

Synthese und Evaluation neuer Inhibitoren und Modulatoren von Proteasen und Kinasen in Modellen der Alzheimer-Demenz und akuter myeloischer Leukämie

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Eva Christine Naumann
aus Mainz

Referent: Prof. Dr. Boris Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. Katja Schmitz

Tag der Einreichung: 27. Januar 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2014

Darmstadt 2014

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt von Juli 2010 bis September 2013 angefertigt.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei:

- Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Promotion in den letzten drei Jahren.
 - allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die netten Mittagspausen in der Kuhle: Binia, Chris, Conny, Stefan, Parul, Theresa, Johannes, Dennis und unserer lieben Sekretärin Frau Keenan.
 - den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Andrea, Alex, Daniel, Thomas, Jiamin, Upendra, Valeria und Azadeh.
 - insbesondere meinen Kollegen, mit denen ich bei der Betreuung diverser Praktika viel Spaß hatte: Andrea, Binia, Stefan, Chris, Alex und Daniel, und auch ein herzliches Dankeschön an alle beteiligten Kollegen der anderen Arbeitskreise und alle Hiwis: vor allem Johanna und Katrin.
 - Andrea, Alex, Binia, Conny, Chris und Daniel für diverse lustige Abende, bei denen viel gelacht wurde.
 - allen, die an der Korrektur von Teilen dieser Arbeit beteiligt waren: Andrea, Chris, Conny, Stefan. Und ein besonderes Dankeschön an Sabrina, die als Nicht-Chemikerin meine Einleitung Korrektur gelesen hat.
 - allen Studenten, die ich betreuen und bei ihrer Ausbildung unterstützen durfte.
 - Dr. Karlheinz Baumann und Robert Schubanel von der Firma Hoffmann-La Roche für die gute Zusammenarbeit.
 - Prof. Dr. Sascha Weggen und Isabella Ogorek von der Heinrich Heine-Universität in Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit.
 - Prof. Dr. Claus Pietrzik und Jessica Bien von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Assay-Messungen meiner Meprin-Inhibitoren.
 - den Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung jeglicher Art, vor allem Frau Rudolph aus der MS-Abteilung und Herrn Schädler von der HV.
 - meiner ehemaligen Chefin Frau Klisserath und Team.
 - meinen Freunden, die mich schon viele Jahre motivieren: vor allem Michelle, Betti und Christian.
 - meiner ganzen Familie.
 - Thomas für seine permanente Unterstützung und seine unvergleichliche Art.
-

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Höttecke, Eva C. Naumann, Binia Thomaszewski, Katrin Schneider, Dirk T. Steinbacher, Robert Schubanel, Stefan Mazur, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt, „*NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold*“, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4903-4909.

Eva C. Naumann, Stefan Göring, Isabella Ogorek, Sascha Weggen, Boris Schmidt, „*Membrane anchoring γ -secretase modulators with terpene-derived moieties*“, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3852-3856.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Verzeichnis der Aminosäuren	viii
1 Einleitung	1
1.1 Die Alzheimer-Krankheit	1
1.1.1 Risikofaktoren der Alzheimer-Demenz	2
1.1.2 Medikamente und Therapieansätze zur Behandlung der AD	4
1.1.3 Der APP-Metabolismus und die Amyloid-Hypothese	5
1.1.4 Die γ -Sekretase – eine Aspartylprotease	7
1.1.5 γ -Sekretase-Inhibitoren und –Modulatoren	9
1.2 Akute myeloische Leukämie	16
1.2.1 Therapieansätze der akuten myeloischen Leukämie	17
1.2.2 FLT3 – die FMS- <i>like</i> Tyrosin Kinase	18
1.2.3 FLT3 als Target für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie	20
1.3 Die Metalloproteasen Meprin α und Meprin β	24
1.3.1 Meprin α und β und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen	25
1.3.2 Inhibitoren von Meprin α und β	27
2 Zielsetzungen	29
3 Ergebnisse und Diskussion	30
3.1 Carbazolderivate als γ-Sekretase-Modulatoren	31
3.1.1 Synthese von Carbazol (52) – das Einführen der Aldehydfunktionalität	33
3.1.2 Synthese von Carbazol (53)	35
3.1.3 Synthese von Carbazol (54)	37
3.1.4 Synthese von Carbazol (55)	39
3.1.5 Zusammenfassung der Carbazolderivate	41
3.1.6 Biologische Aktivität der Carbazolderivate	42
3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick	44

3.2 Tocopherol-derivatisierte und –abgeleitete γ-Sekretase-Modulatoren	46
3.2.1 Synthese der Tocopherolderivate (76a-b) als γ -Sekretase Modulatoren	47
3.2.2 Synthese der Chromanverbindungen (78a-e) und (79a-e)	49
3.2.3 Zusammenfassung der Tocopherolderivate und Chromanderivate	52
3.2.4 Experimente zur dynamischen Lichtstreuung	56
3.2.5 Biologische Aktivität der Tocopherolderivate und Chromanderivate	58
3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick	61
3.3 Cumarinderivate als γ-Sekretase-Modulatoren	62
3.3.1 Synthese der Cumarinderivate (87a-d)	62
3.3.2 Zusammenfassung der Cumarinderivate	64
3.3.3 Biologische Aktivität der Cumarinderivate	65
3.3.4 Zusammenfassung und Ausblick	66
3.4 Indolinonderivate als FLT3-Inhibitoren	67
3.4.1 Synthese der Indolinonderivate (92) und (93a-b) als FLT3-Inhibitoren	71
3.4.2 Zusammenfassung der Indolinonderivate	75
3.4.3 Biologische Aktivität der Indolinonderivate	75
3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick	76
3.5 Ein Harnstoffderivat als FLT3-Inhibitor	77
3.5.1 Synthese des Harnstoffs (110)	78
3.5.2 Biologische Aktivität des Harnstoffs (110)	81
3.5.3 Zusammenfassung und Ausblick	81
3.6 Computergestütztes Wirkstoffdesign am Beispiel von Meprin β-Inhibitoren	85
3.6.1 Beschreibung des durchgeführten Dockings	86
3.6.2 Synthese der potentiellen Meprin β -Inhibitoren	98
3.6.3 Biologische Aktivität der Verbindungen (126) und (133)	101
3.6.4 Zusammenfassung und Ausblick	103
4 Zusammenfassung und Ausblick	105

5 Experimenteller Teil	106
5.1 Allgemeine Anmerkungen	106
5.2 Beschreibung der Synthesen	107
5.2.1 Synthese der Carbazolderivate	107
5.2.2 Synthese der Tocopherolderivate	117
5.2.3 Synthese der Chromanderivate	120
5.2.4 Synthese der Cumarinderivate	131
5.2.5 Synthese der Indolinonderivate	136
5.2.6 Synthese des Harnstoffs	142
5.2.7 Synthese der potentiellen Meprin-Inhibitoren	145
5.3 Beschreibung der Assays	148
6 Literaturverzeichnis	151

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β -Peptid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AChE	Acetylcholinesterase
AcOH	Essigsäure
AD	Alzheimer-Demenz
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ALM	akute myeloische Leukämie
Äq.	Äquivalente
Aph-1	<i>anterior pharynx defective-1</i>
ApoE	Apolipoprotein
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cal	Kalorie
CDK5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
CH	Cyclohexan
COX	Cyclooxygenase
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
d	Dublett
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium, standardisiertes Nährmedium
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EOFAD	<i>early onset familial Alzheimer's disease</i>
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
FBS	<i>fetal bovine albumin</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3, receptor-type tyrosine-protein kinase 3</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
ges.	gesättigt
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GSM	γ -Sekretase Modulator
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
Hz	Hertz
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors, welche die halbe Aktivität des Enzyms bewirkt
ITD	<i>internal tandem duplication</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante

L	Liter
LCL	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LOAD	<i>late onset Alzheimer's disease</i>
LPECL	<i>liquid phase electrochemoluminescence</i>
m	Multipllett
M	Molar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min.	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
NaOEt	Natriumethanolat
Nct	Nicastrin
NFT	<i>neurofibrillary tangel</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NMDA	<i>N-Methyl D-Aspartat</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NSAID	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
p	Pentett
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
Pen-2	<i>presenilin enhancer-2</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3 kinase</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Präsenilin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
R _t	Retentionszeit

RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumlaurylsulfat
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAILS	<i>terminal amine isotopic labeling of substrates</i>
TBST	Mischung aus <i>tris-buffered saline</i> und <i>Tween 20</i> , Pufferlösung
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TKD	<i>tyrosine kinase domain</i>
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TMS	Tetramethylsilan
tr.	trocken
TRAF	<i>tumor necrosis factor, receptor associated factor</i>
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
δ	chemische Verschiebung

Verzeichnis der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Seit 1906 steht die Alzheimer-Krankheit im Interesse der medizinischen Forschung. In diesem Jahr führte der ehemalige deutsche Pathologe ALOIS ALZHEIMER eine Autopsie an dem Gehirn seiner Patientin AUGUSTE DETER durch, die im Alter von nur 56 Jahren verstorben war. Mit „seltsamen Symptomen des Altersschwachsinnns“ wurde die Patientin 1901 in die damalige „Anstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main eingewiesen. *Post mortem* fand ALOIS ALZHEIMER Proteinablagerungen in ihrem Gehirn, die er mit der Pathogenese seiner Patientin in Verbindung brachte. Die Alzheimer-Krankheit wurde zum ersten Mal in der Literatur beschrieben.^[1]

Bei der Alzheimer-Krankheit, mit weltweit ca. 36 Millionen Betroffenen, handelt es sich um eine irreversibel verlaufende Demenz-Erkrankung (Abb. 01).^[2] Die stets tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung des Gehirns führt beim Patienten zum vollständigen Verlust der kognitiven Leistungsfähigkeit und äußert sich in Symptomen wie Vergesslichkeit, Verwirrung sowie Sprach- und Orientierungsstörungen. Auch neuropsychologische Symptome wie depressive Verstimmung und Stimmungsschwankungen bis hin zu starken Persönlichkeitsänderungen können mit der Alzheimer-Erkrankung einhergehen.^[3-5] Mit dem Fortschreiten der Krankheit kommt es infolge des Absterbens von Neuronen und der Rückbildung von Myelin zu einer Gehirnatrophie, die durch bildgebende Verfahren sichtbar gemacht werden kann (Abb. 01).^[6, 7]

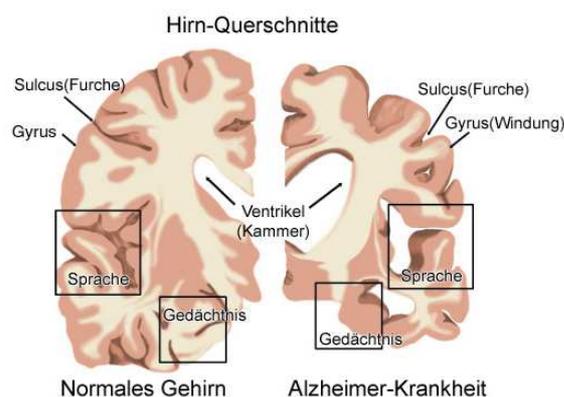


Abb. 01: Vergleich der Gehirnquerschnitte eines gesunden Menschen (links) und eines Alzheimer-Patienten (rechts), mit freundlicher Genehmigung von www.alzheimer-forschung.de.

Charakteristisch für die Alzheimer-Demenz (AD) sind zwei unterschiedliche Proteinablagerungen im Gehirn der Patienten. Dabei handelt es sich um die intrazellulären neurofibrillären Bündel (Tangles) und die extrazellulären amyloiden Plaques (A β -Plaques),

die erst *post mortem* anhand einer Autopsie im Gehirn der Patienten festgestellt werden können und die Basis der Diagnose bilden (Abb. 02).^[8-10]

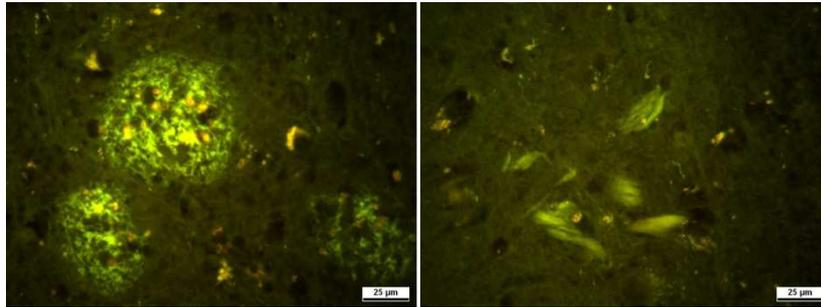


Abb. 02: Gehirnschnitt mit angefärbten A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln (Farbstoff: Thioflavin S, Gewebe: Hippocampus, Patient: männlich, Alter: 86 J, AD, Klinikum Darmstadt), Gehirnschnitt: Dr. Roland Heyny-von Hausen, Foto: Dr. Daniel Kieser.

Bei den neurofibrillären Bündeln handelt es sich um aggregierte Filamente des abnorm phosphorylierten Proteins Tau, die sich nach der Tau-Hypothese infolge eines Ungleichgewichts verschiedener aktiver Kinasen und Phosphatasen bilden. Das Protein Tau ist Bestandteil der Mikrotubuli der Zelle und spielt beim axonalen Transport eine wesentliche Rolle. Für die Phosphorylierung sind verschiedene Enzyme wie die Kinasen GSK3 β , CDK5 oder auch ERK2 verantwortlich.^[11] Durch die aggregierten Filamente wird die Struktur der Mikrotubuli zerstört und schließlich das Absterben von Neuronen ausgelöst.^[12, 13] Die amyloiden Plaques bestehen aus aggregierten A β -Proteinen, die bei der proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins APP (*amyloid precursor protein*) durch die beteiligten Aspartylproteasen β - und γ -Sekretase generiert werden.^[8-10] Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte der Zusammenhang der A β -Ablagerungen im Gehirn mit der Pathogenese der Alzheimer-Demenz nicht eindeutig rekonstruiert werden. Als allgemein anerkannt gilt die Amyloid-Hypothese, die als Hauptursache der Alzheimer-Demenz die Aggregation und Ablagerung von A β im Zentralnervensystem beschreibt.^[14]

1.1.1 Risikofaktoren der Alzheimer-Demenz

Die Ursache der Alzheimer-Krankheit ist bislang nicht eindeutig aufgeklärt und steht im starken Interesse aktueller Forschung. Epidemiologischen Studien zufolge ist das Alter der größte bislang bekannte Risikofaktor an der Alzheimer-Demenz zu erkranken. Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit massiv an der Alzheimer-Demenz zu erkranken. Zur Risikogruppe gehören Personen ab dem 65. Lebensjahr. Bei den über 90-Jährigen ist bereits ca. jeder dritte von der Alzheimer-Demenz betroffen. Infolge des Fortschritts der modernen Medizin und der stetig steigenden Lebenserwartung ist davon

auszugehen, dass die Zahl an Alzheimer-Patienten im Laufe der Jahre immer weiter wachsen wird.^[2]

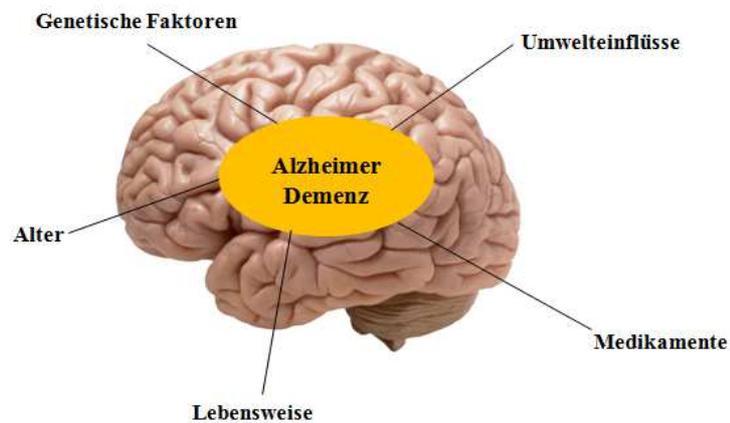


Abb. 03: Beispiele diskutierter Einflussfaktoren der Alzheimer-Demenz.

Von der altersbedingten Form der AD (LOAD, *late onset Alzheimer's disease*) ist die seltener auftretende Form der EOFAD (*early onset familial Alzheimer's disease*) zu differenzieren. Die EOFAD tritt vorwiegend vor dem 65. Lebensjahr und bei weniger als 5% der Patienten auf. Ursache dieser seltenen Form der Alzheimer-Demenz sind genetische Dispositionen.^[15, 16] Bislang stehen über 160 Mutationen auf drei Genen im Verdacht, direkt mit der Entwicklung von AD in Zusammenhang zu stehen, beispielsweise die Mutationen der Gene von Präsenilin-1 und 2 auf Chromosom 14 bzw. 1, sowie von APP auf Chromosom 21.^[17-19] Des Weiteren ist das $\epsilon 4$ -Allel des ApoE-Gens mit einem stark erhöhten AD-Risiko assoziiert.^[20] Neben dem Alter und genetischen Merkmalen finden sich in der Literatur zahlreiche Theorien und Studien, die eine Beziehung zwischen der Pathogenese der Alzheimer-Demenz und Umwelteinflüssen, der Lebensweise und auch z.B. der Einnahme verschiedener Medikamente herstellen (Abb. 03). Studien zufolge bewirkt die längerfristige Einnahme von NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) bei Patienten ein gesenktes Risiko an AD zu erkranken.^[21] Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Entzündungshemmer lediglich präventiv, jedoch nicht therapeutisch wirksam waren.^[22] Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Rauchen das Krankheitsrisiko der AD erhöht, währenddessen sich mäßiger Alkoholkonsum risikosenkend auswirken soll.^[23, 24] Auch der Einfluss verschiedener Antioxidantien wie Vitamin C und E, verschiedener Polyphenole aus den Inhaltsstoffen von grünem Tee, Rotwein oder auch Currypulver wurden bereits auf ihr präventives und therapeutisches Potential untersucht. Studien zufolge wird der Verlauf der Alzheimer-Demenz durch die Einnahme von Antioxidantien positiv verändert^[25] und in

AD-Modellen mit transgenen Mäusen konnte für verschiedene Polyphenole eine A β -Peptid-senkende Wirkung beobachtet werden.^[26] Die genauen Wirkmechanismen sind bislang nicht aufgeklärt. Die zahlreichen in der Literatur beschriebenen Studien vergegenwärtigen nur allzu deutlich, dass trotz des enormen weltweiten Forschungsaufwandes viele pathogenetische Aspekte der AD weiterhin im Dunkeln liegen.

1.1.2 Medikamente und Therapieansätze zur Behandlung der AD

Die medikamentöse Behandlung der Alzheimer-Demenz kann bisher nur auf die Symptomatik der Krankheit abzielen. Acetylcholinesterasehemmer (AChE-Hemmer) wie die Wirkstoffe Donepezil (**1**), Galantamin (**2**) und Rivastigmin (**3**) sind für die Behandlung von leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Demenz zugelassen (Abb. 04). Durch das Absterben von Neuronen im Falle einer Alzheimer-Erkrankung wird das für die Signalübermittlung notwendige Acetylcholin nicht mehr ausreichend im Gehirn hergestellt. Mit der Behandlung von AChE-Hemmern können die kognitiven Funktionen bei Alzheimer-Patienten für ca. 12-24 Monate verbessert werden, jedoch kann es auch zu starken Nebenwirkungen z.B. im Bereich des Gastrointestinaltrakts (Übelkeit, Diarrhöe) kommen.^[27]

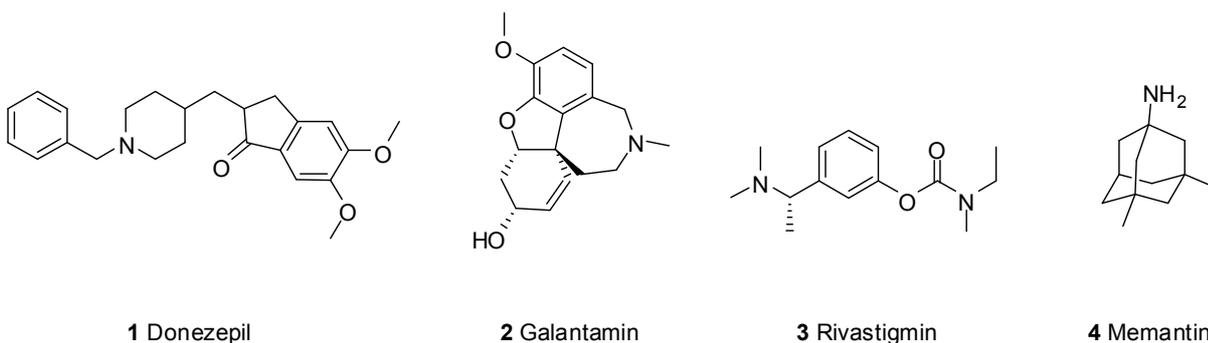


Abb. 04: Zugelassene Medikamente **1-4** zur symptomatischen Behandlung der Alzheimer-Demenz.

Memantin (**4**), ein nichtkompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, wird zur Behandlung von mittlerer bis schwerer Alzheimer-Demenz eingesetzt (Abb. 04). Klinische Studien zeigten eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und eine Verbesserung der neuropsychologischen Symptome bei Patienten, denen Memantin (**4**) verabreicht wurde.^[28]

Die Gruppe um D. SCHENK von ELAN-Pharmaceuticals konnte mit Immuntherapie-Studien an transgenen Mäusen große Erfolge erzielen. PDAPP-transgene Mäuse, die eine Mutante des menschlichen APP überexprimieren, wurden mit synthetischem A β ₄₂-Peptid (AN1792) immunisiert. Bei jungen Mäusen, die noch keine neuropathologischen AD-Merkmale (A β -Plaques) aufwiesen, konnte durch die Impfung eine protektive Wirkung auf die

Ausbildung von A β -Plaques nachgewiesen werden. Bei den älteren Mäusen, die bereits Proteinablagerungen im Gehirn ausgebildet hatten, führte die Immunisierung zu einer starken Reduktion der A β -Plaques,^[29] einhergehend mit einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit.^[30, 31] In klinischen Studien wurde der Impfstoff am Menschen als Therapeutikum untersucht. Dieser zunächst vielversprechende therapeutische Ansatz musste jedoch in Phase II der klinischen Studien aufgrund massiver Nebenwirkungen eingestellt werden.^[32, 33] Um zukünftig geeignete Therapeutika für die Alzheimer-Demenz entwickeln zu können, ist es für die weitere Forschung essentiell, die Auslösemechanismen der Alzheimer-Demenz detailliert aufzuklären und auf Grundlage eines Kausalzusammenhangs geeignete Targets zur Behandlung der AD zu finden.

1.1.3 Der APP-Metabolismus und die Amyloid-Hypothese

Eine veränderte Proteolyse von APP, einem Typ-1-Transmembranglycoprotein, wird mit dem Auftreten der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht. Es gibt verschiedenen Spleiß-Varianten des APP, die alle zu A β -Peptiden abgebaut werden können. APP, dessen Gen auf Chromosom 21 lokalisiert ist, wird ubiquitär im Körper exprimiert.^[34] Es besteht aus einer extrazellulären *N*-terminalen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kleinen cytoplasmatischen Domäne, wobei die extrazelluläre Domäne den größten Teil ausmacht. Innerhalb der extrazellulären Domäne enthält das Protein eine cysteinreiche Subdomäne in der Nähe des *N*-Terminus.^[34, 35] Es gibt Hinweise darauf, dass APP bei der Zelladhäsion eine Rolle spielt und als membranverankertes Rezeptormolekül fungiert.^[36, 37] APP wird von drei verschiedenen Proteasen umgesetzt: der α -, β - und γ -Sekretase.

Auf dem nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch die α -Sekretase zu den Fragmenten sAPP α und C83 prozessiert. Das C-terminale C83-Fragment wird von der γ -Sekretase zu dem kurzen P3-Peptid umgesetzt, das vom Körper schnell abgebaut werden kann (Abb. 05).^[38, 39]

Der amyloidogene Weg beschreibt die Umsetzung von APP durch die β -Sekretase zu den Fragmenten sAPP β und C99. Die proteolytische Spaltung von C99 durch die γ -Sekretase führt zu A β -Peptiden A β ₄₀ und A β ₄₂ (Abb. 05).^[40]

Die Spaltung durch die α - und β -Sekretase findet an der extrazellulären Transmembrandomäne statt. Die C-terminalen Fragmente C99 und C83 bleiben mit der Transmembrandomäne in der Membran verankert (Abb. 05).

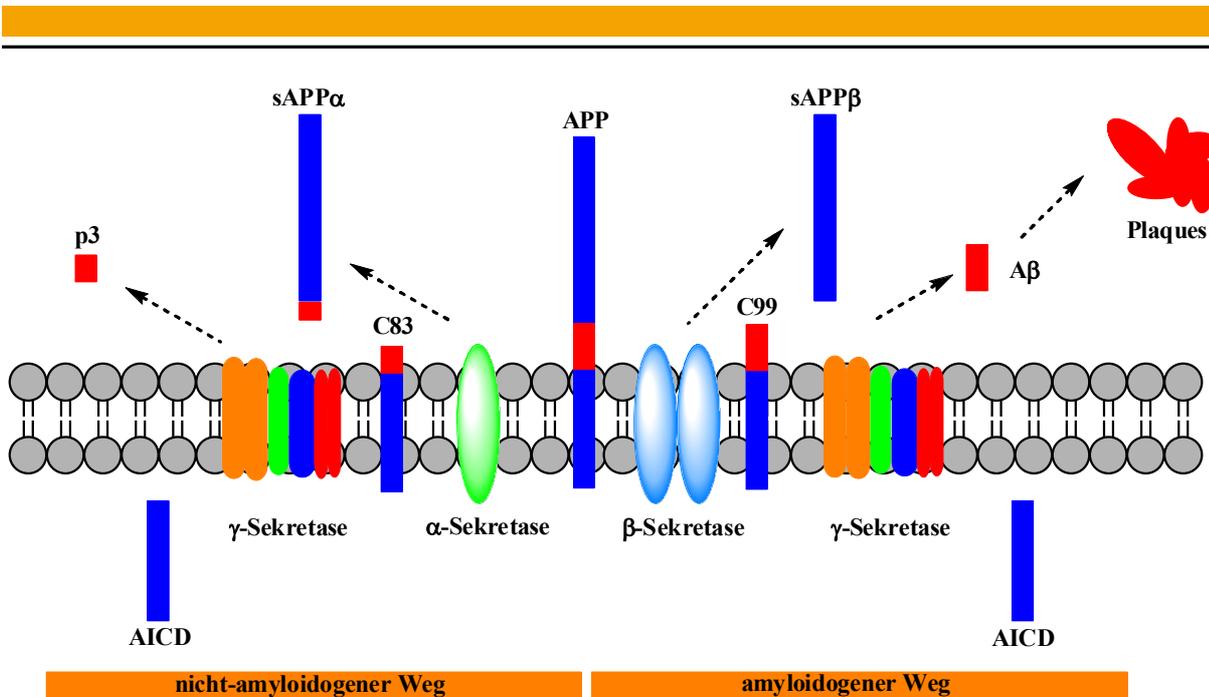


Abb. 05: Schematische Darstellung des APP-Metabolismus.

Da die γ -Sekretase C99 an verschiedenen Positionen spaltet, handelt es sich bei dem A β -Peptid um eine Gruppe von Peptiden, die sich in der Länge ihres C-Terminus unterscheiden. Das Hauptprodukt ist das lösliche A β_{40} -Peptid (80-90%), während das zur Aggregation neigende A β_{42} -Peptid zu etwa 5-10% generiert wird. Die restlichen Peptide sind kürzer und bestehen aus bis zu 38 Aminosäuren.^[41]

Die Aggregation der A β -Peptide hängt mit einer Strukturänderung der Peptide zusammen. Die α -helikale Konformation der A β -Peptide geht in eine β -Faltblattstruktur über.^[34] Zur Aggregation zu den unlöslichen A β -Plaques neigen vor allem die A β_{42} -Peptide, ab einer bestimmten Konzentration an amyloiden Plaques lagern sich auch die A β_{40} -Peptide an. Die A β -Plaques bestehen aus Bündeln von β -Faltblatt-Einheiten, die als Protofilamente zu den A β -Plaques aggregieren. Triebkraft für die Bildung der A β -Plaques sind hydrophobe Wechselwirkungen sowie π - π -Stapel-Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren.^[42] *In vitro* Experimente zeigen, dass die Aggregation zu Fibrillen sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig (bezogen auf A β -Peptide) ist.^[43] Die Halbwertszeit von A β -Peptiden bei gesunden Menschen beträgt nur wenige Stunden,^[44, 45] da diese proteolytisch abgebaut sowie carriervermittelt über die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie transportiert werden.^[46, 47] Hierdurch wird eine Aggregation von A β -Plaques effektiv verhindert.

Die Amyloid-Hypothese sieht als Ursache einer Alzheimer-Erkrankung die Ablagerung von A β -Plaques im Gehirn. Der genaue toxische Wirkmechanismus konnte noch nicht

experimentell aufgeklärt werden. Vertreter der Amyloid-Hypothese gehen davon aus, dass die Ablagerung der A β -Plaques eine pathogene Kaskade bestehend aus Entzündungsreaktionen, oxidativem Stress und ionischer Homöostase auslöst, die das Absterben von Neuronen verursacht.^[48, 49] Studien belegen außerdem, dass schon die frühen Oligomere der A β -Peptide neurotoxisch wirken.^[50, 51] CLEARY *et al.* konnte in einer *in vivo* Studie zeigen, dass das Verabreichen von humanen A β -Dimeren und A β -Trimeren direkt in das zentrale Nervensystem (intracerebroventrikulär) bei Ratten die kognitive Funktion signifikant stört.^[52]

Anhand des APP-Metabolismus und der darauf aufbauenden Amyloid-Hypothese lassen sich verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit ableiten. Um die pathogene Spezies der A β -Peptide aus dem APP-Metabolismus zu vermeiden, muss die β - bzw. γ -Sekretase inhibiert oder aber die α -Sekretase aktiviert werden. A β -Aggregationshemmer stellen eine weitere Wirkstoffklasse für die Behandlung der Alzheimer-Demenz dar.

1.1.4 Die γ -Sekretase – eine Aspartylprotease

Die γ -Sekretase gehört zu der Klasse der Aspartylproteasen, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Im aktiven Zentrum von Aspartylproteasen befinden sich zwei hoch konservierte Aspartate, mit denen verschiedene Substrate gebunden werden können. Die Hydrolyse der Substrate erfolgt im aktiven Zentrum über einen Säure-Base-Mechanismus (Abb. 06). Durch eine deprotonierte Asparaginsäure aktiviert, greift ein Wassermolekül nukleophil die zu spaltende Peptidbindung an (Abb. 06, (a)), während die zweite protonierte Asparaginsäure den Stickstoff des Amids protoniert (Abb. 06, (b)). Diesem daraus hervorgehenden zwitterionischen Übergangszustand folgt die Hydrolyse der Peptidbindung (Abb. 06, (c)).

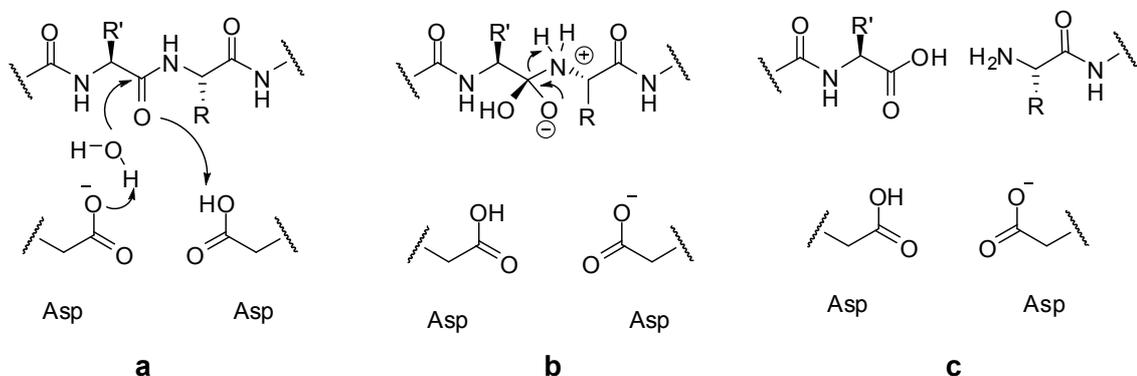


Abb. 06: Säure-Base-Mechanismus der Hydrolyse von Aspartylproteasen.

Die γ -Sekretase ist ein in der Membran verankerter Komplex, bestehend aus vier unterschiedlichen integralen Membranproteinen: Präsenilin 1 und 2 (PSEN1, PSEN2), Nicastrin (NCSTN), *anterior pharynx defective* (aph-1) und *presenilin enhancer 2* (pen-2). Die Stöchiometrie der vier Untereinheiten verhält sich elektronenmikroskopischen Studien und Western Blot-Analysen zufolge 1:1:1:1.^[53, 54] Bislang ist es nicht gelungen, den γ -Sekretase-Komplex zu kristallisieren, um die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. PSEN1 und PSEN2 bestehen aus neun Transmembrandomänen und bilden die katalytische Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes. Die Klassifizierung als Aspartylprotease gelang durch die Mutation zweier Asparaginsäure-Seitenketten, aus der eine vollständige Inaktivierung von PSEN1 resultierte.^[55] Die Identifizierung von PSEN1 als aktive Untereinheit der γ -Sekretase wurde weiterhin durch Photoaffinitätsmarkierungen bestätigt.^[56, 57] Der Gruppe um Li gelang es kürzlich, ein prokaryotisches PSEN1-Homolog zu kristallisieren und dessen Struktur aufzuklären. Das PSEN1-Homologe besteht aus neun Transmembrandomänen, ist 50 Å lang sowie 40 Å breit und hoch. Die zwei katalytischen Asparaginsäure-Seitenketten befinden sich in den Transmembrandomänen 6 und 7 und sind 6.7 Å voneinander entfernt. Durch die gesamte Transmembrandomäne des Proteins zieht sich eine Pore, die den Zugang von Wasser in das aktive Zentrum ermöglicht. Das PSEN1-homologe Protein assoziiert zu Tetrameren.^[58] Nicastrin ist ein 130 kDa Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären glycosylierten Domäne und spielt bei der Erkennung des Substrats eine wesentliche Rolle.^[59] Experimentell konnte belegt werden, dass die Funktion der γ -Sekretase bei reduzierter Expression von Nicastrin gestört wird und Nicastrin für die Stabilisierung des γ -Sekretase-Komplexes essentiell ist.^[60] Aph-1 besteht aus sieben Transmembrandomänen und bildet mit Nicastrin einen Subkomplex im endoplasmatischen Retikulum, während Pen-2 zwei Transmembrandomänen aufweist. Die genauen Funktionen von Aph-1 und Pen-2 sind noch nicht genau bekannt.

Neben APP prozessiert die γ -Sekretase noch weitere Substrate. Zu den bekannten Substraten gehören unter anderem die Proteine Notch 1-4, die Notch-Liganden Jagged und Delta, der Neurotrophinrezeptor p75, die Rezeptortyrosinkinase ErbB4, der Rezeptor CD44, die intrazellulären Adhäsionsmoleküle Nectin 1a sowie E- und N-Cadherine und der Rezeptor LDL.^[16] Ein besonderes Augenmerk gilt dem Notch-Rezeptor, der unter anderem bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt. Nach der Proteolyse der extrazellulären Domäne von Notch wird der cytoplasmatische Teil durch das Binden von Ligandenproteinen (Delta, Jagged) zur weiteren Proteolyse aktiviert, bei welcher das Fragment NICD

(*Notch intracellular domain*) freigesetzt wird. Dieses Fragment wird in den Zellkern transportiert und reguliert als Komplex mit anderen Proteinen die Genexpression.^[61]

1.1.5 γ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren

Aufgrund ihrer in Abschnitt 1.1.4 beschriebenen Fähigkeit zur APP-Prozessierung ist die γ -Sekretase ein wichtiges Target bei der Entwicklung von Therapieansätzen von AD. Um die Prozessierung von A β ₄₂-Peptiden durch die γ -Sekretase im APP-Metabolismus einzudämmen, ist die Inhibierung bzw. Modulation der Enzymfunktion notwendig (Abb. 05).

Eine Vielzahl an γ -Sekretase-Inhibitoren ist in der Vergangenheit entwickelt und zum Teil auch in klinischen Studien untersucht worden.^[62, 63] Zu den ersten beschriebenen γ -Sekretase-Inhibitoren gehörten die beiden di- bzw. tripeptidischen Aldehyde (**5**) und (**6**), die in APP-transfektierten Zellen eine schwache inhibitorische Wirkung auf die γ -Sekretase zeigten (Abb. 07).^[64-66] Der erste Substrat-basierte Inhibitor (**7**) war MW167 (Abb. 07), ein fluorhaltiges peptidomimetisches Keton. WOLFE *et al.* konnten in einem zellulären Assay eine inhibierende Wirkung des Ketons (**7**) auf die γ -Sekretase (IC₅₀ = 13 μ M) zeigen, die zehnfach schwächer gegenüber der Inhibition der Calpain-Protease war (Abb. 07).^[67] Eine weitere Inhibitor-Klasse sind die Hydroxyethylamine, deren potentester Vertreter (**8**) (L685, 458) eine sehr starke Hemmung der γ -Sekretase-Aktivität (IC₅₀ = 17 nM) verursacht (Abb. 07).^[68]

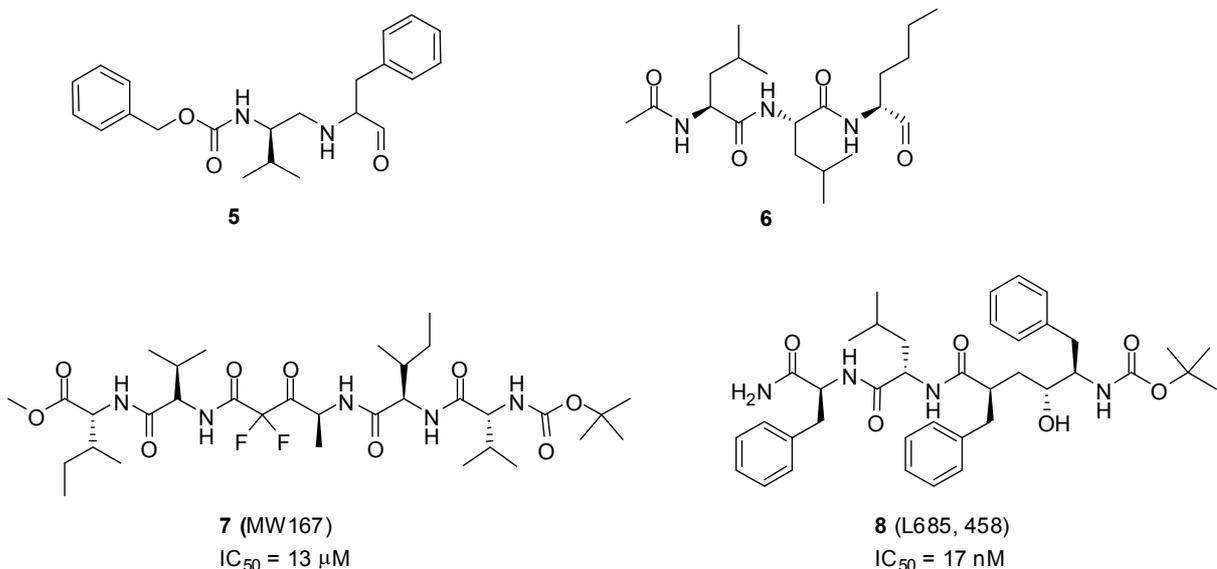
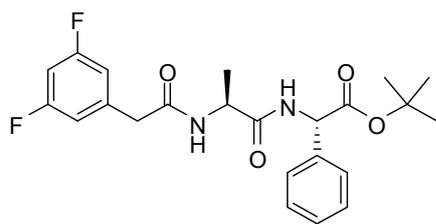
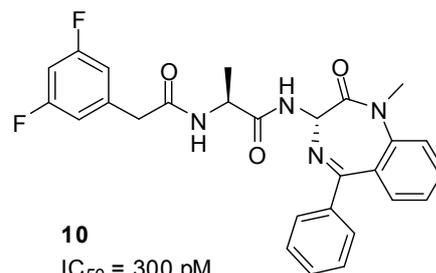


Abb. 07: Auswahl an γ -Sekretase-Inhibitoren **5-8** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC₅₀-Werte siehe Literatur).^[67, 68]

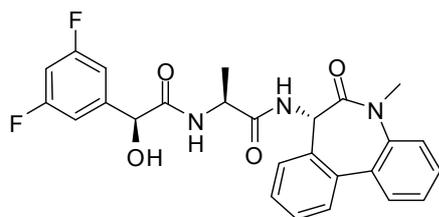
Der peptidische γ -Sekretase-Inhibitor (**9**) (DAPT, Abb. 08) wurde in einem *high throughput screening* der Unternehmen ELAN und Eli Lilly 2001 identifiziert (Abb. 08). Der Inhibitor (**9**) zeigte eine gute A β -senkende Wirkung ($IC_{50} = 20$ nM) in zellulären Assays und war die erste Substanz, die *in vivo* in einer PDAPP-transgenen Maus bei oraler Verabreichung wirksam war ($EC_{50} = 100$ mg/kg).^[69] Die Applikation von DAPT (**9**) führte zu einer Konzentrationssenkung an A β im Gehirn, im Plasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit.^[69] Problematisch im Hinblick auf die *in vivo* Toxizität ist die simultane Hemmung des Notch-Signalweges.^[70]



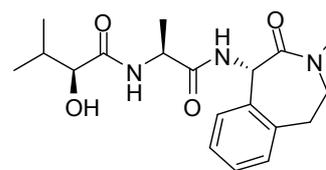
9 (DAPT)
 $IC_{50} = 20$ nM



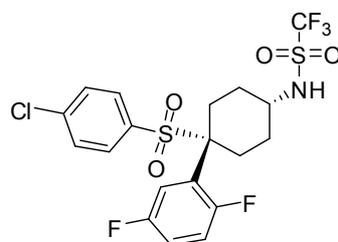
10
 $IC_{50} = 300$ pM



11 (LY-411, 575)
 $IC_{50} = 30$ pM



12 (LY-450139, Semagacestat)
 $IC_{50} = 15$ nM



13 (MRK-560)
 $IC_{50} = 0.7$ nM

Abb. 08: Auswahl an γ -Sekretase-Inhibitoren **9-13** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC_{50} -Werte siehe Literatur).^[69, 71-73]

Auf der DAPT-Struktur (**9**) basierend entwickelten SEIFFERT *et al.* den potenten γ -Sekretase-Inhibitor (**10**) ($IC_{50} = 300$ pM), bei welchem die Phenylalanin-Einheit durch eine Benzodiazepin-Einheit ersetzt wurde (Abb. 08).^[73] Eine weitere Strukturmodifikation lieferte den Inhibitor (**11**) (LY-411, 575), der die A β -Produktion *in vivo* bei tg2576-Mäusen mit einem IC_{50} von 30 pM inhibierte ($EC_{50} < 1$ mg/kg).^[72] Die Applikation des Inhibitors (**11**) führte zu gastrointestinalen Blutungen und Immunsuppression, bedingt durch die Inhibition

des Notch-Signalwegs (Abb. 08).^[74] Der Inhibitor (**12**) (Semagacestat, LY-450139) wurde in klinischen Studien untersucht und scheiterte in Phase III, in welcher 1537 Patienten Dosen von 100 mg oder 140 mg des Wirkstoffs verabreicht wurden (Abb. 08). Im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe konnte keine Verbesserung der kognitiven Funktion festgestellt werden. Stattdessen kam es zu erheblichen Nebenwirkungen wie gastrointestinalen Störungen und Hautkrebs.^[75] CHURCHER *et al.* berichtete von Cyclohexylsulfon-Derivaten, die in Zellen die A β -Produktion bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich inhibieren konnte.^[71] Der beste γ -Sekretase-Inhibitor dieser Serie ist das Sulfon (**13**) (MRK-560, Abb. 08), das auch *in vivo* bei oraler Applikation in tg2576-Ratten das A β -Level im Gehirn und der Zerebrospinalflüssigkeit senken konnte (EC₅₀ = 6-10 mg/kg).^[76] Der Inhibitor (**13**) hatte im Rattenmodell eine lange Halbwertszeit von über 15 Stunden, sodass er als Tages-Einzeldosis verabreicht werden konnte.

Aufgrund der Inhibition des Notch-Signalwegs und der damit verbundenen Toxizität der γ -Sekretase-Inhibitoren verschiebt sich das Interesse der Forschung immer mehr zu den Modulatoren der γ -Sekretase, bei welchen man zwischen zwei verschiedenen Klassen unterscheidet. Unterschieden wird zwischen Substanzen, welche selektiv die γ -Sekretase-vermittelte Spaltung von APP vollständig inhibieren, währenddessen die Proteolyse von Notch nicht gestört wird (auch *Notch-sparing* Inhibitoren), und Substanzen, die das Produktspektrum der APP-Hydrolyse modifizieren. Letztere senken die Produktion an A β ₄₂-Peptiden unter Erhöhung der A β ₃₈-Konzentration, währenddessen die A β -Gesamtkonzentration unverändert bleibt. Die Ausschüttung des in Abschnitt 1.1.3 erwähnten Transkriptionsfaktors NICD wird von den γ -Sekretase-Modulatoren nicht inhibiert, sodass es zu keiner Toxizität aufgrund der Inhibition des Notch-Signalwegs kommt.^[77]

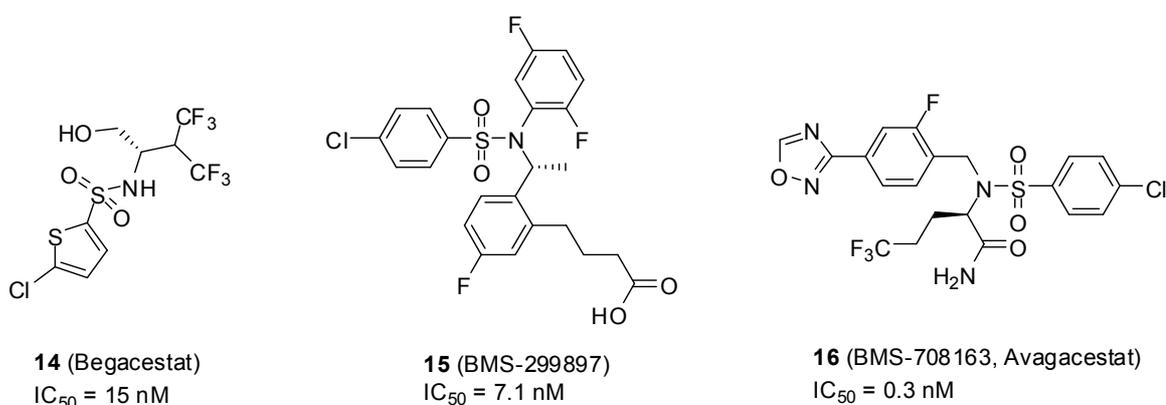


Abb. 09: Auswahl an *Notch-sparing* γ -Sekretase-Inhibitoren **14-16** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC₅₀-Werte siehe Literatur).^[78-81]

Das Thiophen-haltige Sulfonamid (**14**) (Begacestat) inhibiert die zelluläre A β -Produktion (IC₅₀ = 15 nM) mit hoher Selektivität gegenüber Notch (IC₅₀ = 210 nM). Auch im Mausmodell konnte eine signifikante Konzentrationsabnahme von A β ₄₀ und A β ₄₂ im Gehirn gemessen werden (Abb. 09).^[80, 82] Das von dem Unternehmen Bristol-Myer Squibb entwickelte Diarylsulfon (**15**) (BMS-299897) zeigte in transgenen Mäusen eine Senkung der A β -Konzentration im Plasma, Gehirn und in der Rückenmarksflüssigkeit (Abb. 09).^[78, 79] Der γ -Sekretase-Modulator (**15**) zeigte *in vitro* eine selektive Inhibition der APP-Prozessierung gegenüber der Notch-Spaltung (IC₅₀ (APP) = 7.1 nM, IC₅₀ (Notch) = 105.9 nM). Das Verabreichen des Modulators (**15**) konnte im Mausmodell Defizite des Kurzzeit- jedoch nicht des Langzeitgedächtnisses aufheben.^[81] Ein weiterer von Bristol-Myer Squibb entwickelter γ -Sekretase-Modulator (**16**) (BMS-708163, Avagacestat) zeigte in Zellen eine 190-fach größere Selektivität der A β -Produktion gegenüber der Notch-Spaltung (Abb. 09).^[83] Bei oralen Dosen von 3-100 mg/kg des Modulators (**16**) im Rattenmodell konnte in der Zerebrospinalflüssigkeit eine signifikante Senkung der A β ₄₀-Konzentration gemessen werden. Auch bei Hunden konnte bei oraler Applikation von 2 mg/kg im frontalen Cortex und in der Zerebrospinalflüssigkeit eine anhaltende Senkung des A β ₄₀-Levels festgestellt werden.^[83] In der klinischen Studie (Phase I) am gesunden Menschen wurde die Verträglichkeit des Modulators (**16**) bei moderaten Nebenwirkungen (Nausea, Kopfschmerzen) bei einer Einzeldosis zwischen 0.3-800 mg bestätigt.^[84, 85] In Phase II der klinischen Studie an 209 Patienten mit leichter bis mittlerer Alzheimer-Demenz wurden Einzeldosen zwischen 25 und 125 mg Avagacestat (**16**) getestet. Bis zu einer Dosierung von 50 mg wurde der Wirkstoff (**16**) vergleichsweise gut vertragen, bei höheren Dosen ab 100 mg kam es zu Nebenwirkungen wie gastrointestinalen Störungen. Bei hohen Dosen (ab 100 mg) konnte eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten beobachtet werden. Bei geringer Dosierung (25-50 mg) konnte keine statistisch relevante Verbesserung der kognitiven Leistung festgestellt werden.^[86] Zum Jahresende 2012 gab Bristol-Myer Squibb bekannt, die klinischen Untersuchungen von Avagacestat (**16**) einzustellen. Der antidiabetische Wirkstoff NIC5-15 konnte bei einer Verabreichungsdauer von 6 Monaten in Insulin-resistenten tg2576 Mäusen die A β ₄₀- und A β ₄₂-Level im cerebralen Cortex senken.^[87] Derzeit befindet sich der Modulator NIC5-15 in der klinischen Studie.^[88]

Die erste Klasse der A β ₄₂-senkenden γ -Sekretase-Modulatoren waren Vertreter der NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*). WEGGEN *et al.* konnten für Suldinac Sulfid (**17**), Indomethacin (**18**) und Ibuprofen (**19**) in verschiedenen Zellen eine A β ₄₂-senkende und

gleichzeitig $A\beta_{38}$ -steigernde Wirkung unabhängig von der COX-Aktivität zeigen (Abb. 10).^[89] Ibuprofen (**19**) senkte das $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnis um 50% bei einer Konzentration zwischen 200-300 μM , Indomethacin (**18**) dagegen bei einer Konzentration von 25-50 μM . *In vivo* Experimente ergaben, dass das Verabreichen von Ibuprofen (**19**) über einen Zeitraum von sechs Monaten bei tg2576 Mäusen eine Abnahme der $A\beta_{42}$ -Level um 39% bewirkt.^[89]

Das *R*-Flurbiprofen (**20**) zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung (Abb. 10).^[90] Eine weitere Studie an tg2576-Mäusen, denen täglich 10 mg/kg *R*-Flurbiprofen (**20**) verabreicht wurde, belegt eine Verbesserung der kognitiven Defizite.^[91] *R*-Flurbiprofen (**20**) durchlief klinische Studien am Menschen und scheiterte in Phase III aufgrund mangelnder Wirksamkeit.^[92] Das Fenofibrat (**21**) zeigte eine inverse Modulation, d.h. die Prozessierung der pathogenen Spezies $A\beta_{42}$ dominierte gegenüber der Bildung des unbedenklichen $A\beta_{38}$. Bei Aspirin (**22**) konnte kein Effekt beobachtet werden.

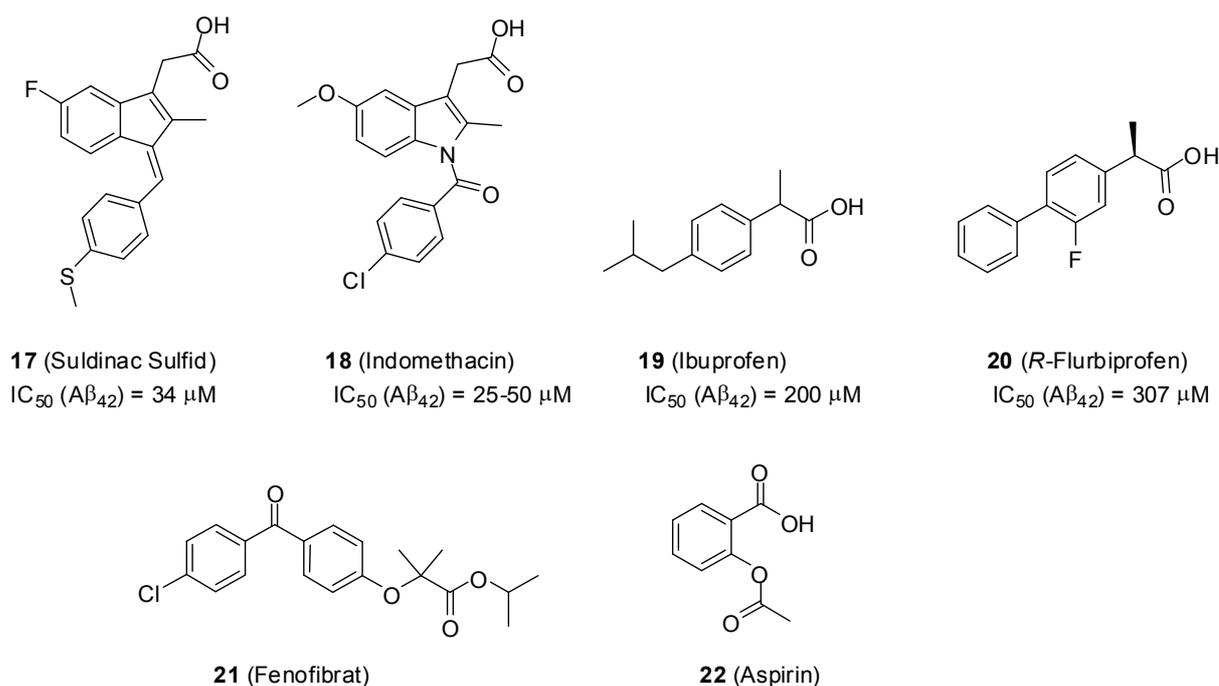


Abb. 10: Auswahl an NSAIDs als γ -Sekretase-Modulatoren **17-20**, Fenofibrat **21** und Aspirin **22** ohne modulatorische Wirkung (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC₅₀-Werte siehe Literatur).^[89, 93]

Inspiziert durch die Struktur der NSAIDs wurde eine Vielzahl an Substanzen synthetisiert und auf eine modulierende Funktion der γ -Sekretase untersucht (Abb. 11).^[94] Die Arylessigsäure (**23**) zeigte einen $A\beta_{42}$ -senkenden Effekt (IC₅₀ ($A\beta_{42}$) = 41 μM), der zu einer Senkung der $A\beta$ -Plaque-Belastung führt und die Neurogenese im Hippocampus

wiederherstellt (Abb. 11).^[95] Die Lern- und Erinnerungsdefizite in APP-transgenen Mäusen konnten nach der Verabreichung des Modulators (**23**) verbessert werden.^[95] Der vielversprechende Modulator befindet sich derzeit in klinischen Studien.^[96]

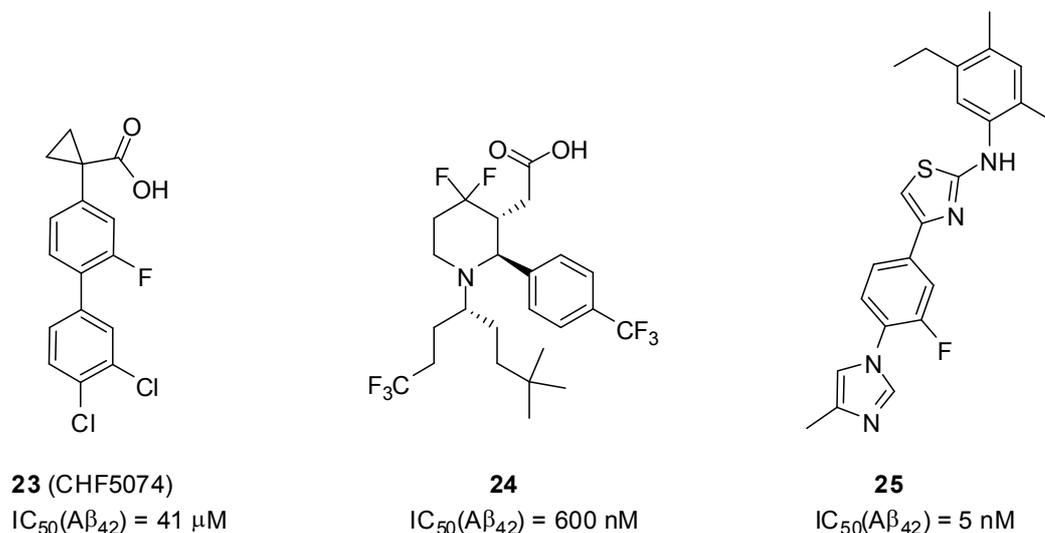


Abb. 11: Auswahl an $A\beta_{42}$ -senkenden γ -Sekretase-Modulatoren **23-25** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC_{50} -Werte siehe Literatur).^[95, 97, 98]

Auch die Piperidin-haltige Essigsäure (**24**) ist ein sehr potenter $A\beta_{42}$ -senkender γ -Sekretase-Modulator ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 600 \text{ nM}$), der auch *in vivo* das $A\beta_{42}$ -Level im Gehirn von Mäusen senkt (Abb. 11).^[98] Eine nicht auf der Struktur der NSAIDs basierende Modulatorklasse bilden die 2-Aminothiazole wie (**25**) ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 5 \text{ nM}$). Der Modulator (**25**) senkt sowohl die $A\beta_{42}$ - als auch die $A\beta_{40}$ -Produktion und steigert die $A\beta_{38}$ -Produktion, wobei die $A\beta$ -Gesamtkonzentration konstant bleibt (Abb. 11).^[97]

Auch die Arbeitsgruppe SCHMIDT *et al.* hat in der Vergangenheit eine Vielzahl an $A\beta_{42}$ -senkenden γ -Sekretase-Modulatoren synthetisiert und publiziert (Abb. 12).^[99, 100] Strukturell sind diese Modulatoren durch ihre Carbonsäurefunktionalität eng verwandt mit den bekannten NSAIDs (Abb. 10). Als Leitstruktur dienten hierbei das Carprofen (**26**) und das Carbazol (**27**). Durch Einführung eines lipophilen Restes gelang es, die inhibitorische Wirkung des Carprofens (**26**) in die gewünschte modulatorische Aktivität umzuwandeln. Der lipophile Rest scheint als eine Art Membrananker zu fungieren, während die Säurefunktionalität mit einer basischen Aminosäure z. B. Lysin⁶²⁴ interagieren könnte.^[101]

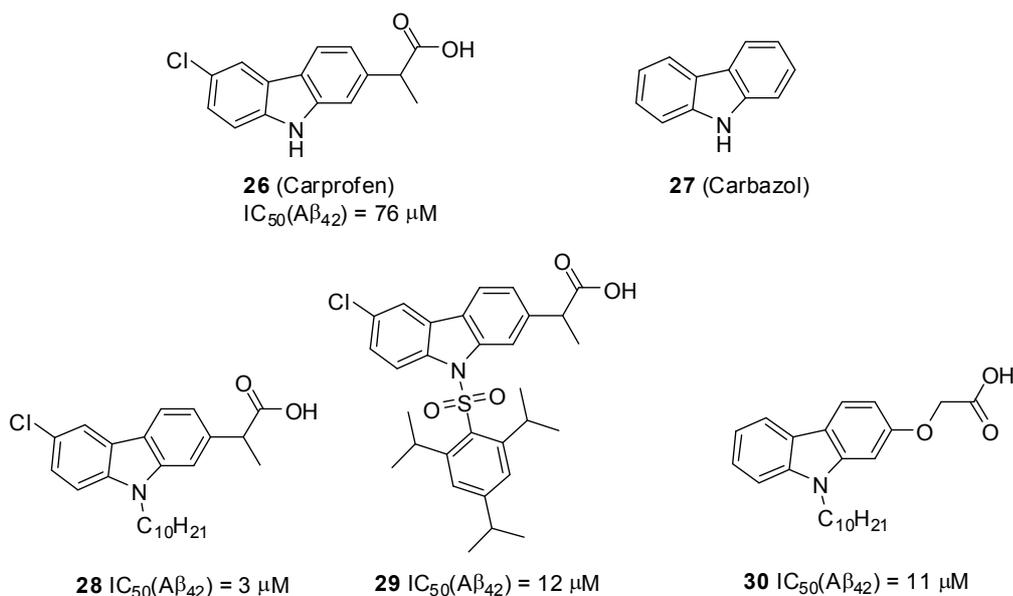


Abb. 12: γ -Sekretase-Modulatoren **28-30** von SCHMIDT *et al.* basierend auf dem Carprofen- **26** und Carprofen-Gerüst **27** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC_{50} -Werte siehe Literatur).^[100]

Für den Wirkmechanismus $A\beta_{42}$ -senkender γ -Sekretase-Modulatoren gibt es zwei verschiedene Hypothesen: die *enzyme-targeting*-Hypothese und die *substrate-targeting*-Hypothese. Der *enzyme-targeting*-Hypothese liegt die Annahme einer allosterischen Interaktion zwischen Modulator und γ -Sekretase zugrunde, wobei die resultierende Konformationsänderung zu einer veränderten Proteolyse des Substrats führt.^[102-104] Bei der *substrate-targeting*-Hypothese dagegen vermutet man eine indirekte Modulation durch Bildung eines Substrat-Modulator-Komplexes. Letztere Hypothese wird unterstützt durch verschiedenen Photoaffinitätsstudien mit NSAIDs (*R*-Flurbiprofen (**20**) als GSM und Fenofibrat (**21**) als inverser GSM).^[105]

1.2 Akute myeloische Leukämie

In den Industrieländern gehören Krebserkrankungen neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Mit 246.700 Neuerkrankungen bei Männern und 223.100 Neuerkrankungen bei Frauen in 2008 ist die Zahl der jährlich neu auftretenden Krebserkrankungen innerhalb der letzten 30 Jahre signifikant angestiegen.^[106] In 2008 erkrankten 6340 Männer und 5080 Frauen an einer Leukämie, davon war ca. ein Viertel von einer akuten myeloischen Leukämie (AML) betroffen.^[106] Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems im Knochenmark. Der Reifungsprozess der sich erneuernden Blutzellen ist bei dieser Erkrankung gestört. Durch die Entartung unreifer myeloischer Zellen (Stammzellen der Blutbildung) können keine reifen und somit funktionsfähigen Blutzellen gebildet werden. Meist findet eine Entartung einer Vorläuferzelle der weißen Blutzellen (Myeloblasten) statt, grundsätzlich ist aber die Entartung aller Vorläufer myeloischer Zellen möglich. So kommt es im Falle einer Entartung der Myeloblasten zu einer unkontrollierten und schnellen Vermehrung von unreifen Leukozyten.^[107-109] Dieser Prozess stört die normale Blutbildung und reife Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten können nicht mehr in der benötigten Menge gebildet werden. Infolge dessen können Infektionen, Anämie und auch Blutungen auftreten, die oftmals erste Anzeichen für eine Erkrankung sind.^[108] Es gibt verschiedene Formen der akuten myeloischen Leukämie, die sich durch die betroffene entartete Vorläuferzelle sowie die unterschiedlichen Reifungsstufen unterscheiden. Die genauen Ursachen der AML sind nicht genau aufgeklärt, einige Risikofaktoren der Krankheit sind jedoch bekannt: Radioaktive Strahlung und Röntgenstrahlung sowie verschiedene Chemikalien wie z.B. Benzol oder bestimmte Chemotherapeutika stehen im Verdacht, das Erkrankungsrisiko von AML zu erhöhen.^[110] Studien zufolge haben auch Kinder mit bestimmten Chromosomenmutationen ein erhöhtes Krankheitsrisiko. Es konnte bei Kindern mit dem Down-Syndrom (Trisomie 21) ein 100-fach erhöhtes AML-Risiko festgestellt werden.^[109, 111, 112] Die Krankheit verläuft sehr aggressiv und führt ohne Therapie in nur wenigen Wochen zum Tod. Die Überlebensrate der erkrankten Patienten hängt von der Form der AML ab, jedoch ist sie bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) mit 25-70% weitaus höher als bei den älteren Patienten mit einer Überlebensrate von 5-15%.^[113]

1.2.1 Therapieansätze der akuten myeloischen Leukämie

Um Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie zu behandeln, gibt es unterschiedliche Therapieansätze. Die Therapie hängt unter anderem mit der Form der Erkrankung und dem Alter sowie mit dem Gesundheitszustand des Patienten zusammen. Von zentraler Bedeutung ist die Behandlung durch eine Chemotherapie. Dabei werden Zytostatika intravenös oder oral appliziert, die die Zellteilung und so das Zellwachstum hemmen (Abb. 13).^[114-117]

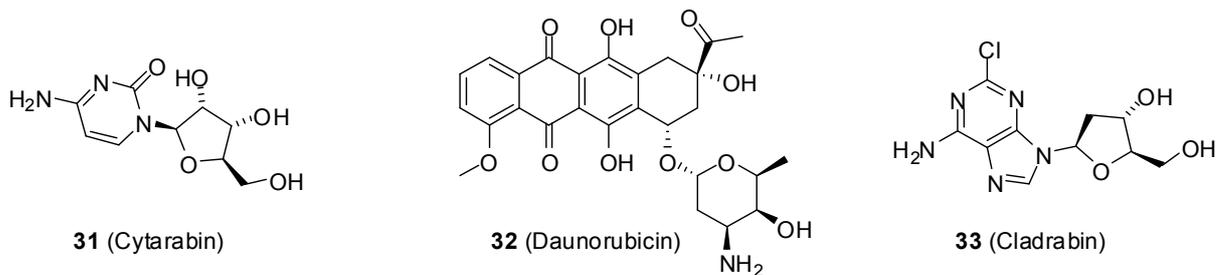


Abb. 13: Beispiele von Zytostatika **31-33** zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie.

