

# Entwicklung neuer selektiver inverser Agonisten für **PPAR $\beta/\delta$**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Frithjof Scheer**

aus **Göttingen**

Marburg 2013



Erstgutachter: Prof. Wibke Diederich

Zweitgutachter: Prof. Gerhard Klebe

Eingereicht am: 5.11.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Hochschulkennziffer: 1180



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregungen von Frau Prof. Dr. Wibke E. Diederich am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von März 2010 bis Oktober 2013 durchgeführt.



## Veröffentlichungen:

Scheer, F.; Lieber, S.; Meissner, W.; Naruhn, S., Adhikary, T.; Müller-Brüsselbach, S.; Diederich, W. E.; Müller, R. (Z)-2-(2-Bromophenyl)-3-[[4-(1-methyl-piperazine)-amino]phenyl]acrylonitrile (DG172): An Orally Bioavailable PPAR $\beta/\delta$ -Selective Ligand with Inverse Agonistic Properties. *J. Med. Chem.* **55**, 2858–2868 (2012).

Adhikary, T.; Brandt, D. T.; Kaddatz, K.; Stockert, J.; Naruhn, S.; Meissner, W.; Finkernagel, F.; Obert, J.; Lieber, S.; Scharfe, M.; Jarek, M.; Toth, P. M.; Scheer, F.; Diederich, W. E.; Reinartz, S.; Grosse, R.; Müller-Brüsselbach, S.; Müller, R. Inverse PPAR $\beta/\delta$  agonists suppress oncogenic signaling to the ANGPTL4 gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene* (2012).

## Internationale Patentanmeldungen:

Scheer, F.; Müller, R.; Meissner, W.; Lieber, S.; Klebe, G.; Diederich, W. E. Stilbenverbindungen als PPAR beta/delta Inhibitoren für die Behandlung von PPAR beta/delta-vermittelten Erkrankungen; International Patent Application No. PCT/EP2012/072655.

## Poster:

Scheer, F.; Lieber, S.; Meissner, W.; Naruhn, S., Adhikary, T.; Müller-Brüsselbach, S.; Müller, R.; Diederich, W. E. Development of the first orally bioavailable PPAR $\beta/\delta$ -selective inverse agonist; EFMC-ISMC 2012, XXII<sup>nd</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry, 02–06.09.2012, Berlin, Deutschland.

EFMC-ISMC Book of Abstracts, ChemMedChem 2012, P417.





---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kernrezeptoren in der Wirkstoffforschung .....	1
1.2	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren .....	2
1.2.1	Aufgaben und Funktionen .....	3
1.2.1.1	PPAR $\alpha$ .....	3
1.2.1.2	PPAR $\gamma$ .....	4
1.2.2	PPAR $\beta/\delta$ .....	6
1.2.2.1	Bestätigte Funktionen .....	6
1.2.2.2	Krebs und PPAR $\beta/\delta$ .....	7
1.2.2.3	Entzündung und PPAR $\beta/\delta$ .....	8
1.2.2.4	Funktionelle Überschneidung von PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ und PPAR $\beta/\delta$ .....	8
1.2.2.5	Endogene Liganden von PPAR $\beta/\delta$ .....	9
1.2.2.6	Synthetische Liganden .....	10
1.3	Mechanismus und Struktur .....	11
1.3.1	Allgemeiner Aufbau von Kernrezeptoren .....	11
1.3.2	Transkriptionskontrolle durch PPAR .....	12
1.3.2.1	Ligandenvermittelte Transkriptionskontrolle .....	13
1.3.2.2	Agonisten, Antagonisten, inverse Agonisten .....	15
1.3.2.3	Ligandenunabhängige Transkriptionskontrolle .....	16
1.3.3	Subtypspezifische Transkription.....	16
1.3.4	Strukturelle Grundlagen der Ligandenselektivität .....	17
2	Themenstellung.....	19
2.1	Problematik und Motivation.....	19
2.1.1	Bekannte PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitoren .....	19

---

2.2	Suche nach neuen Grundstrukturen .....	21
2.3	Aufgabenstellung.....	21
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Screening Hits.....	23
3.2	Synthese .....	24
3.3	SAR-Studie .....	25
3.3.1	SAR der oberen und unteren Region .....	26
3.3.2	Synthese der Acrylnitrilderivate .....	29
3.3.3	SAR der Acrylnitrilderivate .....	32
3.3.4	Kombination der Serien .....	34
3.3.5	Modifikationen am Piperazin.....	36
3.4	Strukturelle Rigidität der Acrylnitrilstilbene .....	38
3.5	Evaluation des optimierten Liganden .....	40
3.5.1	Aktivität und Selektivität.....	40
3.5.2	Angiotensin-like 4 .....	43
3.5.3	Bioverfügbarkeit.....	44
3.5.4	Etablierung der Bioverfügbarkeitsstudien .....	45
3.6	Versuche zur Aufklärung des Bindungsmodus.....	46
3.6.1	Proteinexpression und Aufreinigung .....	47
3.6.2	Photoaffinitätsmarkierung.....	47
3.6.2.1	Design des Photoaffinitätsliganden.....	49
3.6.2.2	Markierungsversuche .....	50
3.6.3	Proteinkristallisation .....	51
3.6.4	Problemsuche .....	54
4	Zusammenfassung.....	55
4.1	Ausblick.....	56

---

5	Experimenteller Teil .....	59
5.1	Ergänzende Daten.....	60
5.2	Chemie .....	61
5.2.1	Analytik.....	61
5.2.2	Allgemeine Methoden.....	62
5.2.3	Verbindungen .....	63
5.3	Biologie .....	140
5.3.1	Verwendete Geräte .....	140
5.3.2	Verwendete Kits und Reagenzien.....	140
5.3.3	Verwendetes Plasmid .....	141
5.3.4	Allgemein Verwendete Lösungen.....	141
5.3.5	Allgemeine Vorschriften .....	142
5.3.5.1	Proteinkonzentration .....	142
5.3.5.2	Gensequenzierung .....	142
5.3.5.3	SDS-Page.....	142
5.3.5.4	Agarose Gel .....	143
5.3.5.5	PCR .....	144
5.3.5.6	Hitzeschock-Transformation .....	144
5.3.5.7	Plasmidpräparation .....	145
5.3.5.8	PPAR $\beta/\delta$ Expression und Aufreinigung .....	145
5.3.5.9	Kristallplatten .....	147
5.3.5.10	Plasmakinetiken .....	148
5.3.5.11	Photoaffinitätslabeling.....	150
5.4	Strukturverzeichnis .....	151
6	Literatur.....	155



# 1 Einleitung

## 1.1 Kernrezeptoren in der Wirkstoffforschung

Mitte des 20. Jahrhunderts hatte die Markteinführung der Antibabypille weitreichende gesellschaftliche Folgen, sie stellt dabei jedoch nur einen Teilaspekt in der Erforschung der Kernrezeptoren dar. Bis heute ist die Steroidforschung ein Erfolgsmodell in der Medizinischen Chemie und hat nicht nur viele bewährte Arzneistoffe hervorgebracht, sondern ist auch eng verknüpft mit Meilensteinen in der Naturstoffsynthese. Die Gründe hierfür sind zum einen, dass über Kernrezeptoren viele zelluläre und extrazelluläre Signalwege gleichzeitig adressiert werden können. Zum anderen besitzen Kernrezeptoren als ligandenregulierte Transkriptionsfaktoren endogene Liganden, die in ihrer Größe typischen Arzneistoffen entsprechen. Diese Kombination macht die Superfamilie der Kernrezeptoren zu einem bevorzugten Ziel in der Medizinischen Chemie. Dementsprechend adressieren 13 % aller bis 2006 zugelassenen Arzneistoffe Kernrezeptoren, ein Wert der nur von GPCR-Liganden übertroffen wird (26.8 %)¹. Allerdings liegt die Entdeckung und Markteinführung vieler dieser Arzneistoffe schon Jahrzehnte zurück. Seit 2006 wurden nur drei NMEs (*new molecular entities*) zugelassen, von denen bekannt ist, dass sie Kernrezeptoren adressieren, was nicht einmal 3 % der Neuzulassungen entspricht<sup>2a-f</sup>. Durch Marktrücknahmen oder Indikationseinschränkungen von bereits zugelassenen Arzneistoffen wurde das Bild vom idealen Wirkstoffziel in den letzten Jahren zudem getrübt. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms in 2001 wurde bestätigt, dass bereits alle 48 humanen Kernrezeptoren bekannt sind, von denen bisher aber nur 14 von Arzneistoffen adressiert werden. Die Zahl der *orphan* Rezeptoren, also Rezeptoren für die kein endogener Ligand bekannt ist, wird immer weiter reduziert. Verstärkt in den Vordergrund rückt zudem die nicht-genomische Regulation durch Kernrezeptoren, über die weitere Signalwege gesteuert werden. Ein tieferes Verständnis dieser Prozesse und der vielfältigen Aufgaben von Kernrezeptoren könnte neue Therapieansätze aufzeigen und den Kernrezeptorliganden zu einer Renaissance in der Wirkstoffforschung verhelfen.

## 1.2 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

In den letzten 20 Jahren avancierten Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) zu den am häufigsten untersuchten Kernrezeptoren. Grund hierfür sind die vielfältigen und therapeutisch interessanten Funktionen, aber auch die Komplexität mit der diese gesteuert werden. Abgesehen von dem enormen Marktpotential von Arzneistoffen, die z. B. Übergewicht und dessen Folgen entgegenwirken könnten, sind die PPARs auch eine Rezeptorfamilie von der Grundlegendes über die genomische Regulation gelernt werden kann.

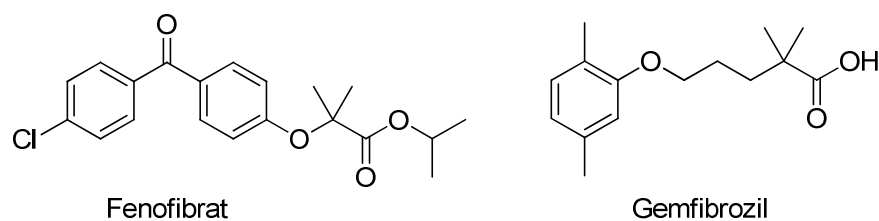
Wie die meisten Kernrezeptoren sind die PPARs ligandenregulierte Transkriptionsfaktoren. Die Familie der PPARs wird dabei in drei Subtypen eingeteilt: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) und PPAR $\gamma$  (NR1C3). Die doppelte Nomenklatur für den in dieser Arbeit behandelten PPAR $\beta/\delta$ -Subtyp resultiert, wie der Familienname, aus der zeitlichen Entdeckung. Erstmals beschrieben wurde diese Proteinfamilie 1990 als Rezeptor, der durch Peroxisom-Proliferatoren aktiviert wird, eine Gruppe von Substanzen, welche die Proliferation von Peroxisomen induzieren<sup>3</sup>. In den Jahren danach wurden mit PPAR $\beta$  und PPAR $\gamma$  zwei weitere Subtypen entdeckt<sup>4</sup> und noch später ein vermeintlich vierter Subtyp, der als PPAR $\delta$  bezeichnet wurde. Die Sequenzierung des humanen Genoms deutete jedoch an, dass nur drei Kernrezeptoren dieser Art existieren. Die Charakterisierung und der Vergleich von PPARs aus verschiedenen Spezies bestätigte diese Theorie, so dass dieser Subtyp heute als PPAR $\beta/\delta$  bezeichnet wird. Diese drei Subtypen wurden bisher in jedem untersuchten Säugetier gefunden<sup>5</sup>. Jeder Subtyp wird von einem separaten Chromosom codiert und die Expression in den verschiedenen Gewebearten ist Typ-spezifisch. PPAR $\alpha$  findet sich vor allem in braunem Fettgewebe und Organen wie Leber, Niere, Herz und Skelettmuskel. PPAR $\gamma$  wird vornehmlich in allen Fettgeweben exprimiert und zu einem geringeren Anteil im Lymphgewebe aber, wie PPAR $\alpha$  auch, in Leber, Niere, Herz und Skelettmuskel. PPAR $\beta/\delta$  wird im Gegensatz zu den anderen Subtypen ubiquitär exprimiert, findet sich aber besonders im Darm und der Haut wieder<sup>6</sup>.

### 1.2.1 Aufgaben und Funktionen

Allen PPAR-Subtypen ist gemein, dass ihnen eine elementare Rolle im Fettsäurekatabolismus zukommt. Dies spiegelt sich im Expressionsmuster und der Tatsache wider, dass viele Fettsäuren und deren Metaboliten endogene PPAR-Liganden sind. Die genauen Funktionen der einzelnen Subtypen variieren aber sehr stark und gehen weit über die Energiehomöostase der Zelle hinaus<sup>7</sup>. Zudem ist der Effekt, der durch Aktivierung von PPARs ausgelöst wird, stark abhängig vom Gewebetyp und der Art der Aktivierung.

#### 1.2.1.1 PPAR $\alpha$

Die vermutete Hauptfunktion von PPAR $\alpha$  besteht in der Regulation der Energiehomöostase durch Aktivierung des Fettsäurekatabolismus sowie der Gluconeogenese und Ketogenese zur Energieproduktion. Lange bevor diese Funktionen oder PPARs überhaupt bekannt waren, gab es bereits die ersten Arzneistoffe gegen Hyperlipidämie: die Fibrate (Abbildung 1.1).



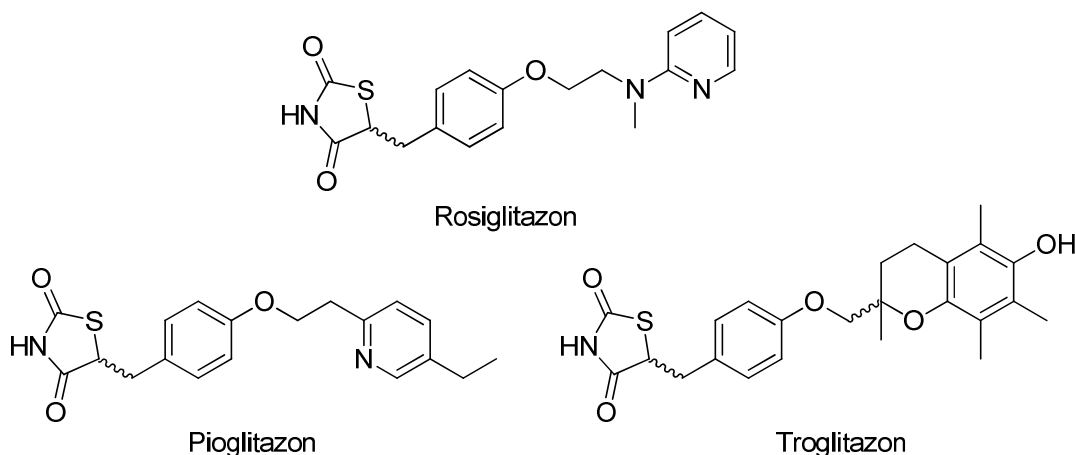
**Abbildung 1.1** Die PPAR $\alpha$ -Agonisten Fenofibrat und Gemfibrozil aus der Klasse der Fibrate.

Diese Klasse von Arzneistoffen bewirkt eine Abnahme der Triglyceride, des LDL (*low density lipoprotein*) sowie eine Zunahme des HDL (*high density lipoprotein*) und soll so die kardiovaskulären Risiken der Hyperlipidämie verringern. Erst später wurde erkannt, dass die Senkung der Lipidkonzentrationen durch die agonistische Wirkung auf PPAR $\alpha$  hervorgerufen wird. Der positive kardiovaskuläre Effekt konnte bisher jedoch nur in speziellen Risikogruppen nachgewiesen werden; so profitieren nur Patienten mit Diabetes und metabolischem Syndrom von Fenofibrat<sup>8</sup>. Jedoch legen viele weitere Befunde nahe, dass die Aktivierung von PPAR $\alpha$  kardioprotektiv wirkt und über diesen Weg zum Beispiel die inflammatorische Antwort auf kardiovaskuläre Ereignisse wie Atherosklerose reduziert

werden könnte<sup>9</sup>. Grundlage hierfür ist vermutlich die PPAR $\alpha$  induzierte Inhibition von NF- $\kappa$ B sowie von anderen Schlüsselproteinen bei der Entstehung von Entzündungen<sup>6</sup>. Eine neue Anwendung findet Fenofibrat demnach auch als Entzündungshemmer in der Behandlung von rheumatoider Arthritis<sup>10,11</sup>. Des Weiteren sind PPAR $\alpha$ -Agonisten in der Lage, das Tumorwachstum mehrerer Krebsarten in Nagern zu inhibieren. Dies geschieht über mindestens zwei Signalwege: Inhibition der Angiogenese und Hemmung der endothelialen Zellproliferation. Diskutiert werden zudem NF- $\kappa$ B abhängige Signalwege, sowie eine erhöhte Produktion bestimmter Metaboliten. Diese wirken wiederum als PPAR $\gamma$ -Agonisten und stoßen somit weitere Signalkaskaden an, die auch tumorsuppressiv wirken<sup>5</sup>.

### 1.2.1.2 PPAR $\gamma$

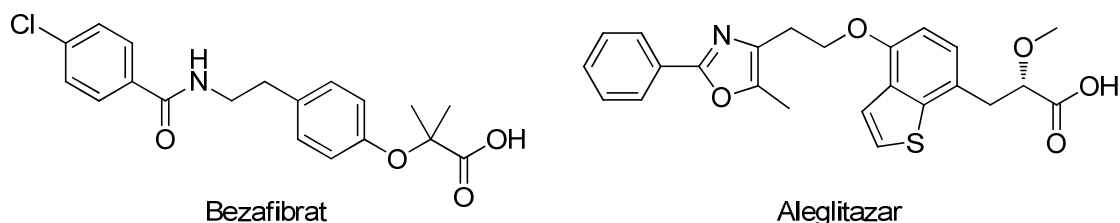
Seinem Expressionsmuster entsprechend ist PPAR $\gamma$  vor allem für die Differenzierung von Fettgewebe sowie der Aufrechterhaltung von dessen Funktionen verantwortlich, wie zum Beispiel Lipidspeicherung und Energieumwandlung. Zudem ist PPAR $\gamma$  ein Schnittpunkt zwischen Kohlenhydrat- und Lipidhaushalt, indem es die Insulinsensitivität erhöhen kann<sup>7</sup>. Wie schon im Fall der Fibrate wurden die Thiazolidindione als Insulin-Sensitizer zur Behandlung von Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) entwickelt, ohne dass zunächst deren Wirkmechanismus im Detail aufgeklärt war.



**Abbildung 1.2** Die PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon, Pioglitazon und Troglitazon.



Die drei Vertreter der Thiazolidindione, die eine Marktzulassung erfahren haben (Abbildung 1.2), konnten sich jedoch nicht lange behaupten. Troglitazon wurde in 2000 nach nur drei Jahren wegen akuter Leberschäden vom amerikanischen Markt zurückgenommen<sup>12</sup>. Pioglitazon steht im Verdacht, Blasenkrebs zu verursachen und Rosiglitazon erhöht das Infarktisiko, so dass beide Arzneistoffe nur sehr eingeschränkt verschreibungsfähig sind<sup>13,14</sup>. Interessanterweise scheint der antidiabetische Effekt jedoch nicht aus der agonistischen Wirkung auf PPAR $\gamma$  zu resultieren: PPAR $\gamma$ -Liganden, die im Gegensatz zu Rosiglitazon nur partiell agonistisch wirken, zeigen denselben antidiabetischen Effekt, rufen bei Mäusen aber keine klassischen Nebenwirkungen hervor<sup>15</sup>. Beide Liganden hemmen aber die Cdk5 (*cyclin-dependant-kinase* 5) vermittelte Phosphorylierung von PPAR $\gamma$ , so dass die Nebenwirkungen vermutlich aus der Agonisierung von PPAR $\gamma$  resultieren. Im Widerspruch dazu stehen allerdings diverse Befunde, nach denen die PPAR $\gamma$ -Aktivierung chemopräventive und in geringerem Umfang auch kardioprotektive Effekte hervorruft. Klinische Studien, in denen dieser Effekt beobachtet wurde, halten sich jedoch die Waage mit Studien, in denen kein Effekt nachgewiesen werden konnte<sup>8,5</sup>. Demnach ist die spezifische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor bedeutend für die daraus resultierenden Effekte.



**Abbildung 1.3** Die PPAR $\alpha/\gamma$ -Liganden Bezafibrat und Aleglitazar.

Hyperlipidämie und Diabetes erscheinen oft begleitend. Die Entwicklung von PPAR-Liganden, die beide Subtypen adressieren und somit antidiabetische mit lipidsenkender Wirkung kombinieren scheint demnach viel versprechend. Tatsächlich adressiert Bezafibrat (Abbildung 1.3) PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ , verhält sich in seiner Wirkung jedoch wie ein klassisches Fibrat und zeigt nur in Risikogruppen eine Verringerung der kardiovaskulären Ereignisse. Mehrere potentielle Arzneistoffe zur Behandlung von T2DM (Muraglitazar, Ragaglitazar, Tesaglitazar) haben es bis in Phase III der klinischen Studien geschafft, wiesen aber erhebliche Nebenwirkungen auf. Aleglitazar hat zwar bisher alle primären Endpunkte von Phase II erfüllt, die Entwicklung wurde aber ebenfalls in Phase III abgebrochen<sup>16</sup>.

## 1.2.2 PPAR $\beta/\delta$

Im Vergleich zu PPAR $\alpha$  und  $\gamma$  ist PPAR $\beta/\delta$  der bisher am wenigsten verstandene Subtyp. PPAR $\beta/\delta$  spielt eine Rolle in vielen biologischen Prozessen wie Lipid- und Glucosemetabolismus, Zelldifferenzierung und -proliferation, Apoptose, Entzündung und Entwicklung<sup>7</sup>. Da es sich um den in dieser Arbeit adressierten Subtyp handelt, soll an dieser Stelle genauer auf die vielfältigen Funktionen von PPAR $\beta/\delta$  eingegangen werden.

### 1.2.2.1 Bestätigte Funktionen

Obwohl es Zelltyp-spezifische Maxima in der Expression von PPAR $\beta/\delta$  gibt, kommt der Rezeptor doch in fast jedem Gewebetyp vor. Dementsprechend vielfältig sind die funktionellen Aufgaben, die PPAR $\beta/\delta$  zugeordnet werden. Über die letzten 15 Jahre sind mehrere Befunde in verschiedener Form vielfach reproduziert worden, so dass sie eindeutig als spezifische Antwort auf eine PPAR $\beta/\delta$ -Aktivierung angesehen werden können (Tabelle 1.1)<sup>17</sup>. Hierzu gehört eine Reduktion von Serum Triglyceriden sowie von HDL-C (*high-density lipoprotein cholesterol*) vermittelt durch eine im Skelettmuskel erhöhte Expression von Proteinen, die Fettsäuren metabolisieren. Die Expression von Lipogenese-Proteinen wird ebenfalls erhöht, wodurch sich die Insulinsensitivität verbessert. Weitere positive Effekte zeigen sich in der Inhibierung pro-inflammatorischer Signalwege. Zusammengenommen sind diese Effekte für die Verbesserung des metabolischen Syndroms verantwortlich, welche folglich durch Aktivierung von PPAR $\beta/\delta$  erreicht werden kann. Hier zeigt sich die essentielle Rolle von PPAR $\beta/\delta$  in der Energiehomöostase und die Vielfältigkeit der Signalwege mit der diese, ausgehend von nur einem Rezeptor, gesteuert werden kann. Diese Steuerung geschieht aber nicht nur ligandenvermittelt, sondern auch durch die Änderung des Expressionsmusters von PPAR $\beta/\delta$ , welches z. B. durch die Ernährung und Übergewicht beeinflusst wird<sup>18</sup>.

**Tabelle 1.1** Übersicht über die bestätigten Funktionen von PPAR $\beta/\delta$ <sup>17</sup>

Effekt	Induziert durch	Betroffenes Organ oder Gewebe	Spezies
Gewichtsverlust bei metabolischen Syndrom	Aktivierung	-	H
Verbesserte Insulinsensitivität	Aktivierung	-	H
Inhibition pro-inflammatorischer Signalwege	Aktivierung	Leber, Herz, Haut	H
Förderung der terminalen Zelldifferenzierung	Aktivierung	-	M
Erhöhung von Serum HDL-C	Aktivierung	-	H
Erhöhung des Fettsäurekatabolismus	Aktivierung	Fettgewebe	H
Inhibition induzierter Hautkarzinogenese	Aktivierung	Haut	M
Veränderung der PPAR $\beta/\delta$ -Expression	Training, Fasten, Übergewicht	Skelettmuskel, Fettgewebe	H
Hohe PPAR $\beta/\delta$ -Konzentration erhöht Überlebensrate bei Darmkrebs	-	Darm	H

*H = Human, M = Maus*

### 1.2.2.2 Krebs und PPAR $\beta/\delta$

Das metabolische Syndrom ist eine Krankheit, die mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergeht. Es scheint also folgerichtig, dass PPAR $\beta/\delta$  ebenfalls Einfluss auf die Krebsentstehung hat. Die Rolle von PPAR $\beta/\delta$  in der Karzinogenese und dem anschließenden Krankheitsverlauf ist jedoch höchst unklar. Aus vielen Studien lässt sich zwar eine antikarzinogene Wirkung ableiten, in mindestens genauso vielen Studien konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden. Auch die bekannten Signalwege, die von PPAR $\beta/\delta$  beeinflusst werden, lassen sich in beide Richtungen interpretieren<sup>5</sup>. Fest steht, dass PPAR $\beta/\delta$  einen Einfluss auf viele Krebsarten hat. Besonders intensiv untersucht sind in diesem Zusammenhang Darm-, Haut- und Lungenkrebs. Bei Hautkrebs konnte gezeigt werden, dass die ligandengesteuerte Aktivierung eine chemisch induzierte Hautkarzinogenese hemmt, wobei die Haut auch eines der höchsten Expressionslevel von PPAR $\beta/\delta$  aufweist. Bei Darmkrebspatienten konnte eine große klinische Studie zeigen, dass die Überlebensrate

viermal höher ist, wenn ein relativ hohes PPAR $\beta/\delta$ -Expressionslevel in den Tumorzellen vorliegt<sup>19</sup>. Inwiefern das Expressionslevel durch die Karzinogenese beeinflusst wird, ist jedoch weiterhin unklar. Für diese Krebsarten kann aktiviertem PPAR $\beta/\delta$  tendenziell ein antikarzinogener Effekt zugewiesen werden, bei Lungenkrebs lässt sich aus den *in vivo* Studien ein ähnlicher Trend ableiten<sup>17</sup>. Das allgemeine Verständnis und die aktuelle Datenlage reichen aber nicht aus, um PPAR $\beta/\delta$ -Aktivierung generell mit einem antikarzinogenen Effekt zu assoziieren.

### **1.2.2.3 Entzündung und PPAR $\beta/\delta$**

Aktivierung von PPAR $\beta/\delta$  kann Entzündungen auf mehreren Wegen entgegenwirken: Inhibition pro-inflammatorischer Signalwege wie NF- $\kappa$ B und ERK1/2 MAPK (*mitogen activated protein kinase*); Aktivierung des anti-inflammatorischen Corepressors BCL-6; lokale Reduktion pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine. Zusätzlich kann als Antwort auf inflammatorische Reize die Expression von PPAR $\beta/\delta$  erhöht werden, wie es in Keratinozyten geschieht<sup>20</sup>. Da die Karzinogenese ebenfalls einen inflammatorischen Reiz darstellt, wird vermutet, dass die etwaige antikarzinogene Wirkung von PPAR $\beta/\delta$  aus der Entzündungshemmung resultiert. Die Entwicklung von Antiphlogistika mit diesem Mechanismus ist aber noch im Anfangsstadium, da die Aktivierung von PPAR $\beta/\delta$  neben anti-inflammatorischen Antworten auch viele weitere Effekte hervorruft.

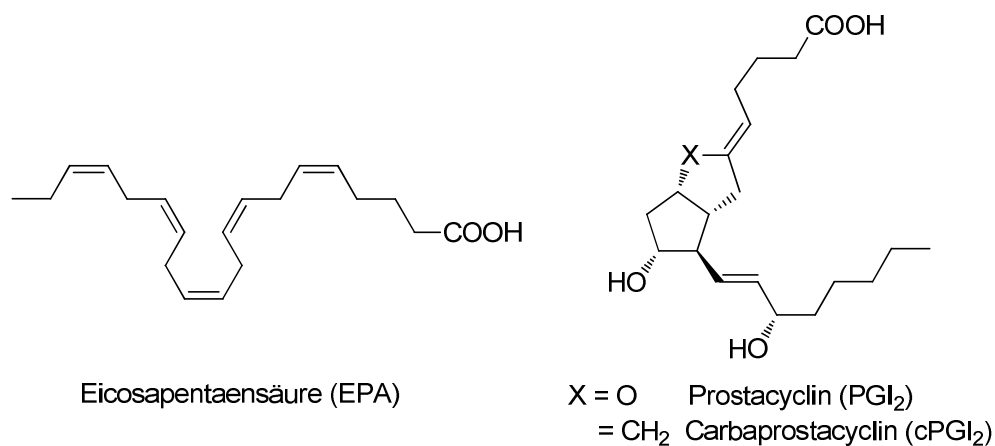
### **1.2.2.4 Funktionelle Überschneidung von PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ und PPAR $\beta/\delta$**

PPAR $\beta/\delta$  vereint viele Funktionen von PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  und stellt somit ein sehr erfolgversprechendes Wirkstoffziel in der medizinischen Forschung dar. Jeder Subtyp reguliert einen spezifischen Satz an Genen, die sich jedoch teilweise überschneiden, weshalb derselbe physiologische Effekt durch unterschiedliche PPAR-Subtypen hervorgerufen werden kann<sup>21</sup>. Die Regulation von Genen, die von allen Subtypen adressiert werden, findet über den mehrheitlich vorliegenden Subtyp statt und ist demnach stark abhängig vom jeweiligen Gewebetyp. Dabei darf aber auch nicht vergessen werden, dass viele Studien mit

verschiedenen PPAR-Agonisten angefertigt wurden, denn die regulatorische Antwort ist stark abhängig von den verwendeten Liganden.

### 1.2.2.5 Endogene Liganden von PPAR $\beta/\delta$

Die große Bindetasche von PPAR $\beta/\delta$ , näher dargestellt in Kapitel 1.3.4, erlaubt einer Vielzahl von Liganden zu binden. Durch die essentielle Rolle von PPAR $\beta/\delta$  in der Energiehomöostase ist es nur folgerichtig, dass zu den endogenen Liganden Fettsäuren (z. B. EPA, Linolensäure, Arachidonsäure) und Triglyceride sowie deren Metaboliten (z. B. 15-Hydroxy-eicosatetraensäure) gehören (Abbildung 1.4). Weitere Liganden kommen aus der Gruppe der Eicosanoide, vor allem Prostaglandine (z. B. PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>) und Prostacycline (z. B. PGI<sub>2</sub>, cPGI<sub>2</sub>).



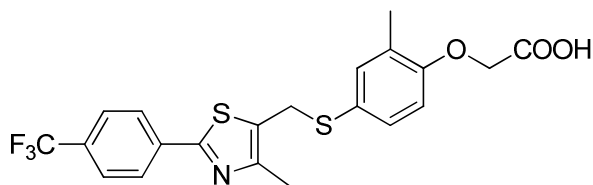
**Abbildung 1.4** Die endogenen PPAR $\beta/\delta$ -Liganden Eicosapentaensäure (EPA) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) bzw. Carbastrocyclin (cPGI<sub>2</sub>).

