.97-4.01 (m, 2H, Ph-C₄-O-CH₂), 4.13-4.20 (m, 4H, O-CH₂ + Ph-C₃-O-CH₂), 6.96-7.03 (m, 3H, Ph-H), 7.17-7.34 (m, 5H, Ph'-H), 7.48 (s, 1H, C=CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.64 (Bu-CH₃), 14.14 (Et-CH₃), 22.36 (Bu-CH₂), 25.73 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.03 (Cyclohex-C₄), 26.86 (Bu-CH₂), 30.72 (Bu-CH₂), 32.67 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.99 (Cyclohex-CH₂), 34.76 (Ph'-CH₂), 36.09 (Cyclohex-C₁), 60.22 (O-CH₂), 66.26 (Ph-C₄-O-CH₂), 69.02 (Ph-C₃-O-CH₂), 113.25 (Ph-C₂), 114.64 (Ph-C₅), 122.93 (Ph-C₆), 126.19 (Ph-C₁), 127.55 (Ph'-C₄), 128.13 (2C, Ph'-C_{2/6}), 128.99 (2C, Ph'-C_{3/5}), 130.69 (C=C-COO), 138.02 (Ph-C=C), 138.44 (Ph'-C₁), 147.66 (Ph-C₃), 149.05 (Ph-C₄), 169.01 (COO⁻). **MS (ESI+):** m/e = 479.5 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-[3-(2-cyclohexylethoxy)-4-phenethoxybenzyliden]hexanoat**83 (MH121)**

¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.84-0.90 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 0.94-1.74 (m, 20H, Et-CH₃ + Bu-CH₂ + Cyclohex-CH + -CH₂), 2.47 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.99-3.04 (t, 2H, J = 6.5 Hz, Ph'-CH₂), 3.92-3.97 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph-C₃-O-CH₂), 4.13-4.20 (m, 4H, O-CH₂ + Ph-C₄-O-CH₂), 6.95-7.04 (m, 3H, Ph-H), 7.18-7.35 (m, 5H, Ph'-H), 7.49 (s, 1H, C=CH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.66 (Bu-CH₃), 13.88 (Et-CH₃), 21.44 (Bu-CH₂), 25.72 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.29 (Cyclohex-C₄), 26.77 (Bu-CH₂), 30.75 (Bu-CH₂), 32.67 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.05 (Cyclohex-CH₂), 34.73 (Ph'-CH₂), 36.15 (Cyclohex-C₁), 60.21 (O-CH₂), 66.47 (Ph-C₃-O-CH₂), 68.91 (Ph-C₄-O-CH₂), 113.36 (Ph-C₂), 114.67 (Ph-C₅), 122.84 (Ph-C₆), 126.18 (Ph-C₁), 127.80 (Ph'-C₄), 128.11 (2C, Ph'-C_{2/6}), 129.01 (2C, Ph'-C_{3/5}), 130.81 (C=C-COO), 137.99 (Ph-C=C), 138.43 (Ph'-C₁), 148.85 (Ph-C₄), 148.85 (Ph-C₃), 167.64 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 479.4 [M+1]⁺.

5.3.7 Arbeitsvorschrift zur Hydrierung der exozyklischen Doppelbindung



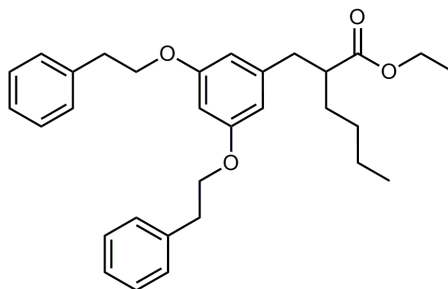
Die Zwischenstufen **72-76**, **81-83** werden in Ethanol gelöst, mit Pd/ C versehen und im Autoklaven plaziert. Der Ansatz wird mit H₂ begast und über Nacht bei 5 bar gerührt. Nach 17-24 h wird das resultierende Produkt über Celite® filtriert und einrotiert. Der Umsatz findet quantitativ statt, das Produkt kann im nächsten Schritt ohne weitere Aufreinigung hydrolysiert werden.

Tabelle 18 Synthesebedingungen

Substanz	E		Pd/C in g (%)	Reaktions- dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)			in %	in g	
84 (MH83)	72	0.50 (1.1)	0.05 (10)	20	90.0	0.45	Braunes Öl
85 (MH70)	73	0.31 (0.7)	0.07 (10)	24	89.9	0.28	Farbloses Öl
86 (MH67)	74	0.45 (0.9)	0.04 (10)	24	93.0	0.42	Farbloses Öl
87 (MH72)	75	0.47 (1.0)	0.05 (10)	24	87.6	0.44	Farbloses Öl
88 (MH76)	76	0.69 (1.5)	0.06 (10)	18	98.0	0.68	Farbloses Öl
89 (MH114)	81	0.48 (1.0)	0.05 (10)	22	90.0	0.43	Farbloses Öl
90 (MH116)	82	0.60 (1.2)	0.06 (10)	17	94.7	0.57	Farbloses Öl
91 (MH126)	83	0.50 (1.0)	0.05 (10)	20	97.6	0.49	Farbloses Öl

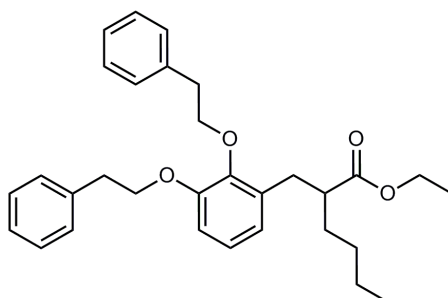
5.3.8 Charakterisierung der Zwischenstufen 84-91

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,5-diphenethoxybenzyl)hexanoat 84 (MH83)



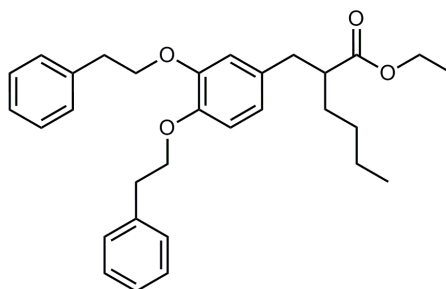
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.01-1.06 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et- CH_3), 1.08-1.21 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.30-1.48 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.58-2.69 (m, 3H, Prop- C_3H_2 + Prop- C_2H), 2.95-3.00 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'- CH_2), 3.91-3.99 (m, 2H, O- CH_2), 4.08-4.13 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-O- CH_2), 6.29 (s, 3H, Ph-H), 7.17-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.97 (Bu- CH_3), 14.00 (Et- CH_3), 21.92 (Bu- CH_2), 28.92 (Bu- CH_2), 31.36 (Bu- CH_2), 32.65 (Prop- C_3), 34.88 (2C, Ph'- CH_2), 46.54 (Prop- C_2), 59.51 (O- CH_2), 68.03 (2C, Ph-O- CH_2), 98.97 (Ph- C_4), 107.42 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 126.18 (2C, Ph'- C_4), 128.21 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.89 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 138.35 (2C, Ph'- C_1), 141.55 (Ph- C_1), 159.35 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 174.66 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 475.3 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,3-diphenethoxybenzyl)hexanoat 85 (MH70)



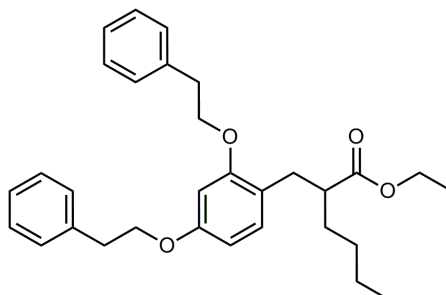
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu- CH_3), 0.98-1.02 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et- CH_3), 1.10-1.41 (m, 6H, Bu- CH_2), 2.42-2.54 (m, 3H, Prop- C_3H_2 + Prop- C_2H), 2.87-2.92 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph'- CH_2), 3.01-3.04 (t, 2H, J = 6.4 Hz, Ph'- CH_2), 3.92-4.01 (m, 4H, Ph-O- CH_2), 6.57-6.60 (dd, 1H, J = 3.5; 5.6 Hz, Ph- C_6), 6.83-6.88 (m, 2H, Ph- $\text{C}_{4/5}$), 7.16-7.32 (m, 10H, Ph'-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.73 (Bu- CH_3), 13.98 (Et- CH_3), 21.93 (Bu- CH_2), 28.88 (Bu- CH_2), 31.55 (Bu- CH_2), 32.79 (Prop- C_3), 35.08+36.17 (2C, Ph'- CH_2), 45.64 (Prop- C_2), 59.38 (O- CH_2), 68.57+72.40 (2C, Ph-O- CH_2), 111.98 (Ph- C_4), 122.05 (Ph- C_5), 123.26 (Ph- C_6), 126.03+126.31 (2C, Ph'- C_4), 128.14+128.20 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.76+128.86 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 132.57 (Ph- C_1), 138.74+138.54 (2C, Ph'- C_1), 145.74 (Ph- C_2), 151.32 (Ph- C_3), 174.70 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 475.4 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,4-diphenethoxybenzyl)hexanoat 86 (MH67)



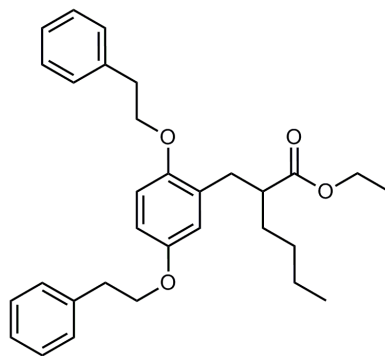
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 6.9 Hz, Bu-CH₃), 1.00-1.06 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.19-1.20 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.41-1.43 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.54-2.72 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + Prop-C₂H), 2.95-3.00 (m, 4H, Ph'-CH₂), 3.91-3.98 (q, 2H, J = 7.0 Hz, O-CH₂), 4.05-4.09 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph-O-CH₂), 6.60-6.62 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ph-C₆), 6.74 (s, 1H, Ph-C₂), 6.80-6.83 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ph-C₅), 7.20-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.70 (Bu-CH₃), 14.04 (Et-CH₃), 21.93 (Bu-CH₂), 28.79 (Bu-CH₂), 31.27 (Bu-CH₂), 35.15+35.19 (2C, Ph'-CH₂), 37.38 (Prop-C₃), 46.92 (Prop-C₂), 59.46 (O-CH₂), 69.12+69.20 (2C, Ph-O-CH₂), 113.96 (Ph-C₂), 114.71 (Ph-C₅), 121.14 (Ph-C₆), 128.16 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.96 (4C, Ph'-C_{3/5}), 132.14 (Ph-C₁), 138.47+138.53 (2C, Ph'-C₁), 146.67 (Ph-C₄), 147.99 (Ph-C₃), 174.75 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 492.5 [M+OH⁺]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,4-diphenethoxybenzyl)hexanoat 87 (MH72)



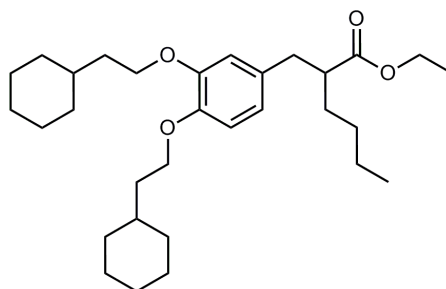
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.02-1.07 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.13-1.22 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.45-1.52 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.48-2.53 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + Prop-C₂H), 2.98-3.00 (m, 4H, Ph'-CH₂), 3.93-3.96 (m, 2H, O-CH₂), 4.05-4.16 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.35-6.38 (dd, 1H, J = 2.3; 8.2 Hz, Ph-C₅), 6.47-6.48 (d, 1H, J = 2.3 Hz, Ph-C₃), 6.83-6.86 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Ph-C₆), 7.17-7.22 (m, 2H, Ph'-C₄), 7.24-7.33 (m, 8H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.55 (Bu-CH₃), 13.70 (Et-CH₃), 21.68 (Bu-CH₂), 28.78 (Bu-CH₂), 31.35 (Bu-CH₂), 34.96+35.09 (2C, Ph'-CH₂), 45.04 (Prop-C₃), 47.61 (Prop-C₂), 59.32 (O-CH₂), 68.11+68.16 (2C, Ph-O-CH₂), 99.28 (Ph-C₃), 105.17 (Ph-C₅), 119.31 (Ph-C₁), 126.12+126.18 (2C, Ph'-C₄), 128.12+128.23 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.88+128.89 (4C, Ph'-C_{3/5}), 130.57 (Ph-C₆), 138.37+138.69 (2C, Ph'-C₁), 157.18 (Ph-C₂), 158.28 (Ph-C₄), 174.95 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 475.3 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-(2,5-diphenethoxybenzyl)hexanoat 88 (MH76)

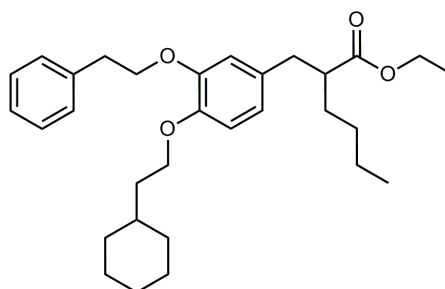


$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu- CH_3), 0.99-1.05 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et- CH_3), 1.13-1.19 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.20-1.49 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.51-2.59 (m, 3H, Prop- C_3H_2 + Prop- C_2H), 2.93-3.01 (q, 4H, J = 6.6 Hz, Ph'- CH_2), 3.93-4.01 (q, 2H, J = 7.0 Hz, O- CH_2), 4.02-4.13 (m, 4H, Ph-O- CH_2), 6.57-6.58 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Ph- C_6), 6.71-6.75 (dd, 1H, J = 3.0; 8.9 Hz, Ph- C_4), 6.82-6.85 (d, 1H, J = 8.9 Hz, Ph- C_3), 7.19-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.74 (Bu- CH_3), 14.03 (Et- CH_3), 21.96 (Bu- CH_2), 28.82 (Bu- CH_2), 31.46 (Bu- CH_2), 32.93 (Prop- C_3), 34.97+35.25 (2C, Ph'- CH_2), 44.86 (Prop- C_2), 59.43 (O- CH_2), 68.46+68.67 (2C, Ph-O- CH_2), 112.38 (Ph- C_3), 112.55 (Ph- C_4), 117.13 (Ph- C_6), 126.13+126.18 (2C, Ph'- C_4), 128.15+128.23 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.40 (Ph- C_1), 128.87+128.92 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 138.46+138.79 (2C, Ph'- C_1), 150.51 (Ph- C_5), 151.81 (Ph- C_2), 174.87 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 475.1 $[\text{M}+1]^+$.

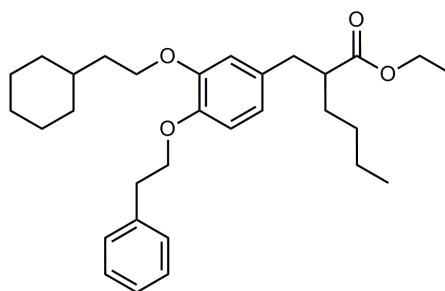
Charakterisierung von Ethyl 2-[3,4-bis(2-cyclohexylethoxy)benzyl]hexanoat 89 (MH114)



$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 0.89-1.24 (m, 15H, Et- CH_3 , Bu- CH_2 , Cyclohex-H), 1.38-1.77 (m, 20H, Cyclohex-H + - CH_2 , Bu- CH_2), 2.53-2.73 (m, 2H, Prop- C_2H + C_3H), 3.39-3.46 (m, 1H, Prop- C_3H), 3.87-4.00 (m, 6H, Ph-O- CH_2 + O- CH_2), 6.59-6.62 (dd, 1H, J = 1.6; 8.1 Hz, Ph- C_6), 6.72-6.73 (d, 1H, J = 1.6 Hz, Ph- C_2), 6.79-6.81 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ph- C_5). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.73 (Bu- CH_3), 14.04 (Et- CH_3), 21.96 (Bu- CH_2), 25.76 (4C, Cyclohex- $\text{C}_{3/5}$), 26.04 (2C, Cyclohex- C_4), 28.83 (Bu- CH_2), 31.27 (Bu- CH_2), 32.71 (4C, Cyclohex- $\text{C}_{2/6}$), 34.03 (2C, Cyclohex- CH_2), 36.20 (2C, Cyclohex- C_1), 37.44 (Prop- C_3), 46.98 (Prop- C_2), 59.47 (O- CH_2), 66.27+66.43 (2C, Ph-O- CH_2), 113.85 (Ph- C_2), 114.57 (Ph- C_5), 120.91 (Ph- C_6), 131.86 (Ph- C_1), 146.97 (Ph- C_4), 148.29 (Ph- C_3), 174.78 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 487.7 $[\text{M}+1]^+$.

Charakterisierung von Ethyl 2-[4-(2-cyclohexylethoxy)-3-phenethoxybenzyl]hexanoat 90**(MH116)**

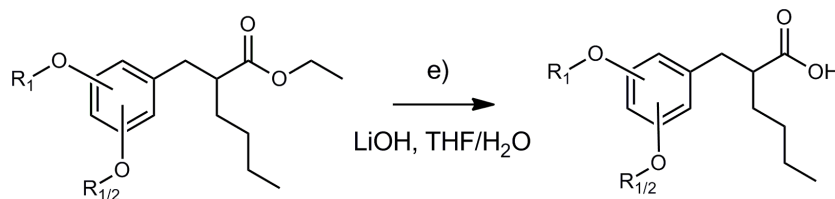
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.78-0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 0.86-0.97 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.01-1.06 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et-CH₃), 1.15-1.77 (m, 17H, Bu-CH₂ + Cyclohex-H + -CH₂), 2.50-2.72 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + -C₂H), 2.97-3.01 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH₂), 3.85-3.98 (m, 4H, Ph-C₄-O-CH₂ + O-CH₂), 4.07-4.12 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-C₃-O-CH₂), 6.60-6.63 (dd, 1H, J = 1.9; 8.1 Hz, Ph-C₆), 6.74 (d, 1H, J = 1.9 Hz, Ph-C₂), 6.80-6.82 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ph-C₅), 7.17-7.34 (m, 5H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.73 (Bu-CH₃), 14.04 (Et-CH₃), 21.96 (Bu-CH₂), 25.73 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.04 (Cyclohex-C₄), 28.82 (Bu-CH₂), 31.30 (Bu-CH₂), 32.70 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.96 (Cyclohex-C₁), 35.13 (Cyclohex-CH₂), 36.27 (Ph'-CH₂), 37.41 (Prop-C₃), 46.97 (Prop-C₂), 59.47 (O-CH₂), 66.40 (Ph-C₄-O-CH₂), 69.04 (Ph-C₃-O-CH₂), 113.80 (Ph-C₂), 114.52 (Ph-C₅), 121.09 (Ph-C₆), 126.16 (Ph'-C₄), 128.13 (2C, Ph'-C_{2/6}), 128.90 (2C, Ph'-C_{3/5}), 131.86 (Ph-C₁), 138.53 (Ph'-C₁), 146.88 (Ph-C₄), 147.97 (Ph-C₃), 174.79 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 481.5 [M+1]⁺.

Charakterisierung von Ethyl 2-[3-(2-cyclohexylethoxy)-4-phenethoxybenzyl]hexanoat 91**(MH126)**

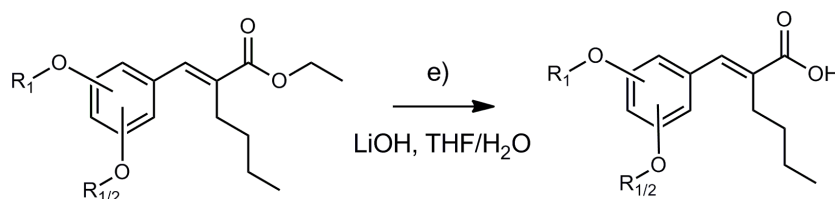
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 0.87-1.73 (m, 23H, Bu-CH₂, Et-CH₃, Cyclohex-H + -CH₂), 2.52-2.73 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + -C₂H), 2.95-2.99 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH₂), 3.87-3.99 (m, 4H, Ph-C₃-O-CH₂ + OCH₂), 4.06-4.11 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-C₄-O-CH₂), 6.59-6.62 (dd, 1H, J = 1.8; 8.2 Hz, Ph-C₆), 6.73 (d, 1H, J = 1.8 Hz, Ph-C₂), 6.80-6.83 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Ph-C₅), 7.17-7.33 (m, 5H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.73 (Bu-CH₃), 14.05 (Et-CH₃), 21.96 (Bu-CH₂), 25.73 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.04 (Cyclohex-C₄), 28.82 (Bu-CH₂), 31.27 (Bu-CH₂), 32.69 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.96 (Cyclohex-C₁), 35.17 (Cyclohex-CH₂), 36.21 (Ph'-CH₂), 37.42 (Prop-C₃), 46.95 (Prop-C₂), 59.48 (O-CH₂), 66.25 (Ph-C₃-O-CH₂), 69.11 (Ph-C₄-O-CH₂), 113.77 (Ph-C₂), 114.53 (Ph-C₅), 120.89 (Ph-C₆), 126.13 (Ph'-C₄), 128.11 (2C, Ph'-C_{2/6}), 128.99 (2C, Ph'-C_{3/5}), 132.05 (Ph-C₁), 138.58 (Ph'-C₁), 146.65 (Ph-C₄), 148.20 (Ph-C₃), 174.78 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 481.5 [M+1]⁺.

5.3.9 Arbeitsvorschrift zur Verseifung der Estergruppe

2-Benzylhexansäure-Derivate:



2-Benzylidenhexansäure-Derivate:



Die Verseifung findet nach der in Kapitel 5.2.5 beschriebenen Methode statt. Detaillierte Synthesebedingungen der einzelnen Derivate sind Tabelle 19 zu entnehmen.

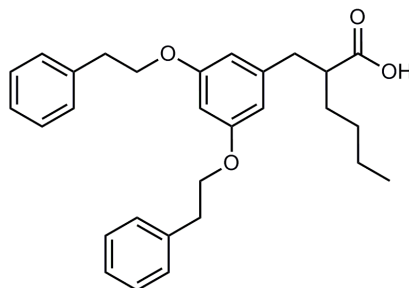
Tabelle 19 Synthesebedingungen

Substanz	E		LiOHxH ₂ O Menge in g (mmol)	Reak- tions- dauer (in h)	Ausbeute		Aussehen
	Edukt	Menge in g (mmol)			in %	in g	
2-Benzylhexansäure-Derivate							
23 (MH85)	84	0.40 (0.8)	0.18 (4.2)	22	76.3	0.28	Farbloses Öl
27 (MH74)	85	0.31 (0.6)	0.14 (3.3)	8	89.0	0.26	Farbloses Öl
28 (MH73)	86	0.31 (0.7)	0.14 (3.3)	24	84.5	0.25	Farbloses Öl
29 (MH78)	87	0.26 (0.5)	0.11 (2.7)	40	73.6	0.18	Braunes Öl
30 (MH77)	88	0.40 (0.8)	0.18 (4.2)	72	85.1	0.32	Weißer Feststoff
36 (MH115)	89	0.40 (0.8)	0.17 (4.1)	17	75.7	0.28	Farbloses Öl
37 (MH118)	90	0.55 (1.1)	0.23 (5.7)	24	63.8	0.33	Farbloses Öl
38 (MH127)	91	0.40 (0.8)	0.17 (4.1)	6	71.4	0.27	Farbloses Öl
2-Benzylidenhexansäure-Derivate							
24 (MH95)	72	0.40 (0.8)	0.17 (4.1)	7	93.1	0.35	Weißer Feststoff
31 (MH147)	76	0.31 (0.6)	0.14 (3.3)	24	76.4	0.22	Weißer Feststoff
32 (MH164)	77	0.12 (0.2)	0.05 (1.2)	9	45.1	0.05	Weißer Feststoff
33 (MH166)	78	0.31 (0.5)	0.10 (4.3)	24	52.4	0.15	Weißer Feststoff
34 (MH163)	79	0.21 (0.4)	0.08 (1.8)	20	70.7	0.14	Weißer Feststoff
35 (MH167)	80	0.09 (0.2)	0.04 (0.9)	40	50.7	0.05	Weißer Feststoff

5.3.10 Charakterisierung der Endprodukte 23-38

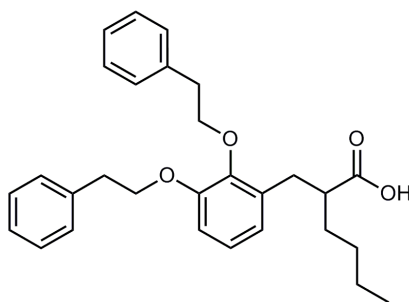
a) 2-Benzylhexansäure-Derivate

Charakterisierung von 2-(3,5-Diphenethoxybenzyl)hexansäure 23 (MH85)



$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.79-0.84 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.14-1.23 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.37-1.48 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.48-2.73 (m, 3H, Prop- C_3H_2 + Prop- C_2H), 2.96-3.01 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'- CH_2), 4.09-4.13 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-O- CH_2), 6.29-6.31 (m, 3H, Ph-H), 7.17-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.79 (Bu- CH_3), 22.02 (Bu- CH_2), 28.86 (Bu- CH_2), 31.33 (Bu- CH_2), 32.67 (Prop- C_3), 34.91 (2C, Ph'- CH_2), 46.56 (Prop- C_2), 68.01 (2C, Ph-O- CH_2), 98.74 (Ph- C_4), 107.48 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 126.20 (2C, Ph'- C_4), 128.24 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.90 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 138.34 (2C, Ph'- C_4), 141.95 (Ph- C_1), 159.60 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 176.29 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 447.5 $[\text{M}+1]^+$. **Anal.** ($\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_4$ [446.25]) C, H: ber. C: 78.00, H: 7.67, gef. C: 77.61, H: 7.94, Abw. C: 0.39, H: 0.27.