Zytostatika wirken nicht nur auf die entarteten, sondern auch auf gesunde Zellen, wodurch es während der Therapie zu starken Nebenwirkungen kommt. Besonders betroffen sind Zellen, die sich schnell und oft teilen: Haarwurzeln, Zellen der Mund- und Darmschleimhaut sowie Knochenmarkszellen. Infolge dessen kommt es häufig zu Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö.^[118] In seltenen Fällen, beim Auftreten von Leukämiezellen im Zentralnervensystem, wird die Behandlung durch eine therapeutische Bestrahlung des Kopfes ergänzt.^[109] Bei AML-Rückfallpatienten kann mit Hilfe eines passenden Spenders nach einer Hochdosis-Chemotherapie eine Stammzelltransplantation durchgeführt werden.^[119]

Andere Therapieansätze basieren auf dem Prinzip der Immuntherapie. Histamindihydrochlorid (Ceplene[®]) in Kombination mit Interleukin-2 wird therapeutisch bei älteren Patienten während der ersten Remission verabreicht.^[120] Weiterhin gab es Versuche, mit einem CD33-Antikörper therapeutische Erfolge zu erzielen. Das Immunkonjugat Gemtuzumab Ozogamicin wurde 2000 von der *Food and Drug Administration* (FDA) für rückfällige AML-Patienten über 60 Jahren zugelassen, bei denen eine andere Therapieform nicht in Frage kommt.^[121] Die Verabreichung des Antikörpers allein zeigte keinen therapeutischen Nutzen, in Kombination mit einer Chemotherapie jedoch sprachen die Patienten besser auf die Behandlung an. Die Genehmigung der FDA basierte auf drei Phase II Studien an 142 Patienten, bei denen die Therapie mit Gemtuzumab Ozogamicin eine Remissionsrate von 15% induzierte.^[122] Es zeigte sich in mehreren Phase III Studien eine

hohe Toxizität des Wirkstoffs und ein signifikanter Nutzen für den Patienten konnte nicht festgestellt werden, weshalb der Wirkstoff 2010 wieder vom Markt genommen wurde.^[123-125]

Eine weitere vielversprechende Wirkstoffklasse zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie stellen Proteasom-Inhibitoren dar. Das Proteasom ist eine multikatalytische Threonin-Protease, die hauptverantwortlich für den gezielten Abbau von Proteinen in Eukaryoten ist.^[126] Die Inhibition der Proteasom-Aktivität führt zur Apoptose von Tumorzellen und steht daher als Therapieansatz bei Krebserkrankungen stark im Fokus der Forschung.^[127, 128] Bortezomib (**34**) ist ein Proteasom-Inhibitor, der für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen ist (Abb. 14).^[129, 130]

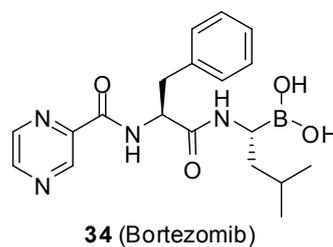


Abb. 14: Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib **34**.

In einer Phase I Studie konnte die Verträglichkeit von Bortezomib (**34**) in Kombination mit einer Chemotherapie bestätigt werden.^[131] Die folgende Phase II Studie zeigte bei der Behandlung mit Bortezomib (**34**) ohne zusätzliche Chemotherapie bei acht von 13 Patienten einen anti-leukämischen Effekt. Als Nebenwirkung trat bei sieben Patienten eine periphere Neuropathie auf, weshalb vier von Ihnen die Studie abbrechen mussten.^[132] Weitere Studien zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie mit Bortezomib (**34**) in Kombination mit Zytostatika sollen folgen.

Ein besonderes Augenmerk liegt derzeit auf der Klasse der FLT3-Inhibitoren als Therapeutika der akuten myeloischen Leukämie.^[113, 133, 134] Aus diesem Grund ist dieser Inhibitor-Klasse ein separat folgendes Kapitel gewidmet.

1.2.2 FLT3 – die FMS-like Tyrosin Kinase

FLT3 gehört zur Klasse der Typ-III-Rezeptor Tyrosinkinase. Kinasen gehören zur Klasse der Phosphoryltransferasen, das heißt sie katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem an das Enzym gebundenen ATP-Molekül auf ein Substratmolekül. Bei den Tyrosinkinase erfolgt die Übertragung des Phosphats dabei auf die Hydroxygruppe eines Tyrosins. Durch die Übertragung des Phosphats wird die biologische Aktivität des Substrats

bestimmt, wodurch Kinasen bei einer Vielzahl an Vorgängen in der Zelle eine Rolle spielen.^[135, 136]

FLT3 besteht aus einer extrazellulären Domäne, die wiederum aus fünf Immunoglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut ist und für die Bindung des FLT3-Liganden verantwortlich ist. Weiterhin enthält FLT3 eine Transmembrandomäne, eine intrazelluläre Juxtamembran-Domäne sowie zwei katalytisch aktive intrazelluläre Tyrosinkinasedomänen, die durch eine *kinase insert*-Domäne getrennt sind (Abb. 15). Die *activation loop* genannte Schleife zwischen dem α -helikalen C-terminalen- und β -Faltblatt strukturierten N-terminalen Kinaseteil reguliert die Enzymfunktion (Abb. 15). Sie enthält ein DFG-Motiv (D-Asparaginsäure, F-Phenylalanin, G-Glycin), das durch Änderung der Konformation als *DFG-in* oder *DFG-out* Konformation vorliegen kann. Die Seitenkette der Asparaginsäure des DFG-Motivs bildet mit einem Lysin eine Salzbrücke. Die ATP-Bindungstasche, die sich in der Nähe des DFG-Motivs befindet, enthält ein GxGxxG Motiv (*glycine rich loop*).^[137]

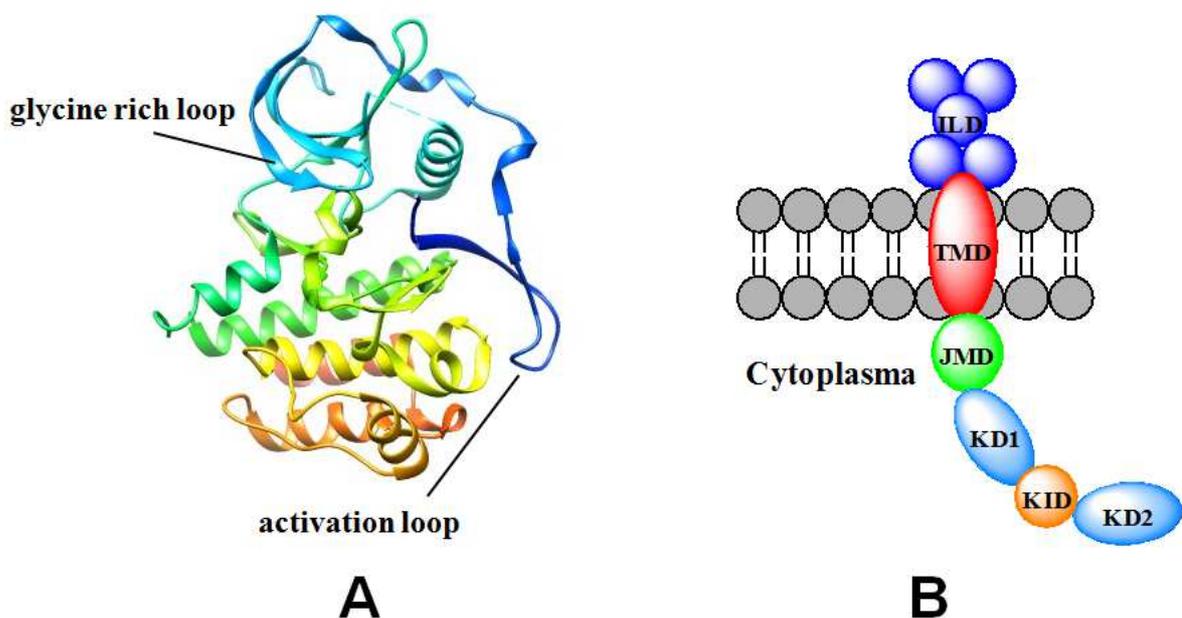


Abb. 15: **A:** Röntgenkristallstruktur der Kinasedomäne und Juxtamembran-Domäne von FLT3 (PDB: 1RJB), **B:** Schematische Darstellung von FLT3, ILD: Immunoglobulin-ähnliche Domäne, TMD: Transmembrandomäne, JMD: Juxtamembran-Domäne, KD1/KD2: Kinasedomänen, KID: *kinase insert* Domäne.^[137]

Für die Enzymaktivität von FLT3 ist das Binden des FLT3-Liganden von zentraler Bedeutung. Nachdem der FLT3-Ligand (FL) an FLT3 gebunden wurde, kommt es zu einer induzierten Aktivitätssteigerung durch Dimerisierung. Das dimerisierte Protein unterliegt der

Autophosphorylierung durch ein gebundenes ATP-Molekül. Nach erfolgreicher Autophosphorylierung des FLT3-Dimers liegt der *activation loop* in einer aktivierten Konformation vor. Diese ermöglicht Substraten den Zugang zur Kinase, welche über spezielle Signalwege essentielle Mechanismen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung steuern.^[138]

1.2.3 FLT3 als Target für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie

FLT3 wird in unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert und kommt weiterhin in der Plazenta, den Drüsen sowie im Gehirn vor.^[139-141] Auffällig oft und in hohen Konzentrationen wird FLT3 in hämatopoetischen Malignomen exprimiert, z.B. im Falle einer akuten myeloischen Leukämie, akuten lymphoblastischen Leukämie oder auch chronischer myeloischer Leukämie.^[142, 143] Zwei verschiedene Mutationen des FLT3-Gens bei AML-Patienten sind in der Literatur beschrieben, die mit einer geringen Remissions- und somit Überlebensrate korrelieren.^[144] NAKAO *et al.* fanden 1996 erstmals die FLT3-ITD Mutation (ITD - *internal tandem duplication*), bei der ein Genabschnitt von 3-400 Basenpaaren doppelt im FLT3-Gen enthalten ist.^[145] Welcher Genabschnitt in welcher Länge dupliziert ist, variiert von Patient zu Patient. Das mutierte FLT3-Gen, das bei ca. 23% aller AML-Patienten gefunden wird, führt zur Bildung eines mutierten FLT3-Proteins mit einer verlängerten Juxtamembran-Domäne. Das FLT3-ITD-Protein zeigt eine gesteigerte Aktivität aufgrund einer resultierenden Liganden-unabhängigen Dimerisierung des Proteins.^[138] Neben der FLT3-ITD Mutation werden häufig Punktmutationen des FLT3-Gens beobachtet, die zu einer Substitution einer einzelnen Aminosäure im exprimierten FLT3-Protein innerhalb des *activation loop* führen (FLT3-TKD).^[146, 147] Diese Mutation kommt bei ca. 7% aller AML-Patienten vor und führt zu einer veränderten Konformation des Enzyms, welche die autoinhibitorische Funktion des Enzyms stört und so aktivierend wirkt. Die gesteigerte Aktivität von FLT3 induziert eine gesteigerte Aktivität der FLT3-regulierenden Signalwege (z.B. PI3K, Ras, STAT5 und ERK1/2), welche an der Regulation von Signaltransduktion, Genexpression und Wachstums- sowie Differenzierungsprozessen von Zellen beteiligt sind.^[138] Die Therapie mit FLT3-Inhibitoren soll die Proliferation leukämischer Zellen stoppen und deren Apoptose induzieren. Die Inhibition von FLT3 erfolgt hierbei ATP-kompetitiv, d. h. der Inhibitor interagiert mit der ATP-Bindungstasche in Konkurrenz zu einem ATP-Molekül. FLT3-Inhibitoren zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie befinden sich derzeit in klinischen Studien. Hierbei wird sowohl die Eignung der Wirkstoffe

als Monopräparat als auch die Wirkung in Kombination mit einer Chemotherapie untersucht (Abb. 16).^[113, 133, 134]

Quizartinib (**35**) ist ein potenter hochselektiver FLT3-Inhibitor, der in einer Phase 1 Studie 76 AML-Rückfallpatienten im Durchschnittsalter von 60 Jahren in Dosen von 12-450 mg oral verabreicht wurde (Abb. 16).^[148, 149] Bei 17 der 76 Patienten lag eine FLT3-ITD Mutation vor, bei 22 der Testpatienten war nicht bekannt, ob eine FLT3-ITD Mutation vorliegt. Insgesamt sprachen 23 von 76 Patienten auf die Behandlung mit Quizartinib (**35**) an, davon erreichten zehn Patienten die komplette Remission. Die Überlebensrate der Patienten betrug im Durchschnitt 14 Wochen. Die maximal tolerierte Dosis des Wirkstoffs lag bei 200 mg/Tag.

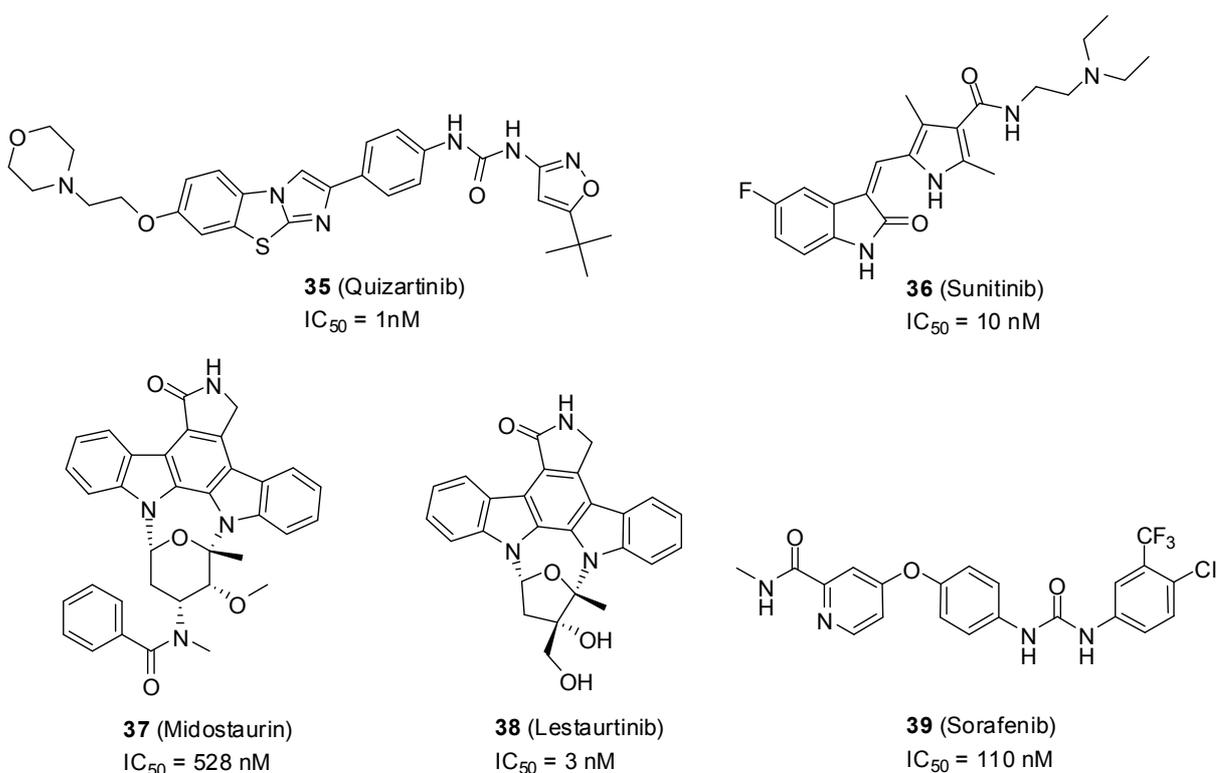


Abb. 16: Auswahl an FLT3-Inhibitoren **35-39** in klinischen Studien (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC_{50} -Werte siehe Literatur).^[150-153]

Im Folgenden wurde eine Phase II Studie durchgeführt, deren Patienten in zwei unterschiedlichen Gruppen untersucht wurden.^[154, 155] In der ersten Gruppe (134 Patienten) lag das Durchschnittsalter der Patienten bei über 60 Jahren. Sowohl Patienten mit FLT3-ITD Mutation (FLT3-ITD⁺) als auch ohne (FLT3-ITD⁻) waren an der Studie beteiligt. Quizartinib (**35**) wurde für 28 Tage mit einer Dosis von 90 mg oder 135 mg oral appliziert. Von den 92 FLT3-ITD⁺-Patienten sprachen 50 Patienten auf die Behandlung an, bei den 41 FLT3-ITD⁻-Patienten dagegen 13 Patienten. In der zweiten Gruppe (137 Patienten) sprachen

von den 99 FLT3-ITD⁺-Patienten 44 Patienten auf die Behandlung mit Quizartinib (**35**) an, wohingegen nur 13 Patienten von 38 FLT3-ITD⁻-Patienten auf die Therapie reagierten. Unabhängig von der Gruppe traten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Müdigkeit und Anämie auf. Die durchschnittliche Überlebensdauer lag zwischen 19 und 25 Wochen. Da die bisherigen Ergebnisse das therapeutische Potential bestätigen konnten, werden die klinischen Studien aktuell fortgeführt.

Sunitinib (**36**) ist ein multi-Kinase-Inhibitor, der in präklinischen Studien eine inhibitorische Aktivität gegenüber FLT3, FLT3-ITD und FLT3-TKD *in vitro* und *in vivo* zeigte (Abb. 16).^[156] In zwei Phase I Studien von AML-Rückfallpatienten konnte bei der Behandlung mit Sunitinib (**36**) partielle Remission von kurzer Dauer nachgewiesen werden.^[157] In Kombination mit einer Hochdosis-Chemotherapie mit Cytarabin (**31**) sprachen, ersten Ergebnissen zufolge, in einer Phase II Studie 59% der Patienten auf die Therapie an.^[158]

Der multi-Kinase-Inhibitor Midostaurin (**37**) wird in klinischen Studien sowohl als Einzelpräparat als auch mit ergänzender Chemotherapie untersucht (Abb. 16). In einer Phase IIb Studie bei AML-Rückfallpatienten konnte eine signifikante Reduktion der peripheren Blasten sowie Knochenmarkblasten bei einer Dosierung von 100-200 mg/Tag beobachtet werden.^[159] Die Blastenreduktion konnte bei Patienten mit Wildtyp FLT3 und auch mit FLT3-ITD nachgewiesen werden. Die kombinierte Therapie von Midostaurin (**37**) mit Daunorubicin (**32**) und Cytarabin (**31**) lieferte in einer Phase I Studie vielversprechende Ergebnisse und wird derzeit in einer Phase III Studie untersucht.^[160]

Die Behandlung mit dem multi-Kinase-Inhibitor Lestaurtinib (**38**) zeigte in Phase I/II Studien beim Patienten eine gute Verträglichkeit (Abb. 16).^[161] Bei den 14 AML-Rückfallpatienten konnte bei fünf Patienten ein Rückgang der peripheren Blasten von über 50% festgestellt werden. In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der zusätzlichen Medikation von Lestaurtinib (**38**) bei einer Chemotherapie untersucht. Bei der kombinierten Therapie sprachen die Patienten jedoch nicht besser auf die Behandlung an, durch die zusätzliche Verabreichung des Wirkstoffs Lestaurtinib (**38**) konnte die Überlebensrate der Patienten nicht verlängert werden.^[162]

Sorafenib (**39**) inhibiert eine Reihe von Kinasen, wie die RAF Kinase, VEGFR, c-Kit und FLT3 (Abb. 16).^[133] Der Inhibitor (**39**) wirkt aktiver auf FLT3-ITD als auf den Wildtyp FLT3, während er gegenüber FLT3-TKD nur eine sehr geringe Aktivität aufweist (Abb. 16).

Dies wurde in Phase I Studien bestätigt, in denen die FLT3-ITD⁺-Patienten auf die Therapie mit Sorafenib (**39**) am besten ansprachen. Die Therapieergebnisse bei den Wildtyp FLT3-Patienten bei einer Dosierung von 200-400 mg des Wirkstoffs (**39**) waren moderat, während eine Behandlung mit Sorafenib (**39**) bei den FLT3-TKD-Patienten ergebnislos blieb.^[163, 164] Die kombinierte Therapie mit Zytostatika dagegen verläuft vielversprechend. In einer Phase I Studie erreichten bei einer kombinierten Therapie von 51 Patienten 38 die komplette Remission, darunter 14 von insgesamt 15 Patienten mit einer FLT3-ITD Mutation.^[165] In einer weiteren Studie mit einer ergänzenden niedrig-dosierten Chemotherapie sprachen dagegen nur 10% der Patienten auf die Behandlung an. Weitere Studien sollen folgen.^[166]

Auch die Arbeitsgruppe SCHMIDT *et al.* konnte in der Vergangenheit eine Reihe FLT3-Inhibitoren synthetisieren (Abb. 17).^[167]

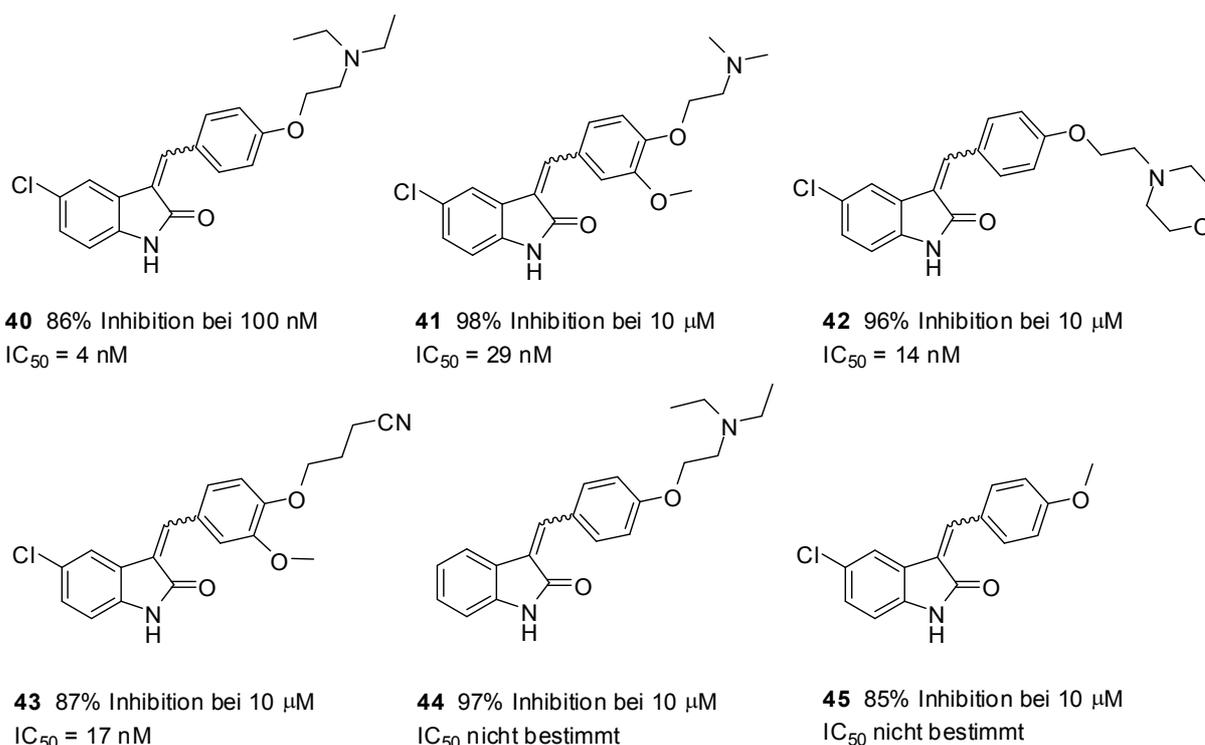


Abb. 17: Auswahl an FLT3-Inhibitoren **40-45** nach SCHMIDT *et al.*, Inhibition: gemessene spezifische Aktivität/ spezifische Aktivität der Kontrolle, Kontrolle: multi-Kinase-Inhibitor Staurosporin.

Die Inhibitoren (**40-45**) basieren auf dem von Sunitinib (**36**) bekannten Grundgerüst. Die Derivate wurden hierbei durch rationales Wirkstoffdesign mithilfe von computergestütztem Protein/Ligand-Docking entwickelt. Die synthetisierten Verbindungen (**40-45**) zeigen eine Inhibition von FLT3 im niederen nanomolaren Bereich und bilden eine gute Ausgangslage für die weitere Synthese Indolinon-basierter Verbindungen als potentielle FLT3-Inhibitoren.

1.3 Die Metalloproteasen Meprin α und Meprin β

Meprine sind Zink-abhängige Endopeptidasen und gehören zu der Familie der Astacine und übergeordnet zu den Metzincin-Proteasen. Endopeptidasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse einer Bindung innerhalb einer Peptidkette katalysieren, dabei erfolgt die Spaltung oft spezifisch nach einer bestimmten Klasse von Aminosäuren. Meprine spalten unter anderem Cytokine, Wachstumsfaktoren, bioaktive Peptide, Hormone und extrazelluläre Matrix-Proteine.^[168] Oftmals steht die proteolytische Spaltung nur am Anfang einer Kaskade von weiteren enzymatischen Vorgängen in der Zelle. Charakteristisch für Meprine ist ein konserviertes Zink-bindendes Motiv (HExxHxxGxxHxxxRxDR) und zusätzlich in der direkten Nachbarschaft eine sogenannte Methionin-Schleife.^[169] Die Meprine bestehen aus einem *N*-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne, einer Proteasedomäne, die das aktive Zentrum des Enzyms enthält, einer MAM-Domäne (*meprin, A5 protein, receptor protein tyrosine phosphatase* μ), einer TRAF-Domäne (*tumor necrosis factor, receptor associated factor*), einer EGF-ähnlichen-Domäne (*epidermal growth factor*), einer Transmembrandomäne und einer cytosolischen Domäne (Abb. 18).

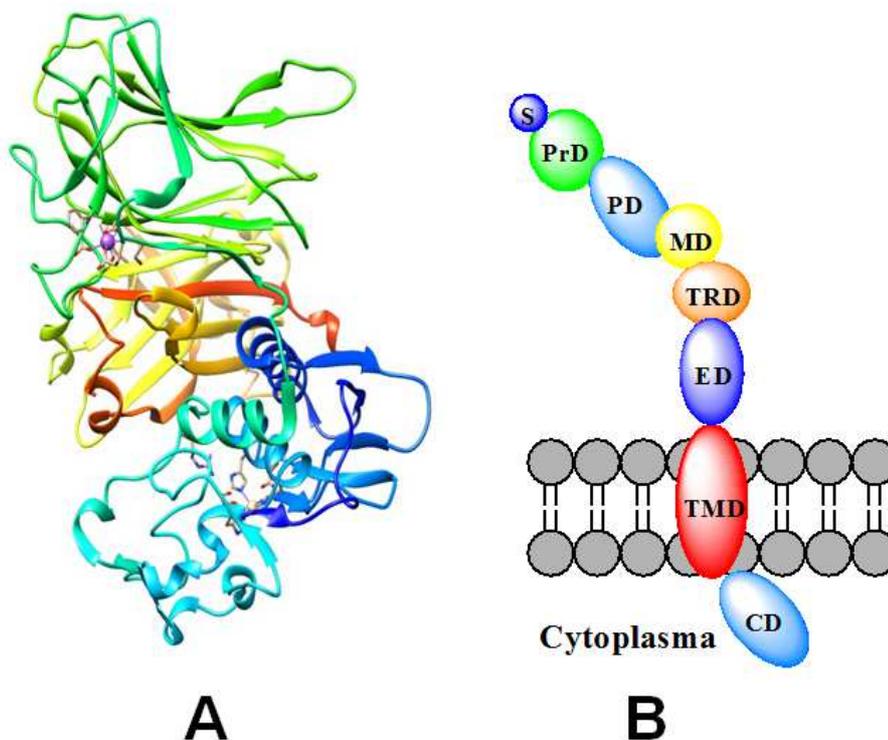


Abb. 18: **A:** Röntgenkristallstruktur von Meprin β (PDB: 4GWN), **B:** Schematische Darstellung von Meprin β , S: Signalpeptid, PrD: Prodomäne, PD: Proteasedomäne, MD: MAM-Domäne, TRD: TRAF-Domäne, ED: EGF-Domäne, TMD: Transmembrandomäne, CD: cytoplasmatische Domäne.^[170]

Bei den Meprinen wird das Meprin α und das Meprin β unterschieden, die sich in ihrer Aminosäure-Sequenz zu 42% entsprechen. Das Meprin α enthält zusätzlich nach der TRAF-Domäne noch eine zusätzliche *inserted*-Domäne.^[168, 170] Die Meprin α und Meprin β Untereinheiten bilden Disulfid-verbrückte Homo ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$)- oder Heterodimere ($\alpha\beta$).^[171] Die Heterodimere neigen dazu, Tetramere zu bilden, wohingegen die α -Homodimere zu großen Multimeren mit Molmassen bis zu 6 MDa assoziieren.^[172-174] Erstmals gefunden wurden Meprin α und Meprin β in Niere und Darm bei Mensch und Maus.^[175, 176] Inzwischen ist bekannt, dass Meprin α darüber hinaus in Leukozyten, in der Haut, in der Bauchspeicheldrüse, im Hoden, in der fötalen Leber sowie auch in Tumorgewebe exprimiert wird.^[168, 177-185] Meprin β wurde zusätzlich noch im Gehirn, in Leber und Herz gefunden.^[168, 186] Auch im Zebrafisch-Bärbling konnten Meprin α und Meprin β nachgewiesen werden. Die Meprine werden als proteolytisch inaktive Zymogene exprimiert. Durch die Abspaltung der N-terminalen Prodomäne durch Trypsin-ähnliche Proteasen wird die katalytisch aktive Form der Meprine generiert.^[187] Meprin α spaltet Peptide nach kleinen hydrophoben Aminosäuren, während Meprin β nach sauren Aminosäuren der Substrate spaltet.^[188] Die Gruppe um JEFFERSON konnte 2012 mit Hilfe der TAILS-Methode (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) 151 Substrate von Meprin α und Meprin β bestimmen.^[189] Darunter befinden sich Proteasen (z.B. ADAM9, ADAM10, MMP1, MMP7), Protease-Inhibitoren (z.B. Cystatin C, Fetuin-A), Wachstumsfaktoren (IGFBP-3, FGF19), extrazelluläre Matrixproteine (Collagen- α 2, Cadherin-2) und andere Substrate.

1.3.1 Meprin α und β und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen

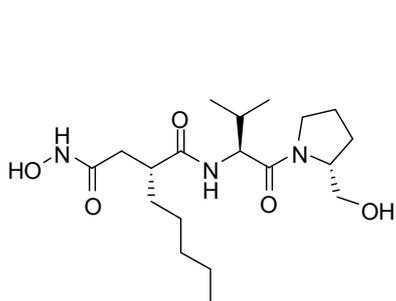
Meprin α und β werden in verschiedenen Geweben exprimiert und sind daher mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen assoziiert.^[190] Die Meprin α - und Meprin β -Gene (MEP1A und MEP1B) sind Suszeptibilitätsgene, welche die erbliche Erkrankungswahrscheinlichkeit an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) erhöhen. BANERJEE *et al.* konnten zeigen, dass MEP1A aufgrund von einzelnen Nukleotid-Polymorphismen mit dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in Verbindung steht.^[191, 192] Studien zufolge werden Nierenerkrankungen mit der veränderten Expression von Meprinen assoziiert. Mäuse, die ausschließlich Meprin β exprimieren, entwickelten, einer Studie zufolge, eine schwächere Form einer Nierenerkrankung als Mäuse mit einem normalen Meprin α -Level. Diese Studie gab erste Hinweise darauf, dass eine akute Niereninsuffizienz mit Meprin α

zusammenhängt.^[193-195] Folgende Studien konnten diese Hinweise bestätigen.^[196-199] Weiterhin werden Meprin α und Meprin β in humanen Fibroblasten bei einer Fibrose-Erkrankung verstärkt exprimiert. Es ist außerdem bekannt, dass die Meprine α und β das C-Propeptid des fibrillären Procollagens *in vitro* spalten. Diese Spaltung ist der Auftaktschritt bei der Bildung von Collagen-Fibrillen.^[179, 200] Verschiedene Studien belegen, dass Meprin α bei der Angiogenese eine Rolle spielt. Die Angiogenese ist der physiologische Prozess bei der Bildung von Blutgefäßen und somit ein Schlüsselschritt bei der Organentwicklung und Homöostase. Einer Studie zufolge entwickelten Meprin α *knockdown* Zebrafisch-Embryos einen Phänotyp, der ein stark reduziertes vaskuläres System aufweist.^[201] Meprin α ist demnach ein pro-angiogenetisches Enzym, das für die Bildung von Blutgefäßen während der Embryogenese essentiell ist. Der molekulare Mechanismus dieser Wirkung könnte die proteolytische Aktivierung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie VEGF-A oder CTGF, sein. Beide Wachstumsfaktoren sind nachweislich Substrate von Meprin α .^[189] Ein Ungleichgewicht bei der Angiogenese führt zu verschiedenen Erkrankungen, unter anderem auch zu Entzündungsprozessen und Krebserkrankungen.^[202] Das pro-angiogenetisch aktive Meprin α wird in verschiedenen malignen Tumoren (z.B. Brust und Darm) exprimiert.^[182, 203] Zelluläre *in vitro* Experimente zeigten eine erhöhte Meprin α -Aktivität im Tumorstroma.^[203] Die proteolytische Aktivität von Meprin α ist auf extrazelluläre Matrix-Substrate gerichtet und zerstört die Struktur des Stromas, sodass es schließlich zur Migration und Proliferation der Tumorzellen in das umliegende Gewebe kommt. Diese Ergebnisse unterstützend folgte eine zweite Studie, die in einem zellulären *in vitro* Experiment bei der Zugabe eines Meprin α -Inhibitors auf humane Brustkrebs-Zellen eine eingedämmte Verbreitung der Krebszellen auf das umliegende Gewebe zeigte.^[204] Der proteolytische Abbau von APP, einem Substrat von Meprin β , spielt bei der Pathogenese der Alzheimer-Demenz eine wesentliche Rolle (Abb. 05). Die dabei gebildeten A β -Peptide sind dabei die pathogene Spezies. BIEN *et al.* konnten *in vitro* die Meprin β -katalysierte Bildung von A β -Peptiden nachweisen, die sehr ähnlich wie die β -Sekretase aktivierte Proteolyse von APP verläuft.^[205] Die Überexpression von Meprin β führt zu N-terminal gespaltenen A β -Peptiden, wie sie in der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden werden.^[186, 206, 207] Die Überexpression von Meprin β im Gehirn bei Alzheimer-Patienten scheint bei der Entwicklung von A β -Peptiden von entscheidender Bedeutung zu sein. Weiterhin ist bekannt, dass Meprin β ADAM10 durch Spaltung des Propeptids zur katalytisch aktiven α -Sekretase umsetzt, die am

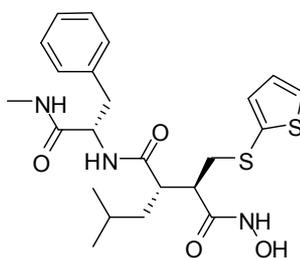
APP-Metabolismus beteiligt ist und APP über den nicht-amyloidogenen Weg abbaut (Abb. 05).^[189]

1.3.2 Inhibitoren von Meprin α und β

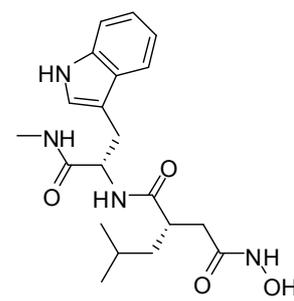
Trotz der Identifizierung einer Vielzahl neuer Substrate ist über die Funktion von Meprin α und β bisher wenig bekannt. Durch die gezielte und selektive Inhibition der zwei Enzyme könnten Experimente dazu beitragen, Wirkmechanismen von Meprin α und β aufzuklären und sie somit als Target für die Behandlung verschiedener Erkrankungen noch attraktiver zu machen. Bislang sind nur wenige Inhibitoren von Meprin α und β bekannt. Die meisten Inhibitoren tragen eine Hydroxamsäure-Einheit, die für die Koordination des Zinks im aktiven Zentrum von Bedeutung ist. Der bislang potenteste Inhibitor ist das Actinonin (**46**) ($IC_{50}(\alpha) = 100 \text{ nM}$, $IC_{50}(\beta) = 400 \text{ nM}$).^[188] Weiterhin sind eine Reihe Verbindungen mit peptidanaloger Struktur (**47-51**) auf die inhibitorische Wirkung von Meprin α und β getestet worden, die ursprünglich als MMP- und ADAM-Inhibitoren entwickelt worden sind (Abb. 19).^[208]



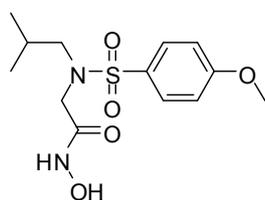
46 (Actinonin)
 IC_{50} (Meprin α) = 0.1 μM
 IC_{50} (Meprin β) = 0.4 μM



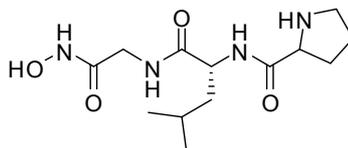
47 (Batimastat)
 K_i (Meprin α) = 4.4 μM
 K_i (Meprin β) = 18.0 μM



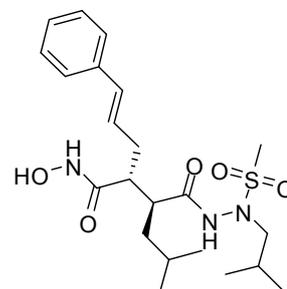
48 (Galardin)
 K_i (Meprin α) = 0.1 μM
 K_i (Meprin β) = 8.9 μM



49 (NNGH)
 K_i (Meprin α) = 0.4 μM
 K_i (Meprin β) = 7.4 μM



50 (PLG-NHOH)
 K_i (Meprin α) = 0.5 μM
 K_i (Meprin β) = 14.0 μM



51 (Ro 32-7315)
 K_i (Meprin α) = 1.6 μM
 IC_{50} (Meprin β) = 1.6 mM

Abb. 19: Auswahl an Meprin-Inhibitoren **46-51** (Beschreibung der Assays zur Bestimmung der IC_{50} -Werte und Inhibitionskonstanten siehe Literatur).^[188, 208]

Bisher verliefen jedoch alle Bemühungen, einen hochselektiven Meprin α - oder Meprin β -Inhibitor zu entwickeln, ergebnislos. Mithilfe der Röntgenkristallstruktur von Meprin β und computergestütztem, strukturbasiertem Wirkstoffdesign sollten in naher Zukunft diverse Meprin-Inhibitoren entwickelt werden können.

2 Zielsetzungen

a) Die γ -Sekretase ist ein wichtiges Target bei der Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung der Alzheimer-Demenz. Die selektive Inhibition der γ -Sekretase im amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung bzw. die Modulation des Spaltmusters hin zu kleineren A β -Peptiden werden bei der Entwicklung von Wirkstoffen angestrebt (Abb. 05). Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, neue potentielle γ -Sekretase-Modulatoren zu entwickeln und auf ihre modulatorische Wirkung bezüglich der γ -Sekretase in geeigneten Assay-Systemen untersuchen zu lassen. Anhand der erhaltenen biologischen Daten sollen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hergestellt werden. Als Ausgangspunkt der Struktur motive dienen die bereits im Arbeitskreis SCHMIDT etablierten γ -Sekretase-Modulatoren (Abb. 12).

b) Die Inhibition von FLT3 ist ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie. Einige potente FLT3-Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien (Abb. 16).^[133] Mithilfe der Röntgenkristallstruktur der Kinasedomäne von FLT3 und rationalem Wirkstoffdesign durch computergestütztes Protein/Ligand Docking konnten in der Vergangenheit diverse FLT3-Inhibitoren im Arbeitskreis SCHMIDT synthetisiert werden (Abb. 17).^[167] Die Modifikation dieser Strukturen hin zu besser löslichen Verbindungen ist wünschenswert. Durch zusätzliche Interaktionen im aktiven Zentrum des Enzyms soll die Aktivität der Verbindungen noch weiter gesteigert werden. Weiterhin sollen durch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bekannter Inhibitoren neue Struktur motive für Inhibitoren abgeleitet werden und nach erfolgreicher Synthese der Verbindungen soll die inhibitorische Wirkung auf FLT3 getestet werden.

c) Meprin α und Meprin β werden mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen assoziiert, daher ist die Inhibition dieser Enzyme bei der Wirkstoffentwicklung von großem Interesse. Anhand einer selektiven Inhibition der Enzyme können die genauen Wirkkaskaden der Enzyme untersucht werden und mögliche Targets zur Behandlung verschiedener Krankheiten gefunden werden. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mithilfe der Röntgenkristallstruktur von Meprin β , eine Datenbank von bekannten „drug-like molecules“ als potentielle Inhibitoren computergestützt in die aktive Tasche des Enzyms zu docken. Auf der Grundlage der Ergebnisse des Docking-Algorithmus sollen Rückschlüsse auf Struktur motive möglicher Meprin β -Inhibitoren gezogen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

a) Den Ausgangspunkt der Synthese von γ -Sekretase-Modulatoren bilden bereits bekannte Carbazolverbindungen, die eine modulatorische Wirkung auf die γ -Sekretase zeigen.^[100] Zunächst sollen weitere Carbazolderivate synthetisiert werden, die durch das Einführen weiterer Substituenten zu einer Aktivitätssteigerung der modulierenden Eigenschaft führen sollen und so die Grundlage einer Strukturoptimierung bilden. Auf der Suche nach einer neuen Strukturklasse werden im Anschluss daran Tocopherol-derivatisierte und -abgeleitete Verbindungen sowie Cumarinderivate synthetisiert, die auf eine modulatorische Wirkung der γ -Sekretase untersucht werden sollen.

b) Bei der Entwicklung von FLT3-Inhibitoren soll die Struktur der bereits bekannten Indolinon-abgeleiteten Inhibitoren (**40**) und (**41**) (Abb. 17) so modifiziert werden, dass die Löslichkeit sowie die Aktivität der Verbindungen (**40**) und (**41**) gesteigert werden. Weiterhin soll ein potentieller Inhibitor synthetisiert werden, der strukturell ein „Hybrid“ aus zwei bekannten FLT3-Inhibitoren darstellt.

c) Grundlage des computergestützten Dockings einer Datenbank von Molekülen in das aktive Zentrum von Meprin β bildet zunächst das Docking des bekannten Meprin-Inhibitors Actinonin (**46**). Anhand der Wechselwirkungen des Actinonins (**46**) mit spezifischen Aminosäuren im aktiven Zentrum wird ein „Pharmakophorfilter“ entwickelt, der beim folgenden Docken der Datenbank-Moleküle ähnliche Wechselwirkungen im aktiven Zentrum „erzwingt“ und Moleküle ohne ähnliche Wechselwirkungen aussortiert.

In diesem Kapitel wird zunächst abschnittsweise auf die geplanten Zielstrukturen eingegangen. Darauf folgt eine retrosynthetische Betrachtung der Syntheseplanung und im Anschluss daran die genaue Beschreibung der Synthesen. Abschließend werden die Ergebnisse der biologischen Daten dargestellt und diskutiert.

3.1 Carbazolderivate als γ -Sekretase-Modulatoren

Motiviert durch die Publikation verschiedener NSAIDs als γ -Sekretase-Modulatoren,^[89] wurde in der Arbeitsgruppe SCHMIDT in der Vergangenheit eine Vielzahl an NSAID-abgeleiteten Verbindungen hergestellt, die auf eine modulatorische Wirkung der γ -Sekretase untersucht wurden. Basierend auf der Vorarbeit von R. NARLAWAR,^[100] der die in Abb. 12 aufgeführten Carprofen- und Carbazolderivate als γ -Sekretase-Modulatoren nachweisen konnte, sollen weitere Carbazolderivate mit verschiedenen Substituenten synthetisiert werden, die als γ -Sekretase-Modulatoren in Frage kommen. Die bislang hergestellten Modulatoren weisen zum einen eine Carbonsäurefunktionalität und zum anderen einen lipophilen Alkylrest innerhalb der Struktur auf. Es wird vermutet, dass der Alkylrest sich als „Anker“ in die Membran orientiert, während die Säurefunktionalität mit Lys624 von C99 interagieren könnte (Abb. 20).^[101]

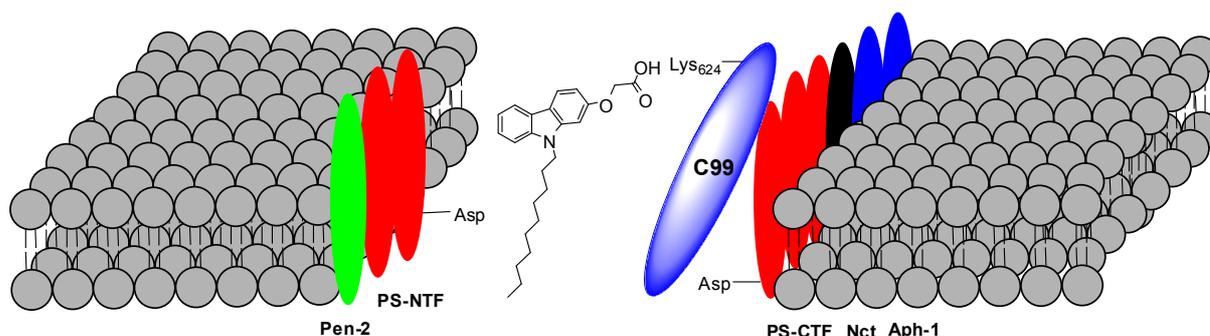


Abb. 20: Hypothese zum Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* in der Membran am Beispiel von Carbazol **30**.

Durch eine Variation der Substituenten soll die Aktivität der γ -Sekretase-modulierenden Eigenschaft der Carbazolstrukturen erhöht werden. Geplant ist das Einführen einer Aldehydfunktionalität in para-Stellung zum alkylierten Stickstoff sowie ortho-Stellung zum Säurerest des Carbazols (Abb. 21). Die Aldehydfunktionalität in der direkten Nachbarschaft zur Carbonsäure könnte, gemäß dem vermuteten Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren, eine zusätzliche Wechselwirkung mit einer Aminosäure von C99 eingehen und somit die modulierende Wirkung der γ -Sekretase erhöhen. Weiterhin soll der Alkylrest des Modulators (**30**) um eine C_2 -Einheit verkürzt werden, um somit eine geringere Lipophilie des Modulators (**52**) zu erreichen (Abb. 21). Ausgehend von Carbazol (**52**) sind viele neue Derivate durch einfache Synthesen zugänglich. So soll das Carbazol (**52**) über eine Wittig-Reaktion mit anschließender Hydrierung der Doppelbindung um eine C_2 -Einheit zur Disäure (**53**) verlängert werden (Abb. 21). Schließlich soll im Anschluss der Alkohol (**54**)

durch eine Reduktion der Aldehydfunktionalität des Carbazols (**52**) hergestellt werden (Abb. 21).

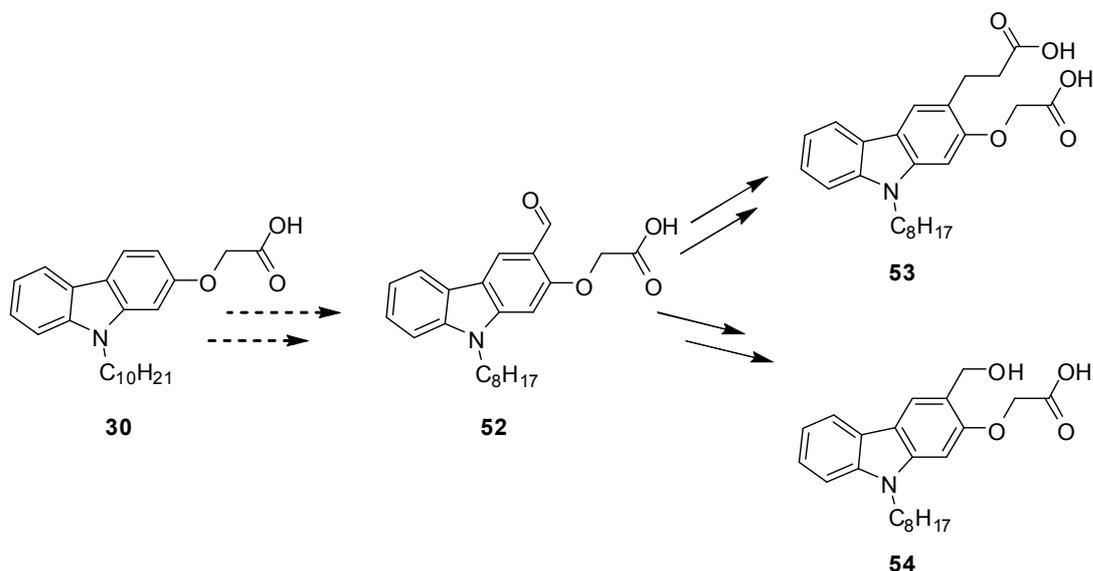


Abb. 21: Geplante Modifikation des Carbazols **30** zu Carbazol **52** und Derivatisierungsprodukte **53** und **54**.

Des Weiteren soll ein invers substituiertes Carbazolderivat (**55**) synthetisiert werden, bei welchem die Säurefunktionalität und der lipophile Alkylrest an den beiden Heteroatomen vertauscht sind (Abb. 22). Hierbei soll untersucht werden, ob der Austausch der Säurefunktionalität und des lipophilen Alkylrestes an den beiden Heteroatomen einen Einfluss auf die modulierende Wirkung der γ -Sekretase ausübt.

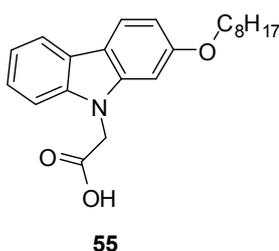


Abb. 22: Zielverbindung **55** als potentieller γ -Sekretase-Modulator.

Nach erfolgreicher Synthese und Messung der biologischen Aktivität der Carbazolderivate (**52-55**) auf die γ -Sekretase sollen Aussagen über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Verbindungen getroffen werden.

3.1.1 Synthese von Carbazol (52) – das Einführen der Aldehydfunktionalität

Zunächst wird der vor Beginn der präparativen Arbeiten erstellte Synthesepfad beschrieben, während im Folgenden über die realisierten Schritte auf dem Weg der Zielverbindung (52) berichtet wird (Abb. 23). Die Säure (52) kann aus dem Ester-geschützten Carbazol (56) generiert werden. Die Aldehyd-Funktionalität von Carbazol (56) soll über eine Vielsmeier-Reaktion aus dem entsprechenden Carbazol (57) eingeführt werden, welches ausgehend von dem *N*-alkylierten Carbazol (59) durch eine nukleophile Substitution mit Bromessigsäuremethylester (60) erhalten werden kann. Das Carbazol (59) ist über eine nukleophile Substitution von 2-Hydroxycarbazol (61) mit Octyliodid (62) zugänglich.

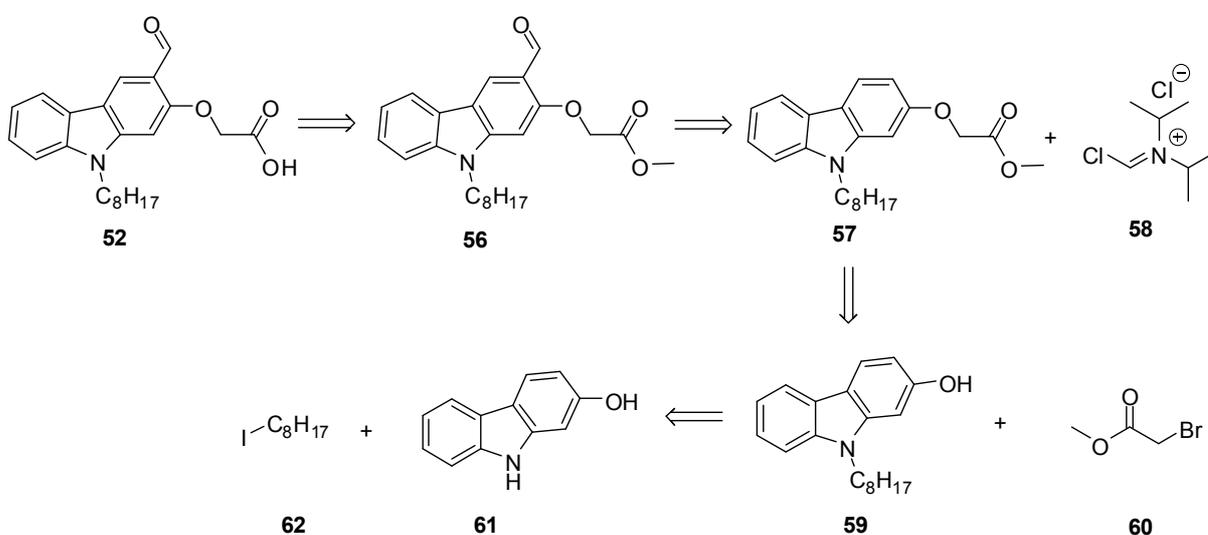


Abb. 23: Retrosynthetische Analyse von Carbazolderivat 52.

Zunächst wurde das Stickstoffatom des 2-Hydroxycarbazol (61) mit Octyliodid (62) über eine nukleophile Substitution alkyliert (Abb. 24). Die Synthese erfolgte bei -70°C unter Argon-Atmosphäre in Gegenwart von NaH in abs. THF über das Dianion des 2-Hydroxycarbazols (61). In beiden Synthesen kam es zur Dialkylierung sowie zur Sauerstoff-Alkylierung als Nebenreaktion. Die Nebenprodukte wurden säulenchromatographisch abgetrennt und das *N*-alkylierte Carbazol (59) konnte mit einer Ausbeute von 53% isoliert werden. Anschließend wurde die Hydroxygruppe des *N*-alkylierten Carbazols (59) für die weiteren Syntheseschritte durch das Einführen eines Esters geschützt, sodass im letzten Syntheseschritt die gewünschte Säurefunktionalität durch Hydrolysieren des Esters freigesetzt werden konnte (Abb. 24). Carbazol (59) wurde über eine nukleophile Substitution mit Bromessigsäuremethylester (60) in Aceton unter Zugabe von K_2CO_3 als Base umgesetzt (Abb. 24) und lieferte den Carbazolether (57) nahezu quantitativ (99 %).

Der Aldehyd wurde durch eine Vielsmeier-Formylierung eingeführt. Die Problematik der Synthese bestand darin, dass die elektronische Situation des Carbazols (**57**) die Formylierung in ortho-Stellung zwischen Stickstoffatom und Ester gegenüber der Formylierung in der gewünschten para-Position bevorzugen würde. Aus diesem Grund wurde das Vielsmeier-Reagenz nicht aus *N,N*-Dimethylformamid und POCl₃ sondern aus dem sterisch anspruchsvolleren *N,N*-Diisopropylformamid und POCl₃ hergestellt. Da das daraus entstehende Vielsmeier-Reagenz durch die zwei *i*Pr-Gruppen mehr Raum einnimmt als das klassische Vielsmeier-Reagenz, kommt es zu einer größeren Wechselwirkung mit dem Octylrest sowie mit dem Ester des Carbazols (**57**) und das sterisch anspruchsvolle Vielsmeier-Reagenz greift bevorzugt in der gewünschten para-Position an, um die Abstoßung mit den beiden Resten zu vermeiden.

Bei der Formylierungsreaktion wurden zwei verschiedene Varianten getestet. Zum einen wurde Carbazol (**57**) in Dichlorethan vorgelegt und anschließend die Vielsmeier-Reagenzien einzeln zugegeben. Nach wässriger Aufarbeitung wurde Carbazol (**56**) mit einer mäßigen Ausbeute von 66% erhalten. Zum anderen wurde zunächst das Vielsmeier-Reagenz (**58**) hergestellt und anschließend Carbazol (**57**) in Dichlorethan zugegeben (Abb. 24).^[209] Hier wurde nach wässriger Aufarbeitung Carbazol (**56**) mit einer weitaus besseren Ausbeute von 97% erhalten. Im letzten Syntheseschritt wurde das Carbazol (**56**) durch basische Esterhydrolyse zu Carbazol (**52**) umgesetzt (Abb. 24). Nach Umkristallisation aus EE konnte der Aldehyd (**52**) mit einer mäßigen Ausbeute von 35% isoliert werden.

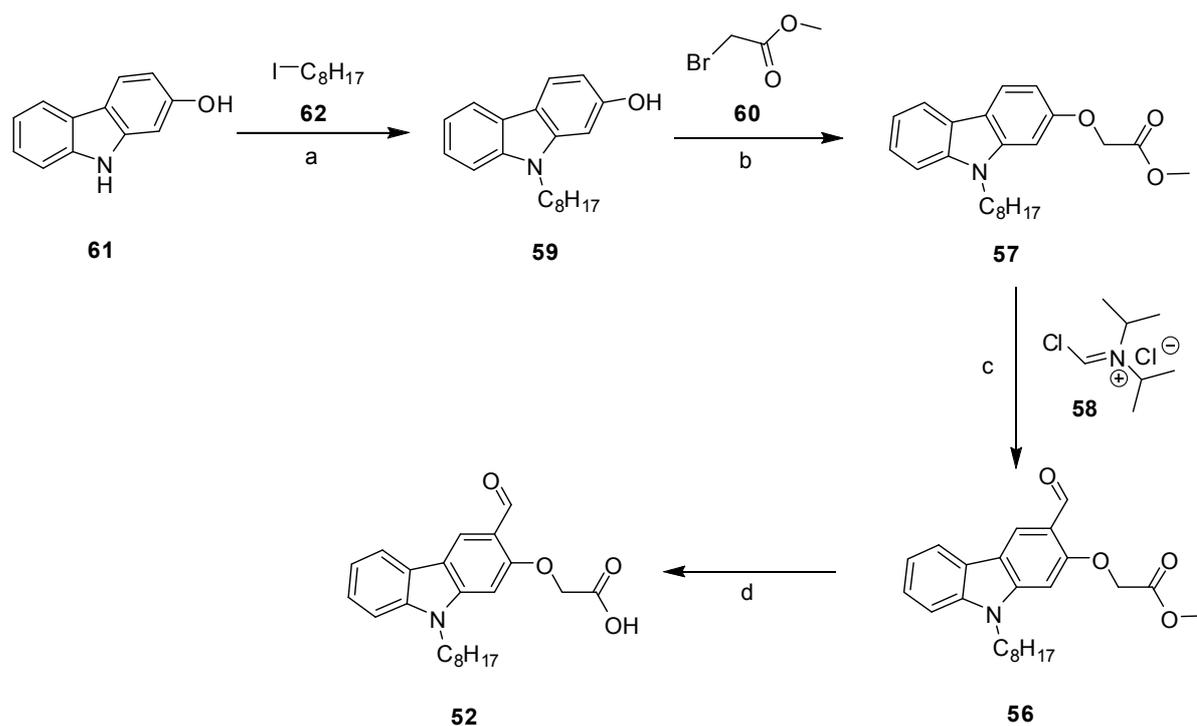


Abb. 24: Synthese von Carbazolderivat **52**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH (5 Äq), DMF, THF, -70°C , 12 h, 53%, (b) K_2CO_3 , Aceton, 60°C , 20 h, 99%, (c) DCE, $60\text{-}80^\circ\text{C}$, 48 h, 97%, (d) KOH, MeOH, RT, 24 h, 35%.