Gerade weil die Liganden eine so große Strukturdiversität aufweisen, ist die Affinität der meisten endogenen Liganden recht gering. Für viele Prozesse sind die endogenen Liganden aber auch nicht bekannt und die eindeutige Identifizierung gestaltet sich aufgrund der komplexen Transkriptionsregulation von PPAR sehr aufwändig (Kapitel 1.3.3). Interessanterweise zeigen alle bisher identifizierten Liganden agonistische Eigenschaften, einzig für PPAR $\gamma$  ist die cyclische Phosphatidsäure (cPA) als endogener Inhibitor beschrieben, für PPAR $\beta/\delta$  sind bisher keine solchen Liganden bekannt. Der Fokus der Forschung liegt daher meist auf der Aktivierung von PPAR, d.h. ob es ähnlich viele Inhibitoren wie

Aktivatoren gibt, oder ob die Inhibierung vorwiegend über nicht-ligandengesteuerte Mechanismen abläuft (Kapitel 1.3.2.3), lässt sich vom derzeitigen Forschungsstand nicht eindeutig beantworten, momentan überwiegen jedoch die Indizien für eine nicht-ligandenregulierte Hemmung.

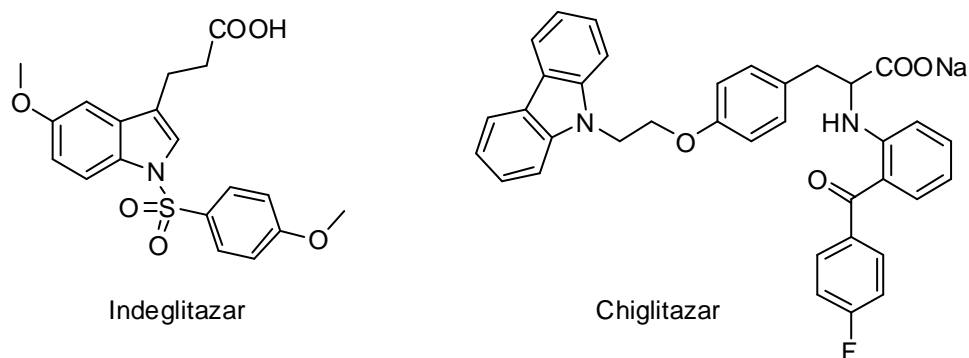
### 1.2.2.6 Synthetische Liganden

Wie auch für PPAR $\alpha$  und - $\gamma$  sind für PPAR $\beta/\delta$  eine Vielzahl synthetischer Liganden beschrieben, fast alle davon sind Agonisten oder partielle Agonisten (Kapitel 1.3.2.2)<sup>22</sup>. Der wohl am besten untersuchte Ligand ist GW501516 (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5** Struktur des PPAR $\beta/\delta$ -Liganden GW501516.

Ursprünglich entwickelt zur Behandlung von Hyperlipidämie findet der Agonist heute nur noch Anwendung in der Forschung, da die kommerzielle Entwicklung in Phase II der klinischen Prüfung gestoppt wurde. Die Gründe dafür sind bisher nicht veröffentlicht, es gibt aber Studien, die einen kanzerogenen Effekt in Mäusen nachgewiesen haben<sup>23</sup>. Mit Hilfe dieses Liganden konnte auch gezeigt werden, dass eine Überexpression bzw. Aktivierung von PPAR $\beta/\delta$  eine Leistungs- und Ausdauersteigerung zur Folge hat<sup>24</sup>. GW501516 wurde danach als Dopingmittel klassifiziert, die ersten Betrugsfälle traten kurz danach auf. In 2013 warnte die Welt Anti-Doping Agentur (WADA) offiziell vor den gesundheitlichen Folgen des Dopings mit GW501516, ein sonst sehr seltener Vorgang<sup>25</sup>. Mit KD3010 und MBX-8025 befinden sich noch zwei weitere potentielle Arzneistoffe zur Behandlung von Hyperlipidämie in der klinischen Entwicklung, die Phase I bzw. II erfolgreich abgeschlossen haben. Die Strukturen sowie der aktuelle Entwicklungsstand sind bisher aber nicht veröffentlicht<sup>26,27</sup>.



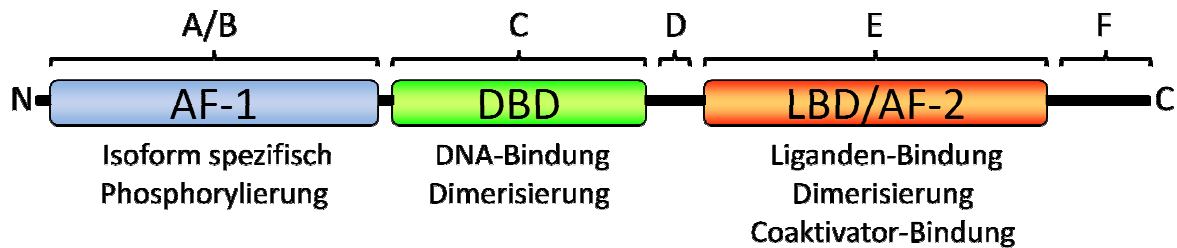
**Abbildung 1.6** Struktur der beiden Pan-PPAR-Agonisten Indeglitazar und Chiglitazar.

Indikationsgebiete wie Übergewicht, Diabetes und Hyperlipidämie sind eng miteinander verknüpft. Die Entwicklung von Agonisten, die mehrere Subtypen adressieren, ist daher ein logischer Schritt, der schon früh verfolgt wurde. Inzwischen sind mehrere Agonisten für jede mögliche Subtyp-Kombination beschrieben (Kapitel 1.2.1.2). In Kombination mit PPAR $\beta/\delta$  sind die Pan-PPAR-Liganden, also Liganden die alle drei Subtypen adressieren, in der Entwicklung am weitesten fortgeschritten. Die Pan-PPAR-Agonisten Indeglitazar und Chiglitazar befinden sich momentan in Phase 2 der klinischen Prüfung zur Behandlung von T2DM (Abbildung 1.6)<sup>22</sup>.

## 1.3 Mechanismus und Struktur

### 1.3.1 Allgemeiner Aufbau von Kernrezeptoren

Alle Kernrezeptoren sind prinzipiell gleich aufgebaut und besitzen Regionen mit spezifischen Funktionen, eingeteilt von A–F (Abbildung 1.7). Die A/B-Region ist Isoform spezifisch und kann in der Länge von ~400 Aminosäuren (Glucocorticoidrezeptoren) bis 50 Aminosäuren (Pregnan X Rezeptor) variieren, bei manchen *orphan* Rezeptoren fehlt diese Region sogar gänzlich (z. B. *Hepatocyte nuclear factor 4*). Diese ebenfalls als Aktivator Funktion 1 (AF-1) bezeichnete Region ist verantwortlich für die nicht-ligandenregulierte Transkriptionskontrolle und umfasst für die PPARs ungefähr 100 Aminosäuren.



**Abbildung 1.7** Regionen von Kernrezeptoren und deren Funktionen. AF: activator function; DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain.

Die Regionen C und E sind zwischen den Rezeptorfamilien konserviert. Die Region C (DBD, *DNA binding domain*) ist für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und DNA verantwortlich, die Ligandenbindungsdomäne E (LBD, *ligand binding domain*) ist für die ligandeninduzierte Transkriptionskontrolle zuständig und enthält die Aktivator Funktion 2 (AF-2). Die *hinge* Region D sowie Region F haben keine direkten funktionellen Aufgaben<sup>28</sup>.

### 1.3.2 Transkriptionskontrolle durch PPAR

PPAR kann auf mehreren Wegen die Transkription beeinflussen. Am besten untersucht ist die ligandenvermittelte Transkriptionskontrolle, daneben ist PPAR aber auch in der Lage eine schwächere, ligandenunabhängige Transkriptionskontrolle auszuüben. Beide Wege benötigen den Retinoid X Rezeptor (RXR) um das aktive Heterodimer zu bilden (Abbildung 1.8). RXR gehört wie PPAR zur Familie der Kernrezeptoren, ist in seiner Funktion jedoch einmalig: RXR fungiert als Dimerisierungspartner für alle Kernrezeptoren, die kein aktives Monomer oder Homodimer bilden, dominiert wird die Transkriptionskontrolle jedoch immer von dem anderen Bindungspartner. Die Transkriptionskontrolle von PPAR ist somit immer auch abhängig von dem verfügbaren RXR-Subtyp ( $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ ) und den endogenen RXR-Liganden. Die *in vivo* Aktivierung von RXR durch diese endogene Liganden ist aber weitestgehend noch ungeklärt<sup>28, 29</sup>.

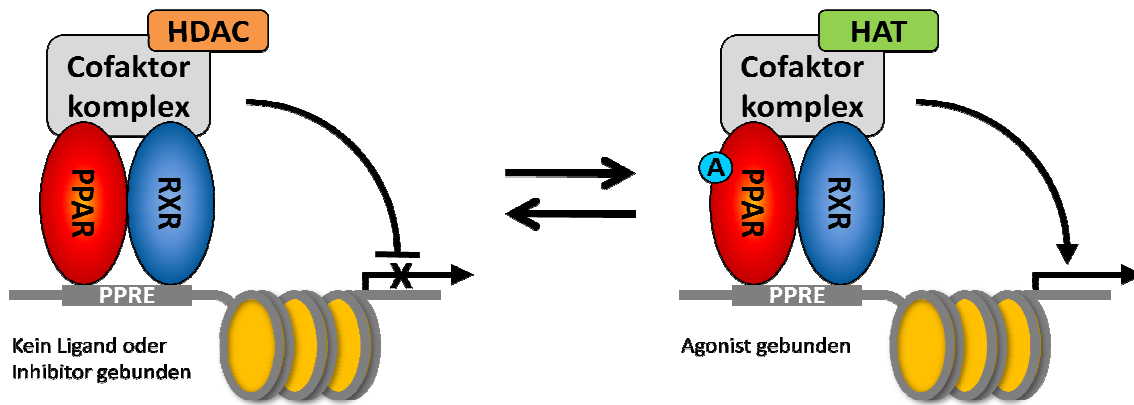




**Abbildung 1.8** Struktur des **PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$** -Heterodimers mit **Rosiglitazon**, **9-cis-Retinsäure** und dem **Nuclear Receptor Coactivator 2**, gebunden an **DNA** (3DZY). Die A/B-Regionen sind nicht in der Struktur enthalten.

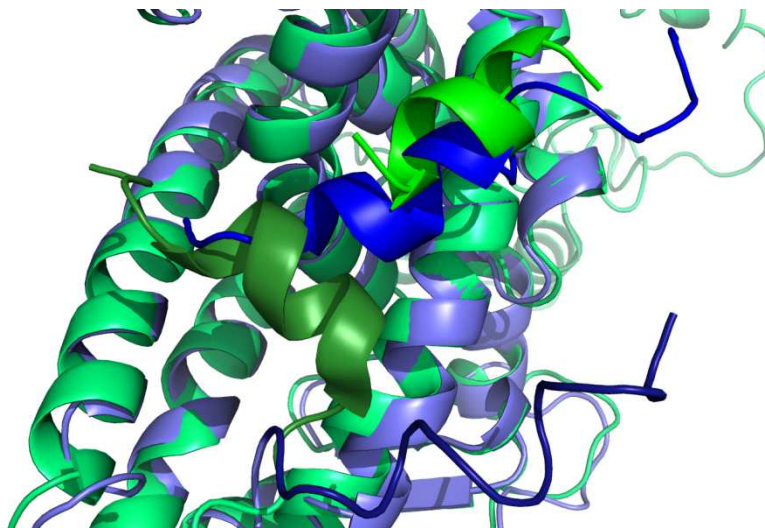
### **1.3.2.1 Ligandenvermittelte Transkriptionskontrolle**

Bei der ligandenvermittelten Transkriptionskontrolle formt sich im Zellkern das Heterodimer aus PPAR und RXR und bindet anschließend an das *PPAR Response Element* (PPRE) der DNA, oft bestehend aus einer Wiederholung der Erkennungssequenz (AGGTCAX). Sowohl die Dimerisierung als auch die DNA Bindung werden beschleunigt durch die Bindung von PPAR-Liganden. Ist bis jetzt noch kein Ligand an PPAR gebunden, so werden meistens Corepressoren rekrutiert z. B. Histondeacetylasen (HDAC), die wiederum ihrerseits durch Deacetylierung der DNA die Transkription inhibieren.



**Abbildung 1.9** Mechanismus der ligandenregulierten Transkription von PPAR. RXR: *Retinoid X Rezeptor*; HDAC: *Histondeacetylase*; HAT: *Histonacetyltransferase*; PPRE: *PPAR-Response Element*; A: *Agonist*.

Bindet ein Agonist, so lockert sich die Bindung der Corepressoren und Coaktivatoren wie Histonacetyltransferasen (HAT) werden stattdessen rekrutiert. Diese ermöglichen durch die strukturelle Änderung des Chromatins die Transkription. Bei dieser Form der Transkriptionskontrolle spielt die C-terminale Helix 12 (H12) der Aktivatorfunktion 2 (AF-2) eine entscheidende Rolle (Abbildung 1.10).



**Abbildung 1.10** Überlagerung zweier PPAR $\gamma$ -Strukturen, die jeweils einen Agonisten (3DZY) oder einen Inhibitor (1KKQ) gebunden haben. Ebenfalls gebunden sind dementsprechend ein Coaktivator (NRC2) oder ein Corepressor (SMRT). Der Corepressor kollidiert mit der H12 der Agonistenstruktur während die H12 der Inhibitorstruktur ungeordnet ist. Die Liganden sind nicht dargestellt.

In Abwesenheit eines Liganden ist diese Helix sehr dynamisch und weist nur wenig Wechselwirkungen mit dem Rest des Proteins auf. Dieser Zustand erlaubt die Bindung von Corepressoren, die, verglichen mit Coaktivatoren, deutlich mehr Wechselwirkungen mit dem

Protein zeigen und damit auch eine größere Kontaktfläche benötigen. Bindet nun ein Agonist so dreht sich die Helix um  $\sim 90^\circ$  und wird durch mehrere konservierte Wasserstoffbrücken stabilisiert, so dass sie eine geordnete helikale Form annimmt. Bei dieser Umlagerung wird ein Teil der Kontaktfläche belegt an die sonst der Corepressor bindet und die so genannte *charge clamp* wird ausgeformt, welche die Coaktivatorbindung stabilisiert<sup>30</sup>. Durch die Bindung von Inhibitoren wird die Helix 12 der AF-2 aus dieser Position gezwungen und so die Corepressorrekrutierung erhöht<sup>31</sup>.

### ***1.3.2.2 Agonisten, Antagonisten, inverse Agonisten***

Die Helix 12 der AF-2 ist dabei jedoch nicht als ein an/aus-Schalter zu sehen. Diverse Röntgenkristallstrukturen haben gezeigt, dass Liganden eine konformationelle Änderung der gesamten Bindetasche induzieren und diese sich dem jeweiligen Liganden anpasst. Diese individuelle Änderung wirkt sich natürlich auch auf die Positionierung der Helix 12 aus, woraus sich unterschiedliche Affinitäten für die diversen Cofaktoren ergeben und somit eine ligandenspezifische Transkriptionskontrolle. Liganden, die die Coaktivatorrekrutierung erhöhen, werden als Agonisten bezeichnet oder, in Relation dazu, als partielle Agonisten. Liganden, welche die Corepressorrekrutierung erhöhen, werden in der Literatur meist als Antagonisten tituliert, sind streng genommen aber inverse Agonisten. Antagonisten heben per Definition sowohl den Effekt von Agonisten als auch von inversen Agonisten auf und setzen die Proteinaktivität auf ein basales Level zurück. Ist keine grundlegende Aktivität des Proteins vorhanden, so agieren inverse Agonisten als Antagonisten<sup>32</sup>. Da bei PPAR die grundlegende Aktivität schwer abzuschätzen ist (Kapitel 1.3.2.3), kann die Einteilung zwischen Antagonist und inversem Agonist als fließender Übergang angesehen werden, abhängig von der jeweiligen Referenz. Fast alle Liganden sind diesbezüglich nicht charakterisiert und werden in dieser Arbeit demnach als Inhibitoren bezeichnet.

### **1.3.2.3 Ligandenunabhängige Transkriptionskontrolle**

Verantwortlich für die ligandenunabhängige Transkriptionskontrolle ist die AF-1 (A/B-Domäne). Die Tatsache, dass es bisher nicht gelungen ist, eine Röntgenkristallstruktur dieses Bereichs von irgendeinem Kernrezeptor zu erhalten, legt eine sehr flexible Struktur nahe, was auch durch diverse Experimente (NMR, Isotopenaustausch) bestätigt wurde. Bei einem gebundenem Liganden erfolgt über die Anpassung der LBD vermutlich auch eine Anpassung der AF-1, die so den Effekt des Liganden unterstützt<sup>21</sup>. In die anschließende Cofaktorrekutierung ist nicht nur die LBD, sondern auch die AF-1 involviert, wie auch im Fall der ligandenabhängigen Transkriptionskontrolle. In den meisten Fällen werden Corepressoren rekrutiert und leiten so eine Repression ein, in einigen Fällen wird die Transkription aber auch erhöht. Dabei scheint es abhängig vom PPRE (PPAR-Response Element) zu sein, welche Cofaktoren rekrutiert werden und in welche Richtung die Regulation erfolgt<sup>33</sup>. Die basale Aktivität von PPAR ist damit immer abhängig von dem beobachteten Gen. Da die A/B-Region in den verschiedenen Subtypen am wenigsten konserviert ist, werden gerade subtypspezifische Gene durch die ligandenunabhängige Transkriptionskontrolle besonders stark reguliert.

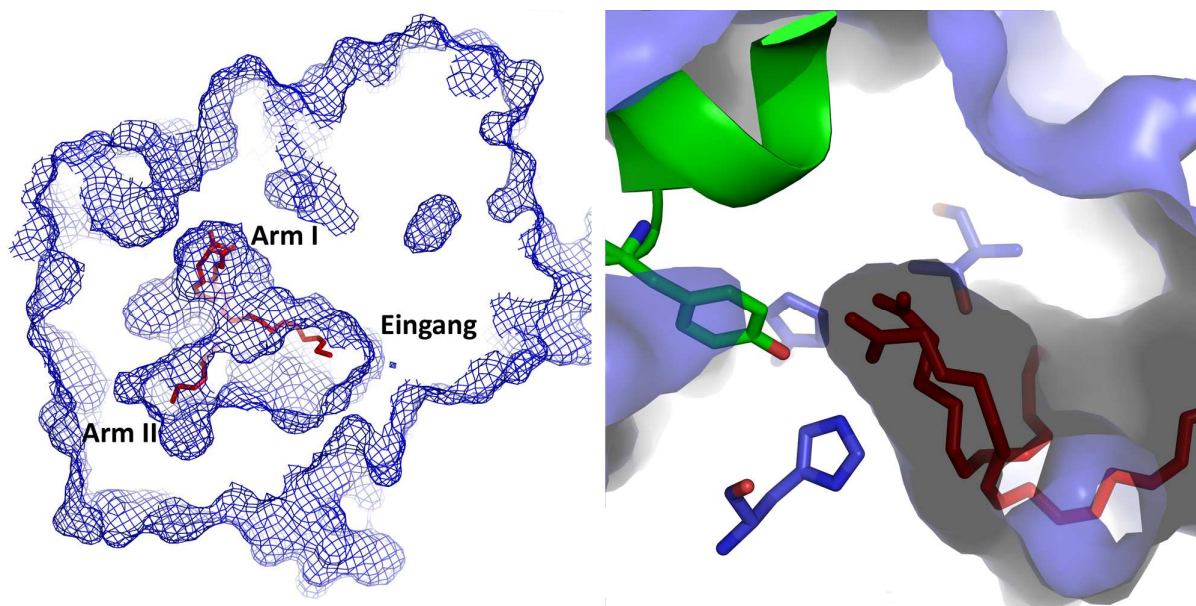
### **1.3.3 Subtypspezifische Transkription**

Die Transkriptionskontrolle durch PPAR ist von vielen Faktoren abhängig, angefangen mit der Konzentration aktiven Proteins. Je nach Gewebe ist auch entscheidend, welcher Subtyp dominant ist, falls mehrere Subtypen vorliegen. Die Aktivität von PPAR ist ebenfalls abhängig vom Grad der post-translationalen Modifikation wie Ubiquitinylierung und SUMOylierung<sup>34</sup>. Im Fall von PPAR $\alpha$  und - $\gamma$  wird die A/B Region zusätzlich noch phosphoryliert, bei PPAR $\beta/\delta$  fällt dieser Steuerungsmechanismus hingegen weg<sup>21</sup>. Die Unterschiede in der subtypspezifischen Transkription sind nun ein Zusammenspiel aus der unterschiedlichen Selektivität der vorhandenen Liganden, den verfügbaren Cofaktoren und den PPRES der DNA. Kleine Unterschiede in der Primärsequenz der Subtypen, die letztendlich die Kontaktfläche mit dem Cofaktor ergeben, sind vermutlich verantwortlich für eine unterschiedliche Affinität der vielen Cofaktoren und bestimmen so welche Faktoren

bevorzugt binden<sup>30</sup>. Ausschlaggebend dafür scheint aber auch das PPRE zu sein, an das der Kernrezeptorkomplex gebunden ist<sup>33</sup>. Die Cofaktoren selbst, egal ob Corepressor oder Coaktivator, regulieren wiederum durch die unterschiedlichen Mechanismen (Acetylierung, Methylierung) nicht jedes Gen gleich stark. All diese verschiedenen Einflüsse tragen dazu bei, dass die biologische Funktion von PPAR, besonders die von PPAR $\beta/\delta$ , so schwer zu erfassen ist und es so viele widersprüchliche Befunde gibt.

### 1.3.4 Strukturelle Grundlagen der Ligandenselektivität

Nur wenige Aminosäuren sind verantwortlich für die Subtypeselektivität von PPAR-Liganden, dabei ist die Bindetasche mit  $\sim 1300 \text{ \AA}^2$  für einen Kernrezeptor sehr groß. Die Tasche selbst weist eine Y-Form auf und ist vorwiegend hydrophob (Abbildung 1.11, links).



**Abbildung 1.11** Links: Bindetasche von PPAR $\beta/\delta$  in Komplex mit EPA, das in zwei Konformationen gebunden werden kann (3GWX). Rechts: Die vier konservierten polaren Reste (Thr289, His323, His449, Tyr473) der Bindetasche und der H12.

Die Bindetasche des Arms I enthält vier konservierte polare AS, die für die Wechselwirkung mit der Säurefunktion der endogenen Liganden (Fettsäuren u.ä., Kapitel 1.2.2.5) verantwortlich sind (Abbildung 1.11, rechts). Eine dieser Aminosäuren befindet sich auf Helix 12 und ist Teil des Wasserstoffbrücken-Netzwerks, das diese Helix bei Agonistenbindung stabilisiert. Beide Arme sind in etwa  $12 \text{ \AA}$  lang, bisher ist jedoch kein Ligand bekannt, der den

gesamten Raum der Bindetasche ausfüllt, selbst große Moleküle wie EPA können in zwei Konformationen gebunden werden. In der Nähe zur Helix 12, am Ende von Arm I, ist die PPAR $\beta/\delta$ -Tasche deutlich enger als bei den anderen Subtypen, was die Selektivität der Liganden beeinflusst. Mutiert man aber nur eine einzelne Aminosäure in dieser Position und gleicht sie so PPAR $\alpha$  an (Met453Val), erhöht sich die Affinität der Fibrate gegenüber PPAR $\beta/\delta$ , welche sonst nur sehr schwach binden. Auf gleiche Weise kann die Ligandenselektivität bezüglich PPAR $\gamma$  und PPAR $\alpha$  beeinflusst werden, nur dass hier andere Aminosäuren beteiligt sind<sup>30</sup>. Duale- oder Pan-PPAR-Liganden können durch diese kleinen Unterschiede verschiedene Bindungsmodi in den einzelnen Subtypen aufweisen.

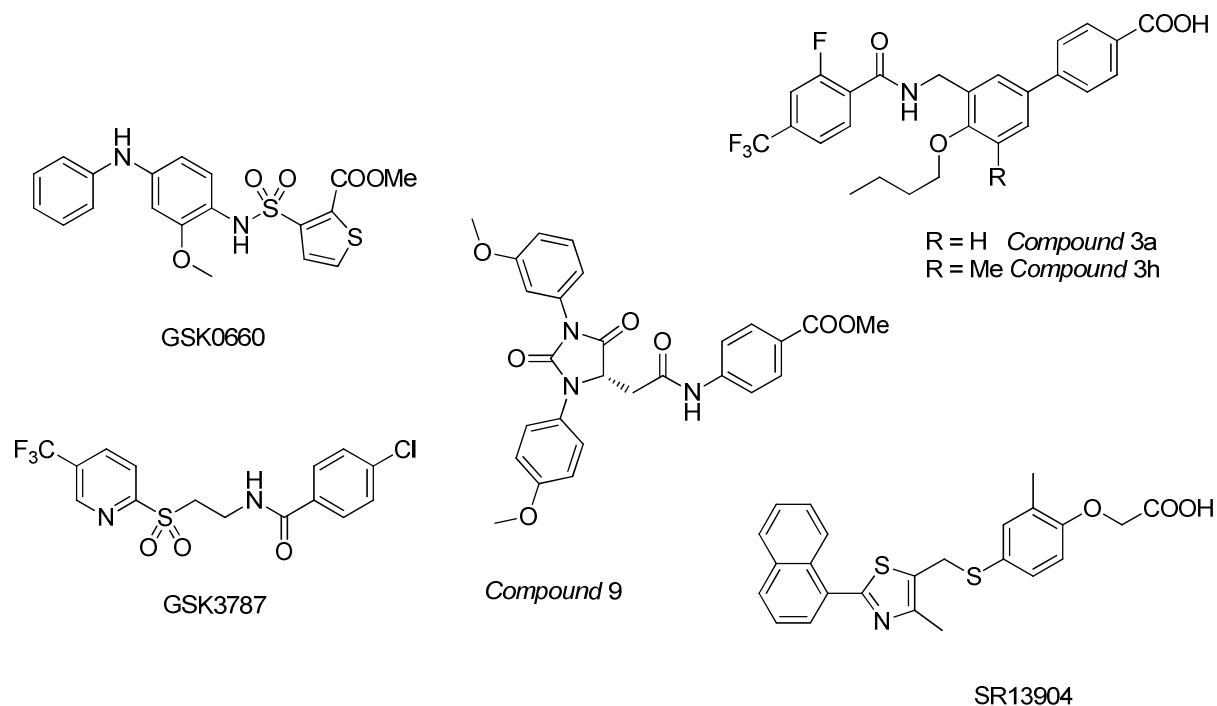
## 2 Themenstellung

### 2.1 Problematik und Motivation

PPAR $\beta/\delta$  ist mit seinen vielfältigen Funktionen und Aufgaben ein Rezeptor, der bisher mehr Fragen aufgeworfen hat als dessen Erforschung beantworten konnte. Der Fokus der Forschung liegt meist auf der Agonisierung von PPAR $\beta/\delta$ , Forschungsergebnisse bezüglich der Inhibierung sind deutlich seltener in der Literatur zu finden, dabei können gerade diese wertvolle Informationen liefern: Psoriasis ist eine chronisch inflammatorische Hauterkrankung, mit der eine erhöhte Prävalenz für das metabolische Syndrom einhergeht, eine Verknüpfung mit PPAR ist durchaus möglich. Studien mit einem Pan-PPAR-Agonisten, der besonders für PPAR $\beta/\delta$  Affinität besitzt (Tetradecylthioessigsäure), ergaben jedoch keine Verbesserung der Symptome<sup>35</sup>. In späteren Studien zeigte sich, dass PPAR $\beta/\delta$  in der Haut bei Psoriasis überexprimiert ist, so dass statt Aktivierung eine PPAR $\beta/\delta$ -Inhibition die logische Therapiestrategie sein sollte<sup>36</sup>. So konnte bei Mäusen mit einer induzierten Psoriasis ein Rückgang der Symptome nach topischer Anwendung verschiedener PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitoren beobachtet werden<sup>37</sup>. Um bei Krankheiten mit ähnlicher Datenlage den Effekt von PPAR $\beta/\delta$  evaluieren zu können, ist jedoch die systemische Anwendung der Inhibitoren notwendig. Dieser Ansatz kann bisher nicht verfolgt werden, da keine selektiven kompetitiven PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitoren beschrieben sind, die eine ausreichende Bioverfügbarkeit besitzen.

#### 2.1.1 Bekannte PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitoren

Der erste selektive PPAR $\beta/\delta$  inverse Agonist wurde in 2007 von GlaxoSmithKline beschrieben<sup>38</sup>. GSK0660 (Abbildung 2.1) fiel in einem Hochdurchsatzscreening auf, da die Verbindung zwar PPAR $\beta/\delta$ -Affinität besaß, aber keine agonistische Aktivität im nachfolgenden Assay zeigte. Die Anwendungen für GSK0660 sind jedoch sehr beschränkt, da der Ligand keine ausreichende Bioverfügbarkeit aufweist. *Compound 9* wurde in einem virtuellen Screening für Agonisten entdeckt, ist jedoch ein PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitor, der auch als PPAR $\gamma$ -Agonist wirkt<sup>39</sup>.



**Abbildung 2.1** Übersicht über die bekannten PPARβ/δ-Inhibitoren.

Ebenfalls durch eine SAR-Studie an PPARβ/δ-Agonisten wurden *compound* 3a und 3h entdeckt<sup>40</sup>. Deren inhibitorisches Profil wandelt sich in ein agonistisches, wenn die Carboxylgruppe in *meta*-Position steht. Strukturell sehr nahe zu dem Agonisten GW501516 (Abbildung 1.5, S. 10) ist der PPARβ/δ-Inhibitor SR13904, der jedoch ebenfalls als schwacher PPARγ-Inhibitor fungiert und somit nicht selektiv ist<sup>41</sup>. GSK3787 ist ein Sonderfall, da der Ligand zwar gute Bioverfügbarkeit besitzt, aber ein kovalenter Inhibitor für PPARβ/δ ist und auch PPARγ adressiert<sup>42</sup>. Die Bindung bei PPARβ/δ erfolgt an Cys243, wobei das Pyridin übertragen wird und der Sulfonalkylrest als Abgangsgruppe fungiert<sup>43</sup>. Die Effekte dieser Liganden sind leider nur wenig untersucht: SR13904 zeigte in einer humanen Krebszelllinie einen antiproliferativen Effekt, für GSK3787 konnte in verschiedenen Krebszelllinien jedoch kein Effekt auf die Zellproliferation beobachtet werden. GSK0660, GSK3787 und Compound 3h sind in der Lage, im Mausmodell die Symptome von Psoriasis zu verringern. Dies ist auch die einzige publizierte Studie, in der ein Effekt von PPARβ/δ-Inhibitoren im Tiermodell beobachtet wurde<sup>37</sup>.



## 2.2 Suche nach neuen Grundstrukturen

Am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) in Marburg wurden in der Gruppe von Prof. Dr. R. Müller 2693 Substanzen des NCI/NIH *Developmental Therapeutics Program* auf ihre PPAR $\beta/\delta$ -Affinität gescreent. In dem verwendeten Assay interagiert eine Terbium markierte PPAR $\beta/\delta$ -LBD mit dem fluoreszenten Liganden *Fluormone Pan-PPAR-Green*, wodurch ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) von 340 nm auf 520 nm entsteht<sup>44</sup>. Wird dieser Ligand verdrängt, kann kein FRET stattfinden und das Terbium emittiert bei 495 nm. Das Verhältnis von 520 zu 495 nm ist somit proportional zu der Verdrängung des *Fluormone Pan-PPAR-Green*. Der initiale Screen ergab 191 Treffer, die daraufhin in einem Coaktivator- und Corepressorassay vermessen wurden. Bei diesem Assay ist entweder ein Coaktivator oder ein Corepressor Fluoreszenz-markiert, wodurch die Rekrutierung dieser Faktoren an die Terbium markierte PPAR $\beta/\delta$ -LBD quantitativ verfolgt und der Ligand als Agonist oder inverser Agonist charakterisiert werden kann. Die Ergebnisse dieser drei Assays sind unabhängig voneinander, erst im zellbasierten Assay wirken diese Eigenschaften des Liganden zusammen und bedingen die Expression von PPAR $\beta/\delta$ -Zielgenen. Von den 191 Hits wurden zehn Verbindungen als inverse Agonisten identifiziert, die als Ausgangspunkt für diese Arbeit dienten.