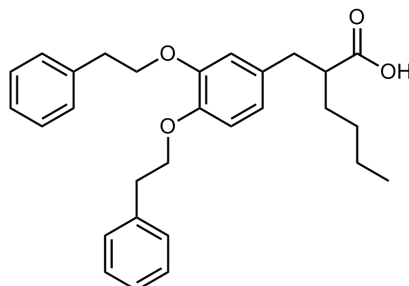
Charakterisierung von 2-(2,3-Diphenethoxybenzyl)hexansäure 27 (MH78)



$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78-0.82 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.13-1.30 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.30-1.39 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.38-2.50 (m, 1H, Prop- C_2H), 2.50-2.61 (m, 2H, Prop- C_3H_2), 2.87-2.91 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph'- CH_2), 2.99-3.03 (t, 2H, J = 6.4 Hz, Ph'- CH_2), 3.99-4.03 (m, 2H, Ph-O- CH_2), 4.14-4.18 (t, 2H, J = 6.4 Hz, Ph-O- CH_2), 6.62-6.65 (t, 1H, J = 4.6 Hz, Ph- C_5), 6.85-6.87 (d, 2H, J = 4.6 Hz, Ph- $\text{C}_{4/6}$), 7.16-7.30 (m, 10H, Ph'-H), 11.94 (s/ br, 1H, COOH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.90 (Bu- CH_3), 22.01 (Bu- CH_2), 28.96 (Bu- CH_2), 31.24 (Bu- CH_2), 32.47 (Prop- C_3), 35.01+36.18 (2C, Ph'- CH_2), 45.70 (Prop- C_2), 68.54+72.42 (2C, Ph-O- CH_2), 111.77 (Ph- C_4), 122.06 (Ph- C_5), 123.25 (Ph- C_6), 126.03+126.16 (2C, Ph'- C_4), 128.15+128.20 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.77+128.85

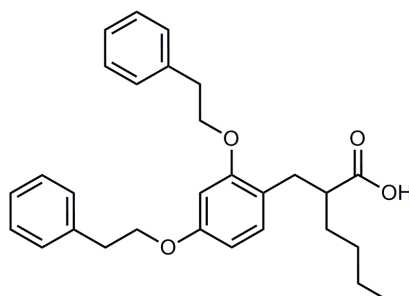
(4C, Ph^c-C_{3/5}), 133.02 (Ph-C₁), 138.53+138.68 (4C, Ph^c-C₁), 145.73 (Ph-C₂), 151.32 (Ph-C₁), 176.38 (COOH). **MS (ESI⁺):** $m/e = 464.4$ [M+OH]⁺. **Anal. (C₂₉H₃₄O₄ [446.25])** C, H: ber. C: 78.00, H: 7.67, gef. C: 77.77, H: 7.89, Abw. C: 0.23, H: 0.22.

Charakterisierung von 2-(3,4-Diphenethoxybenzyl)hexansäure 28 (MH73)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.79-0.83$ (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.14-1.22 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.23-1.50 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.45-2.58 (m, 2H, Prop-C₃H + Prop-C₂H), 2.58-2.69 (m, 1H, Prop-C₃H), 2.96-3.01 (m, 4H, Ph^c-CH₂), 4.05-4.10 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.66 (dd, 1H, J = 1.8; 8.3 Hz, Ph-C₆), 6.77-6.78 (d, 1H, J = 1.8 Hz, Ph-C₂), 6.81-6.84 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Ph-C₅), 7.20-7.33 (m, 10H, Ph^c-H), 12.02 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** $\delta = 13.79$ (Bu-CH₃), 22.05 (Bu-CH₂), 28.93 (Bu-CH₂), 31.21 (Bu-CH₂), 35.17+35.22 (2C, Ph^c-CH₂), 37.32 (Prop-C₃), 46.93 (Prop-C₂), 69.06+69.15 (2C, Ph-O-CH₂), 113.81 (Ph-C₅), 114.66 (Ph-C₂), 121.13 (Ph-C₆), 126.16+126.19 (2C, Ph^c-C₄), 128.19 (4C, Ph^c-C_{2/6}), 129.03 (4C, Ph^c-C_{3/5}), 132.51 (Ph-C₁), 138.49+138.55 (2C, Ph^c-C₁), 146.58 (Ph-C₃), 147.92 (Ph-C₄), 176.42 (COOH). **MS (ESI⁻):** $m/e = 445.3$ [M-1]⁻. **Anal. (C₂₉H₃₄O₄ [446.25])** C, H: ber. C: 78.00, H: 7.67, gef. C: 78.06, H: 7.65, Abw. C: 0.06, H: 0.02.

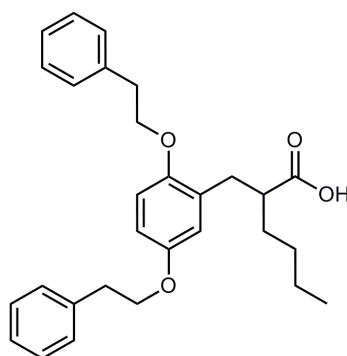
Charakterisierung von 2-(2,4-Diphenethoxybenzyl)hexansäure 29 (MH74)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.79-0.83$ (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.11-1.22 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.27-1.53 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.32-2.60 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + Prop-C₂H), 2.96-3.02 (q, 4H, J = 6.4 Hz, Ph^c-CH₂), 4.05-4.15 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.35-6.39 (dd, 1H, J = 2.3; 8.2 Hz, Ph-C₅), 6.47-6.48

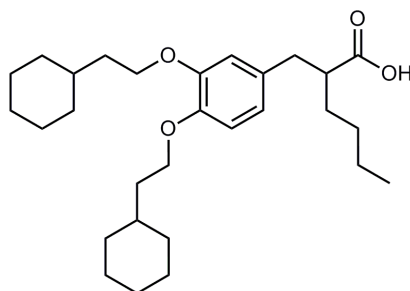
(d, 1H, $J = 2.3$ Hz, Ph-C₃), 6.87-6.90 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, Ph-C₆), 7.17-7.33 (m, 10H, Ph'-H), 12.02 (s/br, 1H, COOH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 13.64$ (Bu-CH₃), 22.07 (Bu-CH₂), 28.89 (Bu-CH₂), 31.43 (Bu-CH₂), 32.19 (Prop-C₃), 34.99+35.11 (2C, Ph'-CH₂), 45.10 (Prop-C₂), 68.08+68.19 (2C, Ph-O-CH₂), 99.18 (Ph-C₃), 105.08 (Ph-C₅), 119.68 (Ph-C₁), 126.14+126.22 (2C, Ph'-C₄), 128.15+128.27 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.92+128.97 (4C, Ph'-C_{3/5}), 130.61 (Ph-C₆), 138.38+138.71 (2C, Ph'-C₁), 157.19 (Ph-C₂), 158.18 (Ph-C₄), 176.67 (COOH). MS (ESI-): $m/e = 445.3$ [M-1]⁻. Anal. (C₂₉H₃₄O₄ [446.25]) C, H: ber. C: 78.00, H: 7.67, gef. C: 78.18, H: 8.03, Abw. C: 0.18, H: 0.36.

Charakterisierung von 2-(2,5-Diphenethoxybenzyl)hexansäure 30 (MH77)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.78$ -0.83 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, Bu-CH₃), 1.15-1.40 (m, 6H, Bu-CH₂), 2.47-2.49 (m, 1H, Prop-C₂H), 2.55-2.58 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, Prop-C₃H₂), 2.93-3.00 (q, 4H, $J = 6.4$; 8.9 Hz, Ph'-CH₂), 4.01-4.09 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.60-6.61 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, Ph-C₆), 6.66-6.69 (dd, 1H, $J = 2.9$; 8.7 Hz, Ph-C₄), 6.80-6.82 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, Ph-C₃), 7.16-7.31 (m, 10H, Ph'-H), 11.95 (s/br, 1H, COOH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 13.77$ (Bu-CH₃), 22.02 (Bu-CH₂), 28.88 (Bu-CH₂), 31.51 (Bu-CH₂), 32.68 (Prop-C₃), 34.99+35.26 (2C, Ph'-CH₂), 44.92 (Prop-C₂), 68.40+68.70 (2C, Ph-O-CH₂), 112.23 (Ph-C₃), 112.33 (Ph-C₄), 117.19 (Ph-C₆), 126.10+126.17 (2C, Ph'-C₄), 128.13+128.24 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.85+128.92 (4C, Ph'-C_{3/5}), 138.43+138.75 (2C, Ph'-C₁), 150.52 (Ph-C₅), 151.78 (Ph-C₂), 176.50 (COOH). MS (ESI-): $m/e = 445.4$ [M-1]⁻. Anal. (C₂₉H₃₄O₄ [446.25]) C, H: ber. C: 78.00, H: 7.67, gef. C: 77.77, H: 7.66, Abw. C: 0.23, H: 0.01.

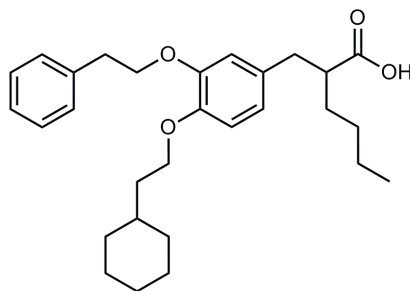
Charakterisierung von 2-[3,4-Bis-(2-cyclohexylethoxy)benzyl]hexansäure 36 (MH115)



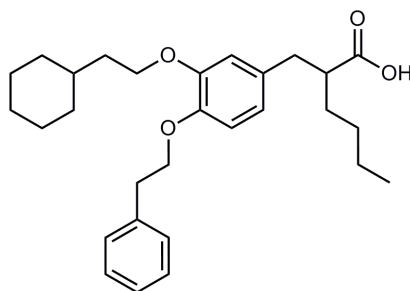
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.99 (m, 7H, Bu-CH₃ + Bu-CH₂), 1.05-1.75 (m, 28H, Bu-CH₂ + Cyclohex-H + -CH₂), 2.44-2.75 (m, 3H, Prop-C₃H₂ + C₂H), 3.88-3.98 (q, 4H, J = 6.2 Hz, Ph-O-CH₂), 6.61-6.64 (dd, 1H, J = 1.8; 8.1 Hz, Ph-C₆), 6.75-6.81 (m, 2H, Ph-C_{2/5}), 12.05 (s/br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.78 (Bu-CH₃), 22.04 (Bu-CH₂), 25.77 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.05 (2C, Cyclohex-C₄), 28.92 (Bu-CH₂), 31.16 (Bu-CH₂), 32.72 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.04 (2C, Cyclohex-CH₂), 36.24 (2C, Cyclohex-C₁), 37.31 (Prop-C₃), 46.90 (Prop-C₂), 66.28+66.42 (2C, Ph-O-CH₂), 113.77 (Ph-C₂), 114.63 (Ph-C₅), 120.91 (Ph-C₆), 146.92 (Ph-C₄) 148.27 (Ph-C₃), 176.43 (COOH). **MS (ESI-):** m/e = 457.6 [M-1]⁻. **Anal. (C₂₉H₄₆O₄ [458.67])** C, H: ber. C: 75.94, H: 10.11, gef. C: 76.07, H: 10.26, Abw. C: 0.13, H: 0.15.

Charakterisierung von 2-[4-(2-Cyclohexylethoxy)-3-phenethoxybenzyl]hexansäure 37

(MH118)



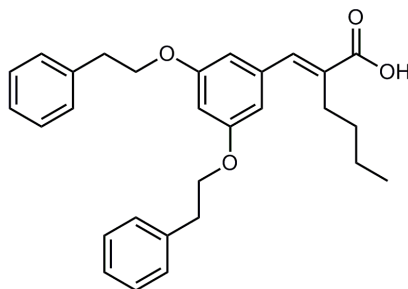
¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-0.83 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 0.85-1.30 (m, 9H, Bu-CH₂ + Cyclohex-H), 1.34-1.73 (m, 10H, Cyclohex-H + CH₂ + Bu-CH₃), 2.45-2.59 (m, 2H, Prop-C₂H + C₃H), 2.66-2.74 (dd, 1H, J = 5.0; 8.4 Hz, Prop-C₃H), 2.96-3.01 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH₂), 3.86-3.90 (t, 2H, J = 6.4 Hz, Ph-C₄-O-CH₂), 4.08-4.12 (t, 2H, J = 6.8 Hz, Ph-C₃-O-CH₂), 6.62-6.66 (dd, 1H, J = 1.8; 8.1 Hz, Ph-C₆), 6.76 (d, 1H, J = 1.8 Hz, Ph-C₂), 6.79-6.82 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Ph-C₅), 7.18-7.34 (m, 5H, Ph'-H), 12.05 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.77 (Bu-CH₃), 22.03 (Bu-CH₂), 25.74 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.04 (Cyclohex-C₄), 28.92 (Bu-CH₂), 31.20 (Bu-CH₂), 32.71 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 33.97 (Cyclohex-CH₂), 35.16 (Ph'-CH₂), 36.31 (Cyclohex-C₁), 37.31 (Prop-C₃), 46.94 (Prop-C₂), 66.39 (Ph-C₄-O-CH₂), 69.02 (Ph-C₃-O-CH₂), 113.75 (Ph-C₂), 114.58 (Ph-C₅), 121.10 (Ph-C₆), 126.16 (Ph'-C₄), 128.13 (2C, Ph'-C_{2/6}), 129.02 (2C, Ph'-C_{3/5}), 132.26 (Ph-C₁), 138.54 (Ph'-C₁), 146.83 (Ph-C₄) 147.93 (Ph-C₃), 176.42 (COOH). **MS (ESI-):** m/e = 451.3 [M-1]⁻. **Anal. (C₂₉H₄₀O₄ [452.29])** C, H: ber. C: 76.95, H: 8.91, gef. C: 77.01, H: 8.95, Abw. C: 0.06, H: 0.04.

Charakterisierung von 2-[3-(2-Cyclohexylethoxy)-4-phenethoxybenzyl]hexansäure 38**(MH127)**

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.79-0.85 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu- CH_3), 0.91-1.74 (m, 20H, Bu- CH_2 , Cyclohex-H + - CH_2), 2.47-2.71 (m, 3H, Prop- C_3H_2 + - C_2H), 2.96-3.00 (t, 2H, J = 6.6 Hz, Ph'- CH_2), 3.87-3.91 (t, 2H, Ph- C_3 -O- CH_2), 4.07-4.11 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Ph- C_4 -O- CH_2), 6.61-6.64 (dd, 1H, J = 1.8; 8.1 Hz, Ph- C_6), 6.76 (d, 1H, J = 1.8 Hz, Ph- C_2), 6.80-6.83 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Ph- C_5), 7.20-7.34 (m, 5H, Ph'-H), 12.06 (s/ br, 1H, COOH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.77 (Bu- CH_3), 22.04 (Bu- CH_2), 25.74 (2C, Cyclohex- $\text{C}_{3/5}$), 26.06 (Cyclohex- C_4), 28.91 (Bu- CH_2), 31.15 (Bu- CH_2), 32.72 (2C, Cyclohex- $\text{C}_{2/6}$), 34.00 (Cyclohex- C_1), 35.23 (Cyclohex- CH_2), 36.27 (Ph'- CH_2), 37.31 (Prop- C_3), 46.88 (Prop- C_2), 66.36 (Ph- C_3 -O- CH_2), 69.19 (Ph- C_4 -O- CH_2), 113.87 (Ph- C_2), 114.73 (Ph- C_5), 120.94 (Ph- C_6), 126.14 (Ph'- C_4), 128.13 (2C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.99 (2C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 132.53 (Ph- C_1), 138.62 (Ph'- C_1), 146.66 (Ph- C_4), 148.26 (Ph- C_3), 176.40 (COOH). **MS (ESI+):** m/e = 453.5 $[\text{M}+1]^+$. **Anal.** ($\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_4$ [452.29]) C, H: ber. C 76.95, H: 8.91, gef. C: 76.69, H: 8.87, Abw. C: 0.26, H: 0.04.

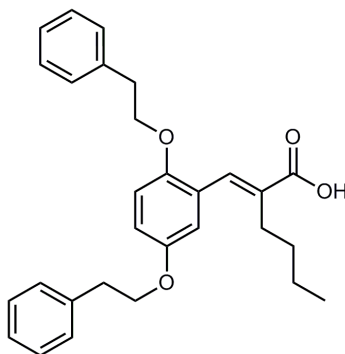
b) 2-Benzylidenhexansäure-Derivate

Charakterisierung von 2-(3,5-Diphenethoxybenzyliden)hexansäure 24 (MH95)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.77-0.82 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.24-1.27 (m, 2H, Bu-CH₂), 1.29-1.40 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.35-2.40 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.98-3.03 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'-CH₂), 4.15-4.19 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH₂), 6.48-6.53 (dd, 3H, J = 1.7; 9.2 Hz, Ph-H), 7.20-7.28 (m, 10H, Ph'-H), 7.44 (s, 1H, C=CH), 12.0 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.64 (Bu-CH₃), 22.38 (Bu-CH₂), 27.03 (Bu-CH₂), 30.91 (Bu-CH₂), 34.85 (2C, Ph'-CH₂), 68.26 (2C, Ph-O-CH₂), 101.41 (Ph-C₄), 107.61 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.25 (2C, Ph'-C₄), 128.26 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.92 (4C, Ph'-C_{3/5}), 134.19 (Ph-C₁), 137.25 (CH-COO), 137.47 (Ph-C=CH), 138.26 (2C, Ph'-C₁), 159.53 (2C, Ph-C_{3/5}), 169.04 (COOH). **MS (ESI-):** *m/e* = 443.5 [M-1]⁻. **Anal.** (C₂₉H₃₂O₄ [444.23]) C, H: ber. C: 78.35, H: 7.26, gef. C: 78.28, H: 7.27, Abw. C: 0.07, H: 0.01.

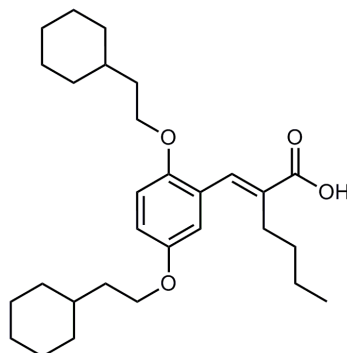
Charakterisierung von 2-(2,5-Diphenethoxybenzyliden)hexansäure 31 (MH147)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.73-0.78 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.16-1.45 (m, 4H, Bu-CH₂), 2.26-2.33 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.94-3.01 (m, 4H, Ph'-CH₂), 4.08-4.13 (q, 4H, J = 6.7 Hz, Ph-O-CH₂), 6.76-6.77 (m, 1H, Ph-C₆), 6.85-6.97 (m, 2H, Ph-C_{3/4}), 7.17-7.31 (m, 10H, Ph'-H), 7.63 (s, 1H, C=CH), 12.4 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.58 (Bu-CH₃), 22.21 (Bu-CH₂), 26.91 (Bu-CH₂), 30.91 (Bu-CH₂), 34.93+35.11 (2C, Ph'-CH₂), 68.66+69.09 (2C, Ph-O-CH₂), 113.14 (Ph-C₆), 115.12 (Ph-C₄), 115.62 (Ph-C₃), 125.00 (Ph-C₁), 126.13+126.18 (2C, Ph'-C₄), 128.09+128.19 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.84+129.11 (4C, Ph'-C_{3/5}), 133.39 (CH-COO), 133.49 (Ph-C=CH), 138.28+138.45 (2C, Ph'-C₁), 150.58 (Ph-C₂), 152.81 (Ph-C₅), 168.99 (COOH). **MS (ESI-):** *m/e* =

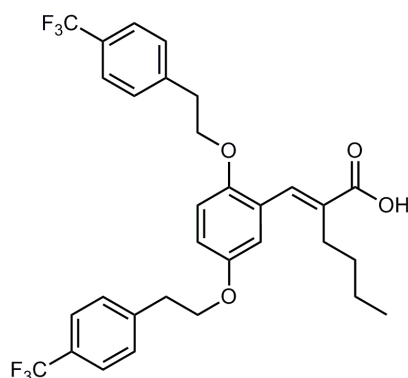
443.3 [M-1]. **Anal.** (C₂₉H₃₂O₄ [444.23]) C, H: ber. C: 78.35, H: 7.26, gef. C: 78.20, H: 7.35, Abw. C: 0.15, H: 0.11.

Charakterisierung von 2,5-Bis-[(2-cyclohexylethoxy)benzyliden]hexansäure 32 (MH164)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-0.85 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Bu-CH₃), 0.88-1.75 (m, 30H, Cyclohex-H + -CH₂ + Bu-CH₂), 2.31-2.36 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.90-3.96 (q, 4H, J = 6.4 Hz, Ph-O-CH₂), 6.77-6.78 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Ph-C₆), 6.85-6.89 (dd, 1H, J = 3.0; 8.9 Hz, Ph-C₄), 6.94-6.97 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ph-C₃), 7.63 (s, 1H, C=CH), 12.39 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.68 (Bu-CH₃), 22.36 (Bu-CH₂), 25.75 (4C, Cyclohex-C_{3/5}), 26.04 (2C, Cyclohex-C₄), 27.01 (Bu-CH₂), 31.00 (Bu-CH₂), 32.70 (4C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.10 (2C, Cyclohex-CH₂), 36.06 (2C, Cyclohex-C₁), 65.95+66.70 (2C, Ph-O-CH₂), 113.79 (Ph-C₆), 114.79 (Ph-C₃), 115.83 (Ph-C₄), 125.11 (Ph-C₁), 133.43 (C=C-COO), 133.63 (Ph-C=C), 150.75 (Ph-C₂), 152.03 (Ph-C₅), 169.02 (COOH). **MS (ESI):** *m/e* = 455.9 [M-1]. **Anal.** (C₂₉H₄₄O₄ [456.66]) C, H: ber. C: 76.27, H: 9.71, gef. C: 76.02, H: 9.79, Abw. C: 0.25, H: 0.08.

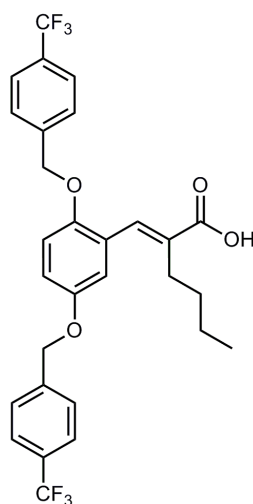
Charakterisierung von 2,5-Bis-[[4-(trifluormethyl)phenethoxy]benzyliden]hexansäure 33 (MH166)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.64-0.68 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu-CH₃), 1.09-1.46 (m, 4H, Bu-CH₂), 2.30-2.36 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.15-3.29 (m, 4H, Ph^t-CH₂), 4.14-4.32 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.78-

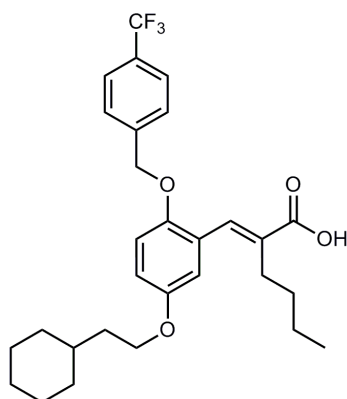
6.82 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, Ph-C₆), 6.94-7.04 (m, 2H, Ph-C_{3/4}), 7.56-7.70 (m, 9H, Ph'-H + C=CH), 12.63 (s/ br, 1H, COOH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 13.44$ (Bu-CH₃), 22.09 (Bu-CH₂), 26.77 (Bu-CH₂), 30.81 (Bu-CH₂), 34.62+34.82 (2C, Ph'-CH₂), 68.08+68.44 (2C, Ph-O-CH₂), 113.04 (Ph-C₆), 115.21 (Ph-C₄), 115.54 (Ph-C₃), 122.57 (Ph-C₁), 124-125 (2C, -CF₃), 124.78+124.94 (4C, Ph'-C_{3/5}), 129.71+129.87 (4C, Ph'-C_{2/6}), 134.67 (2C, Ph'-C₄), 143.48+143.64 (2C, Ph'-C₁), 133.34 (C=C-COO), 133.57 (Ph-C=C), 150.50 (Ph-C₂), 151.69 (Ph-C₅), 168.94 (COOH). MS (ESI+): $m/e = 581.9$ [M+1]⁺. Anal. (C₃₁H₃₀F₆O₄ [580.20]) C, H: ber. C: 64.13, H: 5.21, gef. C: 64.19, H: 5.06, Abw. C: 0.06, H: 0.15.