3.1.2 Synthese von Carbazol (**53**)

Nach der erfolgreichen Synthese von Carbazol (**52**) sollten weitere Carbazolderivate hergestellt werden. Der eingeführte Aldehyd bietet eine große Vielfalt an möglichen Folgereaktionen. Zunächst sollte die Carbazolstruktur (**52**) über eine Wittig-Reaktion um ein C_2 -Fragment vergrößert werden (Abb. 21). Nach der retrosynthetischen Methodenplanung kann die Disäure (**53**) aus dem entsprechenden Diester (**63**) generiert werden (Abb. 25). Der Diester (**63**) ist ausgehend von Olefin (**64**) zugänglich, welches über eine Wittig-Reaktion aus dem Aldehyd (**56**) aufgebaut werden soll. Die Synthese des Aldehyds (**56**) erfolgt in der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Weise (Abb. 24).

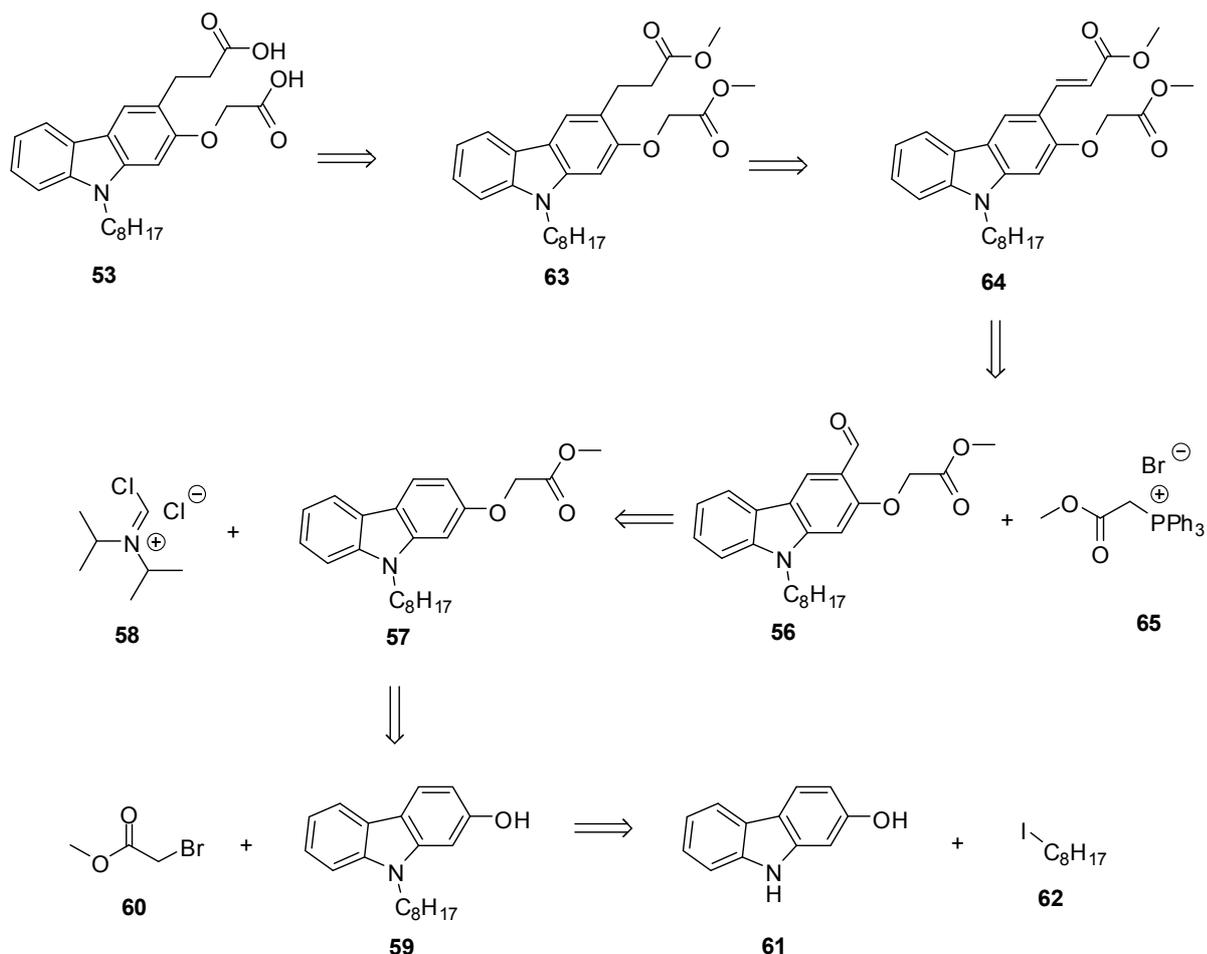


Abb. 25: Retrosynthetische Analyse von Carbazolderivat **53**.

Die Beschreibung der Disäure-Synthese (**53**) erfolgt ausgehend von Aldehyd (**56**). Carbazol (**56**) wurde mit dem Wittig-Salz (**65**) in abs. EtOH und NaOEt zu Zimtester (**66**) umgesetzt.^[210] Während der Reaktion kam es zu einer „Umesterung“ durch die Anwesenheit von EtOH als Lösungsmittel zu dem Carbazolethylester (**66**) (Abb. 26). Dagegen konnte bei einer Synthese über eine Eintopfreaktion, bei der das Phosphoniumsalz (**65**) *in situ* in der Wittig-Reaktionslösung generiert wurde, kein Produkt isoliert werden.^[211] Bei der Wittig-Synthese kommt es zu einem Selektivitätsproblem bezüglich des Produkts (**66**), da sowohl das *E*- als auch das *Z*-Olefin gebildet werden. Um dieses Selektivitätsproblem zu umgehen, wurde das Rohprodukt (**66**) mit Pd/C/H₂ in EtOH zu Carbazol (**67**) hydriert (Abb. 26). Nach der Aufarbeitung wurde Carbazol (**67**) mit einer Ausbeute von 31% erhalten (Abb. 26). Zuletzt sollte die Säure von Carbazol (**67**) freigesetzt werden. Durch basische Esterhydrolyse in methanolischer KOH-Lösung bei 64°C und anschließender wässriger Aufarbeitung wurde die Disäure (**53**) mit einer Ausbeute von 63% isoliert (Abb. 26). Das Carbazolderivat (**53**) enthält neben der Alkylkette am Stickstoffatom innerhalb des Moleküls zwei Säurefunktionalitäten. Zu beobachten ist, ob die zusätzliche Säurefunktionalität an der

Carbazolstruktur einen Einfluss auf die modulierende Wirkung der γ -Sekretase ausübt. Die zweite Carbonsäurefunktionalität in der direkten Nachbarschaft könnte ebenfalls mit einer basischen Aminosäure von C99 interagieren und die modulierende Wirkung erhöhen.

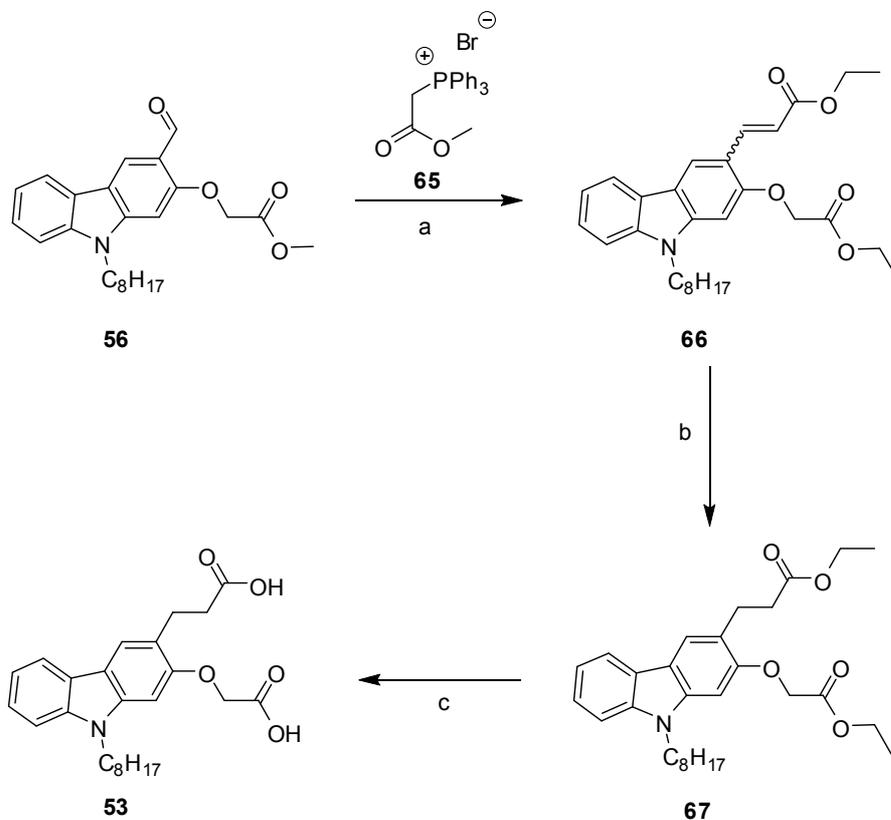


Abb. 26: Synthese von Carbazolderivat **53**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOEt, EtOH, 80°C, 12 h, (b) Pd/C/H₂, EtOH, HCl, RT, 12 h, 31%, (c) KOH, MeOH, RT/ 64°C, 24 h, 63%.

3.1.3 Synthese von Carbazol (**54**)

Weiterhin sollte die Aldehydfunktionalität von Carbazol (**52**) zum Alkohol (**54**) reduziert werden (Abb. 21). Aus der retrosynthetischen Methodenplanung in der Abbildung 27 geht hervor, dass der Alkohol (**54**) aus dem entsprechenden Ester (**68**) gewonnen werden kann. Der Ester (**68**) ist durch Reduktion des Aldehyds (**56**) zu generieren. Die Synthese des Aldehyds (**56**) erfolgt in der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Weise.

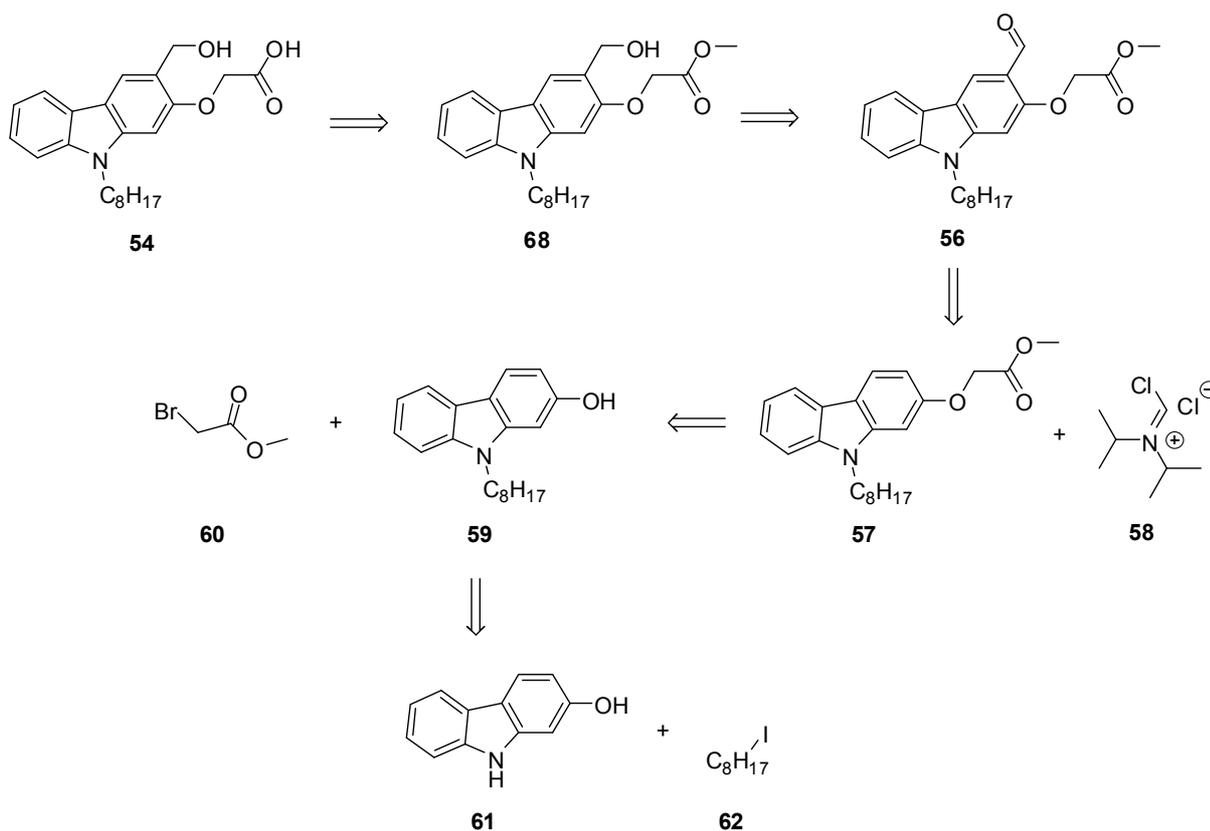


Abb. 27: Retrosynthetische Analyse von Carbazolderivat **54**.

Die Beschreibung der Synthese von Alkohol (**54**) erfolgt ausgehend von Aldehyd (**56**). Carbazol (**56**) wurde in ethanolischer Lösung mit NaBH₄ umgesetzt (Abb. 28). Nach vollständigem Umsatz an Carbazol (**56**) gelang es nicht, das gebildete Hauptprodukt nach der wässrigen Aufarbeitung zu isolieren. Deshalb wurden die Komponenten der Reaktionslösung nach dem Entfernen des Lösungsmittels direkt durch Säulenchromatographie aufgetrennt. Als Hauptprodukt konnte ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 35% isoliert werden. Die Analytik durch NMR und MS ergab, dass es sich bei dem gebildeten Hauptprodukt nicht um das gewünschte Carbazol (**68**) handelt. Neben der Aldehydfunktionalität wurde auch die benachbarte Estergruppe bis zum Alkohol (**69**) reduziert (Abb. 28). Als alternatives Reduktionsmittel wurde DIBAH eingesetzt, da es durch die beiden *i*-Butylgruppen sterisch sehr anspruchsvoll ist und dies zu einer größeren Abstoßung mit dem benachbarten Esterrest führen sollte und dieser so nicht reduziert werden sollte. Dazu wurde Carbazol (**56**) in DCM mit DIBAH umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung der verschiedenen Komponenten der Reaktionslösung konnte auch hier die Zielverbindung (**68**) nicht isoliert werden (Abb. 28). Das synthetisierte Carbazolderivat (**69**) soll alternativ als möglicher γ -Sekretase-Modulator getestet werden. Zu beobachten ist, ob die Funktionalität des Alkohols im Vergleich zur Säure einen unterschiedlichen Einfluss auf die modulierenden Eigenschaften

der γ -Sekretase hat. Nach dem vermuteten Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* würde der Verlust der Säurefunktionalität die Interaktion mit Lys624 von C99 ausschalten und dazu führen, dass die modulierende Wirkung der γ -Sekretase verloren geht.

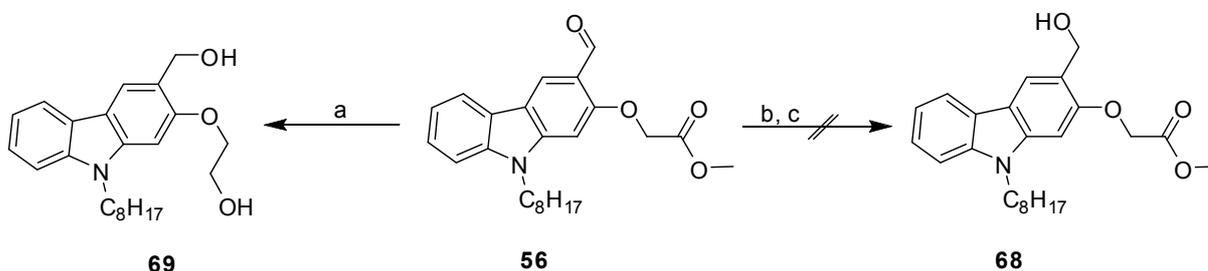


Abb. 28: Synthese von Carbazolderivat **69**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaBH_4 , EtOH, 80°C , 12 h, 35%, (b) NaBH_4 , EtOH, 80°C , 12 h, (c) DIBAH, DCM, $0^\circ\text{C}/\text{RT}$, 12 h.

3.1.4 Synthese von Carbazol (**55**)

Schließlich sollte das invers substituierte Carbazol (**55**) hergestellt werden, bei dem die Säurefunktionalität und der lipophile Alkylrest an den beiden Heteroatomen vertauscht sind. Die retrosynthetische Methodenplanung von Carbazol (**55**) sieht vor das Carbazol (**55**) aus dem geschützten Ester (**70**) zu generieren. Der Ester (**70**) ist durch eine nukleophile Substitution aus dem Sauerstoff-alkylierten Carbazol (**71**) zugänglich, welches ausgehend von 2-Hydroxycarbazol (**61**) und Octyliodid (**62**) generiert werden kann (Abb. 29).

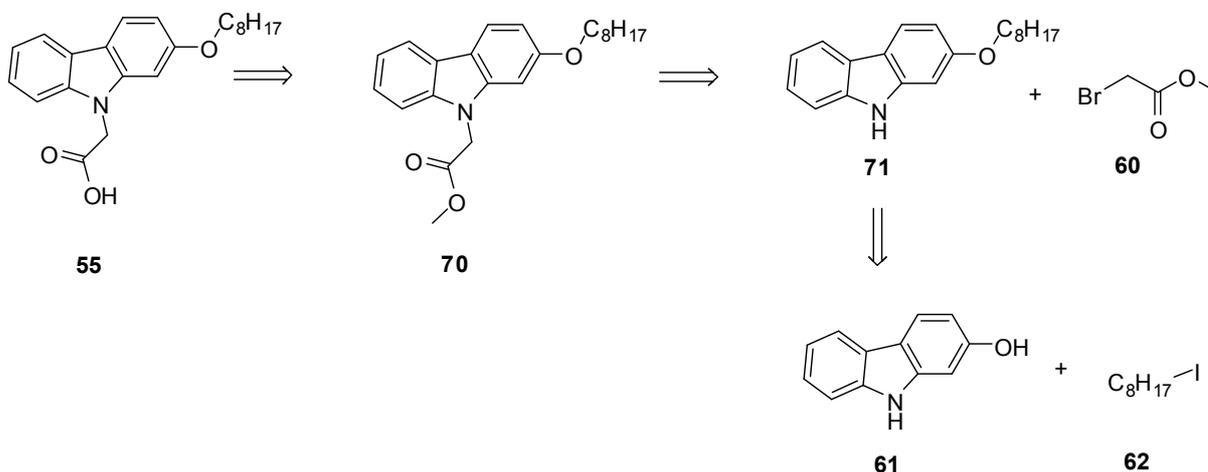


Abb. 29: Retrosynthetische Analyse von Carbazolderivat **55**.

Das 2-Hydroxycarbazol (**61**) wurde mit Octyliodid (**62**) durch eine nukleophile Substitution bei -70°C in THF/DMF zu Carbazol (**71**) umgesetzt. Nach der Aufarbeitung konnte das Carbazol (**71**) mit einer Ausbeute von 25% isoliert werden (Abb. 30). Das Carbazolderivat (**71**) reagierte mit Bromessigsäuremethylester (**60**) in Aceton unter Zugabe

von K_2CO_3 zu Ester (**70**) mit einer sehr guten Ausbeute von 97% (Abb. 30). Im letzten Schritt konnte die Säure (**55**) durch KOH in methanolischer Lösung mit einer guten Ausbeute von 80% freigesetzt werden (Abb. 30).

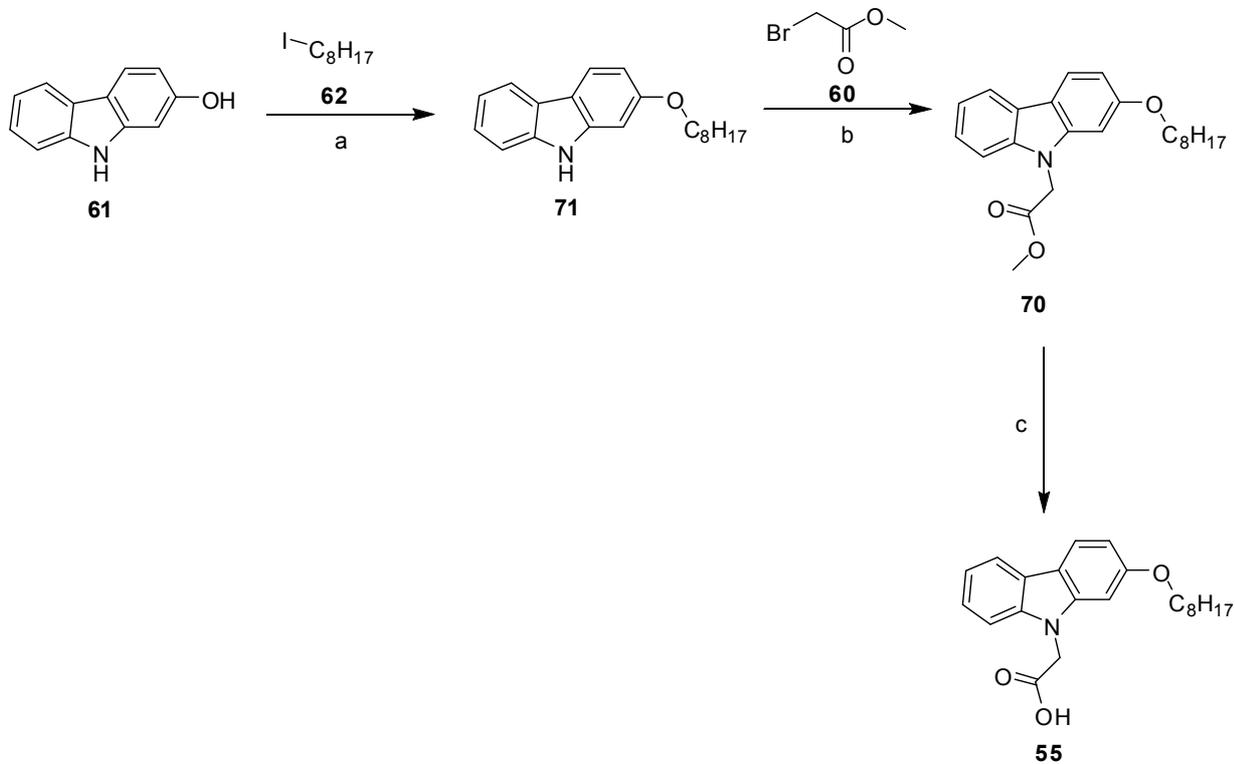


Abb. 30: Synthese von Carbazolderivat **55**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH (1.3 Äq.), DMF, THF, $-70^\circ C$, 12 h, 25% (b) K_2CO_3 , Aceton, $60^\circ C$, 20 h, 97%, (c) KOH, MeOH, RT, 24 h, 80%.

3.1.5 Zusammenfassung der Carbazolderivate

Die Abbildung 31 zeigt die während dieser Arbeit synthetisierten Carbazolderivate, die *in vitro* auf ihre Wirkung bezüglich der γ -Sekretase untersucht wurden. Daneben stellt Tabelle 1 die Ausbeute, Reinheit (HPLC), die clogP-Werte sowie die tPSA-Werte der synthetisierten Carbazolverbindungen dar.

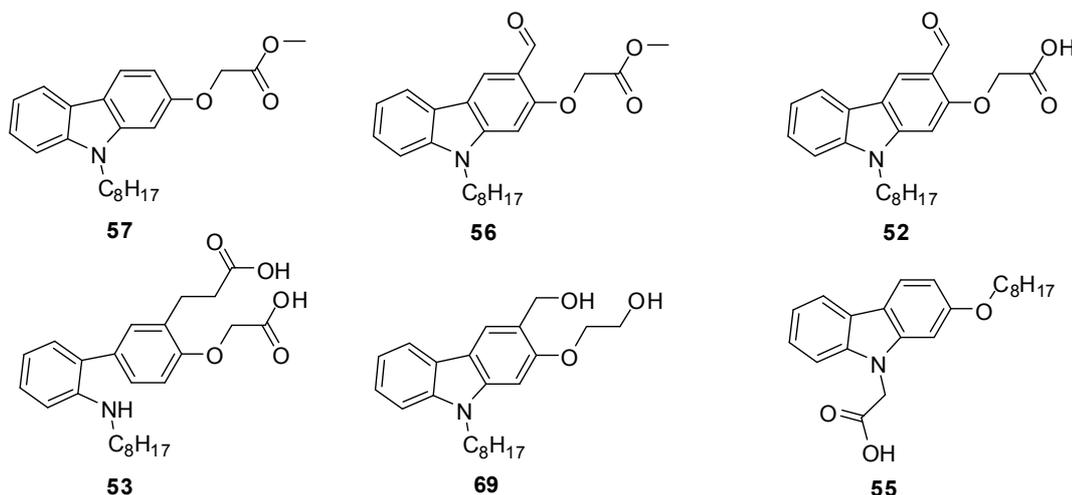


Abb. 31: Synthetisierte Carbazolderivate **57**, **56**, **52**, **53**, **69** und **55** als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren.

Mithilfe der berechneten clogP- und tPSA-Werte lassen sich Aussagen über die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen treffen. Der clogP-Wert ist ein Verteilungskoeffizient, der das Verhältnis einer Substanz in einem Oktanol/Wasser-Gemisch angibt. Der tPSA-Wert (*topological polar surface area*) gibt die Summe der polaren Oberflächen eines Moleküls an. Beide Größen erlauben eine Einschätzung der oralen Verfügbarkeit und Hirngängigkeit einer Substanz. Studien zufolge liegt der tPSA-Wert von hirngängigen Pharmaka bei unter 70 \AA^2 bei anderen Medikamenten bei unter 120 \AA^2 . Der clogP-Wert dagegen sollte unter 5 liegen.^[212-214] Demnach sind die synthetisierten Carbazolverbindungen wahrscheinlich zu lipophil, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, dennoch liegen sie in einem „akzeptablen“ Bereich (Tab. 1).

Tab. 1: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Carbazolderivate **57**, **56**, **52**, **53**, **69** und **55**.

Verbindung	BSc-Nummer	Ausbeute [%] ^a	HPLC-Reinheit [%]	clogP ^b	tPSA ^b
57	4028	99	99	7.4	38.8
56	4038	97	98	6.9	55.8
52	4041	35	98	6.7	66.8
53	4050	63	93	6.8	87.1
69	4048	35	87	5.8	52.9
55	4037	80	97	7.1	49.8

^a Ausbeute bezogen auf die letzte Stufe

^b clogP- und tPSA-Werte berechnet mit ChemDraw 10.0

3.1.6 Biologische Aktivität der Carbazolderivate

Die Carbazolverbindungen (Abb. 31) wurden bei Hoffmann La Roche in der Arbeitsgruppe von DR. KARLHEINZ BAUMANN in einem zellulären A β -Assay untersucht. Es wurde eine aus menschlichen H4-Zellen APP-überexprimierende Zelllinie verwendet. Mithilfe eines LPECL-Assays (*liquid phase electrochemoluminescence*) wurden die verschiedenen A β -Isoformen A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ bestimmt.^[215] Aus Wettbewerbsgründen können in dieser Arbeit nur die IC₅₀-Werte von A β ₄₂ gezeigt werden (Tab. 2).

Tab. 2: Biologische Aktivität der Carbazolderivate **57**, **56**, **52**, **53**, **69** und **55** auf die γ -Sekretase.

Verbindung	BSc-Nummer	Zelltoxizität [μ M] ^a	IC ₅₀ (A β ₄₂) [μ M]	Eigenschaft
57	4028	>80	27	Modulator
56	4038	>80	89	Inhibitor
52	4041	80	32	Modulator
53	4050	>80	>80	nicht aktiv
69	4048	>80	80	nicht aktiv
55	4037	80	28	Modulator

^a Konzentration mit signifikanter Zelltoxizität

Ester (**57**) ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 27 \mu M$) und das inverse Carbazol (**55**) ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 28 \mu M$) sind recht potente γ -Sekretase-Modulatoren. Die Aktivität der zu modifizierenden Ausgangsverbindung (**30**) (Abb. 12) jedoch konnte nicht gesteigert werden ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 11 \mu M$), sodass durch den Austausch der beiden Reste (Alkylrest, Säurefunktionalität) zwischen den Heteroatomen am Carbazol keine Verbesserung der modulierenden Wirkung erreicht werden konnte. Allerdings scheint der Austausch der Funktionalitäten an den beiden Heteroatomen die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase nicht auszuschalten. Die Hypothese zum Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* lässt sich auch auf das inverse Carbazol (**55**) übertragen. Auch hier könnte der lipophile Alkylrest zur Orientierung in der Membran beitragen, während die Säurefunktionalität mit Lys624 interagiert (Abb. 32). Das Carbazolgerüst wäre im Vergleich zu dem ursprünglich betrachteten Carbazol (**30**) um 90° gedreht.

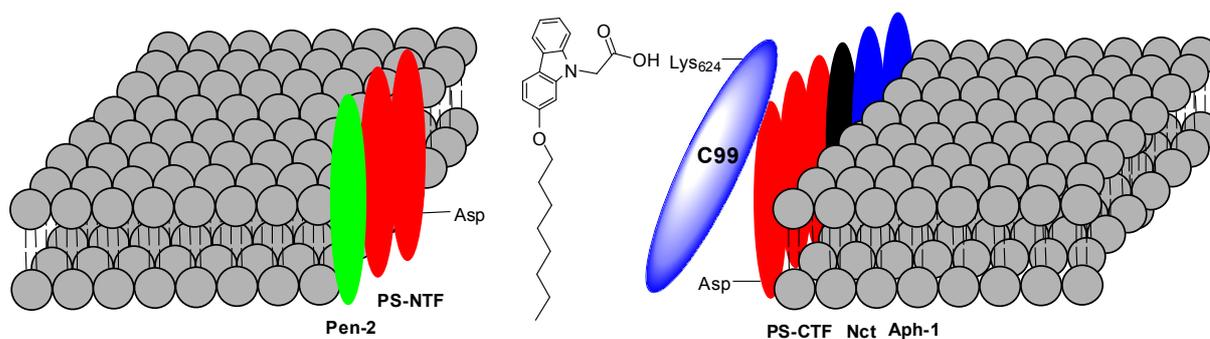


Abb. 32: Hypothese zum Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* in der Membran am Beispiel des inversen Carbazols **55**.

Zu überprüfen wäre, ob die modulierende Wirkung durch das Einführen weiterer Substituenten auf das inverse Carbazol (**55**) optimiert werden kann. Das Einführen einer Aldehydfunktionalität auf das Carbazolgerüst führt nicht zu einer Verbesserung der modulierenden Eigenschaft. Der Aldehyd (**52**) ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 32 \mu M$) ist nur noch ein schwacher γ -Sekretase-Modulator und scheint keine zusätzliche Interaktion mit einer Aminosäure von C99 eingehen zu können, die zu einer besseren modulierenden Eigenschaft führt. Die weitere Derivatisierung von Carbazol (**52**) und das Einführen einer weiteren Säurefunktionalität zu Carbazol (**53**) führt zum Verlust der modulierenden Eigenschaft. Die zweite Säurefunktionalität scheint keine Wechselwirkung mit dem γ -Sekretase-Komplex ausbilden zu können, wie erhofft wurde. Durch die Reduktion von Carbazol (**52**) zu dem Alkohol (**69**) geht die modulierende Eigenschaft des Carbazols (**52**) verloren, was die Vermutung weiter bestätigt, dass eine Säurefunktionalität innerhalb des Moleküls für die

Modulation der γ -Sekretase wichtig zu sein scheint. Insgesamt unterstützen die Assay-Ergebnisse die aufgestellte Hypothese zum Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* Es konnte gezeigt werden, dass eine Säurefunktionalität in Verbindung mit einem lipophilen Alkylrest für die modulierende Wirkung der γ -Sekretase essentiell ist. Dies wird untermauert durch die modulierende Wirkung des inversen Carbazols (**55**) und dem Verlust der modulierenden Eigenschaft von Alkohol (**69**). Die modulierende Wirkung von Ester (**57**) wird auf einen *pro-drug*-Mechanismus zurückgeführt. Es wird angenommen, dass der Ester (**57**) im zellulären Assay-Experiment zur entsprechenden Carbonsäure freigesetzt wird und so die modulierende Eigenschaft zustande kommt. Diese Vermutung müsste im Folgenden durch weitere Experimente überprüft werden. Die Aldehydfunktionalität von Carbazol (**52**) könnte eine starke Wechselwirkung mit einer Aminosäure von C99 ausbilden, die möglicherweise die Interaktion der Carbonsäure mit Lys624 und so die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase schwächt. Die Wechselwirkungen der zweiten Säurefunktionalität innerhalb der Membran von der Disäure (**53**) führen scheinbar dazu, die Interaktion der Carbonsäure mit Lys624 vollständig zu verhindern und so die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase auszuschalten.

3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, verschiedene Carbazolderivate zu synthetisieren und auf ihre modulierende Wirkung gegenüber der γ -Sekretase testen zu lassen. Einige zeigten *in vitro* eine Modulation der γ -Sekretase. Dennoch konnten keine neuen Verbindungen hergestellt werden, die die Aktivität im Vergleich zu den bekannten γ -Sekretase-Modulatoren der Arbeitsgruppe SCHMIDT optimieren konnten (Abb. 12). Die Derivatisierung des Benzenrings in ortho-Stellung zur Hydroxygruppe des 2-Hydroxycarbazols (**61**) scheint also die modulierende Wirkung der γ -Sekretase nicht zu verbessern. Es wird vermutet, dass die mögliche Interaktion der Carbonsäurefunktionalität mit Lys624 durch das Einführen weiterer Substituenten in der direkten Nachbarschaft gestört wird. Das Einführen von verschiedenen Substituenten an der gegenüberliegenden Seite des Carbazol-Gerüsts könnte eine weitere Strategie sein, die Aktivität der Carbazolderivate zu optimieren (Abb. 33). Sinnvoll wäre es, polare Substituenten einzuführen, die auch die clogP- und tPSA-Werte senken würden, um weiterhin die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen zu verbessern. Auch das inverse Carbazol (**55**) ist ein aussichtreicher γ -Sekretase-Modulator, der durch Derivatisierung durch das Einführen polarer Substituenten optimiert werden könnte (Abb. 33). Möglicherweise kommt es bei diesen Carbazolderivaten zu Wechselwirkungen zwischen den

neu eingeführten Substituenten und der Membran, welche die vermutete Interaktion der Carbonsäurefunktionalität mit Lys624 nicht stören oder sogar zusätzlich verstärken und somit die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase verbessern.

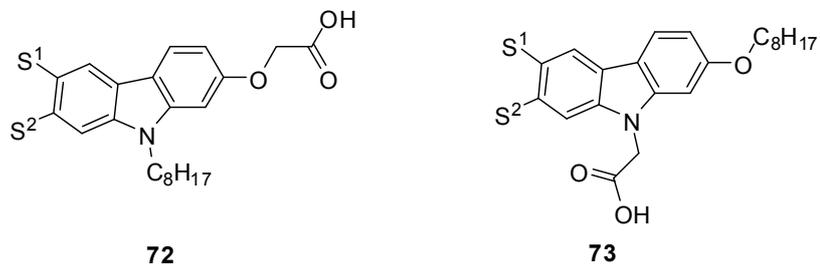


Abb. 33: Mögliche Derivatisierung des Carbazol-Gerüsts, S¹ und S²: polare Substituenten.

3.2 Tocopherol-derivatisierte und –abgeleitete γ -Sekretase-Modulatoren

Tocopherol (Vitamin E) gehört zu den lipophilen Vitaminen und ist im Menschen in allen Zellmembranen enthalten.^[216] Es gibt acht natürlich vorkommende Tocopherole, die unter anderem in pflanzlichen Ölen, Gemüse oder auch Nüssen enthalten sind und somit über die Nahrung aufgenommen werden. Tocopherol ist ein Antioxidans und kann im zellulären Assay Zellmembranen vor oxidativem Schaden durch freie Radikale schützen.^[216] Es gibt Hinweise darauf, dass oxidativer Stress beim Auftreten einer Alzheimer-Erkrankung eine Rolle spielt.^[217] Nach dieser Hypothese soll die Alzheimer-Erkrankung die Folge eines beschleunigten Alterungsprozesses in bestimmten Hirnregionen sein, der durch oxidativen Stress verursacht wird. Nach dieser Theorie liegt es nahe, Antioxidantien wie Tocopherol als Therapeutika von AD oder auch als Präventivmaßnahme zu untersuchen. In der Vergangenheit wurde diesbezüglich eine Vielzahl an Studien durchgeführt.^[216, 218, 219] Studien zeigten, dass das LPO-Level (Lactoperoxidase), ein Marker für oxidativen Stress, bei AD-Patienten signifikant erhöht ist.^[220] Weiterhin unterstützten verschiedene Studien die Theorie, dass der Tocopherol-Spiegel im Blut und in der Zerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten niedriger ist als im gesunden Menschen.^[221, 222] Andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Tocopherol-Level und einer Alzheimer-Erkrankung nachweisen.^[223] Eine Vielzahl an Langzeitstudien wurde getätigt, in welchen der Einfluss auf die kognitive Funktion bei der Verabreichung von Tocopherol über mehrere Jahre untersucht wurde. Auch hier kamen verschiedene Studien zu keinem konsistenten Ergebnis. Zum Teil zeigten Studien bei der Therapie mit Tocopherol eine Verbesserung der kognitiven Funktionen, andere Studien wiederum konnten keinen Effekt beobachten.^[216, 218, 224] *R, R, R*- α -Tocopherol (**74a**) (Abb. 34) ist das in allen Geweben am häufigsten vorkommende Vitamin E-Isomer, dessen hydrophobe Eigenschaft die Absorption und den Transport im wässrigen Medium erschwert. Daher wird es als Assoziat mit verschiedenen Lipoproteinen durch den Blutkreislauf transportiert.^[225] EPR- und Fluoreszenz-Experimenten zufolge verankert sich der Alkylrest des *R, R, R*- α -Tocopherols (**74a**) in der Zellmembran innerhalb der Phospholipiddoppelschicht, während der Chromanteil mit der enthaltenen Hydroxygruppe sich in Richtung der Lipid/Wasser-Grenzfläche orientiert.^[226-229] Innerhalb der Zellmembran kann *R, R, R*- α -Tocopherol (**74a**) durch die Bildung von Assoziaten mit destabilisierenden Membrankomponenten (freie Fettsäuren, Lysophospholipide) zu einer Stabilisierung der Membran beitragen.^[230, 231] Natürlich vorkommendes *R, R, R*- α -Tocopherol (**74a**) und synthetisches *all-rac*- α -Tocopherol (**74b**) sind nicht toxische und verfügbare Substanzen, die sich aufgrund dessen als Therapeutika anbieten (Abb. 34). Die Struktur der

α -Tocopherole (**74a-b**) mit dem lipophilen Alkylrest und der Benzengrundstruktur erinnern entfernt an die in Kapitel 3.1 beschriebenen Carbazole, die eine γ -Sekretase modulierende Wirkung zeigten (Abb. 34, Abb. 31). Ziel dieser Arbeit ist es, Tocopherol-derivatisierte und strukturell abgeleitete Verbindungen herzustellen, die als γ -Sekretase-Modulatoren in Frage kommen. Als Ausgangsverbindungen dienen hierbei das *R, R, R*- α -Tocopherol (**74a**) und das synthetische *all-rac*- α -Tocopherol (**74b**) sowie ein strukturell verwandtes Chroman (**75**) (Abb. 34).

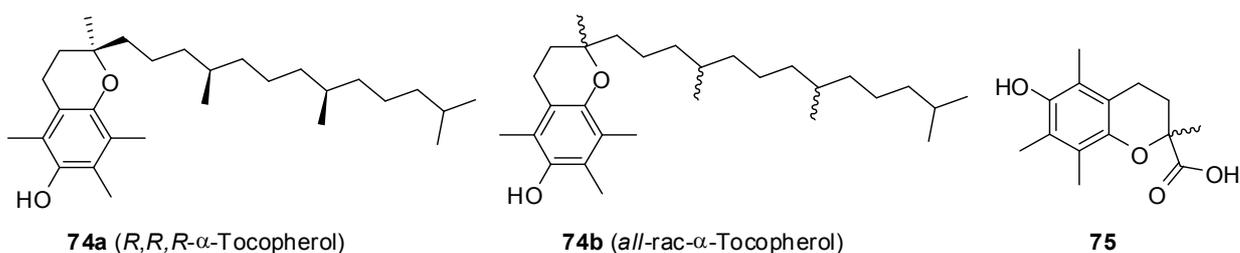


Abb. 34: Zu derivatisierende Ausgangsverbindungen als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren.

3.2.1 Synthese der Tocopherolderivate (**76a-b**) als γ -Sekretase Modulatoren

Die Struktur motive der α -Tocopherole (**74a-b**) stellen gute Ausgangsverbindungen für potentielle γ -Sekretase-Modulatoren dar. Im Falle der α -Tocopherole (**74a-b**) ist bekannt, dass der lipophile Alkylrest zu einer Verankerung in der Membran beiträgt,^[228] wie es auch für den Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* vermutet wird (Abb. 20). Die zur Modulation der γ -Sekretase benötigte Säurefunktionalität dagegen ist „von Natur aus“ nicht gegeben und soll im Folgenden auf die α -Tocopherole (**74a-b**) eingeführt werden. Es sollen zunächst die Säurederivate (**76a-b**) hergestellt werden und auf ihre modulatorische Wirkung gegenüber der γ -Sekretase getestet werden (Abb. 35).

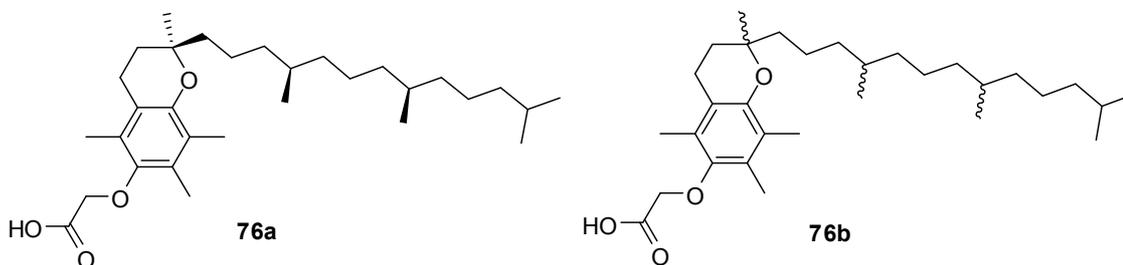


Abb. 35: Zielstrukturen **76a-b** der zu derivatisierenden α -Tocopherole **74a-b**.

Die retrosynthetische Analyse der Tocopherolderivate (**76a-b**) zeigt, dass die α -Tocopherolderivate (**76a-b**) leicht über aus den entsprechenden Estern (**77a-b**) gewonnen

werden können, die über eine nukleophile Substitution am phenolischen Sauerstoff aus den α -Tocopherolen (**74a-b**) zugänglich sind (Abb. 36, Tab. 3).

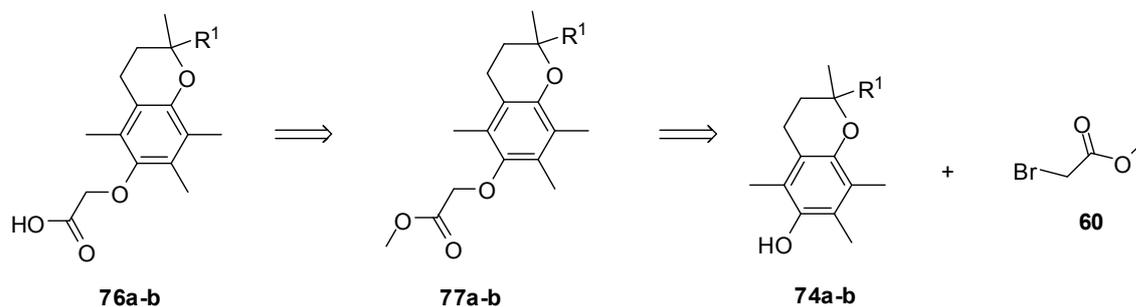


Abb. 36: Retrosynthetische Analyse der Tocopherolderivate **76a-b**, R^1 definiert in Tabelle 3.

Tab. 3: Definition der Substituenten R^1 .

Verbindung	R	Substituent
76a, 77a, 74a	R^1	
76b, 77b, 74b	R^1	

Zunächst erfolgte die Umsetzung von (**74a-b**) mit Bromessigsäuremethylester (**60**) unter Zugabe von NaH im stark basischen Milieu bei RT (Abb. 37). Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnten die Ester (**77a-b**) in sehr guten Ausbeuten (94%) als farblose Öle isoliert werden. Im Anschluss wurden die Ester (**77a-b**) durch basische Esterhydrolyse in Dioxan/Wasser bei 75°C zu den Zielverbindungen (**76a-b**) umgesetzt (Abb. 37). Auch hierbei konnten sehr gute Ausbeuten von 94-95% erzielt werden.

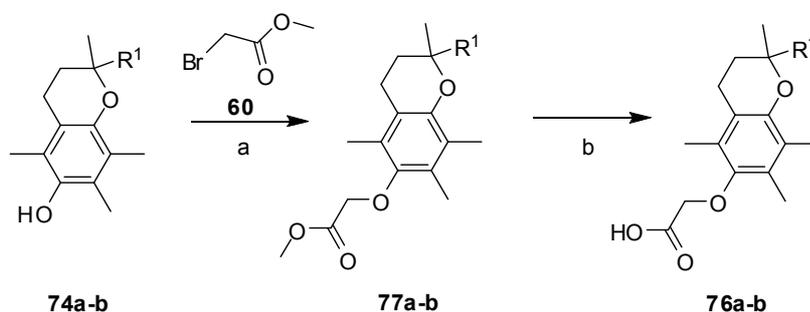


Abb. 37: Synthese der Tocopherolderivate **76a-b**, Definition des Restes R^1 siehe Tabelle 3. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH, DMF, RT, 8 h, 94%, (b) KOH, Dioxan/Wasser, 75°C, 2-12 h, 94-95%.

Die hergestellten Tocopherolderivate (**76a-b**) sollen auf die Wirkung gegenüber der γ -Sekretase untersucht werden. Bei den Verbindungen (**76a-b**) soll vor allem der Einfluss der unterschiedlich konfigurierten Methylgruppen auf die modulatorische Wirkung der γ -Sekretase hin beobachtet werden.

3.2.2 Synthese der Chromanverbindungen (**78a-e**) und (**79a-e**)

Die Chromanstruktur (**75**) (Abb. 34) weist eine Tocopherol-ähnliche Struktur auf. Auch hier sollen durch verschiedene Derivatisierungen der Chromanstruktur (**75**) potentielle γ -Sekretase-Modulatoren synthetisiert werden. Zum einen sollen auf den phenolischen Sauerstoff der Chromanstruktur (**75**) verschiedene Alkylsubstituenten eingeführt werden (Abb. 38), sodass die Chromanderivate (**78a-e**) auch wiederum das „spezifische Muster“ der Säure- sowie Alkylfunktionalität aufweisen, das bei, bisher im Arbeitskreis SCHMIDT bekannten, γ -Sekretase-Modulatoren auftritt.

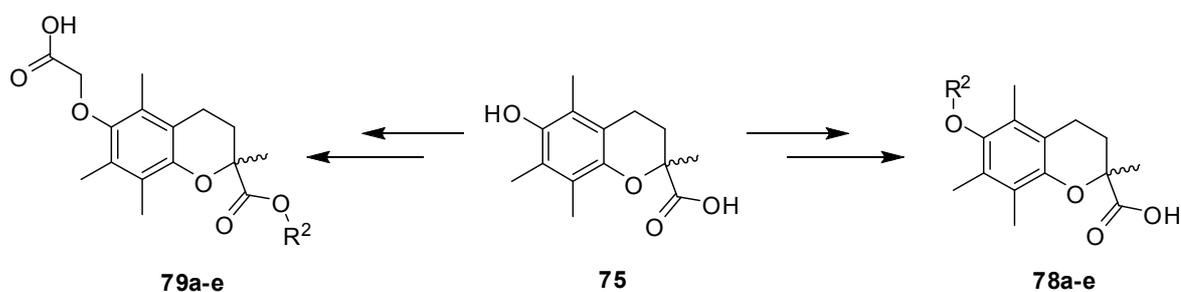
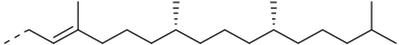
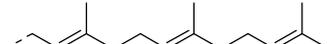


Abb. 38: Geplante Derivatisierungen an Chroman **75** zu den Derivaten **78a-e** und **79a-e**.

Des Weiteren soll eine zweite Derivateserie (**79a-e**) hergestellt werden, bei welcher die Säure- bzw. Alkylfunktionalität innerhalb des Moleküls gegenüber der ersten Derivateserie (**78a-e**) vertauscht ist (Abb. 38). Hierbei soll untersucht werden, ob der Austausch der funktionellen Gruppen innerhalb der Chromanstruktur die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase beeinflusst. Die eingeführten Reste R² sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt. Neben unverzweigten Alkylresten von C₈-C₁₄ sollen auch terpenartige verzweigte Alkylreste eingeführt werden.

Tab. 4: Definition der Substituenten R².

Verbindung ^a	R	Substituent
-a	R ²	
-b	R ²	
-c	R ²	
-d	R ²	
-e	R ²	

^a Die Substituenten beziehen sich auf alle Verbindungen in Kapitel 3.2 mit den entsprechenden Indices a-e

Im Folgenden wird zunächst die Synthese der Derivateserie (**78a-e**) erläutert. Aus der retrosynthetischen Betrachtung der Derivateserie (**78a-e**) ergibt sich, dass die Chromanderivate (**78a-e**) durch eine einfache O-Alkylierung hergestellt werden können, wobei die Säurefunktionalität von Chroman (**75**) während der Synthese als Ester zu schützen ist (Abb. 39).

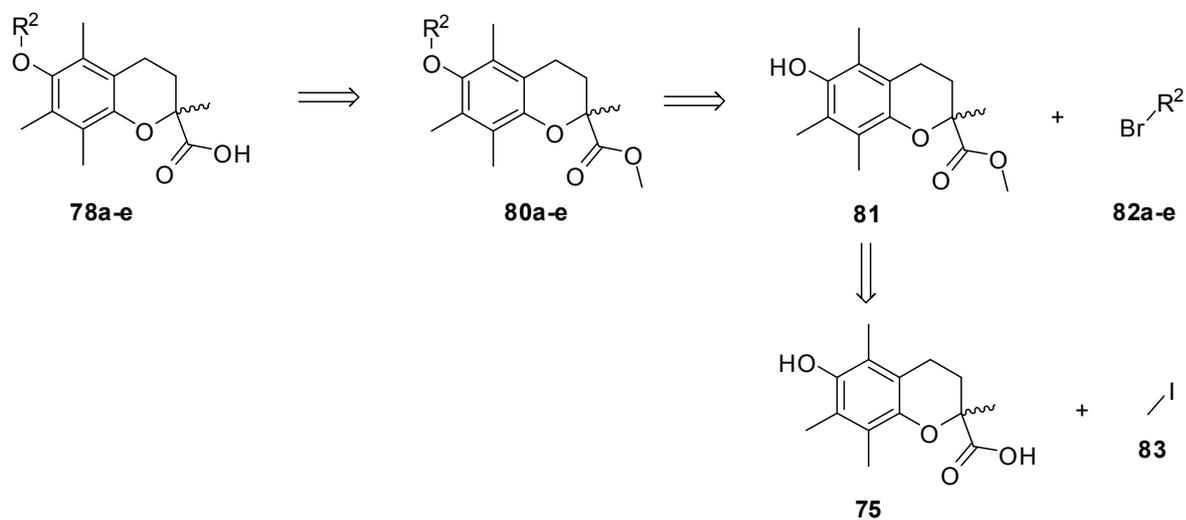


Abb. 39: Retrosynthetische Analyse der Derivateserie **78a-e**, R² definiert in Tabelle 4.

Das Chroman (**75**) wurde unter Zugabe von K₂CO₃ mit MeI (**83**) bei RT umgesetzt und Chroman (**81**) konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 95% als farbloser Feststoff gewonnen werden (Abb. 40). Im Anschluss erfolgte die Alkylierung des phenolischen Sauerstoffs mit den entsprechenden Alkylbromiden (**82a-e**). Die Substitution fand in basischer Lösung bei einer Reaktionstemperatur von 100°C statt und nach wässriger

Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnten die entsprechenden Chromanmethylester (**80a-e**) in unterschiedlichen Ausbeuten von 37-94% isoliert werden (Abb. 40). Bei dieser Reaktionsstufe fiel auf, dass die Alkylierung des Chromans (**81**) mit den verzweigten Alkylbromiden (**82d-e**) weitaus schlechtere Ausbeuten lieferte als die mit den unverzweigten Alkylbromiden (**82a-c**). Bei der Umsetzung mit den verzweigten Alkylbromiden (**82d-e**) entstand jeweils ein Nebenprodukt, das säulenchromatographisch abgetrennt wurde aber dessen Struktur nicht bestimmt wurde. Die Alkylbromide (**82a-c**) wurden kommerziell erworben, währenddessen die verzweigten Alkylbromide (**82d-e**) durch eine Bromierung mit PBr_3 bei 0°C in Hexan/Pyridin aus den Alkoholen (**84d-e**) mit sehr guten Ausbeuten von 90-95% generiert wurden (Abb. 40). Im letzten Schritt wurden die Ester (**80a-e**) mit KOH in Dioxan/Wasser zu den Säuren (**78a-e**) umgesetzt.

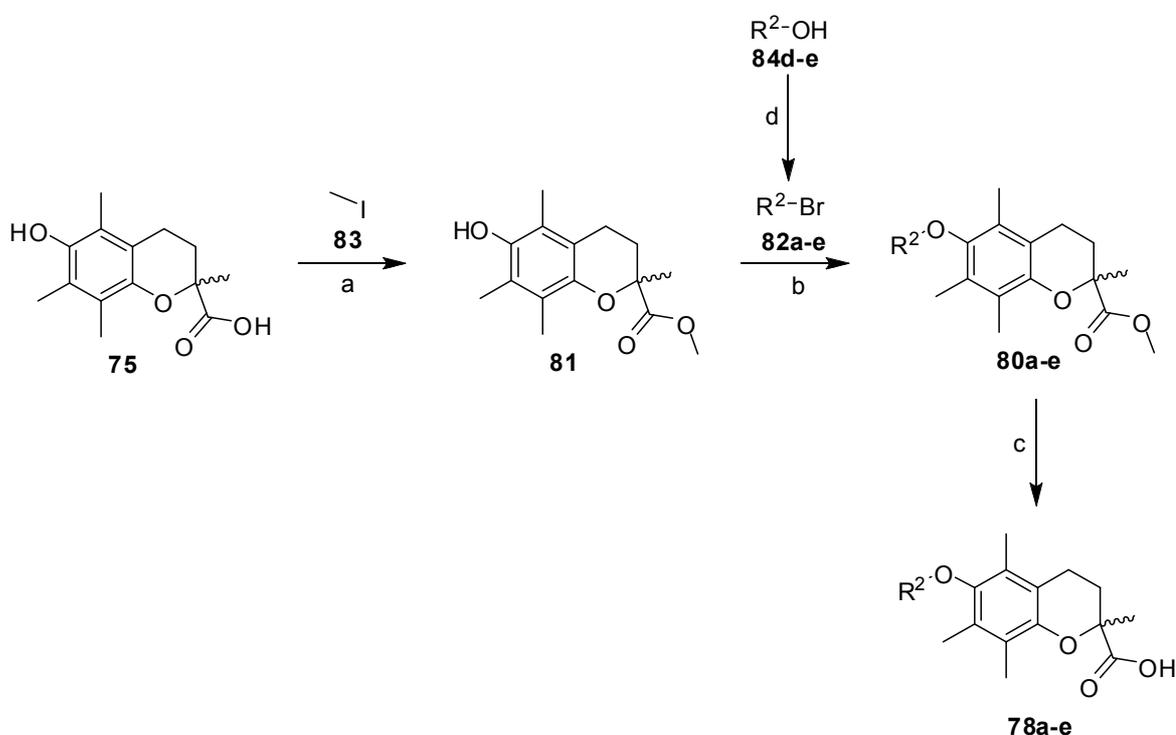


Abb. 40: Synthese der Chromane **78a-e**. Reagenzien und Bedingungen: (a) K_2CO_3 , DMF, RT, 30 min., 95%, (b) Cs_2CO_3 , DMF, 100°C , 6 h, 37-94%, (c) KOH , Dioxan/Wasser, 75°C , 4 h, 33-88%, (d) PBr_3 , Hexan, Pyridin, 0°C , 3 h, 90-95%, R^2 definiert in Tabelle 4.

Im nächsten Abschnitt wird die Syntheseplanung und -durchführung der zweiten Serie an Chromanderivaten (**79a-e**) beschrieben. Die retrosynthetische Analyse zeigt, dass die Chromanderivate (**79a-e**) auch über eine Alkylierung aus den Estern (**86a-e**) hergestellt werden können, die wiederum aus Chroman (**75**) zugänglich sind (Abb. 41). Bei dieser

Derivateserie (**79a-e**) sollen dieselben lipophilen Alkylsubstituenten eingeführt werden wie bei der Derivateserie (**78a-e**) (Tab. 4).

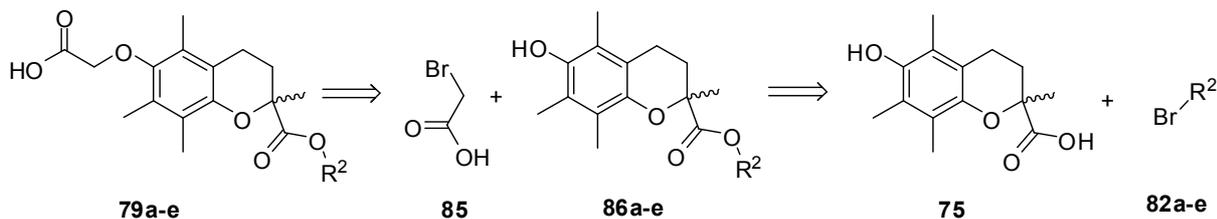


Abb. 41: Retrosynthetische Analyse der zweiten Derivateserie **79a-e**, R^2 definiert in Tabelle 4.

Zunächst wurde das Chroman (**75**) mit den entsprechenden Alkylbromiden (**82a-e**) zu den Estern (**86a-e**) umgesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe von K_2CO_3 bei RT und die Ester (**86a-e**) konnten in sehr guten Ausbeuten (91-97%) direkt nach der wässrigen Aufarbeitung isoliert werden (Abb. 42). Anschließend erfolgte die Substitution des phenolischen Sauerstoffs mit Bromessigsäure (**85**) zu den Chromanderivaten (**79a-e**) bei RT unter Zugabe von NaH. Die Chromanderivate (**79a-e**) konnten in moderaten bis guten Ausbeuten (53-87%) gewonnen werden (Abb. 42).

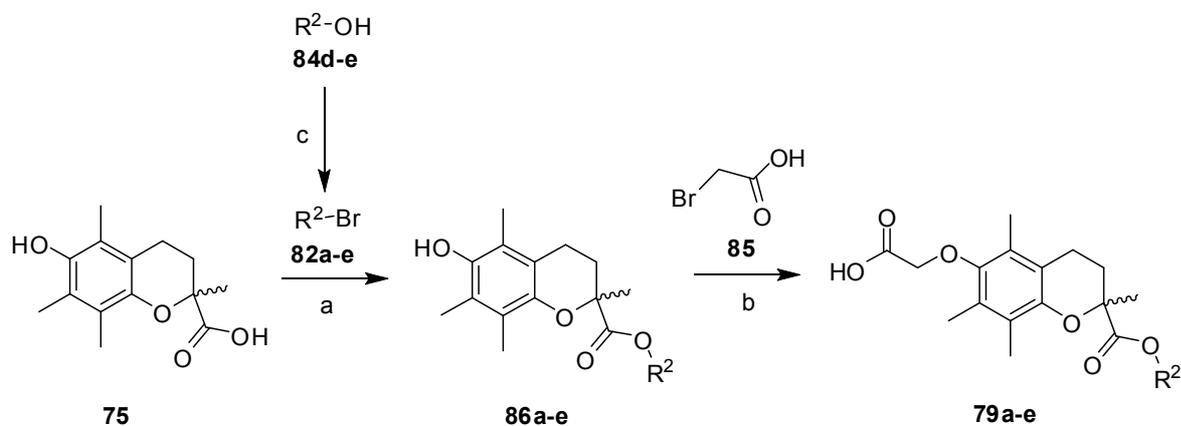


Abb. 42: Synthese der Chromane **79a-e**. Reagenzien und Bedingungen: (a) K_2CO_3 , DMF, RT, 8 h, 91-97%, (b) NaH, THF, RT, 12 h, 53-87%, (c) PBr_3 , Pyridin, Hexan, $0^\circ C$, 3 h, 90-95%, R^2 definiert in Tabelle 4.

3.2.3 Zusammenfassung der Tocopherolderivate und Chromanderivate

In den folgenden Abbildungen 43a-b sind alle während dieser Arbeit hergestellten Tocopherolderivate und Chromanderivate dargestellt, die auf ihre γ -Sekretase-modulatorische Wirkung getestet wurden.