## 2.3 Aufgabenstellung

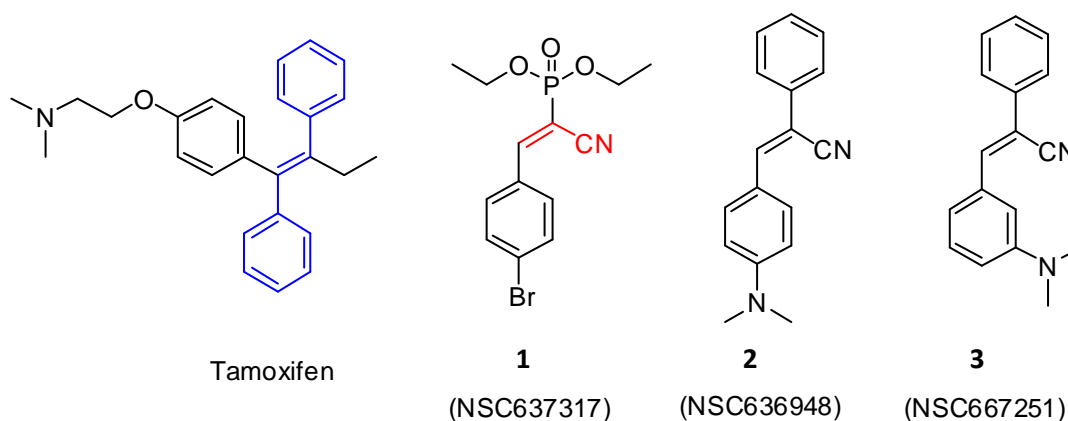
Basierend auf dem oben genannten Screen sollte aus den zehn initialen Hits eine neue Leitstruktur für selektive PPAR $\beta/\delta$  inverse Agonisten identifiziert werden und diese hinsichtlich ihrer kinetischen und pharmakokinetischen Eigenschaften optimiert werden, um letztendlich eine Anwendung im Tiermodell zu ermöglichen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Screening Hits

Von den zehn Screening Hits besaßen vier ein Stilben- und/oder Acrylnitril-Grundgerüst (Abbildung 3.1). Darunter befand sich auch Tamoxifen, ein Arzneistoff zur Behandlung von Brustkrebs, der den Estrogenrezeptor inhibiert. PPAR $\beta/\delta$  wäre demnach als weiterer Kernrezeptor, der von Tamoxifen adressiert würde ein Off-Target. Resveratrol, das ebenfalls ein Stilbengerüst enthält, wurde bereits als PPAR $\alpha$  bzw. PPAR $\gamma$ -Agonist identifiziert<sup>45,46</sup>. Es wurde deshalb in die Messungen mit einbezogen, genauso wie Diethylstilbestrol, ein weiterer Stilben-basierter Arzneistoff. In den folgenden Zellassays konnte jedoch weder für Tamoxifen noch für die anderen beiden Verbindungen ein Effekt auf die Expression von PPAR $\beta/\delta$ -Zielgenen festgestellt werden. Auch die Tamoxifenmetabolite 4-Hydroxy-Tamoxifen, *N*-Desmethyltamoxifen und Endoxifen ergaben keine veränderte Expression der Zielgene, so dass das Stilben für sich allein genommen als Pharmakophor nicht erfolgversprechend erschien.

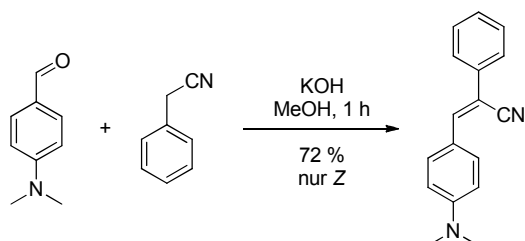


**Abbildung 3.1** Screening Hits mit **Stilben-** und/oder **Acrylnitril-**Grundgerüst.

Das Phosphonat **1**, das nur ein Phenylacrylnitrilgerüst enthält, zeigte im Zellassay ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der PPAR $\beta/\delta$  Zielgene. Für Verbindung **2** und **3**, die eine Kombination aus dem Stilben- und Acrylnitrilgerüst enthalten, wurde hingegen eine signifikante Reduktion der Zielgenexpression beobachtet, weshalb sie als Startpunkt für die SAR-Studie gewählt wurden.

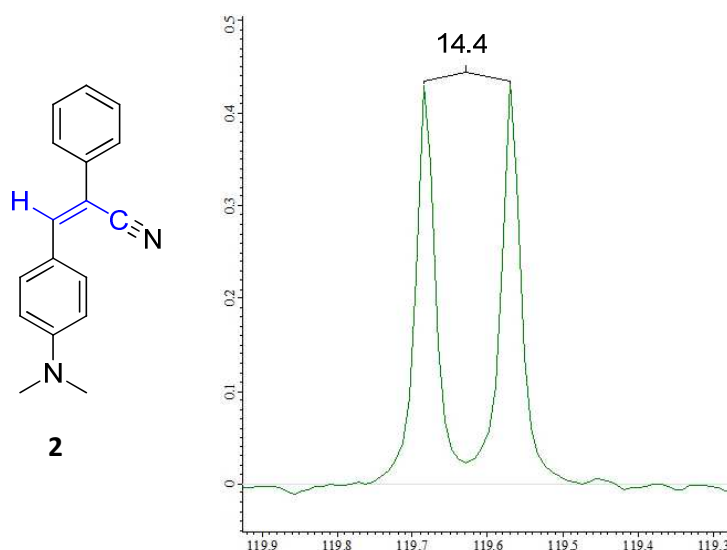
### 3.2 Synthese

Um die Screeningergebnisse verifizieren zu können und einen Syntheseweg zu etablieren, wurde zunächst das Stilben **2** nachsynthetisiert (Schema 3.1). Die Synthese von Acrylnitrilen verläuft allgemein über eine Nitril-Aldolkondensation, die für die sterisch anspruchsvollen Phenylreste eine ausgezeichnete *E/Z*-Selektivität aufweist<sup>47</sup>.



**Schema 3.1** Synthese des Screening Hits **2**.

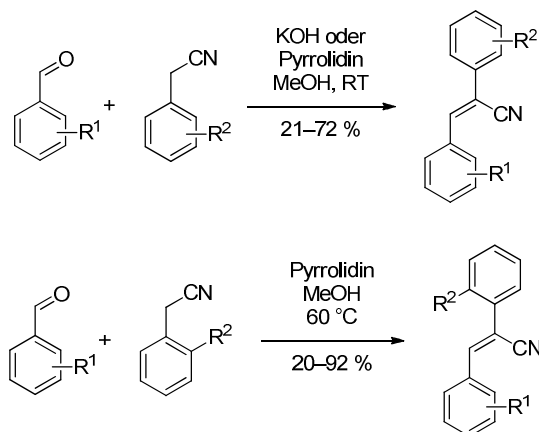
Die eindeutige Zuordnung der *Z*-Konfiguration erfolgte über ein *gated-decoupled* <sup>13</sup>C-NMR-Experiment (Abbildung 3.2). Die <sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>-Kopplung des Nitril-Kohlenstoffs mit dem benachbarten Wasserstoff ergibt einen Wert von 14.4 Hz und ist damit typisch für *E*-Kopplungen<sup>48</sup>.



**Abbildung 3.2** Zuordnung der Konfiguration von **2** durch ein *gated-decoupled* <sup>13</sup>C-NMR.

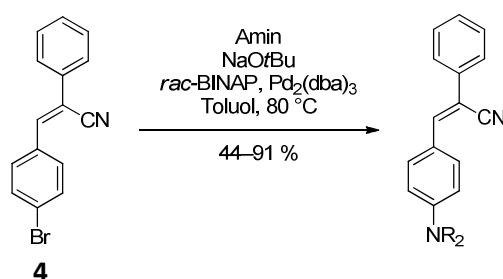
Die Synthese erfolgte für alle weiteren Stilbene analog und konnte so optimiert werden, dass das Produkt für die meisten Synthesen aus der Reaktionslösung auskristallisierte (Schema 3.2, oben). Falls R<sup>2</sup> in *ortho*-Position stand, wurde die Reaktionstemperatur sowie

Reaktionszeit erhöht und anstelle von KOH Pyrrolidin als Base verwendet, da unter den vorherigen Bedingungen das Produkt nur sehr langsam gebildet wurde (Schema 3.2, unten). Die ausgeprägte Z-Selektivität blieb dabei erhalten.



**Schema 3.2** Allgemeine Synthese der Stilbenserie.

Falls ein gewünschtes *para*-Aminobenzaldehyd nicht kommerziell verfügbar war, wurden die Aminderivate über eine Buchwald-Hartwig Reaktion erhalten (Schema 3.3)<sup>49a-c</sup>. Das dafür benötigte Edukt **4** wurde über den bekannten Syntheseweg gewonnen.



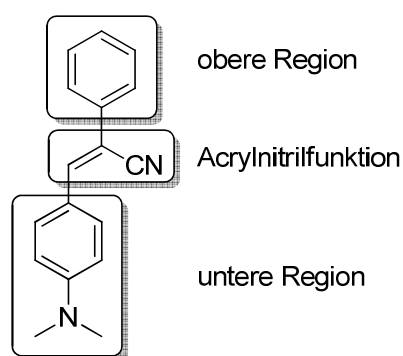
**Schema 3.3** Synthese von Aminderivaten.

Durch diese Synthesewege konnten mehrere Serien von Verbindungen erhalten werden und auf ihre biologische Aktivität untersucht werden.

### 3.3 SAR-Studie

Viele Beispiele illustrieren die Leistungsfähigkeit von computergestützten Methoden bei der Suche und Identifizierung neuer PPAR-Agonisten<sup>50</sup>. Diese Screenings gestalten sich aber

durch die flexible LBD schwierig, da manche Regionen der LBD erst durch eine konformationelle Änderung für Liganden zugänglich sind<sup>51</sup>. Hinzu kommt, dass Agonisten und Inhibitoren strukturell sehr ähnlich sein können, was eine Vorhersage bezüglich dieser Eigenschaften erschwert (Kapitel 2.1.1). In Kombination mit einer neuen Grundstruktur, deren Bindungsmodus unbekannt ist, erschienen computergestützte Methoden zur Ligandenoptimierung daher nicht Erfolg versprechend und wurden in dieser Arbeit nicht angewandt. Die Optimierung der Serie erfolgte stattdessen durch eine systematische Modifikation des Screening Hits **2**, der dazu in drei Regionen unterteilt wurde (Abbildung 3.3).

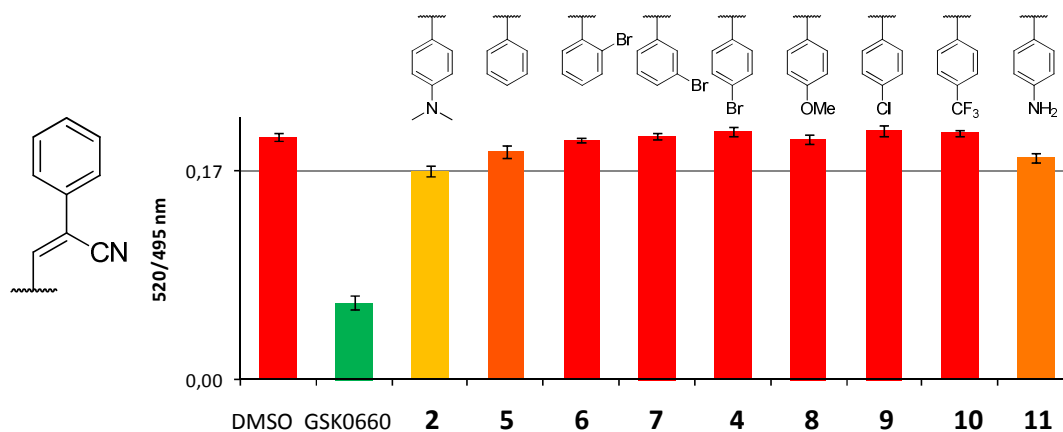


**Abbildung 3.3** Verbindung **2**, eingeteilt in drei Regionen, die zunächst separat optimiert werden sollten.

Diese Regionen sollten zunächst separat bezüglich ihrer Affinität für PPAR $\beta/\delta$  optimiert werden, um dann die aussichtsreichsten Modifikationen zu kombinieren. Für ausgewählte Verbindungen wurden weiterführende Assays angefertigt, um sie genauer zu charakterisieren.

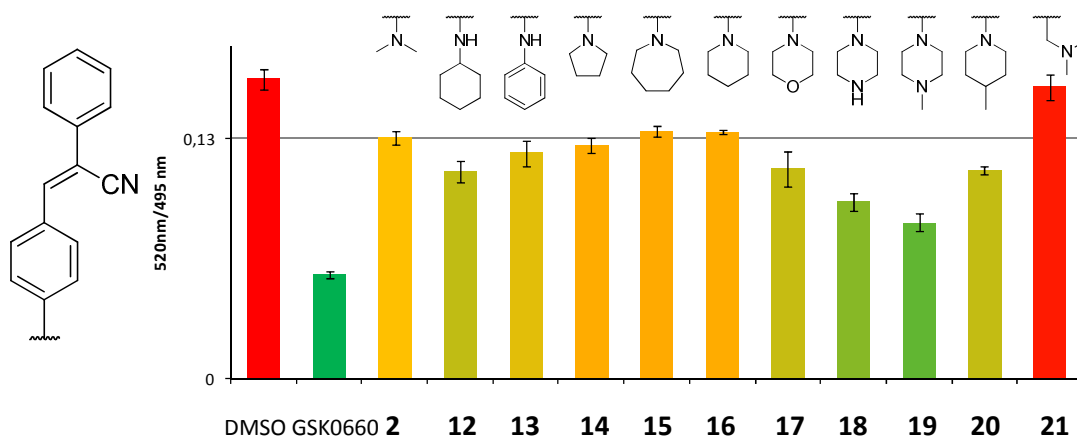
### 3.3.1 SAR der oberen und unteren Region

In der ersten Serie von Inhibitoren wurde zunächst die untere Region modifiziert. Im direkten Vergleich der Screening Hits **2** und **3**, zeigte Verbindung **2** eine deutlich höhere PPAR $\beta/\delta$ -Affinität, weshalb der Fokus auf Variation der *para*-Position lag. Dabei zeigte sich, dass die Dimethylaminogruppe entscheidend zur Affinität beiträgt (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4** Affinitäten der ersten Serie. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Der Austausch der Dimethylaminogruppe gegen Halogene oder andere funktionelle Gruppen führte ausschließlich zum Verlust der Affinität (**4–10**). Auch die Veränderung der Position des Halogens am Aromaten brachte keine Verbesserung (**4, 6, 7**). Das primäre Amin **11** zeigte ebenfalls eine geringere Affinität als der Hit **2**, die Methylgruppen scheinen demnach einen signifikanten Beitrag zur Affinität zu leisten. In der zweiten Serie wurde der Dimethylaminorest systematisch durch andere substituierte Amine ersetzt (Abbildung 3.5).

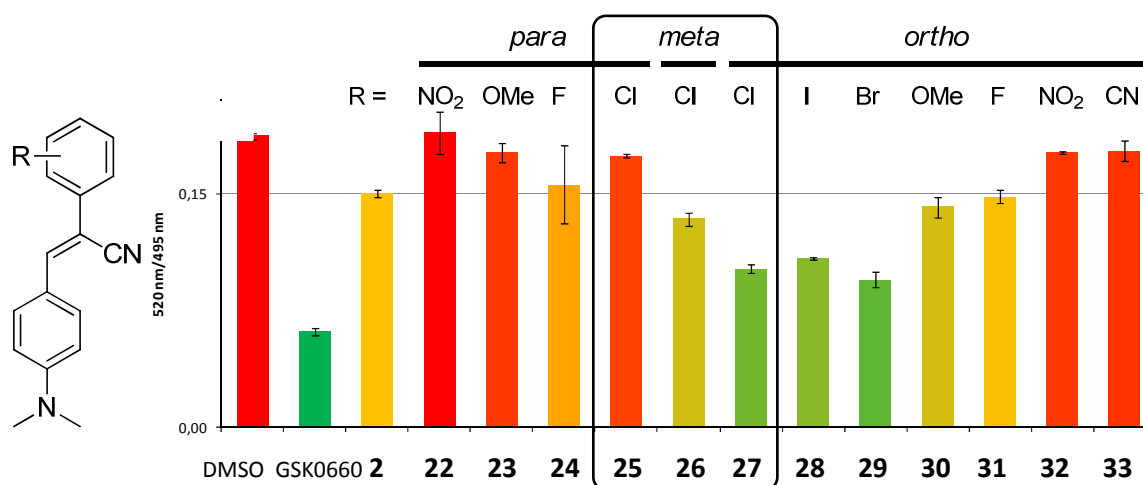


**Abbildung 3.5** Affinitäten der zweiten Serie. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Die Messwerte der Verbindungen **12** und **13** lassen den Schluss zu, dass das Amin nicht tertiär sein muss, sondern dass sterisch anspruchsvolle Reste ausreichen, um einen leichten Affinitätsgewinn zu erzielen. Im Gegensatz dazu scheinen gesättigte Heterozyklen kaum einen Effekt auf die Affinität zur PPAR $\beta/\delta$ -LBD zu haben (**14–16**). Deutlich wurde dieser Einfluss erst im Zellassay, bei dem der Sechsring (**16**) die PPAR $\beta/\delta$ -Zielgene am stärksten

herab regulierte. Deshalb wurden weitere sechsgliedrige Heterozyklen eingeführt, deren Einfluss sich dann auch im Affinitätsassay deutlich zeigte (**17–20**). Der Vergleich von **16** und **20**, sowie von **18** und **19** offenbart einen signifikanten Beitrag der Methylgruppe am Sechsring. Noch stärker ist der Beitrag des zweiten Stickstoffs im Piperazin, ersichtlich aus dem Vergleich von **16** und **18**, sowie von **20** und **19**. Das Methylpiperazinderivat **19**, das beide Strukturmerkmale vereint, ist die affinste Verbindung dieser Serie, was ein additives Verhalten der Affinitätsbeiträge nahelegt. Aber auch der an den Phenylrest angrenzende Stickstoff ist entscheidend für die Affinität. Durch dessen +M-Effekt entsteht ein *push-pull*-System mit dem Nitril, was sich in einer intensiven gelben Farbe der Verbindungen äußert. Wenn dieses *push-pull*-System unterbrochen wird, wie in der farblosen Verbindung **21**, dann geht auch die Affinität für PPAR $\beta/\delta$  fast komplett verloren. Dies ist sehr wahrscheinlich nicht durch den sterischen Anspruch der zusätzlichen CH<sub>2</sub>-Gruppe bedingt.

In der dritten Serie lag der Fokus auf der Optimierung des Substitutionsmusters des oberen Phenylrings (Abbildung 3.6). Dabei zeigte sich, dass die Affinität stark von der Position des Substituenten abhängt. Gruppen in *para*-Position führen ausschließlich zum Affinitätsverlust, unabhängig von der Funktionalität der Gruppe. Substituenten in *ortho*-Position erhöhen dagegen die Affinität. Dies offenbart sich besonders beim Vergleich der Chlorderivate **25–27** (Abbildung 3.6, eingerahmt). Das *para*-substituierte Derivat **25** ist fast inaktiv, eine Verschiebung in die *meta*-Position bringt bereits einen kleinen Affinitätsgewinn, während das *ortho*-Derivat **27** eine der affinsten Verbindungen dieser Serie darstellt.



**Abbildung 3.6** Affinitäten der dritten Serie. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.



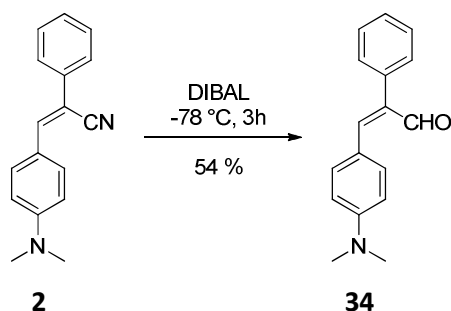
Der Beitrag der *ortho*-Substituenten scheint dabei stark geprägt vom -I-Effekt des Substituenten. Halogene mit ähnlicher Elektronegativität, wie Chlor, Brom und Iod (**27–29**), ergeben einen ähnlichen Affinitätsbeitrag, bei Fluor (**31**) wird dieser Beitrag jedoch fast Null. Für Substituenten mit noch stärkerem -I-Effekt wie Nitro- und Nitrilgruppen kehrt sich der Affinitätsbeitrag sogar ins Negative um, obwohl Nitrilgruppen als Bioisostere für Halogene eingesetzt werden können<sup>52</sup>. Eine mögliche Erklärung könnte die veränderte Elektronenverteilung in dem offenbar essentiellen *push-pull*-System sein. Um die Rolle der Acrylnitrilfunktion genauer zu untersuchen, wurden daher mehrere Verbindungen synthetisiert, die in diesem Bereich variieren.

### 3.3.2 Synthese der Acrylnitrilderivate

Zu Beginn der SAR-Studie wurden bereits mehrere Arzneistoffe mit Stilbengerüst auf ihre Affinität getestet. Alle diese Verbindungen waren entweder *para*-substituiert oder trugen an der Stilbendoppelbindung weitere Gruppen. Die bisherigen Verbindungserien haben aber gezeigt, dass gerade Substituenten in *para*-Position die Affinität negativ beeinflussen (Abbildung 3.6). Dadurch ist von den bisher getesteten Verbindungen keine Aussage mehr über die Affinität im Bezug auf das Stilben als Pharmakophor möglich. Ein Ziel dieser Serie war daher die Einführung einer Ethylgruppe anstelle des Nitrils, analog zu Tamoxifen oder Diethylstilbestrol.

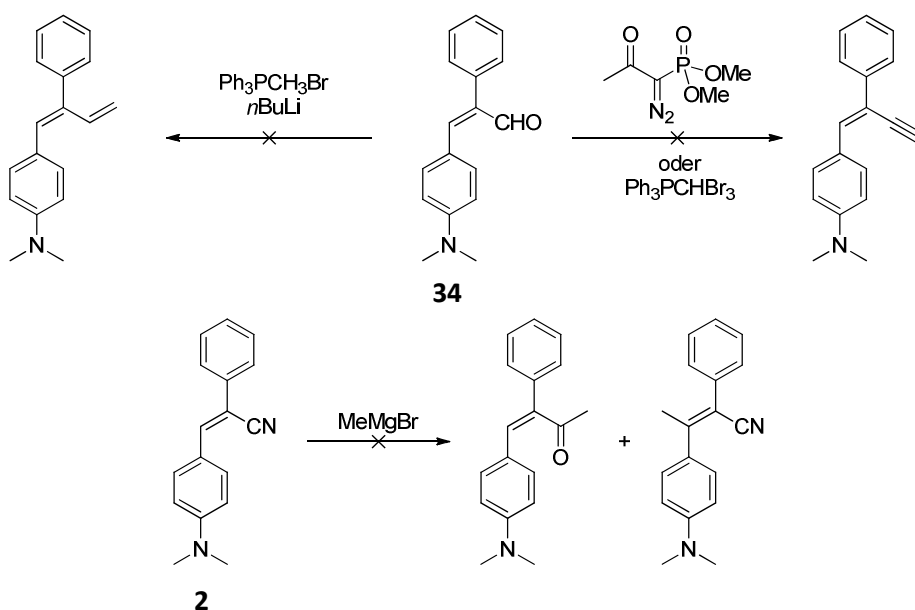
Prinzipiell besitzen andere elektronenziehende Gruppen anstelle des Nitrils die gleiche Reaktivität in der Kondensation, so dass sie über den etablierten Syntheseweg einfach eingeführt werden könnten (Schema 3.1, S. 24). Für Säuren, Ester oder Ketone ergibt sich bei dieser Kondensation aber das *E*-Isomer und bei einer Nitrogruppe anstelle des Nitrils geht die Isomeraselektivität zum Teil verloren<sup>53</sup>. Da sich eine Isomerentrennung sehr aufwändig gestaltet, wurden die Synthesewege daher so entworfen, dass von einem reinen *Z*-Isomer ausgegangen wird und die Synthese ohne Isomerisierung verläuft.

Nitrile können klassischerweise selektiv zu Iminen oder, nach wässriger Aufarbeitung, zu Aldehyden reduziert werden. Auf diesem Weg wurde auch das Aldehyd **34** erhalten, jedoch nur mit 54 % Ausbeute (Schema 3.1).



**Schema 3.4** Reduktion des Nitrils zum Aldehyd.

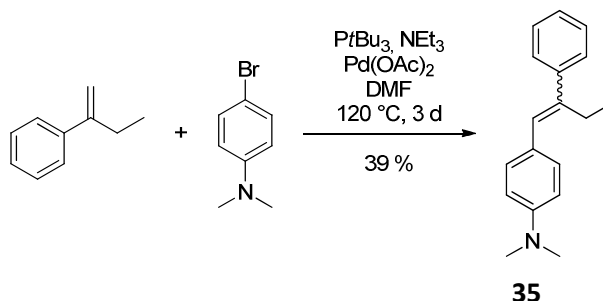
Um diese Ausbeute zu erreichen, wurden zwei Äquivalente DIBAL eingesetzt. Zugabe weiterer drei Äquivalente DIBAL bei  $-40\text{ °C}$  erhöhten die Ausbeute nur um 2 %, obwohl nach jeder Reaktion nicht umgesetztes Edukt isoliert wurde. Dieses untypische Reaktionsverhalten wurde ebenfalls bei den nachfolgenden Reaktionen des Aldehyds **34** beobachtet.



**Schema 3.5** Erfolgreiche Syntheseansätze zur Variation des Nitrils.

So konnte weder unter Bedingungen der Wittig-Reaktion ein Umsatz des Aldehyds beobachtet werden<sup>54</sup>, noch verlief die Reaktion zum Alkin mit dem Bestmann-Ohira-Reagenz oder Dibrommethyltriphenylphosphinbromid erfolgreich (Schema 3.5, oben)<sup>55,56</sup>. In all diesen Reaktionen agiert der Aldehyd als Elektrophil, durch den +M-Effekt der konjugierten Dimethylaminogruppe scheint der elektrophile Charakter aber so abgeschwächt zu sein, dass keine Reaktion zustande kommt. Ähnliches wurde bei der Umsetzung von **2** mit

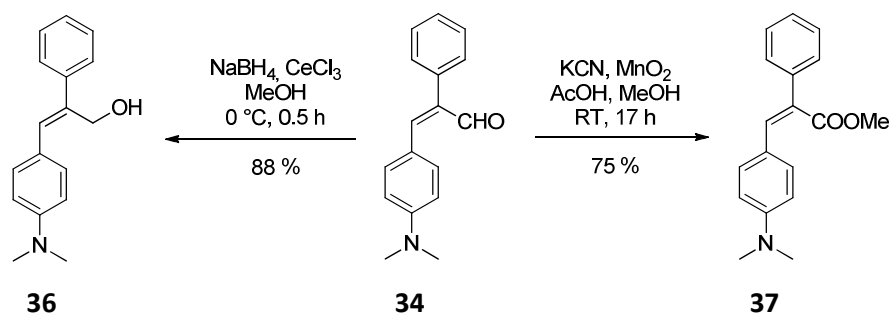
Methylmagnesiumbromid beobachtet (Schema 3.5, unten). Weder das gewünschte Keton noch das mögliche Nebenprodukt der Michael-Addition wurden erhalten, wiederum bedingt durch den schwachen elektrophilen Charakter des Nitrils.



**Schema 3.6** Synthese des Ethylderivats **35**.

Letztendlich gelang die Synthese eines Ethylderivats über eine Heck-Reaktion (Schema 3.6)<sup>57a,b</sup>. Über diese Syntheseroute konnte jedoch keine *E/Z*-Selektivität erhalten werden, so dass das Produkt **35** als Isomerengemisch (1:1) isoliert wurde.

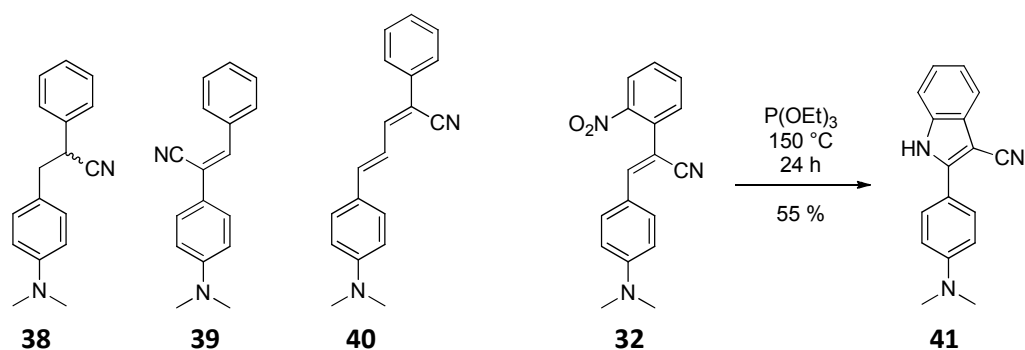
Während die Aldehydfunktion von **34** nicht als elektrophile Gruppe agiert, konnte sie über eine Luche-Reduktion erfolgreich in den entsprechenden Alkohol **36** überführt werden (Schema 3.7)<sup>58</sup>.



**Schema 3.7** Erfolgreiche Syntheseansätze zur Variation des Nitrils.

Auch die Umsetzung zum Methylester **37** über eine Corey-Gilman-Ganem-Oxidation verlief erfolgreich, obwohl diese einen nucleophilen Angriff des Cyanids an das Aldehyd voraussetzt<sup>59</sup>. Vermutlich liegt unter den sauren Reaktionsbedingungen das Amin protoniert vor, wodurch der +M-Effekt wegfällt und sich der elektrophile Charakter des Aldehyds

erhöht. Dieses Konzept ließ sich leider nicht auf die vorherigen erfolglosen Reaktionen übertragen, da diese keine sauren Reaktionsbedingungen tolerieren.

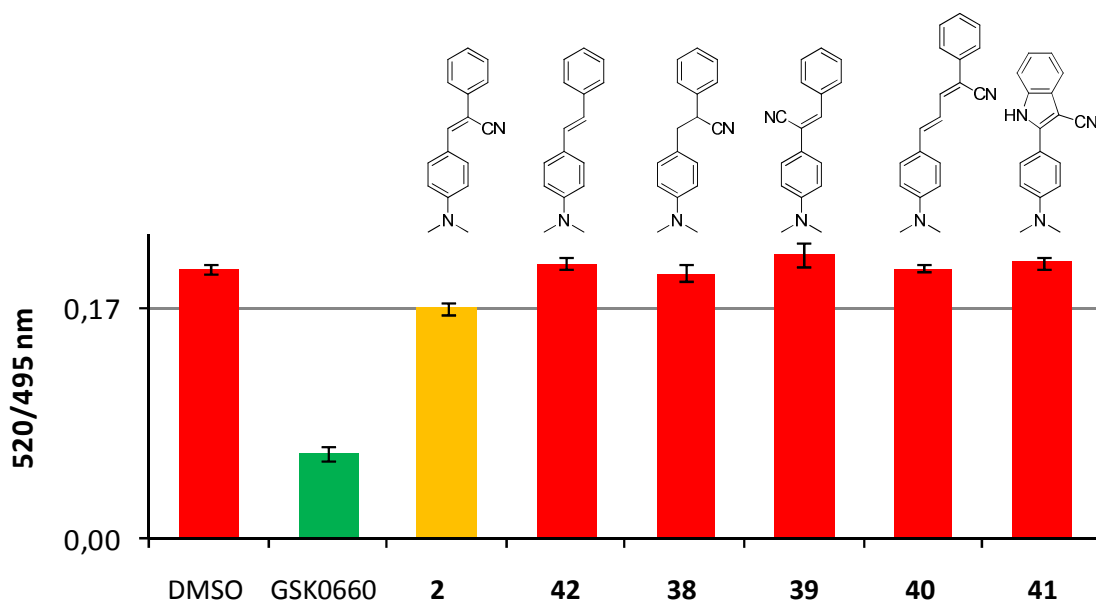


**Abbildung 3.7** Grundgerüstderivate der Stilbenserie.

Weitere Modifikationen des Grundgerüsts konnten ebenfalls über einfache synthetische Umsetzungen dargestellt werden (Abbildung 3.7). Durch Hydrierung des Screening Hits **2** konnte Verbindung **38** erhalten werden. Die Verbindungen **39** und **40** wurden über die etablierte Nitril-Aldolreaktion synthetisiert. Verbindung **41** wurde ausgehend von dem Nitroderivat **32** synthetisiert. In dem neuen Heterozyklus ist der *ortho*-Substituent des Edukts kovalent mit der räumlich nahen Doppelbindung verknüpft.