Charakterisierung von 2-{2,5-Bis-[4-(trifluormethyl)benzyloxy]benzyliden}hexansäure 34 (MH163)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 0.72$ -0.77 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, Bu-CH₃), 1.08-1.38 (m, 4H, Bu-CH₂), 2.24-2.29 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz, Bu-CH₂), 5.21 (s, 4H, Ph'-CH₂), 6.86-6.87 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Ph-C₆), 6.97-7.06 (m, 2H, Ph-C_{3/4}), 7.58-7.75 (m, 9H, Ph'-H + C=CH), 12.47 (s, 1H, COOH). ¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 13.53$ (Bu-CH₃), 22.00 (Bu-CH₂), 26.62 (Bu-CH₂), 30.67 (Bu-CH₂), 68.66+69.13 (2C, Ph-O-CH₂), 114.07 (Ph-C₆), 115.63 (Ph-C₄), 116.03 (Ph-C₃), 122.35 (Ph-C₁), 122-127 (2C, -CF₃), 125.22+125.31 (4C, Ph'-C_{3/5}), 127.68 (4C, Ph'-C_{2/6}), 129.56 (2C, Ph'-C₄), 133.30 (CH-COO), 134.14 (Ph-C=C), 142.10 (2C, Ph'-C₁), 150.18 (Ph-C₂), 151.64 (Ph-C₅), 167.19 (COOH). MS (ESI-): $m/e = 551.9$ [M-1]⁻. Anal. (C₂₉H₂₆F₆O₄ [552.51]) C, H: ber. C: 63.04, H: 4.74, gef. C: 62.93, H: 4.73, Abw. C: 0.11, H: 0.01.

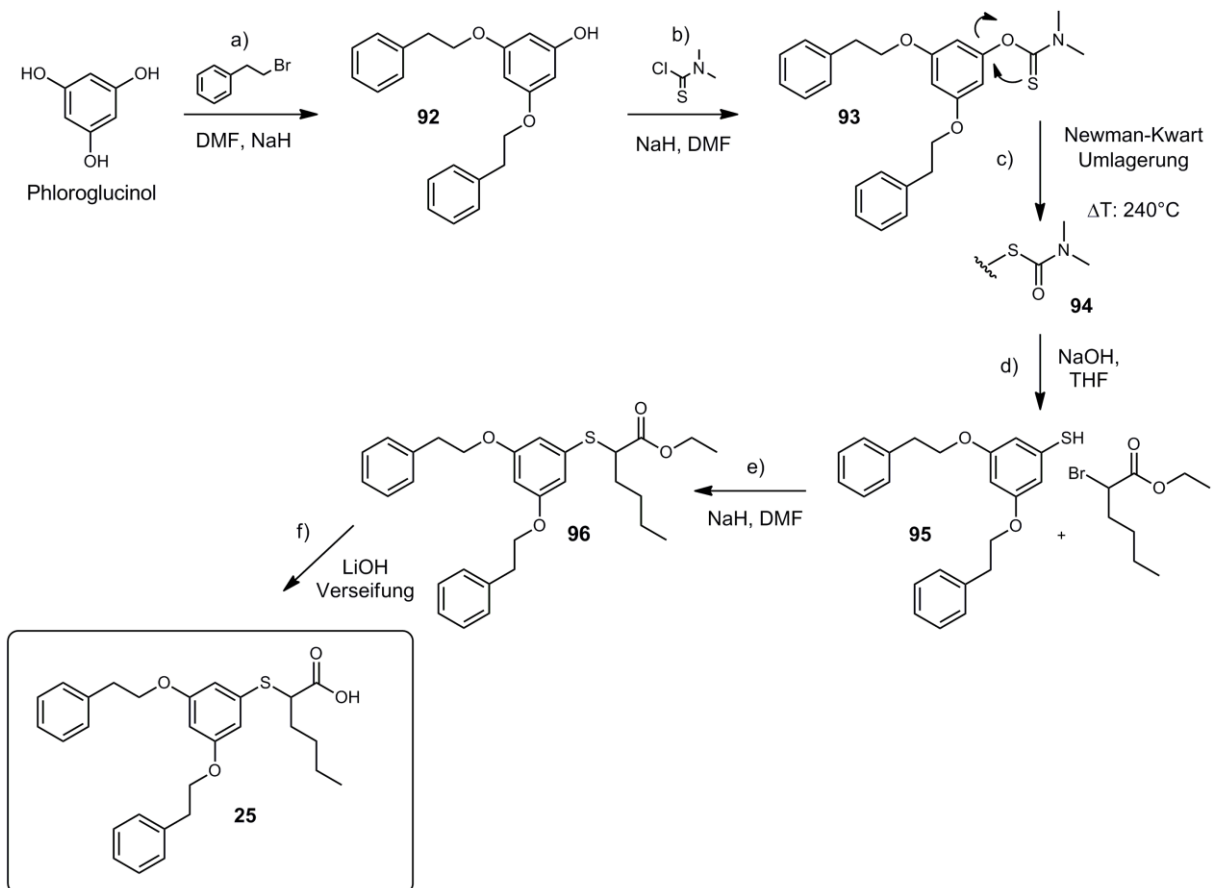
Charakterisierung von 2-{5-(2-Cyclohexylethoxy)-2-[(4-trifluormethyl)benzyloxy]-benzyliden}hexansäure 35 (MH167)



¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.79-1.73 (m, 20H, Cyclohex-H + -CH₂ + Bu-CH₂), 2.31-2.38 (m, 2H, Bu-CH₂), 3.91-3.96 (t, 2H, J = 8.1 Hz, Ph-O-CH₂), 5.20 (s, 2H, Ph'-CH₂), 6.80-7.90 (m, 2H, Ph-C_{6/4}), 6.99-7.01 (d, 1H, J = 8.9 Hz, Ph-C₃), 7.58-7.75 (m, 5H, Ph'-H + C=CH), 12.45 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.59 (Bu-CH₃), 22.86 (Bu-CH₂), 25.70 (2C, Cyclohex-C_{3/5}), 25.99 (Bu-CH₂), 27.01 (Cyclohex-C₄), 30.93 (Bu-CH₂), 32.66 (2C, Cyclohex-C_{2/6}), 34.09 (Cyclohex-CH₂), 36.00 (Cyclohex-C₁), 66.00 (Ph-C₅-CH₂), 69.27 (Ph'-CH₂), 114.19 (Ph-C₆), 115.03 (Ph-C₄), 115.70 (Ph-C₃), 122.40 (Ph-C₁), 125.22+125.48 (3C, -CF₃ + Ph'-C_{3/5}), 127.68 (2C, Ph'-C_{2/6}), 133.26 (C=C-COO), 134.01 (Ph-C=C), 135.10 (Ph'-C₄), 142.13 (Ph'-C₁), 149.88 (Ph-C₂), 152.44 (Ph-C₅), 167.21 (COOH). **MS (ESI-):** *m/e* = 503.9 [M-1]⁻. **Anal. (C₂₉H₃₅F₃O₄ [504.58])** C, H: ber. C: 69.03, H: 6.99, gef. C: 68.90, H: 7.11, Abw. C: 0.13, H: 0.12.

5.4 Synthese und Charakterisierung von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure 25

Syntheschema:

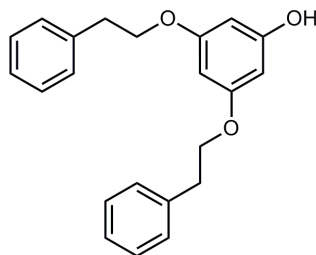


5.4.1 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 92

2.4 g Natriumhydrid (95%; 90 mmol) wird in einen Dreihalskolben eingewogen und mit ca. 50 ml absolutem DMF suspendiert. Nach Erzeugen einer Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wird Phloroglucinol (3.78 g, 30 mmol) nach und nach über eine Spritze zugegeben. Es entsteht eine braune Suspension. Nach 30-60 min wird Phenethylbromid (11.7 g, 63 mmol) hinzugefügt und für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es entsteht ein Gemisch aus verschiedenen veretherten Produkten. Die Mischung wird darauf mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen werden über MgSO_4 getrocknet und einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie und *n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase.

Produkt: oranger Feststoff, Ausbeute: 18.4% (1.84 g).

Charakterisierung von 3,5-Diphenethoxyphenol 92 (MH105)



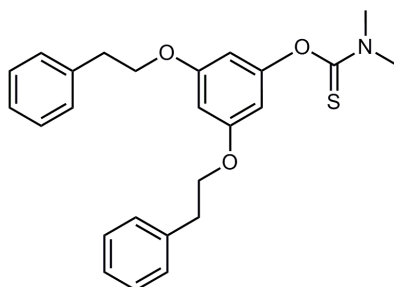
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 2.94-2.99 (t, 4H, J = 6.8 Hz, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 4.05-4.13 (m, 4H, Ph-O-CH_2), 5.90-5.92 (m, 3H, Ph-H), 7.17-7.31 (m, 10H, $\text{Ph}'\text{-H}$), 9.37 (s, 1H, $-\text{OH}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 34.86 (2C, $\text{Ph}'\text{-CH}_2$), 67.38 (2C, Ph-O-CH_2), 92.30 (Ph-C_4), 94.65 (2C, $\text{Ph-C}_{2/6}$), 126.46 ($\text{Ph}'\text{-C}_1$), 128.10 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{2/6}$), 128.87 (4C, $\text{Ph}'\text{-C}_{3/5}$), 138.40 (2C, $\text{Ph}'\text{-C}_4$), 159.04 (Ph-C_1), 160.22 (2C, $\text{Ph-C}_{3/5}$). **MS (ESI+):** m/e = 335.1 $[\text{M}+1]^+$.

5.4.2 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 93

0.16 g Natriumhydrid (95%; 6.3 mmol) wird in einem Dreihalskolben eingewogen und mit 5-10 ml absolutem DMF suspendiert. Nach Erzeugen einer Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wird **92** (1.7 g, 5.1 mmol) nach und nach über eine Spritze zugegeben. Nach 30-60 min wird Dimethylthiocarbamoylchlorid (0.62 g, 5.1 mmol) hinzugefügt und für weitere 5 Stunden bei 60°C gerührt. Die Mischung wird dann mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen werden über MgSO_4 getrocknet und einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie und *n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase.

Produkt: farbloses Öl, Ausbeute: 65.4% (1.4 g).

Charakterisierung von O-(3,5-Diphenethoxyphenyl)dimethylcarbamoylthiolat **93** (MH123)



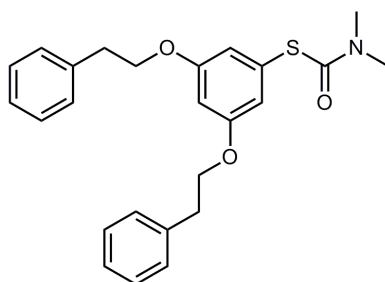
¹H-NMR (300.13 MHz, (CDCl₃): δ = 3.00-3.08 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'-CH₂), 3.31+3.39 (s, 6H, N-CH₃), 4.11-4.23 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 5.97-6.00 (m, 1H, Ph-H), 6.29-6.30 (m, 1H, Ph-H), 6.42-6.43 (m, 1H, Ph-H), 7.24-7.37 (m, 10H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CDCl₃):** δ = 35.35 (2C, Ph'-CH₂), 38.70 (2C, N-CH₃), 68.82 (2C, Ph-O-CH₂), 98.85 (Ph-C₄), 101.02 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.47 (2C, Ph'-C₄), 128.46 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.97 (4C, Ph'-C_{3/5}), 138.12 (2C, Ph'-C₁), 153.00 (Ph-C₁), 160.01 (2C, Ph-C_{3/5}), 187.42 (C=S). **MS (ESI+):** m/e = 422.3 [M+1]⁺.

5.4.3 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe **94**

Für die Umlagerung zum geschützten Thiolderivat wird eine *Newman-Kwart*-Umlagerung durchgeführt. Dabei wird die Vorstufe **93** ohne Verwendung von Lösungsmitteln für 5 h auf 240°C erhitzt. Es entsteht eine braune Lösung, die über Säulenchromatographie (*n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase) aufgereinigt werden kann.

Produkt: gelbes Öl. Ausbeute: 43.6% (0.61 g).

Charakterisierung von S-(3,5-diphenethoxyphenyl)dimethylcarbamoylthiolat **94** (MH124)

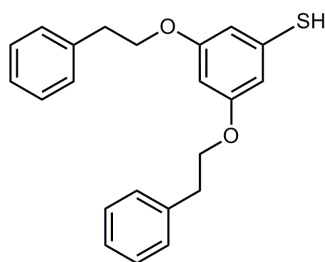


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 2.87-3.01 (m, 10H, N-CH₃ + Ph'-CH₂), 4.07-4.18 (m, 4H, Ph-O-CH₂), 6.23 (d, 1H, Ph-C₄), 6.52-6.57 (m, 2H, Ph-C_{2/6}), 7.17-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 34.78 (2C, Ph'-CH₃), 36.41 (2C, N-CH₃), 67.89 (2C, Ph-O-CH₂), 102.08 (Ph-C₄), 113.63 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.23 (2C, Ph'-C₄), 128.25 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.90 (4C, Ph'-C_{3/5}), 138.24 (2C, Ph'-C₁), 159.31 (2C, Ph-C_{3/5}), 159.50 (Ph-C₁), 164.63 (C=O). **MS (ESI+):** m/e = 422.3 [M+1]⁺.

5.4.4 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 95

Der nächste Schritt stellt die Entschützung zum freien Thiophenol dar. Dabei wird zunächst Vorstufe **94** (0.6 g, 1.4 mmol) in einer Mischung aus THF und MeOH gelöst. Nach Erhitzen auf 80°C wird 10 ml Natronlauge (1 mol/l) zur Lösung gegeben und für 3 h gerührt. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie führt zum sauberen Produkt als milchiges Öl. Ausbeute: 50.2% (0.25 g).

Charakterisierung von 3,5-Diphenethoxythiophenol 95 (MH129)

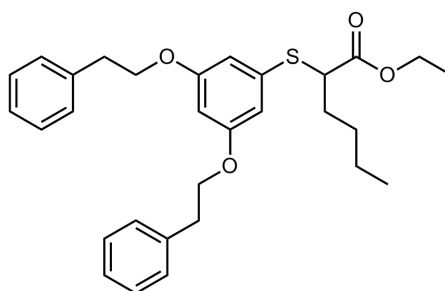


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 3.02-3.07 (t, 4H, J = 6.7 Hz, Ph'-CH₂), 4.15-4.21 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH₂), 5.40 (s, 2H, -SH), 6.28-6.30 (m, 1H, Ph-C₄), 6.50-6.51 (m, 2H, Ph-C_{2/6}), 7.23-7.40 (m, 10H, Ph'-CH₂). **MS (ESI-):** m/e = 349.1 [M-1].

5.4.5 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 96

0.02 g Natriumhydrid (95%; 0.85 mmol) wird in einen Dreihalskolben eingewogen und mit ca. 5-10 ml absolutem DMF suspendiert. Nach Erzeugen einer Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wird Vorstufe **95** (0.25 g, 0.71 mmol) nach und nach über eine Spritze zugegeben. Die Lösung färbt sich zitronengelb. Nach 30-60 min wird α -Brom-Ethylhexanoat (0.19 g, 0.85 mmol) hinzugefügt und für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird dann mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen werden über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie und *n*-Hexan/ Ethylacetat als mobile Phase. Produkt: rotes Öl, Ausbeute: 51.3% (0.18 g).

Charakterisierung von Ethyl 2-[(3,5-diphenethoxyphenyl)thio]hexanoat **96** (MH130)

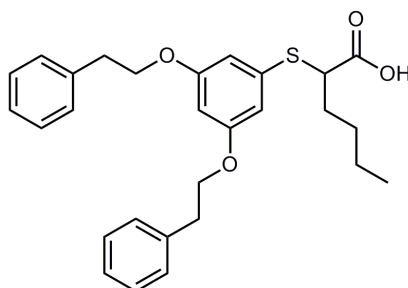


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.80-0.84 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.02-1.06 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Et-CH₃), 1.23-1.37 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.62-1.79 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.96-3.00 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'-CH₂), 3.86-3.90 (t, 1H, J = 6.5 Hz, S-CH), 3.98-4.05 (q, 2H, J = 6.3 Hz, O-CH₂), 4.12-4.17 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph-O-CH₂), 6.38-6.39 (m, 1H, Ph-C₄), 6.51 (d, 2H, J = 2.1 Hz, Ph-C_{2/6}), 7.17-7.30 (m, 10H, Ph'-H). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.67 (Bu-CH₃), 13.84 (Et-CH₃), 21.67 (Bu-CH₂), 28.63 (Bu-CH₂), 30.80 (Bu-CH₂), 34.78 (2C, Ph'-CH₂), 48.83 (S-CH), 60.64 (O-CH₂), 68.27 (2C, Ph-O-CH₂), 100.29 (Ph-C₄), 108.98 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.23 (2C, Ph'-C₄), 128.24 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.89 (4C, Ph'-C_{3/5}), 135.48 (Ph-C₁), 138.23 (2C, Ph'-C₁), 159.58 (2C, Ph-C_{3/5}), 171.62 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 493.3 [M+1]⁺. **Anal. (C₃₀H₃₆O₅ [492.23])** C, H, N: ber. C: 73.14, H: 7.37, S: 6.51, gef. C: 73.23, H: 7.48, S: 6.73, Abw. C: 0.09, H: 0.11, N: 0.22.

5.4.5 Synthese und Charakterisierung von Endprodukt **25**

Die Verseifung läuft nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Kap. 5.2.5 ab. Synthesebedingungen: **96** (0.13 g, 0.26 mmol), LiOH (0.05 g, 1.31 mmol), Reaktionsdauer: 3h, Produkt: gelbliches Öl, Ausbeute: 65.6% (0.12 g).

Charakterisierung von 2-[(3,5-Diphenethoxyphenyl)thio]hexansäure **25** (MH139)

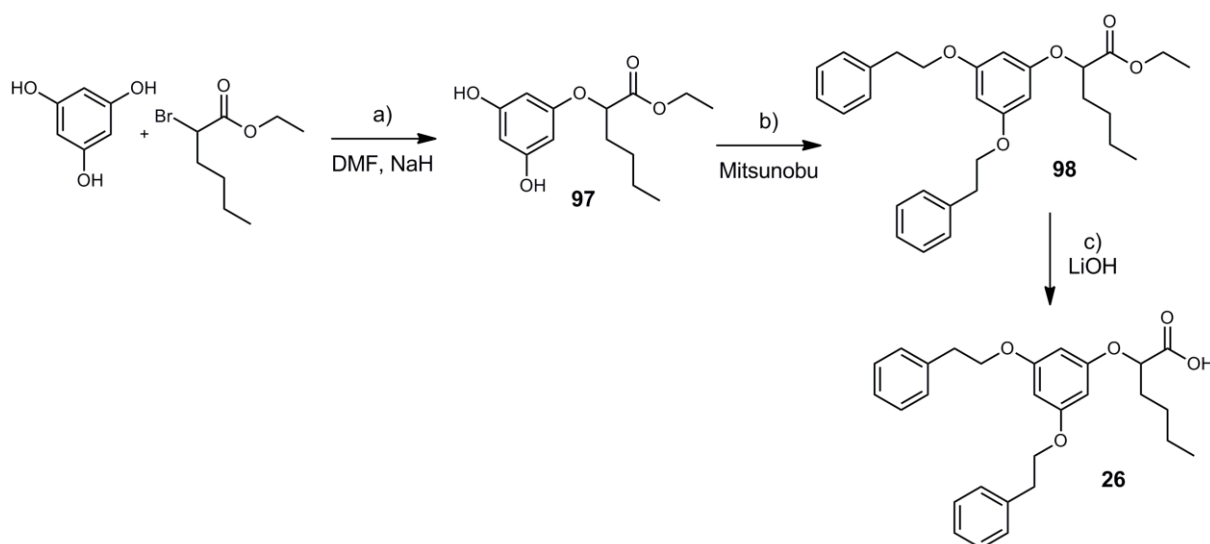


¹H-NMR (300.13 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 0.82-0.87 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu-CH₃), 1.24-1.41 (m, 4H, Bu-CH₂), 1.58-1.84 (m, 2H, Bu-CH₂), 2.98-3.04 (t, 4H, J = 6.5 Hz, Ph'-CH₂), 3.77-3.83 (t, 1H, J = 7.0 Hz, S-CH), 4.14-4.19 (t, 4H, J = 6.7 Hz, Ph-O-CH₂), 6.37-6.41 (m, 1H, Ph-C₄), 6.53-6.56 (m, 2H, Ph-C_{2/6}), 7.19-7.33 (m, 10H, Ph'-H), 12.75 (s/ br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (75.44 MHz, (CD₃)₂SO):** δ = 13.70

(Bu-CH₃), 21.72 (Bu-CH₂), 28.71 (Bu-CH₂), 31.01 (Bu-CH₂), 34.82 (2C, Ph'-CH₂), 49.09 (S-CH), 68.26 (2C, Ph-O-CH₂), 99.96 (Ph-C₄), 108.46 (2C, Ph-C_{2/6}), 126.24 (2C, Ph'-C₄), 128.26 (4C, Ph'-C_{2/6}), 128.91 (4C, Ph'-C_{3/5}), 136.30 (Ph-C₁), 138.24 (2C, Ph'-C₁), 159.61 (2C, Ph-C_{3/5}), 173.06 (COOH). **MS (ESI+):** $m/e = 465.5$ [M+1]⁺. **Anal.** (C₂₈H₃₂O₄S [464.20]) C, H: ber. C: 72.38, H: 6.94, S: 6.90, gef. C: 72.35, H: 6.97, S: 6.85, Abw. C: 0.03, H: 0.03, S: 0.05.

5.5 Synthese und Charakterisierung von 2-(3,5-Diphenethoxy)hexansäure 26

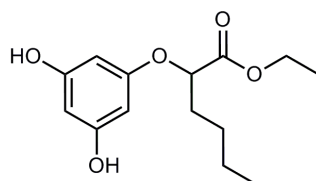
Syntheschema:



5.5.1 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 97

Natriumhydrid (0.40 g, 13.4 mmol) wird in 10-15 ml absolutem DMF suspendiert und Phloroglucinol (1.02 g, 8.1 mmol; in DMF gelöst) unter Eisbadkühlung über eine Spritze hinzuge tropft. Die Suspension verfärbt sich dunkelgrün. Nach 30 min wird α -Brom-Ethylhexanoat (1.5 g, 6.7 mmol) zuge tropft und 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt und zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Es entsteht ein Produktgemisch, das über Säulenchromatographie zum erwünschte einfachsubstituierten Ethyl-2-(3,5-dihydroxyphenoxy)-hexanoat führt. Aussehen: weißer Feststoff, Ausbeute: 27.8% (0.5 g).

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,5-dihydroxyphenoxy)hexanoat 97 (MH120)



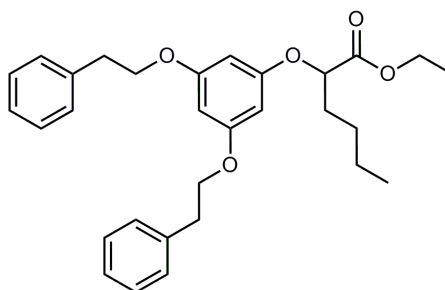
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.84-0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Bu- CH_3), 1.14-1.19 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et- CH_3), 1.20-1.38 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.73-1.80 (m, 2H, Bu- CH_2), 4.09-4.16 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O- CH_2), 4.49-4.54 (t, 1H, J = 6.3 Hz, O- CH), 5.69-5.70 (d, 2H, J = 1.9 Hz, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 5.81-5.82 (d, 1H, J = 1.9 Hz, Ph- C_4), 9.22 (s, 1H, -OH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.73 (Bu- CH_3), 13.99 (Et- CH_3), 21.69 (Bu- CH_2), 26.72 (Bu- CH_2), 31.84 (Bu- CH_2), 60.53 (O- CH_2), 75.40 (O- CH), 93.46 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 96.03 (Ph- C_4), 158.97 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 159.30 (Ph- C_1), 171.16 (COO-). **MS (ESI-):** m/e = 266.9 [M-1]⁻.

5.5.2 Synthese und Charakterisierung von Zwischenstufe 98

Bei Schritt 2 handelt es sich um die Veretherung der beiden freien Hydroxylgruppen mittels *Mitsunobu*-Reaktion. Die Arbeitsbedingungen sind in Kapitel 5.2.3, Methode B beschrieben.

Synthesebedingungen: E₁: **97** (0.48 g, 1.79 mmol), E₂: Phenylethanol (0.46 g, 3.76 mmol), TPP (1.22 g, 4.65 mmol), DEAD (0.81 g, 4.65 mmol), Reaktionsdauer: 4 h, Produkt: farbloses Öl, Ausbeute: 37.6% (0.32 g).

Charakterisierung von Ethyl 2-(3,5-diphenethoxyphenoxy)hexanoat 98 (MH122)



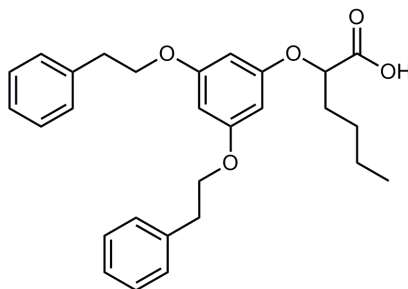
$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.83-0.88 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.09-1.14 (t, 3H, J = 7.0 Hz, Et- CH_3), 1.23-1.37 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.75-1.82 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.95-3.00 (t, 4H, J = 6.8 Hz, Ph'- CH_2), 4.05-4.17 (m, 6H, Ph-O- CH_2 + O- CH_2), 4.72-4.77 (t, 1H, J = 7.0 Hz, O- CH), 5.99-6.00 (d, 2H, J = 2.0 Hz, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 6.08-6.09 (t, 1H, J = 2.0 Hz, Ph- C_4), 7.18-7.29 (m, 10H, Ph'-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.70 (Bu- CH_3), 13.96 (Et- CH_3), 21.69 (Bu- CH_2), 26.59 (Bu- CH_2), 31.70 (Bu- CH_2), 34.80 (2C, Ph'- CH_2), 60.55 (O- CH_2), 68.13 (2C, Ph-O- CH_2), 75.44 (O- CH), 94.42 (Ph- C_4), 94.44 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 126.19 (2C, Ph'- C_4), 128.21 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.85 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 138.29 (2C, Ph'- C_1), 159.28 (Ph- C_1), 160.19 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 170.96 (COO-). **MS (ESI+):** m/e = 477.6 [M+1]⁺. **Anal.** (C₃₀H₃₆O₅ [476.26]) C, H, N: ber. C: 75.60, H: 7.61, gef. C: 75.42, H: 7.61, Abw. C: 0.18, H: 0.00.