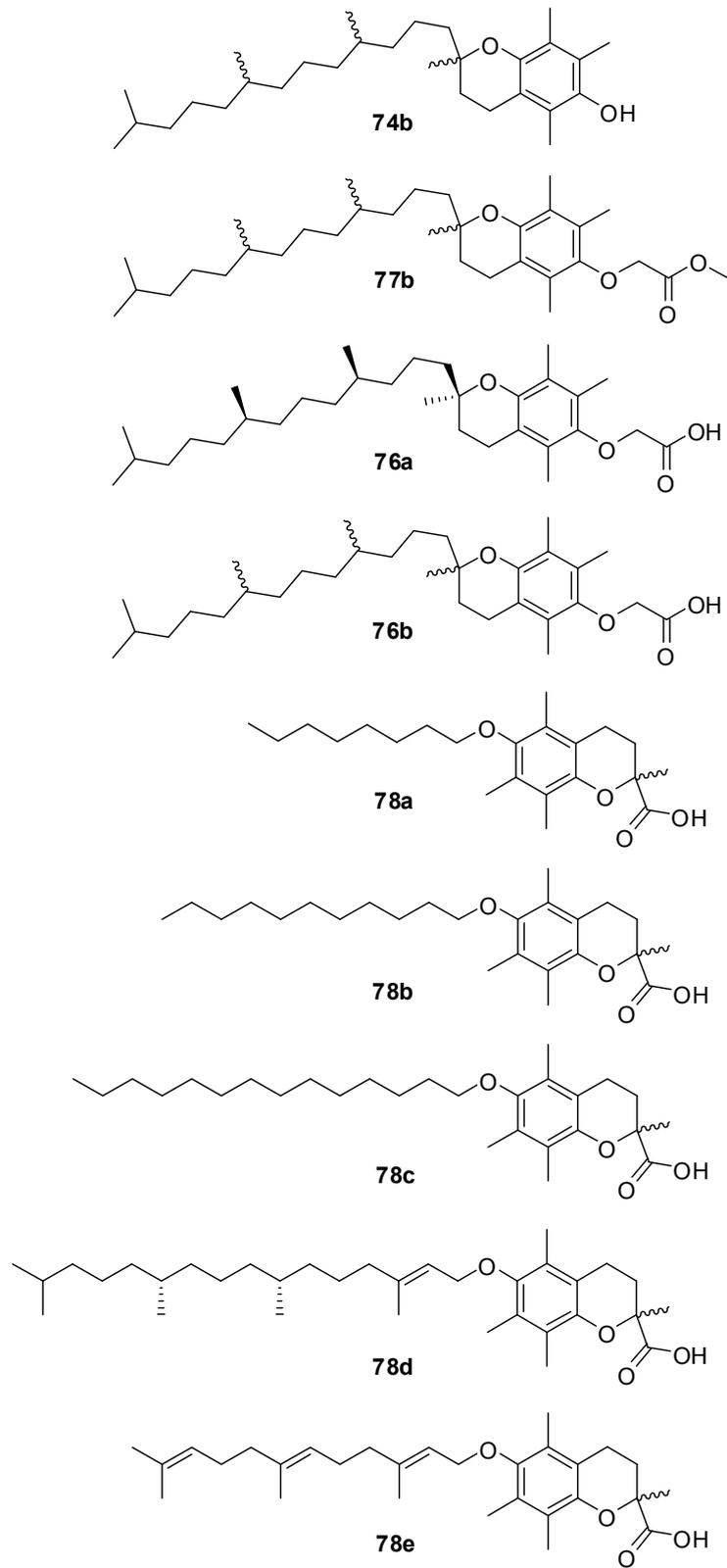


Abb. 43a: Synthetisierte Tocopherolderivate **74b**, **77b**, **76a-b** und Chromanderivate **78a-e** als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren.

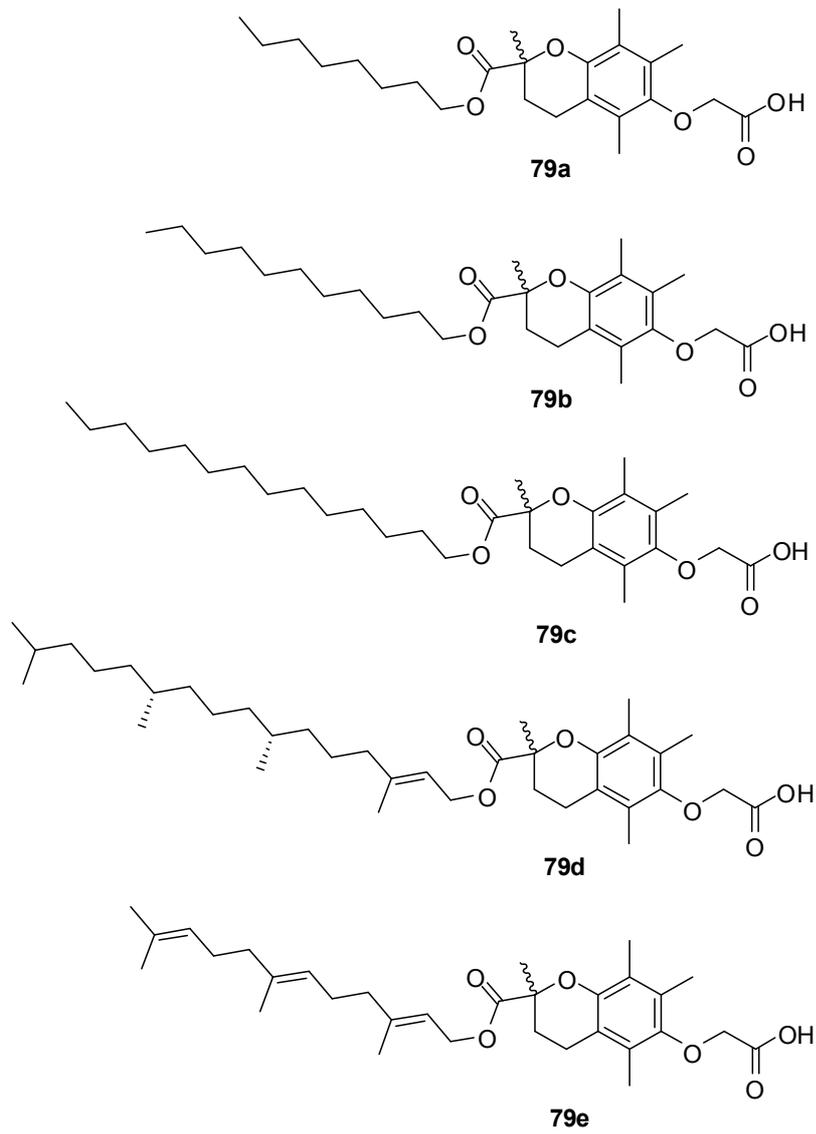


Abb. 43b: Synthetisierte Chromanderivate **79a-e** als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren.

Tabelle 5 zeigt die Ausbeute, clogP-Werte sowie die tPSA-Werte der synthetisierten Tocopherol- und Chromanderivate.

Tab. 5: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der Tocopherolderivate **74b**, **77b**, **76a-b** und Chromanderivate **78a-e** und **79a-e**.

Verbindung	BSc-Nummer	Ausbeute [%] ^a	HPLC-Reinheit [%]	clogP ^b	tPSA ^b
74b	4707		n.b.	12.1	29.46
77b	4708	94	n.b.	12.3	44.8
76a	4732	94	n.b.	12.0	55.8
76b	4558	95	n.b.	12.0	55.8
78a	4898	51	n.b.	7.5	55.8
78b	4902	62	n.b.	9.1	55.8
78c	4901	83	n.b.	10.6	55.8
78d	4899	33	n.b.	13.0	55.8
78e	4922	77	n.b.	9.5	55.8
79a	4881	65	n.b.	8.8	82.1
79b	4916	53	n.b.	7.2	82.1
79c	4917	60	n.b.	10.3	82.1
79d	4918	77	n.b.	12.5	82.1
79e	4923	87	n.b.	9.2	82.1

^a Ausbeute bezogen auf die letzte Stufe

^b n.b. = nicht bestimmt, Substanzen nicht UV-aktiv bei $\lambda = 254$ nm

^c clogP- und tPSA-Werte berechnet mit ChemDraw 10.0

Die hergestellten Substanzen weisen eine sehr hohe Lipophilie auf mit clogP-Werten zum Teil >10. Aufgrund der Säurefunktionalität innerhalb des Moleküls einerseits und den länger-kettigen Alkylresten andererseits neigen die Tocopherol- und Chromanderivate zur Mizellbildung. Daher wurde mithilfe von Lichtstreuungsexperimenten untersucht, ob die hergestellten Verbindungen im relevanten Konzentrationsbereich des γ -Sekretase-Assays (5-100 μ M) Mizellen ausbilden, welche die biophysikalische Messung beeinflussen könnten. Durch die Anlagerung von größeren Lipid-artigen Aggregaten an die Zellmembran, kann

diese in ihrer Funktion massiv gestört werden. Daher muss die Mizellbildung der hergestellten Substanzen im γ -Sekretase-Assay relevanten Bereich ausgeschlossen werden. Im Falle einer Mizellbildung der Substanz kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zellulären *in vitro* Assay-Messungen Artefakte liefern, da es sich bei der γ -Sekretase um ein Transmembranenzym handelt und sich die biochemischen Vorgänge an der Zellmembran abspielen.

3.2.4 Experimente zur dynamischen Lichtstreuung

Amphiphile Moleküle bilden ab einer bestimmten Konzentration in Lösung Aggregate, sogenannte Mizellen. Tenside sind hierfür das prominenteste Beispiel. Die Konzentration, ab welcher Substanzen Mizellen ausbilden, ist die kritische Mizellbildungskonzentration, die experimentell über eine Vielzahl an Methoden bestimmt werden kann.^[232] Dazu gehören unter anderem die UV-Absorptions-Spektroskopie, die Fluoreszenz-Spektroskopie, die Messung der Oberflächenspannung, bei ionischen Verbindungen die Messung der Leitfähigkeit und die Messung der dynamischen Lichtstreuung.^[232-234]

Die hergestellten Tocopherolderivate und Chromanderivate (Abb. 43a-b) wurden auf die Bildung von Mizellen im Konzentrationsbereich von 5-100 μM untersucht. Als Methode wurden Experimente zur dynamischen Lichtstreuung gewählt. Bei diesem Verfahren wird das Streulicht eines Lasers an einer gelösten Probe untersucht. Im Falle kleiner Partikel in Lösung, also beim Auftreten von Mizellen, wird das Licht an der Mizelle gestreut. Die Experimente wurden an einem Zetasizer Nano ZS (Malvern) mit einer Laserwellenlänge von 514 nm durchgeführt. Der vereinfachte Aufbau des Gerätes ist in der folgenden Abbildung 44 schematisch dargestellt:

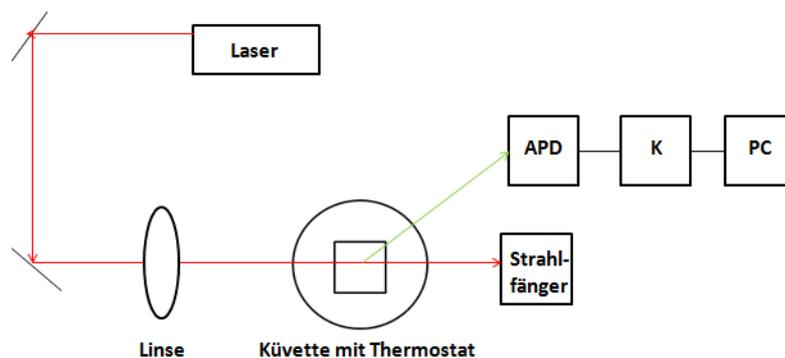


Abb. 44: Vereinfachte Darstellung des Zetasizers Nano ZS zur Messung der dynamischen Lichtstreuung, APD: Avalanche Photodiode, K: Korrelator, PC: Computer mit Zetasizer Software.

Als Lichtquelle dient ein Laser, der über zwei Spiegel mit einem Streuwinkel von insgesamt 173° abgelenkt wird, bevor er durch eine Linse auf die Küvette mit der zu messenden, genau temperierten Probenlösung trifft. Der Strahl wird an vorhandenen Partikeln gestreut und das Streulicht (in Abb. 44 in grün dargestellt) trifft auf den Detektor (Photodiode), der das elektrische Signal an den Korrelator weitergibt. Über den PC wird mit der Malvern Zetasizer Software direkt die Partikelgröße der vorhandenen Aggregate berechnet.^[235] Alle Messungen wurden dreimal bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Der variable Messpunkt (4.65 mm) war bei jeder Messung konstant.

Es wurden Verdünnungsreihen der Verbindungen (74b), (77b), (76a-b), (78a-e) und (79a-e) (von 50 mM DMSO-Lösungen) in dem Konzentrationsbereich von 5-100 μM angesetzt. Angelehnt an die γ -Sekretase-Assay-Bedingungen bestand das Solvens der gelösten Proben aus 2% DMSO und einer wässrigen Salzlösung aus: 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 5.3 mM KCl , 44.1 mM NaHCO_3 , 110.3 mM NaCl , 0.9 mM NaH_2PO_4 (Assay-Puffer).

Um die Methode zu evaluieren, wurde Pluronic F68 (Copolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid, $M = 8400$ g/mol, etwa 80% Ethylenoxid) als Kontrolle verwendet. Die literaturbekannte kritische Mizellbildungskonzentration von Pluronic F68 (40 μM) konnte mit der beschriebenen Messmethode reproduziert werden (Abb. 45).^[236]

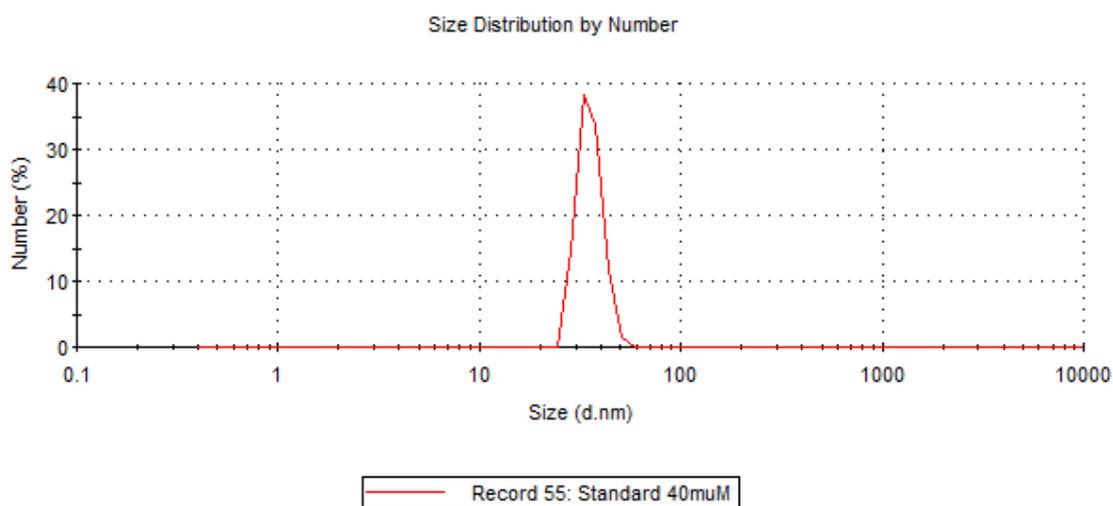


Abb. 45: Kritische Mizellbildungskonzentration von Pluronic F68 bei 40 μM .

Die Tocopherolderivate (74b), (77b), (76a-b) und die Chromanderivate (78a-e) und (79a-e) wurden mit der beschriebenen Methode im Konzentrationsbereich von 5-100 μM vermessen. Die Bildung von Mizellen in diesem Konzentrationsbereich konnte nicht beobachtet werden,

mit einer Ausnahme: Chromanverbindung (**78b**) bildet bei einer Konzentration von 100 μM Mizellen (Abb. 46).

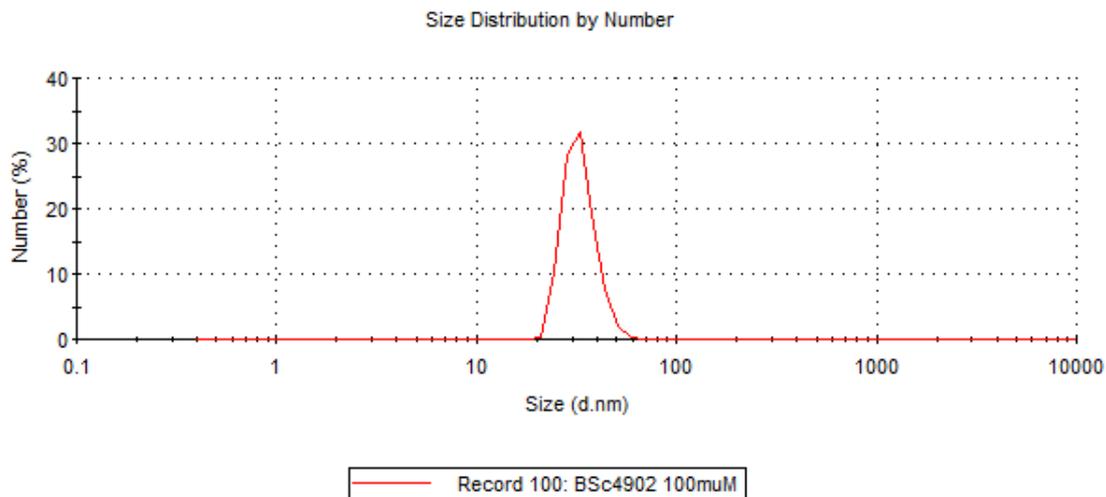


Abb. 46: Kritische Mizellbildungskonzentration von Chromanderivat **78b** bei 100 μM .

Bei einer Modulation der γ -Sekretase ab einer Konzentration von 100 μM wird die Substanz als inaktiv betrachtet. Daher wurde die Mizellbildung nur bis zu einer Konzentration von 100 μM getestet. Die Mizellbildung bei höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) spielt bei den durchgeführten zellulären *in vitro* Assay-Messungen keine Rolle mehr. Da die hergestellten Tocopherolderivate (**74b**), (**77b**), (**76a-b**) und Chromanderivate (**78a-e**) und (**79a-e**) bis zu einer Konzentration von 100 μM keine Mizellen ausbildeten, wurde im Folgenden die Wirkung der Substanzen auf die γ -Sekretase untersucht.

3.2.5 Biologische Aktivität der Tocopherolderivate und Chromanderivate

Die Tocopherolderivate (**74b**), (**77b**), (**76a-b**) und Chromanderivate (**78a-e**) und (**79a-e**) wurden an der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. SASCHA WEGGEN in einem zellulären $\text{A}\beta$ -Assay auf ihre γ -Sekretasemodulatorische Wirkung hin untersucht. Dabei wurden CHO-Zellen verwendet, die humanes APP sowie humanes Präsenilin-1 überexprimieren. Mithilfe eines Antikörper-basierten ELISA-Assays (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurden die verschiedenen $\text{A}\beta$ -Isoformen $\text{A}\beta_{38}$, $\text{A}\beta_{40}$ und $\text{A}\beta_{42}$ bestimmt (Tab. 6).^[237]

Tab. 6: Biologische Aktivität der Tocopherolderivate **74b**, **77b**, **76a-b**, und Chromanderivate **78a-e** und **79a-e** auf die γ -Sekretase.

Verbindung	BSc-Nummer	EC ₅₀ A β ₃₈ [μ M]	IC ₅₀ A β ₄₀ [μ M]	IC ₅₀ A β ₄₂ [μ M]	Eigenschaft
74b	4707	>100	>100	>100	nicht aktiv
77b	4708	>100	>100	>100	nicht aktiv
76a	4732	6	24	11	Modulator
76b	4558	4	26	12	Modulator
78a	4898	>50	>50	57	Modulator
78b	4902	10	>50	28	Modulator
78c	4901	9	29	14	Modulator
78d	4899	10	42	26	Modulator
78e	4922	8	39	28	Modulator
79a	4881	11	42	35	Modulator
79b	4916	5	23	12	Modulator
79c	4917	6	34	22	Modulator
79d	4918	13	36	24	Modulator
79e	4923	1	25	27	Modulator

Die experimentellen Daten bestätigten die anfangs aufgestellte Hypothese: Alle Tocopherolderivate, die eine Säurefunktionalität und einen lipophilen Alkylanker tragen (Abb. 43a-b), haben eine modulierende Wirkung auf die γ -Sekretase und senken die A β ₄₂-Produktion und steigern dagegen die A β ₃₈-Produktion (Tab. 6). Keine anderen Wirkmechanismen wie inverse Modulation oder Inhibition konnten bei den Tocopherolderivaten (**76a-b**) beobachtet werden. Das α -Tocopherol (**74b**) selbst und der Ester (**77b**) zeigen keine Aktivität auf die γ -Sekretase, währenddessen das Tocopherolderivat (**76a**) mit der Säurefunktionalität ein potenter γ -Sekretase-Modulator ist. Die Stereoisomere (**76a**) und (**76b**) zeigen equipotente Aktivitäten auf die γ -Sekretase, die Konfiguration der chiralen Kohlenstoffatome in den Tocopherolderivaten (**76a-b**) scheint daher keinen Einfluss auf die γ -Sekretase-modulatorische Wirkung zu haben (Tab. 6). Auch

die Chromanderivate modulieren die γ -Sekretase auf potente Weise, mit Ausnahme der Chromanderivate (**78a**) und (**79a**), welche mit $IC_{50}(A\beta_{42})$ -Werten von 58 μ M und 35 μ M nur eine schwach modulierende Wirkung aufweisen (Tab. 6). Diese Chromanderivate (**78a-b**) haben als lipophilen Alkylrest eine C_8 -Alkylkette, welche für die Interaktion mit der Membran zu kurz zu sein scheint. Mit der Verlängerung des Alkylrestes von C_8 zu C_{16} zeigt die modulierende Wirkung der Chromanderivate eine biphasische Korrelation (Abb. 47). Zunächst wird die modulierende Wirkung mit der Länge der Alkylkette (und somit mit steigender Molmasse) stärker, ab einer gewissen Länge nimmt die modulierende Wirkung jedoch wieder ab (Abb. 47).

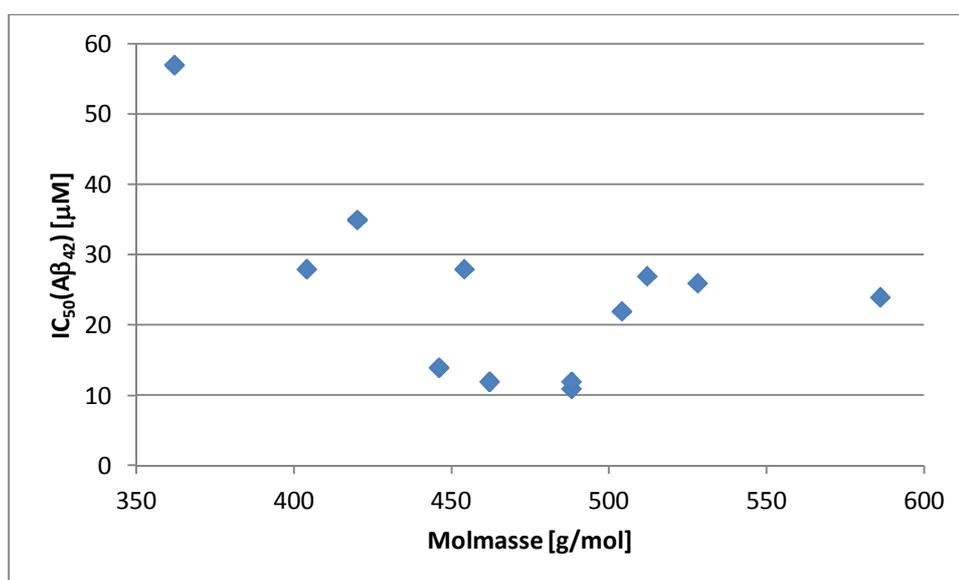


Abb. 47: Auftragung der Molmasse der Tocopherolderivate **76a-b** und Chromanderivate **78a-e** und **79a-e** gegen den $IC_{50}(A\beta_{42})$.

Auch die Verzweigung der ungesättigten Alkylreste, die in den Chromanderivaten (**78d-e**) und (**79d-e**) vorliegen, scheint zu einer Verschlechterung der γ -Sekretase-modulierenden Wirkung zu führen. Möglicherweise stört die durch die Doppelbindungen hervorgerufene Rigidität der Chromanderivate (**78d-e**) und (**79d-e**) die Interaktion der lipophilen Alkylreste mit der Membran. Es wurde eine zweite Serie an Chromanderivaten (**79a-e**) hergestellt, bei welcher die Säure- bzw. Alkylfunktionalität innerhalb des Moleküls gegenüber der ersten Derivateserie (**78a-e**) vertauscht wurden (Abb. 43b). Hierbei sollte untersucht werden, ob der Austausch der funktionellen Gruppen innerhalb der Chromanstruktur die modulierende Eigenschaft der γ -Sekretase beeinflusst. Anhand der experimentellen Daten kann ein solcher Einfluss jedoch nicht beobachtet werden (Tab. 6).

3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es gelang die Synthese von verschiedenen Tocopherolderivaten (**76a-b**) und Chromanderivaten (**78a-e**) und (**79a-e**). Alle hergestellten Verbindungen konnten in einem zellulären A β -Assay als γ -Sekretase-Modulatoren identifiziert werden, die die A β ₄₂-Produktion senken und die A β ₃₈-Produktion steigern. Weiterhin wurde in Experimenten zur dynamischen Lichtstreuung eine Mizellbildung der Tocopherolderivate (**76a-b**) und Chromanderivate (**78a-e**) und (**79a-e**) in dem für das Assay relevanten Konzentrationsbereich ausgeschlossen. Auch im Falle von Chromanderivat (**78b**) spielt die Mizellbildung bei 100 μ M keine Rolle, da die modulatorische Wirkung der Verbindung (**78b**) bereits bei einer Konzentration von 14 μ M auftritt. Die biologischen Daten der Tocopherolderivate (**76a-b**) und der Chromanderivate (**78a-e**) und (**79a-e**) im Vergleich zu dem α -Tocopherol (**74b**) geben erneut den „*proof of concept*“, dass sowohl ein lipophiler Anker als auch eine Carbonsäurefunktionalität für die modulatorische Wirkung auf die γ -Sekretase essentiell sind. Auffallend ist, dass die Chromanderivate (**78a-e**) der Cumarinringstruktur sehr ähnlich sind (Abb. 48). Daher sollen im Folgenden Cumarinderivate hergestellt werden, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den in Kapitel 3.2 beschriebenen Verbindungen potentielle γ -Sekretase-Modulatoren sind. Im Falle einer γ -Sekretase modulierenden Eigenschaft könnte die fluoreszente Eigenschaft der Cumarinderivate für ergänzende Zellexperimente ausgenutzt werden. Entwickelt werden sollte ein Experiment, das den „Wirkungsort“ der γ -Sekretase-Modulatoren an der Zellmembran auf mikroskopischer Ebene markiert und so die Ergebnisse des zellulären A β -Assays unterstützt.

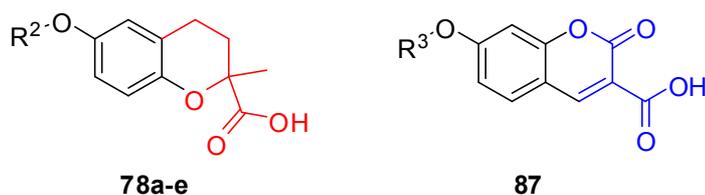


Abb. 48: Strukturelle Ähnlichkeit der Chromanderivate **78a-e** und des herzustellenden Cumarins **87**, R³ = lipophiler Rest.

3.3 Cumarinderivate als γ -Sekretase-Modulatoren

3.3.1 Synthese der Cumarinderivate (87a-d)

Motiviert durch die γ -Sekretase modulierende Eigenschaft der in Kapitel 3.2 beschriebenen Verbindungen, werden im Folgenden eine Reihe an Cumarinderivaten hergestellt, die mit den γ -Sekretase-Modulatoren aus Kapitel 3.2 strukturell verwandt sind (Abb. 48, Abb. 49) und daher als γ -Sekretase-Modulatoren in Frage kommen.

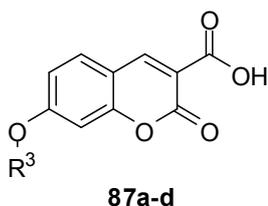


Abb. 49: Geplante Synthese der Cumarinderivate **87a-d**.

Auch an dieser Stelle sollen die Cumarine (**87a-d**) sowohl längerkettige Alkylketten als auch eine zur Modulation notwendige Säurefunktionalität enthalten. Die einzuführenden Alkylreste sind in der folgenden Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Definition der Substituenten R^3 .

Verbindung	R	Substituent
87a, 88a, 82b	R^3	
87b, 88b, 82c	R^3	
87c, 88c, 82d, 84d	R^3	
87d, 88d, 82e, 84d	R^3	

Nach der retrosynthetischen Methodenplanung können die Cumarine (**87a-d**) aus den entsprechenden Estern (**88a-e**) leicht hydrolysiert werden. Die Cumarine (**88a-d**) können anhand einer nukleophilen Substitution am phenolischen Sauerstoff von Cumarin (**89**) generiert werden. Die Cumarinstruktur (**89**) kann schließlich über eine Knoevenagel-Kondensation aus 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**90**) und Malonsäurediethylester (**91**) aufgebaut werden (Abb. 50).

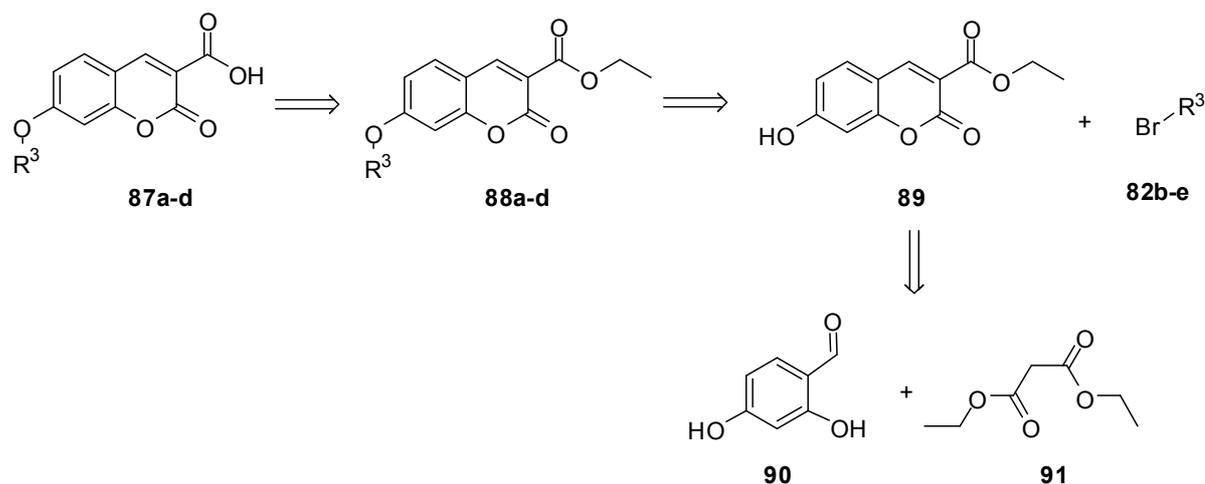


Abb. 50: Retrosynthetische Analyse der Cumarinderivate **87a-d**, R^3 definiert in Tabelle 7.

2, 4-Hydroxybenzaldehyd (**90**) und Malonsäurediethylester (**91**) wurden unter katalytischer Zugabe von Piperidin und AcOH bei 100°C zu Cumarin (**89**) umgesetzt. Nach der wässrigen Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Cumarin (**89**) mit einer guten Ausbeute von 88% als gelber Feststoff gewonnen werden (Abb. 51). Anschließend wurden die unterschiedlichen lipophilen Reste (R^3) auf den phenolischen Sauerstoff eingeführt (Tab. 7). Dazu wurde Cumarin (**89**) in basischer Lösung mit den Alkylbromiden (**82b-e**) bei 120°C umgesetzt (Abb. 51). Nach der wässrigen Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurden die Cumarine (**88a-d**) in moderaten bis guten Ausbeuten generiert (31-86%). Über eine basische Esterhydrolyse der Cumarine (**88a-d**) konnten die Cumarine (**87a-d**) in moderaten bis sehr guten Ausbeuten (59-96%) isoliert werden (Abb. 51). Die Synthese der verzweigten Alkylbromide (**82d-e**) erfolgte über eine Bromierung mit PBr_3 bei 0°C in Hexan/Pyridin aus den entsprechenden Alkoholen (**84d-e**) mit sehr guten Ausbeuten von 90-95% (Abb. 51).

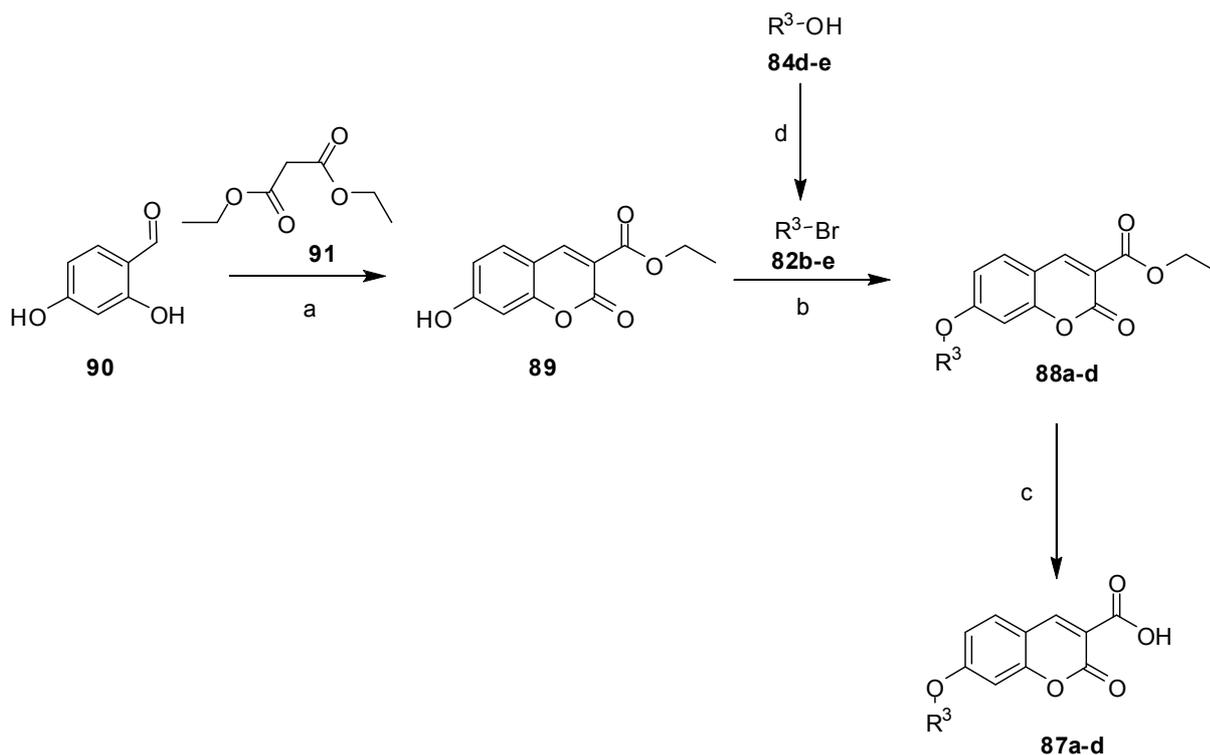


Abb. 51: Synthese der Coumarinderivate **87a-d**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Piperidin, AcOH, DMF, 100°C, 1 h, 88%, (b) CS_2CO_3 , DMF, 120°C, 2 h, 31-86%, (c) KOH, Dioxan/Wasser, 75°C, 2 h, 59-96%, (d) PBr_3 , Pyridin, Hexan, 0°C, 3 h, 90-95%, R^3 definiert in Tabelle 7.

3.3.2 Zusammenfassung der Coumarinderivate

In der folgenden Abbildung 52 sind alle während dieser Arbeit hergestellten Coumarinderivate (**87a-d**) dargestellt, die auf ihre Wirkung gegenüber der γ -Sekretase getestet wurden.

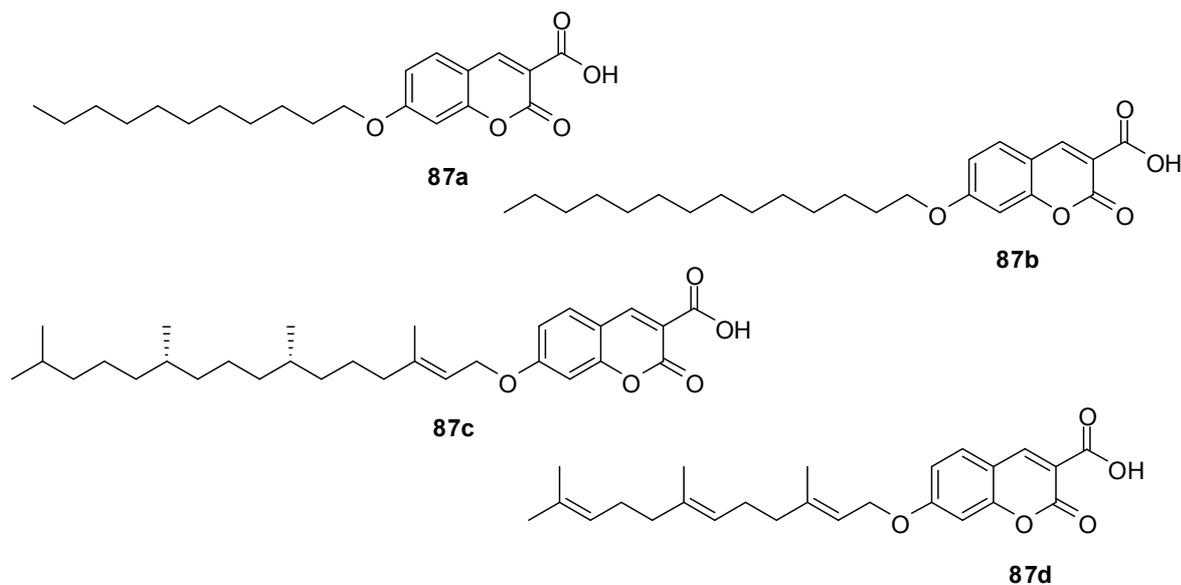


Abb. 52: Synthetisierte Coumarinderivate **87a-d** als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren.

Tabelle 8 zeigt die Ausbeute, Reinheit, clogP-Werte sowie die tPSA-Werte der synthetisierten Cumarinderivate (**87a-d**).

Tab. 8: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der hergestellten Cumarinderivate **87a-d**.

Verbindung	BSc-Nummer	Ausbeute [%] ^a	HPLC-Reinheit [%]	clogP ^b	tPSA ^b
87a	5065	84	99	6.8	72.8
87b	5066	96	98	8.4	72.8
87c	5067	95	96	10.8	72.8
87d	5068	59	96	7.3	72.8

^a Ausbeute bezogen auf die letzte Stufe

^b clogP- und tPSA-Werte berechnet mit ChemDraw 10.0

Die Cumarinderivate (**87a-d**) weisen eine sehr hohe Lipophilie auf und sind mit hohen clogP-Werten zwischen 6.8-10.8 als Wirkstoffe eher ungeeignet. Im Falle einer γ -Sekretase Modulation soll die fluoreszente Eigenschaft der Cumarine (**87a-d**) für *in vivo* Experimente am Zebrafischembryo ausgenutzt werden.

3.3.3 Biologische Aktivität der Cumarinderivate

Die Cumarinderivate (**87a-d**) wurden an der Heinrich Heine-Universität in der Arbeitsgruppe von PROF. DR. SASCHA WEGGEN in einem zellulären A β -Assay auf ihre γ -Sekretasemodulatorische Wirkung getestet (vgl. Kapitel 3.2.5), die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 9 aufgezeigt.^[237]

Tab. 9: Biologische Aktivität der Cumarinderivate **87a-d** auf die γ -Sekretase.

Verbindung	BSc-Nummer	IC ₅₀ A β ₃₈ [μ M] ^a	IC ₅₀ A β ₄₀ [μ M]	IC ₅₀ A β ₄₂ [μ M]	Eigenschaft
87a	5065	>80	>80	>80	nicht aktiv
87b	5066	>60	40	51	Inhibitor
87c	5067	59	32	38	Inhibitor
87d	5068	>80	>80	>80	nicht aktiv

Aus den biologischen Daten der Cumarinderivate (**87a-d**) ist ersichtlich, dass keines der Cumarinderivate (**87a-d**) eine modulierende Wirkung auf die γ -Sekretase ausübt (Tab. 8). Die Cumarine (**87b**) und (**87c**) inhibieren die γ -Sekretase, während die Cumarine (**87a**) und (**87d**)

keinen Effekt auf die γ -Sekretase zeigen. Die strukturelle Veränderung von den in Kapitel 3.2 beschriebenen Strukturen hin zu der Cumarinstruktur führt zu einer veränderten Wirkung auf die γ -Sekretase und die modulierende Wirkung geht verloren. Deshalb ist ein *in vivo* Experiment nicht mehr geboten. Die Inhibition der γ -Sekretase kann indirekt erfolgen, deshalb ist ein *in vivo* Experiment mit den fluoreszenten Cumarinen nicht hinreichend aussagefähig.

3.3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier Cumarinderivate (**87a-d**) synthetisiert werden, die auf ihre γ -Sekretase-Aktivität in einem zellulären A β -Assay getestet wurden. Aufgrund der enttäuschenden Assay-Ergebnisse, die keine modulierende Eigenschaft der Substanzen (**87a-d**) auf die γ -Sekretase zeigten, wurden keine anschließenden Markierungsexperimente mit den Cumarinen (**87a-d**) entwickelt. Die weitere Synthese von amphiphilen Verbindungen als potentielle γ -Sekretase-Modulatoren erscheint nicht sinnvoll, da derartige Verbindungen aufgrund ihrer länger-kettigen Alkylreste zu lipophil sind, um als Wirkstoffe in Frage zu kommen.

3.4 Indolinonderivate als FLT3-Inhibitoren

Verschiedene Indolinone sind in der Literatur als FLT3-Inhibitoren beschrieben, unter anderem auch das Indolinon Sunitinib (**36**), das aktuell klinische Studien als Therapeutikum für die die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie durchläuft (Abb. 16).^[157, 158] Auch in der Arbeitsgruppe SCHMIDT konnten eine Reihe von Indolinonderivaten synthetisiert werden, die eine inhibitorische Wirkung auf FLT3 im nanomolaren Bereich zeigen (Abb. 17).^[167] Motiviert von diesen Ergebnissen war es ein Ziel dieser Arbeit, weitere Indolinonderivate als potentielle FLT3-Inhibitoren herzustellen (Abb. 53). Die neuen Indolinonderivate sollten dabei Struktur motive enthalten, welche die Löslichkeit der Verbindungen verbessern (Tab. 10). Dabei sollte zum einen der aromatische Ring des Indolinongerüsts durch eine Pyridineinheit substituiert werden, zum anderen sollte der Chlorsubstituent des aromatischen Systems gegen eine Methoxygruppe ausgetauscht werden (Abb. 53, in rot dargestellt).

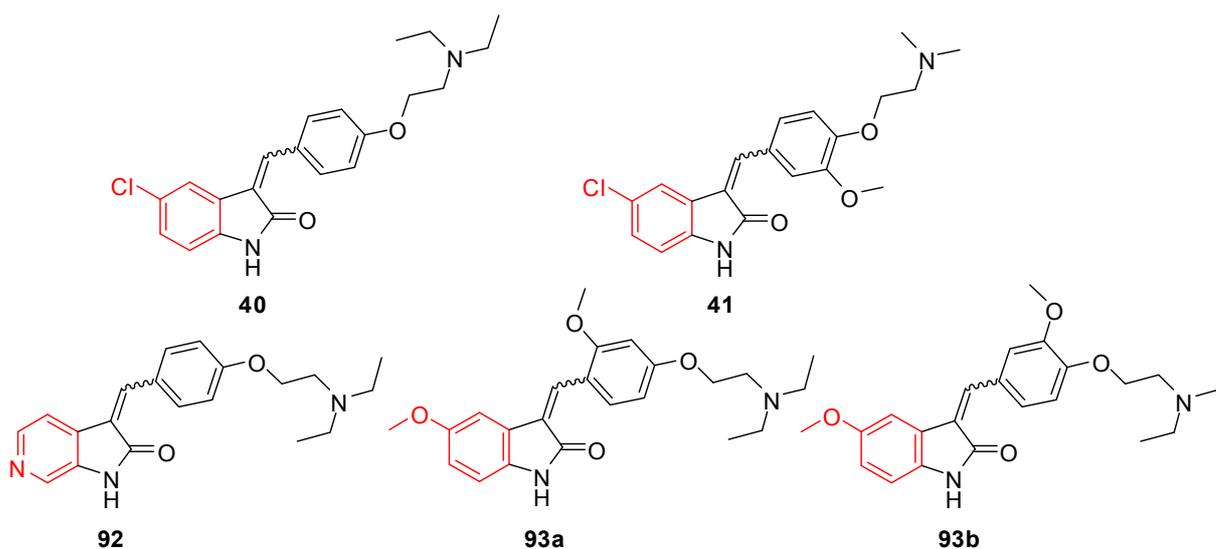


Abb. 53: FLT3-Inhibitoren **40** und **41** nach SCHMIDT *et al.* und geplante Indolinonderivate **92**, **93a-b**.

Anhand der clogP- und tPSA-Werte aus Tabelle 10 ist ersichtlich, dass die Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) im Vergleich zu den Indolinonderivaten (**40**) und (**41**) einen polareren Charakter aufweisen und diese somit die Löslichkeit der Verbindungen (**92**) und (**93a-b**) in polaren Lösungsmitteln verbessern sollten.

Tab. 10: Vergleich der clogP- und tPSA-Werte der Indolinonderivate **40**, **41**, **92** und **93a-b**.

Verbindung	clogP ^a	tPSA ^a
40	5.3	41.6
41	5.0	50.8
92	3.6	53.9
93a	4.5	60.0
93b	4.1	60.0

^a clogP- und tPSA-Werte berechnet mit ChemDraw10.0

Um die Syntheseidee auf Plausibilität zu überprüfen und mögliche Wechselwirkungen der Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) mit dem Protein im aktiven Zentrum vorherzusagen, wurde zunächst ein computergestütztes Protein/Ligand-Docking der Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) durchgeführt. Hierzu wurde die Röntgenkristallstruktur (PDB: 1RJB) von FLT3 verwendet, welche die kristallisierte Kinasedomäne und Juxtamembran-Domäne von FLT3 ohne kokristallisierten Inhibitor enthält. Das Docking wurde in Anlehnung an SMITH *et al.* durchgeführt, die, anhand eines Dockings von Quizartinib (**35**) in die ATP-Tasche von FLT3, π -Wechselwirkungen von Phe691 und Phe830 mit den aromatischen Systemen des Quizartinib (**35**) publizierten.^[238] Das Docking wurde mit MOE2012.10 durchgeführt.^[239] Es gliedert sich in folgende Schritte: (1) Konformationsgenerierung, (2) Platzierung des Liganden, (3) Berechnung der Energie, (4) Energieminimierung der besten Konformation und (5) erneute Berechnung der Energie. Die Konformationsgenerierung in MOE erfolgt mit einer systematischen Suche durch Drehung aller rotierbaren Bindungen und bei größeren Molekülen (mit mehr als 5000 möglichen Konformationen) durch einen stochastischen Algorithmus. Für die Orientierung im aktiven Zentrum wurde eine pharmakophorbasierte Methode gewählt, welche, in Anlehnung an die Ergebnisse von SMITH *et al.*, zwei aromatische Systeme in der Umgebung von Phe691 und Phe830 erzwingt. Die generierten Konformationen wurden mit der Funktion London dG bewertet, die folgende fünf Werte als Beiträge zur Bindungsenergie erfasst: c (Beiträge zur Rotations- und Translationsentropie), E_{flex} (Beiträge durch Verlust von Flexibilität), $E_{\text{H-Bond}}$ (Beiträge durch Wasserstoffbrücken), $E_{\text{M-Lig}}$ (Beiträge durch Metall-Komplexierung) und D_{atom} (Desolvatationsenergie der Atome). Die 30 Konformationen mit der besten Bewertung wurden durch Energieminimierung optimiert. Hierbei wurden die Seitenketten des aktiven Zentrums flexibel gelassen und das Kraftfeld Amber12:EHT benutzt, das sowohl für Proteine als auch für kleine Moleküle

parametrisiert ist. Die optimierten Konformationen wurden durch die Kraftfeld-basierte *scoring* Funktion GBVI/WSA dG bewertet und in die Ergebnisdatenbank geschrieben. Um die Docking-Methode zu validieren, wurde zunächst Quizartinib (**35**) in Anlehnung an die Literatur gedockt (Abb. 54A) und das Ergebnis mit dem von SMITH *et al.* verglichen.^[238] Abbildung 54A zeigt die ermittelte Konformation von Quizartinib (**35**) im aktiven Zentrum von FLT3, sowie den eingesetzten Pharmakophorfilter in orange. Im Anschluss wurden die Indolinone (**40-41**), (**92**) sowie (**93a-b**) gedockt (jeweils das *E*- und das *Z*-Isomer) und die Energiewerte (*scores*) in Bezug auf die Affinität zum aktiven Zentrum berechnet (Tab. 11). Dabei wurden die *E*-Isomere weitaus schlechter bewertet als die entsprechenden *Z*-Isomere der Indolinonderivate (**40-41**), (**92**) und (**93a-b**) und bleiben deshalb nachfolgend unberücksichtigt. Da auch der bekannte FLT3-Inhibitor Sunitinib (**36**) als *Z*-Isomer aktiv ist,^[156] erscheinen die Ergebnisse des Dockings plausibel.

Tab. 11: Vergleich der durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG berechneten Bindungsenthalpien.

Verbindung	score [kcal/mol]
35	-14.57
40	-11.22
41	-12.52
92	-11.45
93a	-13.48
93b	-13.02

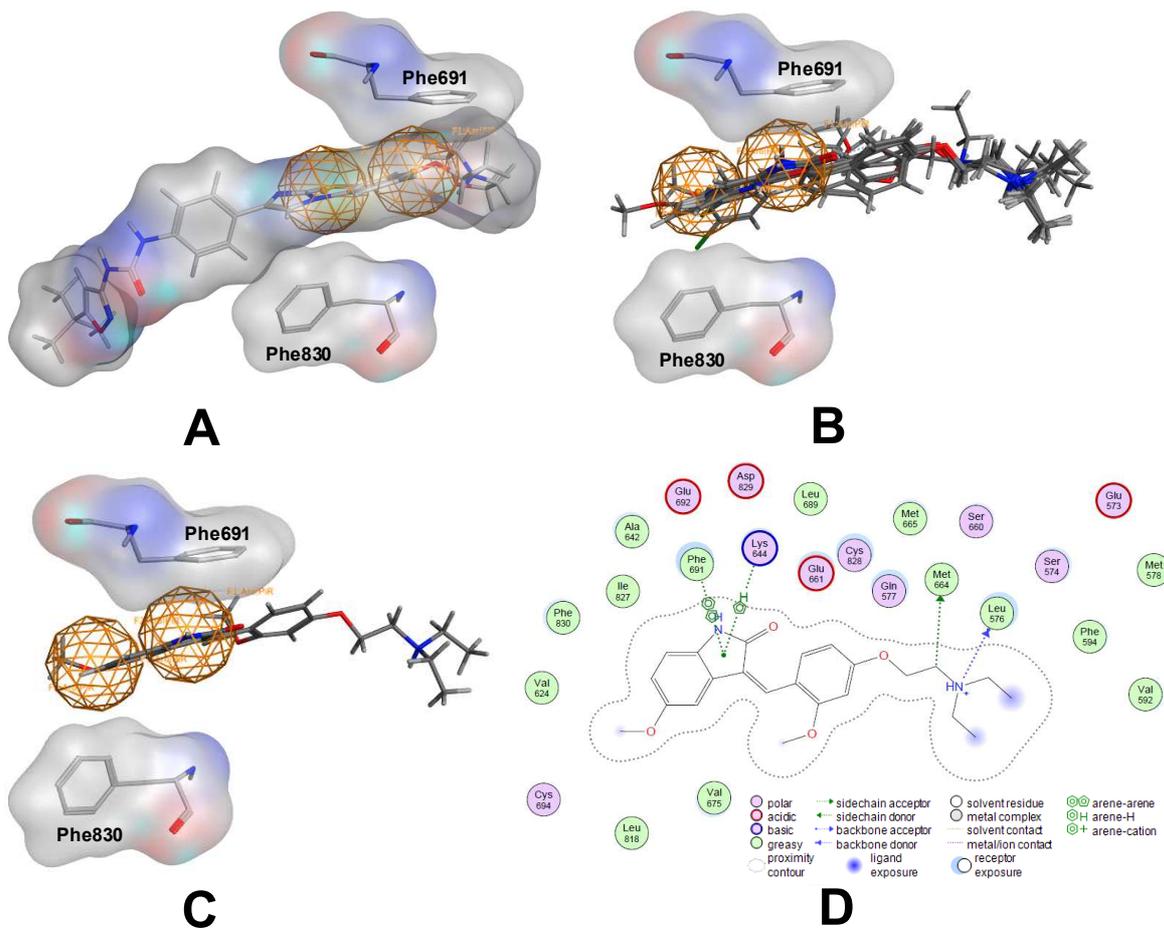


Abb. 54: **A:** Docking von Quizartinib **35**, **B:** Docking der Indolinoderivate **40-41**, **92** und **93a-b**, **C:** Docking des Indolinoderivats **93a**, **D:** Wechselwirkungen des Indolinoderivats **93a** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

In der Abbildung 54B ist die jeweils beste Konformation der Indolinoderivate (**40-41**), (**92**) und (**93a-b**) zusammen dargestellt. Offensichtlich liegen die Indolinoderivate (**40-41**), (**92**) und (**93a-b**) sehr ähnlich im aktiven Zentrum der Kinasedomäne von FLT3 (Abb. 54B). Das Indolinoderivat (**93a**) mit dem besten berechneten *score* (Tab. 11) ist der Abbildung 54C zu entnehmen, die genauen Wechselwirkungen des Indolinoderivats (**93a**) mit dem aktiven Zentrum des Proteins der Abbildung 54D. Das Amin der phenolischen Seitenkette des Indolinoderivats (**93a**) geht eine Wechselwirkung mit dem Rückgrat von Leu576 ein, außerdem eine hydrophobe Wechselwirkung mit Met664. Phe691 geht π - π -Wechselwirkungen mit dem Aromaten von Indolinoderivat (**93a**) ein, außerdem kommt es zu einer kationischen σ - π -Wechselwirkung mit Lys644. Das Protein/Ligand-Docking und die daraus resultierenden *scores* sowie die Betrachtung der Wechselwirkungen der Indolinoderivate (**92**) und (**93a-b**) mit dem aktiven Zentrum des Proteins motivieren zu der Synthese der vorgeschlagenen Indolinoderivate (**92**) und (**93a-b**). Nach der erfolgreichen

Synthese sollen die Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) auf ihre FLT3-inhibitorische Wirkung getestet werden.

3.4.1 Synthese der Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) als FLT3-Inhibitoren

Zunächst wird der erstellte Syntheseplan beschrieben, während im Anschluss daran die Synthese der Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) genau erläutert wird. Nach der retrosynthetischen Analyse kann das 6-Azaindolinonderivat (**92**) aus einer Knoevenagel-Kondensation aus dem 6-Azaindolinon (**94**) und dem Aldehyd (**95**) generiert werden (Abb. 55). Der Aldehyd (**95**) ist leicht über eine nukleophile Substitution aus 4-Hydroxybenzaldehyd (**96**) und Chlorid (**97**) zugänglich (Abb. 55). Das 6-Azaindolinon (**94**) dagegen kann über eine Cyclisierungsreaktion aus Amin (**98**) aufgebaut werden, das durch eine Hydrierung von Nitropyridin (**99**) gewonnen werden kann (Abb. 55). Nitropyridin (**99**) kann aus der Verbindung (**100**) hergestellt werden, die über eine nukleophile aromatische Substitution aus 4-Chloro-3-nitropyridin (**101**) und Malonsäurediethylester (**91**) aufgebaut werden kann (Abb. 55).

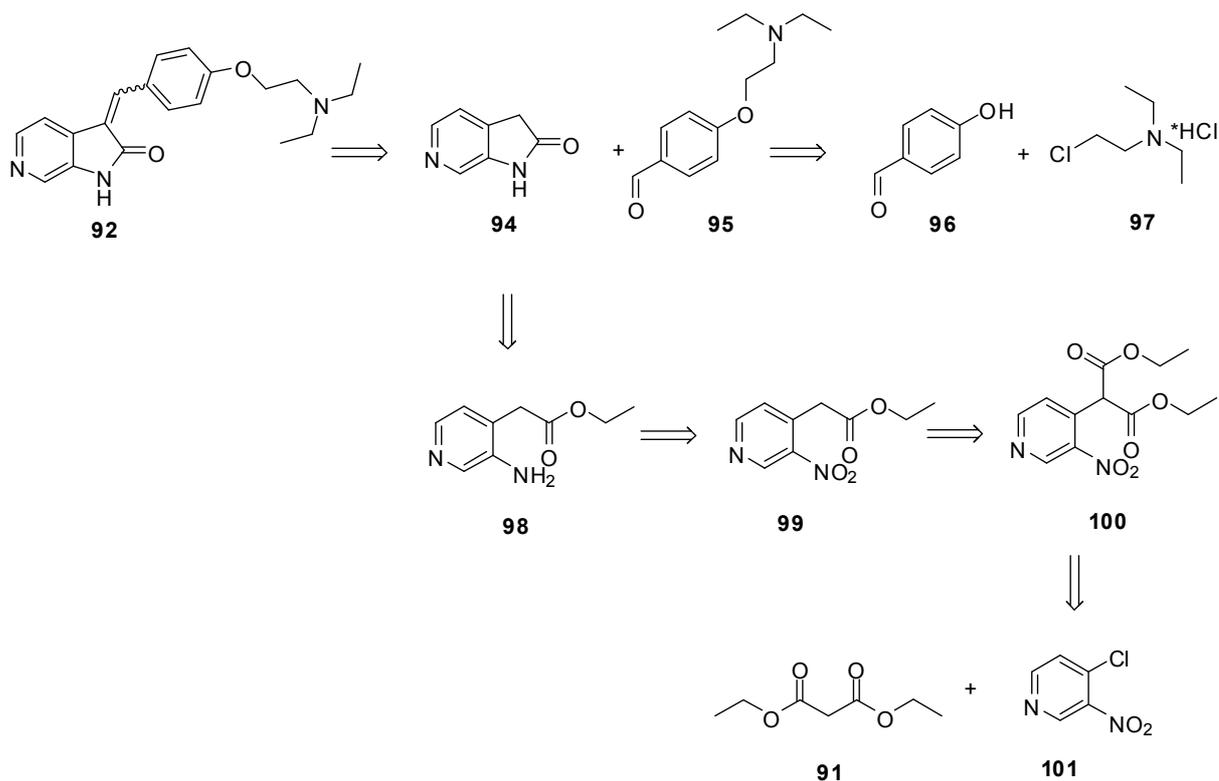


Abb. 55: Retrosynthetische Analyse des 6-Azaindolinonderivats **92**.

Zunächst werden die Synthesen der beiden Edukte (**94**) und (**95**) beschrieben, bevor die Knoevenagel-Kondensation zu der Zielverbindung (**92**) erläutert wird. Das 6-Azaindolinon (**94**) wurde über eine vierstufige Synthese nach einer Patentvorschrift aus

4-Chloro-3-nitropyridin (**101**) und Malonsäurediethylester (**91**) hergestellt (Abb. 56).^[240] Dazu wurden 4-Chloro-3-nitropyridin (**101**) und Malonsäurediethylester (**91**) unter vorsichtiger Zugabe von NaH zu Nitropyridin (**100**) umgesetzt, das nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer guten Ausbeute von 85% isoliert werden konnte (Abb. 56). Das Nitropyridin (**100**) reagierte mit LiCl in DMSO/H₂O bei einer Temperatur von 100°C und bei einer Reaktionsdauer von 24 h zu Verbindung (**99**), die mit einer guten Ausbeute von 85% erhalten wurde (Abb. 56). Nach der Hydrierung von Nitropyridin (**99**) mit Pd/C/H₂ konnte das Amin (**98**) mit einer guten Ausbeute von 80% isoliert werden. Schließlich erfolgte die säurekatalysierte Cyclisierungsreaktion von Amin (**98**) zu 6-Azaindolinon (**94**) bei 90°C in wässriger Lösung und das 6-Azaindolinon (**94**) konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 91% gewonnen werden (Abb. 56).

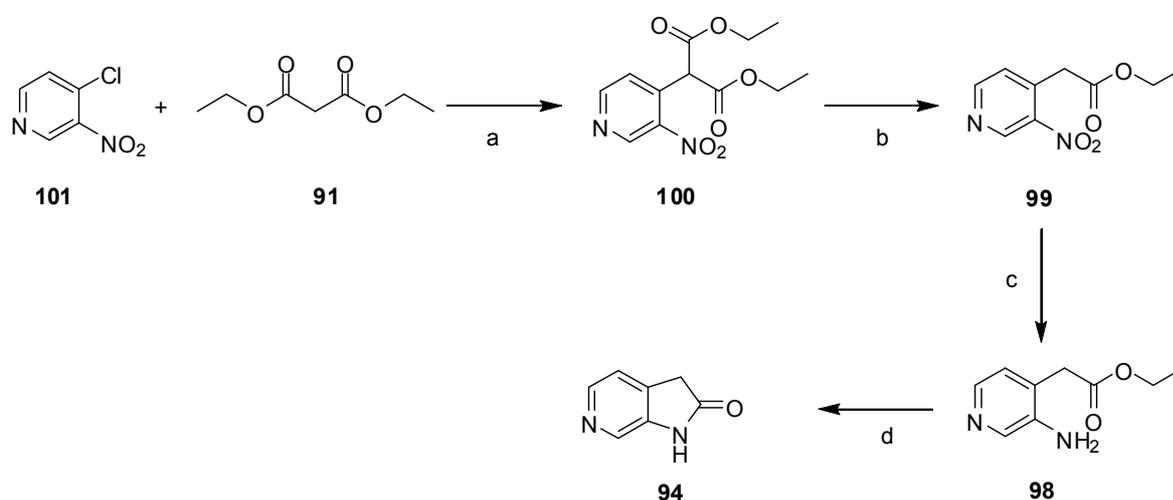


Abb. 56: Synthese des 6-Azaindolinons **94**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH, THF, 100°C, 20 min., 85%, (b) LiCl, DMSO/H₂O, 100°C, 24 h, 85%, (c) Pd/C/H₂, EtOH, RT, 6 h, 80%, (d) 3M HCl, 90°C, 1 h, 91%.

Der für die Knoevenagel-Kondensation benötigte Aldehyd (**95**) wurde aus 4-Hydroxybenzaldehyd (**96**) und Chlorid (**97**) über eine nukleophile Substitution unter der Zugabe von K₂CO₃ in Aceton bei 70°C generiert. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte der Aldehyd (**95**) mit einer guten Ausbeute von 84% isoliert werden (Abb. 57).