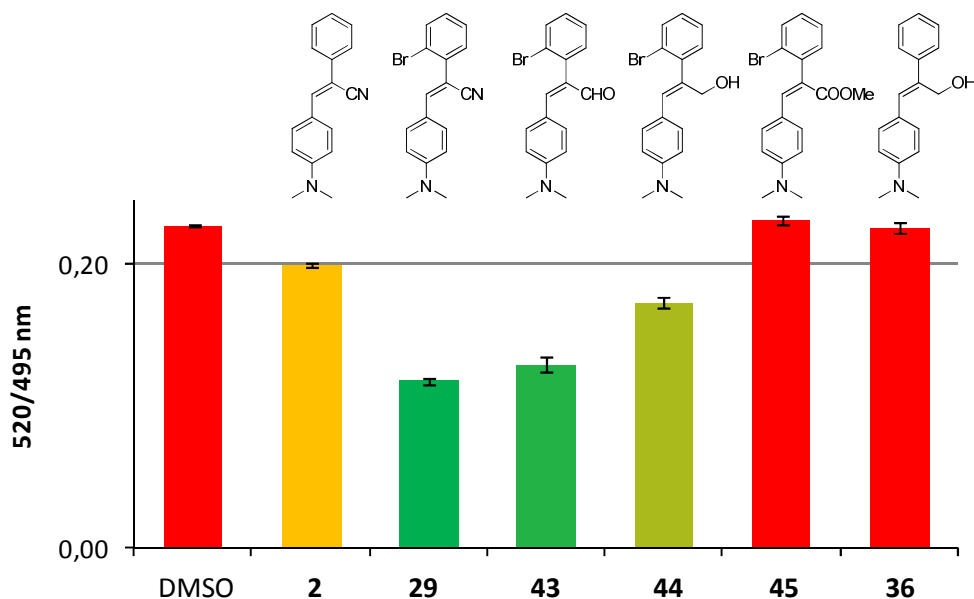
### 3.3.3 SAR der Acrylnitrilderivate

Die Serie der Grundgerüstderivate zeigt, wie essentiell das Stilbengerüst und das Nitril für die Affinität sind (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8** Affinitäten der Grundgerüstderivate. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Jede Veränderung des Grundgerüsts resultierte im kompletten Verlust der Affinität, auch scheinbar geringfügige Modifikationen, wie das formale Weglassen der Nitrilgruppe im kommerziell erhältlichen Dimethylaminostilben **42** oder die Sättigung der Doppelbindung (**38**). Auch die Einführung einer Ethylgruppe anstelle des Nitril in Verbindung **35** führten zum kompletten Affinitätsverlust (Abbildung 5.1, S. 60). Ein ähnliches Bild zeigt die Serie der Nitrilmodifikationen (Abbildung 3.9).

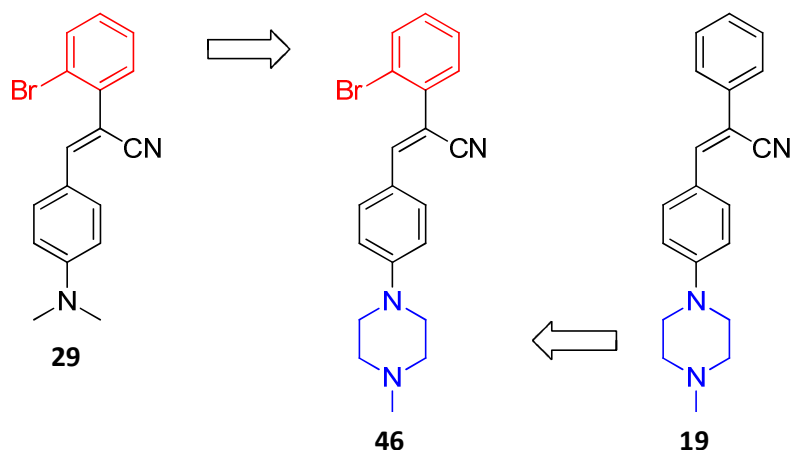


**Abbildung 3.9** Affinitäten der Nitrilderivate. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Um die Unterschiede deutlicher hervorzuheben, sind die Assaydaten der affineren *ortho*-Bromderivate abgebildet. Während der Aldehyd **43** nur etwas schwächer affin ist als das korrespondierende Nitril **29**, ist für den Alkohol **44** schon ein deutlicher Affinitätsunterschied sichtbar. Die Einführung der Estergruppe (**45**) resultiert im kompletten Verlust der Affinität, der sich nicht durch das *ortho*-Brom kompensieren lässt. Der positive Einfluss des *ortho*-Substituenten auf die Affinität zeigt sich auch hier wieder beim Vergleich des minimal affinen Alkohols **36** und des korrespondierenden Bromderivats **44**, das in seiner Affinität sogar den Screening Hit **2** übersteigt.

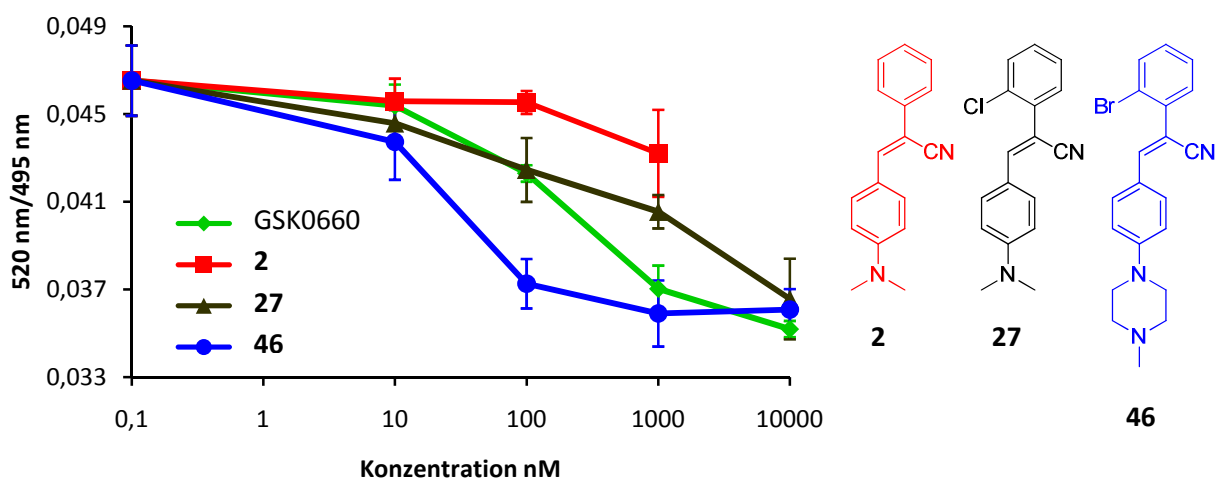
### 3.3.4 Kombination der Serien

Die *ortho*-Brom substituierte Verbindung **29** und das *N*-Methylpiperazinderivat **19** sind die affinsten Vertreter der jeweiligen Serie. Da die beiden Modifikationen an unterschiedlichen Regionen des Moleküls vorliegen, wurden diese Strukturmerkmale zu Verbindung **46** kombiniert, die nach der etablierten Route dargestellt werden konnte (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10** Aus der Kombination der Serien ergibt sich Verbindung **46**.

Die verschiedenen Heterozyklen am unteren Phenylring hatten bereits ein additives Verhalten bezüglich ihrer Affinität zur PPAR $\beta/\delta$ -LBD gezeigt (Abbildung 3.5, S. 27). Für Verbindung **46** ergab sich ebenfalls eine Affinität, welche die der Einzelkomponenten **19** und **29** deutlich übertrifft.

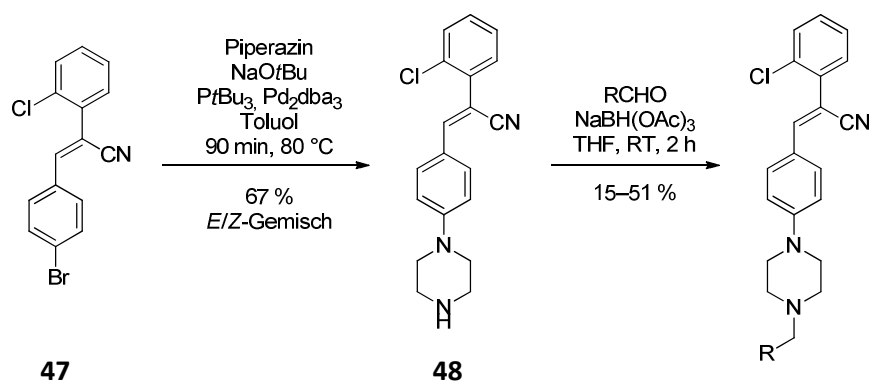


**Abbildung 3.11** Affinität der Liganden **2**, **27** und **46** in Abhängigkeit von ihrer Konzentration. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min.

Im Affinitätsassay zeigt die logarithmische Auftragung der Inhibitorkonzentration gegen die Affinität einen viel früheren Abfall der Kurve von **46** gegenüber der von GSK0660 (Abbildung 3.11). Während die Affinität aller bisher synthetisierten Verbindungen noch deutlich unter der von GSK0660 lag, ist der IC<sub>50</sub> von Verbindung **46** mit 27 nM zehnmal kleiner als der von GSK0660 (>300 nM).

### 3.3.5 Modifikationen am Piperazin

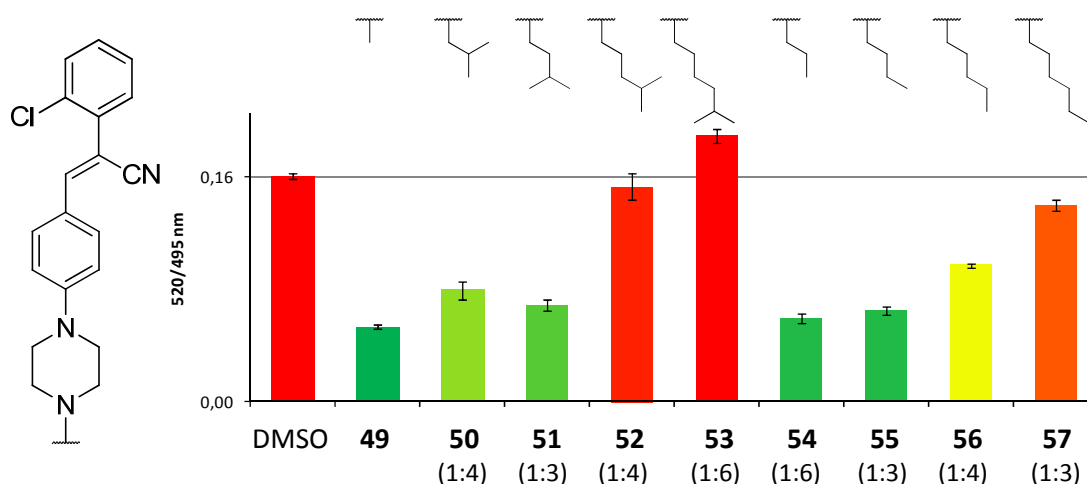
Die meisten PPAR-Liganden sind entweder Y-förmig wie die Bindetasche selbst oder sehr langgestreckt wie die Fettsäuren, die an PPAR binden (Abbildung 1.11, S. 17)<sup>22</sup>. Ausgangspunkt für diese SAR-Serie war die Vermutung, dass durch Ersatz der Methylgruppe in **46** mit längeren Alkylketten die Affinität noch weiter gesteigert werden könnte. Dieser Ansatz führte bereits für einen, in dieser Arbeitsgruppe parallel entwickelten, PPAR $\beta/\delta$ -Inhibitor zum Erfolg (Abbildung 3.24, S. 52)<sup>60</sup>.



**Schema 3.8** Synthese der Alkylderivate.

Für die Einführung der verschiedenen Alkylreste bot sich eine reduktive Aminierung von **48** mit dem entsprechenden Aldehyd an, da hier die Variation erst im letzten Syntheseschritt erfolgt. Das freie Amin **48** kann ausgehend von **47** über eine Buchwald-Hartwig-Aminierung synthetisiert werden, ohne dass zusätzliche Schutzgruppenoperationen für das sekundäre Amin nötig wären. Da im Affinitätsassay der Unterschied zwischen dem Brom- und Chlorsubstituenten sehr gering ist, wurde Chlor in *ortho*-Position gewählt, um eventuelle Nebenreaktionen bei der Aminierung zu vermeiden. Eine weitere mögliche Nebenreaktion ist die *E/Z*-Isomerisierung durch Palladiumkomplexe, die bei der analog synthetisierten Verbindung **18** aber nicht beobachtet wurde<sup>61</sup>. Bei der Synthese dieser Serie traten in den NMR-Spektren jedoch weitere Signale auf, die auf ein Isomerengemisch hindeuten. Diese Isomerisierung ist vermutlich bedingt durch den sterischen Anspruch des *ortho*-Substituenten (Kapitel 3.4)<sup>62</sup>. Die NMR-Reinheit dieser Verbindungen liegt daher nur zwischen 75 und 85 %.



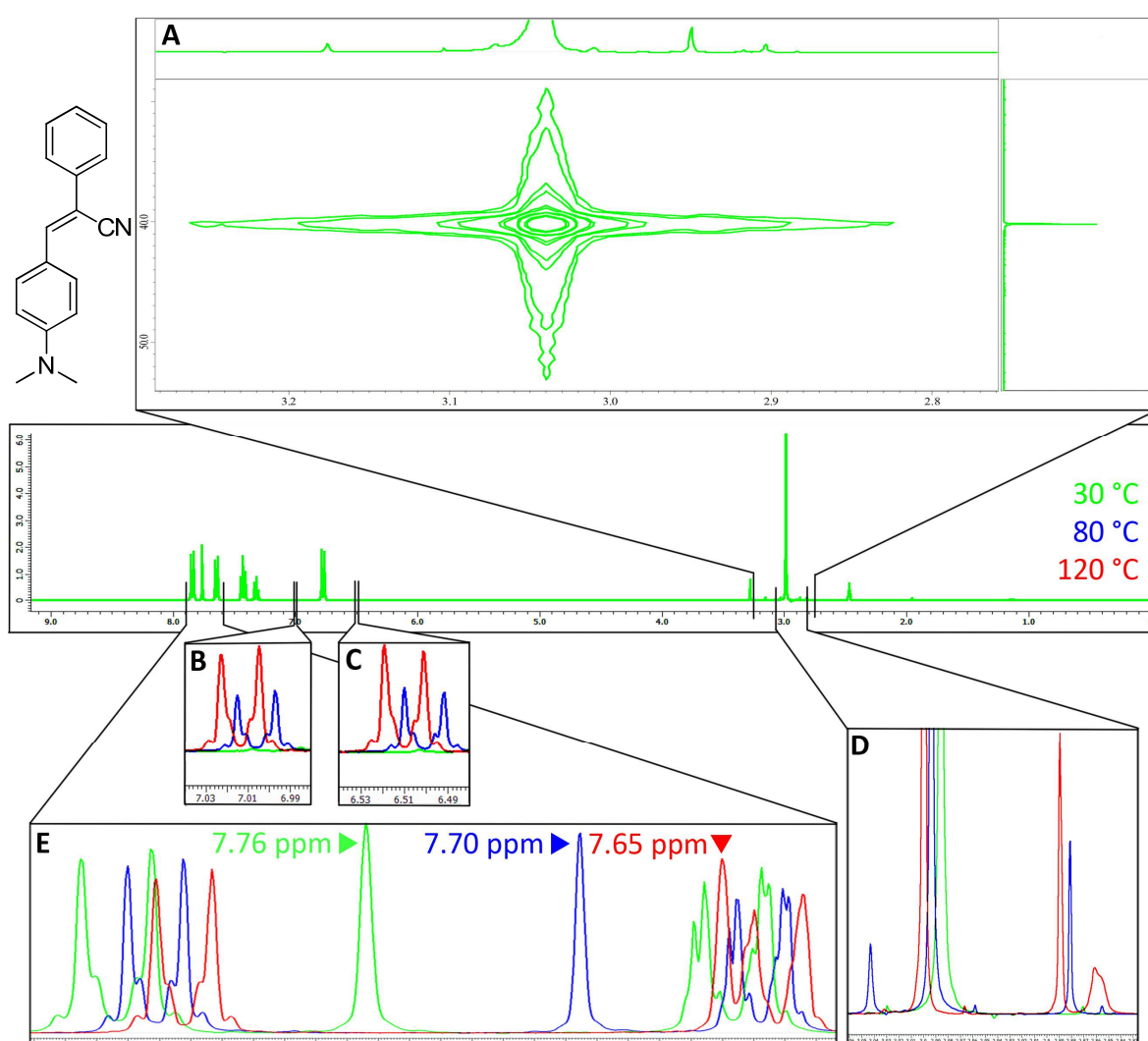


**Abbildung 3.12** Affinitäten der Alkylderivate. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 90 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration. Das E/Z-Verhältnis, bestimmt über NMR, ist in Klammern angegeben.

Referenzverbindung **49** wurde analog zu Verbindung **46** ohne Kreuzkupplungsreaktion dargestellt und liegt als reines Z-Isomer vor. Ein direkter Vergleich mit den Isomergemischen ist deshalb nur schwer möglich, wenn die Affinitäten sehr nahe beieinander liegen. Vergleicht man aber die Alkylserien **50–53** und **54–57**, so wird deutlich, dass mit zunehmender Kettenlänge die Affinität abnimmt. Die optimale, unverzweigte Kettenlänge liegt demnach zwischen Methyl und Butyl. Hinsichtlich der Entwicklung eines oral bioverfügbaren Liganden ist die Methylgruppe den anderen Alkylgruppen jedoch vorzuziehen, da mit größer werdender Kettenlänge auch der cLogP zunimmt, der für die Ausgangsverbindung **49** 4.06 ( $\pm 0.39$ ), für das Butylderivat **55** aber bereits 5.29 ( $\pm 0.61$ ) beträgt<sup>63</sup>. Die Vorhersage der oralen Bioverfügbarkeit eines Liganden ist auch heute noch eine große Herausforderung, dennoch haben sich Richtlinien wie Lipinski's *rule of five* etabliert, deren Einhaltung die Erfolgchancen erhöhen<sup>64</sup>. Zudem findet sich in vielen Arzneistoffen das Strukturelement des Methylpiperazins, nicht jedoch die entsprechenden Homologen wie Ethyl- oder Propylpiperazin. Ein möglicher Affinitätsgewinn durch eine längere Alkylkette würde daher vermutlich mit schlechteren pharmakokinetischen Eigenschaften einhergehen.

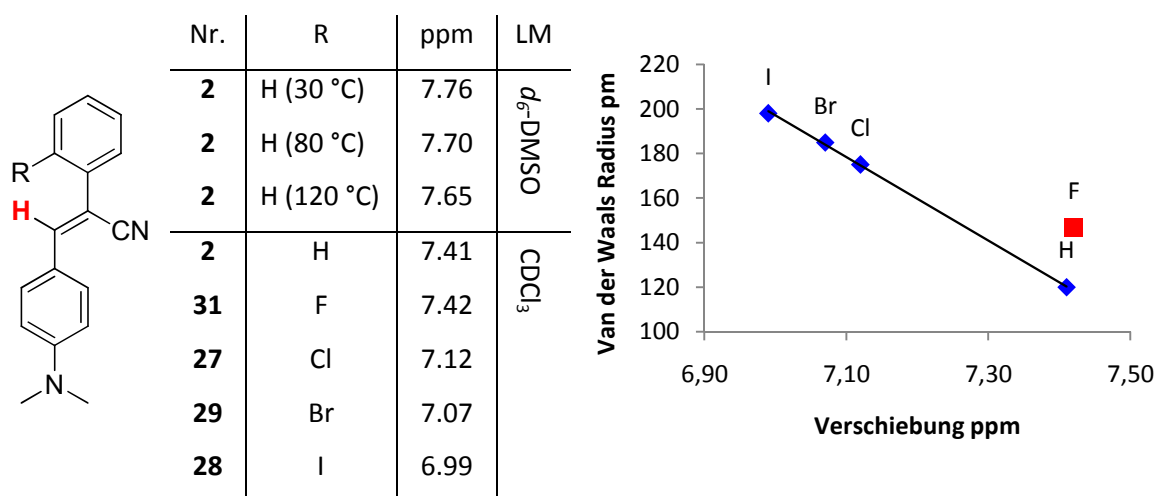
### 3.4 Strukturelle Rigidität der Acrylnitrilstilbene

Bei jeder der synthetisierten Verbindungen war im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ein unterschiedlich stark ausgeprägter zusätzlicher Signalsatz zu beobachten. Auch für Verbindung **2** ergaben die Methylprotonen mehr als das eine zu erwartende Signal. Über ein  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -gekoppeltes COSY-NMR konnten diese zusätzlichen Signale jedoch eindeutig den magnetisch äquivalenten Methylkohlenstoffen zugeordnet und somit ein Isomerengemisch ausgeschlossen werden (Abbildung 3.13, Vergrößerung A).



**Abbildung 3.13** Temperaturabhängigkeit und Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale von Verbindung **2**. **A**: Vergrößerung des entsprechenden  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY-NMR-Spektrum **B–E**: Vergrößerungen des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums.

Um zu überprüfen, ob es sich um Rotamersignale handelt, wurden NMR-Temperaturmessungen durchgeführt. Rotamersignale entstehen, wenn eine innermolekulare energetische Barriere die Rotation um eine oder mehrere Einfachbindungen erschwert, weshalb die betroffenen Protonen mehr als ein NMR-Signal aufweisen können. Die Barrieren, die meist aus sterischer Hinderung resultieren, können durch den Energieeintrag bei Temperaturmessungen schneller überwunden werden, wodurch sich die NMR-Resonanzen auf der NMR-Zeitskala nicht mehr getrennt beobachten lassen. In den Temperaturmessungen zu Verbindung **2** wurden die Signale bei erhöhter Temperatur jedoch stärker (Abbildung 3.13, Vergrößerung B–D). Auffällig ist die ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Acrylnitrilprotonsignals, dass sich mit steigender Temperatur viel stärker ins Hochfeld verschiebt als alle anderen Signale (Abbildung 3.13, Vergrößerung E). Vergleicht man die Reihe der *ortho*-Halogenverbindungen miteinander, so zeigt sich eine ähnliche Hochfeldverschiebung mit ansteigender Halogengröße (Abbildung 3.14)



**Abbildung 3.14** NMR-Verschiebungen des **Acrylnitrilprotons**.

Diese Hochfeldverschiebung verhält sich, bis auf das Fluorderivat, linear zum Van der Waals Radius der Halogene. Aus Kleinmolekülkristallstrukturen ist bekannt, dass Verbindung **2** (*Cambridge Structural Database Code*: YISKAM) planar vorliegt, während beim *ortho*-Bromderivat **29** (*Cambridge Structural Database Code*: BCSTIL) der bromierte Phenylring aus der Molekülebene gedreht ist. Zusammengenommen lassen diese Daten auf eine hohe Stabilisierungsenergie des Michael-Systems schließen, welche am höchsten ist, wenn das Molekül planar vorliegt. Durch den Energieeintrag der Temperaturmessungen oder durch

*ortho*-Substituenten wird der obere Phenylring aus der Ebene in eine sterisch, aber unter Einbezug der elektronischen Konjugation nicht energetisch günstigere Position gebracht. Wendet man das Ringstrom-Modell auf diese Strukturen an, so erfährt das Acrylnitrilproton bei planarer Anordnung einen entschirmenden Effekt durch den oberen Phenylring. Wird dieser jedoch aus der Ebene gedreht, so wirkt zunehmend ein abschirmender Effekt auf das Proton, wodurch sich die starke Hochfeldverschiebung erklären lässt<sup>48</sup>. Im Einklang mit dieser Theorie zeigt das Acrylnitrilproton der zweifach *ortho*-chlorierten Verbindung mit 6.93 ppm auch die stärkste Hochfeldverschiebung aller dargestellten Verbindungen, da hier die größte sterische Hinderung vorliegt.

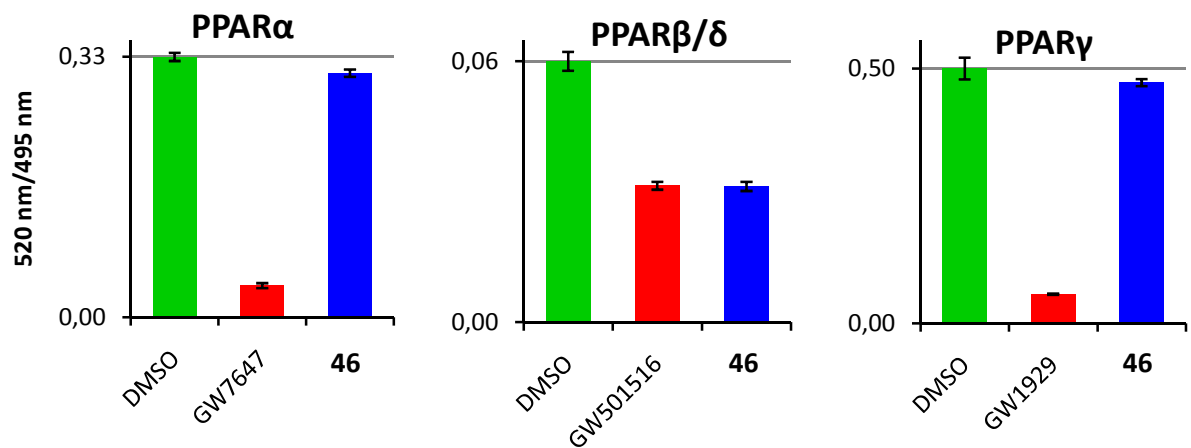
Vor diesem Hintergrund deutet der ausgeprägte Affinitätsbeitrag der *ortho*-Substituenten auf einen nicht planaren Bindungsmodus dieser Liganden hin. Da die substituierten Verbindungen von vornherein verdreht vorliegen geht weniger Bindungsenergie verloren, um den Liganden in die optimale Bindungskonformation zu bringen als bei den nicht substituierten planaren Verbindungen. Allerdings zeigt sich diese Korrelation nur für Halogensubstituenten, andere Substituenten erzeugen zwar auch eine Verdrehung, weisen aber keinen derartig ausgeprägten Affinitätsbeitrag auf.

### 3.5 Evaluation des optimierten Liganden

Da Verbindung **46** sich als die beste aus der gesamten SAR erwiesen hat, wurde sie in weiterführenden Assays eingehender untersucht.

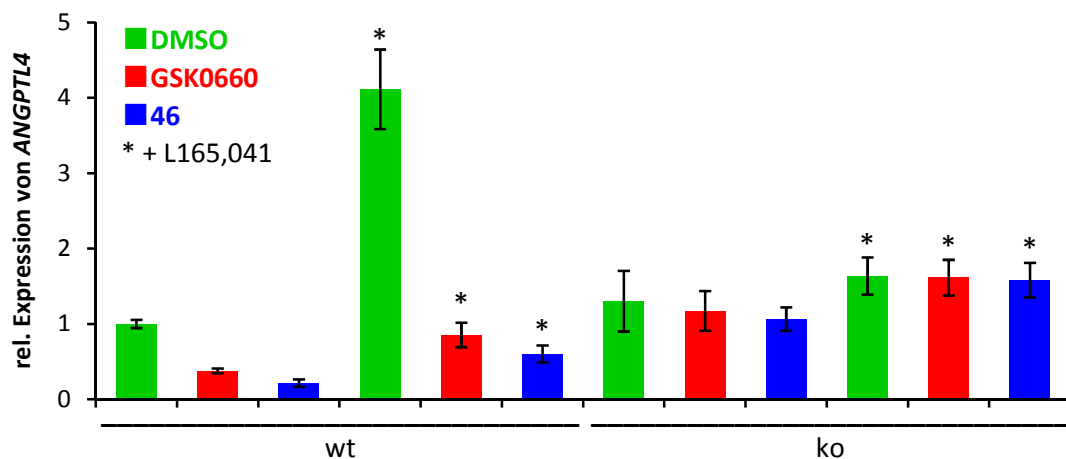
#### 3.5.1 Aktivität und Selektivität

*PPAR-Green* ist ein Pan-PPAR-Agonist, wodurch die Verdrängung dieses Liganden für jeden PPAR-Subtyp vermessen und so die Selektivität bestimmt werden kann.



**Abbildung 3.15** Affinität von **46** für PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  jeweils im Vergleich mit einem für den Subtyp selektiven Agonisten. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

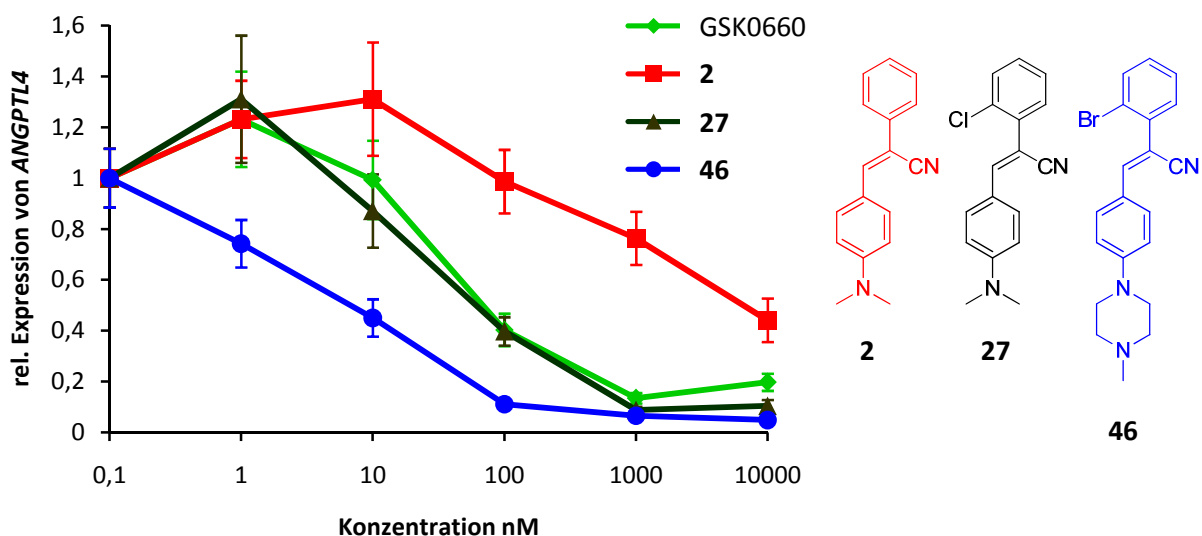
Für **46** ergibt sich in diesem Assay eine sehr gute Subtypselektivität (Abbildung 3.15), die Interaktion mit den anderen Subtypen ist nur minimal. Um andere Interaktionen auszuschließen, wurde Verbindung **46** im Zellassay vermessen. Bei diesem Assay wird mittels Real-Time-quantitative PCR (RT-qPCR) die Expression von *ANGPTL4*, einem endogenen Zielgen von PPAR $\beta/\delta$ , verfolgt, um so dessen Aktivität quantifizieren zu können (Abbildung 3.16)<sup>65</sup>.



**Abbildung 3.16** Einfluss von **46** auf die relative Expression von *ANGPTL4* in Makrophagen aus PPAR $\beta/\delta$ -Wildtyp-Mäusen (wt) und PPAR $\beta/\delta$ -ko-Mäusen (ko) nach 6 h bei einer Ligandkonzentration von 1  $\mu$ M. Der PPAR $\beta/\delta$ -Agonist L165,041 wurde in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt.