5.5.3 Synthese und Charakterisierung von Endprodukt 26

Die Verseifung läuft nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Kap. 5.2.5 ab.

Synthesebedingungen: **98** (0.18 g, 0.39 mmol), LiOH (0.08 g, 1.94 mmol), Reaktionsdauer: 24 h, Produkt: weiße Kristalle, Ausbeute: 88.2% (0.15 g).

Charakterisierung von 2-(3,5-Diphenethoxyphenoxy)hexansäure 26 (MH125)



$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.83-0.88 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Bu- CH_3), 1.19-1.35 (m, 4H, Bu- CH_2), 1.76-1.79 (m, 2H, Bu- CH_2), 2.95-2.99 (t, 4H, J = 6.7 Hz, Ph'- CH_2), 4.08-4.12 (t, 4H, J = 6.5 Hz, Ph-O- CH_2), 4.61 (t, 1H, J = 7.0 Hz, O-CH), 5.98-5.99 (d, 2H, J = 1.9 Hz, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 6.07 (t, 1H, J = 1.8 Hz, Ph- C_4), 7.18-7.30 (m, 10H, Ph'-H), 12.98 (s/ br, 1H, COOH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):** δ = 13.78 (Bu- CH_3), 21.75 (Bu- CH_2), 26.81 (Bu- CH_2), 31.69 (Bu- CH_2), 34.81 (2C, Ph'- CH_2), 68.10 (2C, Ph-O- CH_2), 75.33 (O-CH), 93.98 (Ph- C_4), 94.17 (2C, Ph- $\text{C}_{2/6}$), 126.21 (2C, Ph'- C_4), 128.25 (4C, Ph'- $\text{C}_{2/6}$), 128.89 (4C, Ph'- $\text{C}_{3/5}$), 138.29 (2C, Ph'- C_1), 159.49 (Ph- C_1), 160.15 (2C, Ph- $\text{C}_{3/5}$), 172.60 (COOH). **MS (ESI-):** m/e = 447.5 [$\text{M}-1$]⁻. **Anal.** ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_5$ [448.22]) C, H: ber. C: 74.97, H: 7.19, gef. C: 75.03, H: 7.10, Abw. C: 0.06, H: 0.09.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H., Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, 368, (9533), 387-403.
2. Alzheimer, A., Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* **1907**, 64, (1-2), 146-148.
3. Carter, M. D.; Simms, G. A.; Weaver, D. F., The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther* **2010**, 88, (4), 475-86.
4. Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. <http://www.deutsche-alzheimer.de/>.
5. Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Scazufca, M., Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **2005**, 366, (9503), 2112-7.
6. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M., Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **2010**, 362, (4), 329-44.
7. Cummings, J. L., Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **2004**, 351, (1), 56-67.
8. Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M., Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2007**, 3, (3), 186-91.
9. Minati, L.; Edginton, T.; Bruzzone, M. G.; Giaccone, G., Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **2009**, 24, (2), 95-121.
10. Selkoe, D. J., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **2001**, 81, (2), 741-66.
11. Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Roth, H., *Medizinische Chemie*. 2010; 2. Auflage.
12. Hampel, H.; Frank, R.; Broich, K.; Teipel, S. J.; Katz, R. G.; Hardy, J.; Herholz, K.; Bokde, A. L.; Jessen, F.; Hoessler, Y. C.; Sanhai, W. R.; Zetterberg, H.; Woodcock, J.; Blennow, K., Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9, (7), 560-74.
13. Opar, A., Hope builds for earlier detection of Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9, (8), 579-81.
14. Blennow, K.; Hampel, H.; Weiner, M.; Zetterberg, H., Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **2010**, 6, (3), 131-44.
15. Hampel, H.; Shen, Y.; Walsh, D. M.; Aisen, P.; Shaw, L. M.; Zetterberg, H.; Trojanowski, J. Q.; Blennow, K., Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **2010**, 223, (2), 334-46.
16. Vellas, B.; Coley, N.; Andrieu, S., Disease modifying trials in Alzheimer's disease: perspectives for the future. *J Alzheimers Dis* **2008**, 15, (2), 289-301.
17. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M., *Arzneimittelwirkungen*. 2008; 9. Auflage
18. Selkoe, D. J., The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**, 6, (4), 487-98.
19. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, 256, (5054), 184-5.
20. Hardy, J.; Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297, (5580), 353-6.
21. Hardy, J., The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of neurochemistry* **2009**, 110, (4), 1129-1134.
22. Wolfe, M. S., Gamma-secretase: structure, function, and modulation for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* **2008**, 8, (1), 2-8.
23. Li, H.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J., Toward structural elucidation of the gamma-secretase complex. *Structure* **2009**, 17, (3), 326-34.
24. Citron, M., Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nature neuroscience* **2002**, 5 Suppl, 1055-1057.
25. De Strooper, B., Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* **2010**, 90, (2), 465-94.
26. Huang, Y., Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* **2010**, 16, (6), 287-94.
27. Wollmer, M. A., Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1801, (8), 762-73.
28. Holtzman, D. M.; Fagan, A. M.; Mackey, B.; Tenkova, T.; Sartorius, L.; Paul, S. M.; Bales, K.; Ashe, K. H.; Irizarry, M. C.; Hyman, B. T., Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* **2000**, 47, (6), 739-47.
29. Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M., The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* **2009**, 63, (3), 287-303.
30. Cook, D. G.; Leverenz, J. B.; McMillan, P. J.; Kulstad, J. J.; Ericksen, S.; Roth, R. A.; Schellenberg, G. D.; Jin, L. W.; Kovacina, K. S.; Craft, S., Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset

- Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* **2003**, 162, (1), 313-9.
31. Huang, Y., Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16, (6), 287-94.
 32. Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **1993**, 261, (5123), 921-3.
 33. Harold, D.; Abraham, R.; Hollingworth, P.; Sims, R.; Gerrish, A.; Hamshere, M. L.; Pahwa, J. S.; Moskva, V.; Dowzell, K.; Williams, A.; Jones, N.; Thomas, C.; Stretton, A.; Morgan, A. R.; Lovestone, S.; Powell, J.; Proitsi, P.; Lupton, M. K.; Brayne, C.; Rubinsztein, D. C.; Gill, M.; Lawlor, B.; Lynch, A.; Morgan, K.; Brown, K. S.; Passmore, P. A.; Craig, D.; McGuinness, B.; Todd, S.; Holmes, C.; Mann, D.; Smith, A. D.; Love, S.; Kehoe, P. G.; Hardy, J.; Mead, S.; Fox, N.; Rossor, M.; Collinge, J.; Maier, W.; Jessen, F.; Schurmann, B.; van den Bussche, H.; Heuser, I.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J.; Dichgans, M.; Frolich, L.; Hampel, H.; Hull, M.; Rujescu, D.; Goate, A. M.; Kauwe, J. S.; Cruchaga, C.; Nowotny, P.; Morris, J. C.; Mayo, K.; Sleegers, K.; Bettens, K.; Engelborghs, S.; De Deyn, P. P.; Van Broeckhoven, C.; Livingston, G.; Bass, N. J.; Gurling, H.; McQuillin, A.; Gwilliam, R.; Deloukas, P.; Al-Chalabi, A.; Shaw, C. E.; Tsolaki, M.; Singleton, A. B.; Guerreiro, R.; Muhleisen, T. W.; Nothen, M. M.; Moebus, S.; Jockel, K. H.; Klopp, N.; Wichmann, H. E.; Carrasquillo, M. M.; Pankratz, V. S.; Younkin, S. G.; Holmans, P. A.; O'Donovan, M.; Owen, M. J.; Williams, J., Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **2009**, 41, (10), 1088-93.
 34. Lambert, J. C.; Heath, S.; Even, G.; Campion, D.; Sleegers, K.; Hiltunen, M.; Combarros, O.; Zelenika, D.; Bullido, M. J.; Tavernier, B.; Letenneur, L.; Bettens, K.; Berr, C.; Pasquier, F.; Fievet, N.; Barberger-Gateau, P.; Engelborghs, S.; De Deyn, P.; Mateo, I.; Franck, A.; Helisalmi, S.; Porcellini, E.; Hanon, O.; de Pancorbo, M. M.; Lendon, C.; Dufouil, C.; Jaillard, C.; Leveillard, T.; Alvarez, V.; Bosco, P.; Mancuso, M.; Panza, F.; Nacmias, B.; Bossu, P.; Piccardi, P.; Annoni, G.; Seripa, D.; Galimberti, D.; Hannequin, D.; Licastro, F.; Soininen, H.; Ritchie, K.; Blanche, H.; Dartigues, J. F.; Tzourio, C.; Gut, I.; Van Broeckhoven, C.; Alperovitch, A.; Lathrop, M.; Amouyel, P., Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **2009**, 41, (10), 1094-9.
 35. Bergmans, B. A.; De Strooper, B., gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol* **2010**, 9, (2), 215-26.
 36. Qiu, C.; Kivipelto, M.; von Strauss, E., Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* **2009**, 11, (2), 111-28.
 37. Wolozin, B., Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* **2004**, 41, (1), 7-10.
 38. Wahrle, S.; Das, P.; Nyborg, A. C.; McLendon, C.; Shoji, M.; Kawarabayashi, T.; Younkin, L. H.; Younkin, S. G.; Golde, T. E., Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* **2002**, 9, (1), 11-23.
 39. Osenkowski, P.; Ye, W.; Wang, R.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J., Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem* **2008**, 283, (33), 22529-40.
 40. Zhou, H.; Zhou, S.; Walian, P. J.; Jap, B. K., Dependency of gamma-secretase complex activity on the structural integrity of the bilayer. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, 402, (2), 291-6.
 41. Grosgen, S.; Grimm, M. O.; Friess, P.; Hartmann, T., Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1801, (8), 966-74.
 42. Vetrivel, K. S.; Thinakaran, G., Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1801, (8), 860-7.
 43. Sims-Robinson, C.; Kim, B.; Rosko, A.; Feldman, E. L., How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat Rev Neurol* **2010**, 6, (10), 551-9.
 44. Landreth, G.; Jiang, Q.; Mandrekar, S.; Heneka, M., PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2008**, 5, (3), 481-9.
 45. Craft, S., Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **2006**, 20, (4), 298-301.
 46. Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D. F.; Melendez, P. A.; Hansen, L.; Lee, J.; Shoelson, S. E., Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **2005**, 11, (2), 183-90.
 47. Takeda, S.; Sato, N.; Uchio-Yamada, K.; Sawada, K.; Kunieda, T.; Takeuchi, D.; Kurinami, H.; Shinohara, M.; Rakugi, H.; Morishita, R., Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (15), 7036-41.
 48. Dahms, S. O.; Hoefgen, S.; Roeser, D.; Schlott, B.; Guhrs, K. H.; Than, M. E., Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (12), 5381-6.

49. Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C.; Pipkorn, R.; Schaefer, M.; Langosch, D.; Multhaup, G., GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J* **2007**, 26, (6), 1702-12.
50. Zheng, H.; Koo, E. H., The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* **2006**, 1, 5.
51. De Strooper, B.; Annaert, W., Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **2000**, 113 (Pt 11), 1857-70.
52. LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S., Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2007**, 8, (7), 499-509.
53. Mattson, M. P., Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **2004**, 430, (7000), 631-9.
54. Kukar, T.; Golde, T. E., Possible mechanisms of action of NSAIDs and related compounds that modulate gamma-secretase cleavage. *Curr Top Med Chem* **2008**, 8, (1), 47-53.
55. Cleary, J. P.; Walsh, D. M.; Hofmeister, J. J.; Shankar, G. M.; Kuskowski, M. A.; Selkoe, D. J.; Ashe, K. H., Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **2005**, 8, (1), 79-84.
56. Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **2002**, 416, (6880), 535-9.
57. Lesne, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **2006**, 440, (7082), 352-7.
58. Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, T.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. I.; Van Nostrand, W. E.; Smith, S. O., Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, 17, (5), 561-7.
59. Tanzi, R. E.; Bertram, L., New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* **2001**, 32, (2), 181-4.
60. Mawuenyega, K. G.; Sigurdson, W.; Ovod, V.; Munsell, L.; Kasten, T.; Morris, J. C.; Yarasheski, K. E.; Bateman, R. J., Decreased Clearance of CNS β -Amyloid in Alzheimer's Disease. *SciencExpress* **2010**, (pub 9. Dezember 2010).
61. Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Karlo, J. C.; Cannady, S. B.; Landreth, G. E., Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci* **2000**, 20, (2), 558-67.
62. Akiyama, H.; Barger, S.; Barnum, S.; Bradt, B.; Bauer, J.; Cole, G. M.; Cooper, N. R.; Eikelenboom, P.; Emmerling, M.; Fiebich, B. L.; Finch, C. E.; Frautschy, S.; Griffin, W. S.; Hampel, H.; Hull, M.; Landreth, G.; Lue, L.; Mrak, R.; Mackenzie, I. R.; McGeer, P. L.; O'Banion, M. K.; Pachter, J.; Pasinetti, G.; Plata-Salman, C.; Rogers, J.; Rydel, R.; Shen, Y.; Streit, W.; Strohmeyer, R.; Tooyoma, I.; Van Muiswinkel, F. L.; Veerhuis, R.; Walker, D.; Webster, S.; Wegrzyniak, B.; Wenk, G.; Wyss-Coray, T., Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **2000**, 21, (3), 383-421.
63. Small, S. A.; Duff, K., Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* **2008**, 60, (4), 534-42.
64. Castellani, R.; Hirai, K.; Aliev, G.; Drew, K. L.; Nunomura, A.; Takeda, A.; Cash, A. D.; Obrenovich, M. E.; Perry, G.; Smith, M. A., Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **2002**, 70, (3), 357-60.
65. Citron, M., Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9, (5), 387-98.
66. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M., Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **2010**, 9, (7), 702-16.
67. De Strooper, B.; Vassar, R.; Golde, T., The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **2010**, 6, (2), 99-107.
68. in 't Veld, B. A.; Launer, L. J.; Hoes, A. W.; Ott, A.; Hofman, A.; Breteler, M. M.; Stricker, B. H., NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging* **1998**, 19, (6), 607-11.
69. in t' Veld, B. A.; Ruitenberg, A.; Hofman, A.; Launer, L. J.; van Duijn, C. M.; Stijnen, T.; Breteler, M. M.; Stricker, B. H., Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **2001**, 345, (21), 1515-21.
70. Aisen, P. S.; Schafer, K. A.; Grundman, M.; Pfeiffer, E.; Sano, M.; Davis, K. L.; Farlow, M. R.; Jin, S.; Thomas, R. G.; Thal, L. J., Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *Jama* **2003**, 289, (21), 2819-26.
71. Edbauer, D.; Winkler, E.; Regula, J. T.; Pesold, B.; Steiner, H.; Haass, C., Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **2003**, 5, (5), 486-8.
72. Kimberly, W. T.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J., Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (11), 6382-7.

73. Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G.; Iwatsubo, T., The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **2003**, 422, (6930), 438-41.
74. De Strooper, B., Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **2003**, 38, (1), 9-12.
75. Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H., Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* **2006**, 3, (4-5), 275-83.
76. Sato, T.; Diehl, T. S.; Narayanan, S.; Funamoto, S.; Ihara, Y.; De Strooper, B.; Steiner, H.; Haass, C.; Wolfe, M. S., Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* **2007**, 282, (47), 33985-93.
77. Osenkowski, P.; Li, H.; Ye, W.; Li, D.; Aeschbach, L.; Fraering, P. C.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J.; Li, H., Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 Å resolution. *J Mol Biol* **2009**, 385, (2), 642-52.
78. De Strooper, B.; Annaert, W., Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2010**, 26, 235-60.
79. Ahn, K.; Shelton, C. C.; Tian, Y.; Zhang, X.; Gilchrist, M. L.; Sisodia, S. S.; Li, Y. M., Activation and intrinsic {gamma}-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**.
80. Steiner, H.; Romig, H.; Pesold, B.; Philipp, U.; Baader, M.; Citron, M.; Loetscher, H.; Jacobsen, H.; Haass, C., Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* **1999**, 38, (44), 14600-5.
81. Wolfe, M. S.; Xia, W.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Kimberly, W. T.; Selkoe, D. J., Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **1999**, 398, (6727), 513-7.
82. Nyabi, O.; Bentahir, M.; Horre, K.; Herreman, A.; Gottardi-Littell, N.; Van Broeckhoven, C.; Merchiers, P.; Spittaels, K.; Annaert, W.; De Strooper, B., Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem* **2003**, 278, (44), 43430-6.
83. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: 2009; 2. Auflage.
84. Esler, W. P.; Kimberly, W. T.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Moore, C. L.; Tsai, J. Y.; Rahmati, T.; Xia, W.; Selkoe, D. J.; Wolfe, M. S., Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol* **2000**, 2, (7), 428-34.
85. Li, Y. M.; Xu, M.; Lai, M. T.; Huang, Q.; Castro, J. L.; DiMuzio-Mower, J.; Harrison, T.; Lellis, C.; Nadin, A.; Neduvetil, J. G.; Register, R. B.; Sardana, M. K.; Shearman, M. S.; Smith, A. L.; Shi, X. P.; Yin, K. C.; Shafer, J. A.; Gardell, S. J., Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* **2000**, 405, (6787), 689-94.
86. Dries, D. R.; Shah, S.; Han, Y. H.; Yu, C.; Yu, S.; Shearman, M. S.; Yu, G., Glu-333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity. *J Biol Chem* **2009**, 284, (43), 29714-24.
87. Shah, S.; Lee, S. F.; Tabuchi, K.; Hao, Y. H.; Yu, C.; LaPlant, Q.; Ball, H.; Dann, C. E., 3rd; Sudhof, T.; Yu, G., Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **2005**, 122, (3), 435-47.
88. Chavez-Gutierrez, L.; Tolia, A.; Maes, E.; Li, T.; Wong, P. C.; de Strooper, B., Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem* **2008**, 283, (29), 20096-105.
89. Zhao, G.; Liu, Z.; Ilagan, M. X.; Kopan, R., Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J Neurosci* **2010**, 30, (5), 1648-56.
90. Serneels, L.; Van Biervliet, J.; Craessaerts, K.; Dejaegere, T.; Horre, K.; Van Houtvin, T.; Esselmann, H.; Paul, S.; Schafer, M. K.; Berezovska, O.; Hyman, B. T.; Sprangers, B.; Scot, R.; Moons, L.; Jucker, M.; Yang, Z.; May, P. C.; Karran, E.; Wiltfang, J.; D'Hooge, R.; De Strooper, B., gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* **2009**, 324, (5927), 639-42.
91. Jorissen, E.; De Strooper, B., Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol* **2010**, 92, 201-30.
92. Kopan, R.; Ilagan, M. X., Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, 5, (6), 499-504.
93. St George-Hyslop, P.; Schmitt-Ulms, G., Alzheimer's disease: Selectively tuning gamma-secretase. *Nature* **2010**, 467, (7311), 36-7.
94. Lichtenthaler, S. F.; Wang, R.; Grimm, H.; Uljon, S. N.; Masters, C. L.; Beyreuther, K., Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (6), 3053-8.
95. Shearman, M. S.; Beher, D.; Clarke, E. E.; Lewis, H. D.; Harrison, T.; Hunt, P.; Nadin, A.; Smith, A. L.; Stevenson, G.; Castro, J. L., L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent

- inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry* **2000**, 39, (30), 8698-704.
96. Das, C.; Berezovska, O.; Diehl, T. S.; Genet, C.; Buldyrev, I.; Tsai, J. Y.; Hyman, B. T.; Wolfe, M. S., Designed helical peptides inhibit an intramembrane protease. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, (39), 11794-5.
97. Kornilova, A. Y.; Bihele, F.; Das, C.; Wolfe, M. S., The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, (9), 3230-5.
98. J. E. Audia, T. E. M., J. S. Nissen, S. L. McDaniel WO9932453. 1999.
99. Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; de Saint Andrieu, P.; Fang, L. Y.; Freedman, S. B.; Folmer, B.; Goldbach, E.; Holsztynska, E. J.; Hu, K. L.; Johnson-Wood, K. L.; Kennedy, S. L.; Kholodenko, D.; Knops, J. E.; Latimer, L. H.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I. M.; Motter, R. N.; Mutter, L. C.; Nietz, J.; Quinn, K. P.; Sacchi, K. L.; Seubert, P. A.; Shopp, G. M.; Thorsett, E. D.; Tung, J. S.; Wu, J.; Yang, S.; Yin, C. T.; Schenk, D. B.; May, P. C.; Altstiel, L. D.; Bender, M. H.; Boggs, L. N.; Britton, T. C.; Clemens, J. C.; Czilli, D. L.; Dieckman-McGinty, D. K.; Droste, J. J.; Fuson, K. S.; Gitter, B. D.; Hyslop, P. A.; Johnstone, E. M.; Li, W. Y.; Little, S. P.; Mabry, T. E.; Miller, F. D.; Audia, J. E., Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* **2001**, 76, (1), 173-81.
100. Lanz, T. A.; Himes, C. S.; Pallante, G.; Adams, L.; Yamazaki, S.; Amore, B.; Merchant, K. M., The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A beta levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, 305, (3), 864-71.
101. Quelever, G.; Kachidian, P.; Melon, C.; Garino, C.; Laras, Y.; Pietrancosta, N.; Sheha, M.; Louis Kraus, J., Enhanced delivery of gamma-secretase inhibitor DAPT into the brain via an ascorbic acid mediated strategy. *Org Biomol Chem* **2005**, 3, (13), 2450-7.
102. Geling, A.; Steiner, H.; Willem, M.; Bally-Cuif, L.; Haass, C., A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* **2002**, 3, (7), 688-94.
103. Lanz, T. A.; Hosley, J. D.; Adams, W. J.; Merchant, K. M., Studies of Abeta pharmacodynamics in the brain, cerebrospinal fluid, and plasma in young (plaque-free) Tg2576 mice using the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY-411575). *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, 309, (1), 49-55.
104. Wong, G. T.; Manfra, D.; Poulet, F. M.; Zhang, Q.; Josien, H.; Bara, T.; Engstrom, L.; Pinzon-Ortiz, M.; Fine, J. S.; Lee, H.-J. J.; Zhang, L.; Higgins, G. A.; Parker, E. M., Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279, (13), 12876-12882.
105. Siemers, E.; Skinner, M.; Dean, R. A.; Gonzales, C.; Satterwhite, J.; Farlow, M.; Ness, D.; May, P. C., Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol* **2005**, 28, (3), 126-32.
106. Siemers, E. R.; Quinn, J. F.; Kaye, J.; Farlow, M. R.; Porsteinsson, A.; Tariot, P.; Zoulnouni, P.; Galvin, J. E.; Holtzman, D. M.; Knopman, D. S.; Satterwhite, J.; Gonzales, C.; Dean, R. A.; May, P. C., Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* **2006**, 66, (4), 602-4.
107. Siemers, E. R.; Dean, R. A.; Friedrich, S.; Ferguson-Sells, L.; Gonzales, C.; Farlow, M. R.; May, P. C., Safety, tolerability, and effects on plasma and cerebrospinal fluid amyloid-beta after inhibition of gamma-secretase. *Clin Neuropharmacol* **2007**, 30, (6), 317-25.
108. Eli Lilly, Press Release, Lilly Halts Development of Semagacestat for Alzheimer's Disease Based on Preliminary Results of Phase III Clinical Trials. **Aug 17, 2010**.
109. He, G.; Luo, W.; Li, P.; Remmers, C.; Netzer, W. J.; Hendrick, J.; Bettayeb, K.; Flajolet, M.; Gorelick, F.; Wennogle, L. P.; Greengard, P., Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* **2010**, 467, (7311), 95-8.
110. Tian, Y.; Bassit, B.; Chau, D.; Li, Y. M., An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, 17, (2), 151-8.
111. Albright C, D. R., Olson R, Jere M, Slemmon R, Lentz K, Wang J, Denton R, Pilcher G, Zacaek R, Macor J, Wong O, Gu H, Berman R, Tong G, BMS-708163, a potent and selective γ -secretase inhibitor, decreases CSF A β at safe and tolerable doses in animals and humans. International Conference on Alzheimer's Disease. *International Conference on Alzheimer's Disease, July 26-31, Chicago, Illinois* **2008**.
112. Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Smith, T. E.; Weggen, S.; Das, P.; McLendon, D. C.; Ozols, V. V.; Jessing, K. W.; Zavitz, K. H.; Koo, E. H.; Golde, T. E., NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *The Journal of clinical investigation* **2003**, 112, (3), 440-449.