Aldehyd (**95**) und 6-Azaindolinon (**94**) wurden schließlich in einer Mikrowellenreaktion in methanolischer Lösung und unter katalytischer Zugabe von Piperidin zu dem Kondensationsprodukt (**92**) umgesetzt.^[240] Nach Aufarbeitung und säulenchromato-

graphischer Reinigung wurde das 6-Azaindolinonderivat (**92**) (als *E/Z*-Isomerenmischung) in einer moderaten Ausbeute von 41% erhalten (Abb. 57).

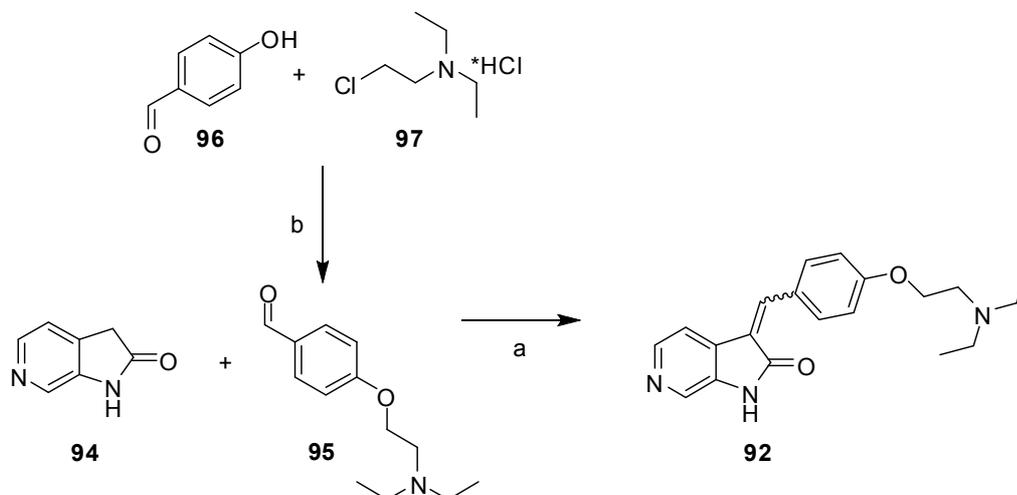


Abb. 57: Synthese des 6-Azaindolinonderivats **92**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Piperidin, MeOH, 100°C, 30 min., 41%, (b) Aceton, 70°C, 12 h, 84%.

Im Folgenden wird die retrosynthetische Methodenplanung der beiden Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) beschrieben. Die Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) können auch über eine Knoevenagel-Kondensation aus dem Methoxyindolinon (**102**) und den Aldehyden (**103a-b**) generiert werden (Abb. 58). Die Aldehyde (**103a-b**) können über eine nukleophile Substitution aus den entsprechenden Aldehyden (**104a-b**) und Chlorid (**97**) hergestellt werden, während das Indolinon (**102**) aus Isatin (**105**) über eine Wolff-Kishner-Reduktion erhalten werden kann (Abb. 58).

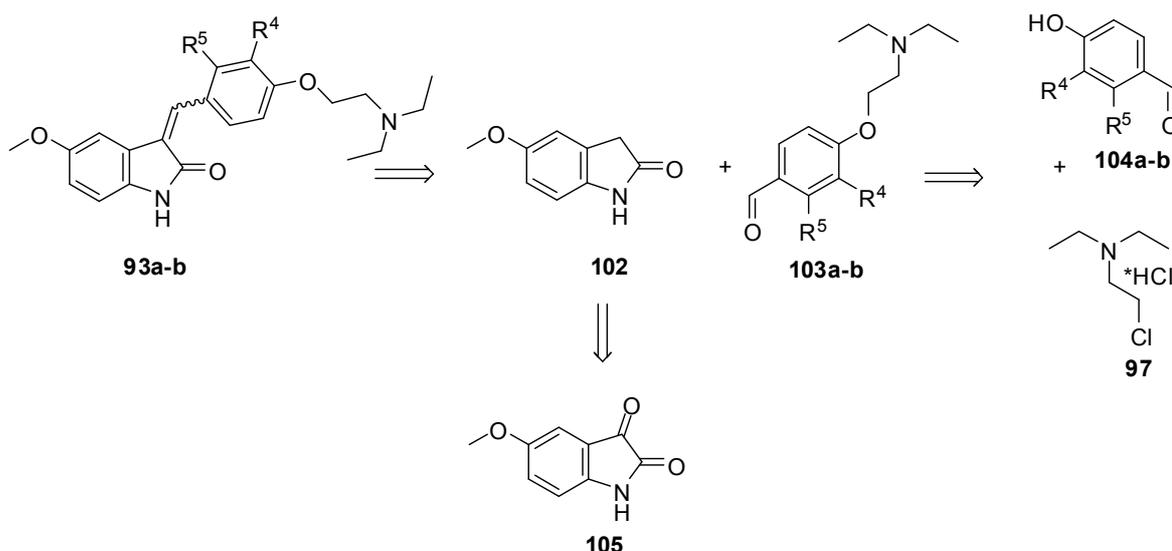


Abb. 58: Retrosynthetische Analyse der Methoxyindolinonderivate **93a-b**, R^4 und R^5 definiert in Tabelle 12.

Tab. 12: Definition der Reste R⁴ und R⁵ aus Abbildung 58.

Verbindung ^a	R ⁴	R ⁵
-a	-OCH ₃	-H
-b	-H	-OCH ₃

^a Die Substituenten beziehen sich auf alle Verbindungen in Kapitel 3.4 mit den entsprechenden Indices a-b

Isatin (**105**) reagierte unter Zugabe von Hydrazinmonohydrat und KOH in Ethylenglycol in einer Mikrowellenreaktion bei 140°C zu Methoxyindolinon (**102**), das nach der wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung mit einer moderaten Ausbeute von 64% gewonnen werden konnte (Abb. 59). Die Aldehyde (**104a-b**) wurden mit Chlorid (**97**) in basischer Suspension bei 70°C zu den Aldehyden (**103a-b**) umgesetzt (Abb. 59). Über eine Knoevenagel-Kondensation in der Mikrowelle konnten die Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) aus Methoxyindolinon (**102**) und den Aldehyden (**103a-b**) synthetisiert werden (Abb. 59).^[240] Nach der wässrigen Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnten die Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) (als *E/Z*-Isomerenmischung) in moderaten bis guten Ausbeuten (41 bzw. 75%) isoliert werden (Abb. 59).

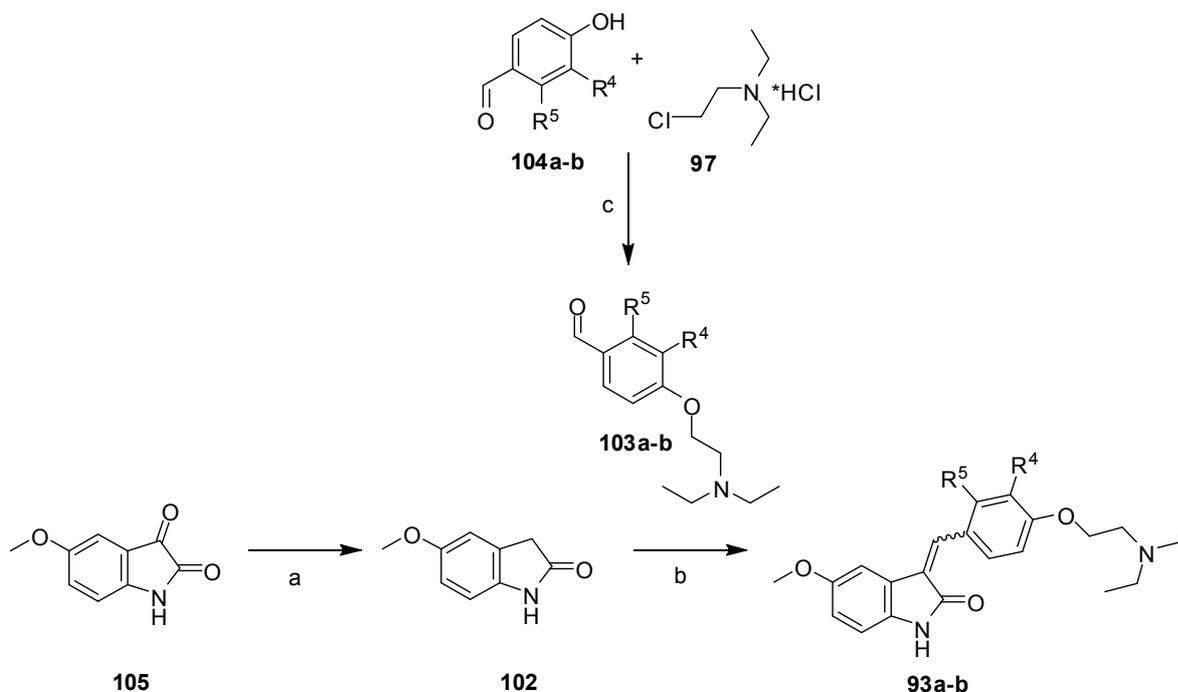


Abb. 59: Synthese der Indolinonderivate **93a-b**. Reagenzien und Bedingungen: (a) Hydrazinmonohydrat, KOH, Ethylenglycol, 140°C, 5 min., 75%, (b) MeOH, 100°C, 30 min., 41-75%, (c) DMF/Aceton, 56-70°C, 12 h, 84-85%, R⁴ und R⁵ definiert in Tabelle 12.

3.4.2 Zusammenfassung der Indolinonderivate

In der folgenden Abbildung 60 sind die während dieser Arbeit hergestellten Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) zusammengefasst, die auf ihre FLT3-inhibitorische Wirkung hin untersucht wurden.

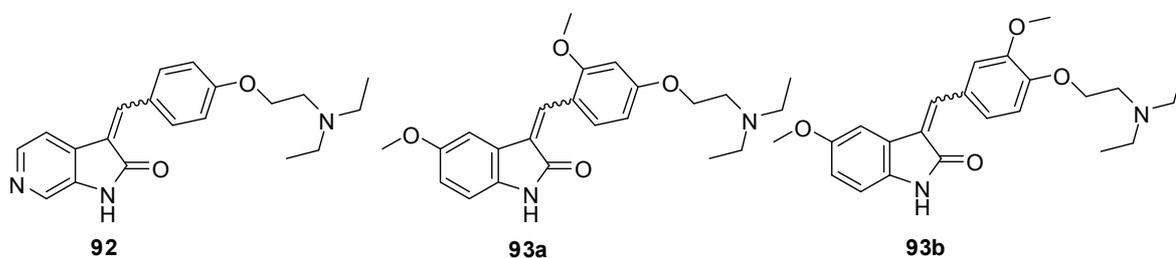


Abb. 60: Synthetisierte Indolinonderivate **92** und **93a-b** als potentielle FLT3-Inhibitoren.

3.4.3 Biologische Aktivität der Indolinonderivate

Die Indolinonderivate (**92**) und (**93a-b**) wurden in einem zellulären FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Kinase-Assay der Firma Cerep auf eine FLT3-inhibitorische Wirkung hin untersucht.^[241] Dabei wird die Inhibition von FLT3 in Prozent als Quotient der spezifischen Aktivität des Inhibitors und der spezifischen Aktivität einer Kontrollsubstanz (Staurosporin) bei einer spezifischen Konzentration angegeben. Die synthetisierten Indolinonderivate wurden bei einer Konzentration von 100 nM vermessen und die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Biologische Aktivität der Indolinonderivate **92** und **93a-b** auf FLT3 im Vergleich zu den Referenzverbindungen **40** und **41**.

Verbindung	BSc-Nummer	Inhibition von FLT3 [%]
92	5122	0 ^a
93a	5112	39 ^a
93b	5111	3 ^a
40	4657	86 ^a
41	4654	98 ^b

^a (spezifische Aktivität Probe/ spezifische Aktivität Staurosporin) *100, bei 100 nM

^b (spezifische Aktivität Probe/ spezifische Aktivität Staurosporin) *100, bei 10 μ M

Die Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) zeigen eine FLT3-inhibitorische Wirkung bei einer gemessenen Konzentration von 100 nM (39 bzw. 3%), während das 6-Azaindo-

linonderivat (**92**) dagegen keine Inhibition von FLT3 bei einer Konzentration von 100 nM aufzeigt. Die Aktivität der Ausgangsverbindung (**40**) zeigte eine Inhibition von 86% bei einer Konzentration von 100 nM mit einem IC₅₀-Wert von 4 nM. Anhand der Assay-Ergebnisse in Tabelle 14 ist ersichtlich, dass die Aktivität der Ausgangsverbindung (**40**) nicht verbessert werden konnte. Die Indolinonderivate (**93a-b**) zeigen eine weitaus schwächere inhibitorische Wirkung auf FLT3 als die Ausgangsverbindung (**40**). Der Chlorsubstituent am Aromaten von Indolinonderivat (**40**) scheint also für die FLT3-inhibitorische Wirkung eine notwendige Rolle zu spielen. Die Substitution des Chloratoms gegen eine Löslichkeitsverbessernde Methoxygruppe schwächt die Inhibition von FLT3, während bei der Substitution des aromatischen Systems (Benzen) gegen eine Pyridineinheit die inhibitorische Wirkung von FLT3 vollständig verloren geht.

3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Synthese eines synthetisch aufwendigen 6-Azaindolinonderivats (**92**) sowie zweier Methoxyindolinonderivate (**93a-b**). Die hergestellten Substanzen (**92**) und (**93a-b**) wurden auf ihre FLT3-inhibitorischen Eigenschaften hin untersucht und für die beiden Methoxyindolinonderivate (**93a-b**) konnte eine inhibitorische Wirkung auf FLT3 nachgewiesen werden. Die Aktivität der Ausgangsverbindungen (Tab. 13) konnte jedoch nicht gesteigert werden. Daher sollten im Folgenden andere Strukturklassen als FLT3-Inhibitoren etabliert werden, die zu einer Verbesserung der inhibitorischen Wirkung auf FLT3 führen sollen.

3.5 Ein Harnstoffderivat als FLT3-Inhibitor

FLT3-Inhibitoren mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Strukturmotiven sind in der Literatur beschrieben, unter anderem Chinoxaline, die von der Gruppe um GAZIT als potente FLT3-Inhibitoren publiziert wurden (Abb. 61).^[242]

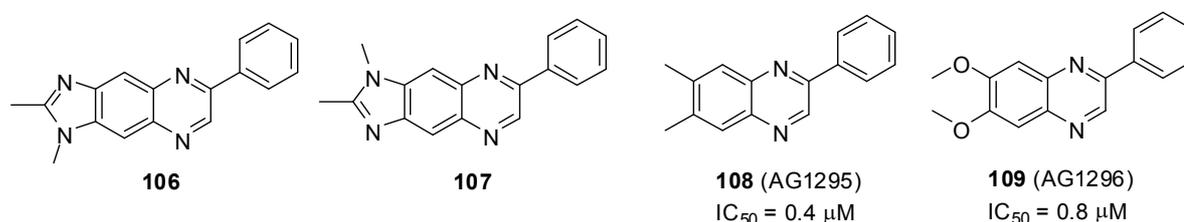


Abb. 61: Chinoxaline als FLT3-Inhibitoren nach GAZIT *et al.*.

Die Chinoxaline (**106-107**) inhibieren neben FLT3 andere Typ-III-Tyrosinkinase wie die PDGFR-Kinase oder auch die Kit-Kinase. Die inhibitorische Wirkung auf FLT3 liegt im unteren mikromolaren Bereich (IC₅₀ = 1-3 μM).^[242] Die Chinoxaline (**108-109**) sind mit IC₅₀-Werten zwischen 0.4-0.8 μM etwas potenter. Um die Verbindungen als Wirkstoffe für klinische Studien attraktiv zu machen, müsste die Struktur der Verbindungen so modifiziert werden, dass die inhibitorische Wirkung auf FLT3 in den nanomolaren Bereich erniedrigt wird. Aus einer Strukturanalyse bekannter FLT3-Inhibitoren resultiert die Idee, ein Teilstrukturmotiv des Inhibitors Quizartinib (**35**) mit dem Strukturtyp des Chinoxalins (**108**) zu kombinieren (Abb. 62) und somit einen „Hybrid“ der beiden Strukturklassen herzustellen.

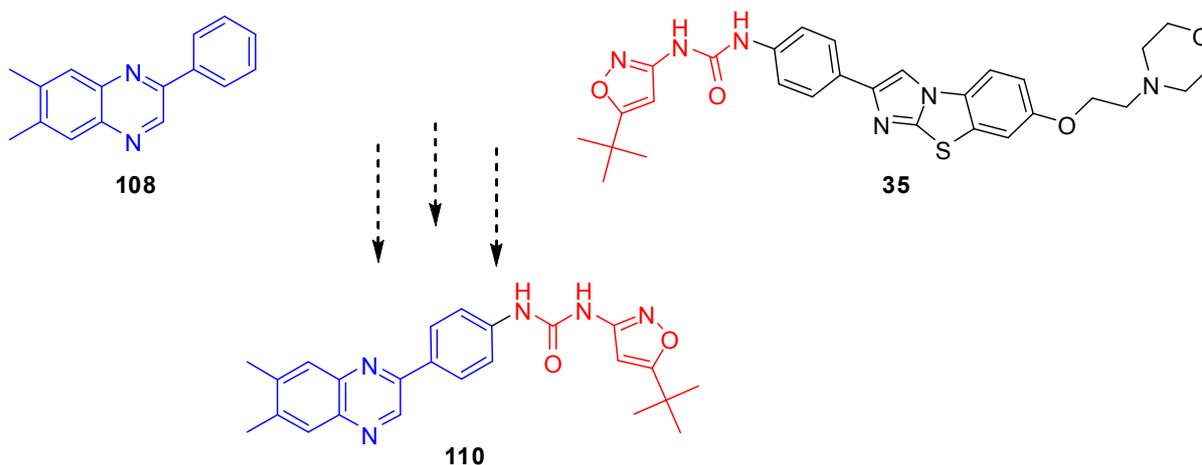


Abb. 62: Syntheseidee: „Hybrid“ **110** aus Quizartinib **35** und Chinoxalin **108**.

Dabei soll das Isoxazol-haltige Harnstoffmotiv des Quizartinib (**35**) beibehalten und durch das synthetisch einfach zugängliche Chinoxalinmotiv (**108**) ergänzt werden (Abb. 62). Das Protein/Ligand-Docking der Verbindungen (**35**), (**108**) und (**110**) (durchgeführt nach der in

Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode) zeigt einen plausiblen Bindungsmodus für den Harnstoff (**110**) mit einem vielversprechenden *score* von -13.07 kcal/mol (Tab. 14).

Tab. 14: Vergleich der durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG berechneten Bindungsenthalpien.

Verbindung	score [kcal/mol]
35	-14.57
108	-9.40
110	-13.07

Abbildung 63A zeigt die beste berechnete Konformation des Harnstoff (**110**) im aktiven Zentrum der Kinase-Domäne von FLT3, die Abbildung 63B die Wechselwirkungen des Harnstoffs (**110**) mit dem Protein. Der Harnstoff (**110**) bildet eine Wasserstoffbrücke mit Met664.

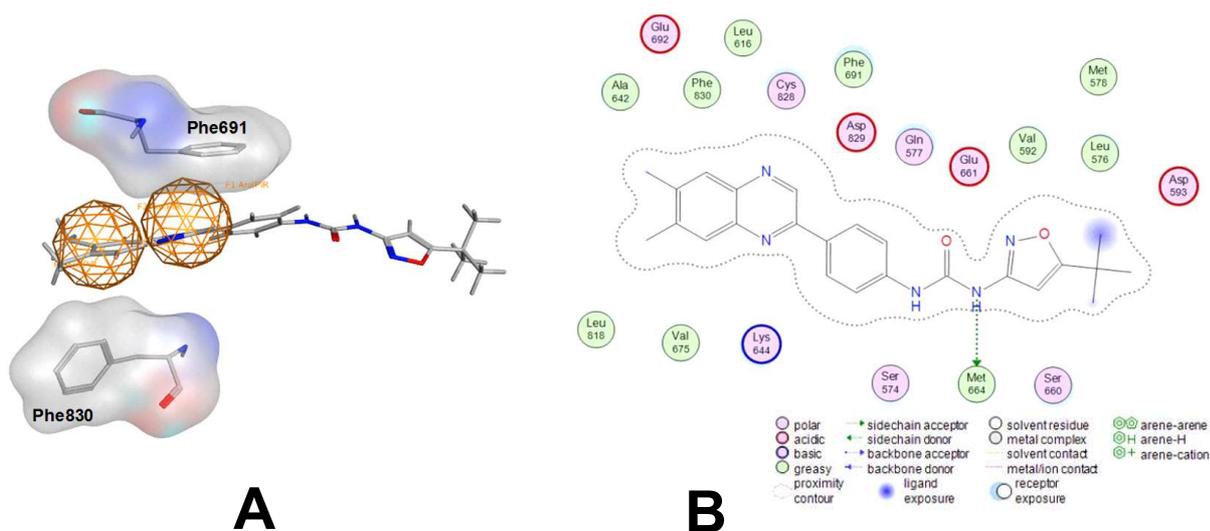


Abb. 63: **A:** Docking des Harnstoffs **110**, **B:** Wechselwirkungen des Harnstoffs **110** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

3.5.1 Synthese des Harnstoffs (**110**)

Zunächst wird die vor Beginn der präparativen Arbeiten erstellte Methodenplanung der Synthese vorgestellt, während anschließend die realisierten Schritte der Synthese von Zielverbindung (**110**) erläutert werden (Abb. 64). Der Harnstoff (**110**) kann aus Amin (**111**) und dem Isocyanat (**112**) aufgebaut werden, welches wiederum aus Triphosgen (**114**) und Amin (**113**) hergestellt werden kann (Abb. 64). Das Amin (**111**) kann über eine Hydrierung aus dem entsprechenden Nitrochinoxalin (**115**) gewonnen werden, welches aus

α -Ketoaldehyd (**116**) und Diamin (**117**) aufgebaut werden kann (Abb. 64). Das α -Ketoaldehyd (**116**) kann aus dem Diiodalkohol (**118**) generiert werden, der durch eine reduktive Alkylierung von 4-Nitrobenzaldehyd (**120**) mit CHI_3 (**121**) und $i\text{PrMgCl}$ (**119**) zugänglich ist (Abb. 64).

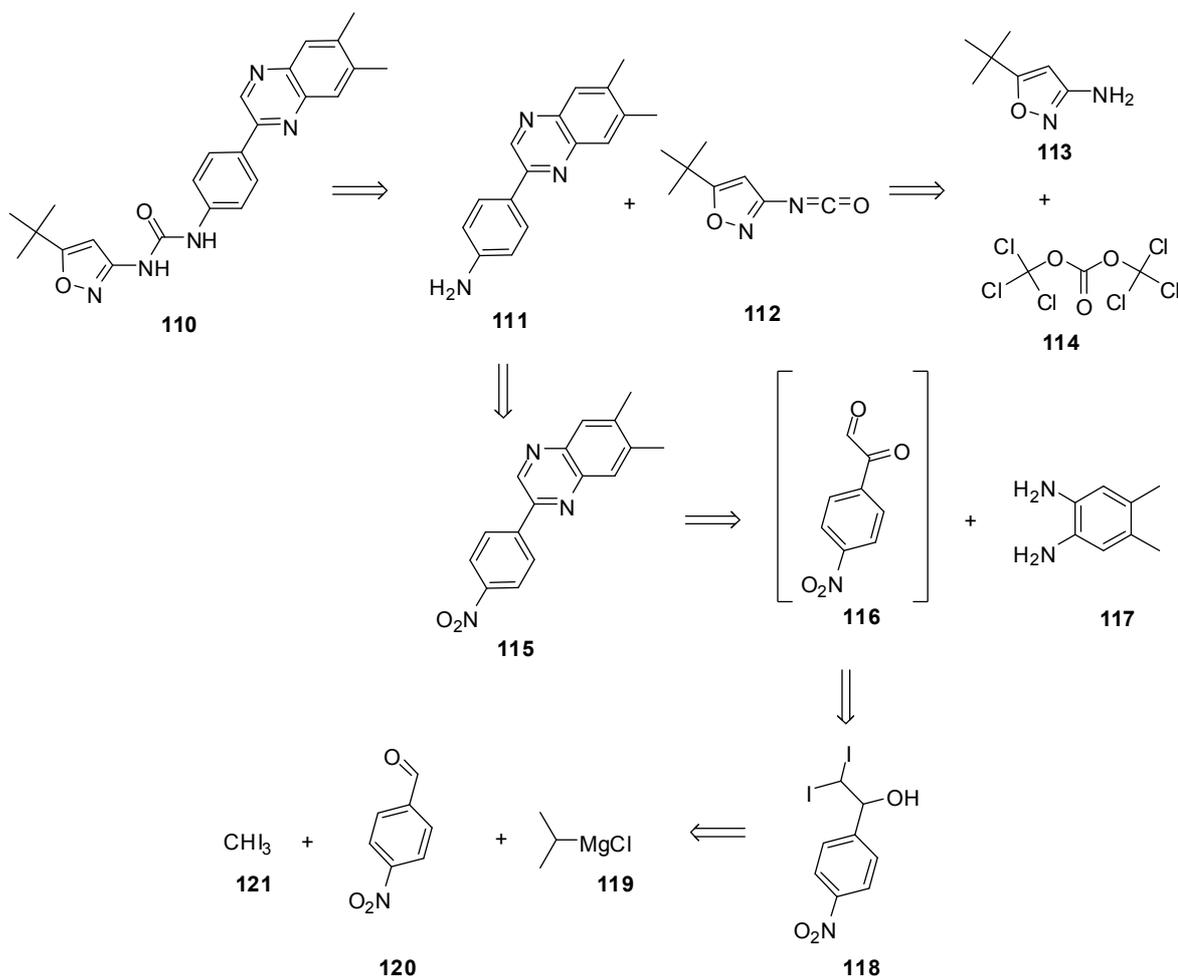


Abb. 64: Retrosynthetische Analyse des Harnstoffs **110**.

Zunächst folgt die Beschreibung der Synthese des Chinoxalins (**111**), bevor über die Harnstoffsynthese von Zielverbindung (**110**) berichtet wird. 4-Nitrobenzaldehyd (**120**) wurde mit CHI_3 (**121**) und $i\text{PrMgCl}$ (**119**) in abs. THF zu dem Diiodalkohol (**118**) umgesetzt (Abb. 65).^[243] Die Synthese erfolgte unter Argon-Atmosphäre und Wasserausschluss bei -78°C und nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte der Diiodalkohol (**118**) mit einer Ausbeute von 71% isoliert werden. Im Anschluss wurde der Diiodalkohol (**118**) mit IBX in DMSO bei RT (über die Zwischenstufe des Diiodketons) zum α -Ketoaldehyd (**116**) oxidiert, das *in situ* mit 2,4-Dimethyl-2-aminoanilin (**117**) bei 90°C unter Zugabe von AcOH zu Chinoxalin (**115**) reagierte (Abb. 65).^[243] Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte das Chinoxalin (**115**) mit einer guten Ausbeute von

80% gewonnen werden. Schließlich folgte die Hydrierung der Nitrogruppe von Verbindung (**115**) mit Fe/FeCl₃/AcOH in EtOH zu Chinoxalin (**111**), das mit einer guten Ausbeute von 77% erhalten werden konnte (Abb. 65).^[244] Ein alternativer Syntheseversuch, die Reduktion von Verbindung (**115**) mit Pd/C/H₂ durchzuführen, blieb erfolglos.

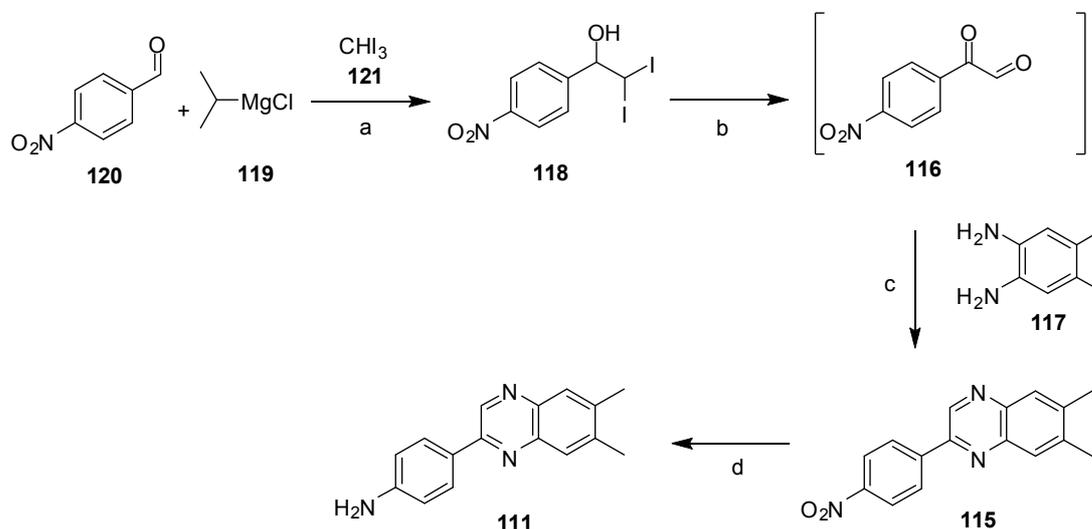


Abb. 65: Synthese von Amin **111**. Reagenzien und Bedingungen: (a) THF, -78°C, 1 h, 71%, (b, c) *in situ*, IBX, DMSO, RT-50°C, 20 h, AcOH, EtOH, 90°C, 1h, 80% (d) Fe, FeCl₃, EtOH, AcOH, 80°C, 1 h, 77%.

Die Synthese von Harnstoff (**110**) erfolgte in Toluol bei 110°C ausgehend von Chinoxalin (**111**) und Amin (**113**), das *in situ* zu Beginn der Synthese bei -10°C mit Triphosgen (**114**) zu Isocyanat (**112**) umgesetzt wurde (Abb. 66).^[151] Nach der wässrigen Aufarbeitung und Umkristallisation aus EtOH wurde der Harnstoff (**110**) mit einer Ausbeute von 77% als gelber Feststoff isoliert (Abb. 66).

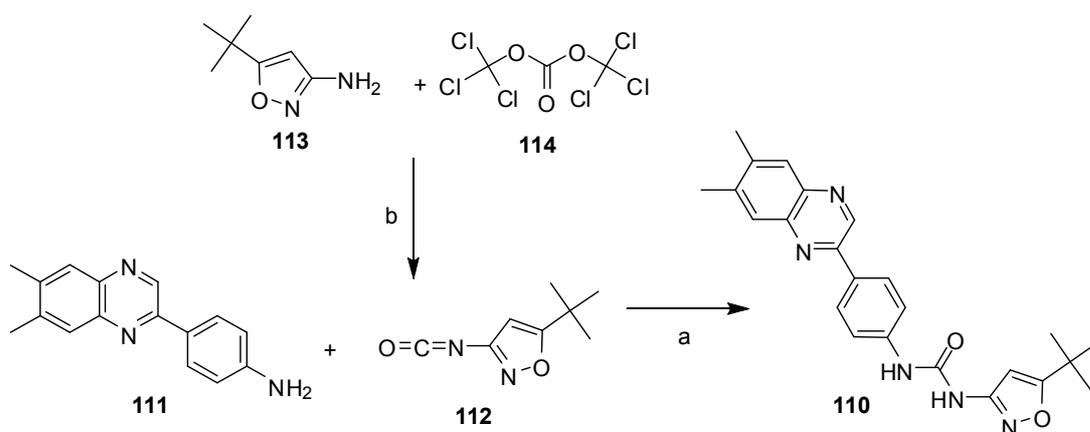


Abb. 66: Synthese von Harnstoff **110**. Reagenzien und Bedingungen: (a, b) *in situ*, Toluol, -10°C, 1h, 110°C, 15 h, 77%.

In der folgenden Tabelle 15 sind die Ausbeute, Reinheit, der clogP- sowie der tPSA-Wert des Harnstoffs (**110**) dargestellt.

Tab. 15: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Wert des Harnstoffs **110**.

Verbindung	BSc-Nummer	Ausbeute [%] ^a	HPLC-Reinheit [%]	clogP ^b	tPSA ^b
110	5110	77	95	5.7	87.4

^a Ausbeute bezogen auf die letzte Stufe

^b clogP- und tPSA-Wert berechnet mit ChemDraw10.0

Der Harnstoff (**110**) liegt mit einem clogP-Wert von 5.7 und einem tPSA-Wert von 87.4 in einem für Wirkstoffe angemessenen Bereich.

3.5.2 Biologische Aktivität des Harnstoffs (**110**)

Der Harnstoff (**110**) wurde in einem zellulären FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Kinase-Assay der Firma Cerep auf die FLT3-inhibitorische Wirkung untersucht.^[241] Dabei wird die Inhibition von FLT3 in Prozent als Quotient der spezifischen Aktivität des Inhibitors und der spezifischen Aktivität einer Kontrollsubstanz (Staurosporin) bei einer spezifischen Konzentration angegeben. Der Harnstoff (**110**) wurde bei einer Konzentration von 100 nM vermessen (Tab. 16).

Tab. 16: Biologische Aktivität des Harnstoffs **110** auf FLT3.

Verbindung	BSc-Nummer	Inhibition FLT3 [%]
110	5110	66

^a (spezifische Aktivität Probe/ spezifische Aktivität Staurosporin) *100, bei 100 nM

Mit einer Inhibition von 66% bei einer Konzentration von 100 nM ist der Harnstoff (**110**) ein recht potenter FLT3-Inhibitor und inhibiert im unteren nanomolaren Bereich. Er stellt daher strukturell eine gute Ausgangsverbindung weiterer FLT3-Inhibitoren dar. Es ist daher sinnvoll, weitere Harnstoffderivate herzustellen und auf ihre FLT3-inhibitorische Wirkung testen zu lassen.

3.5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Während dieser Arbeit gelang die Synthese des Harnstoffs (**110**), der die Struktur motive des Harnstoffs und des Chinoxalins der beiden FLT3-Inhibitoren (**35**) und (**108**) zu einer neuen Verbindung (**110**) zusammenführt. Der Harnstoff (**110**) wurde in einem zellulären FLT3-Assay auf eine inhibitorische Wirkung getestet und eine Inhibition von 66% bei einer

Konzentration von 100 nM motiviert zu neuen Synthesen. Die neu gefundene Strukturklasse bietet vielfältige Möglichkeiten der Derivatisierung. So ist es eine Möglichkeit, verschiedene Substituenten auf das Chinoxalingerüst einzuführen, die zum einen zusätzlich die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen und zum anderen zusätzliche Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von FLT3 eingehen sollten (Abb. 67). Dabei sollten die Substituenten eher klein gewählt werden, damit die Molmasse der resultierenden Verbindungen nicht zu groß wird.

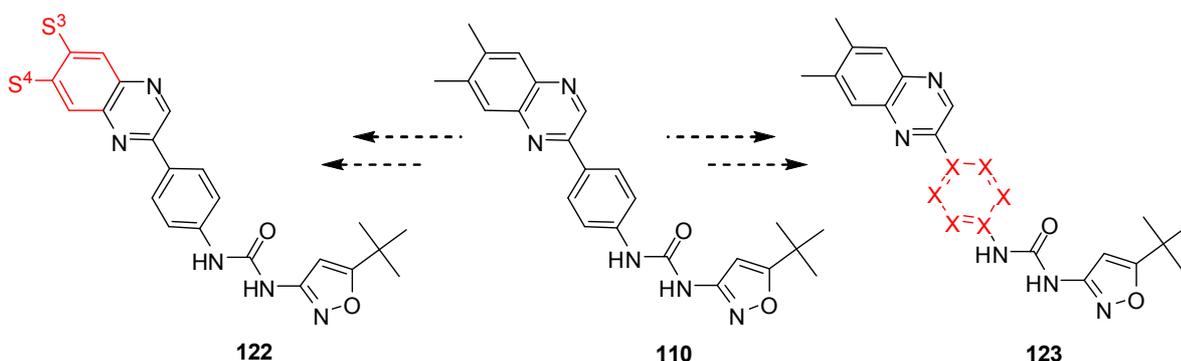


Abb. 67: Derivatisierungsmöglichkeiten des Harnstoffs **110**, S³ und S⁴: verschiedene Substituenten, X: Heteroatom oder Kohlenstoff.

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung sieht vor, das aromatische System des Harnstoffs (**110**) durch diverse Heteroaromaten auszutauschen (Abb. 67). Die Wahl der Derivatisierung sollte anhand der Ergebnisse eines computergestützten Protein/Ligand-Dockings getroffen werden, welches exemplarisch für die folgenden Harnstoffderivate (**122a-b**) und (**123a-d**) durchgeführt wurde (Abb. 68):

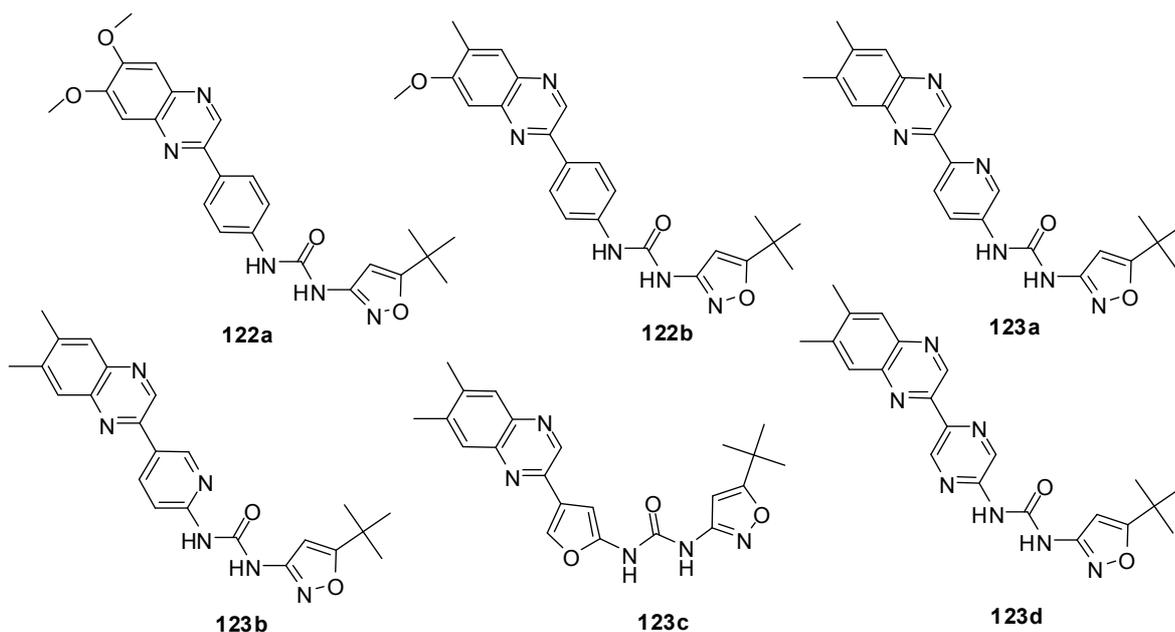


Abb. 68: Harnstoffderivate **122a-b** und **123a-d** als potentielle FLT3-Inhibitoren.

Das Protein/Ligand-Docking der Harnstoffderivate (**122a-b**) und (**123a-d**) (durchgeführt nach der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode) zeigt plausible Bindungsmodi der Harnstoffderivate (**122a-b**) und (**123a-d**) und sehr vielversprechende *scores*, die in der folgenden Tabelle 17 aufgeführt sind:

Tab. 17: Vergleich der durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG berechneten Bindungsenthalpien.

Verbindung	score [kcal/mol]
122a	-14.01
122b	-13.61
123a	-12.98
123b	-12.96
123c	-11.96
123d	-13.02

Mit Ausnahme von Harnstoff (**123c**) liegen die *scores* der Harnstoffderivate alle in dem sehr guten Bereich der Ausgangsverbindung (**110**) und kommen als potentielle FLT3-Inhibitoren in Frage. Am Beispiel von Harnstoff (**123a**) ist noch einmal die am besten bewertete Konformation mit dem aktiven Zentrum der Kinase-Domäne von FLT3 dargestellt (Abb. 69).

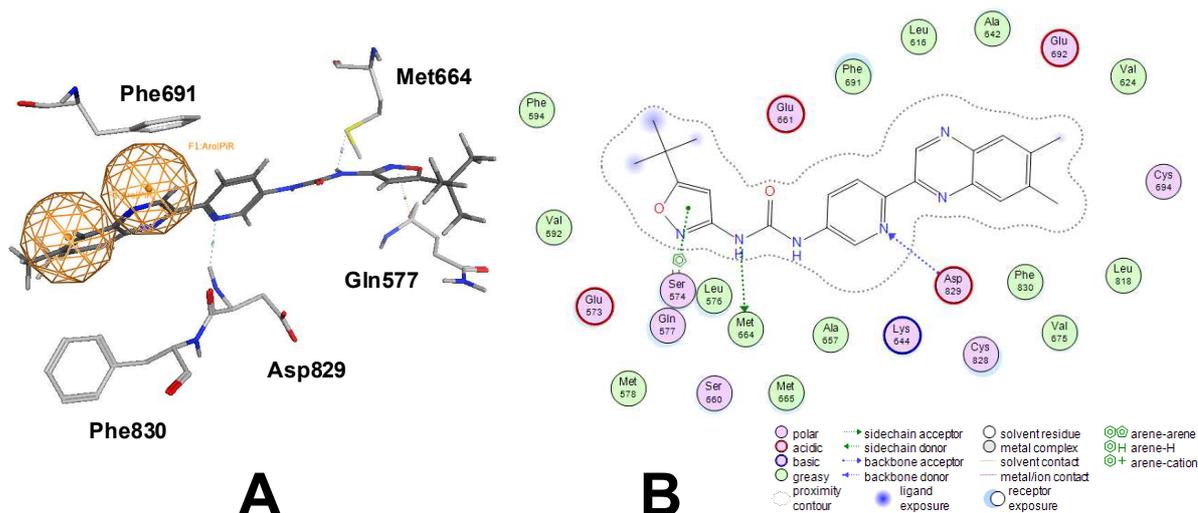


Abb. 69: **A:** Docking des Harnstoffs **123a**, **B:** Wechselwirkungen des Harnstoffs **123a** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

Neben einer Wasserstoffbrücke des Harnstoffs zu Met664 kommt es bei Harnstoffderivat (**123a**) zu einer Wechselwirkung des Stickstoffs des neu eingeführten Pyridins mit Asp829. Aufgrund der Ergebnisse des Protein/Ligand-Dockings erscheinen die Harnstoffderivate (**122a-b**) und (**123a-d**) sehr aussichtsreiche FLT3-Inhibitoren zu sein und motivieren zu der Synthese weiterer Harnstoffderivate.

3.6 Computergestütztes Wirkstoffdesign am Beispiel von Meprin β -Inhibitoren

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen steht der Forschung heutzutage auch das computergestützte rationale Wirkstoffdesign zur Verfügung. Konnte die Tertiärstruktur eines Enzyms durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden, können im Folgenden Inhibitorstrukturen als potentielle Wirkstoffe durch computergestütztes Protein/Ligand-Docking gefunden werden. Bei einem Protein/Ligand-Docking wird zunächst die Konformation des Proteins generiert, im Anschluss daran wird der Ligand in verschiedenen Konformationen im aktiven Zentrum des Proteins platziert und die verschiedenen Konformationen, anhand der berechneten freien Bindungsenthalpien des Liganden, bewertet. Anhand der Bindungsmodi und der berechneten Bindungsenthalpien können Aussagen über die Eignung des Liganden als potentieller Wirkstoff getroffen werden. Für ein Protein/Ligand-Docking stehen auch diverse Datenbanken mit Liganden als potentielle Wirkstoffe zur Verfügung. Mit solchen Datenbanken können sogenannte *screenings* durchgeführt werden, bei welchen eine Vielzahl an Liganden in das aktive Zentrum eines Targets gedockt werden, um neue Wirkstoffklassen zu finden.

Wie in Abschnitt 1.3 ausführlich beschrieben, ist Meprin β mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen assoziiert und steht daher als Target für potentielle Wirkstoffe im Interesse aktueller Forschung. Die Proteolyse von APP, einem Meprin β Substrat, zu den A β -Peptiden und die Ablagerung der A β -Peptide im Zentralnervensystem gilt nach der Amyloid-Hypothese als Hauptursache der Alzheimer-Demenz (Abb. 05, Abschnitt 1.1.3). Die Arbeitsgruppe um BIEN konnte in verschiedenen *in vitro* Experimenten eine Meprin β katalysierte Bildung von A β -Peptiden zeigen, die ähnlich dem β -Sekretase katalysierten Abbau von APP zu den A β -Peptiden verläuft.^[205] Demnach könnte die Inhibition von Meprin β ein therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer-Demenz sein.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein dockingbasiertes virtuelles *screening* einer Datenbank mit 294.343 Verbindungen durchgeführt werden, um mögliche Struktur motive der Meprin β -Inhibitoren zu erschließen. Aussichtsreiche Verbindungen des virtuellen *screenings*, sogenannte hits, sollten hergestellt und in einem Assay auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bezüglich Meprin β getestet werden.

Da von Meprin β bisher keine Röntgenstrukturanalysen kokristallisierter Inhibitoren in der Proteindatenbank PDB veröffentlicht wurden,^[245] musste zunächst ein plausibler Bindungsmodus postuliert werden. Hierzu wurde zunächst Actinonin (**46**), ein bekannter Meprin-Inhibitor, in das aktive Zentrum von Meprin β gedockt und ein geeignetes Pharmakophormodell evaluiert (Abb. 70). Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte des Dockings sowie die Ergebnisse genau erläutert, bevor die Synthese potentieller Meprin β -Inhibitoren beschrieben wird.

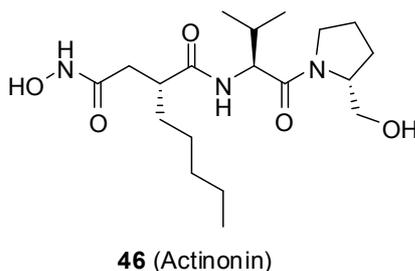


Abb. 70: Der Meprin-Inhibitor Actinonin **46**.

3.6.1 Beschreibung des durchgeführten Dockings

Die Struktur von Meprin β konnte 2012 durch Röntgenkristallstrukturanalyse von der Gruppe um AROLAS aufgeklärt werden.^[170] Die resultierende Röntgenkristallstruktur (PDB: 4GWN) von Meprin β ohne einen kokristallisierten Inhibitor wurde in dem durchgeführten Docking verwendet. Zunächst erfolgte die Analyse des aktiven Zentrums von Meprin β , um essentielle Interaktionen mit potentiellen Inhibitoren zu postulieren. Anhand des Zinkions, das bei Meprin β als Metalloprotease im aktiven Zentrum enthalten ist, wurde das aktive Zentrum lokalisiert. Betrachtet man den Meprin-Inhibitor Actinonin (**46**), so fallen primär seine chelatisierende Hydroxamsäurefunktion sowie ein hydrophober Alkylrest auf. Für diese beiden Struktur motive wurden daraufhin komplementäre Proteinstrukturen identifiziert. Es wurde als plausibel angenommen, dass die Hydroxamsäure von Actinonin (**46**) mit dem Zinkion des aktiven Zentrums interagiert (die Carbonylgruppe als Akzeptor und die Hydroxygruppe als Donor), während der Pentylrest des Actinonins (**46**) in eine hydrophobe Region des aktiven Zentrums von Meprin β orientiert ist (Abb. 71). Das Docking wurde mit MOE2012.10 durchgeführt (zur generellen Methodik siehe Abschnitt 3.5).^[239]

Die plausibelste Konformation von Actinonin (**46**) im aktiven Zentrum von Meprin β ist in der Abbildung 71A dargestellt, die genauen Wechselwirkungen des Actinonins (**46**) mit dem aktiven Zentrum von Meprin β in Abbildung 71B:

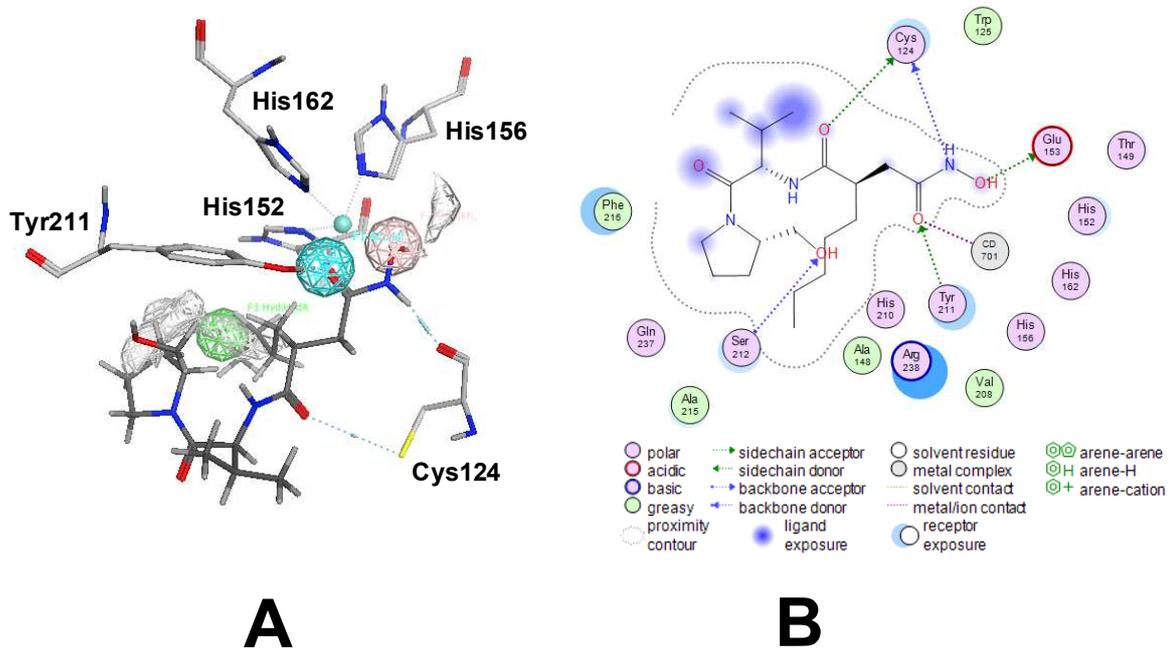


Abb. 71: **A:** Docking von Actinonin **46**, weiß dargestellt: hydrophobe Region, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **B:** Wechselwirkungen des Actinonins **46** mit dem aktiven Zentrum von Meprin β .

Tyr211 bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe der Hydroxamsäure von Actinonin (**46**), die außerdem von dem Zinkion im aktiven Zentrum komplexiert wird (Abb. 71B). Das Amid der Hydroxamsäure von Actinonin (**46**) bildet eine Wechselwirkung mit dem Rückgrat von Cys124, während die Hydroxygruppe der Hydroxamsäure mit Glu153 interagiert (Abb. 71B). Eine weitere Hydroxygruppe von Actinonin (**46**) bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat von Ser212 (Abb. 71B).

Die Histidine His162, His156 und His152 bilden mit der Hydroxamsäurefunktionalität des Actinonins (**46**) und dem Zinkion im Zentrum eine quadratisch pyramidale Geometrie aus (Abb. 72). Die Carbonylgruppe der Hydroxamsäure (Akzeptor) wird durch Tyr211 in Position gehalten, während das Amid und die Hydroxygruppe (Donor) der Hydroxamsäure durch Wechselwirkungen mit Glu153 und Cys124 stabilisiert werden (Abb. 72).

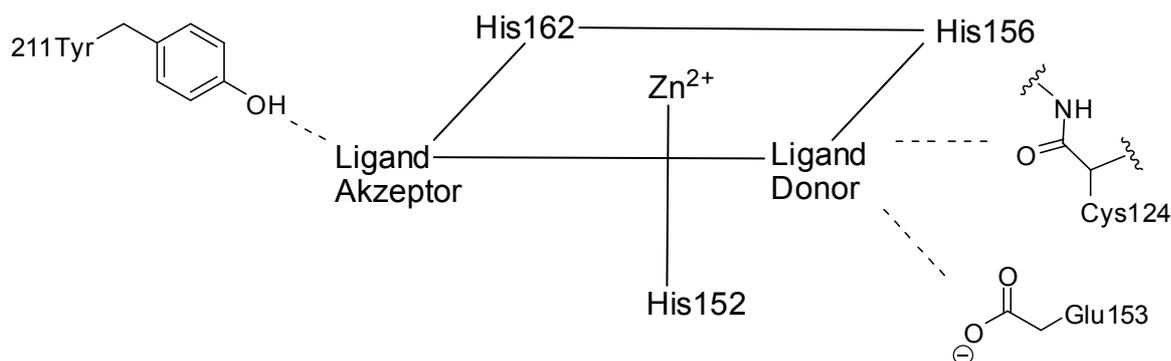


Abb. 72: Schematische Darstellung der plausiblesten Konformation von Actinonin **46** im aktiven Zentrum von Meprin β.

Die Analyse des Bindungsmodus von Actinonin (**46**) im aktiven Zentrum von Meprin β sowie die Analyse der Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum erschienen plausibel. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde das virtuelle *screening* der Datenbank durchgeführt. Die genutzte MOE Conformer Datenbank enthält kommerzielle Moleküle verschiedener Anbieter, die aufgrund ihrer Molmassen, clogP- sowie tPSA-Werten als potentielle Leitstrukturen geeignet sind. Die 294.343 Liganden der genutzten Datenbank wurden in das aktive Zentrum von Meprin β gedockt. Dabei wurde die pharmakophorbasierte Methode in Anlehnung an das Docking von Actinonin (**46**) gewählt, die vorsah, den hydrophoben Rest eines Liganden in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums zu orientieren und die Kopfgruppe eines Liganden mit Akzeptor/Donor-Motiv in entsprechend quadratisch pyramidaler Geometrie mit den Histidinen His162, His156, His152 und dem Zinkion im Zentrum zu orientieren. Die 1000 generierten Konformationen jeder Verbindung wurden mit der Funktion London dG bewertet. Die Konformationen mit einer Bindungsenthalpie (*score*) < -10 kcal/mol wurden erneut mit der beschriebenen pharmakophorbasierten Methode gedockt. Dabei wurden 1000 Konformationen pro Verbindung gedockt, die zunächst wieder mit der Funktion London dG bewertet wurden. Im Anschluss wurden die besten 30 Konformationen jeder Verbindung mit dem Kraftfeld Amber12:EHT energieminiert, wobei die Seitenketten der Aminosäuren im aktiven Zentrum flexibel waren. Die generierten Konformationen wurden mit der Funktion GBVI/ WSA dG bewertet.

Im Anschluss an das zweite Docking erfolgte eine Bewertung der Bindungsmodi der Dockingergebnisse. Zunächst erfolgte die Bewertung der Verbindungen, welche die besten Bindungsenthalpien (*scores*) lieferten. Schnell wurde ersichtlich, dass die sehr großen Verbindungen ausschließlich unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum eingehen.

Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse des Dockings im Anschluss nach der Liganden-Effizienz, anstelle der Bindungsenthalpie, sortiert. Die Liganden-Effizienz gibt den Quotienten aus der berechneten freien Bindungsenthalpie (*Score*) und der Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome an (S/n , bei $S = \textit{Score}$, $n = \text{Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome}$). Auch hier erfolgte die Bewertung der Bindungsmodi der Konformationen mit der besten Liganden-Effizienz. Hierbei zeigten sich plausible Wechselwirkungen der Verbindungen mit dem aktiven Zentrum von Meprin β . In der folgenden Abbildung sind die Verbindungen mit den zehn besten Dockingergebnissen in Bezug auf die Liganden-Effizienz dargestellt (Abb. 73):

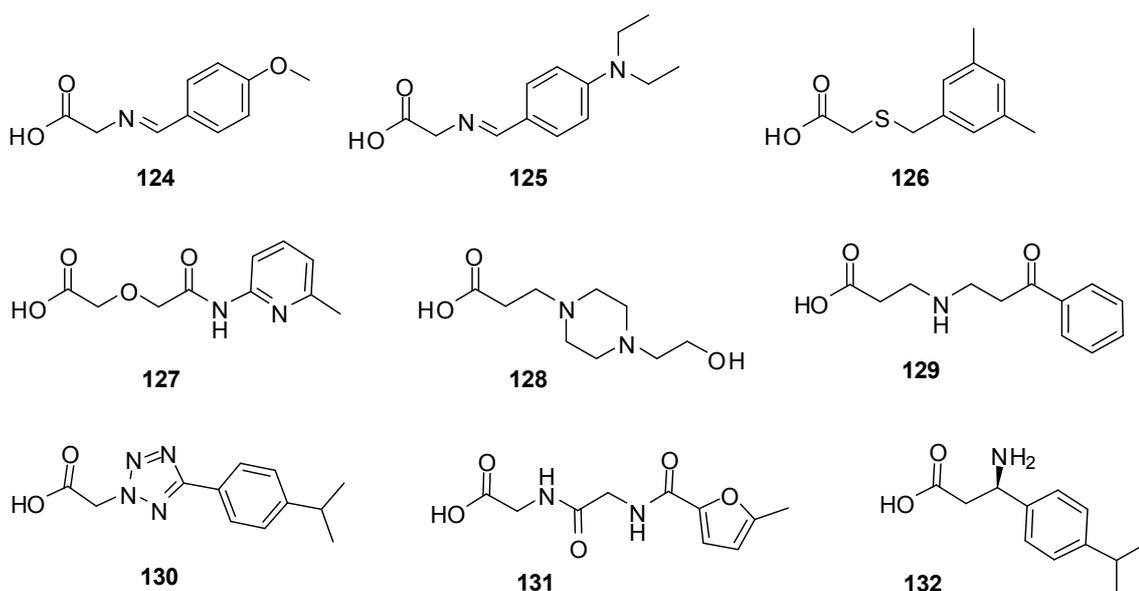


Abb. 73: Die Verbindungen der zehn besten Dockingergebnisse in Bezug auf die Liganden-Effizienz.

Dabei fiel auf, dass unter den besten zehn Ergebnissen (in Bezug auf die Liganden-Effizienz) die Verbindung (126) mit zwei nahezu identischen Konformationen enthalten ist. Die Strukturen enthalten alle als Donor/Akzeptor-Motiv eine Carbonsäure und als hydrophoben Rest ein aromatisches System.

Die berechnete Liganden-Effizienz sowie die freie Bindungsenthalpie der Verbindungen aus Abb. 73 sind in der folgenden Tabelle 18 dargestellt:

Tab. 18: Liganden-Effizienz und Bewertung der freien Bindungsenthalpie durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG für die zehn besten Konformationen des Dockings in Bezug auf die Liganden-Effizienz.

Verbindung	Liganden-Effizienz [kcal/mol]	score [kcal/mol]
46	-0.29	-7.95
124	-0.58	-8.09
125	-0.55	-9.39
126	-0,53	-7.35
127	-0.51	-8.16
126	-0.49	-6.90
128	-0.48	-6.78
129	-0.48	-7.65
130	-0.47	-8.47
131	-0.47	-7.99
132	-0.47	-7.00

Die plausiblen Bindungsmodi der Verbindungen (124-126) werden im Folgenden exemplarisch erläutert. Die besten Konformationen der Verbindungen (124-125) sind in der folgenden Abbildung 74 dargestellt.

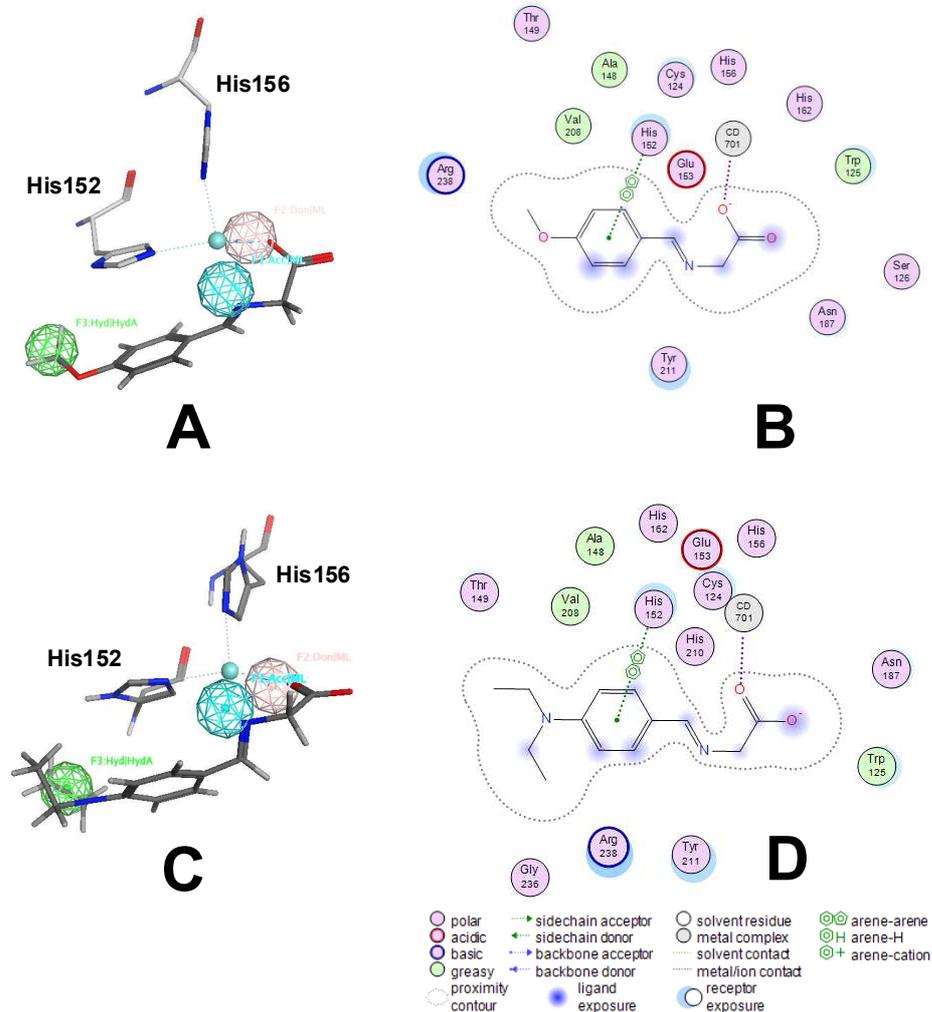


Abb. 74: **A:** Docking der Verbindung **124**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **B:** Wechselwirkung der Verbindung **124** mit dem aktiven Zentrum des Proteins, **C:** Docking von Verbindung **125**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **D:** Wechselwirkung der Verbindung **125** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

Aus den Abbildungen 74B und 74D ist ersichtlich, dass die Verbindungen (**124**) und (**125**) die gleichen Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum eingehen. Es kommt zu π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Systeme der Verbindungen (**124**) und (**125**) mit His152, außerdem koordiniert die Säurefunktionalität der Verbindungen (**124**) und (**125**) an das Zinkion im aktiven Zentrum.