Die für diesen Assay eingesetzten Zellen stammen von PPAR $\beta/\delta$ -wildtyp-Mäusen bzw. PPAR $\beta/\delta$ -ko-Mäusen. Während in den Wildtyp-Zellen ein deutlicher Effekt für **46** auftritt, ist

in den ko-Zellen keine signifikante Verringerung der *ANGPTL4*-Expression zu beobachten. Zudem wurde der Effekt des selektiven PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten L165,041 durch **46** aufgehoben. Beide Experimente bestätigen damit den zellulären Signalweg über PPAR $\beta/\delta$ . Verfolgt man die relative Expression in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration so zeigt sich, dass **46** nicht nur in der Affinität zur PPAR $\beta/\delta$ -LBD, sondern auch in seinem inhibitorischen Potential GSK0660 überlegen ist (Abbildung 3.17). Für **46** ergibt sich ein IC<sub>50</sub> von 9.5 nM, der somit den Wert von GSK0660 mit 48 nM um ein fünffaches übertrifft.

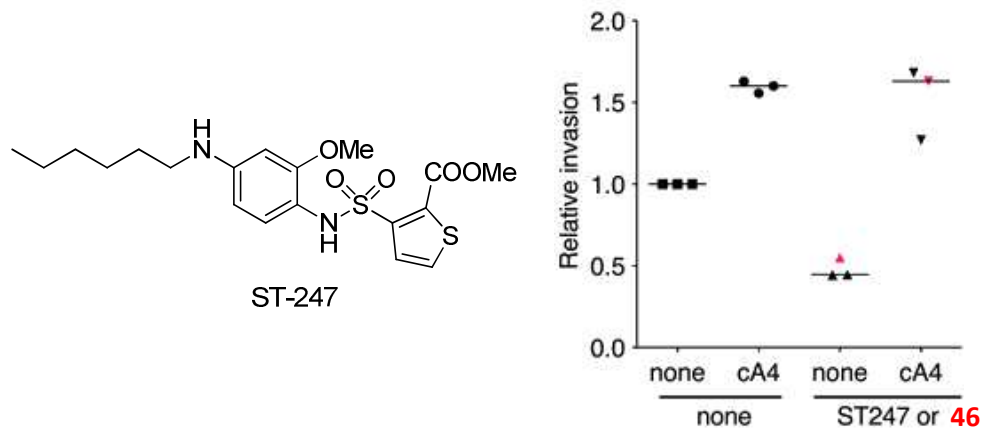


**Abbildung 3.17** Relative Expression von *ANGPTL4* in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration in Mausmyoblasten. Die RNA wurde mittels RT-qPCR nach 24 h ermittelt.

In diesem Assay zeigt sich zudem deutlich, dass die Affinität zur PPAR $\beta/\delta$ -LBD nicht mit der Inhibition im Zellassay korreliert. Der IC<sub>50</sub>-Wert von **27** ist mit 52 nM fast genauso gut wie der von GSK0660, obwohl die PPAR $\beta/\delta$ -Affinität dieser Verbindung kleiner ist als die der Referenzverbindung (Abbildung 3.6). Auch der Effekt des Halogens offenbart sich erst im Zellassay: Während sich im Affinitätsassay das Chlor- und Bromderivat **27** und **29** kaum unterscheiden (Abbildung 3.6, S. 28) ist der IC<sub>50</sub>-Wert von **46** aus dem Zellassay um ein 2.5-faches niedriger als der seines entsprechenden Chlorderivats **49** (Abbildung 5.2, S. 60).

### 3.5.2 Angiotensin-like 4

Angiotensin-like 4 (ANGPTL4) ist eines der am besten untersuchten PPAR $\beta/\delta$ -Zielgene, weshalb es gut geeignet ist, um die PPAR $\beta/\delta$ -Aktivität in zellulären Systemen zu verfolgen. Nach der Sekretion wird ANGPTL4 in N-terminale (nANGPTL4) und C-terminale (cANGPTL4) Fragmente gespalten, die im Blutkreislauf zirkulieren und hauptsächlich Funktionen in der Energiehomöostase und Entzündung wahrnehmen<sup>65</sup>. In Zusammenarbeit mit mehreren Arbeitsgruppen hat die Gruppe um Prof. Dr. R. Müller (IMT Marburg) die Rolle von cANGPTL4 bei der Metastasierung näher untersucht<sup>66</sup>. Dabei wurde die relative Invasion einer Brustkrebszelllinie in einer drei-dimensionalen Matrigel Matrix verfolgt (Abbildung 3.18).

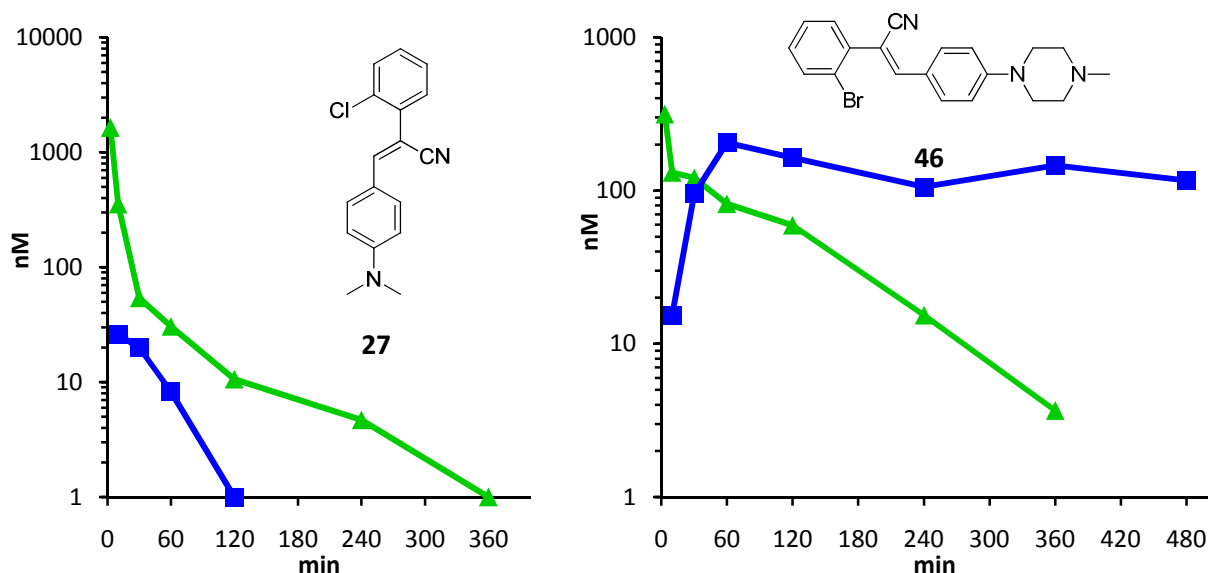


**Abbildung 3.18** Aufhebung des inhibitorischen Effekts von ST-247 (links) und **46** auf die relative Zellinvasion durch cANGPTL4 (cA4).

Die relative Invasion war dabei signifikant erhöht wenn cANGPTL4 vorlag. Die inversen PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten **46** und ST-247, das parallel in dieser Arbeitsgruppe entwickelt wurde, waren in der Lage, die Zellinvasion zu reduzieren<sup>60</sup>. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von cANGPTL4 wiederum aufgehoben werden. ANGPTL4 und somit auch PPAR $\beta/\delta$  scheinen demnach eine essentielle Aufgabe bei der Krebszellinvasion zu haben. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die strukturell unterschiedlichen inversen Agonisten in der Lage sind selektiv PPAR $\beta/\delta$  und darauf folgende Signalkaskaden zu inhibieren.

### 3.5.3 Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeitsstudien an Mäusen für Verbindung **27** und **46** wurden von der Firma Cerep (Redmond, USA) durchgeführt.



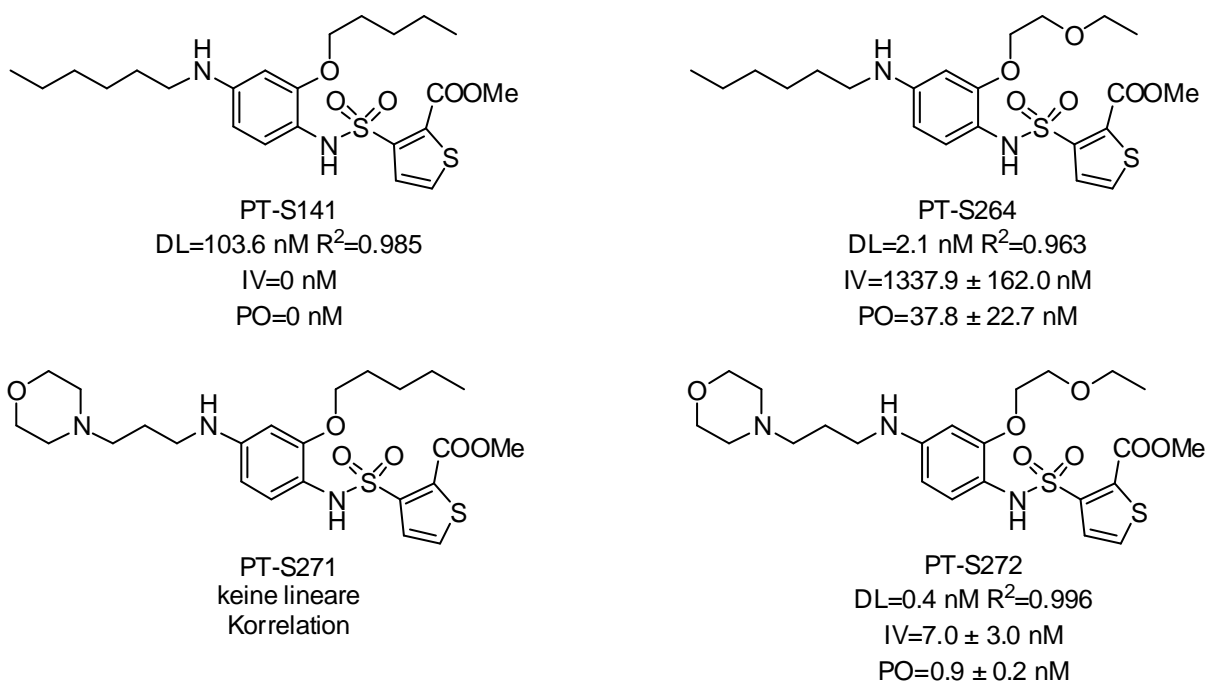
**Abbildung 3.19** Bioverfügbarkeit in Mäusen für Verbindung **27** (links) und Verbindung **46** (rechts), jeweils mit **intravenöser Verabreichung** und **oralen Verabreichung**. Ein weiterer Datenpunkt bei 1440 min ist nicht in den Diagrammen dargestellt, da nach dieser Zeit bei keiner Messung mehr Ligand vorlag. Die Messungen wurden von Cerep (Redmond, USA) durchgeführt.

Die Plasmakonzentration für Verbindung **27** bei oraler Verabreichung war so gering, dass sich keine Bioverfügbarkeit berechnen ließ (Abbildung 3.19, links). Mit einer Clearance von  $176 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  sinkt die Plasmakonzentration auch bei intravenöser Verabreichung sehr schnell. Für Verbindung **46** beträgt die Clearance  $121 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , wodurch die Plasmakonzentration bei intravenöser Verabreichung deutlich höher ist als bei **27** (Abbildung 3.19, rechts). Bei oraler Verabreichung wurde eine Bioverfügbarkeit von 72 % mit einer Halbwertszeit von 634 min erreicht. Die Plasmakonzentration liegt während dieses Zeitraums deutlich über der mittleren inhibitorischen Konzentration aus dem Zellassay von 9.5 nM, so dass eine maximale biologische Aktivität gewährleistet sein sollte. Verbindung **46** ist damit der erste selektive inverse Agonist für PPAR $\beta/\delta$ , der sich für eine Anwendung im Mausmodell eignet.



### 3.5.4 Etablierung der Bioverfügbarkeitsstudien

Neben Verbindung **27** und **46** wurde auch eine Bioverfügbarkeitsstudie für ST-247 von Cerep angefertigt. Diese ergab dass 30 min nach der intravenösen Gabe kein Ligand mehr im Plasma vorlag und auch zu keinem Zeitpunkt bei oraler Verabreichung. Auf Grundlage von ST-247 wurden in unserem Arbeitskreis neue Liganden entwickelt und synthetisiert, mit dem Ziel die Bioverfügbarkeit zu verbessern (Abbildung 3.20)<sup>67</sup>. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Nockher vom Universitätsklinikum Marburg ein Protokoll zur Anfertigung von Bioverfügbarkeitsstudien mittels HPLC/MS etabliert. Am IMT wurden vier der auf ST-247 basierenden Liganden Mäusen verabreicht, um einen ersten Anhaltspunkt für die Bioverfügbarkeit zu erhalten. Da jeder Datenpunkt dreifach repliziert werden muss, wurden nur zu einem Zeitpunkt Blutproben entnommen: Bei intravenöser Verabreichung (IV) nach 15 min, bei oraler Gabe (PO) nach 45 min. Die Empfindlichkeit der Methode zur Bestimmung der Plasmakonzentration war dabei sehr stark abhängig von dem zu quantifizierenden Liganden.



**Abbildung 3.20** Von ST-247 abgeleitete Verbindung, die auf ihre Bioverfügbarkeit getestet wurden. Die Plasmakonzentrationen wurden nach 15 min (IV) oder 45 min (PO) bestimmt. DL: unteres Detektionslimit, IV: intravenös, PO: peroral.

Obwohl die Ionisierungsparameter für jeden Liganden optimiert wurden, konnte bei PT-S271 keine lineare Korrelation zwischen der Konzentration und der AUC (*Area under curve*) erreicht werden. Für die anderen Verbindungen liegt der  $R^2$ -Wert für diese Korrelation zwischen 0.998 und 0.963. Das untere Detektionslimit (DL) lag für PT-S141 nur bei 103.6 nM, für die anderen Verbindungen konnte aber eine Detektionsgrenze von 2.1 bzw. 0.4 nM erreicht werden. Die strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen legt nahe, dass die *n*Pentylkette des Ethers von PT-S271 und PT-S141 eine massenspektrometrische Quantifizierung beeinträchtigt.

Für PT-S141 konnte in keiner Probe Ligand nachgewiesen werden, was bedeutet, dass auch bei intravenöser Gabe die Konzentration unter 100 nM liegt. Ebenfalls niedrig, aber quantifizierbar, waren die Werte für PT-S272, die sich mit 7.0 (IV) bzw. 0.9 nM (PO) im Bereich der Werte von ST-247 befinden. Einzig für PT-S264 konnten mit 1337.9 (IV) bzw. 37.8 nM (PO) höhere Konzentrationen nachgewiesen werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass bei den von Cerep angefertigten Studien eine Dosis von 5 mg/kg bei oraler Verabreichung verwendet wurde, bei den vor Ort angefertigten Studien hingegen 25 mg/kg. Obwohl die Konzentration nur an einem Zeitpunkt bestimmt wurde, deuten die erreichten Plasmakonzentrationen aufgrund der hohen Dosis auf eine unzureichende Bioverfügbarkeit dieser Liganden hin.

### 3.6 Versuche zur Aufklärung des Bindungsmodus

Die Größe der PPAR-Bindetasche und deren Flexibilität erlaubt selbst gebundenen Liganden verschiedene Konformationen anzunehmen (Abbildung 1.11, S. 17). Die Ergebnisse der SAR-Studie lassen daher nur wenige Aussagen über den Bindungsmodus zu, einzig ein kovalenter Bindungsmodus kann als unwahrscheinlich erachtet werden. Nitrile sind in kovalenten Inhibitoren oftmals die für den Aufbau der kovalenten Verknüpfung zum Protein verantwortliche Gruppe. Um einen nucleophilen Angriff des Proteins zu ermöglichen, muss das Nitril allerdings zusätzlich noch aktiviert sein, da die Elektrophilie des Nitrils alleine nicht ausreicht<sup>52</sup>. Dies kann z. B. über weitere elektronenziehende Gruppen im Liganden geschehen. In den hier dargestellten Liganden ist durch den +M-Effekt des konjugierten

Stickstoffs der elektrophile Charakter des Nitrils aber dermaßen verringert, dass ein nucleophiler Angriff überhaupt erst möglich ist, wenn das Amin protoniert vorliegt (Kapitel 3.3.2, S. 29). Zudem sollte bei einem kovalenten Bindungsmodus die Einführung von weiteren Gruppen mit -I-Effekt den Aufbau einer kovalenten Bindung begünstigen, in der SAR-Studie hatten die Einführung solcher Gruppen aber einen negativen Effekt auf die Affinität.

Eine Antwort auf die Frage nach dem Bindungsmodus kann letztendlich eine Röntgenkristallstruktur geben. Vor diesen Hintergrund mussten zunächst ausreichende Mengen an reinem Protein exprimiert werden.

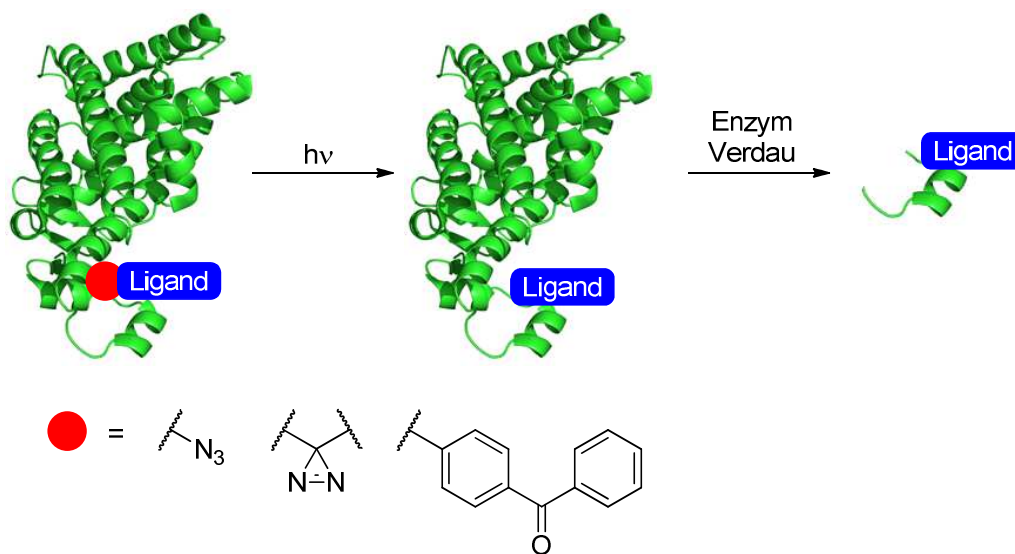
### 3.6.1 Proteinexpression und Aufreinigung

In der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Müller am IMT war bereits ein Protokoll etabliert, um die PPAR $\beta/\delta$ -Bindetasche zu exprimieren und aufzureinigen. Das verwendete Konstrukt beinhaltet jedoch ein nicht abspaltbares Glutathion-S-Transferase-*Tag*, das sich nur bedingt zur Proteinkristallisation eignet, da aufgrund der Größe des Tags von 220 AS die Bildung von Kristallen erschwert werden könnte. Ein neues Konstrukt mit einem Polyhistidin-Tag (*His-Tag*, 6 AS), von dem bereits eine Röntgenkristallstruktur mit einem Agonisten erhalten werden konnte, wurde freundlicherweise von Proteros bereitgestellt<sup>68</sup>. Das Expressionsprotokoll konnte im Zuge dieser Arbeit reproduziert werden, um so genug Protein für Kristallisationsexperimente zu erhalten. Parallel zu den Kristallisationsversuchen wurde zudem eine weitere Methode verfolgt, um die Bindungsposition des Liganden zu ermitteln.

### 3.6.2 Photoaffinitätsmarkierung

Die Photoaffinitätsmarkierung ist eine Methode, bei der eine kovalente Bindung zwischen einem Biomolekül und einem Liganden aufgebaut wird. Der so erhaltene Komplex kann dann chromatographisch aufgereinigt und spektroskopisch untersucht werden, um die enthaltenen Komponenten zu identifizieren<sup>69</sup>. Das namensgebende Element ist eine im Ligand enthaltene funktionelle Gruppe, der Photor, die bei Lichteinwirkung eine reaktive

Spezies erzeugt, welche mit dem direkt umliegenden Protein abreagiert und so eine kovalente Bindung aufbaut. Zudem enthält der Ligand noch einen Marker, der es erlaubt, das markierte Biomolekül von nichtmarkiertem zu unterscheiden. Als Photophore können Azide, Diazirine oder Benzophenone eingesetzt werden, die nach Bestrahlung bei einer bestimmten Wellenlänge ein reaktives Nitren, Carben oder Radikal erzeugen (Abbildung 3.21). Als Marker dienen Chromophore, die eine Detektion über HPLC ermöglichen, oder Gruppen bzw. Atome, die über ihr spezifisches Isotopenmuster eine Zuordnung in der Massenspektrometrie erlauben.



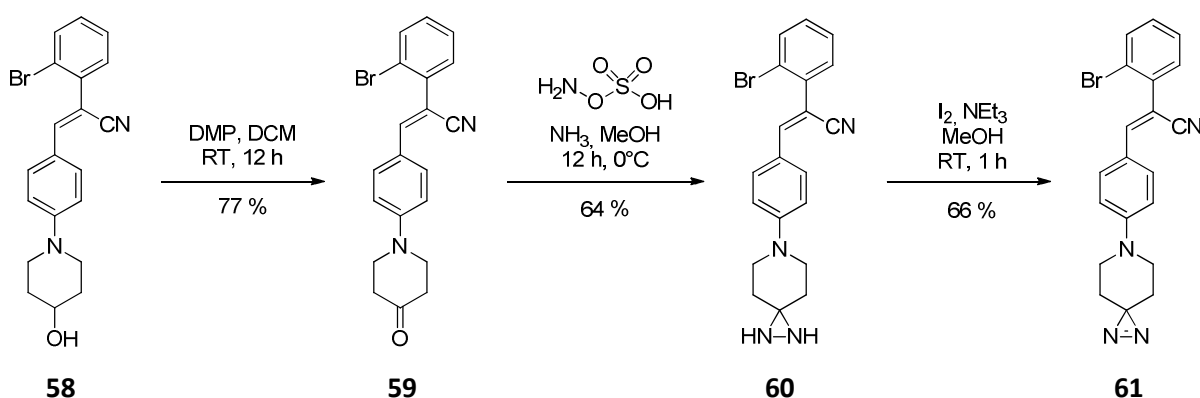
**Abbildung 3.21** Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung. Der **Ligand** bindet an das Protein und der **Photophor** wird anschließend aktiviert, um die kovalente Bindung zum Protein aufzubauen. Danach kann ein enzymatischer Verdau des Proteins folgen.

Mithilfe der Photoaffinitätsmarkierung ist es möglich unbekannte Zielproteine des Liganden zu identifizieren und den ungefähren Bindungsort zu lokalisieren. Dazu wird das markierte Protein einem enzymatischen Verdau unterworfen und anschließend aus den Massen der Fragmente die ursprüngliche Proteinsequenz errechnet. Durch weitere Fragmentierung des markierten Fragments kann zudem die Aminosäure bestimmt werden, an die der Ligand gebunden ist. Da das Zielprotein in dieser Arbeit bekannt ist, lag der Fokus nur auf der Lokalisierung des Bindungsortes.

### 3.6.2.1 Design des Photoaffinitätsliganden

Unabhängig von der Wahl des Markers oder der photoreaktiven Gruppe ist es essentiell, dass die Affinität des Liganden durch die Einführung dieser Funktionen nicht zu stark beeinträchtigt wird. Eine auffällige Eigenschaft der Acrylnitrile ist die starke gelbe Farbe, die aus dem *Push-Pull*-System zwischen dem Nitril und dem konjugierten Amin resultiert. Diese Konjugation ist auch verantwortlich für eine ausgeprägte Fluoreszenz dieser Liganden, die bei ~380 nm absorbieren und bei ~460 nm wieder emittieren. Da Proteine bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren kann diese spezifische Fluoreszenz als Marker zur Fragmentidentifizierung genutzt werden und erlaubt gleichzeitig eine Modifikation des Heterozyklus, da diese das Absorptionsmaxima nicht verschiebt, solange das *Push-Pull*-System erhalten bleibt.

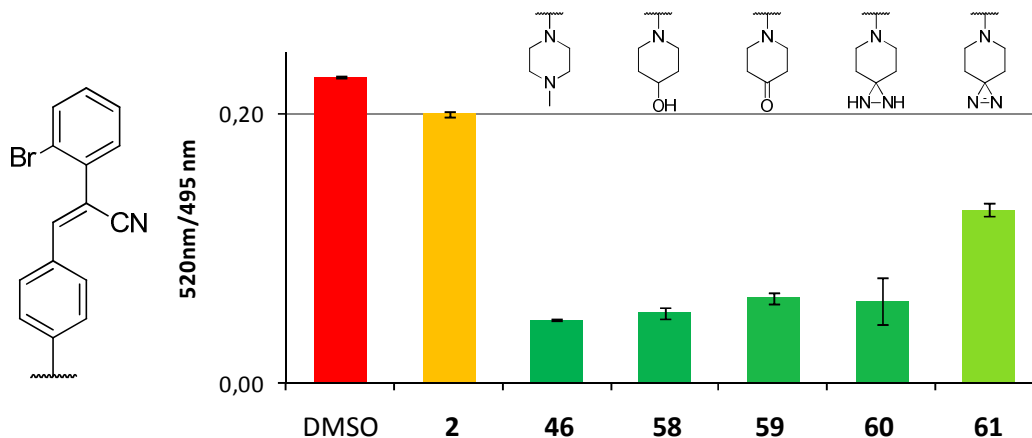
Ausgangspunkt für den Photoaffinitätsliganden ist Verbindung **46**. Das Isotopenmuster des Broms kann neben der Fluoreszenz als zusätzliches Identifikationsmerkmal dienen. Die Alkylserie dieser Verbindung hat zudem gezeigt, dass Modifikationen am unteren Stickstoff der Piperidins erst ab einer bestimmten Größe die Affinität reduzieren, womit sich diese Position gut eignet, um den Photophor zu implementieren (Abbildung 3.12, S. 37). Als photoreaktive Gruppe wurde die Diazirinfunktion gewählt, da sie im Vergleich zu anderen Photophoren eine gute Markierungseffizienz aufweist<sup>70</sup>.



**Schema 3.9** Synthese des Photoaffinitätsliganden **61**.

Die Synthese erfolgte aus Verbindung **58**, welche nach der etablierten Methode als *E/Z*-Gemisch im Verhältnis 1:5 erhalten wurde (Schema 3.9). Oxidation mit Dess-Martin Periodinane (DMP) ergab das entsprechende Keton **59**, welches mit Hydroxylamin-*O*-

Sulfonsäure zum Diaziridin **60** umgesetzt wurde<sup>71</sup>. Die anschließende Oxidation mit Iod ergab den fertigen Liganden **61**, der durch die Iod induzierte Isomerisierung der Doppelbindung als reines Z-Isomer erhalten wurde.

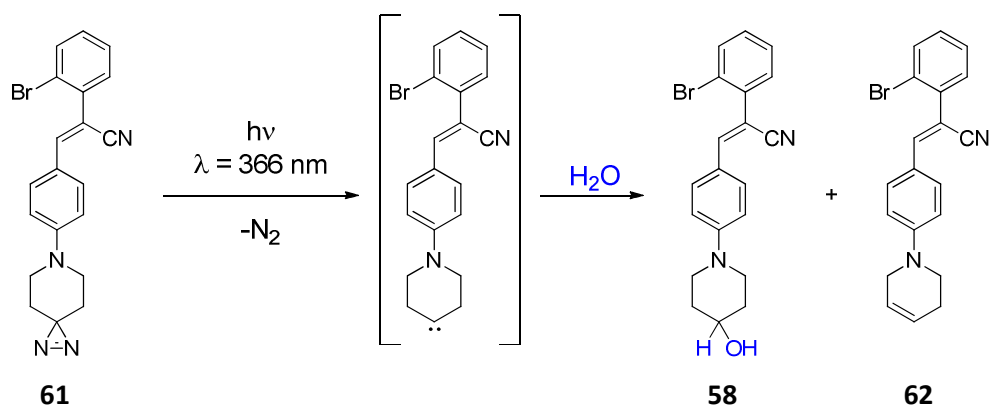


**Abbildung 3.22** Affinitäten der Photoaffinitätsreihe. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Obwohl bei den einzelnen synthetischen Zwischenstufen der Syntheseroute die Affinität abnimmt, besitzt der Ligand **61** immer noch eine Affinität, die deutlich über der des Screening Hits **2** liegt und somit eine Bindung des Liganden an das Protein gewährleisten sollte (Abbildung 3.22).

### 3.6.2.2 Markierungsversuche

Diazirine benötigen standardmäßig Bestrahlungszeiten von unter 30 min, oft ist schon nach 15 min kein Edukt mehr zu finden<sup>72</sup>. Da das Acrylnitril aber ebenfalls bei 366 nm absorbiert, ist zu erwarten, dass eine längere Bestrahlungszeit notwendig ist. Photophore wie das Azid werden bei <300 nm aktiviert und benötigen, verglichen mit dem Diazirin, ebenfalls längere Bestrahlungszeiten, da in diesem Wellenlängenbereich auch Proteine absorbieren. Ein Schaden am Protein, wie er bei Aktivierung von Aziden auftreten kann, ist bei 366 nm aber nicht zu erwarten.



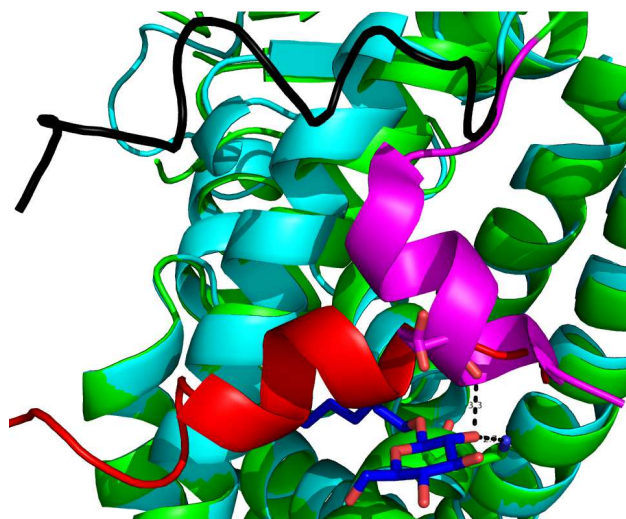
**Schema 3.10** Aktivierung des Photoaffinitätsliganden in Wasser.

In einem Vorversuch ohne Protein wurde der Ligand zwischen 30 und 120 min bei 366 nm bestrahlt. Die massenspektrometrische Analyse zeigt, dass selbst nach zwei Stunden ein großer Teil des Liganden nicht umgesetzt wurde. Nur ein kleiner Teil des gebildeten Carbens reagiert intermolekular mit dem Lösungsmittel zu **58**, der größte Teil bildet über einen innermolekularen H-Shift Verbindung **62**. Das Carben scheint sich demnach nur sehr langsam zu bilden und darüber hinaus sehr instabil zu sein, was eine schlechte Voraussetzung für die Markierung ist, da die Reaktion mit dem umgebenden Protein gegenüber der innermolekularen Umlagerung bevorzugt sein sollte. Bei vielen Photoaffinitätsliganden sind die  $\alpha$ -Protonen des Diazirinzylus gegen Fluor ausgetauscht um einen H-Shift zu vermeiden, was in Verbindung **61** nur unter großem synthetischem Aufwand möglich wäre<sup>73</sup>. Dabei ist aber auch anzumerken, dass die Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung selten 10 % überschreitet und es erfolgreiche Anwendungen nicht-fluorierter Alkyldiazirine gibt<sup>73</sup>. Beim Versuch mit Protein konnte jedoch trotz langer Bestrahlungszeit (5 h) und zehnfachem Überschuss des Liganden kein markiertes Protein im Massenspektrum identifiziert werden. Versuche zum enzymatischen Verdau des Proteins wurden daraufhin nicht mehr durchgeführt.