113. Sagi, S. A.; Weggen, S.; Eriksen, J.; Golde, T. E.; Koo, E. H., The non-cyclooxygenase targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lipoxygenases, peroxisome proliferator-activated receptor, inhibitor of kappa B kinase, and NF kappa B, do not reduce amyloid beta 42 production. *J Biol Chem* **2003**, 278, (34), 31825-30.
114. Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Pietrzik, C. U.; Golde, T. E.; Koo, E. H., Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs preserve intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and ErbB-4 receptor and signaling through the APP intracellular domain. *J Biol Chem* **2003**, 278, (33), 30748-54.
115. Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bulter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, 414, (6860), 212-216.
116. Imbimbo, B. P., The potential role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in treating Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* **2004**, 13, (11), 1469-81.
117. Abdel-Tawab, M.; Zettl, H.; Schubert-Zsilavecz, M., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a critical review on current concepts applied to reduce gastrointestinal toxicity. *Curr Med Chem* **2009**, 16, (16), 2042-63.
118. Kukar, T.; Prescott, S.; Eriksen, J. L.; Holloway, V.; Murphy, M. P.; Koo, E. H.; Golde, T. E.; Nicolle, M. M., Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice. *BMC Neurosci* **2007**, 8, 54.
119. Galasko, D. R.; Graff-Radford, N.; May, S.; Hendrix, S.; Cottrell, B. A.; Sagi, S. A.; Mather, G.; Laughlin, M.; Zavitz, K. H.; Swabb, E.; Golde, T. E.; Murphy, M. P.; Koo, E. H., Safety, tolerability, pharmacokinetics, and Abeta levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **2007**, 21, (4), 292-9.
120. Wilcock, G. K.; Black, S. E.; Hendrix, S. B.; Zavitz, K. H.; Swabb, E. A.; Laughlin, M. A., Efficacy and safety of tarenfluril in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial. *Lancet Neurol* **2008**, 7, (6), 483-93.
121. Green, R. C.; Schneider, L. S.; Amato, D. A.; Beelen, A. P.; Wilcock, G.; Swabb, E. A.; Zavitz, K. H., Effect of tarenfluril on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Jama* **2009**, 302, (23), 2557-64.
122. Imbimbo, B. P., Why did tarenfluril fail in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **2009**, 17, (4), 757-60.
123. Vellas, B., Tarenfluril for Alzheimer's disease: a "shot on goal" that missed. *Lancet Neurol* **2010**, 9, (3), 235-7.
124. Peretto, I.; La Porta, E., Gamma-secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a medicinal chemistry perspective. *Current topics in medicinal chemistry* **2008**, 8, (1), 38-46.
125. Oehrlrich, D.; Berthelot, D. J.-C.; Gijssen, H. J. M., γ -Secretase Modulators as Potential Disease Modifying Anti-Alzheimer's Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, epub 9. Dezember 2010.
126. Peretto, I.; Radaelli, S.; Parini, C.; Zandi, M.; Raveglia, L. F.; Dondio, G.; Fontanella, L.; Misiano, P.; Bigogno, C.; Rizzi, A.; Riccardi, B.; Biscailoli, M.; Marchetti, S.; Puccini, P.; Catinella, S.; Rondelli, I.; Cenacchi, V.; Bolzoni, P. T.; Caruso, P.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Del Giudice, E.; Moretto, N.; Imbimbo, B. P., Synthesis and biological activity of flurbiprofen analogues as selective inhibitors of beta-amyloid(1-42) secretion. *J Med Chem* **2005**, 48, (18), 5705-20.
127. Imbimbo, B. P.; Del Giudice, E.; Cenacchi, V.; Volta, R.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Riccardi, B.; Puccini, P.; Moretto, N.; Grassi, F.; Ottonello, S.; Leon, A., In vitro and in vivo profiling of CHF5022 and CHF5074 Two beta-amyloid1-42 lowering agents. *Pharmacol Res* **2007**, 55, (4), 318-28.
128. Imbimbo, B. P.; Del Giudice, E.; Colavito, D.; D'Arrigo, A.; Dalle Carbonare, M.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Volta, R.; Pietrini, V.; Baroc, M. F.; Serneels, L.; De Strooper, B.; Leon, A., 1-(3',4'-Dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic acid (CHF5074), a novel gamma-secretase modulator, reduces brain beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease without causing peripheral toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, 323, (3), 822-30.
129. Imbimbo, B. P.; Hutter-Paier, B.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Cenacchi, V.; Volta, R.; Lanzillotta, A.; Pizzi, M.; Windisch, M., CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **2009**, 156, (6), 982-93.
130. Imbimbo, B. P.; Giardino, L.; Sivilia, S.; Giuliani, A.; Gusciglio, M.; Pietrini, V.; Del Giudice, E.; D'Arrigo, A.; Leon, A.; Villetti, G.; Calza, L., CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, restores hippocampal neurogenesis potential and reverses contextual memory deficit in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2010**, 20, (1), 159-73.
131. Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B.; Baumann, K., Scaffold of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor carprofen provides Alzheimer gamma-secretase modulators. *J Med Chem* **2006**, 49, (26), 7588-91.

132. Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Baumann, K.; Schubanel, R.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B., N-Substituted carbazolyloxyacetic acids modulate Alzheimer associated gamma-secretase. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (1), 176-82.
133. Baumann, S.; Hottecke, N.; Schubanel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B., NSAID-derived gamma-secretase modulators. Part III: Membrane anchoring. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, 19, (24), 6986-90.
134. Stanton, M. G.; Hubbs, J.; Sloman, D.; Hamblett, C.; Andrade, P.; Angagaw, M.; Bi, G.; Black, R. M.; Crispino, J.; Cruz, J. C.; Fan, E.; Farris, G.; Hughes, B. L.; Kenific, C. M.; Middleton, R. E.; Nikov, G.; Sajonz, P.; Shah, S.; Shomer, N.; Szewczak, A. A.; Tanga, F.; Tudge, M. T.; Shearman, M.; Munoz, B., Fluorinated piperidine acetic acids as gamma-secretase modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, (2), 755-8.
135. Page, R. M.; Baumann, K.; Tomioka, M.; Perez-Revuelta, B. I.; Fukumori, A.; Jacobsen, H.; Flohr, A.; Luebbbers, T.; Ozmen, L.; Steiner, H.; Haass, C., Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J Biol Chem* **2008**, 283, (2), 677-83.
136. Hall, A.; Elliott, R. L.; Giblin, G. M.; Hussain, I.; Musgrave, J.; Naylor, A.; Sasse, R.; Smith, B., Piperidine-derived gamma-secretase modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, (3), 1306-11.
137. Kukar, T.; Murphy, M. P.; Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Weggen, S.; Smith, T. E.; Ladd, T.; Khan, M. A.; Kache, R.; Beard, J.; Dodson, M.; Merit, S.; Ozols, V. V.; Anastasiadis, P. Z.; Das, P.; Fauq, A.; Koo, E. H.; Golde, T. E., Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat Med* **2005**, 11, (5), 545-50.
138. Sahagan, B. G.; Stephenson, D. T.; Hounslow, N.; Liston, D. R.; Manning, P. T., Killing pain, not neurons. *Nat Med* **2005**, 11, (8), 817-8.
139. Rivkin, A.; Ahearn, S. P.; Chichetti, S. M.; Kim, Y. R.; Li, C.; Rosenau, A.; Kattar, S. D.; Jung, J.; Shah, S.; Hughes, B. L.; Crispino, J. L.; Middleton, R. E.; Szewczak, A. A.; Munoz, B.; Shearman, M. S., Piperazinyl pyrimidine derivatives as potent gamma-secretase modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, (3), 1269-71.
140. Rivkin, A.; Ahearn, S. P.; Chichetti, S. M.; Hamblett, C. L.; Garcia, Y.; Martinez, M.; Hubbs, J. L.; Reutershan, M. H.; Daniels, M. H.; Siliphaivanh, P.; Otte, K. M.; Li, C.; Rosenau, A.; Surdi, L. M.; Jung, J.; Hughes, B. L.; Crispino, J. L.; Nikov, G. N.; Middleton, R. E.; Moxham, C. M.; Szewczak, A. A.; Shah, S.; Moy, L. Y.; Kenific, C. M.; Tanga, F.; Cruz, J. C.; Andrade, P.; Angagaw, M. H.; Shomer, N. H.; Miller, T.; Munoz, B.; Shearman, M. S., Purine derivatives as potent gamma-secretase modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, (7), 2279-82.
141. Zettl, H.; Weggen, S.; Schneider, P.; Schneider, G., Exploring the chemical space of gamma-secretase modulators. *Trends Pharmacol Sci* **2010**, 31, (9), 402-10.
142. Leuchtenberger, S.; Beher, D.; Weggen, S., Selective modulation of Abeta42 production in Alzheimer's disease: non-steroidal anti-inflammatory drugs and beyond. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, (33), 4337-55.
143. Gamberdinger, M.; Clement, A. B.; Behl, C., Effects of sulindac sulfide on the membrane architecture and the activity of gamma-secretase. *Neuropharmacology* **2008**, 54, (6), 998-1005.
144. Beher, D.; Clarke, E. E.; Wrigley, J. D.; Martin, A. C.; Nadin, A.; Churcher, I.; Shearman, M. S., Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target gamma-secretase at a novel site. Evidence for an allosteric mechanism. *J Biol Chem* **2004**, 279, (42), 43419-26.
145. Clarke, E. E.; Churcher, I.; Ellis, S.; Wrigley, J. D.; Lewis, H. D.; Harrison, T.; Shearman, M. S.; Beher, D., Intra- or intercomplex binding to the gamma-secretase enzyme. A model to differentiate inhibitor classes. *J Biol Chem* **2006**, 281, (42), 31279-89.
146. Lleo, A.; Berezovska, O.; Herl, L.; Raju, S.; Deng, A.; Bacskai, B. J.; Frosch, M. P.; Irizarry, M.; Hyman, B. T., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. *Nat Med* **2004**, 10, (10), 1065-6.
147. Okochi, M.; Fukumori, A.; Jiang, J.; Itoh, N.; Kimura, R.; Steiner, H.; Haass, C.; Tagami, S.; Takeda, M., Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem* **2006**, 281, (12), 7890-8.
148. Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Bann, M. A.; Fraering, P. C.; Narlawar, R.; Maharvi, G. M.; Healy, B.; Chapman, R.; Welzel, A. T.; Price, R. W.; Moore, B.; Rangachari, V.; Cusack, B.; Eriksen, J.; Jansen-West, K.; Verbeeck, C.; Yager, D.; Eckman, C.; Ye, W.; Sagi, S.; Cottrell, B. A.; Torpey, J.; Rosenberry, T. L.; Fauq, A.; Wolfe, M. S.; Schmidt, B.; Walsh, D. M.; Koo, E. H.; Golde, T. E., Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature* **2008**, 453, (7197), 925-9.
149. Beel, A. J.; Barrett, P.; Schnier, P. D.; Hitchcock, S. A.; Bagal, D.; Sanders, C. R.; Jordan, J. B., Nonspecificity of binding of gamma-secretase modulators to the amyloid precursor protein. *Biochemistry* **2009**, 48, (50), 11837-9.
150. Munter, L. M.; Botev, A.; Richter, L.; Hildebrand, P. W.; Althoff, V.; Weise, C.; Kaden, D.; Multhaup, G., Aberrant amyloid precursor protein (APP) processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP familial Alzheimer disease mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif. *J Biol Chem* **2010**, 285, (28), 21636-43.

151. Richter, L.; Munter, L. M.; Ness, J.; Hildebrand, P. W.; Dasari, M.; Unterreitmeier, S.; Bulic, B.; Beyermann, M.; Gust, R.; Reif, B.; Weggen, S.; Langosch, D.; Multhaup, G., Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (33), 14597-602.
152. Page, R. M.; Gutsmedl, A.; Fukumori, A.; Winkler, E.; Haass, C.; Steiner, H., Beta-amyloid precursor protein mutants respond to gamma-secretase modulators. *J Biol Chem* **2010**, 285, (23), 17798-810.
153. Czirr, E.; Leuchtenberger, S.; Dorner-Ciossek, C.; Schneider, A.; Jucker, M.; Koo, E. H.; Pietrzik, C. U.; Baumann, K.; Weggen, S., Insensitivity to Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *The Journal of biological chemistry* **2007**, 282, (34), 24504-24513.
154. Hahn, S.; Bruning, T.; Ness, J.; Czirr, E.; Baches, S.; Gijssen, H.; Korth, C.; Pietrzik, C. U.; Bulic, B.; Weggen, S., Presenilin-1 (PSEN1) but not amyloid precursor protein (APP) mutations present in mouse models of Alzheimer's disease attenuate the response of cultured cells to gamma-secretase modulators (GSMs) regardless of their potency and structure. *J Neurochem* **2010**.
155. Takahashi, Y.; Hayashi, I.; Tominari, Y.; Rikimaru, K.; Morohashi, Y.; Kan, T.; Natsugari, H.; Fukuyama, T.; Tomita, T.; Iwatsubo, T., Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation. *J Biol Chem* **2003**, 278, (20), 18664-70.
156. Varga, T.; Nagy, L., Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Clin Invest* **2008**, 38, (10), 695-707.
157. Bourguet, W.; Germain, P.; Gronemeyer, H., Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, 21, (10), 381-8.
158. Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F. J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; O'Rahilly, S.; Palmer, C. N.; Plutzky, J.; Reddy, J. K.; Spiegelman, B. M.; Staels, B.; Wahli, W., International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* **2006**, 58, (4), 726-41.
159. Bain, D. L.; Heneghan, A. F.; Connaghan-Jones, K. D.; Miura, M. T., Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* **2007**, 69, 201-20.
160. Zieleniak, A.; Wojcik, M.; Wozniak, L. A., Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2008**, 56, (5), 331-45.
161. Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Westin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Willson, T. M.; Glass, C. K.; Milburn, M. V., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **1998**, 395, (6698), 137-43.
162. Chandra, V.; Huang, P.; Hamuro, Y.; Raghuram, S.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Rastinejad, F., Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **2008**, 456, (7220), 350-6.
163. Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O., Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1771, (8), 915-25.
164. Renaud, J. P.; Rochel, N.; Ruff, M.; Vivat, V.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D., Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **1995**, 378, (6558), 681-9.
165. Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe, R. T., Jr.; McKee, D. D.; Moore, J. T.; Willson, T. M., Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, (24), 13919-24.
166. Desvergne, B.; Wahli, W., Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **1999**, 20, (5), 649-88.
167. Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. A.; Laudet, V., Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3, (11), 950-64.
168. Viswakarma, N.; Jia, Y.; Bai, L.; Vluggens, A.; Borensztajn, J.; Xu, J.; Reddy, J. K., Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* **2010**, 2010.
169. Ghisletti, S.; Huang, W.; Ogawa, S.; Pascual, G.; Lin, M. E.; Willson, T. M.; Rosenfeld, M. G.; Glass, C. K., Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* **2007**, 25, (1), 57-70.
170. Jiang, Q.; Heneka, M.; Landreth, G. E., The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* **2008**, 22, (1), 1-14.
171. Sastre, M.; Klockgether, T.; Heneka, M. T., Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* **2006**, 24, (2-3), 167-76.
172. Kummer, M. P.; Heneka, M. T., PPARs in Alzheimer's Disease. *PPAR Res* **2008**, 2008, 403896.
173. Heneka, M. T.; Landreth, G. E., PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1771, (8), 1031-45.

174. Heneka, M. T.; Landreth, G. E.; Hull, M., Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol* **2007**, 3, (9), 496-504.
175. Landreth, G., PPARgamma agonists as new therapeutic agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **2006**, 199, (2), 245-8.
176. Sastre, M.; Dewachter, I.; Rossner, S.; Bogdanovic, N.; Rosen, E.; Borghgraef, P.; Evert, B. O.; Dumitrescu-Ozimek, L.; Thal, D. R.; Landreth, G.; Walter, J.; Klockgether, T.; van Leuven, F.; Heneka, M. T., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (2), 443-8.
177. Sastre, M.; Dewachter, I.; Landreth, G. E.; Willson, T. M.; Klockgether, T.; van Leuven, F.; Heneka, M. T., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci* **2003**, 23, (30), 9796-804.
178. d'Abramo, C.; Massone, S.; Zingg, J. M.; Pizzuti, A.; Marambaud, P.; Dalla Piccola, B.; Azzi, A.; Marinari, U. M.; Pronzato, M. A.; Ricciarelli, R., Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in amyloid precursor protein processing and amyloid beta-mediated cell death. *Biochem J* **2005**, 391, (Pt 3), 693-8.
179. Du, J.; Zhang, L.; Liu, S.; Zhang, C.; Huang, X.; Li, J.; Zhao, N.; Wang, Z., PPARgamma transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 383, (4), 485-90.
180. Pedersen, W. A.; McMillan, P. J.; Kulstad, J. J.; Leverenz, J. B.; Craft, S.; Haynatzki, G. R., Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Exp Neurol* **2006**, 199, (2), 265-73.
181. Camacho, I. E.; Serneels, L.; Spittaels, K.; Merchiers, P.; Dominguez, D.; De Strooper, B., Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J Neurosci* **2004**, 24, (48), 10908-17.
182. Espuny-Camacho, I.; Dominguez, D.; Merchiers, P.; Van Rompaey, L.; Selkoe, D.; De Strooper, B., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhances the activity of an insulin degrading enzyme-like metalloprotease for amyloid-beta clearance. *J Alzheimers Dis* **2010**, 20, (4), 1119-32.
183. Du, J.; Sun, B.; Chen, K.; Fan, L.; Wang, Z., Antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces cerebellar amyloid-beta levels and motor dysfunction in APP/PS1 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 384, (3), 357-61.
184. Shie, F. S.; Nivison, M.; Hsu, P. C.; Montine, T. J., Modulation of microglial innate immunity in Alzheimer's disease by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Curr Med Chem* **2009**, 16, (6), 643-51.
185. Strum, J. C.; Shehee, R.; Virley, D.; Richardson, J.; Mattie, M.; Selley, P.; Ghosh, S.; Nock, C.; Saunders, A.; Roses, A., Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. *J Alzheimers Dis* **2007**, 11, (1), 45-51.
186. Itoh, T.; Fairall, L.; Amin, K.; Inaba, Y.; Szanto, A.; Balint, B. L.; Nagy, L.; Yamamoto, K.; Schwabe, J. W., Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol* **2008**, 15, (9), 924-31.
187. Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Fujimoto, Y.; Maebara, K.; Kamiya, N.; Jingami, H.; Morikawa, K., Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol* **2009**, 385, (1), 188-99.
188. Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Morikawa, K., Atomic structure of mutant PPARgamma LBD complexed with 15d-PGJ2: novel modulation mechanism of PPARgamma/RXRalpha function by covalently bound ligands. *FEBS Lett* **2009**, 583, (2), 320-4.
189. Kuhn, B.; Hilpert, H.; Benz, J.; Binggeli, A.; Grether, U.; Humm, R.; Marki, H. P.; Meyer, M.; Mohr, P., Structure-based design of indole propionic acids as novel PPARalpha/gamma co-agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, (15), 4016-20.
190. Pirard, B., Peroxisome proliferator-activated receptors target family landscape: a chemometrical approach to ligand selectivity based on protein binding site analysis. *J Comput Aided Mol Des* **2003**, 17, (11), 785-96.
191. Zettl, H.; Steri, R.; Lämmerhofer, M.; Schubert-Zsilavecz, M., Discovery of a novel class of 2-mercaptohexanoic acid derivatives as highly active PPARalpha agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, 19, (15), 4421-4426.
192. Thieme, T. M.; Steri, R.; Proschak, E.; Paulke, A.; Schneider, G.; Schubert-Zsilavecz, M., Rational design of a pirinixic acid derivative that acts as subtype-selective PPARgamma modulator. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, (8), 2469-73.
193. Willson, T. M.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Henke, B. R., The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **2000**, 43, (4), 527-50.

194. Ji, S.; Kronenberg, G.; Balkaya, M.; Farber, K.; Gertz, K.; Kettenmann, H.; Endres, M., Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome. *Exp Neurol* **2009**, *216*, (2), 321-8.
195. Ramachandran, U.; Kumar, R.; Mittal, A., Fine tuning of PPAR ligands for type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Mini Rev Med Chem* **2006**, *6*, (5), 563-73.
196. Escribano, L.; Simón, A.-M.; Pérez-Mediavilla, A.; Salazar-Colocho, P.; Del Río, J.; Frechilla, D., Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model. *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, *379*, (2), 406-410.
197. Escribano, L.; Simon, A. M.; Gimeno, E.; Cuadrado-Tejedor, M.; Lopez de Maturana, R.; Garcia-Osta, A.; Ricobaraza, A.; Perez-Mediavilla, A.; Del Rio, J.; Frechilla, D., Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology. *Neuropsychopharmacology* **2010**, *35*, (7), 1593-604.
198. Risner, M. E.; Saunders, A. M.; Altman, J. F.; Ormandy, G. C.; Craft, S.; Foley, I. M.; Zvartau-Hind, M. E.; Hosford, D. A.; Roses, A. D., Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* **2006**, *6*, (4), 246-54.
199. Craft, S.; Asthana, S.; Schellenberg, G.; Baker, L.; Cherrier, M.; Boyt, A. A.; Martins, R. N.; Raskind, M.; Peskind, E.; Plymate, S., Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Ann N Y Acad Sci* **2000**, *903*, 222-8.
200. Craft, S.; Asthana, S.; Schellenberg, G.; Cherrier, M.; Baker, L. D.; Newcomer, J.; Plymate, S.; Latendresse, S.; Petrova, A.; Raskind, M.; Peskind, E.; Lofgreen, C.; Grimwood, K., Insulin metabolism in Alzheimer's disease differs according to apolipoprotein E genotype and gender. *Neuroendocrinology* **1999**, *70*, (2), 146-52.
201. Gold, M.; Alderton, C.; Zvartau-Hind, M.; Egginton, S.; Saunders, A. M.; Irizarry, M.; Craft, S.; Landreth, G.; Linnamagi, U.; Sawchak, S., Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement Geriatr Cogn Disord* **2010**, *30*, (2), 131-46.
202. Yan, Q.; Zhang, J.; Liu, H.; Babu-Khan, S.; Vassar, R.; Biere, A. L.; Citron, M.; Landreth, G., Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **2003**, *23*, (20), 7504-9.
203. Heneka, M. T.; Sastre, M.; Dumitrescu-Ozimek, L.; Hanke, A.; Dewachter, I.; Kuiperi, C.; O'Banion, K.; Klockgether, T.; Van Leuven, F.; Landreth, G. E., Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* **2005**, *128*, (Pt 6), 1442-53.
204. Hanyu, H.; Sato, T.; Kiuchi, A.; Sakurai, H.; Iwamoto, T., Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc* **2009**, *57*, (1), 177-9.
205. Sato, T.; Hanyu, H.; Hirao, K.; Kanetaka, H.; Sakurai, H.; Iwamoto, T., Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **2009**.
206. Geldmacher, D. S.; Fritsch, T.; McClendon, M. J.; Landreth, G., A Randomized Pilot Clinical Trial of the Safety of Pioglitazone in Treatment of Patients With Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **2010**.
207. Lipscombe, L. L.; Gomes, T.; Levesque, L. E.; Hux, J. E.; Juurlink, D. N.; Alter, D. A., Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes. *Jama* **2007**, *298*, (22), 2634-43.
208. Choi, J. H.; Banks, A. S.; Estall, J. L.; Kajimura, S.; Bostrom, P.; Laznik, D.; Ruas, J. L.; Chalmers, M. J.; Kamenecka, T. M.; Bluher, M.; Griffin, P. R.; Spiegelman, B. M., Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature* **2010**, *466*, (7305), 451-6.
209. Houtkooper, R. H.; Auwerx, J., Obesity: New life for antidiabetic drugs. *Nature* **2010**, *466*, (7305), 443-4.
210. nach Thomsen Reuter's Integrity-Datenbank. <https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>.
211. Oberfield, J. L.; Collins, J. L.; Holmes, C. P.; Goreham, D. M.; Cooper, J. P.; Cobb, J. E.; Lenhard, J. M.; Hull-Ryde, E. A.; Mohr, C. P.; Blanchard, S. G.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Lehmann, J. M.; Plunket, K.; Miller, A. B.; Milburn, M. V.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M., A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, (11), 6102-6.
212. Einstein, M.; Akiyama, T. E.; Castriota, G. A.; Wang, C. F.; McKeever, B.; Mosley, R. T.; Becker, J. W.; Moller, D. E.; Meinke, P. T.; Wood, H. B.; Berger, J. P., The differential interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with Tyr473 is a physical basis for their unique biological activities. *Mol Pharmacol* **2008**, *73*, (1), 62-74.
213. Zhang, F.; Lavan, B. E.; Gregoire, F. M., Selective Modulators of PPAR-gamma Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. *PPAR Res* **2007**, *2007*, 32696.