Bei der Verbindung (**126**) kommt es zu zusätzlichen Wechselwirkungen, die in der folgenden Abbildung 75 aufgezeigt sind:

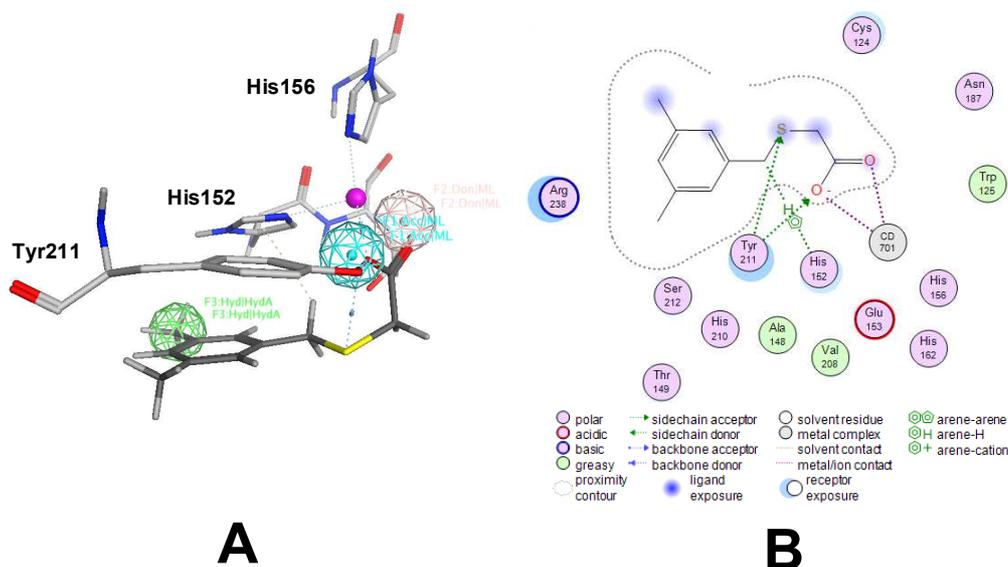


Abb. 75: **A:** Docking der Verbindung **126**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **B:** Wechselwirkungen der Verbindung **126** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

Auch bei Verbindung (**126**) kommt es zu einer π -Wechselwirkung mit His152 und zu einer Komplexierung der Säurefunktionalität von Verbindung (**126**) an das Zinkion im aktiven Zentrum. Zusätzlich bildet Tyr211 eine Wasserstoffbrücke mit dem Schwefel der Verbindung (**126**) aus.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Analyse der Bindungsmodi, dass Verbindung (**126**) ein aussichtsreicher potentieller Meprin β -Inhibitor zu sein scheint. Die Säurefunktionalität als Donor/Akzeptor-Motiv zur Koordination des Zinkions sowie ein hydrophobes, aromatisches System zur Orientierung in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums sind gegeben. Auch die zusätzliche Wechselwirkung des Schwefels mit Tyr211 ist plausibel.

Es resultierte die Idee, die Säurefunktionalität der Verbindung (**126**) durch eine Hydroxamsäure zu ersetzen, die neue Verbindung (**133**) erneut zu docken und die Ergebnisse mit dem Docking von Verbindung (**126**) zu vergleichen (Abb. 76). Die Hydroxamsäure ist ein gängiges Motiv zur Metallkomplexierung und ist auch in dem Meprin-Inhibitor Actinonin (**46**) enthalten.

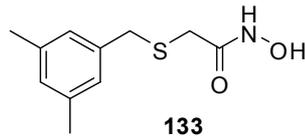


Abb. 76: Schwefelhaltige Hydroxamsäure **133**.

Die Ergebnisse des Dockings für die beste berechnete Konformation der Verbindung (**133**) sind in der folgenden Tabelle 19 dargestellt:

Tab. 19: Liganden-Effizienz und Bewertung der freien Bindungsenthalpie durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG für die beste Konformation von Verbindung **133**.

Verbindung	Liganden-Effizienz [kcal/mol]	score [kcal/mol]
133	-0.75	-11.19

Die Verbindung (**133**) zeigt einen sehr vielversprechenden score von -11.10 kcal/mol bei einer sehr hohen Liganden-Effizienz von 0.75 kcal/mol. Der Bindungsmodus und die Wechselwirkungen der Verbindung (**133**) mit dem aktiven Zentrum sind der folgenden Abbildung 77 zu entnehmen:

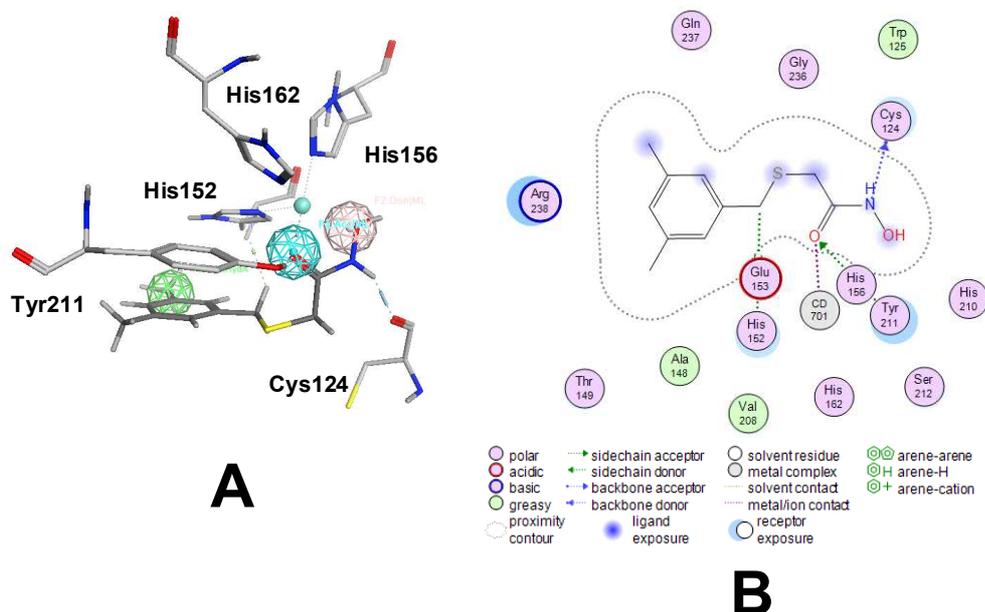


Abb. 77: A: Docking von Verbindung **133**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **B:** Wechselwirkungen der Verbindung **133** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

Bei der Verbindung (**133**) kommt zu einer σ - π -Wechselwirkung mit His152, während die Carbonylgruppe der Hydroxamsäure von Verbindung (**133**) koordinativ an das Zinkion bindet

und eine Wechselwirkung mit Tyr211 eingeht. Das Amid bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat von Cys124. Bei der Verbindung (**133**) zeigen sich im Vergleich zu der Ausgangsverbindung (**126**) noch zusätzliche Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum des Proteins (Abb. 77B). Daraus ergibt sich die bessere Bewertung mit einem *score* von -11.19 kcal/mol bei Verbindung (**133**) im Vergleich zu -7.35 kcal/mol bei Verbindung (**126**).

Beide Verbindungen kommen als potentielle Meprin β -Inhibitoren in Frage und sind synthetisch leicht zugänglich. Die Verbindungen (**126**) und (**133**) sollten im Folgenden hergestellt werden, um sie in einem geeigneten Assay-System auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bezüglich Meprin β zu untersuchen und die Ergebnisse mit dem durchgeführten Docking zu vergleichen.

Die Imine (**124**) und (**125**) (Abb. 73) sind als Meprin β -Inhibitoren zu nukleophil und sollen daher im Folgenden nicht synthetisiert und auf eine inhibitorische Wirkung getestet werden. Allerdings inspirierten die Ergebnisse des Dockings der Imine (**124**) und (**125**) zu einem weiteren Protein/Ligand-Docking der Harnstoffe (**134**) und (**135**) (Abb. 78). Als aromatische Reste wurden die Reste der Schwefelverbindungen (**126**) und (**133**) gewählt. Auch die beiden Harnstoffe (**134**) und (**135**) sollten als Zink-koordinierende Einheit ein Säure- bzw. Hydroxamsäuremotiv enthalten (Abb. 78).

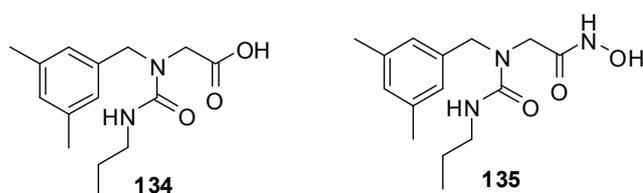


Abb. 78: Harnstoffderivate **134** und **135**.

Durch das Einführen einer Harnstofffunktionalität mit einer aliphatischen Seitenkette sollten zusätzliche Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von Meprin β anhand des Dockings abgeleitet werden können. Die Selektivität der Harnstoffe (**134**) und (**135**) bezüglich der Inhibition von Meprin β gegenüber anderen Metalloproteasen sollte durch die zusätzlichen Wechselwirkungen der aliphatischen Seitenkette im aktiven Zentrum, im Vergleich zu den Schwefelverbindungen (**126**) und (**133**), verbessert werden.

Die Ergebnisse des Dockings für die am besten bewertete Konformation der Harnstoffe (**134**) und (**135**) sind der folgenden Tabelle 20 zu entnehmen:

Tab. 20: Liganden-Effizienz und Bewertung der freien Bindungsenthalpie durch die *scoring* Funktion GBVI/WSA dG für die besten Konformationen der Harnstoffe **134** und **135**.

Verbindung	Liganden-Effizienz [kcal/mol]	score [kcal/mol]
134	-0.75	-15.04
135	-0.59	-12.49

Die Harnstoffe (**134**) und (**135**) weisen beide sehr hohe Liganden-Effizienzen auf und zeigen sehr vielversprechende scores (Tab. 20). Auffällig ist hier, dass der Harnstoff (**134**) mit der Carbonsäurefunktionalität im Vergleich zu Harnstoff (**135**) mit der Hydroxamsäurefunktionalität durch die *scoring* Funktion besser bewertet wird.

Die Bindungsmodi der am besten bewerteten Konformationen der Harnstoffe (**134**) und (**135**) sind der folgenden Abbildung 79 zu entnehmen:

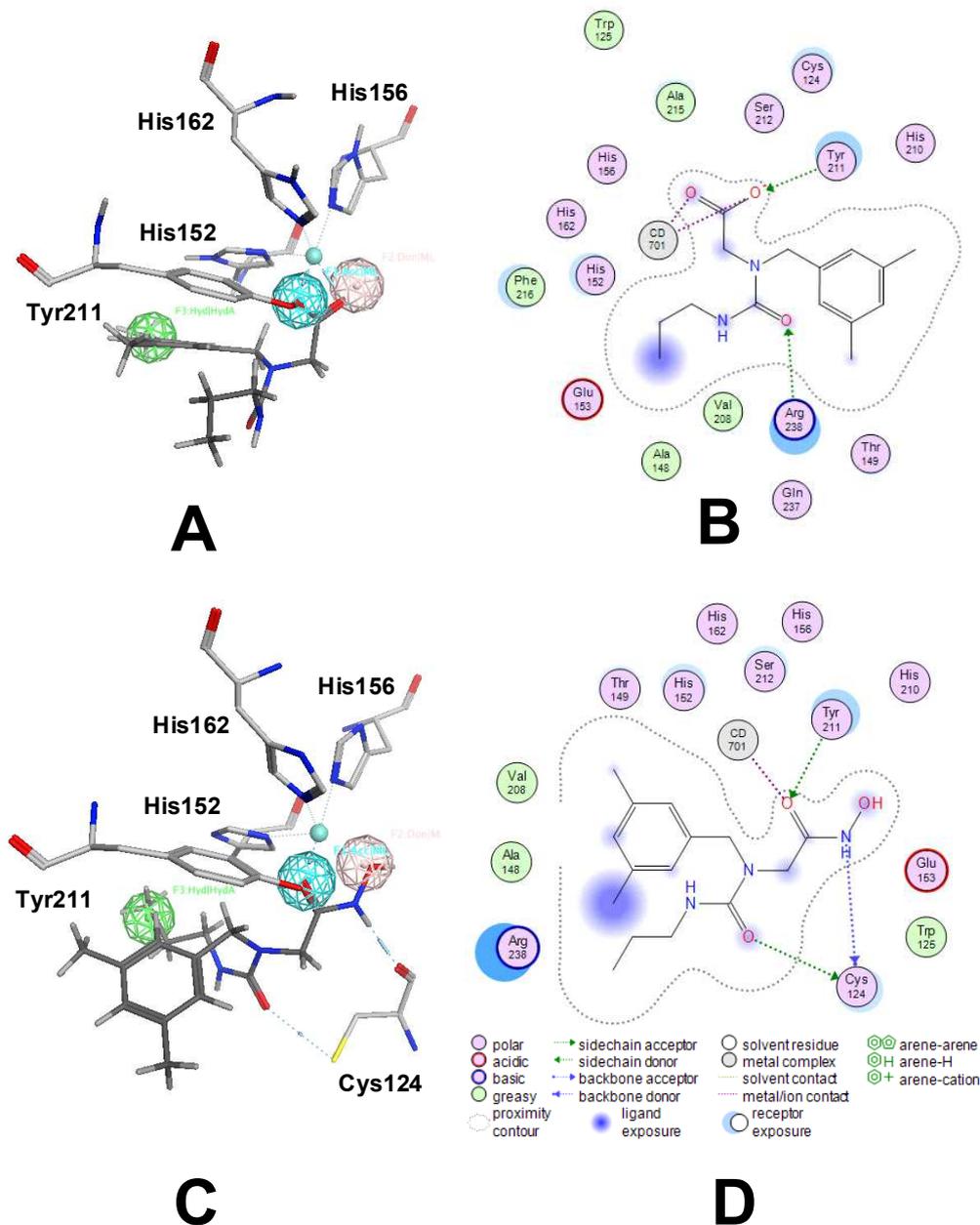


Abb. 79: **A:** Docking des Harnstoffs **134**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **B:** Wechselwirkungen des Harnstoffs **134** mit dem aktiven Zentrum des Proteins, **C:** Docking des Harnstoffs **135**, grüner, blauer und lila Pharmakophorfilter: hydrophobe Wechselwirkung, Akzeptor- und Donormotiv, **D:** Wechselwirkungen des Harnstoffs **135** mit dem aktiven Zentrum des Proteins.

Die Säurefunktionalität des Harnstoffs (**134**) koordiniert an das Zinkion im aktiven Zentrum und auch eine Seitenkette von Tyr211 geht eine Wechselwirkung mit der Säurefunktionalität ein. Zusätzlich kommt es zu einer Interaktion zwischen der Carbonylfunktionalität des Harnstoffs mit einer Seitenkette von Arg238. Die Carbonylfunktionalität des Harnstoffs (**135**)

geht eine Wechselwirkung mit der Seitenkette von Cys124 ein, während das Amid der Hydroxamsäure eine Wasserstoffbrücke mit Cys124 bildet. Das Zinkion interagiert mit der Carbonylfunktionalität der Hydroxamsäure.

Die beiden Harnstoffe (**134**) und (**135**) sind sehr aussichtsreiche potentielle Meprin β -Inhibitoren und sollen folglich hergestellt und *in vitro* auf ihre inhibitorische Wirkung getestet werden.

Zusammenfassend sind in der folgenden Abbildung 80 noch einmal alle Verbindungen dargestellt, die aufgrund ihrer vielversprechenden Dockingergebnisse synthetisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich Meprin β untersucht werden sollen:

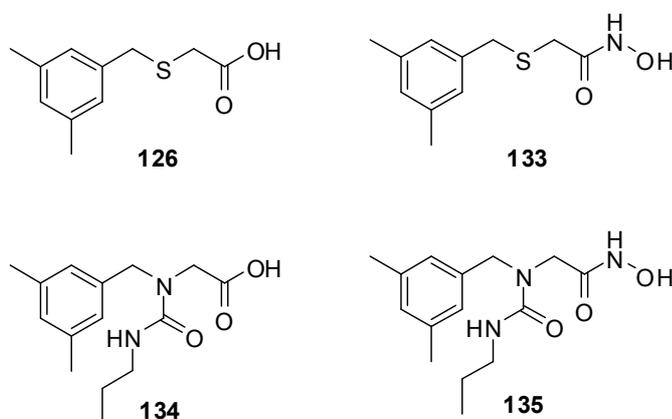


Abb. 80: Schwefelverbindungen **126** und **133** sowie Harnstoffe **134** und **135** als potentielle Meprin- β -Inhibitoren.

3.6.2 Synthese der potentiellen Meprin β -Inhibitoren

Zunächst wird die Methodenplanung der Synthese der Schwefelverbindungen (**126**) und (**133**) erläutert, bevor im Folgenden die Synthese der Verbindungen (**126**) und (**133**) beschrieben wird. Die Hydroxamsäure (**133**) kann aus der Säure (**126**) gewonnen werden, die aus dem entsprechenden Ester (**136**) durch eine nukleophile Substitution aus Thiol (**137**) und Bromid (**138**) erhalten werden kann (Abb. 81).

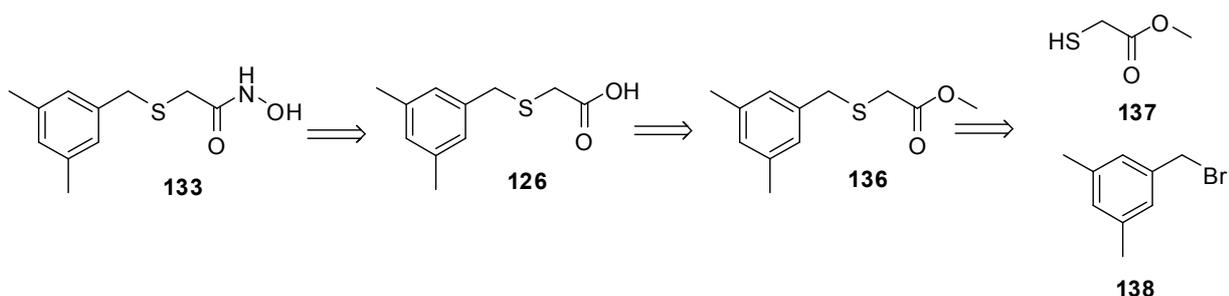


Abb. 81: Retrosynthetische Analyse der Verbindungen **133** und **126**.

Zunächst wurden Bromid (**138**) und Thiol (**137**) in basischer Lösung bei 80°C zu dem Ester (**136**) umgesetzt, der im Folgenden durch basische Esterhydrolyse mit KOH in wässriger Dioxan-Lösung zu der Säure (**126**) freigesetzt wurde. Nach der wässrigen Aufarbeitung konnte die Säure (**126**) mit einer guten Ausbeute von 83% isoliert werden (Abb. 82). Die Säure (**126**) reagierte durch Aktivierung mit PyBOP in basischer Lösung mit Hydroxylaminhydrochlorid (**139**) zu der Hydroxamsäure (**133**), die nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 84% gewonnen werden konnte (Abb. 82).

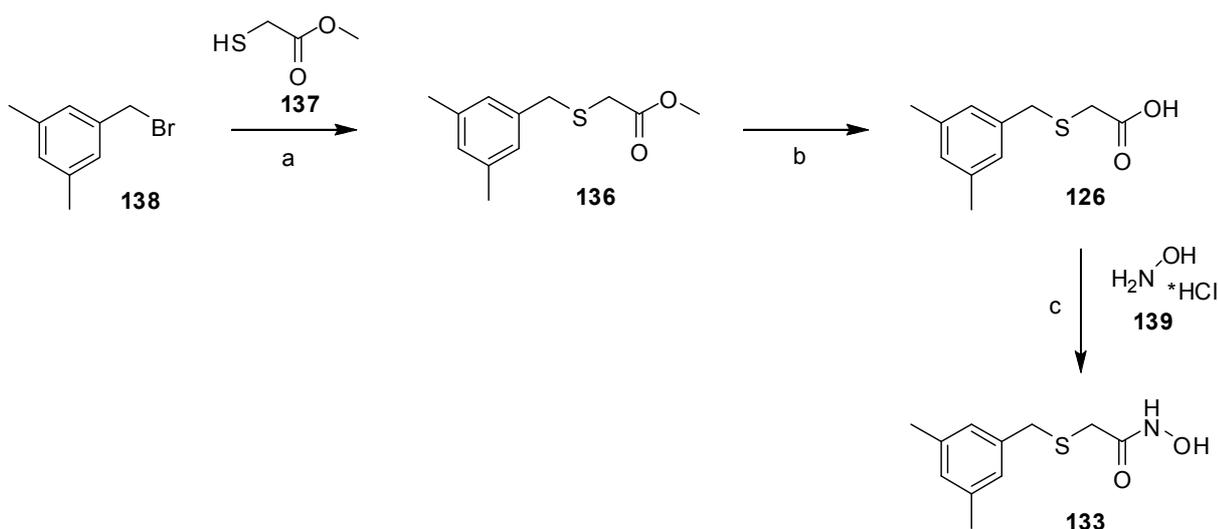


Abb. 82: Synthese der Verbindungen **126** und **133**, Reagenzien und Bedingungen: (a) TEA, MeCN, 80°C, 1 h, 90%, (b) KOH, Dioxan/Wasser, 75°C, 12 h, 84%, (c) PyBOP, TEA, DCM, RT, 48 h, 83%.

Im Folgenden wird die Methodenplanung der Synthese der Harnstoffe (**134**) und (**135**) beschrieben, bevor die Synthese der Verbindungen erläutert wird (Abb. 83). Die Hydroxamsäure (**135**) kann aus der Carbonsäure (**134**) generiert werden, die aus dem entsprechenden Ester (**140**) gewonnen werden kann (Abb. 83). Das Harnstoffmotiv von Ester (**140**) ist aus Amin (**141**) und Isocyanat (**142**) zugänglich (Abb. 83). Das Amin (**141**) kann aus 3, 5-Dimethylbenzaldehyd (**144**) und Glycin-*tert.*-Butylesterhydrochlorid (**143**) hergestellt werden (Abb. 83).

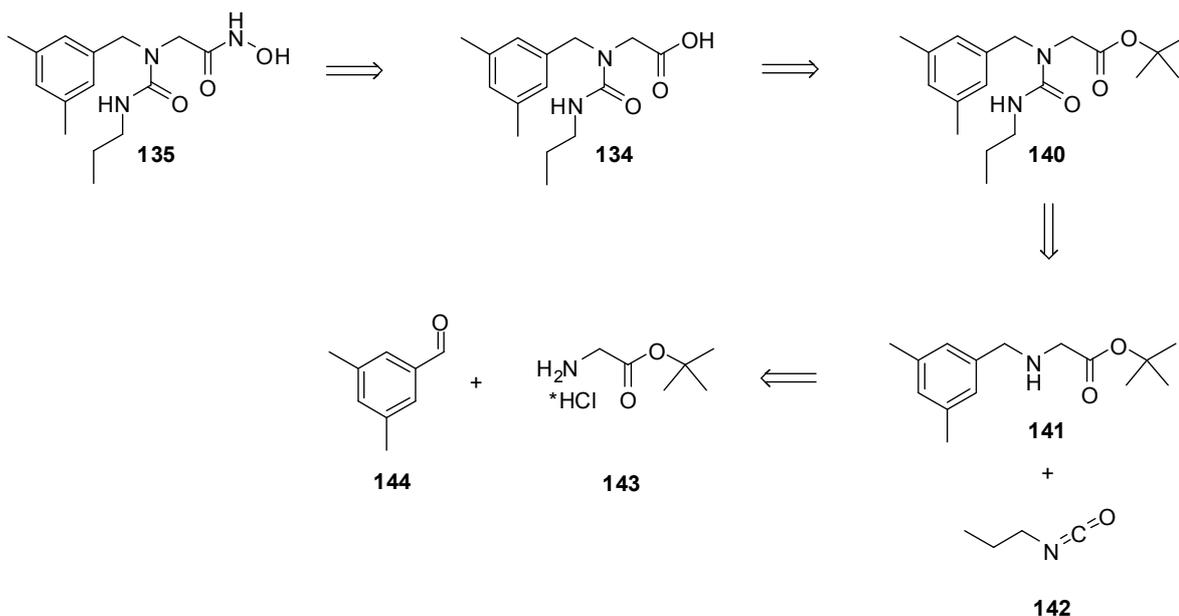


Abb. 83: Retrosynthetische Analyse der Harnstoffe **134** und **135**.

Zunächst wird 3, 5-Dimethylbenzaldehyd (**144**) mit Glycin-*tert.*-Butylesterhydrochlorid (**143**) unter Zugabe von NaOAc und NaCNBH₃ bei RT zu Amin (**141**) umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Amin (**141**) mit einer Ausbeute von 55% als farbloses Öl isoliert werden (Abb. 84). Bei der folgenden Harnstoffsynthese mit Amin (**141**) und Isocyanat (**142**) cyclisierte der zu synthetisierende Harnstoff (**140**) allerdings *in situ* zu der Verbindung (**145**), die nach säulenchromatographischer Reinigung mit NMR und Massenspektrometrie charakterisiert wurde (Abb. 84).

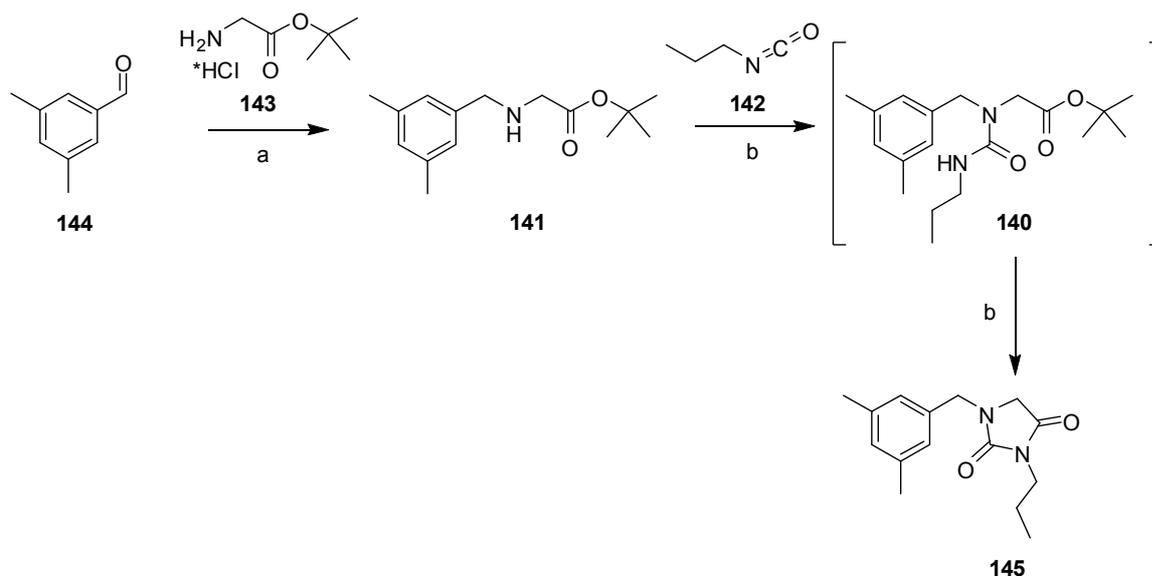


Abb. 84: Synthese der Verbindung **145**, Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOAc, NaCNBH₃, MeOH, RT, 2 h, 55%, (b) Cs₂CO₃, DMF, RT, 4 h, 52%.

Die Synthese der Harnstoffe (**134**) und (**135**) scheiterte aufgrund der in Abbildung 84 dargestellten Cyclisierungsreaktion und die Harnstoffe (**134**) und (**135**) konnten im Folgenden nicht hergestellt werden.

In der folgenden Tabelle 21 sind die Ausbeute, Reinheit, der clogP- sowie der tPSA-Wert der synthetisierten Schwefelverbindungen (**126**) und (**133**) dargestellt:

Tab. 21: Ausbeute, HPLC-Reinheit, clogP- und tPSA-Werte der Verbindungen **126** und **133**.

Verbindung	BSc-Nummer	Ausbeute [%] ^a	HPLC-Reinheit [%]	clogP ^b	tPSA ^b
126	5113	84	98	3.1	37.3
133	5116	83	98	2.0	49.3

^a Ausbeute bezogen auf die letzte Stufe

^b clogP- und tPSA-Werte berechnete mit ChemDraw10.0

Die Verbindungen (**126**) und (**133**) weisen einen sehr polaren Charakter auf und kommen als potentielle Wirkstoffe mit clogP-Werten von 2.0 und 3.1 sowie tPSA-Werten von 37.3 und 49.3 in Frage.

3.6.3 Biologische Aktivität der Verbindungen (126) und (133)

Die Verbindungen (126) und (133) werden in einem zellulären *in vitro* Meprin β -Assay in der Arbeitsgruppe von Prof. Pietrzik an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf ihre inhibitorische Wirkung getestet.^[205] Als Zelllinie dienen transfizierte HEK293T-Zellen, die APP und Meprin β überexprimieren. Die Auswertung des Assays erfolgt über eine Expressionsanalyse mittels Western Blotting der Proteine APP, Tubulin, Meprin β und A β . Die Messungen sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen, die ersten Ergebnisse werden im Folgenden erläutert. Abbildung 85 zeigt die verfügbaren Western Blots von A β , APP, Tubulin und Meprin β des Assays von Verbindung (126) bei verschiedenen Konzentrationen sowie die Negativkontrolle (DMSO) und die Positivkontrolle (Actinonin (46), Inhibitorkonzentration 10 μ M):

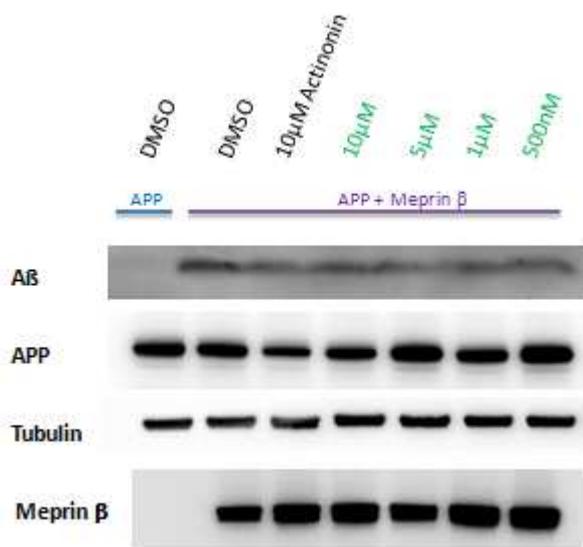


Abb. 85: Western Blots von A β , APP, Tubulin und Meprin β des Assays von Verbindung 126.

Die Western Blots von APP, Tubulin und Meprin β dienen ausschließlich der Expressionskontrolle und zeigen eine konstante Proteinexpression. Im Falle einer Inhibition von Meprin β sollte eine Reduktion von A β aufgrund der Inhibition der APP-Prozessierung zu erkennen sein. Aus den Western Blots der Negativ- (DMSO) und Positivkontrolle (Actinonin (46) 10 μ M) kann dieser Effekt beobachtet werden. Im Falle der Verbindung (126) kann aus den Western Blots keine eindeutige Aussage über eine inhibitorische Wirkung von Meprin β getroffen werden. Die A β -Banden der Verbindung (126) erscheinen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle schwächer, was für eine Inhibition von Meprin β spricht; allerdings ist keine Konzentrationsabhängigkeit des potentiellen Inhibitors (126) erkennbar.

Um eine konkrete Aussage über die inhibitorische Wirkung von Verbindung (126) treffen zu können, wird das Meprin β -Assay der Verbindung (126) aktuell wiederholt.

Die folgende Abbildung 86 zeigt die Western Blots von A β , APP, Tubulin und Meprin β des Assays von Verbindung (133) bei verschiedenen Konzentrationen sowie die Negativkontrolle (DMSO) und die Positivkontrolle (Actinonin (46), Inhibitorkonzentration 10 μ M):

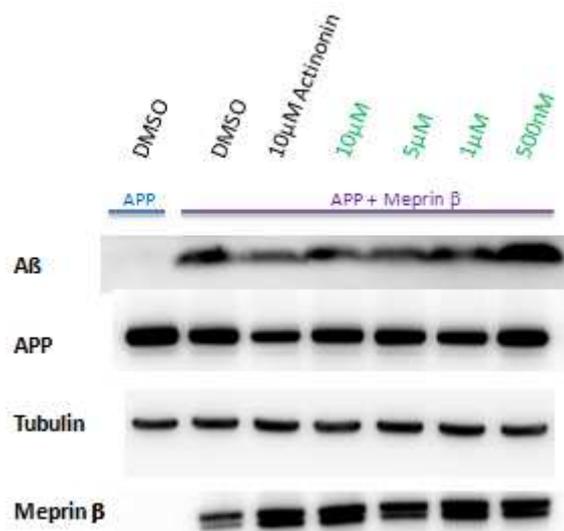


Abb. 86: Western Blots von A β , APP, Tubulin und Meprin β des Assays von Verbindung 133.

Auch hier zeigen die Western Blots von APP, Tubulin und Meprin β eine konstante Proteinexpression. Für die Verbindung (133) scheint die Bildung von A β mit steigender Konzentration gehemmt zu werden, was für eine Meprin β inhibitorische Wirkung der Verbindung (133) spricht. Allerdings scheint auch hier der Inhibitor Actinonin (46) die bessere Wirkung zu zeigen.

Aktuell werden die durchgeführten Western Blots der Meprin β Assays von den Verbindungen (126) und (133) in unabhängigen Experimenten wiederholt, um eine endgültige Aussage über ihre inhibitorische Eigenschaft gegenüber Meprin β treffen zu können. Im Anschluss daran soll eine quantitative Auswertung folgen.

3.6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Protein/Ligand-Docking mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin (**46**) und dem Protein Meprin β mithilfe einer selbst entwickelten pharmakophorbasierten Methode durchgeführt werden. Anhand der pharmakophorbasierten Methode konnte im Anschluss ein dockingbasiertes virtuelles *screening* durchgeführt werden. Nach der Analyse der Bindungsmodi der einzelnen Docking-Ergebnisse konnte die Leitstruktur (**126**) als potentieller Meprin β -Inhibitor abgeleitet werden. Entsprechend der Leitstruktur (**126**) wurden die Verbindungen (**126**) und (**133**) hergestellt, die in einem Meprin β -Assay auf die inhibitorische Wirkung untersucht werden. Die ersten Assay-Ergebnisse der Verbindungen (**126**) und (**133**) sind vielversprechend, die Substanzen geben Hinweise darauf, eine Meprin β inhibitorische Wirkung zu haben. Die aktuell durchgeführten Messungen der Meprin β Assays der Verbindungen (**126**) und (**133**) bleiben abzuwarten. Die Synthese der Harnstoffe (**134**) und (**135**) sollte aufgrund der aussichtsreichen Assay-Ergebnisse der Schwefelverbindungen (**126**) und (**133**) wiederholt werden. Um eine Cyclisierungsreaktion (Abb. 84) zu vermeiden, wird die folgende Synthesemethode vorgeschlagen:

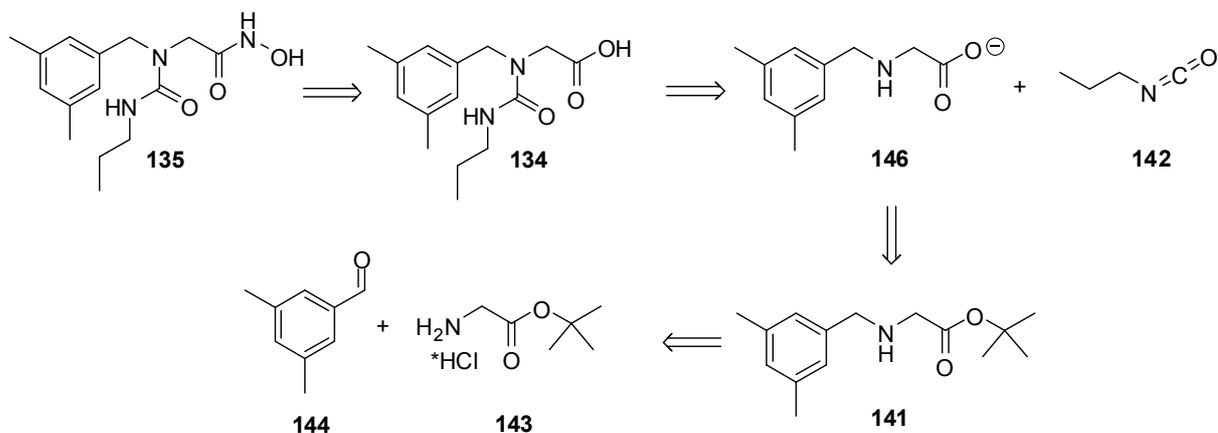


Abb. 87: Neuer Synthesevorschlag zur Herstellung der Harnstoffe **145** und **135**.

Demnach könnte die Hydroxamsäure (**135**) aus der entsprechenden Säure (**134**) generiert werden, die direkt aus dem Carboxylat (**146**) und dem Isocyanat (**142**) hergestellt werden kann. Das Carboxylat (**146**) kann hydrolytisch aus dem Ester (**141**) gewonnen werden, der ausgehend von Aldehyd (**144**) und Amin (**143**) über eine reduktive Aminierung zugänglich ist (Abb. 87). Durch die vorzeitige Hydrolyse des Esters (**141**) zu Carboxylat (**146**) sollte eine Cyclisierungsreaktion (vgl. Abb. 84) während der anschließenden Harnstoffsynthese aufgrund der geringen Elektrophilie des Carboxylatkohlenstoffs der Aminosäure (**146**) auszuschließen

sein. Nach der erfolgreichen Synthese der Harnstoffe **(134)** und **(135)** sollten diese in dem Meprin β -Assay auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht werden.

Sollten die folgenden Assay-Messungen der hergestellten Substanzen eine Inhibition von Meprin β bestätigen, könnten virtuelle *screenings* umfangreicher Datenbanken mithilfe der entwickelten pharmakophorbasierten Methode durchgeführt werden, um neue Leitmotive als Meprin β -Inhibitoren zu finden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

a) Es konnte eine Reihe Verbindungen verschiedener Strukturklassen hergestellt werden, die *in vitro* auf eine modulatorische Wirkung der γ -Sekretase getestet wurden. Darunter befanden sich Carbazolderivate, Tocopherolderivate, Chromanderivate sowie Cumarinderivate. Viele Verbindungen zeigten eine Modulation der γ -Sekretase im unteren mikromolaren Bereich. Die Assay-Ergebnisse trugen dazu bei, die Hypothese zum Bindungsmodus der γ -Sekretase-Modulatoren nach SCHMIDT *et al.* (Abb. 20) zu unterstützen. Ein hydrophober Alkylrest in Kombination mit einer Carbonsäurefunktionalität scheint einen Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase auszuüben. Da bislang keine Röntgenkristallstruktur der γ -Sekretase publiziert werden konnte und der Wirkmechanismus der Modulatoren nicht eindeutig geklärt werden konnte, ist die Suche nach neuen und potenteren Strukturmotiven schwierig. Daher erscheint die weitere Synthese potentieller γ -Sekretase-Modulatoren nicht geboten.

b) Weiterhin konnten verschiedene Indolinoderivate synthetisiert werden, die *in vitro* auf eine inhibitorische Wirkung der Kinase FLT3 untersucht wurden. Einige zeigten eine Inhibition von FLT3 im nanomolaren Bereich. Allerdings konnten die Aktivitäten der zuvor schon im Arbeitskreis SCHMIDT hergestellten Indolinoderivate nicht gesteigert werden, weshalb im Folgenden von der Synthese weiterer Indolinoderivate abgesehen werden soll. Die Synthese eines Harnstoffderivats mit einem enthaltenen Chinoxalinmotiv als potentieller FLT3-Inhibitor dagegen verlief vielversprechend. Das Harnstoffderivat (**110**) zeigte eine inhibitorische Wirkung auf FLT3 im unteren nanomolaren Bereich. Das Docking weiterer möglicher Derivate motiviert dazu, weitere Harnstoffderivate mit Chinoxalinmotiven zu synthetisieren und auf die Inhibition von FLT3 zu untersuchen.

c) Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, ausgehend von der Röntgenkristallstruktur von Meprin β , ein plausibles Protein/Ligand Docking des Meprin-Inhibitors Actinonin (**46**) in das aktive Zentrum der Metalloprotease durchzuführen. Anhand der Analyse der Interaktionen von Actinonin (**46**) mit dem aktiven Zentrum konnte ein Pharmakophormodell für ein folgendes dockingbasiertes virtuelles *screening* entwickelt werden. Aus den Ergebnissen des virtuellen *screenings* konnte eine interessante Leitstruktur (**126**) als potentieller Meprin β -Inhibitor abgeleitet werden. Die Säure (**126**) und davon abgeleitet die Hydroxamsäure (**133**) wurden hergestellt und werden aktuell *in vitro* auf eine inhibitorische Wirkung der Metalloprotease Meprin β untersucht.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Alle Lösungsmittel, Edukte und die Reagenzien wurden bei verschiedenen Anbietern (ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Lancaster, Merck, Sigma Aldrich, VWR) in hoher Reinheit erworben und direkt eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet. Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion bei $\lambda = 254$ nm, sowie zum Teil durch Anfärben und anschließende Wärmebehandlung mit Vanillinlösung (0.5 g Vanillin, 85 mL MeOH, 10 mL AcOH, 5 mL konz. H₂SO₄).

HPLC:

Die HPLC-Messungen wurden an einem Agilent 1100 durchgeführt. Es wurde folgende Säule verwendet: reversed-phase, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 nm. Die Wellenlängendetektion erfolgte bei 254 nm. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser in verschiedenen Gradientenmischungen. Die Messzeit betrug 12-15 min.

Kernresonanzspektroskopie:

Alle NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern DRX 300 sowie DRX 500 der Firma Bruker Biospin GmbH gemessen. Lösungsmittel und Messfrequenzen sind den spektroskopischen Daten der jeweiligen Substanzen zu entnehmen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet. Zur Bestimmung der Protonensignale werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett), m (Multiplett). Die Kopplungskonstanten werden in Hertz (Hz) angegeben.

Massenspektrometrie

ESI-MS-Spektren wurden mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer aufgenommen. Für die Aufnahme der EI-MS-Spektren wurde ein doppelt fokussierendes Massenspektrometer MAT 95 verwendet. Die detektierten Ionenmassen m/z werden in u angegeben, die relativen Intensitäten in Bezug auf die Intensität des stärksten Signals in Prozent.

Infrarotspektroskopie

IR-Spektren wurden an einem Perkin Elmer FT-IR Spektrometer Paragon 1000 PC aufgenommen.

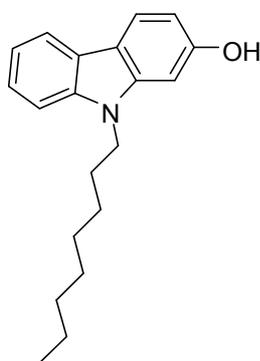
Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korngröße 15-40 μm) der Firma Merck verwendet. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur.

5.2 Beschreibung der Synthesen

5.2.1 Synthese der Carbazolderivate

9-Octyl-9*H*-carbazol-2-ol (**59**)

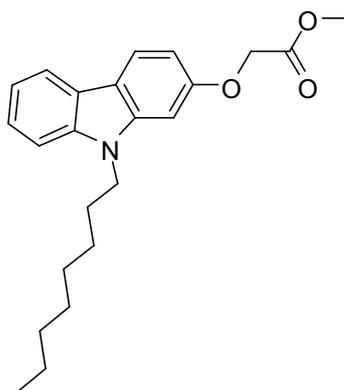


NaH (989 mg, 40.95 mmol) wird unter Argon-Atmosphäre in tr. THF (10 mL) suspendiert und auf -78°C gekühlt, zu der Suspension wird eine Lösung aus 2-Hydroxycarbazol (**61**) (1500 mg, 8.19 mmol) in tr. DMF (10 mL) zugetropft. Nach 30 min. Rühren wird Octyliodid (**62**) (1970 mg, 8.19 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 h gerührt, mit Wasser (30 mL) versetzt und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung (3x 100 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2:1)) gereinigt.

Ausbeute: 1275 mg (53%) von (**59**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 9.24$ min., 97%.

Methyl-2-(9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (57)



Zu einer Lösung aus 9-Octyl-9H-carbazol-3-ol (**59**) (300 mg, 1.02 mmol) in Aceton (4 mL) wird K_2CO_3 (447 mg, 3.30 mmol) zugegeben. Zu der Suspension wird Bromessigsäuremethylester (**60**) (234 mg, 3.30 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung 20 h bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 371 mg (99%) von (**57**) als gelbes Öl.

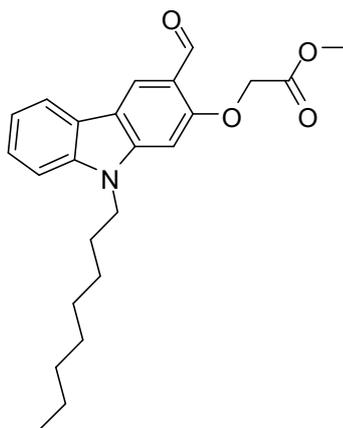
HPLC: $R_t = 10.05$ min., 99%.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 300K): $\delta = 6.72$ -7.92 (m, 7H), 4.78 (s, 2H), 4.11 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.74 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1.16-1.24 (m, 10H), 0.78 (t, $^3J = 6$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 300K): $\delta = 168.6, 156.0, 140.6, 139.7, 123.7, 121.8, 120.1, 118.6, 117.9, 116.8, 107.5, 105.7, 94.0, 65.1, 51.2, 42.1, 30.8, 28.4, 27.8, 28.2, 26.3, 21.6, 13.0$ ppm.

EI-MS: $m/z = 367$ [M^+].

Methyl-2-(3-formyl-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (**56**)^[209]



N,N-Diisopropylformamid (70 mg, 0.54 mmol) wird versetzt mit POCl₃ (342 mg, 2.16 mmol). Zu dieser Lösung wird eine auf 0°C gekühlte Lösung aus Methyl-2-(9-octyl-9*H*-carbazol-2-yloxy)-acetat (**57**) (133 mg, 0.36 mmol) in DCE (4 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 48 h bei 90°C gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (2x 50 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (2x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 139 mg (97%) von (**56**) als roter Feststoff.

HPLC: R_t = 9.78 min., 98%.

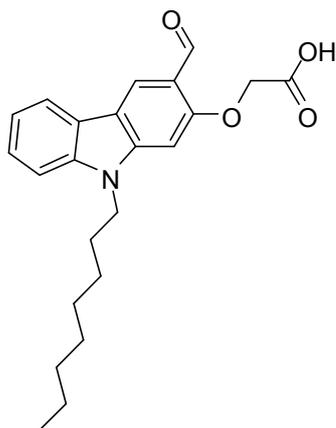
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300K): δ = 10.49 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.16-7.97 (m, 4H), 6.59 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.13 (t, ³J = 9 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 1.76 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1.17-1.26 (m, 10H), 0.78 (t, ³J = 9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300K): δ = 189.1, 168.8, 159.7, 145.2, 141.3, 125.9, 123.3, 121.7, 120.5, 120.3, 118.8, 118.0, 109.1, 91.8, 66.3, 52.4, 43.3, 31.8, 29.3, 29.1, 28.7, 27.5, 22.6, 14.0 ppm.

ESI-MS: *m/z* = 395 [M+Na]⁺.

IR: 1736 cm⁻¹ ν(C-O) (Aldehyd).

2-(3-Formyl-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-essigsäure (52)



Eine Lösung aus Methyl-2-(3-formyl-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (**56**) in MeOH (2 mL) wird mit KOH (22 mg, 0.39 mmol) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 2N HCl auf pH 2 gebracht und mit DCM (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus EE umkristallisiert.

Ausbeute: 17 mg (35%) von (**52**) als grüner Feststoff.

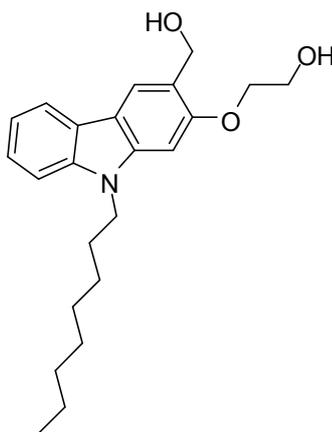
HPLC: R_t = 8.71 min., 98%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300K): δ = 10.09 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.35-7.19 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.18 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 1.79 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1.17-1.31 (m, 10H), 0.78 (t, ³J = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K): δ = 189.8, 168.8, 157.0, 144.0, 140.3, 126.3, 125.3, 121.9, 119.9, 119.2, 117.4, 117.2, 108.4, 93.2, 66.5, 42.6, 30.7, 28.3, 28.1, 27.7, 26.2, 21.6, 13.0 ppm.

ESI-MS: m/z = 404 [M+Na]⁺.

2-(3-(Hydroxymethyl)-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-ethanol (69)



Zu einer Lösung aus Methyl-2-(3-formyl-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (**56**) (100 mg, 0.25 mmol) in EtOH (2 mL) wird unter Argon-Atmosphäre eine Lösung aus NaBH₄ (19 mg, 0.50 mmol) in EtOH (1 mL) zugetropft und die Reaktionslösung wird 12 h bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (CHCl₃, CHCl₃/MeOH (100:1)) gereinigt.

Ausbeute: 32 mg (35%) von (**69**) als grüner Feststoff.

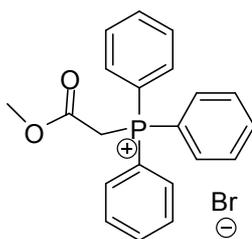
HPLC: R_t = 8.35 min., 87%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300K): δ = 7.88 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.08-7.32 (m, 3H), 6.67 (s, 1H), 4.14 (t, ³J = 3 Hz, 2H), 4.03 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 3.89 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 1.68 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1.21-1.15 (m, 12H), 0.77 (t, ³J = 6 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300K): δ = 155.8, 140.3, 139.4, 123.3, 122.0, 120.6, 120.6, 118.5, 118.0, 115.1, 107.5, 92.0, 69.8, 61.5, 60.1, 42.0, 30.8, 28.1, 28.1, 27.8, 26.2, 21.6, 13.0 ppm.

ESI-MS: m/z = 392 [M+Na]⁺.

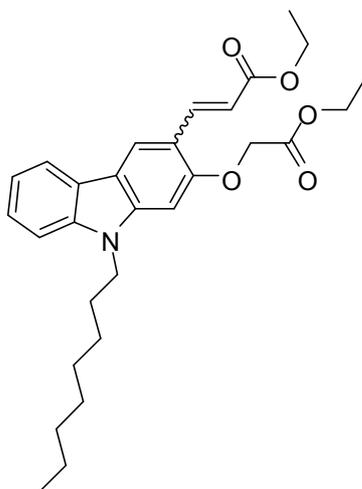
(2-Methoxy-2-oxoethyl)-triphenylphosphoniumbromid (65)



Triphenylphosphin (942 mg, 3.60 mmol) wird in THF (3 mL) gelöst und mit Bromessigsäuremethylester (**60**) (500 mg, 3.27 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wird 3 h bei RT gerührt, der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit THF gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1200 mg (99%) von (**65**) als farbloser Feststoff.

Ethyl-3-(2-(2-methoxy-2-oxoethoxy)-9-octyl-9H-carbazol-3-yl)-acrylat (**66**)^[211]

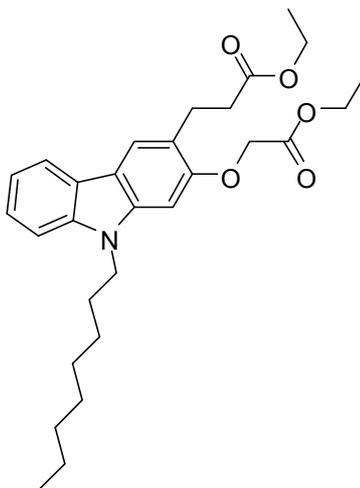


Zu einer Lösung aus Triphenylphosphoniumbromid (**65**) (105 mg, 0.25 mmol) und Methyl-2-(3-formyl-9-octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-acetat (**56**) (100 mg, 0.25 mmol) in EtOH (2 mL) wird unter Argon-Atmosphäre eine Lösung aus NaOEt (26 mg, 0.38 mmol) in EtOH (1 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 12 h bei 80°C gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in DCM (20 mL) gelöst, mit Wasser (2x 20 mL) und ges. NaCl-Lösung (2x 20 mL) gewaschen, die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 90 mg (75%) von (**66**) als gelbes Öl.

HPLC: R_t = 10.50 min., 65%.

Ethyl-3-(2-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-9-octyl-9H-carbazol-3-yl)-propanoat (67)



Zu einer Lösung aus Ethyl-3-(2-(2-methoxy-2-oxoethoxy)-9-octyl-9H-carbazol-3-yl)-acrylat (**66**) (90 mg, 0.19 mmol) in EtOH (4 mL) wird unter Argon-Atmosphäre Pd/C (9 mg) gegeben. Die Reaktionslösung wird unter H₂-Atmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird über Celite filtriert, das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/CH (3:1)) gereinigt.

Ausbeute: 28 mg (31%) von (**67**) als gelber Feststoff.

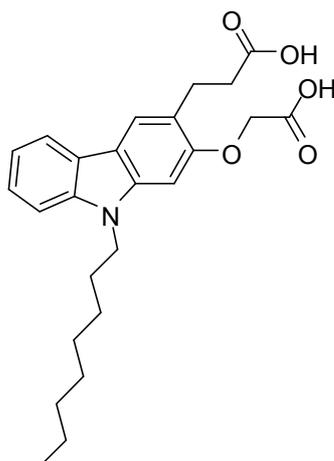
HPLC: R_t = 10.66 min., 87%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300K): δ = 7.88 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.08-7.32 (m, 3H), 6.62 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.19 (q, ³J = 9 Hz, 3H), 4.10 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 4.04 (q, ³J = 9 Hz, 3H), 3.09 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 2.68 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 1.74 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1.13-1.24 (m, 14H), 0.79 (t, ³J = 10 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300K): δ = 172.6, 168.0, 154.3, 139.4, 139.1, 123.3, 121.8, 120.7, 120.4, 118.5, 117.8, 115.7, 107.4, 90.9, 65.1, 60.3, 59.2, 42.1, 33.9, 30.8, 28.4, 27.9, 28.2, 25.9, 25.7, 21.6, 13.3, 13.2, 13.0 ppm.

ESI-MS: m/z = 392 [M+Na]⁺.

3-(2-(Carboxymethoxy)-9-octyl-9H-carbazol-3-yl)-propansäure (53)



Eine Lösung aus Ethyl-3-(2-(2-ethoxy-2oxoethoxy)-9-octyl-9H-carbazol-3-yl)-propanoat (**67**) (28 mg, 0.06 mmol) in MeOH (2 mL) wird mit KOH (20 mg, 0.35 mmol) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 2N HCl auf pH 2 gebracht und mit DCM (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus EE/CH umkristallisiert. **Ausbeute:** 18 mg (63%) von (**53**) als farbloser Feststoff.

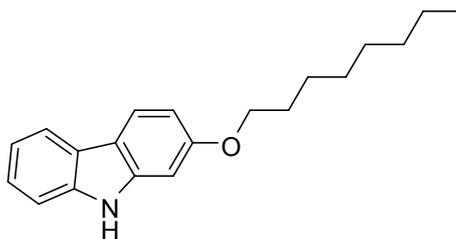
HPLC: R_t = 8.21 min., 93%.

¹H-NMR (CDCl₃/MeOD 11:1, 500 MHz, 300K): δ = 7.91 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.09-7.32 (m, 3H), 6.67 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.16 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2.71 (t, ³J = 8 Hz, 2H), 1.26 (p, ³J = 7 Hz, 2H), 1.17-1.26 (m, 12H), 0.79 (t, ³J = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃/MeOD 11:1, 125 MHz, 300K): δ = 175.3, 170.3, 154.2, 139.5, 139.2, 123.9, 121.7, 120.7, 120.3, 118.5, 117.8, 115.8, 107.5, 91.1, 64.8, 42.1, 33.9, 30.8, 28.4, 28.2, 28.0, 26.3, 25.6, 21.6, 13.0 ppm.

ESI-MS: m/z = 348 [M+Na].

2-(Octyloxy)-9H-carbazol (71)



NaH (346 mg, 14.40 mmol) wird unter Argon-Atmosphäre in tr. THF (10 mL) suspendiert und auf -78°C gekühlt, zu der Suspension wird eine Lösung aus 2-Hydroxycarbazol (**61**) (2000 mg, 10.92 mmol) in tr. DMF (10 mL) zugetropft. Nach 30 min. Rühren wird Octyliodid (**62**) (2620 mg, 10.92 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 h gerührt, mit Wasser (30 mL) versetzt und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung (3x 100 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/CH₂Cl₂ (2:1)) gereinigt.

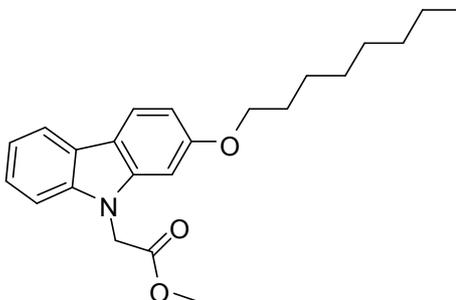
Ausbeute: 808 mg (25%) von (**71**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 9.94$ min., 99%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz, 300 K): $\delta = 10.23$ (s, N-H), 7.91-7.97 (m, 2H), 7.40 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 7.27 (t, $^3J = 7$ Hz, 1H), 7.09 (t, $^3J = 7$ Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.73 (d, $^3J = 7$ Hz, 1H), 4.01 (t, $^3J = 8$ Hz, 2H), 1.74 (p, $^3J = 8$ Hz, 2H), 1.26-1.43 (m, 10H), 0.86 (t, $^3J = 8$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz, 300 K): $\delta = 157.9, 141.1, 139.7, 124.0, 122.7, 121.7, 120.1, 118.4, 116.1, 108.1, 110.5, 95.1, 67.6, 31.2, 28.8, 28.7, 28.5, 25.6, 22.1, 13.9$ ppm.

Methyl-2-(2-(octyloxy)-9H-carbazol-9-yl)-acetat (70)



Zu einer Lösung aus 2-(Octyloxy)-9H-carbazol (**71**) (100 mg, 0.34 mmol) in Aceton (5 mL) wird K_2CO_3 (141 mg, 1.02 mmol) zugegeben. Zu der Suspension wird Bromessigsäuremethylester (**60**) (33 mg, 0.34 mg) zugetropft und die Reaktionslösung 20 h

bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wird filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

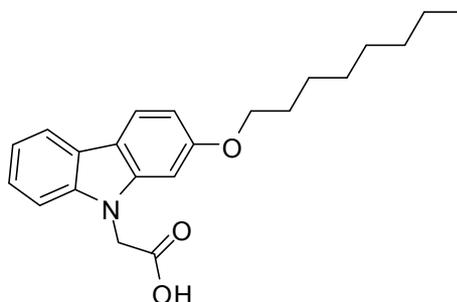
Ausbeute: 120 mg (97%) von (**70**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 10.15$ min., 99%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): $\delta = 6.69-7.91$ (m, 7H), 4.85 (s, 2H), 3.97 (t, ³ $J = 7$ Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 1.76 (p, ³ $J = 7$ Hz, 2H), 1.17-1.27 (m, 10H), 0.82 (t, ³ $J = 7$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300 K): $\delta = 169.1, 158.9, 141.9, 140.6, 124.6, 123.5, 121.2, 119.6, 119.8, 116.9, 108.1, 108.4, 93.8, 68.5, 52.5, 44.6, 31.9, 29.3, 29.4, 26.2, 25.2, 22.7, 14.1$ ppm.

2-(2-(Octyloxy)-9H-carbazol-9-yl)-essigsäure (**55**)



Eine Lösung aus Methyl-2-(2-(octyloxy)-9H-carbazol-9-yl)-acetat (**70**) (120 mg, 0.34 mmol) in MeOH (2 mL) wird mit KOH (57 mg, 1.02 mmol) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 2N HCl auf pH 2 gebracht und mit DCM (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 97 mg (80%) von (**55**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 9.17$ min., 97%.

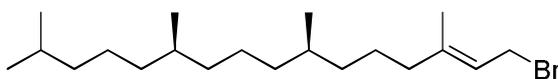
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): $\delta = 6.64-7.88$ (m, 7H), 4.80 (s, 2H), 3.94 (t, ³ $J = 7$ Hz, 2H), 1.74 (p, ³ $J = 7$ Hz, 2H), 1.18-1.27 (m, 10H), 0.82 (t, ³ $J = 7$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300 K): $\delta = 173.4, 157.9, 140.7, 139.4, 123.6, 122.5, 120.2, 118.6, 118.9, 115.9, 106.9, 107.4, 92.7, 67.5, 43.1, 30.8, 28.2, 28.4, 26.2, 25.1, 21.7, 13.1$ ppm.

ESI-MS: $m/z = 353$ [M+Na]⁺.

5.2.2 Synthese der Tocopherolderivate

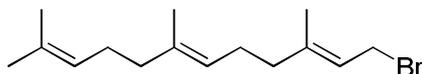
7*R*, 11*R*, *E*-1-bromo-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-en (82d)^[246]



Eine Lösung aus Phytol (**84d**) (350 mg, 1.18 mmol) in Hexan (0.70 mL) wird mit Pyridin (48 μ L) versetzt und auf 0°C gekühlt. Unter Argon-Atmosphäre wird eine Lösung aus PBr₃ (640 mg, 2.26 mmol) in Hexan (0.24 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 h bei RT gerührt, mit Eiswasser versetzt und mit DCM (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1N HCl-Lösung (50 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **Ausbeute:** 399 mg (95%) von (**82d**) als farbloses Öl.

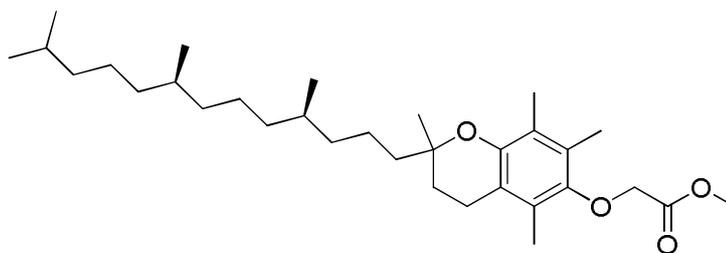
HPLC: R_t = 12.09 min., 91%.