### 3.6.3 Proteinkristallisation

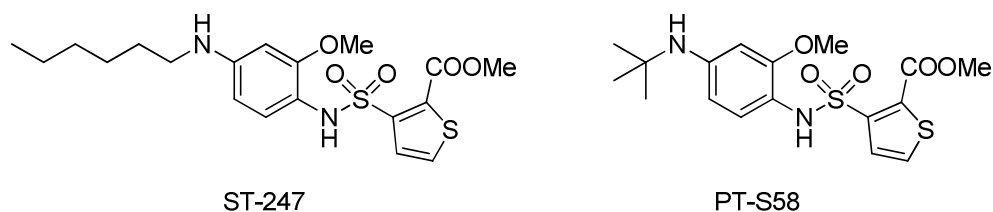
Mit dem verwendeten Proteinkonstrukt wurden bereits Röntgenkristallstrukturen erhalten, da diese aber einen Agonisten gebunden haben, eignen sich die dafür verwendeten Kristallisationsbedingungen nur bedingt als Ausgangspunkt zur Kristallisation der inversen

Agonisten<sup>68</sup>. In Abbildung 1.10 (S. 14) ist der große strukturelle Unterschied für Agonisten und inverse Agonisten an PPAR $\gamma$  aufgezeigt, für PPAR $\beta/\delta$  sind noch keine Strukturen mit gebundenem Inhibitor publiziert. Additiva wie *n*Heptyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid, die zur Stabilisierung den Kristallisationsbedingungen zugesetzt werden und sich in vielen PPAR $\beta/\delta$ -Strukturen finden, sind für inverse Agonisten nicht geeignet, da sie mit der H12 der AF-2 wechselwirken (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23** Überlagerung einer **PPAR $\gamma$ -Struktur** mit gebundenem Inhibitor (1KKQ) und einer **PPAR $\beta/\delta$ -Struktur** mit gebundenem Agonisten (3GZ9). ***n*Heptyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid** wechselwirkt mit dem Protein und der **H12 der Agonistenstruktur**, kann aber nicht die **H12 der Inhibitorstruktur** stabilisieren und würde mit dem **Corepressor (SMRT)** der Inhibitorstruktur kollidieren.

Um einen Startpunkt für die Kristallisation zu finden, wurde ein Roboter-gestützter Kristallisationscreen am MARXTAL-Labor in Marburg durchgeführt. Im Rahmen diese Screens wurde nicht nur versucht Verbindung **46** zu kristallisieren, sondern auch den Antagonisten PT-S58 (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24** Struktur des inversen Agonisten ST-247 und des Antagonisten PT-S58.

Die Struktur dieses Antagonisten ist von besonderem Interesse, da das strukturell sehr ähnliche ST-247 ein inverser Agonist ist, obwohl es sich nur in der Alkylkette unterscheidet<sup>74</sup>.



In dem Kristallisationsscreen wurden **46** und PT-S58 gegen 1248 verschiedene Kristallisationspufferlösungen getestet. Für Verbindung **46** ergaben sich dabei leider bei keiner der getesteten Bedingung Proteinkristalle, für PT-S58 hingegen fanden sich neun Bedingungen, bei denen Kristalle entstanden waren (Abbildung 3.25).



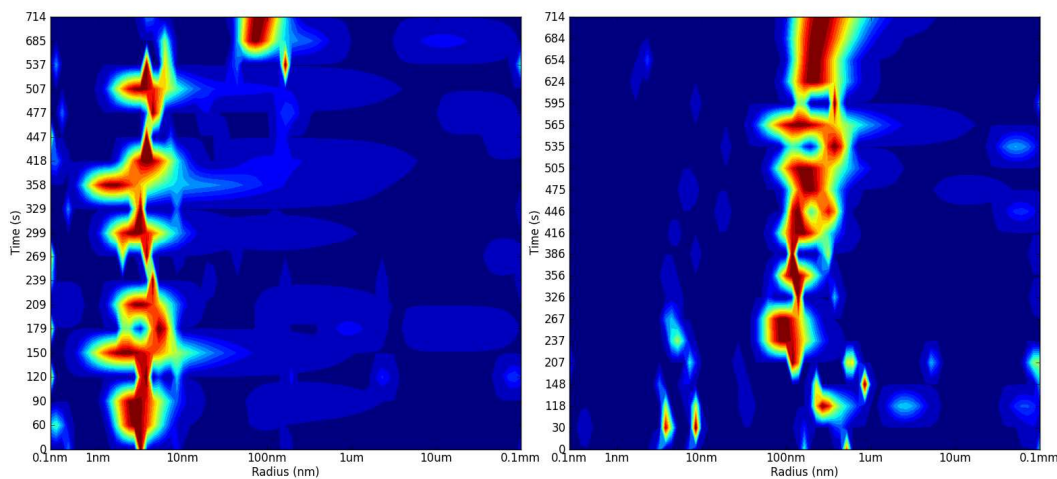
**Abbildung 3.25** Erfolgreiche Bedingung des Kristallisationsscreens für PT-S58 nach zehn Tagen. Bedingungen: 0.1 M NaOAc; 0.9 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>; 0.9 M KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>; pH 8.00.

Ein Anfärbtest ergab, dass es sich dabei um Proteinkristalle handelte, allerdings waren sie zu klein, um aussagekräftige Streubilder zu generieren. Die Reproduktion der Kristalle ohne Roboter gelang nicht. Alle neun Bedingungen enthielten Dihydrogenphosphat in verschiedenen Konzentrationen (1.5–2.0 M), weshalb manuell angefertigte Screenings der Dihydrogenphosphatkonzentration angefertigt wurden. Jedoch konnte hier auch mit Animpfen der Originalkristalle kein Kristallwachstum beobachtet werden.

Da es sich bei PT-S58 um einen Antagonisten handelt, kann die H12 eine andere Konformation annehmen als bei inversen Agonisten. Kristallstrukturen von PPAR $\gamma$  im Komplex mit RXR $\alpha$  haben gezeigt, dass es keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinstruktur hat, ob ein Agonist (Rosiglitazon) oder ein Antagonist (GW9662) gebunden ist<sup>75</sup>. Beide Strukturen enthalten ein Coactivatorsegment und die H12 der AF-2 befindet sich dementsprechend am Protein angeordnet. Daher wurde für PT-S58 ein weiterer Screen mit *n*Heptyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid durchgeführt. Bei drei Bedingungen, welche dieselben Salze enthielten, wurden ähnliche Kristalle erhalten wie beim vorherigen Screen. Auch hier gelang es leider nicht, die Bedingungen zum Kristallwachstum manuell zu replizieren, so dass im Endeffekt für keinen Liganden Kristalle erhalten werden konnten, die Aufschluss über den Bindungsmodus geben könnten.

### 3.6.4 Problemsuche

Sowohl bei der Photoaffinitätsmarkierung als auch bei der Proteinkristallisation ist es essentiell, dass das Protein richtig gefaltet ist, damit der Ligand binden kann. Mittels *Dynamic Light Scattering* (DLS) kann von einer Lösung bzw. Suspension die Partikelgröße über die Streuung des Lichts ermittelt werden. Diese Methode kann angewendet werden, um zu überprüfen, ob sich Proteinaggregate gebildet haben.



**Abbildung 3.26** DLS-Spektren des frisch exprimierten Proteins mit 0.5 mg/mL (links) und nach dem Aufkonzentrieren auf 2 mg/mL (rechts).

Bei der Anwendung von DLS in unserer Arbeitsgruppe hatte sich bereits gezeigt, dass aktives und kristallisierendes Protein keine einheitliche Größenverteilung ergeben muss, sondern auch Spektren mit uneinheitlicher Größenverteilung wie in Abbildung 3.26 (links) ergeben kann<sup>76</sup>. Beim Aufkonzentrieren des PPAR $\beta/\delta$ -Konstrukts von 0.5 auf 2 mg/mL vergrößerte sich der Radius der Partikel jedoch von unter 10 nm auf über 100 nm, was ein starkes Indiz für Proteinaggregation ist (Abbildung 3.26). Schockgefrorene und wieder aufgetaute Proben vorheriger Proteinchargen zeigten eine ähnliche Größenverteilung. Solche Aggregate können oft durch Zentrifugation wieder abgetrennt werden. Mit dem vorhandenen Protein zeigte sich aber selbst nach zwei Stunden bei 13000 rpm keine signifikante Verbesserung der Größenverteilung im DLS-Spektrum. Diese Aggregation scheint einer der Hauptgründe zu sein, warum die Experimente zur Aufklärung des Bindungsmodus nicht zum Erfolg führten, da sehr wahrscheinlich nicht ausreichend Protein in der richtigen Tertiärstruktur vorliegt.

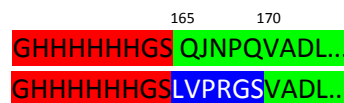
## 4 Zusammenfassung

Ausgehend von einem Screening mit zehn Hits wurde eine neue Grundstruktur für inverse PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten identifiziert. Anhand einer auf diesem Grundgerüst basierenden systematischen Struktur-Aktivitäts-Studie mit über 80 synthetisierten Verbindungen wurden mehrere funktionelle Merkmale identifiziert, die entscheidend für die PPAR $\beta/\delta$ -Affinität sind. Durch Kombination dieser Merkmale wurde ein neuer, selektiver und mit einem IC<sub>50</sub> von 9.5 nM hochaktiver, inverser Agonist für PPAR $\beta/\delta$  entwickelt (**46**). Dieser Ligand stellt zudem mit seiner oralen Bioverfügbarkeit in der Maus von 72 % und einer Halbwertszeit von 10 h den ersten literaturbekannten inversen Agonisten für PPAR $\beta/\delta$  dar, der für eine Anwendung im Tiermodell geeignet ist.

Darüber hinaus wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt, um Informationen über den Bindungsmodus dieses Liganden zu erhalten, die Proteinkristallisation und die Photoaffinitätsmarkierung. Zu diesem Zweck wurden ausreichende Mengen an Protein exprimiert und aufgereinigt, so dass mehrere Kristallisationsscreens durchgeführt werden konnten. Zeitgleich wurde ein Photoaffinitätsligand entwickelt und synthetisiert, um mithilfe der Photoaffinitätsmarkierung die ungefähre Bindungsposition des Liganden zu identifizieren. Da das verwendete Protein jedoch sehr schnell aggregierte, konnte mit keinem dieser Ansätze eine Information über den Bindungsmodus erhalten werden.

## 4.1 Ausblick

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Erhöhung der Proteinstabilität ist die Abspaltung des im Konstrukt enthaltenen His-Tags, um so die Länge der Proteinsequenz zu verkürzen. Inwiefern sich dies auf die Aggregation auswirkt, ist nur schwer vorherzusagen, es sollte aber zumindest förderlich für die Kristallisationsfähigkeit des Proteins sein. Dazu könnte nach dem His-Tag eine Thrombin-Schnittstelle eingefügt werden (Abbildung 4.1).



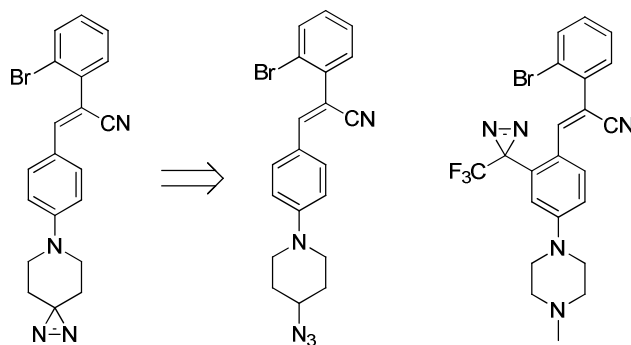
**Abbildung 4.1** Geplante Modifikation des Proteinkonstrukts. Nach dem **His-Tag** soll eine **Thrombin-Schnittstelle** eingefügt werden und das **Protein** gleichzeitig um fünf AS verkürzt werden.

Das verwendete Konstrukt enthält die PPAR $\beta/\delta$ -Sequenz von AS 165–441, ein großer Teil der PPAR $\beta/\delta$ -Strukturen in der PDB startet aber erst bei AS 170 oder 171. Im Zuge der Mutation bietet es sich daher an, nur eine AS einzufügen und fünf AS zu mutieren, um so die 6 AS lange Thrombin-Schnittstelle aufzubauen und die Proteinsequenz gleichzeitig zu verkürzen. In den ersten PCRs wurde versucht diese Variationen in einem Schritt vorzunehmen, was jedoch nicht gelang. Die Variationen wurden danach in drei Schritte unterteilt: zuerst die Insertion (L), dann die Mutation der ersten drei AS (QJN $\rightarrow$ VPR) und am Ende die Mutation der letzten beiden AS (PQ $\rightarrow$ GS). Die Insertion konnte mit dem Standardprotokoll des verwendeten PCR-Kits erfolgreich durchgeführt werden, die erste Mutation jedoch nicht. Mit einer erhöhten Zyklenzahl im PCR-Protokoll gelang schließlich auch die erste Mutation, allerdings wurde das Konstrukt auch an unerwünschten Positionen modifiziert. Um die komplette Thrombin-Schnittstelle aufzubauen bedarf daher es noch der Optimierung des PCR-Protokolls.

Bei der Proteinkristallisation von inversen Agonisten sind Additiva wie *n*Heptyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid nicht förderlich (Kapitel 3.6.3). Um das Protein zu stabilisieren, können aber kurze Corressorsequenzen zugegeben werden, die an PPAR binden und deren Rekrutierung durch inverse Agonisten erhöht werden sollte. Die in 1KKQ (Abbildung 1.10, S. 14) verwendete Sequenz des Corressors SMRT (*silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*) ist 23 AS lang und sollte an alle PPAR-Subtypen gleich gut binden. In

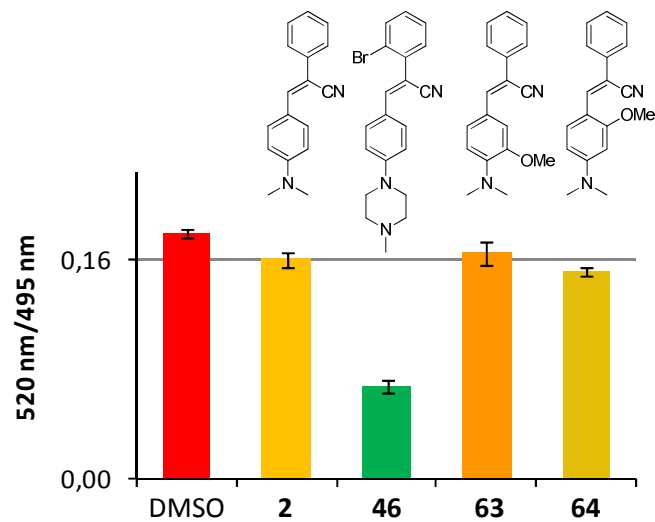
Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Steinmetzer (Marburg) wurde versucht, diese Sequenz mithilfe eines Peptidsyntheseroboters darzustellen, was bisher jedoch nicht gelang.

Neben der Proteinaggregation ist die Instabilität und langsame Entstehung des Carbens des Photoaffinitätsliganden **61** eine weitere Problematik bei der Photoaffinitätsmarkierung. Die Verwendung eines Azids anstelle des Diaziridins wie in Abbildung 4.2 hätte den Vorteil, dass die Absorptionswellenlänge des Photophors sich nicht mehr mit der des Liganden überschneidet, allerdings läge auch hier immer noch ein  $\alpha$ -Proton zum Nitren vor, was synthetisch nur sehr schwer gegen Fluor auszutauschen wäre. Die 3-Phenyl-3-(trifluormethyl)diaziringruppe (TPD) hat sich in der Photoaffinitätsmarkierung sehr bewährt und ließe sich ebenfalls in das Grundgerüst integrieren (Abbildung 4.2)<sup>70,72</sup>.



**Abbildung 4.2** Alternative Photoaffinitätsliganden.

Die Affinität des bisubstituierten Derivats **64** deutet an, dass an dieser Position auch genügend Raum für das 3-(Trifluormethyl)diazirin vorhanden wäre (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3** Affinitäten der bisubstituierten Verbindungen **63** und **64**. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1  $\mu$ M Ligandkonzentration.

Bei Verwendung der TPD-Gruppe würden sich zwar wieder die Absorptionswellenlängen überschneiden, allerdings ist das entstehende Carben durch die Abwesenheit von  $\alpha$ -Protonen recht stabil, was die Markierungschancen erhöhen sollte.

## 5 Experimenteller Teil

PPAR-Kinetiken und Plasmaproben von Mäusen wurden von der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Müller (IMT, Marburg) angefertigt. Die angegebenen Werte der Kinetiken sind das Mittel aus drei Messwerten.

ST-247, PT-S58, PT-S141, PT-S264, PT-S271 und PT-S272 wurden in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert, die Bedingungen sind publiziert<sup>60,74</sup>.

Die Bioverfügbarkeiten für **27**, ST-247 und **46** wurden von Cerep (Redmond, USA) angefertigt.

Die Bioverfügbarkeiten für PT-S141, PT-S264, PT-S271 und PT-S272 wurden in der Uniklinik Marburg in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Nockher angefertigt.

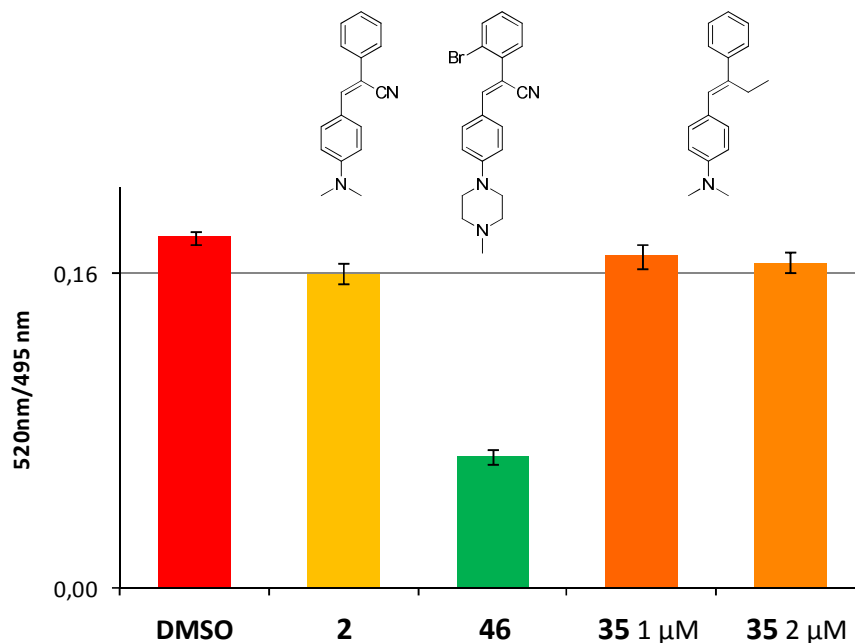
Das PPAR $\beta/\delta$  Konstrukt sowie die initiale Vorschrift zur Expression und Aufreinigung wurden von Proteros (Matinsried) erhalten.

Die Expression, Aufreinigung und Kristallisationsversuche von PPAR $\beta/\delta$  wurden in den Räumlichkeiten von Herrn Professor Klebe (Universität Marburg) durchgeführt.

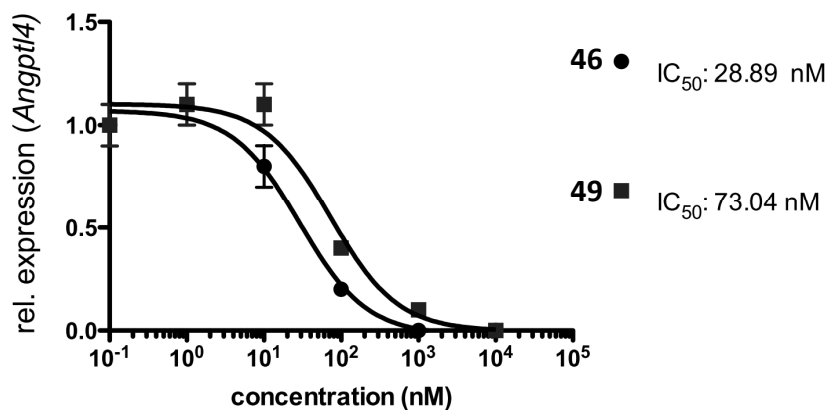
Proteinmassen wurden von der Massenabteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg angefertigt.

Die Kristallisationsscreenings wurden vom Marxtal Labor (Synmikro, Universität Marburg) angefertigt.

## 5.1 Ergänzende Daten



**Abbildung 5.1** Affinitäten von Verbindung 35. Gemessen wurde die Pan-PPAR-Green Verdrängung nach 30 min bei 1 bzw. 2 μM Ligandkonzentration.



**Abbildung 5.2** Relative Expression von ANGPTL4 in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration in Mausmyoblasten. Die RNA wurde mittels RT-qPCR nach 24 h ermittelt.



## 5.2 Chemie

Kommerziell erhältliche Reagenzien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung benutzt. Dünnschichtchromatographie wurde mit Silicagel Platten 60 F245 von Merck durchgeführt. Flashchromatographie wurde mit vorgepackten Säulen (4 g, 12 g, 25 g und 40 g mit 30  $\mu\text{m}$ ) von Interchim durchgeführt unter Verwendung eines Büchi Systems. Cyclohexan und *iso*Hexan wurden vor Benutzung destilliert.

### 5.2.1 Analytik

$^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden mit einem JEOL ECX-400 oder ECA-500 aufgenommen. Die Verschiebungen sind in ppm angegeben, als Referenz wurde das Lösungsmittelsignal verwendet ( $\text{CDCl}_3$ : s, 7.26 ppm [ $^1\text{H}$ ]; t, 77.1 ppm [ $^{13}\text{C}$ ];  $d_6$ -DMSO: quintett, 2.50 ppm [ $^1\text{H}$ ]; septett, 40.1 ppm [ $^{13}\text{C}$ ]). Peakmuster wurden wie folgt abgekürzt: s (singulett), d (doublett), t (triplett), q (quartett), qui (quintett), dd (doublett vom doublett), ddd (doublett vom doublett vom doublett), dt (doublett vom triplet), td (triplett vom doublett), m (multiplett), sm (symmetrisches multiplett), psd (pseudodoublett), dq (doublett vom quartet), bs (breites singulet). Das negative Vorzeichen der  $^nJ_{\text{C,F}}$ -Kopplungen ist nicht angegeben. Auftretende Signale von *E*-Isomeren und Rotameren sind nicht aufgelistet.

Massenspektren wurden mit einem 70-70H autospec Gerät von Micromass aufgenommen.

Elementaranalysen wurden mit einem Vario MICRO Cube von Elementar Analysensysteme GmbH erhalten.

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktmessgerät KSP1N von Krüss bestimmt und sind unkorrigiert.

## 5.2.2 Allgemeine Methoden

### Methode A zur Nitril-Aldol-Kondensation

Zu einer Lösung des entsprechenden Phenylacetonitrils (1 eq.) und dem korrespondierenden Benzaldehyd (1 eq.) in MeOH (0.6 M) wurde KOH (1 eq.) zugegeben und die angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Der auskristallisierte Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser und *iso*Hexan gewaschen, um das Produkt zu erhalten, welches im Vakuum getrocknet wurde.

### Methode B zur Nitril-Aldol-Kondensation

Zu einer Lösung des entsprechenden Phenylacetonitrils (1 eq.) und dem korrespondierenden Benzaldehyd (1 eq.) in MeOH (0.6 M) wurde Pyrrolidin (1 eq.) zugegeben und die angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Der auskristallisierte Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser und *iso*Hexan gewaschen um das Produkt zu erhalten, welches im Vakuum getrocknet wurde.

### Methode C zur Buchwald-Hartwig-Kupplung

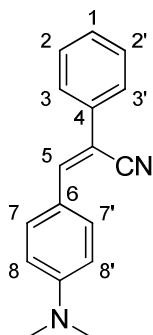
(*Z*)-3-(4-Bromphenyl)-2-phenylacrylnitril (**4**, 1 eq.) wurde in trockenem und entgastem Toluol (0.7 M) unter Argonatmosphäre gelöst. ( $\pm$ )-BINAP (0.075 eq.), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0.05 eq.), NaOtBu (1.5 eq.) und das entsprechende Amin (2 eq.) wurden hinzugefügt und die Suspension wurde die angegebene Zeit bei 80° C gerührt. Die Suspension wurde mit DCM verdünnt, über Celite abfiltriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie mit dem angegebenen Eluenten ergab das Produkt.

### Methode D zur reduktiven Aminierung

Zu einer Lösung von **48** (1 eq.) in THF (0.1 M) wurde das entsprechende Aldehyd (1.1 eq.) und nach 5 min NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.4 eq.) zugegeben. Nach 2 h wurde mit 0.5 mL 3 M NaOH-Lsg. gequench und die Lösung mit EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie mit dem angegebenen Eluenten ergab das Produkt als *E/Z*-Gemisch im Verhältnis des Edukts (siehe Abbildung 3.12, S. 37).

### 5.2.3 Verbindungen

(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenylacrylnitril (**2**)



Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als gelber Feststoff in 72 % Ausbeute (555 mg, 2.23 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-8/8'), 7.32 (dt, 1H, <sup>3</sup>J = 7.3, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz; H-1), 7.38–7.44 (m, 2H, H-2/2'), 7.41 (s, 1H, H-5), 7.62–7.65 (m, 2H, H-3/3'), 7.86 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 104.6 (C-CN), 111.8 (C-8/8'), 119.6 (CN), 121.8 (C-6), 125.5 (C-3/3'), 128.1 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.4 (C-7/7'), 135.7 (C-4), 142.7 (C-5), 151.7 (C-N)

MS (EI+):

m/z (%) = 248 (100, M<sup>+</sup>)

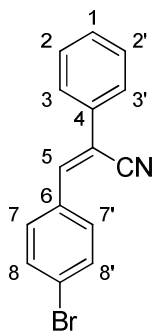
HRMS (EI+):

m/z	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	ber.: 248.13134	gef.: 248.131279
-----	--	-----------------	------------------

EA:	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	ber.:	C: 82.22	H: 6.49	N: 11.28
-----	--	-------	----------	---------	----------

		gef.:	C: 82.14	H: 6.54	N: 11.22
--	--	-------	----------	---------	----------

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 138 °C

**(Z)-3-(4-Bromphenyl)-2-phenylacrylnitril (4)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 20 % Ausbeute (177 mg, 0.62 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.39–7.48 (m, 4H, H-1+2/2'+5), 7.60 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.7$  Hz; H-8/8'), 7.65–7.68 (m, 2H, H-3/3'), 7.76 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.5$  Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$ (ppm) = 112.5 (C-CN), 117.8 (CN), 125.0 (C-Br), 126.1 (C-3/3'), 129.2 (C-2/2'), 129.6 (C-1), 130.7 (C-7/7'), 132.3 (C-8/8'), 132.7 (C-6), 134.2 (C-4), 140.8 (C-5)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 283/285 (95, M<sup>+</sup>), 204 (100, [M-Br]<sup>+</sup>)

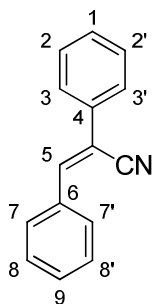
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: 282.999661 gef.: 282.997681

**EA:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: C: 63.40 H: 3.55 N: 4.93

gef.: C: 63.44 H: 3.79 N: 4.91

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 100 °C

**(Z)-2,3-Diphenylacrylnitril ( 5)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 49 % Ausbeute (507 mg, 2.47 mmol) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.38–7.50 (m, 6H, H-1+2/2'+8/8'+9), 7.55 (s, 1H, H-5), 7.68–7.70 (m, 2H, H-3/3'), 7.89–7.91 (m, 2H, H-7/7')

Die erhaltenen Daten stimmen mit den publizierten überein.

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 205 (100,  $\text{M}^+$ )

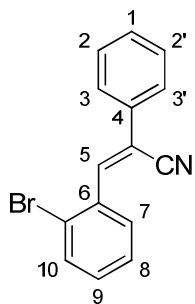
**HRMS** (EI+):

$m/z$      $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}$             ber.: 205.089149            gef.: 205.090917

**EA:**     $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}$             ber.:    C: 87.77            H: 5.40            N: 6.82

          gef.:    C: 87.72            H: 5.62            N: 6.89

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert):            85 °C

**(Z)-3-(2-Bromphenyl)-2-phenylacrylnitril (6)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 41 % Ausbeute (405 mg, 1.42 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.30 (dt, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz; H-1), 7.41–7.50 (m, 4H, H-2/2'+H-3/3'), 7.67 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-7), 7.71–7.74 (m, 2H, H-8+H-9), 7.84 (s, 1H, H-5), 8.07 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.8, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz; H-10)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 115.0 (C-CN), 117.3 (CN), 125.2 (C-Br), 126.4 (C-3/3'), 128.0 (C-9), 129.3 (C-2), 129.8 (C-7+8), 131.5 (C-1), 133.2 (C-10), 133.9 (C-4), 134.1 (C-6), 141.2 (C-5)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 283/285 (42, M<sup>+</sup>), 204 (100, [M-Br]<sup>+</sup>)

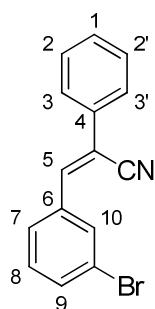
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: 282.999661 gef.: 283.000236

**EA:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: C: 63.40 H: 3.55 N: 4.93

gef.: C: 63.27 H: 3.66 N: 5.11

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 106 °C

**(Z)-3-(3-Bromphenyl)-2-phenylacrylnitril (7)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 27 % Ausbeute (268 mg, 0.94 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.35 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz; H-8), 7.40–7.49 (m, 4H, H-1+2/2'+5), 7.56 (dq, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0, <sup>4</sup>J = 0.9 Hz; H-9), 7.65–7.68 (m, 2H, H-3/3'), 7.89 (dq, 1H, <sup>3</sup>J = 7.8, <sup>4</sup>J = 0.9 Hz; H-7), 7.93 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz; H-10)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 113.4 (C-CN), 117.6 (CN), 123.1 (C-Br), 126.2 (C-3/3'), 127.4 (C-7), 129.3 (C-1), 129.7 (C-2/2'), 130.6 (C-8), 132.4 (C-10), 133.4 (C-9), 134.1 (C-4), 136.8 (C-6), 140.3 (C-5)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 283/285 (71, M<sup>+</sup>), 204 (100, [M-Br]<sup>+</sup>)

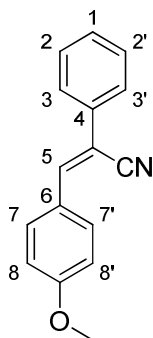
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: 282.999661 gef.: 283.001392

**EA:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN ber.: C: 63.40 H: 3.55 N: 4.93

gef.: C: 63.31 H: 3.85 N: 5.08

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 74 °C

**(Z)-3-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylacrylnitril (8)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 63 % Ausbeute (512 mg, 2.17 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.98 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.36–7.39 (sm, 1H, H-1), 7.41–7.45 (m, 2H, H-2/2'), 7.46 (s, 1H, H-5), 7.63–7.66 (m, 2H, H-3/3'), 7.89 (psd, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.5 Hz; 2H, H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 55.6 (CH<sub>3</sub>), 108.7 (C-CN), 114.5 (C-8/8'), 118.7 (CN), 125.9 (C-3/3'), 126.6 (C-6), 128.9 (C-1), 129.1 (C-2/2'), 131.3 (C-7/7'), 134.9 (C-4), 142.0 (C-5), 161.5 (C-OCH<sub>3</sub>)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 235 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

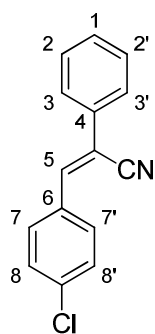
m/z C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO ber.: 235.099714 gef.: 235.103443

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO ber.: C: 81.68 H: 5.57 N: 5.95

gef.: C: 81.50 H: 5.64 N: 5.94

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 94 °C



**(Z)-3-(4-Chlorphenyl)-2-phenylacrylnitril (9)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 46 % Ausbeute (389 mg, 1.62 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.38–7.47 (m, 5H, H-1+2/2'+3/3'), 7.48 (s, 1H, H-5), 7.65–7.68 (m, 2H, H-8), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.5 Hz; H-7)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 112.3 (C-CN), 117.9 (CN), 126.1 (C-3/3'), 129.2 (C-1), 129.4 (C-2/2'), 129.6 (C-8/8'), 130.6 (C-7/7'), 132.3 (C-6), 134.2 (C-Cl), 136.5 (C-4), 140.7 (C-5)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 239 (93, M<sup>+</sup>), 204 (100, [M-Cl]<sup>+</sup>)

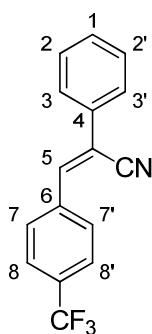
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN ber.: 241.047227 gef.: 241.047909

**EA:** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN ber.: C: 75.16 H: 4.21 N: 5.84

gef.: C: 74.82 H: 4.48 N: 5.94

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 101 °C

**(Z)-2-Phenyl-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)acrylnitril (10)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 1 h als farbloser Feststoff in 21 % Ausbeute (200 mg, 0.72 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.41–7.50 (m, 3H, H-1+H-2/2'), 7.57 (s, 1H, H-5), 7.68–7.74 (m, 4H, H-3/3'+8/8'), 7.98 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.5 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 114.6 (C-CN), 117.5 (CN), 123.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 271.6 Hz; CF<sub>3</sub>), 126.0 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz; C-8/8'), 126.3 (C-3/3'), 129.3 (C-1), 129.5 (C-2/2'), 129.9 (C-7/7'), 131.9 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 32.8 Hz; C-CF<sub>3</sub>), 133.9 (C-4), 137.1 (C-6), 140.2 (C-5)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 273 (100, M<sup>+</sup>), 204 (25, [M-CF<sub>3</sub>]<sup>+</sup>)

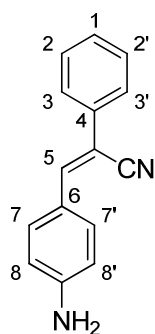
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N ber.: 273.076534 gef.: 273.077826

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N ber.: C: 70.33 H: 3.69 N: 5.13

gef.: C: 70.50 H: 4.09 N: 5.11

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 114 °C

**(Z)-3-(4-Aminophenyl)-2-phenylacrylnitril (11)**

Zu einer Lösung von 4-Nitrobenzaldehyd (655 mg, 4.33 mmol, 1 eq.) und Benzylcyanid (507 mg 4.33 mmol, 1 eq.) in MeOH/EtOAc (1:1, 10 ml) wurde KOH (243 mg, 4.33 mmol, 1 eq.) gegeben und für 6 h gerührt. EtOAc (20 ml), 37 %ige HCl (0.4 mL, 13.0 mmol, 3 eq.) sowie Sn(II)Cl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O (4.9 g, 21.6 mmol, 5 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 7 h unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wurde anschließend 3 mal mit Wasser gewaschen, danach mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., mit ges. NaCl-Lsg., über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Flashchromatographie (DCM) ergab die Titelverbindung als orangen Feststoff (256 mg, 1.16 mmol, 27 % Ausbeute).