214. Allen, T.; Zhang, F.; Moodie, S. A.; Clemens, L. E.; Smith, A.; Gregoire, F.; Bell, A.; Muscat, G. E.; Gustafson, T. A., Halofenate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with antidiabetic activity. *Diabetes* **2006**, *55*, (9), 2523-33.
215. Kintscher, U.; Goebel, M., INT-131, a PPARgamma agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* **2009**, *10*, (4), 381-7.
216. Higgins, L. S.; Depaoli, A. M., Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr* **2010**, *91*, (1), 267S-272S.
217. Motani, A.; Wang, Z.; Weiszmann, J.; McGee, L. R.; Lee, G.; Liu, Q.; Staunton, J.; Fang, Z.; Fuentes, H.; Lindstrom, M.; Liu, J.; Biermann, D. H.; Jaen, J.; Walker, N. P.; Learned, R. M.; Chen, J. L.; Li, Y., INT131: a selective modulator of PPAR gamma. *J Mol Biol* **2009**, *386*, (5), 1301-11.
218. d'Atri, G.; Gomasasca, P.; Resnati, G.; Tronconi, G.; Scolastico, C.; Sirtori, C. R., Novel pyrimidine and 1,3,5-triazine hypolipidemic agents. *J Med Chem* **1984**, *27*, (12), 1621-9.
219. Rau, O.; Syha, Y.; Zettl, H.; Kock, M.; Bock, A.; Schubert-Zsilavecz, M., Alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma. *Archiv der Pharmazie* **2008**, *341*, (3), 191-195.
220. Popescu, L.; Rau, O.; Böttcher, J.; Syha, Y.; Schubert-Zsilavecz, M., Quinoline-based derivatives of pirinixic acid as dual PPAR alpha/gamma agonists. *Archiv der Pharmazie* **2007**, *340*, (7), 367-371.
221. Zettl, H.; Dittrich, M.; Steri, R.; Proschak, E.; Rau, O.; Steinhilber, D.; Schneider, G.; Laemmerhofer, M.; Schubert-Zsilavecz, M., Novel Pirinixic Acids as PPARa Preferential Dual PPARa/g Agonists. *QSAR and Combinatorial Science* **2009**, *5*, 576-586.
222. Hieke, M.; Ness, J.; Steri, R.; Dittrich, M.; Greiner, C.; Werz, O.; Baumann, K.; Schubert-Zsilavecz, M.; Weggen, S.; Zettl, H., Design, synthesis, and biological evaluation of a novel class of gamma-secretase modulators with PPARgamma activity. *J Med Chem* **2010**, *53*, (12), 4691-700.
223. Lammerhofer, M.; Pell, R.; Mahut, M.; Richter, M.; Schiesel, S.; Zettl, H.; Dittrich, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Lindner, W., Enantiomer separation and indirect chromatographic absolute configuration prediction of chiral pirinixic acid derivatives: Limitations of polysaccharide-type chiral stationary phases in comparison to chiral anion-exchangers. *J Chromatogr A* **2010**, *1217*, (7), 1033-40.
224. Koeberle, A.; Zettl, H.; Greiner, C.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O., Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, (24), 8068-8076.
225. Bharate, S. B.; Khan, S. I.; Yunus, N. A.; Chauthé, S. K.; Jacob, M. R.; Tekwani, B. L.; Khan, I. A.; Singh, I. P., Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, (1), 87-96.
226. Harvey, J. N.; Jover, J.; Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Murray, P.; Renny, J. S., The Newman-Kwart rearrangement of O-aryl thiocarbamates: substantial reduction in reaction temperatures through palladium catalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, (41), 7612-5.
227. Yoshida, Y.; Barrett, D.; Azami, H.; Morinaga, C.; Matsumoto, S.; Matsumoto, Y.; Takasugi, H., Studies on anti-Helicobacter pylori agents. Part 1: Benzyloxyisoquinoline derivatives. *Bioorg Med Chem* **1999**, *7*, (11), 2647-66.
228. Czirr, E.; Cottrell, B. A.; Leuchtenberger, S.; Kukar, T.; Ladd, T. B.; Esselmann, H.; Paul, S.; Schubel, R.; Torpey, J. W.; Pietrzik, C. U.; Golde, T. E.; Wiltfang, J.; Baumann, K.; Koo, E. H.; Weggen, S., Independent generation of Abeta42 and Abeta38 peptide species by gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, (25), 17049-17054.

7. PUBLIKATIONSLISTE

7.1 Publikationen in *peer-reviewed Journals*

1. “*Design, synthesis, and biological evaluation of a novel class of γ -secretase modulators with PPAR γ activity*” **Journal of Medicinal Chemistry** 2010 (53) 4691–4700

M. Hieke, J. Ness, R. Steri, M. Dittrich, C. Greiner, O. Werz, K. Baumann, M. Schubert-Zsilavecz, S. Weggen und H. Zettl

Eigener Beitrag: Synthese der 15 wichtigsten Derivate incl. der Leitstrukturen, Verfassen des Manuskripts (mit Ausnahme der biochemischen Assay-Methoden)

2. “*A novel class of dual mPGES-1/5-LO inhibitors based on the α -naphthyl-pirinixic acid scaffold*” **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**; zur Publikation angenommen.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.01.049

M. Hieke, C. Greiner, T. Thieme, M. Schubert-Zsilavecz, O. Werz and H. Zettl

Eigener Beitrag: Testung der mPGES-1-Inhibition

3. „*Discovery and biological evaluation of a novel class of dual mPGES-1/ 5-LO inhibitors*” *submitted*

M. Hieke, C. Greiner, M. Dittrich, M. Schubert-Zsilavecz and O. Werz

Eigener Beitrag: Synthese von 34 Verbindungen, Testung der mPGES-1-Inhibition, Verfassen des Manuskripts (mit Ausnahme der Einleitung und biochemischen Assay-Methoden)

7.2 Konferenzbeiträge und Posterpräsentationen

7.2.1 Vorträge

1. First International SummerSchool on Lipid Signalling (26.-29.9.2010 Chieti)
“Synthesis and biological evaluation of dual γ -secretase/ PPAR γ modulators”

7.2.2 Posterpräsentationen

1. Summer School of Medicinal Chemistry (29.9-01.10.2008 Regensburg):
„Pirinix acid derivatives as fatty acid mimetics: Targets and SAR“
M. Dittrich., **M. Hieke**, T. Thieme, R. Steri, H. Zettl, M. Schubert-Zsilavecz
2. PreSatellite Meeting of the 2nd Pharmaceutical Sciences Fair and Exhibition (7.-8.6.2009 Nizza)
„Pirinixic acid derivatives as dual mPGES-1/ 5-LO inhibitors”
H. Zettl, **M. Hieke**, A. Koeberle, O. Werz, M. Schubert-Zsilavecz
3. EMBL Conference Chemical Biology (22.-25.9.2010 Heidelberg)
“Synthesis and characterization of dual γ -secretase/ PPAR γ modulators”
M. Hieke, J. Ness, R. Steri, M. Dittrich, C. Greiner, O. Werz, M. Schubert-Zsilavecz, S. Weggen und H. Zettl
4. The 10th Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s disease (6.-11.3.2011 Barcelona):
“Design of dual γ -secretase/ PPAR γ modulators as potential therapeutics for the treatment of Alzheimer’s disease”, Abstract für Posterpräsentation angenommen
M. Hieke, J. Ness, R. Steri, M. Dittrich, C. Greiner, O. Werz, M. Schubert-Zsilavecz, S. Weggen und H. Zettl

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Martina Hieke
Geburtsdatum	30. Mai 1983
Adresse	Graudenzer Str. 18a, 90491 Nürnberg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulische und universitäre Ausbildung

Nov bis Dez 2009	Forschungsaufenthalt an der Universität Tübingen (Arbeitskreis Prof. Dr. Oliver Werz), Charakterisierung von mPGES-1-Inhibitoren
Seit Mai 2008	Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation
Seit Jan 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis Prof. Dr. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt/Main
Dez 2007	Praktikumsbetreuung „Arzneistoffanalytik“, 5. Semester Pharmazie
Dez 2007	Approbation zur Apothekerin
Mai bis Okt 2007	Praktisches Jahr in der Marktapotheke Neunkirchen am Brand
Nov 06 bis Apr 07	Praktisches Jahr bei Merck KGaA, Abteilung „Produktion von festen Arzneistoffen“
Okt 02 bis Sept 06	Studium der Pharmazie , Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
1993 bis Jul 02	Melanchthon-Gymnasium Nürnberg, Abschluss Abitur
1989 bis 1993	Grundschule Bismarckschule Nürnberg

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Latein/	fließend in Schrift
Altgriechisch	

Hochschullehrer

Prof. Dr. Peter Gmeiner

Prof. Dr. Reinhard Troschütz

Prof. Dr. Burghardt Hinz

Prof. Dr. Gisa Tiegs

Prof. Dr. Martin Fromm

Prof. Dr. Geoffrey Lee

Prof. Dr. Wolfgang Kreis

Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Claudia und Herbert Hieke und meinem Bruder Tobias Hieke, die mich mein ganzes Leben lang in jeder Hinsicht unterstützt haben. Durch ihren Rückhalt war es mir überhaupt möglich, eine solche Arbeit zu beginnen.

Insbesondere möchte ich mich auch bei meinem Freund Dr. Heiko Zettl bedanken, der nicht nur in privaten Belangen für mich da war, sondern mir auch bei fachlichen Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat. Darüber hinaus danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Des Weiteren danke ich allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

... Ramona Steri für die Testung meiner Substanzen (PPAR), alle außeruniversitären Aktivitäten und eine schöne gemeinsame Promotionszeit.

... Michaela Dittrich, Christina Lamers und Thomas Hanke für ihre stete Diskussionsbereitschaft und eine tolle Zeit als Laborpartner.

... Dr. Christian Ude und Dr. Mario Wurglics für viele lustige Gespräche im Kaffeeraum und die Unterstützung bei bürokratischen und EDV-technischen Fragen (Mario).

... allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises: Dr. Alexander Paulke, Theresa Thieme, Maren Pellowaska, Matthias Gabler, Roberto Carrasco Gomez, Astrid Kaiser, Stefan Bihler, und Simon Zenglein.

... meinen Kooperationspartnern der Universität Düsseldorf, Prof. Dr. Sascha Weggen und Julia Ness für die Testung meiner Substanzen (γ -Sekretase, Notch) und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

... meinen Kooperationspartnern der Universität Tübingen, Prof. Dr. Oliver Werz und Christine Greiner für die Testung meiner Substanzen (5-LO und COX) und die erfolgreiche Zusammenarbeit. Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern des AK Werz für ihre nette Aufnahme in den Arbeitskreis und ihre Hilfsbereitschaft beim mPGES-1-Assay.

... Prof. Dr. Gisbert Schneider, Prof. Dr. Dieter Steinhilber und Dr. Eugen Proschak für die Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt der 5-LO Inhibitoren.

... Dr. Eugen Proschak für seine vielen Ideen, die stete Diskussionsbereitschaft und die gemeinsamen außeruniversitären Aktivitäten.

... meiner ehemaligen Laborpartnerin Miriam Walter für den gemeinsamen Kampf durch die anfänglichen Probleme in der Synthese, ein immer offenes Ohr und viele gemeinsame Aktivitäten.

... allen Betreuern des Praktikums Arzneibuchanalytik (Semester 5A): Prof. Dr. Holger Stark, Dr. Kerstin Sander, Dr. Uwe Hener sowie Eva Eichelsbacher, Miriam Tomasch und Stefan Schwed.

... und allen, die ich vergessen habe.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, der meine Doktorarbeit betreut hat und mich während meiner Promotionszeit in jeder Hinsicht unterstützt hat. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit, mich in zahlreichen Kooperationsprojekten zu engagieren und meine Ergebnisse auf verschiedenen Konferenzen zu präsentieren sowie die gemeinsamen Arbeitsgruppen-Seminare haben diese Zeit für mich zu einem ganz besonderen Lebensabschnitt gemacht.

10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „*Synthese und Charakterisierung von dualen γ -Sekretase/ PPAR γ -Modulatoren als potentielle Wirkstoffe zur Therapie von Morbus Alzheimer*“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Martina Hieke

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Martina Hieke

11. ANHANG

11.1 Abkürzungsverzeichnis

A β = Amyloid- β	HDAC = Histondeacetylase
ABCA1 = ABC-Transporter, Subfamilie A	HETE = Hydroxyeicosatetraensäure
ACh = Acetylcholin	HHT = Hydroxyheptadecatriensäure
AChEI = Acetylcholinesterase-Inhibitor	HODE = Hydroxyoctadecadiensäure
AD = Alzheimer-Demenz	HPLC = <i>high pressure liquid chromatography</i>
ADAM = <i>a disintegrin and metalloprotease</i>	HTS = <i>High Throughput Screening</i>
AF = Aktivierungsfunktion	IDE = <i>Insulin-degrading Enzyme</i>
AICD = APP-intrazelluläre Domäne	I-CLiP = <i>intramembrane-cleaving protease</i>
Aph1 = anterior pharynx defective-1	IL = Interleukin
APP = Amyloid Precursor Protein	5-LO = 5-Lipoxygenase
APOE = Apolipoprotein E	LBD = Liganden-Bindedomäne
AP-1 = Aktivator-Protein 1	LBP = Liganden-Bindetasche
AS = Aminosäure	LTP = Langzeit-Potenzierung
ASID = APP-Substrat-inhibitorische Domäne	LXR = <i>liver X-receptor</i>
BACE-1 = <i>β-site cleaving enzyme-1</i>	MCP-1 = Monozyten chemotaktisches Protein-1
CDK = <i>cyclin-dependent kinase</i>	MRT = Magnetresonanztomographie
CHO = <i>Chinese hamster ovar</i>	MS = Massenspektrometrie
CLU = Clusterin	N-CoR1 = <i>nuclear receptor corepressor-1</i>
CREB = <i>cAMP-response-element binding</i> Protein	Nct = Nicastrin
COX = Cyclooxygenase	NEXT = <i>Notch-extracellular truncation</i>
CR-1 = Komplement-Rezeptor-1	NF- κ B = Nukleärer Faktor-kappa B
CSF = cerebrospinale Flüssigkeit	NICD = Notch-intrazelluläre Domäne
CT = Computertomographie	NMDA = <i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
CTF = carboxyterminales Fragment	NMR = <i>nuclear magnetic resonance</i>
CYP = Cytochrom P450	NSAID = <i>non-steroidal antiinflammatory drug</i>
DBD = DNA-Bindedomäne	oxoETE = oxo-Eicosatetraensäure
DR-1 = <i>direct repeat-1</i>	PBP = PPAR-bindendes Protein
EA = Elementaranalyse	Pen-2 = <i>Presenilin enhancer-2</i>
ELISA = <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	PG = Prostaglandin
GSI(s) = γ -Sekretase-Inhibitor(en)	PGC-1 α = PPAR γ Coaktivator-1 α
GSM(s) = γ -Sekretase-Modulator(en)	PICALM = <i>phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
HAT = Histonacetyltransferase	

PPAR(s) = Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor(en)

PPRE = *PPAR-response element*

PS = Presenilin

ROS = reaktive Sauerstoffspezies

mRNA = messenger Ribonukleinsäuren

RXR = Retinoid-X Rezeptor

SAR = Struktur-Wirkungsbeziehungen

SERM = selektiver Estrogen-Rezeptor Modulator

sPPAR γ M = selektiver PPAR γ -Modulator

SMRT = *silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*

SRC1 = *steroid receptor coactivator*

TMD = transmembranäre Domäne

TMP = transmembranäres Protein

TMS = transmembranärer Sektor

TNF α = Tumor-Nekrose-Faktor α

T2DM = Typ-II Diabetes Mellitus

(V)LDL = (*very*) *low density lipoprotein*

ZNS = zentrales Nervensystem

11.2 Nachdruck der Publikation

“*Design, synthesis, and biological evaluation of a novel class of γ -secretase modulators with PPAR γ activity*” **Journal of Medicinal Chemistry** 2010 (53) 4691–4700

M. Hieke, J. Ness, R. Steri, M. Dittrich, C. Greiner, O. Werz, K. Baumann, M. Schubert-Zsilavec, S. Weggen und H. Zettl

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Novel Class of γ -Secretase Modulators with PPAR γ Activity

Martina Hieke,[†] Julia Ness,[‡] Ramona Steri,[†] Michaela Dittrich,[†] Christine Greiner,[§] Oliver Werz,[§] Karlheinz Baumann,^{||} Manfred Schubert-Zsilavecz,[†] Sascha Weggen,^{*,‡} and Heiko Zettl^{*,†,⊥}

[†]Institute of Pharmaceutical Chemistry, ZAFES/LiFF/Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany, [‡]Molecular Neuropathology Group, Department of Neuropathology, Heinrich-Heine University Duesseldorf, Moorenstrasse 5, D-40225 Duesseldorf, Germany, [§]Department of Pharmaceutical Analytics, Eberhard-Karls University Tuebingen, Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tuebingen, Germany, and ^{||}Pharmaceuticals Division, Preclinical Research CNS, F. Hoffmann-La Roche Ltd., CH-4070 Basel, Switzerland. [⊥]Present address: ETH Zurich, Institute of Pharmaceutical Sciences, Wolfgang-Pauli-Strasse 10, CH-8093 Zurich, Switzerland.

Received March 8, 2010

We present a novel class of dual modulators of γ -secretase and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) based on the structure of 2-(bis(phenethoxy)pyrimidine-2-ylthio)hexanoic acid **8** (IC₅₀(A β 42) = 22.8 μ M, EC₅₀(PPAR γ) = 8.3 μ M). The modulation of both targets with approved drugs (i.e., amyloid- β 42 (A β 42)-lowering NSAIDs for γ -secretase and glitazones for PPAR γ) has demonstrated beneficial effects in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease (AD). However, although NSAIDs and PPAR γ agonists share similar structural features, no druglike compounds with dual activities as γ -secretase modulators (GSMs) and PPAR γ agonists have been designed so far. On the basis of our initial lead structure **8**, we present the structure–activity relationships (SARs) of broad structural variations. A significant improvement was reached by the introduction of *p*-trifluoromethyl substituents at the phenyl residues yielding compound **16** (IC₅₀(A β 42) = 6.0 μ M, EC₅₀(PPAR γ) = 11.0 μ M) and the replacement of the two phenyl residues of **8** by cyclohexyl yielding compound **22** (IC₅₀(A β 42) = 5.1 μ M, EC₅₀(PPAR γ) = 6.6 μ M).

Introduction

Alzheimer's disease (AD^a) is the most common age-related cause of dementia with 26.6 million patients worldwide in 2006 and over a 100 million predicted cases by 2050.¹ The cardinal symptom of the disease is progressive memory loss due to the degeneration of neurons and synapses in the cerebral cortex and subcortical regions of the brain. The neuropathology of AD is characterized by the extracellular deposition of amyloid- β (A β) plaques, the formation of intracellular neurofibrillary tangles, chronic brain inflammation, and oxidative damage.² According to the modified amyloid hypothesis, small soluble oligomers of A β peptides, particularly those formed by the highly hydrophobic A β 42 species, are the disease-initiating agents in AD.³ A β 42 is a proteolytic fragment resulting from sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by two aspartyl proteases, i.e., β -secretase and γ -secretase. Currently, a variety of potentially disease-modifying therapeutic approaches are under development that target the production, aggregation, or clearance of A β peptides in brain (Scheme 1).^{4,5} Substantial advances have been made with respect to inhibitors of the

γ -secretase enzyme, a multiprotein complex that catalyzes the final step in the cellular generation of A β peptides. However, because of its essential role in the NOTCH signaling pathway, mechanism-based toxicity with severe phenotypes in the gastrointestinal and hematopoietic systems has been observed in preclinical studies of γ -secretase inhibitors^{6–8} and might be a limiting factor in clinical efficacy. Intriguingly, a subset of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen and indomethacin were found to modulate the γ -secretase activity in a way that allowed selective inhibition of A β 42 production (Figure 1).⁹ These compounds, termed γ -secretase-modulators (GSMs), shifted the proteolytic processing of APP toward higher production of shorter A β species such as A β 38 at the expense of the highly toxic A β 42. Importantly, impairment of NOTCH processing and signaling was not observed.^{9,10} Unfortunately, these NSAID-type GSMs suffer from low potency against γ -secretase (Figure 1), poor brain permeability, and side effects related to inhibition of cyclooxygenases (COX) such as gastrointestinal toxicity and increased cardiovascular mortality.¹¹ Consequently, NSAID-type GSMs and derived analogues, whose consumption appeared to confer a reduced risk for AD in epidemiological studies, have produced negative or inconclusive clinical results in patients suffering from established AD^{11–14} or showed unacceptable side effects for long-term treatment. Recently, potent GSMs with favorable pharmacological properties have emerged.^{15,16}

In addition, some NSAIDs including the GSMs indomethacin and ibuprofen function as agonists of the peroxisome

*To whom correspondence should be addressed. For S.W.: phone, +49 (211) 8104506; fax, +49 (211) 8104577; e-mail, sweggen@uni-duesseldorf.de. For H.Z.: phone, +41 (44) 6339113; fax, +41 (44) 6331379; e-mail, heiko.zettl@pharma.ethz.ch.

^a Abbreviations: A β , amyloid β peptide; AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; COX, cyclooxygenase; GSM, γ -secretase modulator; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SAR structure–activity relationship.

Scheme 1. Amyloid Cascade

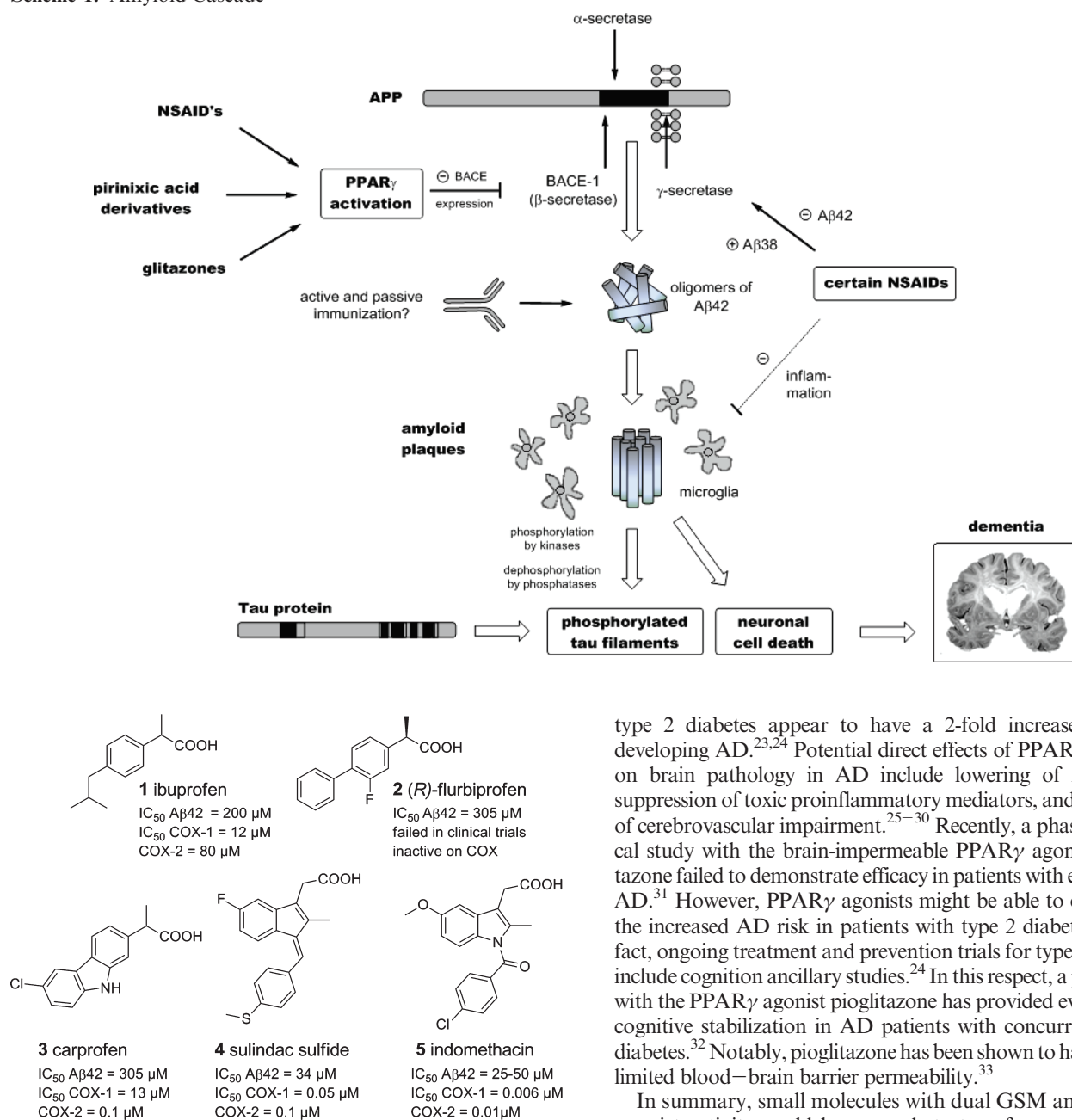


Figure 1. In vitro pharmacology of γ -secretase-modulating NSAIDs.^{15,47–49}

proliferator-activated receptor γ (PPAR γ).^{17,18} PPAR γ belongs to a family of ligand-activated nuclear receptors that act as lipid sensors, and synthetic ligands for PPAR γ include the widely prescribed antidiabetic drugs rosiglitazone and pioglitazone.¹⁹ Evidence indicates that PPAR γ agonists might have multiple beneficial effects in AD both on core pathological processes in brain and on peripheral factors such as serum glucose levels and insulin sensitivity that constitute potential risk factors for AD.²⁰ Several studies have demonstrated that AD is associated with perturbations in insulin metabolism, and diet-induced insulin resistance caused increased brain A β levels and plaque formation in a mouse model of AD.²¹ In addition, a recent cross of an AD mouse model to leptin-deficient diabetic mice revealed accelerated learning deficits and severe cerebrovascular amyloid deposition.²² Importantly, individuals with

type 2 diabetes appear to have a 2-fold increased risk of developing AD.^{23,24} Potential direct effects of PPAR γ agonists on brain pathology in AD include lowering of A β levels, suppression of toxic proinflammatory mediators, and reduction of cerebrovascular impairment.^{25–30} Recently, a phase III clinical study with the brain-impermeable PPAR γ agonist rosiglitazone failed to demonstrate efficacy in patients with established AD.³¹ However, PPAR γ agonists might be able to counteract the increased AD risk in patients with type 2 diabetes, and in fact, ongoing treatment and prevention trials for type 2 diabetes include cognition ancillary studies.²⁴ In this respect, a pilot study with the PPAR γ agonist pioglitazone has provided evidence for cognitive stabilization in AD patients with concurrent type 2 diabetes.³² Notably, pioglitazone has been shown to have at least limited blood–brain barrier permeability.³³

In summary, small molecules with dual GSM and PPAR γ agonist activity could be a novel strategy for prevention of AD, particularly in patients with type 2 diabetes. In an initial screening of our in-house compound library, we have identified compound **8** (2-(bis(phenethoxy)pyrimidine-2-ylthio)hexanoic acid) that displayed a typical GSM profile and concentration-dependently and selectively decreased A β 42 levels with a concomitant increase in A β 38 production (IC_{50} -(A β 42) = 22.8 μ M, EC_{50} (A β 38) = 11.3 μ M, Figure 2). Additionally, compound **8** is a subtype-selective PPAR γ modulator (EC_{50} = 8.3 μ M, 60% max activation). Here, we describe the structure–activity relationships (SARs) of a novel class of dual γ -secretase/PPAR γ modulators based on the scaffold of compound **8**. Our strategy aimed at improving the GSM activity while maintaining PPAR γ agonism. Characteristic structural features of compound **8** are a carboxylic acid headgroup and two phenethyl residues forming a lipophilic backbone. As conventional NSAIDs have similar structural features, we further determined the inhibitory activity of all compounds for COX-1 and COX-2.