2*E*, 6*E*-1-bromo-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trien (82e)^[246]



Eine Lösung aus Farnesol (**84e**) (350 mg, 1.57 mmol) in Hexan (0.70 mL) wird mit Pyridin (48 μ L) versetzt und auf 0°C gekühlt. Unter Argon-Atmosphäre wird eine Lösung aus PBr₃ (803 mg, 2.97 mmol) in Hexan (0.24 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 h bei RT gerührt, mit Eiswasser versetzt und mit DCM (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1N HCl-Lösung (50 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **Ausbeute:** 400 mg (90%) von (**82e**) als braunes Öl.

Methyl-2-(2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-((4*R*, 8*R*)-4, 8, 12-trimethyltridecyl)-chroman-6-yloxy)-acetat (77a)^[247]

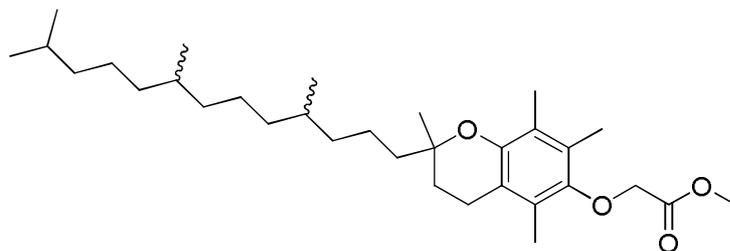


Zu einer Suspension NaH (37 mg, 1.52 mmol) in DMF (2 mL) wird eine Lösung aus +-Tocopherol (**74a**) (298 mg, 0.69 mmol) in DMF (5 mL) zugetropft. Die Suspension wird unter Argon-Atmosphäre bei RT gerührt für 30 min. Zu der Suspension wird eine Lösung aus

Bromessigsäuremethylester (**60**) (127 mg, 0.83 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 45 mg (94%) von (**77a**) als farbloses Öl.

Methyl-2-(2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(4, 8, 12-trimethyltridecyl)-chroman-6-yloxy)-acetat (77b**)**^[247]



Zu einer Suspension NaH (43 mg, 1.79 mmol) in DMF (2 mL) wird eine Lösung aus *all-rac-α*-Tocopherol (**74b**) (350 mg, 0.81 mmol) in DMF (5 mL) zugetropft. Die Suspension wird unter Argon-Atmosphäre bei RT gerührt für 30 min. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäuremethylester (**60**) (149 mg, 0.98 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (DCM) gereinigt.

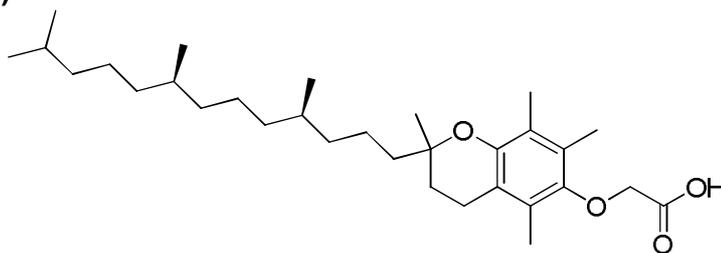
Ausbeute: 45 mg (94%) von (**77b**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 4.33 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.60 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.87-1.75 (m, 2H), 1.61-1.52 (m, 3H), 1.48-1.22 (m, 12H), 1.19-1.06 (m, 7H), 0.92-0.86 (m, 14H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 170.2, 148.3, 147.7, 127.5, 125.6, 123.0, 117.7, 75.0, 69.9, 52.0, 40.1, 39.4, 37.5, 37.5, 37.4, 37.3, 32.8, 32.7, 31.3, 28.0, 24.8, 24.4, 23.9, 22.7, 22.6, 21.0, 20.6, 19.8, 19.7, 12.7, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: *m/z* = 502 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-((4*R*, 8*R*)-4, 8, 12-trimethyltridecyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (76a)^[247]



Zu einer Lösung (**77a**) (50 mg, 0.01 mmol) in Dioxan/Wasser (3 mL/1 mL) wird KOH (56 mg, 0.99 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 h bei 75°C gerührt, mit 2 N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

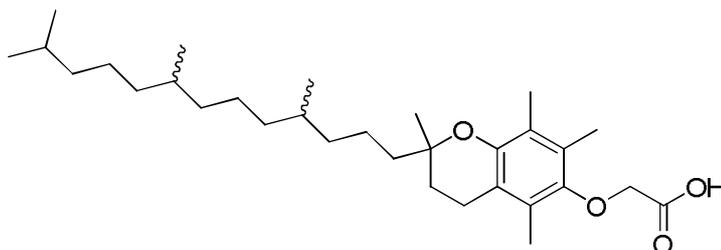
Ausbeute: 45 mg (94%) von (**76a**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 4.38 (s, 2H), 2.61 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.88-1.75 (m, 2H), 1.60-1.52 (m, 3H), 1.47-1.24 (m, 12H), 1.20-1.06 (m, 7H), 0.92-0.86 (m, 14H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 172.8, 148.6, 147.0, 127.3, 125.5, 123.4, 117.8, 75.0, 69.2, 40.1, 39.4, 37.5, 37.5, 37.4, 37.3, 32.8, 32.7, 31.2, 28.0, 24.8, 24.4, 23.8, 22.7, 22.6, 21.0, 20.7, 19.8, 19.7, 12.7, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: *m/z* = 488 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(4, 8, 12-trimethyltridecyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (76b)^[247]



Zu einer Lösung (**77b**) (380 mg, 0.76 mmol) in Dioxan/Wasser (5 mL/1 mL) wird KOH (424 mg, 7.57 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 h bei 75°C gerührt, mit 2 N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 350 mg (95%) von (**76b**) als farbloses Öl.

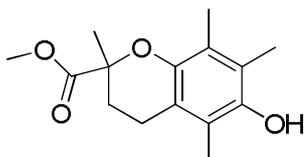
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 4.38 (s, 2H), 2.61 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.88-1.76 (m, 2H), 1.63-1.50 (m, 3H), 1.45-1.23 (m, 12H), 1.19-1.07 (m, 7H), 0.93-0.86 (m, 14H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 172.5, 148.5, 146.9, 127.4, 125.4, 123.4, 117.9, 75.1, 69.2, 40.0, 39.4, 37.5, 37.3, 32.8, 31.2, 28.1, 24.8, 24.4, 23.9, 22.7, 22.6, 21.0, 20.6, 19.8, 19.7, 19.6, 19.6, 12.7, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: *m/z* = 488 [M]⁺.

5.2.3 Synthese der Chromanderivate

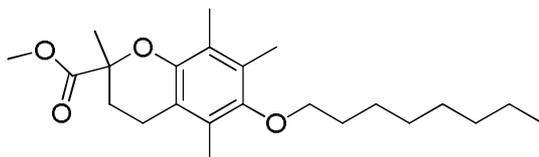
Methyl-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylat (**81**)^[247]



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (300 mg, 1.20 mmol) in DMF (3 mL) wird K₂CO₃ (330 mg, 2.40 mmol) gegeben. Die Suspension wird 30 min. bei RT gerührt, MeI (**83**) (170 mg, 1.20 mmol) wird zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL), mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 301 mg (95%) von (**81**) als farbloser Feststoff.

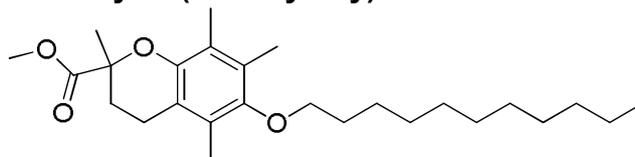
Methyl-2, 5, 7, 8-tetramethyl-6-(octyloxy)-chroman-2-carboxylat (**80a**)



Zu einer Suspension von Cs₂CO₃ (247 mg, 0.76 mmol) in DMF (3 mL) wird (**81**) (100 mg, 0.38 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt, mit Octylbromid (**82a**) (73 mg, 0.38 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL), mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 105 mg (74%) von (**80a**) als gelbes Öl.

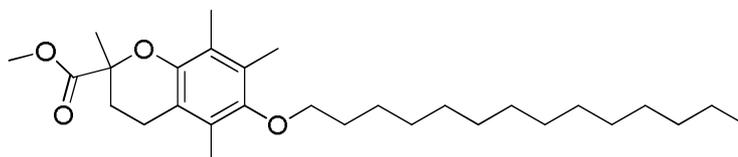
Methyl-2, 5, 7, 8-tetramethyl-6-(undecyloxy)-chroman-2-carboxylat (**80b**)



Zu einer Suspension von Cs_2CO_3 (136 mg, 0.42 mmol) in DMF (4 mL) wird (**81**) (100 mg, 0.38 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt, mit 1-Bromundecan (**82b**) (89 mg, 0.38 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL), mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 150 mg (94%) von (**80b**) als farbloses Öl.

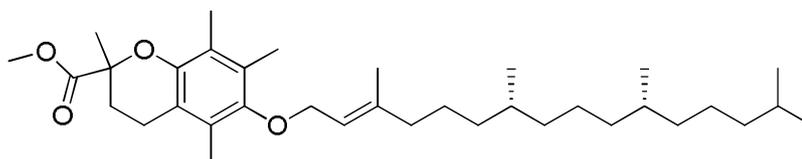
Methyl-2, 5, 7, 8-tetramethyl-6-(tetradecyloxy)-chroman-2-carboxylat (**80c**)



Zu einer Suspension von Cs_2CO_3 (123 mg, 0.38 mmol) in DMF (2 mL) wird (**81**) (50 mg, 0.19 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt, mit 1-Bromtetradecan (**82c**) (52 mg, 0.19 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL), mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (46%) von (**80c**) als farbloser Feststoff.

Methyl-2, 5, 7, 8-tetramethyl-6-((7*R*, 11*R*, *E*)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-chroman-2-carboxylat (**80d**)

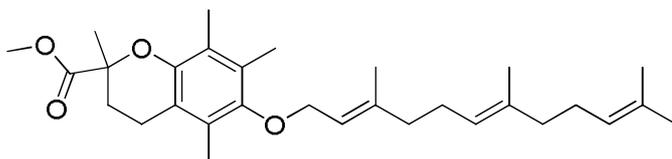


Zu einer Suspension von Cs_2CO_3 (68 mg, 0.21 mmol) in DMF (2 mL) wird (**81**) (50 mg, 0.19 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt, mit Phitylbromid (**82d**) (59 mg, 0.19 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL), mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie

(CH/EE (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 38 mg (37%) von (**80d**) als farbloser Feststoff.

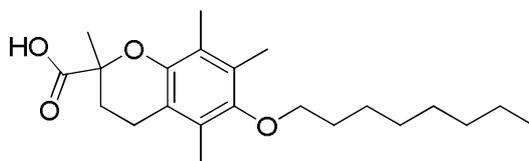
Methyl-2, 5, 7, 8-tetramethyl-6-((2E, 6E)-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyloxy)-chroman-2-carboxylat (**80e**)



Zu einer Suspension von Cs_2CO_3 (68 mg, 0.21 mmol) in DMF (3 mL) wird (**81**) (50 mg, 0.19 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt, mit Farnesylbromid (**82e**) (54 mg, 0.19 mmol) versetzt und 6 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL), mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 45 mg (51%) von (**80e**) als farbloser Feststoff.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-6-(octyloxy)-chroman-2-carbonsäure (**78a**)



Zu einer Lösung aus (**80a**) (23 mg, 0.06 mmol) in Dioxan/Wasser (2 mL/ 0.5 mL) wird KOH zugegeben (92 mg, 1.65 mmol). Die Reaktionslösung wird 4 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

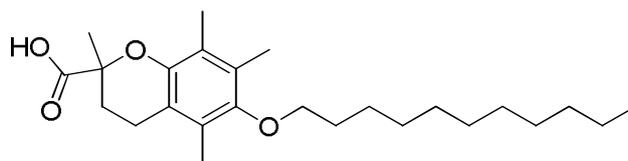
Ausbeute: 45 mg (51%) von (**78a**) als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): δ = 3.65 (t, 3J = 7 Hz, 2H), 2.70-2.56 (m, 2H), 2.44-2.38 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.97-1.90 (m, 1H), 1.81 (p, 3J = 7 Hz, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.51 (p, 3J = 7 Hz, 2H), 1.41-1.26 (m, 8H), 0.93 (t, 3J = 7 Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): δ = 178.5, 149.5, 146.9, 128.5, 126.1, 122.7, 117.1, 76.9, 73.1, 31.9, 30.3, 30.0, 29.4, 29.3, 26.2, 24.9, 22.7, 20.6, 14.1, 12.8, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: m/z = 362 [M] $^+$.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-6-(undecyloxy)-chroman-2-carbonsäure (78b)



Zu einer Lösung aus (**80b**) (150 mg, 0.34 mmol) in Dioxan/Wasser (5 mL/ 1 mL) wird KOH zugegeben (402 mg, 7.17 mmol). Die Reaktionslösung wird 4h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

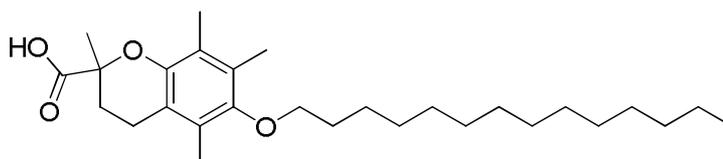
Ausbeute: 85 mg (62%) von (**78b**) als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 3.54 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 2.58-2.45 (m, 2H), 2.32-2.27 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.87-1.81 (m, 1H), 1.73-1.68 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.43-1.39 (m, 2H), 1.30-1.15 (m, 14H), 0.80 (t, ³J = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 178.2, 149.6, 146.8, 128.5, 126.1, 122.7, 117.2, 77.0, 73.1, 31.9, 30.3, 30.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 26.2, 24.7, 22.7, 20.5, 14.2, 12.8, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: m/z = 404 [M]⁺.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-6-(tetradecyloxy)-chroman-2-carbonsäure (78c)



Zu einer Lösung aus (**80c**) (38 mg, 0.08 mmol) in Dioxan/Wasser (2 mL/ 0.5 mL) wird KOH zugegeben (92 mg, 1.65 mmol). Die Reaktionslösung wird 4 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

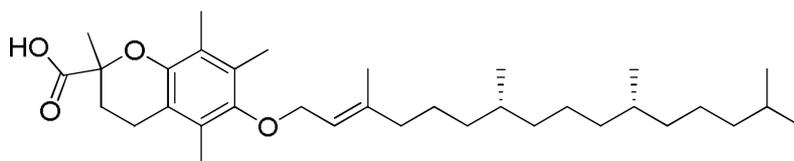
Ausbeute: 30 mg (83%) von (**78c**) als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 3.56 (m, 2H), 2.56-2.49 (m, 2H), 2.32-2.27 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.87-1.81 (m, 1H), 1.73-1.68 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.41-1.39 (2H), 1.30-1.10 (m, 20H), 0.80 (t, ³J = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 178.0, 149.6, 146.8, 128.5, 126.1, 122.7, 117.2, 77.0, 73.1, 32.7, 31.9, 30.3, 30.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 26.2, 26.7, 24.7, 22.7, 20.5, 14.2, 12.8, 11.9, 11.8 ppm.

EI-MS: *m/z* = 446 [M]⁺.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-6-((7*R*, 11*R*, *E*)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-chroman-2-carbonsäure (78d)



Zu einer Lösung aus (**80d**) (38 mg, 0.07 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (79 mg, 1.40 mmol). Die Reaktionslösung wird 4 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

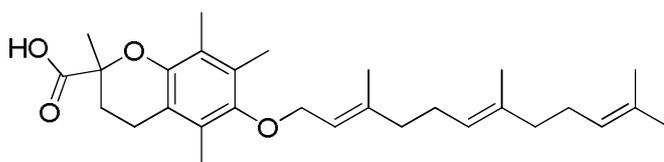
Ausbeute: 13 mg (33%) von (**78d**) als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.05 (s, 1H), 5.50 (t, ³*J* = 7 Hz, 1H), 4.11 (d, ³*J* = 7 Hz, 1H), 4.09 (d, ³*J* = 7 Hz, 1H), 2.57-2.47 (m, 2H), 2.31-2.28 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.11 (m, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.48-1.23 (m, 14H), 1.20-1.07 (m, 6H), 0.94-0.78 (m, 12H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 176.7, 149.7, 146.4, 141.3, 140.9, 128.8, 126.5, 122.6, 121.0, 120.1, 117.4, 77.2, 69.8, 69.5, 39.9, 39.4, 37.4, 37.3, 37.1, 37.0, 36.9, 36.8, 32.8, 32.7, 32.5, 29.8, 29.7, 28.0, 25.7, 25.1, 24.8, 24.5, 24.4, 23.5, 22.8, 22.7, 20.4, 19.7, 19.6, 16.4, 13.0, 12.1, 11.9 ppm.

EI-MS: *m/z* = 528 [M]⁺.

2, 5, 7, 8-Tetramethyl-6-((2*E*, 6*E*)-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyloxy)-chroman-2-carbonsäure (78e)



Zu einer Lösung aus (**80e**) (45 mg, 0.10 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (101 mg, 1.80 mmol). Die Reaktionslösung wird 4 h bei 75°C gerührt, mit Wasser

versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

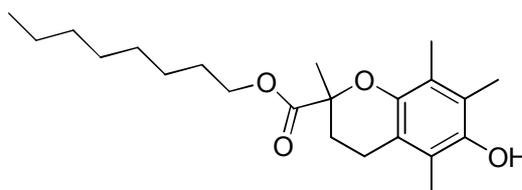
Ausbeute: 35 mg (77%) von (**78e**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 5.52 (t, ³J = 7 Hz, 1H), 5.08-5.01 (m, 2H), 4.10 (d, ³J = 7 Hz, 2H), 2.53-2.45 (m, 2H), 2.25-2.23 (m, 1H), 2.24-2.21 (s, breit, 3H), 2.20-2.17 (m, 2H), 2.17-2.13 (m, 8H), 2.13-2.09 (m, 3H), 2.05-2.01 (m, 2H), 1.72 (s, 6H), 1.66-1.63 (m, 6H), 1.61-1.55 (m, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 179.0, 149.4, 147.1, 140.3, 135.4, 131.3, 128.5, 126.1, 124.4, 123.9, 122.8, 120.5, 117.2, 77.0, 69.8, 39.7, 39.7, 34.3, 30.0, 26.8, 25.7, 24.8, 20.6, 17.7, 16.5, 16.0, 12.9, 12.0, 11.9 ppm.

ESI-MS: m/z = 477 [M+Na]⁺.

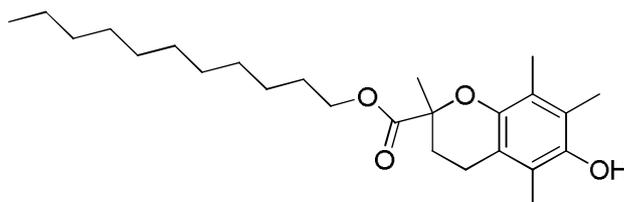
Octyl-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylat (**86a**)



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (50 mg, 0.20 mmol) in DMF (2 mL) wird K₂CO₃ (55 mg, 0.40 mmol) gegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Octylbromid (**82a**) (39 mg, 0.20 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 68 mg (94%) von (**86a**) als farbloser Feststoff.

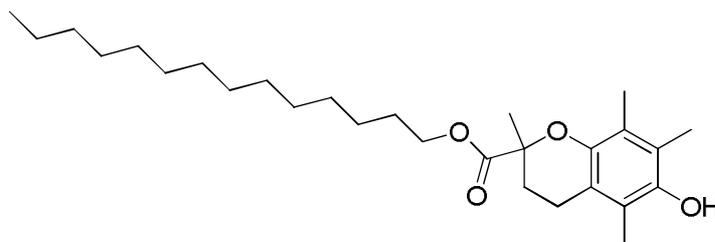
Undecyl-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylat (**86b**)



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (100 mg, 0.40 mmol) in DMF (4 mL) wird K₂CO₃ (110 mg, 0.80 mmol) gegeben. Die Suspension wird

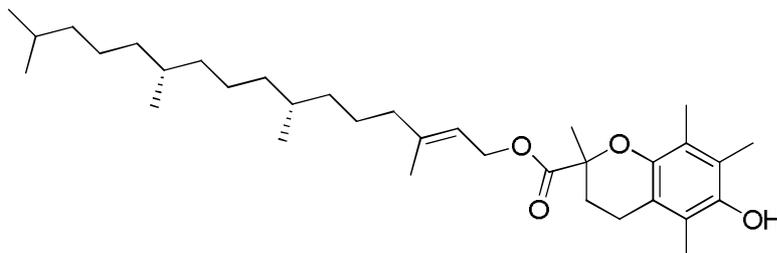
30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus 1-Bromundecan (**82b**) (94 mg, 0.40 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **Ausbeute:** 147 mg (91%) von (**86b**) als farbloser Feststoff.

Tetradecyl-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylat (86c)



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (68 mg, 0.27 mmol) in DMF (2 mL) wird K₂CO₃ (75 mg, 0.54 mmol) gegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus 1-Bromtetradecan (**82c**) (75 mg, 0.27 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **Ausbeute:** 116 mg (97%) von (**86c**) als farbloser Feststoff.

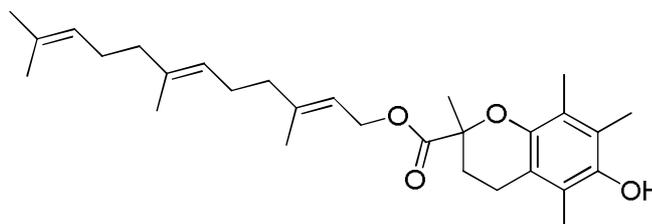
(7R, 11R, E)-3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadec-2-enyl 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-chroman-2-carboxylat (86d)



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (100 mg, 0.40 mmol) in DMF (3 mL) wird K₂CO₃ (110 mg, 0.80 mmol) gegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Phytlylbromid (**82d**) (119 mg, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 62 mg (30%) von (**86d**) als gelbes Öl.

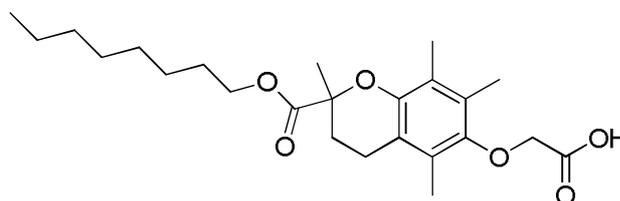
(2E, 6E)-3, 7, 11-Trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyl-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-chroman-2-carboxylat (86e)



Zu einer Lösung aus 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**75**) (100 mg, 0.40 mmol) in DMF (3 mL) wird K_2CO_3 (110 mg, 0.80 mmol) gegeben. Die Suspension wird 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Farnesylbromid (**82e**) (114 mg, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 8 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (20 mL) und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 172 mg (95%) von (**86e**) als gelbes Öl.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(octyloxycarbonyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (79a)



Zu einer Suspension aus NaH (9 mg, 0.37 mmol) in THF (4 mL) wird eine Lösung aus Ester (**86a**) (61 mg, 0.17 mmol) in THF (1 mL) gegeben. Die Suspension wird für 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäure (**85**) (23 mg, 0.17 mmol) in THF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 12 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit 2N HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

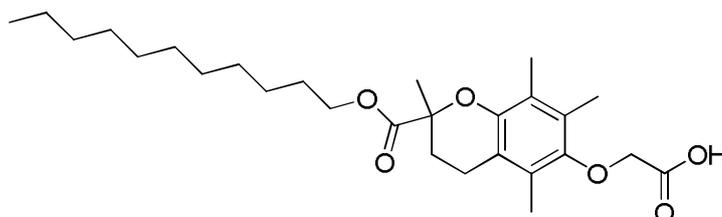
Ausbeute: 46 mg (65%) von (**79a**) als farbloses Öl.

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K): δ = 4.26 (s, 2H), 4.03-3.93 (m, 2H), 2.57-2.51 (m, 1H), 2.44-2.35 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.48-1.41 (m, 2H), 1.26-1.09 (m, 10 H), 0.81 (t, $^3J = 7$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 172.8, 171.4, 147.7, 146.6, 126.6, 124.4, 122.3, 116.5, 68.1, 64.2, 30.8, 29.4, 28.7, 28.2, 28.1, 27.5, 24.6, 24.4, 21.6, 19.9, 13.1, 11.7, 10.8 ppm.

EI-MS: *m/z* = 420 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(undecyloxycarbonyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (79b)



Zu einer Suspension aus NaH (25 mg, 1.05 mmol) in THF (5 mL) wird eine Lösung aus Ester (**86b**) (193 mg, 0.48 mmol) in THF (2 mL) gegeben. Die Suspension wird für 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäure (**85**) (67 mg, 0.48 mmol) in THF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 12 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit 2N HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

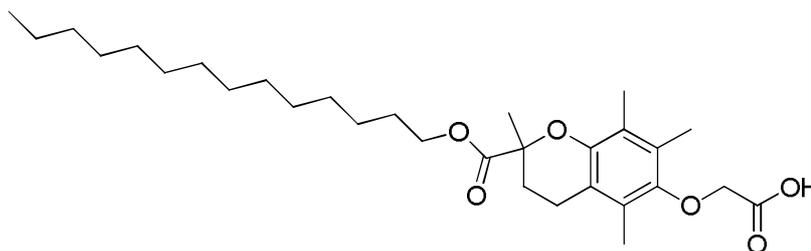
Ausbeute: 118 mg (53%) von (**79b**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 3.95 (s (breit), 2H), 2.94-2.65 (m, 2H), 2.61-2.20 (m, 3H), 2.18-1.75 (m, 8H), 1.72-1.42 (m, 5H), 1.42-1.04 (m, 18H), 0.89 (t, ³J = 6 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 173.7, 162.7, 147.9, 147.8, 127.9, 125.7, 122.6, 116.9, 77.0, 65.1, 36.5, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.5, 25.7, 25.2, 22.7, 20.7, 14.1, 12.6, 11.7 ppm.

EI-MS: *m/z* = 462 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(tetradecyloxycarbonyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (79c)



Zu einer Suspension aus NaH (22 mg, 0.92 mmol) in THF (5 mL) wird eine Lösung aus Ester (**86c**) (188 mg, 0.42 mmol) in THF (2 mL) gegeben. Die Suspension wird für 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäure (**85**) (59 mg, 0.42 mmol) in THF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 12 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit 2N HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

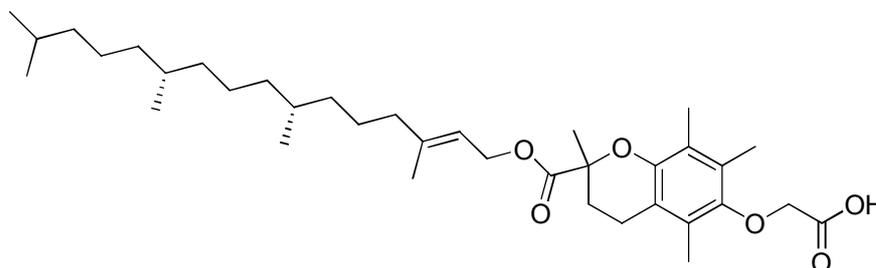
Ausbeute: 126 mg (60%) von (**79c**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 3.95 (s (breit), 2H), 2.69-2.25 (m, 3H), 2.22-1.78 (m, 8H), 1.70-1.42 (m, 5H), 1.38-1.11 (m, 26H), 0.95-0.86 (t, ³J = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 174.7, 173.7, 148.2, 147.9, 127.9, 125.6, 122.7, 116.9, 77.0, 65.1, 63.0, 32.7, 31.9, 30.3, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 19.2, 28.5, 28.2, 25.7, 25.2, 22.7, 20.7, 14.1, 12.6, 11.8, 11.7 ppm.

EI-MS: m/z = 504 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(((7R, 11R, E)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-carbonyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (79d)



Zu einer Suspension aus NaH (22 mg, 0.92 mmol) in THF (5 mL) wird eine Lösung aus Ester (**86d**) (252 mg, 0.42 mmol) in THF (3 mL) gegeben. Die Suspension wird für 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäure (**85**) (59 mg, 0.42 mmol) in THF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 12 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt

(10 mL) und mit 2N HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

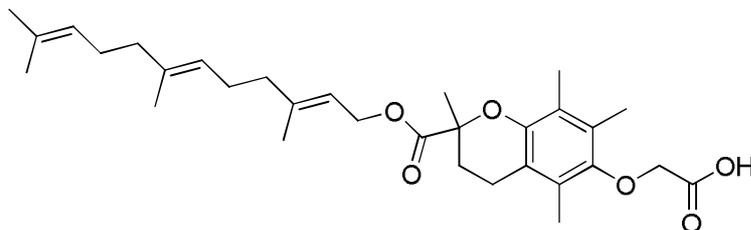
Ausbeute: 190 mg (77%) von (**79d**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 5.20-5.16 (m, 1H), 4.48 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 2.67-2.37 (m, 3H), 2.19-1.93 (m, 12H), 1.65-1.57 (m, 5H), 1.34-1.21 (m, 12H), 1.18-1.05 (m, 4H), 0.94-0.84 (m, 16H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 173.7, 173.5, 148.2, 148.0, 143.4, 127.7, 125.5, 123.0, 118.5, 117.7, 117.3, 77.1, 69.8, 61.9, 61.6, 39.9, 39.5, 37.4, 37.3, 36.9, 36.7, 36.6, 32.8, 32.7, 32.3, 30.3, 29.7, 28.0, 25.6, 25.1, 24.8, 24.5, 23.4, 22.7, 22.6, 20.8, 19.7, 19.6, 16.3, 12.7, 11.8, 11.7 ppm.

EI-MS: *m/z* = 586 [M]⁺.

2-(2, 5, 7, 8-Tetramethyl-2-(((2E, 6E)-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyloxy)-carbonyl)-chroman-6-yloxy)-essigsäure (79e**)**



Zu einer Suspension aus NaH (20 mg, 0.82 mmol) in THF (5 mL) wird eine Lösung aus Ester (**86e**) (170 mg, 0.37 mmol) in THF (3 mL) gegeben. Die Suspension wird für 30 min. gerührt. Zu der Suspension wird eine Lösung aus Bromessigsäure (**85**) (51 mg, 0.37 mmol) in THF (1 mL) zugetropft, die Reaktionslösung wird 12 h bei RT gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit 2N HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 126 mg (87%) von (**79e**) als gelbes Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 5.21 (t, ³J = 7 Hz, 1H), 5.02 (m, 2H), 4.47 (d, ³J = 6 Hz, 2H), 3.94 (s, (breit), 2H), 2.62-2.35 (m, 2H), 2.20-1.95 (m, 16H), 1.88-1.76 (m, 1H), 1.72-1.67 (m, 3H), 1.66-1.54 (m, 12H), 1.34-1.24 (m, 2H) ppm.

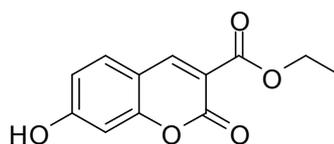
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 174.2, 173.5, 148.2, 142.9, 135.4, 131.3, 127.8,

125.5, 125.4, 124.3, 123.6, 123.0, 118.0, 117.2, 77.1, 69.7, 61.8, 39.7, 39.5, 30.4, 26.7, 26.3, 25.7, 25.1, 20.8, 17.7, 16.4, 16.0, 12.6, 11.8, 11.7 ppm.

ESI-MS: $m/z = 535$ $[M+Na]^+$. **EI-MS:** $m/z = 512$ $[M]^+$.

5.2.4 Synthese der Cumarinderivate

Ethyl-7-hydroxy-2-oxo-2H-chroman-3-carboxylat (**89**)



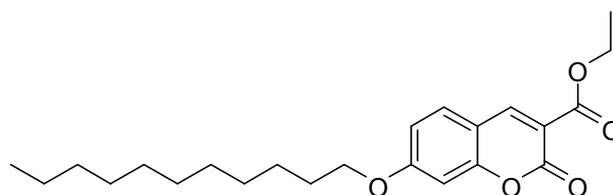
2, 4-Dihydroxybenzaldehyd (**90**) (250 mg, 1.81 mmol) und Malonsäurediethylester (**91**) (301 mg, 1.81 mmol) werden in DMF (1 mL) gelöst, mit Piperidin (15 mg, 0.18 mmol) und AcOH (11 mg, 0.18 mol) versetzt und 1 h bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 10 mL Wasser versetzt, mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (2x 20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

Ausbeute: 374 mg (88%) von (**89**) als gelber Feststoff.

HPLC: $R_t = 3.45$ min., 94%.

EI-MS: $m/z = 234$ $[M]^+$.

Ethyl-2-oxo-7-(undecyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88a**)



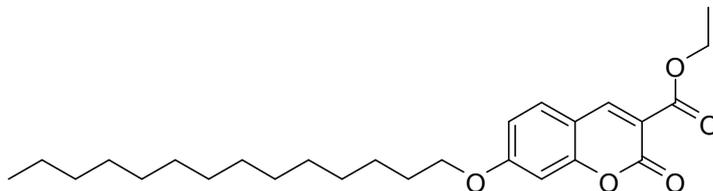
Ethyl-7-hydroxy-2-oxo-2H-chroman-3-carboxylat (**89**) (21 mg, 0.09 mmol) wird in DMF (200 µL) gelöst und mit Cs₂CO₃ (59 mg, 0.18 mmol) versetzt. Die Suspension wird 10 min. gerührt, Undecanbromid (**82b**) (106 mg, 0.49 mmol) wird zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 120°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10 mL) versetzt, mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (86%) von (**88a**) als gelbes Öl.

HPLC: $R_t = 10.13$ min., 99%.

EI-MS: $m/z = 388$ $[M]^+$.

Ethyl-2-oxo-7-(tetradecyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88b**)



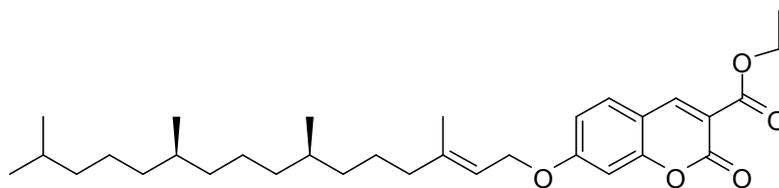
Ethyl-7-hydroxy-2-oxo-2H-chroman-3-carboxylat (**89**) (100 mg, 0.43 mmol) wird in DMF (1 mL) gelöst und mit Cs_2CO_3 (279 mg, 0.85 mmol) versetzt. Die Suspension wird 10 min. gerührt, Tetradecanbromid (**82c**) (355 mg, 1.29 mmol) wird zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 120°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10 mL) versetzt, mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (4:1)) gereinigt.

Ausbeute: 106 mg (58%) von (**88b**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 11.04$ min., 98%.

EI-MS: $m/z = 430$ $[M]^+$.

Ethyl-2-oxo-7-((7R, 11R, E)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88c**)



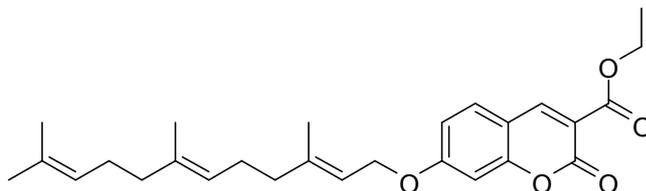
Ethyl-7-hydroxy-2-oxo-2H-chroman-3-carboxylat (**89**) (100 mg, 0.43 mmol) wird in DMF (1 mL) gelöst und mit Cs_2CO_3 (279 mg, 0.85 mmol) versetzt. Die Suspension wird 10 min. gerührt, Phitylbromid (**82d**) (770 mg, 2.14 mmol) wird zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 120°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10 mL) versetzt, mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (3:1)) gereinigt.

Ausbeute: 66 mg (31%) von (**88c**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 12.13$ min., 98%.

EI-MS: $m/z = 512$ $[M]^+$.

Ethyl-2-oxo-7-((2E, 6E)-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (88d)



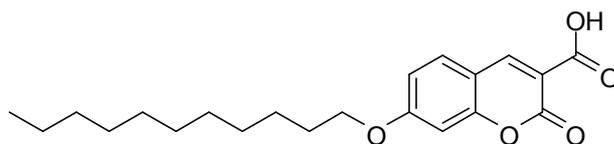
Ethyl-7-hydroxy-2-oxo-2H-chroman-3-carboxylat (**89**) (94 mg, 0.40 mmol) wird in DMF (1 mL) gelöst und mit Cs_2CO_3 (262 mg, 0.80 mmol) versetzt. Die Suspension wird 10 min. gerührt, Farnesylbromid (**82e**) (572 mg, 2.01 mmol) wird zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 120°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10 mL) versetzt, mit DCM (3x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (4:1)) gereinigt.

Ausbeute: 92 mg (52%) von (**88d**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 10.14$ min., 98%.

EI-MS: $m/z = 438$ $[M]^+$.

2-Oxo-7-(undecyloxy)-2H-chroman-3-carbonsäure (87a)



Zu einer Lösung aus Ethyl-2-oxo-7-(undecyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88a**) (36 mg, 0.09 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (52 mg, 0.93 mmol). Die Reaktionslösung wird 2 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (84%) von (**87a**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 9.54$ min., 99%.

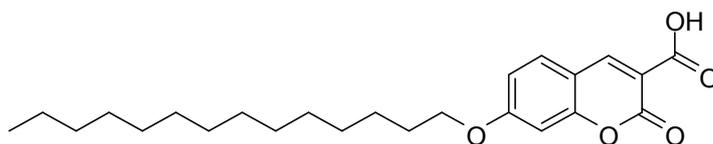
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 300 K): $\delta = 8.87$ (s, 1H), 7.65 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 7.02 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.11 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1.87 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.55-

1.23 (m, 14H), 0.90 (t, $^3J = 7$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, 300 K): $\delta = 165.9, 164.7, 163.1, 157.2, 151.2, 131.6, 115.5, 112.2, 110.7, 101.2, 69.4, 31.9, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 25.9, 22.7, 14.0$ ppm.

EI-MS: $m/z = 360$ $[\text{M}]^+$.

2-Oxo-7-(tetradecyloxy)-2H-chroman-3-carbonsäure (87b)



Zu einer Lösung aus Ethyl-2-oxo-7-(tetradecyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88b**) (56 mg, 0.13 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (73 mg, 1.30 mmol). Die Reaktionslösung wird 2 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 50 mg (96%) von (**87b**) als farbloser Feststoff.

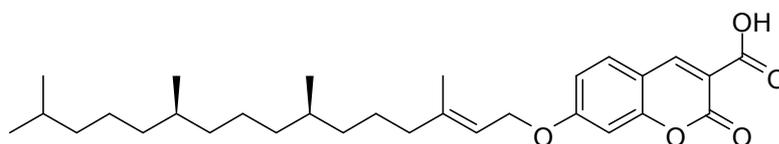
HPLC: $R_t = 10.51$ min., 98%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): $\delta = 12.16$ (s, breit 1H), 8.90 (s, 1H), 7.65 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 7.03 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.12 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1.87 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1.55-1.23 (m, 22H), 0.90 (t, $^3J = 7$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): $\delta = 165.9, 164.6, 163.1, 157.2, 151.2, 131.6, 115.5, 111.2, 109.7, 101.3, 69.4, 31.9, 29.6$ (3x C), 29.5 (2x C), 29.3 (2x C), 28.8 (2x C), 25.9, 22.7, 14.2 ppm.

EI-MS: $m/z = 402$ $[\text{M}]^+$.

E-2-Oxo-7-((7R, 11R)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-2H-chroman-3-carbonsäure (87c)



Zu einer Lösung aus Ethyl-2-oxo-7-((7R, 11R, E)-3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-enyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88c**) (66 mg, 0.13 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (72 mg, 1.29 mmol). Die Reaktionslösung wird 2 h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL)

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 60 mg (95%) von (**87c**) als farbloser Feststoff.

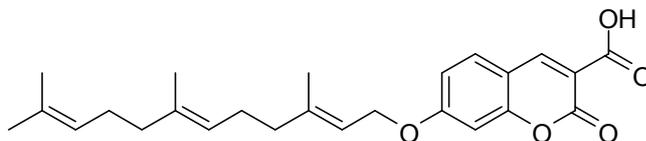
HPLC: R_t = 11.49 min., 96%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.27 (s, 1H), 6.78 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 6.77 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 6.58 (t, ³J = 9 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.43-5.37 (m, 2H), 4.29 (d, ³J = 7 Hz, 2H), 4.24 (d, ³J = 7 Hz, 2H), 2.04-1.96 (m, 2H), 1.60-1.55 (s, 3H), 1.39-1.31 (m, 8H), 1.24-1.10 (m, 8H), 0.99-0.91 (m, 15H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 164.7, 164.1, 161.9, 156.6, 149.6, 143.1, 142.5, 131.0, 128.5, 128.3, 127.6, 127.4, 124.7, 124.5, 118.8, 118.0, 114.7, 112.1, 111.3, 100.6, 65.6, 65.2, 39.7, 39.5, 37.6, 37.5 (2x C), 37.4, 32.9, 32.8, 32.4, 28.0, 25.4, 25.0, 24.9, 24.6, 22.9, 22.5, 22.4, 20.5, 20.3, 20.2, 20.0, 19.9, 19.7, 19.6, 19.5, 19.4, 16.1 ppm.

ESI-MS: *m/z* = 483[M-H]⁺.

2-Oxo-7-((2E, 6E)-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyloxy)-2H-chroman-3-carbonsäure (87d)



Zu einer Lösung aus Ethyl-2-oxo-7-(undecyloxy)-2H-chroman-3-carboxylat (**88d**) (92 mg, 0.21 mmol) in Dioxan/Wasser (1 mL/ 0.2 mL) wird KOH zugegeben (118 mg, 2.10 mmol). Die Reaktionslösung wird 2h bei 75°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL), mit 2N HCl angesäuert und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (59%) von (**87d**) als farbloser Feststoff.

HPLC: R_t = 9.57 min., 96%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 8.86 (s, 1H), 7.65 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 7.03 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.48 (t, ³J = 6 Hz, 1H), 5.12-5.05 (m, 2H), 4.71 (d, ³J = 7 Hz, 2H), 2.20-2.11 (m, 3H), 1.99-1.94 (m, 5H), 1.80 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.63-1.58 (m, 6H) ppm.

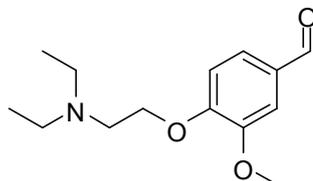
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 165.7, 164.6, 163.2, 157.1, 151.2, 143.3, 135.7, 131.6, 131.3, 124.2, 123.9, 117.7, 115.7, 112.2, 110.7, 101.3, 69.4, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3,

28.8, 25.9, 22.7, 14.2 ppm.

ESI-MS: $m/z = 433$ $[M+Na]^+$.

5.2.5 Synthese der Indolinonderivate

4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-3-methoxybenzaldehyd (**103b**)



K_2CO_3 (522 mg, 3.78 mmol) und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (**104b**) (250 mg, 1.64 mmol) werden in Aceton (3 mL) suspendiert. Nach Zugabe von 2-Chloro-ethan-aminhydrochlorid (**97**) (283 mg, 1.64 mmol) wird die Suspension 12 h bei 56°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (20 mL), mit DCM extrahiert (3x 20 mL), die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie ($CHCl_3/MeOH$ (15:1)) gereinigt.

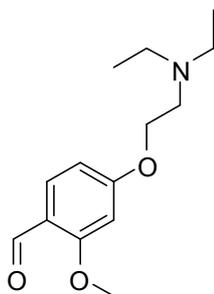
Ausbeute: 353 mg (85%) von (**103b**) als gelbes Öl.

HPLC: $R_t = 1.05$ min., 99%.

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K): $\delta = 9.77$ (s, 1H), 7.37 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H) 6.93 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H), 4.10 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.88 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 2.57 (q, $^3J = 7$ Hz, 4H), 1.01 (t, $^3J = 7$ Hz, 6H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, 300 K): $\delta = 190.8, 153.9, 149.9, 130.1, 126.7, 111.6, 109.3, 67.7, 55.9, 51.4, 47.9$ (2x C), 11.9 (2x C) ppm.

4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-2-methoxybenzaldehyd (**103a**)



K_2CO_3 (418 mg, 3.02 mmol) und 4-Hydroxy-2-methoxybenzaldehyd (**104a**) (200 mg, 1.31 mmol) werden in DMF (2 mL) suspendiert. Nach Zugabe von 2-Chloro-ethan-aminhydrochlorid (**97**) (226 mg, 1.31 mmol) wird die Suspension 12 h bei 70°C gerührt.

Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (20 mL), mit DCM extrahiert (3x 20 mL), die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (15:1)) gereinigt.

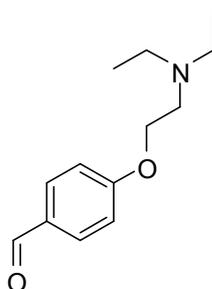
Ausbeute: 275 mg (84%) von (**103a**) als gelbes Öl.

HPLC: R_t = 1.42 min., 98%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 10.29 (s, 1H), 7.72 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 6.47 (d, ³J = 8 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.05 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.81 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 2.57 (q, ³J = 7 Hz, 4H), 1.02 (t, ³J = 7 Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 188.3, 165.5, 130.7, 119.1, 108.8, 106.4, 98.4, 67.0, 55.6, 51.6, 47.9 (2x C), 11.8 (2x C) ppm.

4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-benzaldehyd (**95**)



K₂CO₃ (1302 mg, 9.42 mmol) und 4-Hydroxybenzaldehyd (**96**) (500 mg, 4.09 mmol) werden in Aceton (5 mL) suspendiert. Nach Zugabe von 2-Chloro-ethan-amin-hydrochlorid (**97**) (705 mg, 4.09 mmol) wird die Suspension 12 h bei 56°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (30 mL), mit DCM extrahiert (3x 30 mL), die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (15:1)) gereinigt.

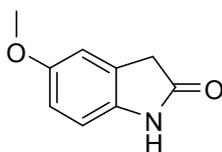
Ausbeute: 870 mg (84%) von (**95**) als gelbes Öl.

HPLC: R_t = 1.20 min., 96%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ = 9.80 (s, 1H), 7.75 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 6.94 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 4.07 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 2.84 (t, ³J = 6 Hz, 2H), 2.57 (q, ³J = 7 Hz, 4H), 1.02 (t, ³J = 7 Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ = 190.7, 163.9, 131.9 (2x C), 129.9, 116.3 (2x C), 67.1, 51.6, 47.9 (2x C), 11.8 (2xC) ppm.

5-Methoxyindolin-2-on (**102**)^[248]



Zu einer Suspension aus 5-Methoxyindolin-2,3-dion (**105**) (250 mg, 1.41 mmol) in Ethylenglycol (1 mL) wird Hydrazinhydrat (140 μ L) und KOH (79 mg, 1.41 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 5 min. bei 140°C gerührt, mit Wasser (10 mL) versetzt und mit EE (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

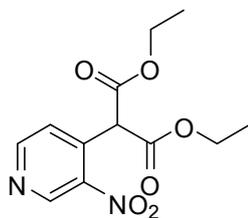
Ausbeute: 146 mg (64%) von (**102**) als farbloser Feststoff.

HPLC: $R_t = 1.81$ min., 98%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz, 300 K): $\delta = 10.14$ (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.74-6.70 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.43 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz, 300 K): $\delta = 176.1, 154.6, 137.0, 127.0, 112.2, 111.5, 109.3, 55.4, 36.2$ ppm.

Diethyl-2-(3-nitropyridin-4-yl)-malonat (**100**)^[240]



Zu einer Suspension von NaH (32 mg, 0.72 mmol) in tr. THF (1 mL) wird unter Argon-Atmosphäre Malonsäurediethylester (**91**) (116 mg, 0.72 mmol) zugegeben. Nach 30 min. Rühren bei RT wird 4-Chloro-3-nitropyridin (**101**) (50 mg, 0.31 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 20 min. bei 100°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (10 mL) versetzt, mit EE (4x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

Ausbeute: 74 mg (85%) von (**100**) als gelbes Öl.

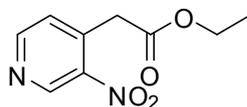
HPLC: $R_t = 5.50$ min., 99%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): $\delta = 9.20$ (s, 1H), 8.77 (d, ³J = 5 Hz, 1H), 7.45 (d,

$^3J = 5$ Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.21 (q, $^3J = 7$ Hz, 4H), 1.22 (t, $^3J = 7$ Hz, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): $\delta = 165.9$ (2x C), 153.8, 146.3, 144.8, 136.9, 125.2, 62.7, 53.9 (2x C), 13.9 (2x C) ppm.

Ethyl-2-(3-nitropyridin-4-yl)-acetat (**99**)^[240]



Zu einer Lösung aus Diethyl-2-(3-nitropyridin-4-yl)-malonat (**100**) (74 mg, 0.26 mmol) in DMSO/ H_2O (3 mL/1 mL) wird LiCl (28 mg, 0.66 mmol) zugegeben. Die Suspension wird 24 h bei 100°C gerührt, mit Wasser versetzt (10 mL) und mit EE (4x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (2:1)) gereinigt.

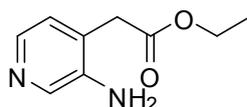
Ausbeute: 46 mg (85%) von (**99**) als gelbes Öl.

HPLC: $R_t = 3.93$ min., 95%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): $\delta = 9.22$ (s, 1H), 8.71 (d, $^3J = 5$ Hz, 1H), 7.26 (d, $^3J = 5$ Hz, 1H), 4.12 (q, $^3J = 7$ Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 1.20 (t, $^3J = 7$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): $\delta = 168.3$, 153.7, 146.3, 145.2, 138.7, 127.2, 61.8, 39.0, 14.0 ppm.

Ethyl-2-(3-aminopyridin-4-yl)-acetat (**98**)^[240]



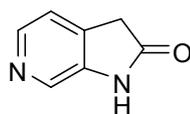
Zu einer Lösung aus Ethyl-2-(3-nitropyridin-4-yl)-acetat (**99**) (46 mg, 0.22 mmol) in EtOH (2 mL) wird unter Argon-Atmosphäre Pd/C (9 mg) zugegeben. Die Suspension wird unter H_2 -Atmosphäre 6 h bei RT gerührt, über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 32 mg (80%) von (**98**) als gelber Feststoff.

HPLC: $R_t = 0.81$ min., 96%.

EI-MS: $m/z = 180$ $[\text{M}]^+$.

1*H*-Pyrrolo-[2,3-*c*]-pyridin-2(3*H*)-on (**94**)^[240]



Eine Lösung aus Ethyl-2-(3-aminopyridin-4-yl)-acetat (**98**) (32 mg, 0.18 mmol) in 3M HCl-Lösung (1 mL) wird 1 h bei 90°C gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 21 mg (91%) von (**94**) als roter Feststoff.

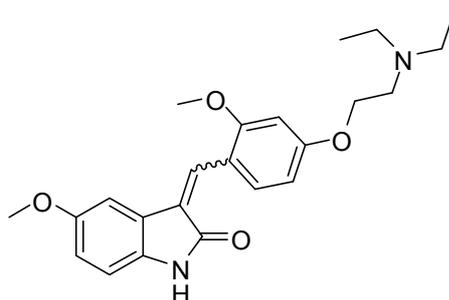
HPLC: $R_t = 0.71$ min. 95%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): $\delta = 8.33$ (s, 1H), 7.86 (d, $^3J = 5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $^3J = 5$ Hz, 1H), 3.22 (s, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): $\delta = 164.6, 141.8, 129.9, 128.4, 124.1, 122.5, 62.9$ ppm.

EI-MS: $m/z = 134$ [M]⁺.

3-(4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-2-methoxybenzyliden)-5-methoxyindolin-2-on (**93a**)^[240]



4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-2-methoxybenzaldehyd (**103a**) (82 mg, 0.33 mmol) und 5-Methoxyindolin-2-on (**102**) (51 mg, 0.33 mmol) werden in MeOH (1 mL) gelöst und mit einem Tropfen Piperidin versetzt. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 30 min. bei 100°C gerührt und nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt.

Ausbeute: 98 mg (75%) von (**93b**) als roter Feststoff.

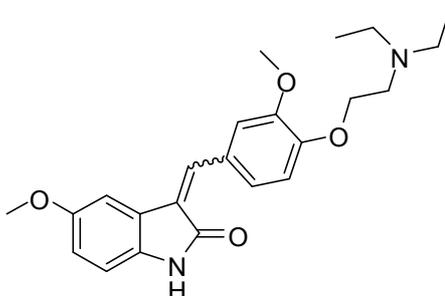
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): $\delta = 8.67$ (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.65 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.71-6.64 (m, 2H), 6.50-6.44 (m, 1H), 4.11 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.90 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H), 2.65 (q, $^3J = 7$ Hz, 4H), 1.08 (t, $^3J = 7$ Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): $\delta = 170.7, 162.2, 159.9, 154.9, 135.2, 134.2, 130.9, 125.8, 123.2, 116.5, 114.2, 110.2, 109.4, 105.2, 98.8, 66.5, 55.8, 55.6, 51.6, 47.8$ (2x C), 11.5

(2x C) ppm.

EI-MS: $m/z = 396$ $[M]^+$.

3-(4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-3-methoxybenzyliden)-5-methoxyindolin-2-on
(93b)^[240]



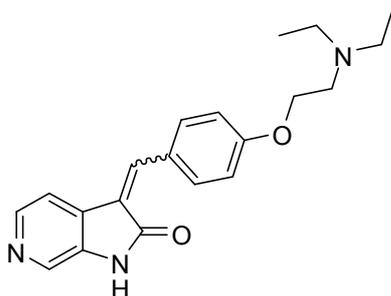
4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-3-methoxybenzaldehyd (**103b**) (77 mg, 0.31 mmol) und 5-Methoxyindolin-2-on (**102**) (50 mg, 0.31 mmol) werden in MeOH (1 mL) gelöst und mit einem Tropfen Piperidin versetzt. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 30 min. bei 100°C gerührt und nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt. **Ausbeute:** 50 mg (41%) von (**93b**) als roter Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): $\delta = 9.03$ (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.22-7.20 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.92 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H), 6.69-6.67 (m, 1H), 4.11 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 2.90 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 2.62 (q, $^3J = 7$ Hz, 4H), 1.01 (t, $^3J = 7$ Hz, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): $\delta = 170.9, 155.0, 149.9, 149.2, 137.9, 135.6, 127.7, 126.8, 123.4, 122.9, 115.9, 112.9, 112.6, 110.4, 109.9, 67.6, 56.1, 55.9, 51.6, 47.9$ (2x C), 11.7 (2x C) ppm.

EI-MS: $m/z = 396$ $[M]^+$.

3-(4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-benzyliden)-1*H*-pyrrolo-[2,3-*c*]-pyridin-2(3*H*)-on (92)^[240]



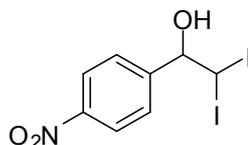
4-(2-(Diethylamino)-ethoxy)-benzaldehyd (**95**) (40 mg, 0.16 mmol) und 1*H*-Pyrrolo-[2,3-*c*]-pyridin-2(3*H*)-on (**94**) (21 mg, 0.16 mmol) werden in MeOH (1 mL) gelöst und mit einem Tropfen Piperidin versetzt. Die Reaktionslösung wird in der Mikrowelle 30 min. bei 100°C gerührt und nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (10:1)) gereinigt. **Ausbeute:** 50 mg (40%) von (**92**) als roter Feststoff.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, 300 K): δ = 8.58 (s, 1H), 8.27-8.19 (m, 3H), 7.86-7.50 (m, 2H), 7.17-7.10 (m, 2H), 4.28 (s (breit), 2H), 3.19-2.98 (m, 4H), 2.81 (s (breit), 2H), 1.24-1.06 (m, 6H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, 300 K): δ = 168.2, 161.1, 143.2, 142.7, 141.8, 141.7, 138.3, 136.4, 135.4, 132.4, 127.9, 126.7, 122.1, 115.8, 56.0, 47.0 (2x C), 43.6, 10.6 (2x C) ppm.

5.2.6 Synthese des Harnstoffs

2,2-Diiodo-1-(4-nitrophenyl)-ethanol (**118**)^[243]



Eine wasserfreie Lösung aus Iodoform (**121**) (1181 mg, 3.00 mmol) in THF (3 mL) wird auf -78°C gekühlt. Zu der Lösung wird unter Argon eine Lösung aus *i*PrMgCl (**119**) in THF (1.5 mL, 3.00 mmol) zugegeben. Nach 10 min Rühren bei -78°C wird eine Lösung aus 4-Nitrobenzaldehyd (**120**) (151 mg, 1.00 mmol) in THF (2 mL) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 1 h bei -78°C gerührt, mit NH₄Cl-Lösung versetzt und mit DCM extrahiert (4x 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃) gereinigt.

Ausbeute: 297 mg (71%) von **(118)** als gelber Feststoff.

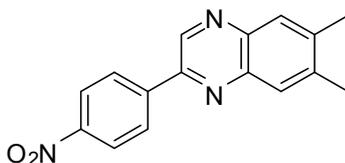
HPLC: $R_t = 6.74$ min., 98%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 300 K): $\delta = 8.18\text{-}8.14$ (m, 2H), 7.57-7.54 (m, 2H), 5.28 (d, $^3J = 4$ Hz, 1H), 4.76 (d, $^3J = 4$ Hz, 1H), ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, 300 K): $\delta = 147.9, 145.8, 127.7$ (2x C), 123.7 (2x C), 78.6, -14.2 ppm.

EI-MS: $m/z = 419$ $[\text{M}]^+$.

6, 7-Dimethyl-2-(4-nitrophenyl)-chinoxalin (115**)**^[243]



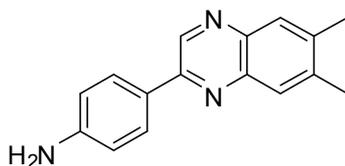
Zu einer Lösung aus 2, 2-Diiodo-1-(4-nitrophenyl)-ethanol (**118**) (297 mg, 0.71 mmol) in DMSO (5 mL) wird IBX (297 mg, 1.06 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wird 20 h bei RT gerührt und anschließend 24 h bei 50°C. Nach der Zugabe von AcOH (0.3 mL) wird eine Lösung von 2,4-Dimethyl-2-aminoanilin (**117**) (97 mg, 0.71 mmol) in EtOH (1 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 1 h bei 90°C gerührt, mit Wasser (20 mL) versetzt und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl_3) gereinigt.

Ausbeute: 158 mg (80%) von **(115)** als brauner Feststoff.

HPLC: $R_t = 7.18$ min., 97%.

EI-MS: $m/z = 279$ $[\text{M}]^+$.

4-(6, 7-Dimethylchinoxalin-2-yl)-anilin (111**)**^[244]



Zu einer Lösung aus 6, 7-Dimethyl-2-(4-nitrophenyl)-chinoxalin (**115**) (86 mg, 0.31 mmol) in EtOH (5 mL) wird AcOH (0.7 mL), Fe (103 mg, 1.85 mmol) und FeCl_3 (50 mg, 0.31 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 1 h bei 80°C gerührt, über Celite filtriert und mit EE (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet

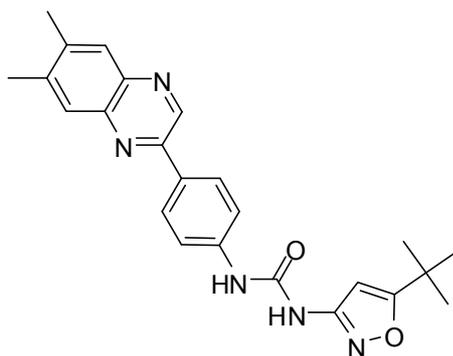
und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH (15:1)) gereinigt.

Ausbeute: 29 mg (77%) von (**111**) als gelber Feststoff.

HPLC: R_t = 3.62 min., 95%.

ESI-MS: *m/z* = 250 [M+H]⁺.

1-(5-*tert*-Butylisoxazol-3-yl)-3-(4-(6, 7-dimethylchinoxalin-2-yl)-phenyl)-harnstoff (**110**)^[151]



Eine Lösung aus 3-Amino-*tert*-Butylisoxazol (**113**) (16 mg, 0.12 mmol) in Toluol (4 mL) wird auf -10°C abgekühlt und mit Triphosgen (**114**) (10 mg, 0.03 mmol) versetzt. Eine Lösung aus Triethylamin (12 mg, 0.12 mmol) in Toluol (1 mL) wird zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt. Zu dieser Reaktionslösung wird eine Lösung aus 4-(6, 7-Dimethylchinoxalin-2-yl)-anilin (**111**) (29 mg, 0.12 mmol) in Toluol (2 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 15 h bei 110°C gerührt, mit Wasser (10 mL) versetzt und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO₃-Lösung (3x 20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 29 mg (77%) von (**110**) als gelber Feststoff.

HPLC: R_t = 8.10 min., 95%.

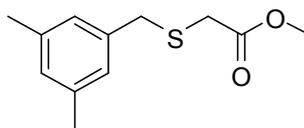
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ = 9.60 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 6.55 (s, 1H), 2.51 (s, 6H), 1.32 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300 K): δ = 158.3, 151.2, 151.1, 140.9, 140.7, 140.4, 140.2, 139.8, 130.3, 127.9 (4 x C), 127.7 (2x C), 118.6 (2x C), 118.4, 92.5, 19.8 (3x C), 19.7 (2x C) ppm.

ESI-MS: *m/z* = 438 [M+Na]⁺.

5.2.7 Synthese der potentiellen Meprin-Inhibitoren

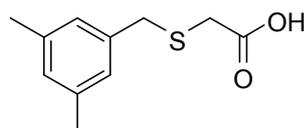
Methyl-2-(3, 5-dimethylbenzylthio)-acetat (**136**)



Methylmercaptoacetat (**137**) (54 mg, 0.51 mmol) und Triethylamin (102 mg, 1.01 mmol) werden in MeCN (2 mL) gelöst und mit einer Lösung aus 3, 5-Dimethylbenzylbromid (**138**) (100 mg, 0.51 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wird 1 h bei 80°C gerührt, mit Wasser (10 mL) versetzt und mit EE (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **Ausbeute:** 103 mg (90%) von (**136**) als gelbes Öl.

HPLC: R_t = 7.31 min., 95%.

2-(3, 5-Dimethylbenzylthio)-essigsäure (**126**)



Methyl-2-(3, 5-dimethylbenzylthio)-acetat (**136**) (103 mg, 0.46 mmol) wird in Dioxan/Wasser (3 mL/1 mL) gelöst und mit KOH (257 mg, 4.60 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wird 12 h bei 75°C gerührt, mit Wasser (10 mL) versetzt und mit 2N HCl auf pH = 2 gebracht. Die wässrige Phase wird mit DCM (3x 20 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 81 mg (84%) von (**126**) als gelber Feststoff.