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 5.97 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.62 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.5 Hz; H-8/8'), 7.29–7.34 (sm, 1H, H-1), 7.39–7.45 (m, 2H, H-2/2'), 7.60–7.64 (m, 2H, H-3/3'), 7.69 (s, 1H, H-5), 7.71 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 106.1 (C-CN), 114.8 (C-8/8'), 119.2 (CN), 124.1 (C-6), 125.7 (C-3/3'), 128.4 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.5 (C-7/7'), 135.4 (C-4), 142.6 (C-5), 149.1 (C-NH<sub>2</sub>)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 220 (57, M<sup>+</sup>)

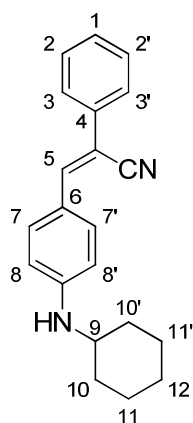
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub> ber.: 220.100048 gef.: 220.099022

**EA:**  $C_{15}H_{12}N_2$  ber.: C: 81.79 H: 5.49 N: 12.72

gef.: C: 81.72 H: 5.68 N: 12.66

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 146 °C

**(Z)-3-(4-(Cyclohexylamino)phenyl)-2-phenylacrylnitril (12)**

Die Titelverbindung wurde Methode C folgend (Eluent: *iso*Hexan/EtOAc, Gradient 20–50 % EtOAc) nach 15 h in 44 % Ausbeute (94 mg, 0.31 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.10–1.21 (m, 3H, H-11/11'+12), 1.27–1.39 (sm, 2H, H-11/11'), 1.53–1.61 (sm, 1H, H-12), 1.65–1.74 (sm, 2H, H-10/10'), 1.86–1.93 (sm, 2H, H-10/10'), 3.23–3.33 (sm, 1H, H-9), 6.40 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz; NH), 6.64 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.7 Hz; H-8/8'), 7.28–7.33 (sm, 1H, H-1), 7.39–7.45 (m, 2H, H-2/2'), 7.60–7.64 (m, 2H, H-3/3'), 7.69 (s, 1H, H-5), 7.74 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.7 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 25.0 (C-11/11'), 25.8 (C-12), 33.3 (C-10/10'), 51.4 (C-9), 104.5 (C-CN), 112.6 (C-8/8'), 119.6 (CN), 122.3 (C-6), 125.6 (C-3/3'), 128.1 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.7 (C-7/7'), 135.7 (C-4), 142.8 (C-5), 149.5 (C-N)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 302 (100, M<sup>+</sup>), 259 (59, [M-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

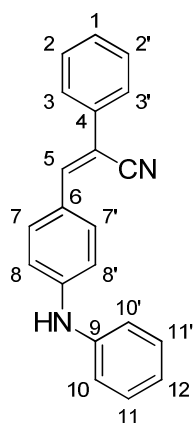
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: 302.178299 gef.: 302.178004

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 83.40 H: 7.33 N: 9.26

gef.: C: 83.27 H: 7.26 N: 9.10

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 122 °C

**(Z)-2-Phenyl-3-(4-(phenylamino)phenyl)acrylnitril (13)**

Die Titelverbindung wurde Methode C folgend (Eluent: *iso*Hexan/EtOAc, Gradient 20–50 % EtOAc) nach 13 h in 53 % Ausbeute (112 mg, 0.37 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.04–7.11 (m, 3H, H-8/8'+12), 7.17–7.21 (m, 2H, H-11/11'), 7.32–7.38 (m, 3H, H-1+10/10'), 7.40–7.45 (m, 3H, H-2/2'+5), 7.63–7.67 (m, 2H, H-3/3'), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 107.0 (C-CN), 115.7 (C-8/8'), 119.1 (CN), 120.2 (C-10/10'), 123.0 (C-12), 125.5 (C-6), 125.8 (C-3/3'), 128.6 (C-1), 129.2 (C-2/2'), 129.6 (C-11/11'), 131.4 (C-7/7'), 135.2 (C-4), 141.0 (C-9), 142.1 (C-5), 146.1 (C-N)

**MS** (EI+):

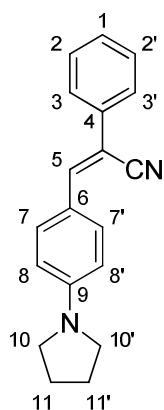
$m/z$  (%) = 296 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> ber.: 296.131349 gef.: 296.129489

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 85.11 H: 5.44 N: 9.45  
gef.: C: 84.78 H: 5.66 N: 9.19

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 162 °C

**(Z)-2-Phenyl-3-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)acrylnitril (14)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 24 h als gelber Feststoff in 45 % Ausbeute (142 mg, 0.51 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.01–2.07 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.40 (sm, 4H, H-10/10'), 6.58 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8'), 7.28–7.33 (sm, 1H, H-1), 7.37–7.43 (m, 3H, H-2/2'+5), 7.61–7.65 (m, 2H, H-3/3'), 7.86 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 25.6 (C-11/11'), 47.6 (C-10/10'), 103.4 (C-CN), 111.7 (C-8/8'), 119.8 (CN), 121.1 (C-6), 125.5 (C-3/3'), 127.9 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.6 (C-7/7'), 135.8 (C-4), 142.9 (C-5), 149.4 (C-9)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 274 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

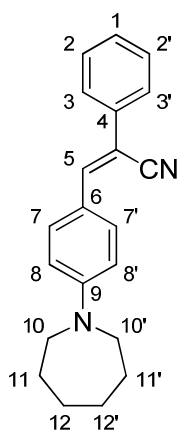
$m/z$  C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: 274.146999 gef.: 274.144312

**EA:** C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 83.18 H: 6.61 N: 10.21

gef.: C: 82.77 H: 6.64 N: 10.21

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 118 °C



**(Z)-3-(4-(Azepan-1-yl)phenyl)-2-phenylacrylnitril (15)**

Die Titelverbindung wurde Methode C folgend (Eluent: *iso*Hexan/DCM, 2:1) nach 18 h in 53 % Ausbeute (142 mg, 0.46 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.41–1.47 (sm, 4H, H-12/12'), 1.67–1.74 (m, 4H, H-11/11'), 3.49–3.54 (sm, 4H, H-10/10'), 6.78 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 9.2 Hz; H-8/8'), 7.29–7.34 (sm, 1H, H-1), 7.40–7.45 (m, 2H, H-2/2'), 7.62–7.66 (m, 2H, H-3/3'), 7.74 (s, 1H, H-5), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 27.0 (C-12), 27.2 (C-11/11'), 50.3 (C-10/10'), 104.5 (C-CN), 111.9 (C-8/8'), 119.6 (CN), 122.1 (C-6), 125.5 (C-3/3'), 128.1 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.7 (C-7/7'), 135.7 (C-4), 142.4 (C-5), 150.3 (C-9)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 302 (100, M<sup>+</sup>), 273 (55, [M-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 259 (28, [M-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 231 (14, [M-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>]<sup>+</sup>), 218 (16, [M-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>]<sup>+</sup>), 203 (26, [M-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

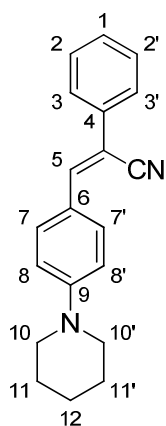
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: 302.178299 gef.: 302.177334

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 83.40 H: 7.33 N: 9.26

gef.: C: 83.15 H: 7.20 N: 9.18

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 87 °C

**(Z)-2-Phenyl-3-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)acrylnitril (16)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 3 d als gelber Feststoff in 77 % Ausbeute (234 mg, 0.81 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.6–1.76 (m, 6H, H-11/11'+12), 3.31–3.37 (m, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 7.8 Hz; H-8/8'), 7.30–7.35 (m, 1H, H-1), 7.38–7.44 (m, 3H, H-2/2'+5), 7.61–7.66 (m, 2H, H-3/3'), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 24.5 (C-12), 25.5 (C-11/11'), 48.9 (C-10/10'), 105.6 (C-CN), 114.5 (C-8/8'), 119.4 (CN), 123.2 (C-6), 125.6 (C-3/3'), 128.3 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.4 (C-7/7'), 135.5 (C-4), 142.4 (C-5), 152.8 (C-9)

MS (EI+):

m/z (%) = 288 (59, M<sup>+</sup>)

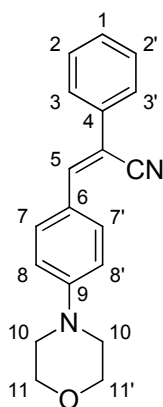
HRMS (EI+):

m/z C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub> ber.: 288.162649 gef.: 288.164001

EA: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 83.30 H: 6.99 N: 9.71

gef.: C: 83.23 H: 7.14 N: 9.81

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 128 °C

**(Z)-3-(4-Morpholinphenyl)-2-phenylacrylnitril (17)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 24 h als gelber Feststoff in 61 % Ausbeute (108 mg, 0.37 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.29 (sm, 4H, H-10/10'), 3.87 (sm, 4H, H-11/11'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.32–7.38 (m, 1H, H-1), 7.42 (s, 1H, H-5), 7.39–7.45 (m, 2H, H-2/2'), 7.62–7.66 (m, 2H, H-3/3'), 7.87 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (d<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 47.5 (C-10/10'), 66.4 (C-11/11'), 105.1 (C-CN), 114.4 (C-8/8'), 119.4 (CN), 124.0 (C-6), 125.8 (C-3/3'), 128.9 (C-1), 129.6 (C-2/2'), 131.4 (C-7/7'), 135.1 (C-4), 143.2 (C-5), 152.8 (C-9)

**MS** (EI+):

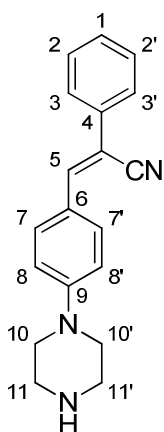
m/z (%) = 290 (100, M<sup>+</sup>), 232 (71, [M-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 204 (29, [M-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: 290.141913 gef.: 290.144040

**EA:** C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: C: 78.59 H: 6.25 N: 9.65  
gef.: C: 78.39 H: 6.33 N: 9.47

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 131 °C

**(Z)-2-Phenyl-3-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (18)**

(Z)-3-(4-Bromphenyl)-2-phenylacrylnitril (**4**) (100 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Toluol (2 ml) unter Argon-Atmosphäre gelöst. PtBu<sub>3</sub> (14.2 mg, 0.070 mmol, 0.2 eq.), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (16.1 mg, 0.018 mmol, 0.05 eq.), NaOtBu (101 mg, 1.06 mmol, 3 eq.) und Piperazin (182 mg, 2.11 mmol, 6 eq.) wurden zugegeben und die Suspension wurde 15 h bei 120 °C gerührt. DCM wurde zugegeben, über Celite filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (DCM/MeOH, 9:1) ergab die Titelverbindung als gelben Feststoff (53.1 mg, 0.18 mmol, 52 % Ausbeute).

<sup>1</sup>H-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.77–2.81 (sm, 4H, H-10/10'), 3.19–3.23 sm, 4H, H-11/11'), 6.99 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-8/8'), 7.31–7.37 (sm, 1H, H-1), 7.41–7.47 (m, 2H, H-2/2'), 7.64–7.68 (m, 2H, H-3/3'), 7.80 (s, 1H, H-5), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-7/7')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 45.9 (C-11/11'), 48.8 (C-10/10'), 106.5 (C-CN), 114.5 (C-8/8'), 119.1 (CN), 124.1 (C-6), 125.7 (C-3/3'), 128.4 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.2 (C-7/7'), 135.3 (C-4), 142.2 (C-5), 152.8 (C-9)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 289 (38, M<sup>+</sup>), 247 (100, [M-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

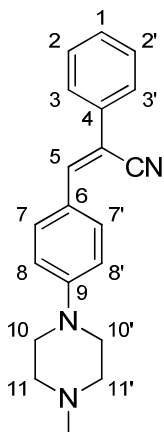
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub> ber.: 289.157898 gef.: 289.155945

**EA:**  $C_{19}H_{19}N_3 \cdot 0.5 H_2O$  ber.: C: 76.48 H: 6.76 N: 14.08

gef.: C: 76.59 H: 6.48 N: 14.21

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 139 °C

**(Z)-3-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenyl)-2-phenylacrylnitril (19)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 1 h als gelber Feststoff in 68 % Ausbeute (149 mg, 0.49 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.41 (t, 4H, <sup>3</sup>*J* = 5.0 Hz; H-10/10'), 3.30 (t, 4H, <sup>3</sup>*J* = 5.0 Hz; H-11/11'), 7.02 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 9.2 Hz; H-8/8'), 7.32–7.37 (sm, 1H, H-1), 7.41–7.47 (m, 2H, H-2/2'), 7.64–7.69 (m, 2H, H-3/2'), 7.81 (s, 1H, H-5), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 46.3 (CH<sub>3</sub>), 47.2 (C-10/10'), 54.9 (C-11/11'), 104.7 (C-CN), 114.5 (C-8/8'), 119.5 (CN), 123.5 (C-6), 125.7 (C-3/3'), 128.8 (C-1), 129.6 (C-2/2'), 131.5 (C-7/7'), 135.2 (C-4), 143.2 (C-5), 152.7 (C-9)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 303 (100, M<sup>+</sup>)

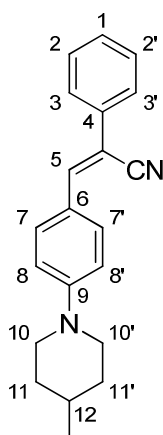
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub> ber.: 303.173548 gef.: 303.171852

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub> ber.: C: 79.17 H: 6.98 N: 13.85

gef.: C: 78.95 H: 7.01 N: 13.86

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 143 °C

**(Z)-3-(4-(4-Methylpiperidin-1-yl)phenyl)-2-phenylacrylnitril (20)**

Die Titelverbindung wurde Methode C folgend (Eluent: *iso*Hexan/DCM, 5:2) nach 23 h in 91 % Ausbeute (194 mg, 0.64 mmol) als gelber Feststoff hergestellt.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.98 (d, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz; 3H, CH<sub>3</sub>), 1.26–1.34 (sm, 2H, H-11/11'), 1.55–1.65 (sm, 1H, H-12), 1.73–1.75 (m, 2H, H-10/10'), 2.82–2.87 (m, 2H, H-11/11'), 3.84–3.86 (m, 2H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.31–7.34 (m, 1H, H-1), 7.40–7.42 (m, 2H, H-2/2'), 7.40 (s, 1H, H-5), 7.63–7.64 (m, 2H, H-3/3'), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 9.2 Hz; H-7/7')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 21.9 (CH<sub>3</sub>), 31.0 (C-12), 33.7 (C-11/11'), 48.3 (C-10/10'), 105.7 (C-CN), 114.5 (C-8/8'), 119.3 (CN), 123.2 (C-6), 125.6 (C-3/3'), 128.3 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 131.3 (C-7/7'), 135.5 (C-4), 142.4 (C-5), 152.6 (C-9)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 302 (100, M<sup>+</sup>), 204 (17, [M-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>)

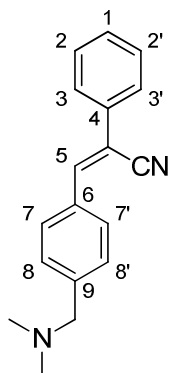
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: 302.178299 gef.: 302.178744

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 83.40 H: 7.33 N: 9.26

gef.: C: 83.20 H: 7.30 N: 8.81

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 120 °C

**(Z)-3-(4-((Dimethylamino)methyl)phenyl)-2-phenylacrylnitril Hydrochlorid (21)**

Zu einer Lösung von 4-((Dimethylamino)methyl)benzaldehyd (105 mg, 0.90 mmol) und Phenylacetonitril (105 mg, 0.90 mmol) in MeOH (2 ml) wurde KOH (50 mg, 0.90 mmol) gegeben und 24 Stunden bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc verdünnt und die organische Phase mit Wasser, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Flashchromatographie (*iso*Hexan/EtOAc, 2:1) ergab das Produkt, welches aus EtOAc mit HCl (5-6 M in Isopropanol) gefällt wurde (120 mg, 0.40 mmol, 45 % Ausbeute).

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.68 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 4.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.42–7.47 (sm, 1H, H-1), 7.48–7.54 (m, 2H, H-2/2'), 7.71–7.78 (m, 4H, H-3/3'+8/8'), 7.97 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.2 Hz; H-7/7'), 8.07 (s, 1H, H-5), 11.04 (bs, 1H, HCl)

**<sup>13</sup>C-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 42.1 (CH<sub>3</sub>), 59.4 (CH<sub>2</sub>), 111.9 (C-CN), 118.3 (CN), 126.4 (C-3/3'), 129.8 (C-1), 129.9 (C-7/7'), 130.1 (C-8/8'), 132.1 (C-2/2'), 133.3 (C-6), 134.1 (C-4), 135.2 (C-9), 142.6 (C-5)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 262 (58, M<sup>+</sup>), 218 (35, [M-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

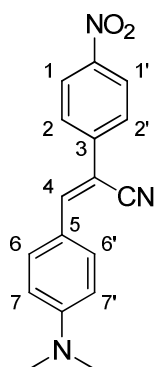
$m/z$  C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: 262.146999 gef.: 262.145737

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: C: 72.35 H: 6.41 N: 9.37



gef.: C: 71.86      H: 6.55      N: 9.14

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert):      über Zersetzungspunkt

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(4-nitrophenyl)acrylnitril (22)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend mit 2 eq. Pyrrolidin nach 10 min als dunkel lila Feststoff in 78 % Ausbeute (284 mg, 0.96 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.10 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.54 (s, 1H, H-4), 7.77 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-2/2'), 7.91 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-6/6'), 8.25 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-1/1')

**<sup>13</sup>C-NMR** (d<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 100.2 (C-CN), 112.2 (C-7/7'), 119.4 (CN), 120.8 (C-5), 124.8 (C-2/2'), 126.2 (C-1/1'), 132.6 (C-6/6'), 142.2 (C-3), 146.7 (C-NO<sub>2</sub>), 146.8 (C-4), 153.0 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 293 (100, M<sup>+</sup>), 263 (77, [M- (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 247 (29, [M-NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

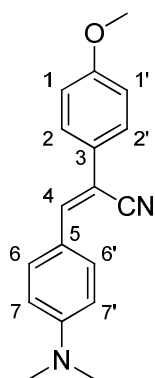
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ber.: 293.116427 gef.: 293.115855

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ber.: C: 69.61 H: 5.15 N: 14.33

gef.: C: 69.34 H: 5.24 N: 14.38

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 250 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(4-methoxyphenyl)acrylnitril (23)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 12 h als gelber Feststoff in 83 % Ausbeute (789 mg, 2.82 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.05 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.74 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 7.3 Hz; H-7/7'), 6.93 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-1/1'), 7.30 (s, 1H, H-4), 7.56 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-2/2'), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-6/6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (NCH<sub>3</sub>), 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 104.5 (C-CN), 111.8 (C-7/7'), 114.5 (C-1/1'), 119.7 (CN), 122.0 (C-5), 126.8 (C-2/2'), 128.2 (C-3), 131.0 (C-6/6'), 140.9 (C-4), 151.4 (C-O), 159.7 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 278 (100, M<sup>+</sup>), 263 (27, [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>)

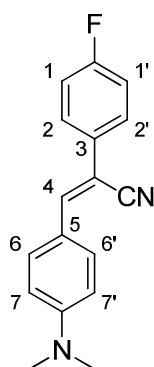
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: 278.141913 gef.: 278.144148

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: C: 77.67 H: 6.52 N: 10.06

gef.: C: 77.76 H: 6.61 N: 10.05

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 151 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(4-fluorophenyl)acrylnitril (24)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 2 d in 94 % Ausbeute (1.0 g, 3.7 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.06–7.13 (sm, 2H, H-1/1'), 7.32 (s, 1H, H-4), 7.56–7.61 (sm, 2H, H-2/2'), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-6/6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 103.4 (C-CN), 111.7 (C-7/7'), 116.0 (C-1/1', d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 22.2 Hz), 119.5 (CN), 121.5 (C-5), 127.3 (C-2/2', d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 8.7 Hz), 131.3 (C-6/6'), 131.9 (C-3, d, <sup>4</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.9 Hz), 142.6 (C-4), 151.8 (C-N), 162.6 (C-F, d, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 248.5 Hz)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 266 (100, M<sup>+</sup>)

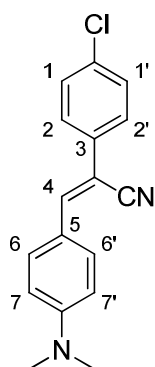
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub> ber.: 266.121927 gef.: 266.120746

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub> ber.: C: 76.67 H: 5.68 N: 10.52

gef.: C: 76.31 H: 5.75 N: 10.55

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 180 °C

(Z)-2-(4-Chlorphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylnitril (**25**)

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 10 min als gelber Feststoff in 49 % Ausbeute (327 mg, 1.15 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.74 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.35–7.38 (m, 3H, H-2/2'+4), 7.55 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-1/1'), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-6/6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 103.2 (C-CN), 111.7 (C-7/7'), 119.3 (CN), 121.4 (C-5), 126.7 (C-2/2'), 129.1 (C-1/1'), 131.5 (C-6/6'), 133.8 (C-3), 134.2 (C-Cl), 142.9 (C-4), 152.0 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 282 (100, M<sup>+</sup>), 203 (18, [M-Cl- N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

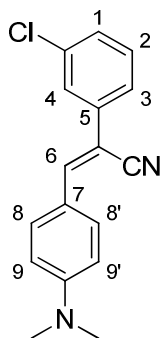
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: 282.092376 gef.: 282.093166

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: C: 72.21 H: 5.35 N: 9.91

gef.: C: 72.06 H: 5.37 N: 9.85

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 193 °C

**(Z)-2-(3-Chlorphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylnitril (26)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 2 h in 64 % Ausbeute (715 mg, 2.52 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.71 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-9/9'), 7.27 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0, <sup>4</sup>J = 1.8, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-1), 7.33 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz; H-2), 7.38 (s, 1H, H-6), 7.50 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.8, <sup>4</sup>J = 1.8, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-3), 7.60 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz; H-4), 7.86 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-8/8')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 102.8 (C-CN), 111.8 (C-9/9'), 119.2 (CN), 121.2 (C-7), 123.7 (C-3), 125.4 (C-4), 127.9 (C-1), 130.2 (C-8/8'), 131.7 (C-2), 135.0 (C-Cl), 137.6 (C-5), 143.6 (C-6), 152.0 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 283 (100, M<sup>+</sup>).

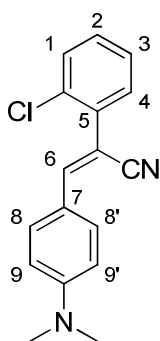
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: 282.092376 gef.: 282.090917

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: C: 72.21 H: 5.35 N: 9.91

gef.: C: 72.29 H: 5.46 N: 9.80

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 132 °C

**(Z)-2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylnitril (27)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 3 Tagen bei 60 °C als gelber Feststoff in 49 % Ausbeute (326 mg, 1.15 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.26–7.33 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.46 (m, 2H, H-1+4), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 101.8 (C-CN), 111.7 (C-9/9'), 119.0 (CN), 121.2 (C-7), 127.4 (C-3), 129.7 (C-4), 130.4 (C-2), 131.0 (C-1), 131.5 (C-8/8'), 133.2 (C-Cl), 135.6 (C-5), 148.4 (C-6), 152.0 (C-N)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 282 (100, M<sup>+</sup>), 203 (27, [M-Cl- N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

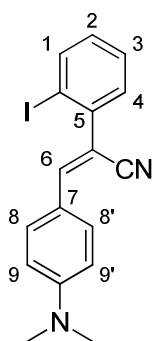
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: 282.092376 gef.: 282.094431

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub> ber.: C: 72.21 H: 5.35 N: 9.91

gef.: C: 72.30 H: 5.53 N: 9.77

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 99 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(2-iodophenyl)acrylnitril (28)**

Zu einer Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd (161 mg, 1.08 mmol, 1 eq.) und 2-Iodphenylacetonitril (263 mg, 1.08 mmol, 1 eq.) in MeOH (2 ml) wurde Pyrrolidin (145 mg, 1.08 mmol, 1 eq.) gegeben und 18 h bei 60 °C gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. sowie ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Flashchromatographie (*iso*Hexan/EtOAc, Gradient 0–30 % EtOAc) ergab die Titelverbindung als gelben Feststoff in 46 % Ausbeute (185 mg, 0.49 mmol).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-9/9'), 6.99 (s, 1H, H-6), 7.04 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.7, <sup>3</sup>J = 6.6, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz; H-3), 7.36–7.42 (m, 2H, H-2+4), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.91–7.94 (m, 1H, H-1)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 98.7 (C-CN), 111.7 (C-9/9'), 118.8 (CN), 121.0 (C-7), 128.7 (C-3), 129.9 (C-4), 130.5 (C-2), 131.4 (C-1), 132.1 (C-8/8'), 140.1 (C-5), 141.1 (C-I), 148.5 (C-6), 152.1 (C-N)

MS (EI+):

m/z (%) = 347 (100, M<sup>+</sup>)

HRMS (EI+):

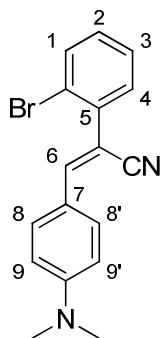
m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>2</sub> ber.: 374.028001 gef.: 374.024834

EA: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>2</sub> ber.: C: 54.56 H: 4.04 N: 7.49

gef.: C: 54.82 H: 4.16 N: 7.45



**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 134 °C

**(Z)-2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylnitril (29)**

Zu einer Lösung von 2-Bromphenylacetonitril (500  $\mu$ L, 3.85 mmol, 1 eq.) und 4-Dimethylaminobenzaldehyd (574 mg, 3.85 mmol, 1 eq.) in MeOH (5 ml) wurde Pyrrolidin (316  $\mu$ L, 3.85 mmol, 1 eq.) zugegeben und für 4 Tage bei 60 °C gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc verdünnt und die organische Phase mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (Cyclohexan/EtOAc, 3:1) ergab die Titelverbindung (618 mg, 1.88 mmol) in 49 % Ausbeute als gelben Feststoff.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.72 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-9/9'), 7.07 (s, 1H, H-6), 7.21 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.8, <sup>5</sup>J = 0.5 Hz; H-4), 7.35 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz; H-3), 7.41 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz; H-2), 7.64 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-1), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 103.5 (C-CN), 111.7 (C-9/9'), 118.9 (CN), 121.1 (C-7), 123.2 (C-Br), 127.9 (C-2), 129.8 (C-3), 131.2 (C-4), 131.4 (C-8/8'), 133.6 (C-1), 137.5 (C-5), 148.4 (C-6), 152.1 (C-N)

MS (EI+):

m/z (%) = 326/328 (100, M<sup>+</sup>), 203 (40, [M-Br-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

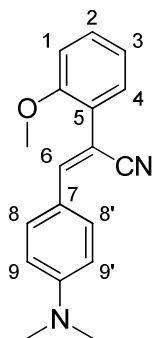
HRMS (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>2</sub> ber.: 328.039814 gef.: 328.042183

**EA:**  $C_{17}H_{15}BrN_2$  ber.: C: 62.40 H: 4.62 N: 8.56

gef.: C: 62.34 H: 4.79 N: 8.44

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 140 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(2-methoxyphenyl)acrylnitril (30)**

Zu einer Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd (304 mg, 2.04 mmol, 1 eq.) und 2-Methoxyphenylacetonitril (300 mg, 2.04 mmol, 1 eq.) in MeOH (4 ml) wurde Pyrrolidin (145 mg, 2.04 mmol, 1 eq.) zugegeben und die Lösung für 48 h bei 60° C gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc verdünnt, mit Wasser, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Flashchromatographie (*iso*Hexan/EtOAc/DCM, 8:1:1) ergab die Titelverbindung in 20 % Ausbeute (111 mg, 0.40 mmol).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.05 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.76 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 7.1 Hz; H-9/9'), 6.94 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.2, <sup>4</sup>J = 0.7 Hz; H-1), 6.99 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-3), 7.28 (s, 1H, H-6), 7.32 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.2, <sup>3</sup>J = 7.4, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz; H-2), 7.38 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz; H-4), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-8/8')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (N-CH<sub>3</sub>), 55.9 (O-CH<sub>3</sub>), 102.0 (C-CN), 111.5 (C-9/9'), 111.6 (C-1), 119.6 (CN), 121.0 (C-3), 122.1 (C-5), 125.9 (C-7), 129.7 (C-4), 129.9 (C-2), 131.2 (C-8/8'), 146.5 (C-6), 151.6 (C-N), 157.0 (C-O)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 278 (100, M<sup>+</sup>), 248 (13, [M - 2CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 147 (38, [Ph(OCH<sub>3</sub>)CCN]<sup>+</sup>)