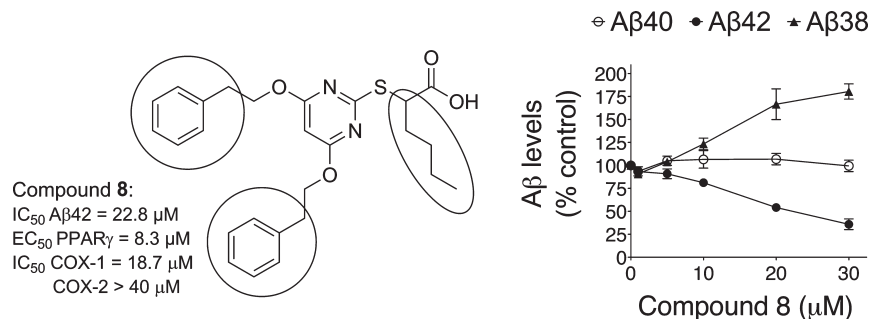
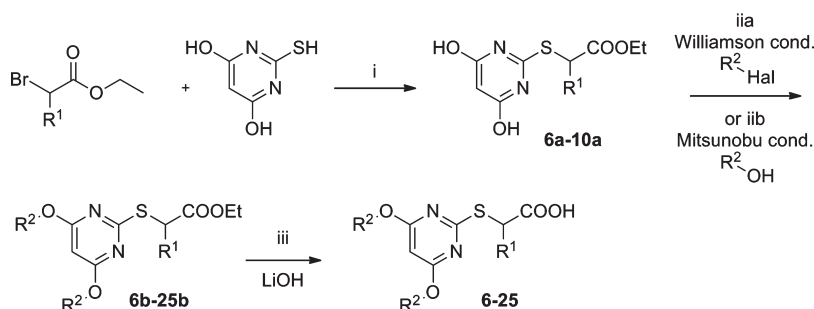


Figure 2. Lead compound **8** and its impact on Aβ38, Aβ40, and Aβ42 formation. SARs based on **8** were obtained by structural modifications of the encircled residues.

Scheme 2. Synthetic Route of Compounds 6–25^a



^a Reagents and conditions: (i) 2-bromo-(R^1)-ethyl acetate (1.5 equiv), thiobarbituric acid (1 equiv), TEA (1.5 equiv), DMF, 80 °C, 4 h; (ii) **6a–10a** (1 equiv), R^2 -Hal (2.1 equiv), K_2CO_3 (2.3 equiv), DMF, 80 °C, 3–28 h or (iib) **6a–10a** (1 equiv), R^2 -OH (2 equiv), DEAD (2.5 equiv), TPP (2.5 equiv), THF, room temp, 1–3 h; (iii) LiOH (5 equiv), THF/MeOH, H_2O , 25–50 °C, 2–24 h.

Chemistry

The general synthetic procedure of the compounds is illustrated in Scheme 2. Presented compounds were prepared in a three-step reaction, which has been described previously by Koeberle et al.³⁴ First, a nucleophilic substitution between thiobarbituric acid and the respective α -bromoethyl ester using dimethylformamide (DMF) as solvent and triethylamine (TEA) as corresponding base was carried out. This step was followed by the etherification of the two hydroxyl groups, either by a Mitsunobu reaction or by a Williamson ether synthesis. In the case of the Mitsunobu reaction, we used the precursor, the respective alcohol, triphenylphosphine (TPP), and diethylazodicarboxylate (DEAD) and stirred the solution at room temperature under argon atmosphere.³⁵ The Williamson ether synthesis was carried out with the respective alkyl halogenide, K_2CO_3 , and DMF at 80 °C. Finally, the ester group was hydrolyzed with LiOH in tetrahydrofuran (THF) and H_2O to yield final compounds **6–25**.

Biological Assays

PPAR activity of the final compounds was tested in a cellular luciferase-based PPAR transactivation assay, which has been described previously.³⁶ Final compounds **6–25** were fully characterized on all PPAR subtypes (α , γ , and δ). Since every derivative described in this paper was inactive on PPAR α and PPAR δ (tested concentration of 10 μM), the following discussion is only focused on PPAR γ activity. For biological characterization of GSM activity, we measured the levels of Aβ38, Aβ40, and Aβ42 peptides in cell supernatants with an ELISA assay as described with some modifications.³⁷ Inhibition of COX was tested in a cell-free assay using isolated ovine COX-1 and human recombinant COX-2 enzymes.³⁴

Potential effects on proteolytic processing of NOTCH were investigated for the two compounds with the highest GSM activity using a previously described reporter assay.³⁸ Cytotoxicity of all compounds was determined using alamar blue reagent.

Results

In an initial screening of our in-house-library we have identified 2-(bis(phenethoxy)pyrimidine-2-ylthio)hexanoic acid **8**, a selective PPAR γ modulator that displayed the characteristic GSM activity with $IC_{50}(A\beta_{42}) = 22.8 \mu M$ (Figure 2). As the first hit, compound **8** served as the structural template for all presented derivatives. Important structural features of **8** are two 2-phenethyl residues forming a lipophilic backbone and a carboxylic acid function as headgroup. This acidic headgroup is an essential structural element required for PPAR γ activation³⁹ and of NSAID-type GSMs.^{15,40} Therefore, we have not modified the carboxylic acid group and focused our efforts on the remaining parts of lead structure **8**.

In previous studies, we have observed that the length of the alkyl chain of α -substituted pirinixic acid derivatives has a high impact on PPAR activity.^{41,42} Hence, we systematically varied this position by elongation and shortening of the α -*n*-butyl residue as well as by introduction of a α -phenyl residue (compounds **6–10**; see Table 1). The inhibitory activity on Aβ42 production showed clear SAR depending on the length of the α -alkyl chain. Removal of the α -chain (compound **6**, $R^1 = H$) caused a complete loss of GSM activity. In line with this observation, compound **7** with the shorter ethyl residue showed only weak GSM activity ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 41.6 \mu M$). A slight decrease of GSM activity was also observed after elongation to *n*-hexyl (compound **9**). In regard to PPAR γ

Table 1. PPAR γ Activation and γ -Secretase Modulation (Determined by A β 42 Inhibition and A β 38 Activation) of Compounds 6–25^a

Compound			PPAR γ activation		γ -secretase modulation	
	R ₁	R ₂	EC ₅₀ in μ M \pm SD	Maximal activation in [%] \pm SD	Inhibition of A β 42 (IC ₅₀ in μ M)	Activation of A β 38 (EC ₅₀ in μ M)
Variation of α-substitution						
6	-H		3.7 \pm 1.0	111 \pm 22	> 40	> 40
7			6.1 \pm 0.2	57 \pm 2	41.6	31.1
8			8.3 \pm 0.1	61 \pm 1	22.8	11.3
8c			22% @10 μ M		21.5	8.4
8d			10.4 \pm 0.4	62 \pm 3	32.6	13.5
9			8.8 \pm 0.4	59 \pm 5	30.4	24.2
10			Inactive		29.3	12.8
Variation of alkyl spacer						
11			31% @ 20 μ M		25.2	24.2
12			8.9 \pm 2.1	71 \pm 14	30.9	16.4
13			10.0 \pm 1.2	55 \pm 7	22.9	16.4
Introduction of para-substituents						
14			7.5 \pm 1.4	63 \pm 17	13.0	6.4
15			23% @10 μ M		19.3	6.2
16			11.0 \pm 0.3	112 \pm 2	6.0	1.8
17			10.3 \pm 1.6	115 \pm 21	8.6	5.5
18			33% @ 6 μ M		31.2	Not determined
19			7.0 \pm 0.9	65 \pm 7	> 40	Not determined
20			32% @10 μ M		37.7	17.5
Introduction of aliphatic residues						
21			Inactive		11.3	1.9
22			6.6 \pm 0.4	71 \pm 5	5.1	4.6
23			12.1 \pm 0.2	127 \pm 2	17.2	9.0
24			4.3 \pm 0.9	79 \pm 8	> 40	24.0
25			11.0 \pm 0.1	69 \pm 1	28.2	10.9

^a Inactive: tested concentration of 10 μ M.

activation, the length of the α -alkyl chain did not considerably influence the activity (EC₅₀ values of 6–9 between 3 and 9 μ M,

with a tendency for decreased activity with longer chains). Phenyl-substituted **10** showed no PPAR γ activity and can

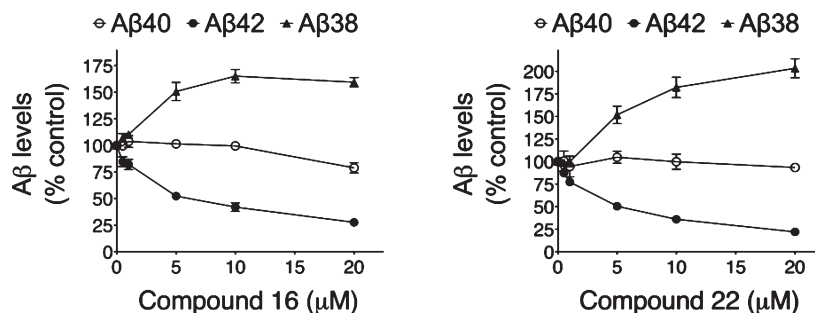


Figure 3. GSM activity of compounds **16** and **22**: dose–response curves for A β 40, A β 42, and A β 38 formation.

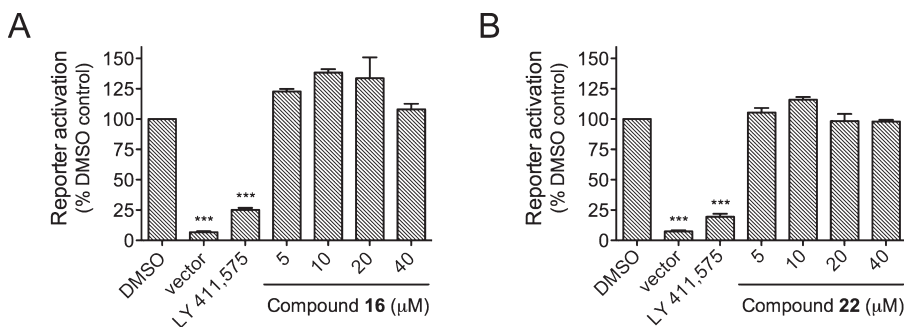


Figure 4. Lack of effect of compounds **16** and **22** in the NOTCH reporter gene assay.

thus be described as a conventional GSM. With an IC_{50} of 29.3 μ M for A β 42 inhibition, compound **10** is somewhat less potent compared to the lead structure. Together, the initial *n*-butyl chain (**8**) turned out to have the optimal chain length in α -position for dual modulation of γ -secretase and PPAR γ . Interestingly, it was possible to modify the activity profile toward a conventional GSM by the introduction of a bulky phenyl moiety in α -position to the carboxylic acid.

On the basis of previous studies where we have assessed the influence of the stereochemical configuration of some α -alkyl substituted pirinixic acid derivatives on PPAR activity,⁴³ we decided to investigate the stereochemical impact on the biological activity of **8**. We have separated **8** into its single enantiomers (**8c** and **8d**) using enantioselective preparative HPLC.⁴⁴ While the (*R*)-enantiomer **8c** ($IC_{50}(A\beta 42) = 21.5 \mu$ M) showed slightly superior activity compared to the (*S*)-enantiomer (**8d**) ($IC_{50}(A\beta 42) = 32.6 \mu$ M) on γ -secretase, the results on PPAR γ were vice versa (**8c**, 22% activation at 10 μ M; **8d**, $EC_{50} = 10.4 \mu$ M). In summary, we were not able to identify any superior biological activity of one enantiomer. Thus, the stereocenter in the α -position of the carboxylic acid does not cause a significant impact on γ -secretase and PPAR γ activity.

Most space for structural modifications is provided by the two ether substituents of the central pyrimidine core of lead structure **8**. First, we elongated and shortened the aliphatic spacer between the two ether moieties and the phenyl residues (compounds **11**–**13**). Compound **11** ($IC_{50}(A\beta 42) = 25.2 \mu$ M) with a shorter methylene and compound **13** with a longer butylene spacer were almost equipotent on γ -secretase compared to **8**, whereas the elongation to a propylene spacer (**12**) led to a decreased potency. In regard to PPAR γ activation, the methylene analogue **11** showed a substantially decreased activity. The elongation to propylene and butylene spacers (**12** and **13**) did not cause considerable changes in PPAR γ activity.

Second, we introduced different substituents in para-position of both phenyl moieties based on lead structure **8**. Methyl

(compound **14**) and methoxy (**15**) substituents increased GSM activity with methyl ($IC_{50}(A\beta 42) = 13.0 \mu$ M) being slightly superior to methoxy ($IC_{50}(A\beta 42) = 19.3 \mu$ M). Further improvement of A β 42 inhibition was finally achieved by introduction of trifluoromethyl (**16**) ($IC_{50}(A\beta 42) = 6.0 \mu$ M, Figure 3) and trifluoromethoxy moieties (**17**) ($IC_{50}(A\beta 42) = 8.6 \mu$ M), which belong to the most potent GSMs from this series. Compounds **16** and **17** modulate PPAR γ with an EC_{50} of about 10 μ M. In contrast to these four derivatives, introduction of nitro (**18**), cyano (**19**), and the bioisosteric replacement of both benzenes by thiophene (**20**) caused a clear decrease of GSM activity with IC_{50} values above 30 μ M.

Finally, we replaced the phenyl moieties by aliphatic rings of various sizes. Substitution with cycloheptyl (**21**), cyclohexyl (**22**), and cyclopentyl (**23**) moieties improved the potency regarding inhibition of GSM activity with IC_{50} values for A β 42 in the low micromolar range. The cyclopentyl ($IC_{50}(A\beta 42) = 17.2 \mu$ M) and cycloheptyl ($IC_{50}(A\beta 42) = 11.3 \mu$ M) derivatives showed considerable activity. However, the most active compound is the cyclohexyl derivative **22** ($IC_{50}(A\beta 42) = 5.1 \mu$ M), which represents the most potent GSM presented in this study (Figure 3). Further size restriction to cyclopropyl (**24**) as well as ring-opening of the cyclopropyl (isopentyl-substituted **25**) was detrimental with $IC_{50} > 28 \mu$ M. Within this series, PPAR γ activity remained in the range between 4 and 11 μ M (**21**–**25**). The largest cycloheptyl substituent (**21**) caused a complete loss of PPAR γ activity, thereby representing the second conventional GSM besides α -phenyl substituted **10**.

NOTCH Processing. Potential effects on NOTCH processing were examined for compounds **16** and **22** that displayed the highest GSM activity with an established reporter assay.³⁸ Treatment of cells with the γ -secretase inhibitor L-685,458 or replacement of the plasmid encoding NOTCH with an empty vector caused a dramatic decrease in reporter activity as expected (Figure 4). However, treatment of cells with 5–40 μ M compounds **16** (Figure 4A) and **22** (Figure 4B)

Table 2. COX Inhibition of Compounds 6–25^a

compd	remaining activity ± SD at 10 μM (%)		compd	remaining activity ± SD at 10 μM (%)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
6	91.8 ± 5.5	91.7 ± 15.6	15	72.8 ± 29.1	94.6 ± 33.0
7	84.6 ± 5.5	56.9 ± 1.4	16	54.4 ± 23.6	69.0 ± 27.7
8	64.2 ± 24.8 IC ₅₀ = 18.7 μM	90.9 ± 28.8 IC ₅₀ > 40 μM	17	73.0 ± 11.5 IC ₅₀ = 16.9 μM	75.8 ± 8.7 IC ₅₀ > 40 μM
8c	73.9 ± 15.8	98.5 ± 11.1	18	82.1 ± 12.2	91.6 ± 14.6
8d	83.5 ± 12.6	92.8 ± 2.1	19	88.8 ± 16.6	82.6 ± 24.3
9	61.8 ± 17.0	63.8 ± 16.8	20	76.6 ± 6.9	102.4 ± 16.9
10	72.2 ± 13.3	86.0 ± 21.8	21	56.1 ± 8.8	50.1 ± 9.3
11	88.9 ± 21.3	61.6 ± 2.4	22	52.7 ± 11.1 IC ₅₀ = 13.4 μM	49.5 ± 18.5 IC ₅₀ = 10.9 μM
12	78.8 ± 14.9	51.9 ± 11.3	23	68.2 ± 6.9	84.7 ± 3.5
13	78.8 ± 14.0	53.9 ± 14.2	24	97.7 ± 17.4	87.9 ± 5.8
14	57.2 ± 12.7	93.3 ± 20.0	25	72.4 ± 31.3	80.5 ± 25.5

^aIC₅₀ values were determined for compounds **8**, **16**, and **22**.

did not reduce reporter activity, indicating that these potent dual γ -secretase/PPAR γ modulators did not affect NOTCH processing or signaling in this concentration range (Figure 4).

Cytotoxicity. Cytotoxicity of all novel analogues was determined in the concentration range between 10 and 100 μ M using Alamar blue reagent and is summarized in the Supporting Information. With one exception (i.e., compound **16**), none of the compounds displayed detectable cytotoxicity up to 60 μ M. Compound **16** showed 25% cytotoxicity at 60 μ M without significant effects at 40 μ M, which is 6- to 7-fold above its IC₅₀ value for A β 42 inhibition (6.0 μ M).

COX Inhibition. Most NSAIDs-type GSMs such as indomethacin inhibit COX-1 and COX-2 with IC₅₀ values in the nanomolar range (Figure 1). Consequently, COX-related side effects are a major obstacle for their long-term clinical use. Thus, one of the main objectives of this study was to develop a potent dual γ -secretase/PPAR γ modulator with substantially weaker COX inhibitory activity compared to NSAID-type GSMs. Inhibition of isolated ovine COX-1 and human recombinant COX-2 is summarized in Table 2 and presented as remaining activity at 10 μ M. Importantly, all novel compounds synthesized within this study were weak COX-1 and COX-2 inhibitors with at least half-maximal remaining activities at 10 μ M. Furthermore, we have determined IC₅₀ values for lead compound **8** as well as for the most active compounds **16** and **22**. Compound **8** displays moderate COX-1 inhibition with an IC₅₀ of 18.7 μ M and very weak COX-2 inhibition (IC₅₀ > 40 μ M). The introduction of cyclohexyl residues (compound **22**: IC₅₀(A β 42) = 5.1 μ M, EC₅₀(PPAR γ) = 6.6 μ M) improved dual γ -secretase/PPAR γ activity but also caused slightly increased COX-1 inhibition and COX-2 inhibition (IC₅₀(COX-1) = 13.4 μ M, IC₅₀(COX-2) = 10.9 μ M). *p*-Trifluoromethylphenyl-substituted **16** (IC₅₀(A β 42) = 6.0 μ M, EC₅₀(PPAR γ) = 11 μ M) shows weaker COX-1 inhibitory activity (IC₅₀ = 16.9 μ M) while sparing inhibition of COX-2. These results suggest an advantage of *p*-trifluoromethylphenyl over cyclohexyl substitution in regard to COX selectivity. In summary, the introduction of *p*-trifluoromethylphenyl residues (**16**) resulted in the most favorable pharmacological profile with superiority of GSM activity versus COX-inhibition.

Discussion

This study presents the successful establishment of a novel and robust scaffold for potent dual γ -secretase/PPAR γ modulators. The structural starting point was our initial hit **8**,

which was used as a template for structural variations with a special focus on the lipophilic parts of the molecule. Our SAR studies revealed clear SAR in α -position to the carboxylic acid, where the introduction of a *n*-butyl chain led to the highest GSM activity. In contrast, the lipophilic backbone of the molecule showed high tolerance toward structural modification. Introduction of different aromatic and aliphatic moieties linked by aliphatic spacers was well tolerated and showed activity on both γ -secretase and PPAR γ . Substantial improvement was finally achieved by the replacement of the two phenyl residues with cyclohexyl (**22**) or by the attachment of *p*-trifluoromethyl substituents (**16**). Cyclohexyl-substituted **22** showed nearly equipotent activities in the low micromolar range with an A β 42 IC₅₀ of 5.1 μ M and a PPAR γ EC₅₀ of 6.6 μ M. The *p*-trifluoromethyl derivative had comparable GSM activity with an A β 42 IC₅₀ of 6.0 μ M, slightly weaker PPAR γ activity with an EC₅₀ of 11 μ M but the more promising selectivity profile (IC₅₀(COX-1) = 16.9 μ M, IC₅₀(COX-2) > 40 μ M). Importantly, these compounds did not impair NOTCH processing in the noncytotoxic concentration range.

Taken together, this series represents the first class of compounds described as dual γ -secretase/PPAR γ modulators. By structural modifications we were able to cover the whole range from selective GSMs to equipotent and low micromolar active dual γ -secretase/PPAR γ modulators. A major liability of the initially discovered GSMs in the class of NSAIDs are COX-associated gastrointestinal and cardiovascular side effects. These side effects most likely preclude the long-term use of A β 42-lowering NSAIDs to prevent AD.⁴⁵ However, the here presented compounds show substantially lower COX inhibition compared to A β 42-lowering NSAIDs such as ibuprofen (Figure 1). We propose that dual γ -secretase/PPAR γ modulators could provide a promising strategy to address the increased dementia risk in patients with insulin resistance and type 2 diabetes. In these individuals, dual-active molecules might ameliorate the deleterious effects associated with insulin resistance by activation of PPAR γ and further confront the elevated risk for AD by modulating γ -secretase activity and lowering A β 42 levels in brain.

Experimental Section

Compounds and Chemistry. The structures of compounds **6**–**25** were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, and mass spectrometry (ESI). The purities of the final compounds described here were determined by combustion analysis and are 95% or

higher. Commercial chemicals and solvents were reagent grade and used without further purification. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured in $\text{DMSO-}d_6$ or CDCl_3 on a Bruker ARX 300 (^1H NMR) and AC 200 E (^{13}C NMR) spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Mass spectra were obtained on a Fissous Instruments VG Platform 2 spectrometer measuring in the positive- or negative-ion mode (ESI-MS system). Combustion analysis was performed by the Microanalytical Laboratory of the Institute of Organic Chemistry and Chemical Biology, Goethe University Frankfurt, on a Foss Heraeus CHNO rapid elemental analyzer (for details see the Supporting Information).

The general synthesis of compounds (Scheme 2) follows the routes described recently.³⁴ The synthetic procedure is described representatively for compounds **8** and **16**. Detailed synthesis and analytical data of all compounds are provided in the Supporting Information.

Step i. 2-Thiobarbituric acid (4.33 g/30 mmol, 1 equiv) was suspended in anhydrous DMF (~30 mL, quantum satis), and triethylamine (4.56 g/45 mmol, 1.5 equiv) was added. Heating to 80–90 °C yielded a clear solution, to which ethyl 2-bromohexanoate (10.05 g/45 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise. After being stirred for 4 h at 80 °C (TLC control), the reaction mixture was quenched with at least four parts of water and extracted three times with ethyl acetate. Solvent evaporation of the organic phase yielded the crude product, which was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate to obtain **8a** as a white solid. Yield: 55.9% (4.8 g).