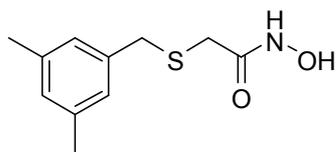
HPLC: R_t = 5.69 min., 98%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ = 10.81 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.03 (s, 2H), 2.33 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300 K): δ = 176.8, 138.2 (2x C), 136.7, 129.1, 127.2, 127.0, 36.4, 32.2, 21.2, 20.8 ppm.

EI-MS: m/z = 210 [M]⁺.

2-(3, 5-Dimethylbenzylthio)-*N*-hydroxyacetamid (133)



Zu einer Lösung aus 2-(3, 5-Dimethylbenzylthio)-essigsäure (**126**) (204 mg, 0.97 mmol), PyBOP (505 mg, 0.97 mmol) und TEA (294 mg, 2.91 mmol) in DCM (10 mL) wird Hydroxylaminhydrochlorid (**139**) (70 mg, 1.00 mmol) zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (20 mL) und mit EE extrahiert (3x 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit 0.1M HCl-Lösung (3x 50 mL) und ges. NaCl-Lösung (3x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird gereinigt durch eine *reversed phase* Chromatographie.

Ausbeute: 181 mg (83%) von (**133**) als farbloser Feststoff.

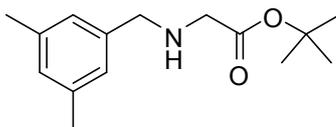
HPLC: R_t = 3.69 min., 98%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ = 6.90-6.86 (m, 3H), 3.70 (s, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.29 (s, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 300 K): δ = 168.2, 138.7 (2x C), 136.8, 129.1, 127.2 (2x C), 36.7, 32.5, 21.0 (2x C) ppm.

ESI-MS: m/z = 248 [M+Na]⁺.

tert-Butyl-2-(3, 5-dimethylbenzylamino)-acetat (141)



Glycin-*tert*-Butylesterhydrochlorid (**143**) (106 mg, 0.63 mmol) und 3, 5-Dimethylbenzaldehyd (**144**) (50 mg, 0.37 mmol) werden in abs. MeOH gelöst und mit NaOAc (52 mg, 0.63 mmol) versetzt. Zu der Lösung wird Molsieb gegeben und 15 min. geschüttelt. Zu der Lösung wird NaCNBH₃ (40 mg, 0.63 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 2 h zugegeben und die Reaktionslösung bei RT geschüttelt. Das Molsieb wird filtriert, die Reaktionslösung mit Wasser versetzt (10 mL) und mit EE (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (3:1)) gereinigt.

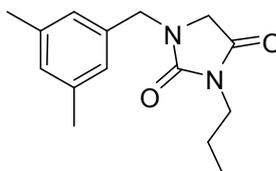
Ausbeute: 51 mg (55%) von (**141**) als farbloses Öl.

HPLC: $R_t = 2.59$ min., 78%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): $\delta = 6.87$ (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.23 (s, 2H), 2.23 (s, 6H), 1.40 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): $\delta = 166.9$, 139.0, 138.0, 128.8 (2x C), 126.2 (2x C), 81.2, 53.4, 50.8, 28.4 (3x C), 21.2 (2x C) ppm.

1-(3, 5-Dimethylbenzyl)-3-propylimidazolidin-2,4-dion (145)



Amin (**141**) (49 mg, 0.20 mmol) wird in abs. DMF gelöst und mit Cs_2CO_3 (71 mg, 0.22 mmol) versetzt. Nach 10 min. Rühren wird zu der Suspension eine Lösung aus Propylisocyanat (**142**) (17 mg, 0.20 mmol) in abs. DMF zugetropft und die Reaktionslösung 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt (10 mL) und mit EE (3x 10 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (CH/EE (1:1)) gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (52%) von (**145**) als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): $\delta = 6.96$ (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.53 (t, $^3J = 5$ Hz, 2H), 2.32 (s, 6H), 1.70 (m, 2H), 0.96 (t, $^3J = 7$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): $\delta = 170.1$, 156.9, 138.7, 135.4, 129.8 (2x C), 125.9 (2x C), 49.0, 46.6, 40.7, 21.4 (2x C), 21.2, 11.2 ppm.

EI-MS: $m/z = 260$ $[\text{M}]^+$.

5.3 Beschreibung der Assays

γ -Sekretase-Assays

Die γ -Sekretase-Aktivität der Substanzen wurde anhand eines zellulären LPECL-Assays bestimmt. Als Zelllinie dienten transfizierte humane Neuroglioma-H4-Zellen, die humanen Wildtyp-APP überexprimieren. Die biotinylierten A β spezifischen Antikörper 6E10 oder 4G8 (Signet Laboratories) werden als Capture-Antikörper für die N-terminale Sequenz verwendet. Für die C-terminale Sequenz werden die spezifischen Antikörper BAP15, BAP24 und BAP29 verwendet, die elektrochemiluminiszent markiert sind. Die zu testenden Substanzen werden in DMSO gelöst und mit Zellkulturmedium zu der gewünschten Konzentration verdünnt. 100 μ L dieser Lösung werden zu den Zellen gegeben, die 20-24 h bei 37°C inkubiert werden. M-280 paramagnetische Eisenkügelchen werden mit der Assay-Pufferlösung verdünnt (50 mM Tris, 60 mM NaCl, 0.5% BSA und 1% Tween-20, pH 7.4). 50 μ L des aufbereiteten Zellkulturmediums werden mit 50 μ L der M-280 enthaltenden Pufferlösung und 25 μ L der Antikörper-Lösung versetzt. Dabei werden die folgenden Antikörper verwendet: 6E10-bio und BAP29-TAG zur Detektion von A β_{38} , 6E10-bio und BAP24-TAG zur Detektion von A β_{40} , 6E10-bio und BAP15-TAG zur Detektion von A β_{42} und 4G8-bio und 6E10-TAG zur Detektion von A β gesamt. Die Lösung wird auf ein Volumen von 250 μ L aufgefüllt und 3 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Um standardisierte Kurven zu generieren, werden synthetische A β_{38} , A β_{40} und A β_{42} -Peptide verwendet (Bachem). Die A β -Peptide werden in DMSO (1mg/mL) gelöst und die Aliquots bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung werden sie in Zellkulturmedium (16-2000 pg/mL) verdünnt. Die Elektrochemilumineszenz wird mit einem M8-Analyzer (Bioversis) gemessen. IC₅₀/EC₅₀-Werte werden mit Hilfe der Software GraphPad Prism bestimmt.

Die γ -Sekretase-Aktivität der Substanzen wurde anhand eines zellulären ELISA-Assays bestimmt. Als Zelllinie dienten CHO-Zellen, die humanen Wildtyp-APP und PSEN1 überexprimieren (in DMEM mit Zusatz von 10% FBS). Die Zellen werden in einer Mikrotiterplatte mit 96 wells mit verschiedenen Konzentrationen des potentiellen GSM bzw. DMSO als Kontrolle versetzt (jeweils als Triplikat). Die Mikrotiterplatte mit den enthaltenen behandelten Zellen wird 24 h inkubiert und die Zellkulturüberstände im Anschluss via ELISA analysiert. Der monoklonale Antikörper IC16 (1:250 in PBS, pH 7.2) dient als Capture-Antikörper. Um standardisierte Kurven zu generieren, werden synthetische A β_{38} , A β_{40} und A β_{42} -Peptide verwendet (JPT Peptide Technologies). Die A β -Peptide werden in DMSO (1mg/mL) gelöst und die Aliquots bei -80°C gelagert. Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wird

mit dem Capture-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Entfernen von überschüssigem Antikörper werden die aufbereiteten Proben (20 µL für die Detektion von Aβ₄₀, 120 µL für die Detektion von Aβ₄₂, 70 µL für die Detektion von Aβ₃₈) sowie die frisch gelösten Aβ-Peptid-Standards (125-6000 pg/mL in PBS mit Zusatz von 0.05% Tween-20 und 1% BSA) zugegeben. Im Anschluss werden die spezifischen Sekundärantikörper für Aβ₃₈, Aβ₄₀ und Aβ₄₂ (markiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), Pierce EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit, Thermo Fisher Scientific) für die C-terminale Detektion in PBS (0.05% Tween-20, 1% BSA) gelöst und zu jedem well hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten werden dreimal mit PBS (0.05% Tween-20, 1% BSA) und anschließend einmal mit reinem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 50 µL TMB (Thermo Fisher Scientific) zur HRP-Detektion wird erneut 1-10 min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 50 µL 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption mit einem Paradigm Mikroplatten-Reader (Beckman Coulter) bei 450 nm gemessen. Der Durchschnitt der Triplikat-Messungen jeder Substanz-konzentration wird bestimmt. Die IC₅₀/EC₅₀-Werte werden durch eine nicht-lineare Kurvenanpassung aus sechs bis acht verschiedenen Konzentrationen der Substanz aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die statistische Analyse erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism.

FLT3-Assay

Die Aktivität auf die Kinase FLT3 wird bei der Firma Cerep gemessen. Die Quantifizierung erfolgt über die Phosphorylierung des Substrats Ulight-CAGAGAIETDKEYYTVKD (JAK1) mit der Detektionsmethode LANCE. Als Referenzverbindung wird der multi-Kinase-Inhibitor Staurosporin verwendet. Es wird ein humanes rekombinantes Enzym benutzt, das in Insektenzellen exprimiert wird. Die Testsubstanz, die Referenzverbindung oder Wasser (als Kontrolle) werden zu dem Enzym (0.252 ng) gegeben in eine Pufferlösung bestehend aus: 40 mM Hepes/Tris (pH 7.4), 0.8 mM EGTA/Tris, 8 mM MgCl₂, 1.6 mM DTT und 0.008% Tween-20. Im Anschluss wird die Reaktion durch die Zugabe von 100 nM des Substrats JAK1 und 200 nM ATP gestartet und für 90 min. bei RT inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 13 mM EDTA gestoppt. Nach 5 min. wird der Antikörper anti-phospho-PT66 (markiert mit Europium) zugegeben. Nach weiteren 60 Minuten wird der Fluoreszenztransfer ($\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$) mit einem Mikrotiterplatten Reader (Envision, Perkin Elmer) bestimmt. Das Ergebnis wird prozentual in Bezug auf die Referenzverbindung Staurosporin angegeben.

Meprin β -Assay

HEK293T-Zellen (in DMEM mit Zusatz von 10% FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 100 Einheiten/mL Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin, Invitrogen) mit stabiler APP695 Expression wurden mittels Calcium-Phosphat Transfektion mit Meprin β -pLHCX transfiziert (bei 37°C, 5% CO₂). Die Zellen werden mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen in frischem Zellkulturmedium (DMSO als Kontrolle) über Nacht inkubiert. Die Auswertung des Assays erfolgt über Western Blotting. Dabei wird die Expression von APP, Meprin- β , der A β -Peptide und Tubulin zur Kontrolle untersucht. Für die Analyse von APP und Meprin β werden Zellysate, für die Analyse von A β der Zellüberstand verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgt über SDS-PAGE. Die hierbei verwendete Pufferlösung besteht aus: 1 M (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure, 1 M Tris, 69.3 mM Natriumlaurylsulfat, 20.5 mM EDTA und Wasser. Als Trenngel wird ein selbst hergestelltes Gel auf Polyacrylamid-Basis (30% Acrylamid, 1.6 M Bis Tris, Wasser, 10% APS, TEMED) verwendet. Für die Auftrennung von APP und Meprin β wird ein 10%iges Acrylamid-Gel, für die Auftrennung von A β ein 14%iges Acrylamid-Gel verwendet. Im Anschluss werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran bzw. für A β auf eine PVDF-Membran (Transferpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20% Methanol, Wasser) über einen Zeitraum von 1.5 h bei 70 V mit einem Mini-Trans-Blot Elektrophorese Transfer Zellsystem (BioRad) transferiert. Anschließend wird die Membran mit TBST (5% Milchpulver) 60 Minuten bei RT behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zur Immunodetektion werden die Blots in einer entsprechend verdünnten Lösung des Primärantikörpers (PAK) in TBST (5% Milchpulver) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Membran wird dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen und im Anschluss mit einer Lösung des Sekundärantikörpers (SAK) in TBST (5% Milchpulver) behandelt und 1 h inkubiert. Nach dem erneuten Waschen mit TBST werden die Sekundärantikörper via Chemilumineszenz mit dem Substrat Immobilon (Millipore) mit einem Fuji LAS-3000 (Fujifilm) detektiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Meprin β : Mep1b (1:2000 in 5% Milchpulver/TBST, R&D Systems), donkey-anti-goat (1:3000 in 5% Milchpulver/TBST, Sigma-Aldrich), APP: 9E10 (1:300 in TBST, aus Hybridoma-Zelllinie), donkey-anti-mouse (1:3000 in 5% Milchpulver/TBST, Sigma-Aldrich), Tubulin: Tubulin (1:5000 in TBST, Sigma-Aldrich), donkey-anti-mouse (1:3000 in 5% Milchpulver/TBST), A β : 6E10 (1:1000 in TBS, Covance), donkey-anti-mouse (1:3000 in 5% Milchpulver/TBST).

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. Alzheimer, *Allgemeine Zeitung für Psychatrie* **1907**, 146.
- [2] *Alzheimer's Association, Alzheimer's Disease and Facts and Figures*, **2012**, 8, http://www.alz.org/downloads/facts_figures_2012.pdf, 3.12.2013.
- [3] M. Di Paola, C. Caltagirone, L. Fadda, U. Sabatini, L. Serra, G. A. Carlesimo, *Hippocampus* **2008**, 18, 719-728.
- [4] B. H. Ridha, J. Barnes, L. A. van de Pol, et al., *Archives of Neurology* **2007**, 64, 849-854.
- [5] C. Uotani, K. Sugimori, K. Kobayashi, *Psychiatry and Clinical Neurosciences* **2006**, 60, 319-326.
- [6] M. Bobinski, J. Wegiel, H. M. Wisniewski, M. Tarnawski, M. Bobinski, B. Reisberg, M. J. De Leon, D. C. Miller, *Neurobiology of Aging* **1996**, 17, 909-919.
- [7] M. Sjöbeck, M. Haglund, E. Englund, *International Journal of Geriatric Psychiatry* **2005**, 20, 919-926.
- [8] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, 120, 885-890.
- [9] P. D. Gorevic, F. Goni, B. Pons-Estel, F. Alvarez, N. S. Peress, B. Frangione, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **1986**, 45, 647-664.
- [10] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, K. Beyreuther, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, 82, 4245-4249.
- [11] S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *Journal of Neurochemistry* **1992**, 59, 750-753.
- [12] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, H. M. Wisniewski, *Journal of Biological Chemistry* **1986**, 261, 6084-6089.
- [13] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L. I. Binder, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, 83, 4913-4917.
- [14] C. Haass, E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung, D. J. Selkoe, *Nature* **1992**, 357, 500-503.
- [15] L. Bertram, R. E. Tanzi, *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, 115, 1449-1457.
- [16] R. Jakob-Roetne, H. Jacobsen, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 3074-3105.
- [17] A. Goate, M.-C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, R. Mant, P. Newton, K. Rooke, P. Roques, C. Talbot, M. Pericak-Vance, A. Roses, R. Williamson, M. Rossor, M. Owen, J. Hardy, *Nature* **1991**, 349, 704-706.

-
- [18] E. I. Rogaev, R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, S. Sorbi, B. Nacmias, S. Piacentini, L. Amaducci, I. Chumakov, D. Cohen, L. Lannfelt, P. E. Fraser, J. M. Rommens, P. H. S. George-Hyslop, *Nature* **1995**, *376*, 775-778.
- [19] R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Perkcak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens, P. H. St George-Hyslop, *Nature* **1995**, *375*, 754-760.
- [20] A. D. Roses, *Neurobiology of Disease* **1997**, *4*, 170-185.
- [21] J. C. Breitner, B. A. Gau, K. A. Welsh, B. L. Plassman, W. M. McDonald, M. J. Helms, J. C. Anthony, *Neurology* **1994**, *44*, 227-232.
- [22] P. L. McGeer, E. G. McGeer, *Neurobiology of Aging* **2007**, *28*, 639-647.
- [23] C. Reitz, T. den Heijer, C. van Duijn, A. Hofman, M. M. Breteler, *Neurology* **2007**, *69*, 998-1005.
- [24] A. Ruitenberg, J. C. van Swieten, J. C. M. Wittteman, K. M. Mehta, C. M. van Duijn, A. Hofman, M. M. B. Breteler, *The Lancet* **2002**, *359*, 281-286.
- [25] Q. Liu, F. Xie, R. Rolston, P. I. Moreira, A. Nunomura, X. Zhu, M. A. Smith, G. Perry, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2007**, *7*, 171-180.
- [26] F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 5892-5901.
- [27] H. O. Tayeb, H. D. Yang, B. H. Price, F. I. Tarazi, *Pharmacology & Therapeutics* **2012**, *134*, 8-25.
- [28] B. Winblad, N. Poritis, *International Journal of Geriatric Psychiatry* **1999**, *14*, 135-146.
- [29] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, *400*, 173-177.
- [30] C. Janus, J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C.

-
- Bergeron, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop, D. Westaway, *Nature* **2000**, *408*, 979-982.
- [31] D. Morgan, D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, G. W. Arendash, *Nature* **2000**, *408*, 982-985.
- [32] A. J. Bayer, R. Bullock, R. W. Jones, D. Wilkinson, K. R. Paterson, L. Jenkins, S. B. Millais, S. Donoghue, *Neurology* **2005**, *64*, 94-101.
- [33] J. M. Orgogozo, A. S. Rigaud, A. Stoffler, H. J. Mobius, F. Forette, *Stroke* **2002**, *33*, 1834-1839.
- [34] P. R. Turner, K. O'Connor, W. P. Tate, W. C. Abraham, *Progress in Neurobiology* **2003**, *70*, 1-32.
- [35] F. Checler, *Journal of Neurochemistry* **1995**, *65*, 1431-1444.
- [36] K. C. Breen, M. Bruce, B. H. Anderton, *Journal of Neuroscience Research* **1991**, *28*, 90-100.
- [37] T. Okamoto, S. Takeda, U. Giambarella, Y. Murayama, T. Matsui, T. Katada, Y. Matsuura, I. Nishimoto, *The EMBO Journal* **1996**, *15*, 3769-3777.
- [38] F. Esch, P. Keim, E. Beattie, R. Blacher, A. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, P. Ward, *Science* **1990**, *248*, 1122-1124.
- [39] C. Haass, D. J. Selkoe, *Cell* **1993**, *75*, 1039-1042.
- [40] S. Estus, T. E. Golde, T. Kunishita, D. Blades, D. Lowery, M. Eisen, M. Usiak, X. M. Qu, T. Tabira, B. D. Greenberg, et al., *Science* **1992**, *255*, 726-728.
- [41] K. Sambamurti, J. Hardy, L. M. Refolo, D. K. Lahiri, *Drug Development Research* **2002**, *56*, 211-227.
- [42] D. B. Teplow, *Amyloid* **1998**, *5*, 121-142.
- [43] J. D. Harper, P. T. Lansbury, Jr., *Annual Review of Biochemistry* **1997**, *66*, 385-407.
- [44] R. J. Bateman, L. Y. Munsell, J. C. Morris, R. Swarm, K. E. Yarasheski, D. M. Holtzman, *Nature Medicine* **2006**, *12*, 856-861.
- [45] J. R. Cirrito, P. C. May, M. A. O'Dell, J. W. Taylor, M. Parsadanian, J. W. Cramer, J. E. Audia, J. S. Nissen, K. R. Bales, S. M. Paul, R. B. DeMattos, D. M. Holtzman, *Journal of Neuroscience* **2003**, *23*, 8844-8853.
- [46] N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. J. Lee, T. C. Saido, *Science* **2001**, *292*, 1550-1552.
- [47] B. V. Zlokovic, *Journal of Neurochemistry* **2004**, *89*, 807-811.
- [48] J. Hardy, G. Higgins, *Science* **1992**, *256*, 184-185.

-
- [49] D. J. Selkoe, *Neuron* **1991**, *6*, 487-498.
- [50] D. M. Hartley, D. M. Walsh, C. P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *Journal of Neuroscience* **1999**, *19*, 8876-8884.
- [51] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 6448-6453.
- [52] J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, K. H. Ashe, *Nature Neuroscience* **2005**, *8*, 79-84.
- [53] P. Osenkowski, H. Li, W. Ye, D. Li, L. Aeschbach, P. C. Fraering, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, H. Li, *Journal of Molecular Biology* **2009**, *385*, 642-652.
- [54] T. Sato, T. S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass, M. S. Wolfe, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33985-33993.
- [55] M. S. Wolfe, W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly, D. J. Selkoe, *Nature* **1999**, *398*, 513-517.
- [56] W. P. Esler, W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, C. L. Moore, J.-Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *Nature Cell Biology* **2000**, *2*, 428-434.
- [57] Y. M. Li, M. Xu, M. T. Lai, Q. Huang, J. L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J. G. Neduelil, R. B. Register, M. K. Sardana, M. S. Shearman, A. L. Smith, X. P. Shi, K. C. Yin, J. A. Shafer, S. J. Gardell, *Nature* **2000**, *405*, 689-694.
- [58] X. Li, S. Dang, C. Yan, X. Gong, J. Wang, Y. Shi, *Nature* **2013**, *493*, 56-61.
- [59] S. Shah, S. F. Lee, K. Tabuchi, Y. H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C. E. Dann, 3rd, T. Sudhof, G. Yu, *Cell* **2005**, *122*, 435-447.
- [60] W. P. Esler, W. T. Kimberly, B. L. Ostaszewski, W. Ye, T. S. Diehl, D. J. Selkoe, M. S. Wolfe, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 2720-2725.
- [61] M. E. Fortini, *Developmental Cell* **2009**, *16*, 633-647.
- [62] M. S. Wolfe, *Journal of Neurochemistry* **2012**, *120*, 89-98.
- [63] W.-L. Wu, L. Zhang, *Drug Development Research* **2009**, *70*, 94-100.
- [64] J. Higaki, D. Quon, Z. Zhong, B. Cordell, *Neuron* **1995**, *14*, 651-659.
- [65] H.-W. Klafki, D. Abramowski, R. Swoboda, P. A. Paganetti, M. Staufenbiel, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 28655-28659.
- [66] H. W. Klafki, P. A. Paganetti, B. Sommer, M. Staufenbiel, *Neuroscience Letters* **1995**, *201*, 29-32.

-
- [67] M. S. Wolfe, M. Citron, T. S. Diehl, W. Xia, I. O. Donkor, D. J. Selkoe, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 6-9.
- [68] M. S. Shearman, D. Beher, E. E. Clarke, H. D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A. L. Smith, G. Stevenson, J. L. Castro, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8698-8704.
- [69] H. F. Dovey, V. John, J. P. Anderson, L. Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L. Y. Fang, S. B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E. J. Holsztynska, K. L. Hu, K. L. Johnson-Wood, S. L. Kennedy, D. Kholodenko, J. E. Knops, L. H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I. M. Lieberburg, R. N. Motter, L. C. Mutter, J. Nietz, K. P. Quinn, K. L. Sacchi, P. A. Seubert, G. M. Shopp, E. D. Thorsett, J. S. Tung, J. Wu, S. Yang, C. T. Yin, D. B. Schenk, P. C. May, L. D. Altstiel, M. H. Bender, L. N. Boggs, T. C. Britton, J. C. Clemens, D. L. Czilli, D. K. Dieckman-McGinty, J. J. Droste, K. S. Fuson, B. D. Gitter, P. A. Hyslop, E. M. Johnstone, W. Y. Li, S. P. Little, T. E. Mabry, F. D. Miller, J. E. Audia, *Journal of Neurochemistry* **2001**, *76*, 173-181.
- [70] A. Geling, H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif, C. Haass, *EMBO Reports* **2002**, *3*, 688-694.
- [71] I. Churcher, D. Beher, J. D. Best, J. L. Castro, E. E. Clarke, A. Gentry, T. Harrison, L. Hitzel, E. Kay, S. Kerrad, H. D. Lewis, P. Morentin-Gutierrez, R. Mortishire-Smith, P. J. Oakley, M. Reilly, D. E. Shaw, M. S. Shearman, M. R. Teall, S. Williams, J. D. J. Wrigley, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 280-284.
- [72] P. C. May, Altstein, L., Bender, M., Boggs, L., Calligaro, D., Fuson, K., *Neurobiology of Aging* **2002**, *23*, 133.
- [73] D. Seiffert, J. D. Bradley, C. M. Rominger, D. H. Rominger, F. Yang, J. E. Meredith, Q. Wang, A. H. Roach, L. A. Thompson, S. M. Spitz, J. N. Higaki, S. R. Prakash, A. P. Combs, R. A. Copeland, S. P. Arneric, P. R. Hartig, D. W. Robertson, B. Cordell, A. M. Stern, R. E. Olson, R. Zaczek, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 34086-34091.
- [74] G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins, E. M. Parker, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 12876-12882.
- [75] R. S. Doody, R. Raman, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, F. He, X. Sun, R. G. Thomas, P. S. Aisen, E. Siemers, G. Sethuraman, R. Mohs, *New England Journal of Medicine* **2013**, *369*, 341-350.
- [76] J. D. Best, D. W. Smith, M. A. Reilly, R. O'Donnell, H. D. Lewis, S. Ellis, N. Wilkie, T. W. Rosahl, P. A. Laroque, C. Boussiquet-Leroux, I. Churcher, J. R. Atack, T.

-
- Harrison, M. S. Shearman, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, *320*, 552-558.
- [77] M. S. Wolfe, *Advances in Pharmacology* **2012**, *64*, 127-153.
- [78] J. J. Anderson, G. Holtz, P. P. Baskin, M. Turner, B. Rowe, B. Wang, M. Z. Kounnas, B. T. Lamb, D. Barten, K. Felsenstein, I. McDonald, K. Srinivasan, B. Munoz, S. L. Wagner, *Biochemical Pharmacology* **2005**, *69*, 689-698.
- [79] D. M. Barten, V. L. Guss, J. A. Corsa, A. Loo, S. B. Hansel, M. Zheng, B. Munoz, K. Srinivasan, B. Wang, B. J. Robertson, C. T. Polson, J. Wang, S. B. Roberts, J. P. Hendrick, J. J. Anderson, J. K. Loy, R. Denton, T. A. Verdoorn, D. W. Smith, K. M. Felsenstein, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *312*, 635-643.
- [80] A. Kreft, B. Harrison, S. Aschmies, K. Atchison, D. Casebier, D. C. Cole, G. Diamantidis, J. Ellingboe, D. Hauze, Y. Hu, D. Huryn, M. Jin, D. Kubrak, P. Lu, J. Lundquist, C. Mann, R. Martone, W. Moore, A. Oganessian, A. Porte, D. R. Riddell, J. Sonnenberg-Reines, J. R. Stock, S.-C. Sun, E. Wagner, K. Woller, Z. Xu, H. Zhou, J. Steven Jacobsen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 4232-4236.
- [81] J. Meunier, V. Villard, L. Givalois, T. Maurice, *European Journal of Pharmacology* **2013**, *698*, 193-199.
- [82] S. C. Mayer, A. F. Kreft, B. Harrison, M. Abou-Gharbia, M. Antane, S. Aschmies, K. Atchison, M. Chlenov, D. C. Cole, T. Comery, G. Diamantidis, J. Ellingboe, K. Fan, R. Galante, C. Gonzales, D. M. Ho, M. E. Hoke, Y. Hu, D. Huryn, U. Jain, M. Jin, K. Kremer, D. Kubrak, M. Lin, P. Lu, R. Magolda, R. Martone, W. Moore, A. Oganessian, M. N. Pangalos, A. Porte, P. Reinhart, L. Resnick, D. R. Riddell, J. Sonnenberg-Reines, J. R. Stock, S.-C. Sun, E. Wagner, T. Wang, K. Woller, Z. Xu, M. M. Zaleska, J. Zeldis, M. Zhang, H. Zhou, J. S. Jacobsen, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 7348-7351.
- [83] K. W. Gillman, J. E. Starrett, M. F. Parker, K. Xie, J. J. Bronson, L. R. Marcin, K. E. McElhone, C. P. Bergstrom, R. A. Mate, R. Williams, J. E. Meredith, C. R. Burton, D. M. Barten, J. H. Toyn, S. B. Roberts, K. A. Lentz, J. G. Houston, R. Zaczek, C. F. Albright, C. P. Decicco, J. E. Macor, R. E. Olson, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1*, 120-124.
- [84] G. Tong, L. Castaneda, J.-S. Wang, O. Sverdlov, S.-P. Huang, R. Slemmon, H. Gu, O. Wong, H. Li, R. M. Berman, C. Smith, C. Albright, R. C. Dockens, *Clinical Drug Investigation* **2012**, *32*, 761-769.

-
- [85] G. Tong, J.-S. Wang, O. Sverdllov, S.-P. Huang, R. Slemmon, R. Croop, L. Castaneda, H. Gu, O. Wong, H. Li, R. M. Berman, C. Smith, C. F. Albright, R. C. Dockens, *Clinical Therapeutics* **2012**, *34*, 654-667.
- [86] V. Coric, C. H. van Dyck, S. Salloway, N. Andreasen, M. Brody, R. W. Richter, H. Soininen, S. Thein, T. Shiovitz, G. Pilcher, S. Colby, L. Rollin, R. Dockens, C. Pachai, E. Portelius, U. Andreasson, K. Blennow, H. Soares, C. Albright, H. H. Feldman, R. M. Berman, *Archives of Neurology* **2012**, *69*, 1430-1440.
- [87] J. Wang, L. Ho, G. M. Pasinetti, *Alzheimer's & Dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **2005**, *1*, S62.
- [88] A. Mullard, *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11*, 657-660.
- [89] S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, E. H. Koo, *Nature* **2001**, *414*, 212-216.
- [90] J. L. Eriksen, S. A. Sagi, T. E. Smith, S. Weggen, P. Das, D. C. McLendon, V. V. Ozols, K. W. Jessing, K. H. Zavitz, E. H. Koo, T. E. Golde, *Journal of Clinical Investigation* **2003**, *112*, 440-449.
- [91] T. Kukar, S. Prescott, J. L. Eriksen, V. Holloway, M. P. Murphy, E. H. Koo, T. E. Golde, M. M. Nicolle, *BMC Neuroscience* **2007**, *8*, 54.
- [92] Green Rc, et al., *Journal of the American Medical Association* **2009**, *302*, 2557-2564.
- [93] J. L. Eriksen, S. A. Sagi, T. E. Smith, S. Weggen, P. Das, D. C. McLendon, V. V. Ozols, K. W. Jessing, K. H. Zavitz, E. H. Koo, T. E. Golde, *Journal of Clinical Investigation* **2003**, *112*, 440-449.
- [94] D. Oehlrich, D. J. C. Berthelot, H. J. M. Gijssen, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *54*, 669-698.
- [95] B. P. Imbimbo, E. Del Giudice, D. Colavito, A. D'Arrigo, M. D. Carbonare, G. Villetti, F. Facchinetti, R. Volta, V. Pietrini, M. F. Baroc, L. Serneels, B. De Strooper, A. Leon, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, *323*, 822-830.
- [96] B. P. Imbimbo, E. Frigerio, M. Breda, F. Fiorentini, M. Fernandez, S. Sivilia, L. Giardino, L. Calza, D. Norris, D. Casula, M. Shenouda, *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **2013**, *27*, 278-286.
- [97] M. Z. Kounnas, A. M. Danks, S. Cheng, C. Tyree, E. Ackerman, X. Zhang, K. Ahn, P. Nguyen, D. Comer, L. Mao, C. Yu, D. Pleyne, P. J. Digregorio, G. Velicelebi, K. A.

- Stauderman, W. T. Comer, W. C. Mobley, Y. M. Li, S. S. Sisodia, R. E. Tanzi, S. L. Wagner, *Neuron* **2010**, *67*, 769-780.
- [98] M. G. Stanton, J. Hubbs, D. Sloman, C. Hamblett, P. Andrade, M. Angagaw, G. Bi, R. M. Black, J. Crispino, J. C. Cruz, E. Fan, G. Farris, B. L. Hughes, C. M. Kenific, R. E. Middleton, G. Nikov, P. Sajonz, S. Shah, N. Shomer, A. A. Szewczak, F. Tanga, M. T. Tudge, M. Shearman, B. Munoz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 755-758.
- [99] S. Baumann, N. Höttecke, R. Schubanel, K. Baumann, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 6986-6990.
- [100] R. Narlawar, K. Baumann, C. Czech, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 5428-5431.
- [101] T. L. Kukar, T. B. Ladd, P. Robertson, S. A. Pintchovski, B. Moore, M. A. Bann, Z. Ren, K. Jansen-West, K. Malphrus, S. Eggert, H. Maruyama, B. A. Cottrell, P. Das, G. S. Basi, E. H. Koo, T. E. Golde, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *286*, 39804-39812.
- [102] E. Czirr, S. Leuchtenberger, C. Dorner-Ciossek, A. Schneider, M. Jucker, E. H. Koo, C. U. Pietrzik, K. Baumann, S. Weggen, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 24504-24513.
- [103] A. Lleo, O. Berezovska, L. Herl, S. Raju, A. Deng, B. J. Bacskai, M. P. Frosch, M. Irizarry, B. T. Hyman, *Nature Medicine* **2004**, *10*, 1065-1066.
- [104] Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 18664-18670.
- [105] T. L. Kukar, T. B. Ladd, M. A. Bann, P. C. Fraering, R. Narlawar, G. M. Maharvi, B. Healy, R. Chapman, A. T. Welzel, R. W. Price, B. Moore, V. Rangachari, B. Cusack, J. Eriksen, K. Jansen-West, C. Verbeeck, D. Yager, C. Eckman, W. Ye, S. Sagi, B. A. Cottrell, J. Torpey, T. L. Rosenberry, A. Fauq, M. S. Wolfe, B. Schmidt, D. M. Walsh, E. H. Koo, T. E. Golde, *Nature* **2008**, *453*, 925-929.
- [106] Krebs in Deutschland 2007/2008, Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V., 2012, Berlin.
- [107] U. Creutzig, M. M. van den Heuvel-Eibrink, B. Gibson, M. N. Dworzak, S. Adachi, E. de Bont, J. Harbott, H. Hasle, D. Johnston, A. Kinoshita, T. Lehrnbecher, G. Leverger,

-
- E. Mejstrikova, S. Meshinchi, A. Pession, S. C. Raimondi, L. Sung, J. Stary, C. M. Zwaan, G. J. Kaspers, D. Reinhardt, *Blood* **2012**, *120*, 3187-3205.
- [108] R. M. Stone, M. R. O'Donnell, M. A. Sekeres, *Hematology* **2004**, 98-117.
- [109] www.kinderkrebsinfo.de 25.11.2013.
- [110] M. Belson, B. Kingsley, A. Holmes, *Environmental Health Perspect* **2007**, *115*, 138-145.
- [111] P. A. Buffler, M. L. Kwan, P. Reynolds, K. Y. Urayama, *Cancer Investigation* **2005**, *23*, 60-75.
- [112] J. K. Hitzler, J. Cheung, Y. Li, S. W. Scherer, A. Zipursky, *Blood* **2003**, *101*, 4301-4304.
- [113] T. Kindler, D. B. Lipka, T. Fischer, *Blood* **2010**, *116*, 5089-5102.
- [114] E. H. Estey, *Haematologica* **2011**, *96*, 795-798.
- [115] B. Lowenberg, *Blood* **2013**, *121*, 26-28.
- [116] D. A. Pollyea, H. E. Kohrt, B. C. Medeiros, *British Journal of Haematology* **2011**, *152*, 524-542.
- [117] G. J. Roboz, *Current Opinion in Oncology* **2012**, *24*, 711-719.
- [118] B. A. R. Hassan, *Pharmaceutica Analytica Acta* **2012**, *3*, e113.
- [119] M. Hamadani, F. T. Awan, E. A. Copelan, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **2008**, *14*, 556-567.
- [120] M. Brune, S. Castaigne, J. Catalano, K. Gehlsen, A. D. Ho, W. K. Hofmann, D. E. Hogge, B. Nilsson, R. Or, A. I. Romero, J. M. Rowe, B. Simonsson, R. Spearing, E. A. Stadtmauer, J. Szer, E. Wallhult, K. Hellstrand, *Blood* **2006**, *108*, 88-96.
- [121] P. F. Bross, J. Beitz, G. Chen, X. H. Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams, R. Pazdur, *Clinical Cancer Research* **2001**, *7*, 1490-1496.
- [122] E. L. Sievers, R. A. Larson, E. A. Stadtmauer, E. Estey, B. Lowenberg, H. Dombret, C. Karanes, M. Theobald, J. M. Bennett, M. L. Sherman, M. S. Berger, C. B. Eten, M. R. Loken, J. J. van Dongen, I. D. Bernstein, F. R. Appelbaum, *Journal of Clinical Oncology* **2001**, *19*, 3244-3254.
- [123] L. Fianchi, L. Pagano, F. Leoni, S. Storti, M. T. Voso, C. G. Valentini, S. Rutella, A. Scardocci, M. Caira, G. Gianfaldoni, G. Leone, *Annals of Oncology* **2008**, *19*, 128-134.
- [124] B. Lowenberg, J. Beck, C. Graux, W. van Putten, H. C. Schouten, L. F. Verdonck, A. Ferrant, P. Sonneveld, M. Jongen-Lavrencic, M. von Lilienfeld-Toal, B. J. Biemond,

-
- E. Vellenga, D. Breems, H. de Muijnck, R. Schaafsma, G. Verhoef, H. Dohner, A. Gratwohl, T. Pabst, G. J. Ossenkoppele, J. Maertens, *Blood* **2010**, *115*, 2586-2591.
- [125] P. P. Piccaluga, G. Martinelli, M. Rondoni, M. Malagola, S. Gaitani, G. Visani, M. Baccarani, *Leukemia Research* **2004**, *28*, 987-990.
- [126] Y. Tu, C. Chen, J. Pan, J. Xu, Z.-G. Zhou, C.-Y. Wang, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **2012**, *5*, 726-738.
- [127] D. Buac, M. Shen, S. Schmitt, F. R. Kona, R. Deshmukh, Z. Zhang, C. Neslund-Dudas, B. Mitra, Q. P. Dou, *Current Pharmaceutical Design* **2013**, *19*, 4025-4038.
- [128] L. Gatti, V. Zuco, N. Zaffaroni, P. Perego, *Current Pharmaceutical Design* **2013**, *19*, 4094-4114.
- [129] R. C. Kane, P. F. Bross, A. T. Farrell, R. Pazdur, *The Oncologist* **2003**, *8*, 508-513.
- [130] A. M. Roccaro, T. Hideshima, P. G. Richardson, D. Russo, D. Ribatti, A. Vacca, F. Dammacco, K. C. Anderson, *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2006**, *7*, 441-448.
- [131] E. C. Attar, D. J. De Angelo, J. G. Supko, F. D'Amato, D. Zahrieh, A. Sirulnik, M. Wadleigh, K. K. Ballen, S. McAfee, K. B. Miller, J. Levine, I. Galinsky, E. G. Trehu, D. Schenkein, D. Neuberg, R. M. Stone, P. C. Amrein, *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 1446-1454.
- [132] C. Sarlo, F. Buccisano, L. Maurillo, M. Cefalo, C. L. Di, L. Cicconi, C. Ditto, L. Ottaviani, V. A. Di, P. M. I. Del, M. A. Grasso, D. Nasso, S. G. De, S. Amadori, A. Venditti, *Leukemia Research and Treatment* **2013**, 705714, 705716 pp.
- [133] M. Grunwald, M. Levis, *International Journal of Hematology* **2013**, *97*, 683-694.
- [134] A. Y. H. Leung, C. H. Man, Y. L. Kwong, *Leukemia* **2013**, *27*, 260-268.
- [135] D. Bossemeyer, *FEBS Letters* **1995**, *369*, 57-61.
- [136] D. G. Gilliland, J. D. Griffin, *Blood* **2002**, *100*, 1532-1542.
- [137] J. Griffith, J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, K. Saxena, *Molecular Cell* **2004**, *13*, 169-178.
- [138] D. L. Stirewalt, J. P. Radich, *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 650-665.
- [139] O. DeLapeyrière, P. Naquet, J. Planche, S. Marchetto, R. Rottapel, D. Gambarelli, O. Rosnet, D. Birnbaum, *Differentiation* **1995**, *58*, 351-359.
- [140] N. Maroc, R. Rottapel, O. Rosnet, S. Marchetto, C. Lavezzi, P. Mannoni, D. Birnbaum, P. Dubreuil, *Oncogene* **1993**, *8*, 909-918.
- [141] O. Rosnet, M.-G. Matteï, S. Marchetto, D. Birnbaum, *Genomics* **1991**, *9*, 380-385.
- [142] H. G. Drexler, *Leukemia* **1996**, *10*, 588-599.

-
- [143] O. Rosnet, H.-J. Buhning, O. Delapeyriere, N. Beslu, C. Lavagna, S. Marchetto, I. Rappold, H. G. Drexler, F. Birg, a. et, *Acta Haematologica* **1996**, *95*, 218-223.
- [144] W. J. C. Rombouts, I. Blokland, B. Lowenberg, R. E. Ploemacher, *Leukemia* **2000**, *14*, 675-683.
- [145] M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, S. Misawa, *Leukemia* **1996**, *10*, 1911-1918.
- [146] F. M. Abu-Duhier, A. C. Goodeve, G. A. Wilson, R. S. Care, I. R. Peake, J. T. Reilly, *British Journal of Haematology* **2001**, *113*, 983-988.
- [147] Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano, R. Suzuki, Y. Kodera, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, F. Yagasaki, C. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, H. Saito, R. Ueda, R. Ohno, T. Naoe, *Blood* **2001**, *97*, 2434-2439.
- [148] J. E. Cortes, H. Kantarjian, J. M. Foran, D. Ghirdaladze, M. Zodelava, G. Borthakur, G. Gammon, D. Trone, R. C. Armstrong, J. James, M. Levis, *Journal of Clinical Oncology* **2013**, *31*, 3681-3687.
- [149] P. P. Zarrinkar, R. N. Gunawardane, M. D. Cramer, M. F. Gardner, D. Brigham, B. Belli, M. W. Karaman, K. W. Pratz, G. Pallares, Q. Chao, K. G. Sprankle, H. K. Patel, M. Levis, R. C. Armstrong, J. James, S. S. Bhagwat, *Blood* **2009**, *114*, 2984-2992.
- [150] T. Burkholder, J. Clayton, M. Rempala, J. Henry, J. Knobloch, D. Mendel, J. McLean, Y. Hao, D. Barda, E. Considine, M. Uhlik, Y. Chen, L. Ma, L. Bloem, J. Akunda, D. McCann, M. Sanchez-Felix, D. Clawson, M. Lahn, J. Starling, *Investigational New Drugs* **2012**, *30*, 936-949.
- [151] Q. Chao, K. G. Sprankle, R. M. Grotzfeld, A. G. Lai, T. A. Carter, A. M. Velasco, R. N. Gunawardane, M. D. Cramer, M. F. Gardner, J. James, P. P. Zarrinkar, H. K. Patel, S. S. Bhagwat, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 7808-7816.
- [152] M. Levis, J. Allebach, K.-F. Tse, R. Zheng, B. R. Baldwin, B. D. Smith, S. Jones-Bolin, B. Ruggeri, C. Dionne, D. Small, *Blood* **2002**, *99*, 3885-3891.
- [153] E. Weisberg, C. Boulton, L. M. Kelly, P. Manley, D. Fabbro, T. Meyer, D. G. Gilliland, J. D. Griffin, *Cancer Cell* **2002**, *1*, 433-443.
- [154] J. E. Cortes, A. E. Perl, H. Dombret, S. Kayser, B. Steffen, P. Rousselot, G. Martinelli, E. H. Estey, A. K. Burnett, G. Gammon, D. Trone, E. Leo, M. J. Levis, *ASH Annual Meeting Abstracts* **2012**, *120*, 48.

-
- [155] M. J. Levis, A. E. Perl, H. Dombret, H. Dohner, B. Steffen, P. Rousselot, G. Martinelli, E. H. Estey, A. K. Burnett, G. Gammon, D. Trone, E. Leo, J. E. Cortes, *ASH Annual Meeting Abstracts* **2012**, *120*, 673.
- [156] A.-M. O'Farrell, T. J. Abrams, H. A. Yuen, T. J. Ngai, S. G. Louie, K. W. H. Yee, L. M. Wong, W. Hong, L. B. Lee, A. Town, B. D. Smolich, W. C. Manning, L. J. Murray, M. C. Heinrich, J. M. Cherrington, *Blood* **2003**, *101*, 3597-3605.
- [157] A.-M. O'Farrell, J. M. Foran, W. Fiedler, H. Serve, R. L. Paquette, M. A. Cooper, H. A. Yuen, S. G. Louie, H. Kim, S. Nicholas, M. C. Heinrich, W. E. Berdel, C. Bello, M. Jacobs, P. Scigalla, W. C. Manning, S. Kelsey, J. M. Cherrington, *Clinical Cancer Research* **2003**, *9*, 5465-5476.
- [158] S. K. W. Fiedler, M. Kabenko, J. Krauter, H. S. Salih, K. Götze, *Blood (Annual Meeting, Abstracts)* **2012**, *120*, Abstract 1483.
- [159] T. Fischer, R. M. Stone, D. J. DeAngelo, I. Galinsky, E. Estey, C. Lanza, E. Fox, G. Ehninger, E. J. Feldman, G. J. Schiller, V. M. Klimek, S. D. Nimer, D. G. Gilliland, C. Dutreix, A. Huntsman-Labed, J. Virkus, F. J. Giles, *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 4339-4345.
- [160] R. M. Stone, T. Fischer, R. Paquette, G. Schiller, C. A. Schiffer, G. Ehninger, J. Cortes, H. M. Kantarjian, D. J. DeAngelo, A. Huntsman-Labed, C. Dutreix, C. A. del, F. Giles, *Leukemia* **2012**, *26*, 2061-2068.
- [161] B. D. Smith, M. Levis, M. Beran, F. Giles, H. Kantarjian, K. Berg, K. M. Murphy, T. Dausies, J. Allebach, D. Small, *Blood* **2004**, *103*, 3669-3676.
- [162] M. Levis, F. Ravandi, E. S. Wang, M. R. Baer, A. Perl, S. Coutre, H. Erba, R. K. Stuart, M. Baccarani, L. D. Cripe, M. S. Tallman, G. Meloni, L. A. Godley, A. A. Langston, S. Amadori, I. D. Lewis, A. Nagler, R. Stone, K. Yee, A. Advani, D. Douer, W. Wiktor-Jedrzejczak, G. Juliusson, M. R. Litzow, S. Petersdorf, M. Sanz, H. M. Kantarjian, T. Sato, L. Tremmel, D. M. Bensen-Kennedy, D. Small, B. D. Smith, *Blood* **2011**, *117*, 3294-3301.
- [163] M. Crump, D. Hedley, S. Kamel-Reid, B. Leber, R. Wells, J. Brandwein, R. Buckstein, J. Kassis, M. Minden, J. Matthews, S. Robinson, R. Turner, L. McIntosh, E. Eisenhauer, L. Seymour, *Leukemia & Lymphoma* **2010**, *51*, 252-260.
- [164] W. Zhang, M. Konopleva, Y. X. Shi, T. McQueen, D. Harris, X. Ling, Z. Estrov, A. Quintas-Cardama, D. Small, J. Cortes, M. Andreeff, *Journal of the National Cancer Institute* **2008**, *100*, 184-198.

-
- [165] F. Ravandi, J. E. Cortes, D. Jones, S. Faderl, G. Garcia-Manero, M. Y. Konopleva, S. O'Brien, Z. Estrov, G. Borthakur, D. Thomas, S. R. Pierce, M. Brandt, A. Byrd, B. N. Bekele, K. Pratz, R. Luthra, M. Levis, M. Andreeff, H. M. Kantarjian, *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 1856-1862.
- [166] D. A. Macdonald, S. E. Assouline, J. Brandwein, S. Kamel-Reid, E. A. Eisenhauer, S. Couban, S. Caplan, A. Foo, W. Walsh, B. Leber, *Leukemia & Lymphoma* **2013**, *54*, 760-766.
- [167] G. M. O. Amombo, T. Kramer, M. F. Lo, S. Goering, M. Fach, S. Smith, S. Kolb, R. Schubeneel, K. Baumann, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 7634-7640.
- [168] E. E. Sterchi, W. Stocker, J. S. Bond, *Molecular Aspects of Medicine* **2008**, *29*, 309-328.
- [169] F. X. Gomis-Ruth, S. Trillo-Muyo, W. Stocker, *Biological Chemistry* **2012**, *393*, 1027-1041.
- [170] J. L. Arolas, C. Broder, T. Jefferson, T. Guevara, E. E. Sterchi, W. Bode, W. Stocker, C. Becker-Pauly, F. X. Gomis-Ruth, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 16131-16136.
- [171] J. S. Bond, R. J. Beynon, *Protein Science* **1995**, *4*, 1247-1261.
- [172] C. Becker, M. N. Kruse, K. A. Sloty, D. Köhler, J. R. Harris, S. Rösmann, E. E. Sterchi, W. Stöcker, *Biological Chemistry* **2003**, *384*, 825.
- [173] G. P. Bertenshaw, M. T. Norcum, J. S. Bond, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 2522-2532.
- [174] P. Marchand, J. Tang, J. S. Bond, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 15388-15393.
- [175] R. J. Beynon, J. D. Shannon, J. S. Bond, *Biochemical Journal* **1981**, *199*, 591-598.
- [176] E. E. Sterchi, J. R. Green, M. J. Lentze, *Clinical Science* **1982**, *62*, 557-560.
- [177] C. Becker-Pauly, M. Howel, T. Walker, A. Vlad, K. Aufenvenne, V. Oji, D. Lottaz, E. E. Sterchi, M. Debela, V. Magdolen, H. Traupe, W. Stocker, *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 1115-1125.
- [178] J. M. Crisman, B. Zhang, L. P. Norman, J. S. Bond, *Journal of Immunology* **2004**, *172*, 4510-4519.
- [179] D. Kronenberg, B. C. Bruns, C. Moali, S. Vadon-Le Goff, E. E. Sterchi, H. Traupe, M. Bohm, D. J. Hulmes, W. Stocker, C. Becker-Pauly, *Journal of Investigative Dermatology* **2010**, *130*, 2727-2735.

-
- [180] D. Lottaz, D. Hahn, S. Müller, C. Müller, E. E. Sterchi, *European Journal of Biochemistry* **1999**, *259*, 496-504.
- [181] D. Lottaz, C. A. Maurer, D. Hahn, M. W. Büchler, E. E. Sterchi, *Cancer Research* **1999**, *59*, 1127-1133.
- [182] G. Matters, A. Manni, J. Bond, *Clinical & Experimental Metastasis* **2005**, *22*, 331-339.
- [183] E. E. Sterchi, H. Y. Naim, M. J. Lentze, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1988**, *265*, 119-127.
- [184] E. E. Sterchi, H. Y. Naim, M. J. Lentze, H.-P. Hauri, J. A. M. Fransen, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1988**, *265*, 105-118.
- [185] T. Yamaguchi, M. Fukase, H. Kido, T. Sugimoto, N. Katunuma, K. Chihara, *Life Sciences* **1994**, *54*, 381-386.
- [186] T. Jefferson, M. Causevic, d. K. U. auf, O. Schilling, S. Isbert, R. Geyer, W. Maier, S. Tschickardt, T. Jumpertz, S. Weggen, J. S. Bond, C. M. Overall, C. U. Pietrzik, C. Becker-Pauly, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 27741-27750.
- [187] J. Grünberg, E. Dumermuth, J. A. Eldering, E. E. Sterchi, *FEBS Letters* **1993**, *335*, 376-379.
- [188] G. P. Bertenshaw, B. E. Turk, S. J. Hubbard, G. L. Matters, J. E. Bylander, J. M. Crisman, L. C. Cantley, J. S. Bond, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 13248-13255.
- [189] T. Jefferson, U. Keller, C. Bellac, V. V. Metz, C. Broder, J. Hedrich, A. Ohler, W. Maier, V. Magdolen, E. Sterchi, J. S. Bond, A. Jayakumar, H. Traupe, A. Chalaris, S. Rose-John, C. U. Pietrzik, R. Postina, C. M. Overall, C. Becker-Pauly, *Cellular and Molecular Life Science* **2013**, *70*, 309-333.
- [190] C. Broder, C. Becker-Pauly, *Biochemical Journal* **2013**, *450*, 253-264.
- [191] S. Banerjee, J. S. Bond, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 31371-31377.
- [192] S. Banerjee, B. Oneda, L. M. Yap, D. P. Jewell, G. L. Matters, L. R. Fitzpatrick, F. Seibold, E. E. Sterchi, T. Ahmad, D. Lottaz, J. S. Bond, *Mucosal Immunology* **2009**, *2*, 220-231.
- [193] J. B. DeGuzman, P. W. Speiser, H. Trachtman, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **2004**, *17*, 1663-1666.
- [194] R. Mathew, S. Futterweit, E. Valderrama, A. A. Tarectecan, J. E. Bylander, J. S. Bond, H. Trachtman, *American Journal of Renal Physiology* **2005**, *289*, F911-921.

-
- [195] H. Trachtman, E. Valderrama, J. M. Dietrich, J. S. Bond, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *208*, 498-505.
- [196] J. Bylander, Q. Li, G. Ramesh, B. Zhang, W. B. Reeves, J. S. Bond, *American Journal of Renal Physiology* **2008**, *294*, F480-490.
- [197] C. Herzog, R. Seth, S. V. Shah, G. P. Kaushal, *Kidney International* **2007**, *71*, 1009-1018.
- [198] R. W. Schrier, W. Wang, B. Poole, A. Mitra, *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *114*, 5-14.
- [199] P. D. Walker, G. P. Kaushal, S. V. Shah, *Kidney International* **1998**, *53*, 1673-1680.
- [200] C. Broder, P. Arnold, S. Vadon-Le Goff, M. A. Konerding, K. Bahr, S. Müller, C. M. Overall, J. S. Bond, T. Koudelka, A. Tholey, D. J. S. Hulmes, C. Moali, C. Becker-Pauly, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 14219-14224.
- [201] A. Schuette, J. Hedrich, W. Stoecker, C. Becker-Pauly, *PLOS One* **2010**, *5*, doi:10.1371/journal.pone.0008835.
- [202] P. Carmeliet, *Nature* **2005**, *438*, 932-936.
- [203] D. Lottaz, C. A. Maurer, D. Hahn, M. W. Buchler, E. E. Sterchi, *Cancer Research* **1999**, *59*, 1127-1133.
- [204] G. L. Matters, A. Manni, J. S. Bond, *Clinical & Experimental Metastasis* **2005**, *22*, 331-339.
- [205] J. Bien, T. Jefferson, M. Causevic, T. Jumpertz, L. Munter, G. Multhaup, S. Weggen, C. Becker-Pauly, C. U. Pietrzik, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 33304-33313.
- [206] M. Bibl, M. Gallus, V. Welge, S. Lehmann, K. Sparbier, H. Esselmann, J. Wiltfang, *Proteomics - Clinical Applications* **2012**, *6*, 163-169.
- [207] J. Wiltfang, H. Esselmann, P. Cupers, M. Neumann, H. Kretzschmar, M. Beyermann, D. Schleuder, H. Jahn, E. Rüther, J. Kornhuber, W. Annaert, B. De Strooper, P. Saftig, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 42645-42657.
- [208] M.-N. Kruse, C. Becker, D. Lottaz, D. Koehler, I. Yiallourous, H.-W. Krell, E. E. Sterchi, W. Stoecker, *Biochemical Journal* **2004**, *378*, 383-389.
- [209] H. Ryu, L. R. Subramanian, M. Hanack, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6236-6247.
- [210] G. Koeckelberghs, G. L. De, J. Perez-Moreno, I. Asselberghs, K. Clays, T. Verbiest, C. Samyn, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3772-3781.
- [211] J.-G. Kim, D. H. Kang, D. O. Jang, *Synlett* **2008**, *2008*, 443-447.

-
- [212] J. Kelder, P. D. Grootenhuis, D. M. Bayada, L. P. Delbressine, J. P. Ploemen, *Pharmaceutical Research* **1999**, *16*, 1514-1519.
- [213] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [214] K. Palm, K. Luthman, A. L. Ungell, G. Strandlund, P. Artursson, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, *85*, 32-39.
- [215] R. Narlawar, B. I. Pérez Revuelta, K. Baumann, R. Schubanel, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 176-182.
- [216] K. Berman, H. Brodaty, *CNS Drugs* **2004**, *18*, 807-825.
- [217] D. Pratico, N. Delanty, *American Journal of Medicine* **2000**, *109*, 577-585.
- [218] S. Arlt, T. Mueller-Thomsen, U. Beisiegel, A. Kontush, *Neurochemical Research* **2012**, *37*, 2706-2714.
- [219] F. Mangialasche, W. Xu, M. Kivipelto, E. Costanzi, S. Ercolani, M. Pigliautile, R. Cecchetti, M. Baglioni, A. Simmons, H. Soininen, M. Tsolaki, I. Kloszewska, B. Vellas, S. Lovestone, P. Mecocci, *Neurobiology of Aging* **2012**, *33*, 2282-2290.
- [220] L. J. McIntosh, M. A. Trush, J. C. Troncoso, *Free Radical & Biological Chemistry* **1997**, *23*, 183-190.
- [221] F. J. Jimenez-Jimenez, F. de Bustos, J. A. Molina, J. Benito-Leon, A. Tallon-Barranco, T. Gasalla, M. Orti-Pareja, F. Guillamon, J. C. Rubio, J. Arenas, R. Enriquez-de-Salamanca, *Journal of Neural Transmission* **1997**, *104*, 703-710.
- [222] H. Tohgi, T. Abe, M. Nakanishi, F. Hamato, K. Sasaki, S. Takahashi, *Neuroscience Letters* **1994**, *174*, 73-76.
- [223] T. Metcalfe, D. M. Bowen, D. P. Muller, *Neurochemical Research* **1989**, *14*, 1209-1212.
- [224] M. Sano, C. Ernesto, R. G. Thomas, M. R. Klauber, K. Schafer, M. Grundman, P. Woodbury, J. Growdon, C. W. Cotman, E. Pfeiffer, L. S. Schneider, L. J. Thal, *The New England Journal of Medicine* **1997**, *336*, 1216-1222.
- [225] S. Lemaire-Ewing, C. Desrumaux, D. Néel, L. Lagrost, *Molecular Nutrition & Food Research* **2010**, *54*, 631-640.
- [226] R. H. Bisby, S. Ahmed, *Free Radical Biology and Medicine* **1989**, *6*, 231-239.
- [227] V. E. Kagan, P. J. Quinn, *European Journal of Biochemistry* **1988**, *171*, 661-667.
- [228] E. Niki, A. Kawakami, M. Saito, Y. Yamamoto, J. Tsuchiya, Y. Kamiya, *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 2191-2196.
- [229] T. Ohyashiki, H. Ushiro, T. Mohri, *Biochimica et biophysica acta* **1986**, *858*, 294-300.

-
- [230] V. E. Kagan, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1989**, 570, 121-135.
- [231] S. Urano, M. Matsuo, T. Sakanaka, I. Uemura, M. Koyama, I. Kumadaki, K. Fukuzawa, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1993**, 303, 10-14.
- [232] A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, *Journal of Chemical Education* **1997**, 74, 1227.
- [233] R. M. M. Brito, W. L. C. Vaz, *Analytical Biochemistry* **1986**, 152, 250-255.
- [234] S.-Y. Lin, Y.-Y. Lin, E.-M. Chen, C.-T. Hsu, C.-C. Kwan, *Langmuir* **1999**, 15, 4370-4376.
- [235] <http://www.malvern.de/common/downloads/MRK496.pdf>, 21.11.2013.
- [236] http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15402/Detergent_Selection_Table.pdf, 21.11.2013.
- [237] S. Hahn, T. Bruning, J. Ness, E. Czirr, S. Baches, H. Gijzen, C. Korth, C. U. Pietrzik, B. Bulic, S. Weggen, *Journal of Neurochemistry* **2011**, 116, 385-395.
- [238] C. C. Smith, Q. Wang, C.-S. Chin, S. Salerno, L. E. Damon, M. J. Levis, A. E. Perl, K. J. Travers, S. Wang, J. P. Hunt, P. P. Zarrinkar, E. E. Schadt, A. Kasarskis, J. Kuriyan, N. P. Shah, *Nature* **2012**, 485, 260-263.
- [239] Molecular Operating Environment (MOE), 2013.2008; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #2910, Montreal, QC, Canada, H2013A 2012R2017, 2013.
- [240] P. A. Harris, L. F. Kuyper, K. E. Lackey, J. M. Veal, Glaxo Group Limited UK **2000**, p. 105 pp.
- [241] M. Dosil, S. Wang, I. R. Lemischka, *Molecular and Cellular Biology* **1993**, 13, 6572-6585.
- [242] A. Gazit, K. Yee, A. Uecker, F.-D. Böhmer, T. Sjöblom, A. Östman, J. Waltenberger, G. Golomb, S. Banai, M. C. Heinrich, A. Levitzki, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, 2007-2018.
- [243] A. Zall, D. Bensinger, B. Schmidt, *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, 1439-1447.
- [244] B. Rane, M. Kazi, S. Bagul, D. Shelar, R. Toche, M. Jachak, *Journal of Fluorescence* **2010**, 20, 415-420.
- [245] <http://www.rcsb.org> 25.11.2013.
- [246] C. M. Griffiths-Jones, D. W. Knight, *Tetrahedron* **2010**, 66, 4150-4166.
- [247] B. G. Sanders, **2004**, U.S. 6770672.
- [248] J. Spencer, **2012**, WO2012025726A2012025721.

Eva Christine Naumann

27.1.2014

Schlossgasse 66

64331 Weiterstadt

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

[Eva Naumann]

Eva Christine Naumann

27.1.2014

Schlossgasse 66

64331 Weiterstadt

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

[Eva Naumann]

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Dipl.-Ing. Eva Christine Naumann

Geburtsdatum: 20.08.1984

Geburtsort: Mainz

Staatsangehörigkeit: Deutsch

AUSBILDUNG

07/2010 – 09/2013 **Promotion** an der TU-Darmstadt, Institut für Organische Chemie, bei Prof. Dr. B. Schmidt

Thema: „*Synthese und Evaluation neuer Inhibitoren und Modulatoren von Proteasen und Kinasen in Modellen der Alzheimer-Demenz und akuter myeloischer Leukämie*“

12/2009 – 06/2010 **Diplomarbeit** an der TU-Darmstadt, Institut für Organische Chemie, bei Prof. Dr. B. Schmidt,

Thema: „*Tetramsäuren als potentielle BACE-Inhibitoren*“

04/2004 – 11/2009 **Chemiestudium** an der TU-Darmstadt

10/2003 – 04/2004 Pädagogische Hochschule Heidelberg

07/2003 **Abitur** am Alten Kurfürstlichen Gymnasium in Bensheim