Step iia. Compound **8b** was prepared under Williamson conditions. The precursor from step i (1.2 g/4.19 mmol, 1 equiv) and (2-bromoethyl)benzene (1.63 g/8.8 mmol, 2.1 equiv) were suspended in anhydrous DMF (quantum satis) and heated to 80–90 °C. K_2CO_3 (1.34 g/9.72 mmol, 2.32 equiv) was added, and the resulting suspension was stirred for 9 h. After completion of the reaction (TLC control), DMF was evaporated in vacuo at 60 °C and the remaining solid was diluted with water. After neutralization to pH 7, the aqueous phase was extracted two times with ethyl acetate. The combined organic fractions were washed with brine and dried over MgSO_4 . Solvent evaporation gave the crude product, which was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate to yield **8b** as clear oil. Yield: 63.7% (1.32 g).

Step iib. Compound **16b** was synthesized under Mitsunobu conditions. Thereby, **8a** (0.45 g/1.6 mmol, 1 equiv), 4-trifluoromethylphenylethanol (0.6 g/3.2 mmol, 2.1 equiv), and triphenylphosphine (1.2 g/4.57 mmol, 2.5 equiv) were dissolved in anhydrous THF and stirred under argon atmosphere with ice bath cooling. Diethylazodicarboxylate (DEAD, 0.78 g/4.57 mmol, 2.5 equiv) diluted in 5 mL of THF was added dropwise via a syringe, and the solution was stirred for 1 h until the reaction was completed (TLC control). Subsequently, THF was evaporated and the remaining residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate to yield **16b** as clear oil in 64.3% (0.64 g) yield.

Step iii. The corresponding ester (**8b** (0.84 g/1.7 mmol, 1 equiv) or **16b** (0.4 g/0.6 mmol, 0.6 equiv)) was dissolved in a mixture of 5 mL of THF/10 mL of MeOH, and a solution of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 equiv) in 3 mL of H_2O was added. After the mixture was stirred at 50 °C until saponification was completed, the solvent was removed and the residue was dissolved in water (under heating; if necessary, low amounts of MeOH were added). The solution was acidified with diluted hydrochloric acid. The formed precipitate (**8**) was filtered, washed to neutrality with water, and then washed with *n*-hexane. Recrystallization from *n*-hexane/ethyl acetate yielded compound **8** as a white solid. Yield: 78.4% (0.62 g).

In the case of compound **16**, the precipitate formed after addition of diluted hydrochloric acid was oily. To purify the crude product, the residue was extracted with ethyl acetate and

separated by column chromatography using *n*-hexane/ethyl acetate. Yield: 92.2% (0.35 g).

Ethyl 2-(4,6-Dihydroxypyrimidin-2-ylthio)hexanoate (8a). White solid, mp 173 °C. ^1H NMR (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.82–0.87 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH_3 -Bu), 1.14–1.19 (t, 3H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_3$), 1.28–1.31 (m, 4H, CH_2 -Bu), 1.72–1.92 (m, 2H, CH_2 -Bu), 4.08–4.15 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH_2), 4.47–4.52 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 5.22 (s, 1H, Pyr-5H), 11.75 (s, br, 2H, Pyr-OH). ^{13}C NMR (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.63 ($-\text{CH}_3$), 13.89 (CH_3 -Bu), 21.59 (CH_2 -Bu), 28.49 (CH_2 -Bu), 31.27 (CH_2 -Bu), 46.39 (S-CH), 61.06 (OCH_2), 85.62 (Pyr-C₅), 167.79 (Pyr-C₂), 170.86 (COO). MS (ESI⁻): m/e = 284.9 [$\text{M} - 1$]⁻.

Ethyl 2-(4,6-Diphenethoxy)pyrimidin-2-ylthio)hexanoate (8b). Clear oil. ^1H NMR (250.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.82 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3 -Bu), 1.05 (t, 3H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_3$), 1.26–1.34 (m, 4H, CH_2 -Bu), 1.74–1.91 (m, 2H, CH_2 -Bu), 2.98 (t, 4H, J = 7.1 Hz, Ph- CH_2), 4.11 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH_2), 4.32–4.48 (m, 5H, S- CH_2 + Pyr-O- CH_2), 5.89 (s, 1H, Pyr-5H), 7.19–7.32 (m, 10H, Ph-H). ^{13}C NMR (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.63 (CH_3 -Bu), 13.83 ($-\text{CH}_3$), 21.60 (CH_2 -Bu), 28.79 (CH_2 -Bu), 30.72 (CH_2 -Bu), 34.43 (2C, Ph- CH_2), 47.13 (S- CH_2), 60.90 (OCH_2), 67.12 (2C, Pyr-O- CH_2), 86.01 (Pyr-C₅), 126.34 (2C, Ph-C₄), 128.12 (4C, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$), 128.61 (4C, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$), 137.80 (2C, Ph-C₁), 168.54 (Pyr-C₂), 170.07 (2C, Pyr-C₄ + $-\text{C}_6$), 171.35 (COO). MS (ESI⁺): m/e = 495.2 [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

Ethyl 2-(4,6-Bis(4-(trifluoromethyl)phenethoxy)pyrimidin-2-ylthio)hexanoate (16b). Clear oil. ^1H NMR (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.79–0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3 -Bu), 1.02–1.06 (t, 3H, J = 7.0 Hz, $-\text{CH}_3$), 1.29–1.40 (m, 4H, CH_2 -Bu), 1.84–1.92 (m, 2H, CH_2 -Bu), 3.07–3.11 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph- CH_2), 3.97–4.08 (m, 2H, OCH_2), 4.29–4.35 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.47–4.53 (m, 4H, Pyr-O- CH_2), 5.89 (s, 1H, Pyr-5H), 7.49–7.52 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$ H), 7.63–7.66 (d, 4H, J = 8.1 Hz, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$ H). ^{13}C NMR (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.60 (CH_3 -Bu), 14.07 ($-\text{CH}_3$), 21.60 (CH_2 -Bu), 28.79 (CH_2 -Bu), 30.64 (CH_2 -Bu), 34.15 (2C, Ph- CH_2), 47.16 (S-CH), 60.88 (OCH_2), 66.59 (2C, Pyr-O- CH_2), 86.06 (Pyr-C₅), 125.11 (4C, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$), 126.13–127.35 (2C, Ph-CF₃), 129.71 (4C, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$), 143.01 (2C, Ph-C₁), 168.59 (Pyr-C₂), 169.99 (2C, Pyr-C₄ + $-\text{C}_6$), 171.31 (COO). MS (ESI⁺): m/e = 631.6 [$\text{M} + 1$]⁺.

2-(4,6-Diphenethoxy)pyrimidin-2-ylthio)hexanoic Acid (8). White solid, mp 99 °C. ^1H NMR (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.81 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3 -Bu), 1.23–1.38 (m, 4H, CH_2 -Bu), 1.78–1.90 (m, 2H, CH_2 -Bu), 2.98 (t, 4H, J = 6.9 Hz, Ph- CH_2), 4.29 (t, 1H, J = 7.2 Hz, S-CH), 4.46 (t, 4H, J = 6.9 Hz, Pyr-O- CH_2), 5.87 (s, 1H, Pyr-5H), 7.18–7.32 (m, 10H, Ph-H). ^{13}C NMR (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.70 (CH_3 -Bu), 21.71 (CH_2 -Bu), 28.92 (CH_2 -Bu), 31.09 (CH_2 -Bu), 34.44 (2C, Ph- CH_2), 47.61 (S- CH_2), 67.08 (2C, Pyr-O- CH_2), 85.87 (Pyr-C₅), 126.31 (2C, Ph-C₄), 128.30 (4C, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$), 128.84 (4C, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$), 137.88 (2C, Ph-C₁), 169.01 (Pyr-C₂), 170.03 (2C, Pyr-C₄ + $-\text{C}_6$), 172.70 (COOH). MS (ESI⁺): m/e = 467.0 [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

2-(4,6-Bis(4-(trifluoromethyl)phenethoxy)pyrimidin-2-ylthio)hexanoic Acid (16). Yellow oil. ^1H NMR (300.13 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 0.78–0.83 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3 -Bu), 1.22–1.37 (m, 4H, CH_2 -Bu), 1.74–1.92 (m, 2H, CH_2 -Bu), 3.06–3.11 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Ph- CH_2), 4.27–4.30 (t, 1H, J = 7.1 Hz, S-CH), 4.48–4.53 (t, 4H, J = 6.6 Hz, Pyr-O- CH_2), 5.87 (s, 1H, Pyr-5H), 7.49–7.52 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$ H), 7.63–7.66 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$ H), 12.82 (s, br, 1H, COOH). ^{13}C NMR (75.44 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 13.64 (CH_3 -Bu), 21.67 (CH_2 -Bu), 28.92 (CH_2 -Bu), 30.91 (CH_2 -Bu), 34.16 (2C, Ph- CH_2), 47.46 (S-CH), 66.54 (2C, Pyr-O- CH_2), 85.97 (Pyr-C₅), 124.99 (4C, Ph-C₃ + $-\text{C}_5$), 125.14–127.74 (2C, Ph-CF₃), 129.69 (4C, Ph-C₂ + $-\text{C}_6$), 143.06 (2C, Ph-C₁), 168.95 (Pyr-C₂), 169.97 (2C, Pyr-C₄ + $-\text{C}_6$), 172.23 (COOH). MS (ESI⁻): m/e = 601.4 [$\text{M} - 1$]⁻.

PPAR Transactivation Assay. COS7 cells were grown in DMEM supplemented with FCS, sodium pyruvate, and penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO_2 . The day before transfection, cells were seeded in 96-well plates at a density of 30 000 cells

per well. Transient transfection was carried out by Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega), and the Gal4-fusion receptor plasmids (pFA-CMV-hPPAR-LBD) of the respective subtype. At 5 h after transfection, the medium was changed to DMEM without phenol red and FCS, containing 0.1% DMSO and the respective concentrations of the test compounds.

Following overnight incubation with the test compounds, cells were assayed for reporter gene activity using Dual-Glo luciferase assay system (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a GENios Pro luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). Each concentration of the compounds was tested in triplicate wells, and each experiment was repeated independently at least three times. Normalization for transfection efficacy and cell growth was done by division of the firefly luciferase data by renilla luciferase data resulting in relative light units. Activation factors were obtained by dividing by DMSO control. EC₅₀ and standard deviation values were calculated by mean values of at least three determinations by SigmaPlot 2001 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) using a four-parameter logistic regression. All compounds were evaluated by comparison of the achieved maximum effect to that of the reference compound (pioglitazone for PPAR γ , GW 7647 for PPAR α , and L165,041 for PPAR δ each with 1 μ M).

Determination of γ -Secretase Modulator Activity. To characterize the GSM activity of novel analogues, their effects on the generation of A β 40, A β 42, and A β 38 peptides were determined in a previously described cell-based ELISA assay with modifications.³⁷ CHO cells with stable overexpression of wild type human amyloid precursor protein and wild type human presenilin-1³⁷ were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and treated in 96-well plates for 24 h with increasing concentrations of the respective compounds or DMSO vehicle. Culture media were collected and analyzed by ELISA as follows: monoclonal antibody IC16 raised against amino acids 1–15 of the A β sequence was used as a capture antibody.⁴⁶ To distinguish different A β species, C-terminal antibodies specific for A β 40, A β 42, and A β 38 labeled with horseradish peroxidase (HRP) using the Pierce EZ-Link Plus activated peroxidase kit (Thermo Fisher Scientific) were used for detection. The 96-well high-binding microtiter plates were coated overnight at 4 °C with capture antibody IC16 diluted 1:250 in PBS, pH 7.2. Capture antibody was removed, and conditioned media samples (10 μ L for detection of A β 40, 100 μ L for A β 42, 50 μ L for A β 38) or standard peptides were loaded. HRP-coupled detection antibodies diluted in assay buffer (PBS containing 0.05% Tween-20, 1% BSA) were added to each well and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween-20 and once with PBS. Then 50 μ L of TMB ultrasubstrate (Thermo Fisher Scientific) was added and incubated for 1–10 min at room temperature in the dark, and the reaction was stopped by adding 50 μ L of 2 M H₂SO₄. Absorbance at 450 nm was recorded with a Paradigm microplate reader (Beckman-Coulter). Synthetic A β 40, A β 42, and A β 38 peptides (Bachem AG) were used to generate standard curves. These A β peptides were solubilized in DMSO at 1 mg/mL, aliquoted, and stored frozen at –80 °C. Immediately before use, peptides were diluted in assay buffer to 250–3000 pg/mL. Triplicate measurements from each drug concentration were averaged and normalized to DMSO control condition. For calculation of IC₅₀ values, cells were treated with eight increasing concentrations of each compound, and a nonlinear curve fit with variable slope model was applied to the results from two to four independent experiments. Statistics were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software).

NOTCH Reporter Assay. The NOTCH reporter assay was performed as described.³⁸ In brief, subconfluent CHO cells were transiently transfected in 96-well plates with plasmid pCDNA3-Notch- Δ E-GVP encoding truncated NOTCH fused to a Gal4

DNA-binding/VP16 transactivation domain and the MH100 reporter plasmid encoding firefly luciferase under the UAS promoter (50 ng each) using GeneJuice transfection reagent (Merck Chemicals Ltd.). Co-transfection of the MH100 reporter with empty pCDNA3 plasmid served as a negative control. Then 5 ng of plasmid pRL-TK encoding renilla luciferase was added to the plasmid mix to control for transfection efficiency. At 24 h after the transfection, cells were treated for an additional 24 h with increasing concentrations of the compounds **16** and **22**, 0.5 μ M γ -secretase inhibitor LY-411575, or DMSO vehicle. The cells were then lysed, and firefly and renilla luciferase activities were quantified using the Dual Glo luciferase assay system (Promega) and a PARADIGM microplate reader (Beckman-Coulter). Normalization for transfection efficacy and cell growth was achieved by dividing the firefly luciferase values by the renilla luciferase values. Percent activation of the reporter was then calculated by normalization of triplicate measurements from each condition to the DMSO control values. Unpaired *t* test analysis was performed from two independent experiments using GraphPad Prism: ***, *p* < 0.001.

Cytotoxicity Assay. CHO cells with stable overexpression of wild type human amyloid precursor protein and wild type human presenilin-1 were seeded at low density in 96-well plates (4000 cells/well) and cultured for 24 h. The cells were then treated in duplicate with increasing concentrations (0–100 μ M) of the respective compounds or DMSO vehicle for an additional 24 h. Cell viability was assessed using the Alamar blue reagent (Invitrogen). Then 20 μ L of Alamar blue was added to cells cultured in 200 μ L of medium and incubated overnight. Absorbance was measured with a Paradigm microplate reader (Beckman-Coulter) at 570 nm, using 600 nm as the reference wavelength. The values expressed as percent viability of vehicle control represent averages of two independent experiments.

Determination of COX Inhibition. Inhibition of the activities of isolated ovine COX-1 and human recombinant COX-2 was performed as described.³⁴ Briefly, purified COX-1 (ovine, 50 units) or COX-2 (human recombinant, 20 units) were diluted in 1 mL of reaction mixture containing 100 mM Tris buffer, pH 8, 5 mM glutathione, 5 μ M hemoglobin, and 100 μ M EDTA at 4 °C and preincubated with the test compounds for 5 min. Samples were prewarmed for 60 s at 37 °C, and arachidonic acid (5 μ M for COX-1, 2 μ M for COX-2) was added to start the reaction. After 5 min at 37 °C, the COX product 12-HHT was extracted and then analyzed by HPLC as described.^{41,47}

Acknowledgment. We thank Dr. Jan Näslund (Karolinska Institute, Sweden) for the NOTCH reporter plasmids, Dr. Manfred Brockhaus (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) for carboxyl-terminus-specific A β antibodies, Dr. Michael Lämmerhofer (Universität Wien, Austria) for enantioselective separation of compound **8**, and Dr. Boris Schmidt (TU Darmstadt, Germany) for scientific advice. This study was supported by the Competence Network Degenerative Dementias of the Federal Ministry of Education (Grant 01 GI 0718 to S.W.).

Supporting Information Available: Chemical synthesis, ¹H and ¹³C NMR data of intermediates and final compounds, mass spectrometry, combustion analysis, and cytotoxicity data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia* **2007**, *3*, 186–191.
- (2) Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.

- (3) Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. $A\beta$ oligomers—a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172–1184.
- (4) Citron, M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 677–685.
- (5) Golde, T. E. Disease modifying therapy for AD? *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 689–707.
- (6) Barten, D. M.; Meredith, J. E.; Zaczek, R.; Houston, J. G.; Albright, C. F. Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R&D* **2006**, *7*, 87–97.
- (7) De Strooper, B.; Annaert, W.; Cupers, P.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Schrijvers, V.; Wolfe, M. S.; Ray, W. J.; Goate, A.; Kopan, R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **1999**, *398*, 518–522.
- (8) Wong, G. T.; Manfra, D.; Poulet, F. M.; Zhang, Q.; Josien, H.; Bara, T.; Engstrom, L.; Pinzon-Ortiz, M.; Fine, J. S.; Lee, H. J.; Zhang, L.; Higgins, G. A.; Parker, E. M. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12876–12882.
- (9) Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bulter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, *414*, 212–216.
- (10) Leuchtenberger, S.; Behr, D.; Weggen, S. Selective modulation of Abeta42 production in Alzheimer's disease: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and beyond. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4337–4355.
- (11) Weggen, S.; Rogers, M.; Eriksen, J. NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 536–543.
- (12) Green, R. C.; Schneider, L. S.; Hendrix, S. B.; Zavitz, K. H.; Swabb, E. Safety and Efficacy of Tarenflurbil in Subjects with Mild Alzheimer's Disease: Results from an 18-Month Multi-Center Phase 3 Trial. Presented at the International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, IL, July 2008; Alzheimer's and Dementia; No. O3-04-01, T165.
- (13) in 't Veld, B. A.; Ruitenbergh, A.; Hofman, A.; Launer, L. J.; van Duijn, C. M.; Stijnen, T.; Breteler, M. M.; Stricker, B. H. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 1515–1521.
- (14) Vlad, S. C.; Miller, D. R.; Kowall, N. W.; Felson, D. T. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* **2008**, *70*, 1672–1677.
- (15) Peretto, J.; La Porta, E. Gamma-secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a medicinal chemistry perspective. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 38–46.
- (16) Page, R. M.; Baumann, K.; Tomioka, M.; Perez-Revuelta, B. I.; Fukumori, A.; Jacobsen, H.; Flohr, A.; Luebbbers, T.; Ozmen, L.; Steiner, H.; Haass, C. Generation of Abeta 38 and Abeta 42 is independently and differentially affected by FAD-associated presenilin 1 mutations and gamma-secretase modulation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 677–683.
- (17) Jaradat, M. S.; Wongsud, B.; Phornchirasilp, S.; Rangwala, S. M.; Shams, G.; Sutton, M.; Romstedt, K. J.; Noonan, D. J.; Feller, D. R. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1587–1595.
- (18) Lehmann, J. M.; Lenhard, J. M.; Oliver, B. B.; Ringold, G. M.; Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3406–3410.
- (19) Lehrke, M.; Lazar, M. A. The many faces of PPARgamma. *Cell* **2005**, *123*, 993–999.
- (20) Landreth, G.; Jiang, Q.; Mandrekar, S.; Heneka, M. PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 481–489.
- (21) Ho, L.; Qin, W.; Pompl, P. N.; Xiang, Z.; Wang, J.; Zhao, Z.; Peng, Y.; Cambareri, G.; Rocher, A.; Mobbs, C. V.; Hof, P. R.; Pasinetti, G. M. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2004**, *18*, 902–904.
- (22) Takeda, S.; Sato, N.; Uchio-Yamada, K.; Sawada, K.; Kunieda, T.; Takeuchi, D.; Kurinami, H.; Shinohara, M.; Rakugi, H.; Morishita, R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 7036–7041.
- (23) Biessels, G. J.; Staekenborg, S.; Brunner, E.; Brayne, C.; Scheltens, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* **2006**, *5*, 64–74.
- (24) Luchsinger, J. A. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *585*, 119–129.
- (25) Bernardo, A.; Minghetti, L. PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 93–109.
- (26) Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Karlo, J. C.; Cannady, S. B.; Landreth, G. E. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 558–567.
- (27) Heneka, M. T.; Sastre, M.; Dumitrescu-Ozimek, L.; Hanke, A.; Dewachter, I.; Kuiperi, C.; O'Banion, K.; Klockgether, T.; Van Leuven, F.; Landreth, G. E. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1–42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* **2005**, *128*, 1442–1453.
- (28) Camacho, I. E.; Serneels, L.; Spittaels, K.; Merchiers, P.; Dominguez, D.; De Strooper, B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10908–10917.
- (29) Sastre, M.; Dewachter, I.; Rossner, S.; Bogdanovic, N.; Rosen, E.; Borghgraef, P.; Evert, B. O.; Dumitrescu-Ozimek, L.; Thal, D. R.; Landreth, G.; Walter, J.; Klockgether, T.; van Leuven, F.; Heneka, M. T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress {beta}-secretase gene promoter activity by the activation of PPAR{gamma}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 443–448.
- (30) Nicolakakis, N.; Aboulkassim, T.; Ongali, B.; Lecrux, C.; Fernandes, P.; Rosa-Neto, P.; Tong, X. K.; Hamel, E. Complete rescue of cerebrovascular function in aged Alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 9287–9296.
- (31) Rabiner, E. A.; Tzimopoulou, S.; Cunningham, V. J.; Jeter, B.; Zvartau-Hind, M.; Castiglia, M.; Mistry, P.; Bird, N. P.; Matthews, J.; Whitcher, B.; Nichols, T. E.; Lai, R.; Lotay, N.; Saunders, A.; Reiman, E.; Chen, K.; Gold, M.; Matthews, P. M. Effects of 12 months of treatment with the PPARgamma agonist rosiglitazone on brain glucose metabolism in Alzheimer's disease: a 18F-FDG PET study. *Alzheimer's Dementia* **2009**, *5*, 207.
- (32) Sato, T.; Hanyu, H.; Hirao, K.; Kanetaka, H.; Sakurai, H.; Iwamoto, T. Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* [Online early access]. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.009. Published Online: Nov 17, 2009.
- (33) Maeshiba, Y.; Kiyota, Y.; Yamashita, K.; Yoshimura, Y.; Motohashi, M.; Tanayama, S. Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs, and monkeys. *Arzneim. Forsch.* **1997**, *47*, 29–35.
- (34) Koeberle, A.; Zettl, H.; Greiner, C.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O. Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8068–8076.
- (35) Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, *1*, 1–28.
- (36) Zettl, H.; Steri, R.; Lammerhofer, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Discovery of a novel class of 2-mercaptohexanoic acid derivatives as highly active PPARalpha agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4421–4426.
- (37) Czirr, E.; Leuchtenberger, S.; Dorner-Ciossek, C.; Schneider, A.; Jucker, M.; Koo, E. H.; Pietrzik, C. U.; Baumann, K.; Weggen, S. Insensitivity to Abeta 42-lowering non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24504–24513.
- (38) Karlstrom, H.; Bergman, A.; Lendahl, U.; Naslund, J.; Lundkvist, J. A sensitive and quantitative assay for measuring cleavage of presenilin substrates. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6763–6766.
- (39) Farce, A.; Renault, N.; Chavatte, P. Structural insight into PPAR-gamma ligands binding. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1768–1789.
- (40) Kukar, T.; Murphy, M. P.; Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Weggen, S.; Smith, T. E.; Ladd, T.; Khan, M. A.; Kache, R.; Beard, J.; Dodson, M.; Merit, S.; Ozols, V. V.; Anastasiadis, P. Z.; Das, P.; Fauq, A.; Koo, E. H.; Golde, T. E. Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 545–550.
- (41) Popescu, L.; Rau, O.; Bottcher, J.; Syha, Y.; Schubert-Zsilavecz, M. Quinoline-based derivatives of pirinixic acid as dual PPAR alpha/gamma agonists. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2007**, *340*, 367–371.
- (42) Rau, O.; Syha, Y.; Zettl, H.; Kock, M.; Bock, A.; Schubert-Zsilavecz, M. Alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as

- potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 191–195.
- (43) Zettl, H.; Dittrich, M.; Steri, R.; Proschak, O.; Rau, O.; Steinhilber, D.; Schneider, G.; Lammerhofer, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Novel pirinixic acids as PPARalpha preferential dual PPARalpha/gamma agonists. *QSAR Comb. Sci.* **2009**, *28*, 576–586.
- (44) Lammerhofer, M.; Pell, R.; Mahut, M.; Richter, M.; Schiesel, S.; Zettl, H.; Dittrich, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Lindner, W. Enantiomer separation and indirect chromatographic absolute configuration prediction of chiral pirinixic acid derivatives: limitations of polysaccharide-type chiral stationary phases in comparison to chiral anion-exchangers. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1033–1040.
- (45) Meinert, C. L.; McCaffrey, L. D.; Breitner, J. C. Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial: design, methods, and baseline results. *Alzheimer's Dementia* **2009**, *5*, 93–104.
- (46) Jager, S.; Leuchtenberger, S.; Martin, A.; Czirr, E.; Wesselowski, J.; Dieckmann, M.; Waldron, E.; Korth, C.; Koo, E. H.; Heneka, M.; Weggen, S.; Pietrzik, C. U. Alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 1369–1382.
- (47) Kato, M.; Nishida, S.; Kitasato, H.; Sakata, N.; Kawai, S. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1679–1685.
- (48) Demello, K. L.; Ricketts, A. P. Cox-2 Selective Carprofen for Treating Pain and Inflammation in Dogs. US2003212123 (A1), 2003.
- (49) Pairet, M., van Ryn, J., Eds. *COX-2 Inhibitors*, 1st ed.; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 2004.