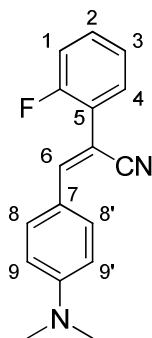
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: 278.141913 gef.: 278.140550

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: C: 77.67 H: 6.52 N: 10.06

gef.: C: 77.23      H: 6.44      N: 9.77

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert):      97 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(2-fluorophenyl)acrylnitril (31)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend mit 2 eq. Pyrrolidin nach 2 h in 74 % Ausbeute (568 mg, 2.13 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.06 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.71 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.2 Hz; H-9/9'), 7.12 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H,F</sub> = 11.2, <sup>3</sup>J = 8.2, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-1), 7.19 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz; H-3), 7.26–7.32 (sm, 1H, H-4), 7.42 (s, 1H, H-6), 7.54 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 7.8, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz; H-2), 7.86 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 98.7 (C-CN, d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 1.9 Hz), 111.6 (C-9/9'), 116.5 (C-1, d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 23.1 Hz), 119.3 (CN), 121.5 (C-7), 124.2 (C-5, d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 11.6 Hz), 124.6 (C-3, d, <sup>4</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.0 Hz), 129.6 (C-4, d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 8.7 Hz), 129.7 (C-6, d, <sup>4</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.0 Hz), 131.6 (C-8/8'), 147.4 (C-2, d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 7.8 Hz), 152.0 (C-N), 159.8 (C-F, d, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 250.4 Hz)

**MS** (EI+):

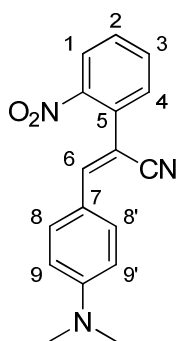
m/z (%) = 266 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub> ber.: 266.121927 gef.: 266.123324

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub> ber.: C: 76.67 H: 5.68 N: 10.52  
gef.: C: 76.57 H: 5.73 N: 10.50

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 106 °C

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(2-nitrophenyl)acrylnitril (32)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend mit 2 eq. Pyrrolidin nach 3 h in 92 % Ausbeute (5.0 g, 17.0 mmol) als oranger Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.07 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.74 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.04 (s, 1H, H-6), 7.49–7.55 (m, 2H, H-4+3), 7.62–7.67 (m, 1H, H-2), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.99–8.03 (sm, 1H, H-1)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 100.5 (C-CN), 111.6 (C-9/9'), 118.1 (CN), 121.0 (C-7), 125.2 (C-1), 129.4 (C-4), 131.6 (C-2), 131.9 (C-8/8'), 132.0 (C-5), 133.5 (C-3), 146.8 (C-6), 148.1 (C-NO<sub>2</sub>), 152.2 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 293 (38, M<sup>+</sup>), 148 (100, [Ph(NO<sub>2</sub>)CCH]<sup>+</sup>)

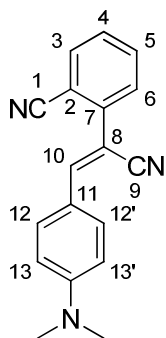
**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ber.: 293.116427 gef.: 293.118392

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ber.: C: 69.61 H: 5.15 N: 14.33

gef.: C: 69.26 H: 5.04 N: 14.26

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 166 °C

**(Z)-2-(1-Cyano-2-(4-(dimethylamino)phenyl)vinyl)benzonitril (33)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend mit 2 eq. Pyrrolidin nach 30 min in 83 % Ausbeute (321 mg, 1.17 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.07 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.73 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-13/13'), 7.41 (td, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz; H-4), 7.48 (s, 1H, H-10), 7.62–7.69 (m, 2H, H-3+5), 7.73 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.7, <sup>4</sup>J = 0.9 Hz; H-6), 7.89 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-12/12')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 99.8 (C-8), 110.4 (C-2), 111.6 (C-13/13'), 118.1 (C-1), 119.1 (C-9), 120.7 (C-11), 128.2 (C-6), 129.4 (C-4), 132.1 (C-12/12'), 133.2 (C-3), 134.5 (C-5), 140.0 (C-7), 148.9 (C-10), 152.5 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 273 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

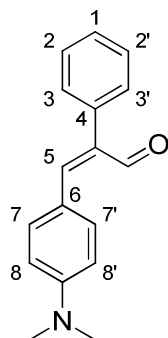
m/z C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> ber.: 273.12659 gef.: 273.126551

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> ber.: C: 79.10 H: 5.53 N: 15.37

gef.: C: 79.17 H: 5.57 N: 15.38

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 160 °C



(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenylacrylaldehyd (**34**)

Zu einer Lösung von Verbindung **2** (500 mg, 2.0 mmol, 1 eq.) in trockenem Toluol (20 ml) wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  DIBAL (1.5 M in Toluol, 2.7 mL, 4.0 mmol, 2 eq.) so zugetropft, dass die Temperatur unter  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  blieb und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung langsam auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und es wurden nacheinander langsam 0.5 ml Wasser/THF (1:1), 1.1 ml Et<sub>2</sub>O, 0.9 ml ges. Natrium-Kaliumtartrat-Lösung und 0.4 ml ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lsg. zugegeben. Nach weiteren 2 h wurde die Reaktionslösung mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (*iso*Hexan/DCM, 1:1) ergab die Titelverbindung als gelben Feststoff in 52 % Ausbeute (261 mg, 1.04 mmol).

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.89 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.52 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.02 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.20–7.24 (m, 2H, H-3/3'), 7.28 (s, 1H, H-5), 7.33–7.45 (m, 3H, H-1+2/2'), 9.66 (s, 1H, CHO)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 111.4 (C-8/8'), 121.8 (C-6), 127.9 (C-1), 129.0 (C-2/2'), 129.7 (C-3/3'), 133.1 (C-7/7'), 134.9 (C-4+C-CO), 137.5 (C-N), 151.7 (C-5), 193.8 (CO)

**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 274 (100, [M+Na]<sup>+</sup>).

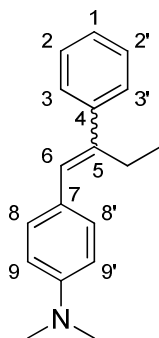
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO ber.: 251.131014 gef.: 251.130648

**EA:**  $C_{17}H_{17}NO$  ber.: C: 81.24 H: 6.82 N: 5.57

gef.: C: 80.97 H: 6.97 N: 5.67

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 136 °C

*N,N*-Dimethyl-4-(2-phenylbut-1-en-1-yl)anilin (**35**)

Zu einer Lösung von But-1-en-2-yl-benzol (150 mg, 1.13 mmol, 1 eq.), 4-Brom-*N,N*-dimethylanilin (568 mg, 2.84 mmol, 2.5 eq.),  $\text{NEt}_3$  (638  $\mu\text{L}$ , 4.54 mmol, 4 eq.) und  $\text{PtBu}_3$  (69  $\mu\text{L}$ , 0.28 mmol, 0.25 eq.) in trockenem DMF (5 mL) wurde  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (25.5 mg, 0.11 mmol, 0.1 eq.) zugegeben und für 3 d bei 120 °C gerührt. Die Lösung wurde mit DCM verdünnt, über Celite filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (Cyclohexan/EtOAc, Gradient 0–15 % EtOAc) ergab die Titelverbindung als leicht gelbes Öl (112 mg, 0.44 mmol, 39 % Ausbeute) als *E/Z*-Gemisch (1:1).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.04/1.10 (t,  $^3J = 7.6$  Hz; 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.47/2.79 (q,  $^3J = 7.5$  Hz; 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.86/2.98 (s, 6H,  $\text{NCH}_3$ ), 6.32/6.62 (s, 1H, H-6), 6.46/6.80 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; 2H, H-9/9'), 6.74/7.26 (psd,  $^3J + ^5J = 8.7$  Hz; 2H, H-8/8'), 7.18–7.37 (m, 3+3H, H-2/2'+1), 7.31–7.33/7.45–7.48 (m, 2H, H-3/3')

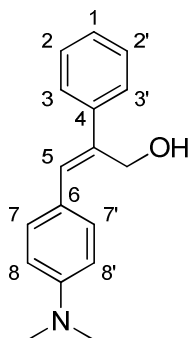
**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 251 (62,  $\text{M}^+$ ), 236 (100,  $[\text{M}-\text{Me}]^+$ ).

**HRMS** (EI+):

$m/z$	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}$	ber.: 251.167400	gef.: 251.164497
-------	--------------------------------------	------------------	------------------

<b>EA:</b>	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}$	ber.: C: 86.01	H: 8.42	N: 5.57
		gef.: C: 85.69	H: 8.48	N: 5.81

**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenylprop-2-en-1-ol (36)**

Verbindung **34** (100 mg, 0.4 mmol) und  $\text{CeCl}_3$  (98 mg, 0.4 mmol) wurden bei  $0^\circ\text{C}$  in MeOH (3 mL) gelöst und anschließend wurde  $\text{NaBH}_4$  (15 mg, 0.4 mmol) zugegeben. Nach 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  wurde mit EtOAc verdünnt und die organische Phase erst mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. dann mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und abfiltriert. Flashchromatographie (DCM, dann DCM/MeOH, 19:1) ergab das Produkt (89 mg, 0.35 mmol) in 89 % Ausbeute als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $21^\circ\text{C}$ , 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.53 (t,  $^3J = 6.4$  Hz; 1H, OH), 2.88 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 4.43 (dd,  $^4J = 0.9$   $^3J = 6.2$  Hz; 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.47 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; 2H, H-8/8'), 6.57 (s, 1H, H-5), 6.88 (psd,  $^3J + ^5J = 8.7$  Hz; 2H, H-7/7'), 7.26–7.31 (m, 3H, H-2/2'+1), 7.33–7.37 (m, 2H, H-3/3')

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $21^\circ\text{C}$ , 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.4 ( $\text{CH}_3$ ), 69.4 ( $\text{CH}_2$ ), 111.8 (C-8/8'), 124.5 (C-6), 127.2 (C-5), 127.3 (C-1), 128.9 (C-2/2'), 129.0 ( $\text{CCH}_2$ ), 130.3 (C-3/3'), 137.4 (C-7/7'), 139.5 (C-4), 149.4 (C-N)

**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 254 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 276 (23,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

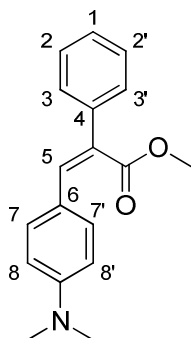
**HRMS** (EI+):

$m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}$  ber.: 253.146664 gef.: 253.147342

**EA:**  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}$  ber.: C: 80.60 H: 7.56 N: 5.53

gef.: C: 80.36 H: 7.50 N: 5.63

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 112 °C

**(Z)-Methyl 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-2-phenylacrylat (37)**

Verbindung **34** (50 mg, 0.20 mmol, 1 eq.), AcOH (28.7  $\mu$ L, 0.50 mmol, 2.5 eq.) und KCN (65 mg, 1.00 mmol, 5 eq.) wurden in MeOH (5 mL) gelöst. Nach 1 h Rühren wurde MnO<sub>2</sub> (aktiviert, 87 mg, 4.0 mmol, 2 eq.) zugegeben und weitere 17 h gerührt. Die Suspension wurde mit DCM verdünnt und über Celite abfiltriert. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um das Produkt (42 mg, 0.15 mmol) in 75 % Ausbeute als gelben Feststoff zu erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.93 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.46 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.5 Hz; H-8/8'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.23–7.25 (m, 2H, H-2/2'), 7.33–7.42 (m, 3H, H-1+3/3'), 7.79 (s, 1H, H-5)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (CH<sub>3</sub>), 52.2 (OCH<sub>3</sub>), 111.4 (C-8/8'), 122.3 (C-6), 127.0 (C-1), 127.5 (C-2/2'), 128.8 (C-3/3'), 130.1 (C-7/7'), 132.6 (CCO), 137.3 (C-4), 141.3 (C-5), 150.8 (C-N), 169.1 (CO)

MS (ESI+):

m/z (%) = 282 (100, [M+H]<sup>+</sup>)

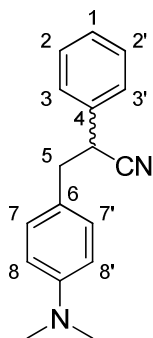
HRMS (EI+):

m/z C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> ber.: 281.141579 gef.: 281.138642

EA: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> ber.: C: 76.84 H: 6.81 N: 4.98

gef.: C: 76.48 H: 6.89 N: 4.86

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 99 °C

3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenylpropannitril (**38**)

Zu einer Lösung von **2** (500 mg, 2.01 mmol) in EtOAc (25 mL) wurde eine Spatelspitze Pd/C (10% w/w) gegeben und unter Wasserstoffatmosphäre (Balondruck) über Nacht gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Filtrat einkonzentriert um die Titelverbindung als farblosen Feststoff in fast quantitativer Ausbeute (500 mg, 2.00 mmol) zu erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.93 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.04 (dd, <sup>3</sup>J = 6.4, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz; 1H, H-5), 3.10 (dd, <sup>3</sup>J = 8.2, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz; 1H, H-5), 3.94 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 6.4, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz; CH-CN), 6.67 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 7.3 Hz; H-8/8'), 7.01 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-7/7'), 7.25–7.39 (m, 5H, H-1+2/2'+3/3')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.4 (CH<sub>3</sub>), 40.7 (C-5), 41.6 (C-CN), 112.7 (C-8/8'), 120.9 (CN), 124.2 (C-6), 127.7 (C-1), 128.1 (C-2/2'), 129.1 (C-3/3'), 130.1 (C-7/7'), 135.8 (C-4), 150.0 (C-N)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 250 (7, M<sup>+</sup>), 134 (100, [CH<sub>2</sub>PhNMe<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

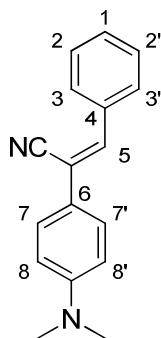
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: 250.146999 gef.: 250.148003

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 81.56 H: 7.25 N: 11.19  
gef.: C: 81.39 H: 7.10 N: 11.03

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 86 °C



**(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-3-phenylacrylnitril (39)**

Die Titelverbindung wurde Methode A folgend nach 20 min in 8 % Ausbeute (50 mg, 0,20 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.03 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 7.76 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.0 Hz; H-8/8'), 7.35–7.47 (m, 4H, H-1+2/2'+5), 7.57 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-7/7'), 7.82–7.86 (m, 2H, H-3/3')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.4 (CH<sub>3</sub>), 111.8 (C-CN), 112.5 (C-8/8'), 118.6 (CN), 122.1 (C-6), 127.0 (C-1), 128.9 (C-7/7'), 129.0 (C-2/2'), 129.7 (C-3/3'), 134.6 (C-4), 137.4 (C-5), 151.0 (C-N)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 248 (100, M<sup>+</sup>), 204 (13, [M-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

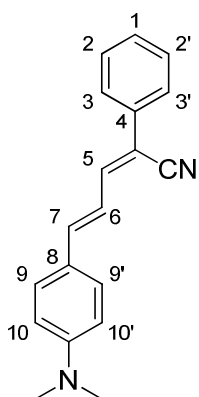
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> ber.: 248.131349 gef.: 248.131605

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> ber.: C: 82.22 H: 6.49 N: 11.28

gef.: C: 81.95 H: 6.63 N: 10.92

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 141 °C

**(2Z,4E)-5-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-phenylpenta-2,4-dienenitril (40)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 4 h als oranger Feststoff in 16 % Ausbeute (327 mg, 1.15 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.03 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.70 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 9.0 Hz; H-10/10'), 6.94 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 15.1 Hz; H-7), 7.20 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 15.1, <sup>3</sup>J = 11.2 Hz; H-6), 7.28–7.34 (sm, 1H, H-1), 7.37–7.42 (m, 3H, H-2/2'+5), 7.45 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-9/9'), 7.58–7.62 (m, 2H, H-3/3')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.4 (CH<sub>3</sub>), 109.3 (C-CN), 112.1 (C-10/10'), 117.9 (CN), 120.8 (C-3/3'), 123.9 (C-8), 125.5 (C-1), 128.4 (C-6), 129.1 (C-2/2'), 129.3 (C-9/9'), 134.0 (C-4), 142.3 (C-7), 143.2 (C-5), 151.4 (C-N)

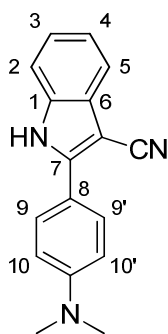
**MS** (EI+):

m/z (%) = 274 (100, M<sup>+</sup>), 197 (31, [M-Ph]<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> ber.: 274.146999 gef.: 274.146448

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 187 °C

2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1*H*-indole-3-carbonitril (**41**)

Zu einer Lösung von **32** (300 mg, 1.02 mmol) in Toluol (8 mL) wurde Triethylphosphit (677 mg, 4.08 mmol, 4 eq.) gegeben und 60 h bei 150 °C gerührt. Nach Adsorption auf Kieselgel wurde die Titelverbindung mittels Flashchromatographie (*iso*Hexan/EtOAc, 3:1) als farbloser Feststoff in 55 % Ausbeute (147 mg, 0.56 mmol) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.98 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.86 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-10/10'), 7.14–7.23 (sm, 2H, H-3+4), 7.43–7.46 (m, 1H, H-2), 7.50–7.53 (m, 1H, H-5), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-9/9'), 12.19 (s, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.2 (CH<sub>3</sub>), 81.1 (C-CN), 111.5 (C-2), 112.2 (C-10/10'), 116.6 (C-7), 118.2 (CN), 119.0 (C-3), 122.1 (C-5), 123.5 (C-4), 127.9 (C-9/9'), 129.3 (C-8), 135.0 (C-6), 146.4 (C-1), 151.3 (C-N)

**MS** (EI+):

*m/z* (%) = 261 (59, M<sup>+</sup>)

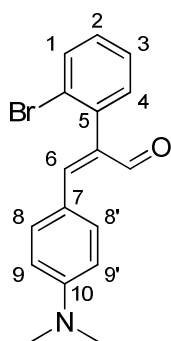
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> ber.: 261.126598 gef.: 261.127753

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> ber.: C: 78.13 H: 5.79 N: 16.08

gef.: C: 77.86 H: 5.78 N: 15.73

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 200 °C

**(Z)-2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylaldehyd (43)**

Zu einer Lösung von **29** (618 mg, 1.9 mmol, 1 eq.) in trockenem THF wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  DIBAL (1.5 M in Toluol, 7 ml, 10.5 mmol, 5.5 eq) so zugegeben, dass die Temperatur unter  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  blieb und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung langsam auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und es wurden nacheinander langsam 1.4 ml Wasser/THF (1:1), 2.9 ml Diethylether, 2.4 ml ges. Natrium-Kaliumtartrat-Lösung und 0.9 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben. Nach weiteren 2 h wurde die Reaktionslösung mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (erst DCM, dann Cyclohexan/EtOAc, 2:1) ergab die Titelverbindung als gelbes Wachs (414 mg, 1.3 mmol, 66 % Ausbeute).

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.98 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 6.51 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9\text{ Hz}$ ; H-9/9'), 7.02 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9\text{ Hz}$ ; H-8/8'), 7.14–7.16 (sm, 1H, H-2), 7.24–7.28 (m, 1H, H-3), 7.36–7.40 (m, 1H, H-4), 7.38 (s, 1H, H-6), 7.70 (d, 1H, H-1), 9.64 (s, 1H, CHO)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.0 ( $\text{CH}_3$ ), 111.6 (C-9/9'), 121.6 (C-Br), 124.2 (C-7), 128.1 (C-2), 129.7 (C-3), 131.4 (C-4), 133.0 (C-8/8'), 133.2 (C-1), 136.4 (C-6), 136.7 (C-5), 151.7 (C-CHO), 151.9 (C-N), 192.6 (CHO)

**MS** (ESI+):

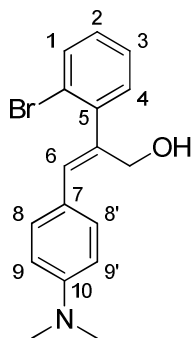
$m/z$  (%) = 330 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**HRMS** (EI+):

$m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrNO}$  ber.: 329.041525 gef.: 329.041491

---

**EA:**  $C_{17}H_{16}BrNO$  ber.: C: 61.83 H: 4.88 N: 4.24  
gef.: C: 61.71 H: 5.06 N: 4.12

**(Z)-2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-en-1-ol (44)**

Zu einer Lösung von **43** (150 mg, 0.45 mmol) und  $\text{CeCl}_3$  (123 mg, 0.5 mmol, 1.1 eq) in MeOH (3 ml) wurde bei 0 °C  $\text{NaBH}_4$  (20 mg, 0.5 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Nach 30 min wurde die Lösung mit EtOAc verdünnt und nacheinander mit Wasser, ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. sowie ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (DCM) ergab die Titelverbindung als leicht gelben Feststoff (54 mg, 0.16 mmol, 36 % Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.88 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 4.38–4.45 (sm, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.48 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.5$  Hz; H-9/9'), 6.65 (s, 1H, H-6), 6.81 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8'), 7.18–7.22 (m, 2H, H-2+3), 7.30–7.34 (sm, 1H, H-4), 7.65–7.67 (m, 1H, H-1)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.4 ( $\text{CH}_3$ ), 68.5 ( $\text{CH}_2$ ), 112.0 (C-9/9'), 123.8 (C-Br), 124.2 (C-7), 128.1 (C-2), 128.6 (C-3), 129.0 (C-6), 129.9 (C-4), 131.4 (C-8/8'), 133.1 (C-1), 136.0 (C- $\text{CH}_2$ ), 140.5 (C-5), 149.6 (C-N)

**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 332 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

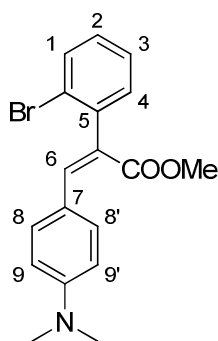
**HRMS** (EI+):

$m/z$      $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}$     ber.: 331.057175    gef.: 331.060107

**EA:**     $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}$     ber.:    C: 61.46    H: 5.46    N: 4.22

gef.:    C: 61.61    H: 5.53    N: 4.12

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 95 °C

**(Z)-Methyl 2-(2-bromphenyl)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylat (45)**

Zu einer Lösung von **43** (150 mg, 0.45 mmol) in MeOH (10 ml) wurde HOAc (1.14 mmol, 65  $\mu$ l, 2.5 eq) und KCN (148 mg, 2.27 mmol, 5 eq) gegeben und 1 h gerührt. Danach wurde MnO<sub>2</sub> (aktiviert, 790 mg, 9.08 mmol, 20 eq) zugegeben und für weitere 12 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc verdünnt und nacheinander mit Wasser, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. sowie ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um die Titelverbindung als gelben Feststoff zu erhalten (155 mg, 0.43 mmol, 96 % Ausbeute).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.93 (s, 6H, N-CH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 6.46 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-9/9'), 6.89 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8'), 7.20–7.26 (m, 2H, H-2+3), 7.32–7.35 (m, 1H, H-4), 7.69 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz; H-1), 7.84 (s, 1H, H-6)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.1 (N-CH<sub>3</sub>), 52.3 (COOCH<sub>3</sub>), 111.6 (C-9/9'), 121.9 (C-Br), 125.0 (C-7), 126.0 (C-COOCH<sub>3</sub>), 128.0 (C-2), 129.3 (C-3), 131.7 (C-4), 132.5 (C-8/8'), 133.0 (C-1), 138.6 (C-5), 142.0 (C-6), 151.1 (C-N), 168.1 (COOCH<sub>3</sub>)

MS (ESI+):

m/z (%) = 360 (100, [M+H]<sup>+</sup>)

HRMS (EI+):

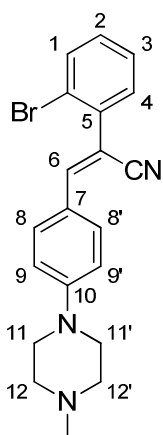
m/z C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>2</sub> ber.: 359.052090 gef.: 359.051043



**EA:**  $C_{18}H_{18}BrNO_2$  ber.: C: 60.01 H: 5.04 N: 3.89

gef.: C: 60.11 H: 5.19 N: 3.92

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 134 °C

**(Z)-2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril Dihydrochlorid (46)**

Zu einer Lösung von 2-Bromphenylacetonitril (480 mg, 2.45 mmol, 1 eq.) und 4-(4-Methylpiperazino)benzaldehyd (500 mg, 2.45 mmol, 1 eq.) in MeOH (4 ml) wurde Pyrrolidin (174 mg, 2.45 mmol, 1 eq.) gegeben und für 48 h bei 60 °C gerührt. Die Lösung wurde auf Kieselgel adsorbiert und Flashchromatographie (DCM/MeOH, 49:1) ergab die Titelverbindung welche mit HCl (5–6 M in *i*PrOH) aus EtOAc als farbloses Salz (Dihydrochlorid) gefällt wurde (806 mg, 1.93 mmol, 79 % Ausbeute).

**<sup>1</sup>H-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.76 (d, 3H,  $^3J = 4.6$  Hz; CH<sub>3</sub>), 3.04–3.13 (sm, 2H, H-11/11'), 3.22–3.29 (sm, 2H, H-12/12'), 3.43–3.46 (sm, 2H, H-11/11'), 4.01–4.05 (sm, 2H, H-12/12'), 7.11 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-9/9'), 7.35 (dt, 1H,  $^3J = 7.7$ ,  $^4J = 1.8$  Hz; H-2), 7.36 (s, 1H, H-6), 7.47 (dt, 1H,  $^3J = 7.4$ ,  $^4J = 1.1$  Hz; H-3), 7.52 (dd, 1H,  $^3J = 7.6$ ,  $^4J = 1.8$  Hz; H-4), 7.72 (dd, 1H,  $^3J = 8.0$ ,  $^4J = 0.9$  Hz; H-1), 7.85 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8'), 9.44 (bs, 1H, HCl), 11.16 (bs, 1H, HCl)

**<sup>13</sup>C-NMR** (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 42.4 (CH<sub>3</sub>), 44.6 (C-11/11'), 52.1 (C-12/12'), 105.3 (C-CN), 115.3 (C-9/9'), 118.5 (CN), 122.8 (C-Br), 124.2 (C-7), 129.1 (C-2), 131.3 (C-3), 131.4 (C-8/8'), 132.1 (C-4), 133.7 (C-1), 136.9 (C-5), 148.6 (C-6), 151.7 (C-10)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 381/383 (100, M<sup>+</sup>), 203 (72, [M-Br-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>)

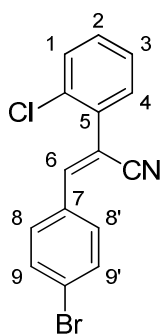
**HRMS (EI+):**

m/z C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub> ber.: 381.084059 gef.: 381.087401

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub> ber.: C: 52.77 H: 4.87 N: 9.23

gef.: C: 52.60 H: 5.02 N: 9.30

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): über Zersetzungstemperatur

**(Z)-3-(4-Bromphenyl)-2-(2-chlorphenyl)acrylnitril (47)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 31 h bei 60 °C in 81 % Ausbeute (2.0 g, 6.2 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.21 (s, 1H, H-6), 7.32–7.38 (sm, 2H, H-2+3), 7.7.42–7.48 (sm, 2H, H-1+4), 7.60 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.6 Hz; H-9/9'), 7.76 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.3 Hz; H-8/8')

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 109.8 (C-CN), 117.2 (CN), 125.5 (C-Br), 127.6 (C-3), 130.6 (C-9/9'), 130.7 (C-4), 130.8 (C-8/8'), 130.9 (C-2), 132.2 (C-Cl), 132.4 (C-1), 133.1 (C-7), 134.2 (C-5), 146.9 (C-6)

**MS** (EI+):

$m/z$  (%) = 317 (90, M<sup>+</sup>), 203 (100, [M-Cl-Br]<sup>+</sup>)

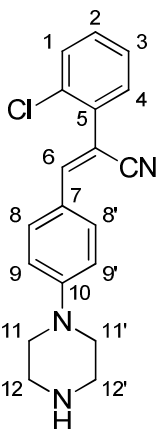
**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>BrClN ber.: 316.960688 gef.: 316.961123

**EA:** C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>BrClN ber.: C: 56.55 H, 2.85 N, 4.40

gef.: C: 56.63 H: 3.00 N: 4.32

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 137 °C

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**48**)

Verbindung **47** (1000 mg, 3.14 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Toluol (10 ml) unter Argon-Atmosphäre gelöst.  $\text{PtBu}_3$  (76  $\mu\text{L}$ , 0.31 mmol, 0.1 eq.),  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (72 mg, 0.078 mmol, 0.025 eq.),  $\text{NaOtBu}$  (905 mg, 9.42 mmol, 3 eq.) und Piperazin (1622 mg, 18.83 mmol, 6 eq.) wurden zugegeben und die Suspension wurde 90 min bei 80 °C gerührt. DCM wurde zugegeben, über Celite filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (DCM/MeOH, Gradient 0–10 % MeOH) ergab die Titelverbindung als gelbes Öl (549 mg, 1.69 mmol, 54 % Ausbeute) als *E/Z*-Gemisch (1:3–1:10).

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.84–2.87 (m, 4H, H-12/12'), 3.26–3.29 (m, 4H, H-11/11'), 7.01 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 9.2$  Hz; H-9/9'), 7.36 (s, 1H, H-6), 7.41–7.45 (m, 2H, H-2+3), 7.52–7.56 (m, 2H, H-1+4), 7.82 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8')

**MS** (EI+):

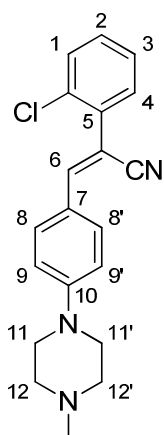
$m/z$  (%) = 323 (41,  $\text{M}^+$ ), 289 (14,  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ ), 281 (100,  $[\text{M}-\text{N}(\text{CH}_2)_2]^+$ ), 247 (34,  $[\text{M}-\text{Cl}-\text{N}(\text{CH}_2)_2]^+$ ), 203 (24,  $[\text{M}-\text{Cl}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}]^+$ )

**HRMS** (EI+):

$m/z$   $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3$  ber.: 325.115975 gef.: 325.116546

**EA:**  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$  ber.: C: 68.57 H: 5.75 N: 12.63

gef.: C: 68.72 H: 5.71 N: 12.26

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril Dihydrochlorid (**49**)

Zu einer Lösung von 2-Chlorphenylacetonitril (149 mg, 0.98 mmol, 1 eq.) und 4-(4-Methylpiperazino)benzaldehyd (200 mg, 2.45 mmol, 1 eq.) in MeOH (1.5 ml) wurde Pyrrolidin (70 mg, 0.98 mmol, 1 eq.) gegeben und für 50 h bei 60 °C gerührt. Die Lösung wurde auf Kieselgel adsorbiert und Flashchromatographie (DCM/MeOH, Gradient 0–25 % MeOH) ergab die Titelverbindung welche mit HCl (5–6 M in *i*PrOH) aus EtOAc als farbloses Salz (Dihydrochlorid) gefällt wurde (181 mg, 0.44 mmol, 45 % Ausbeute).

<sup>1</sup>H-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.77 (d, 3H,  $J = 4.8$  Hz; CH<sub>3</sub>), 3.03–3.15 (sm, 2H, H-12/12'), 3.22–3.31 (sm, 2H, H-12/12'), 3.41–3.49 (sm, 2H, H-11/11'), 4.00–4.08 (sm, 2H, H-11/11'), 7.12 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 9.2$  Hz; H-9/9'), 7.41–7.47 (m, 3H, H-2+3+6), 7.52–7.58 (m, 2H, H-1+4), 7.86 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 9.2$  Hz; H-8/8'), 11.20 (bs, 1H, HCl)

<sup>13</sup>C-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 42.4 (CH<sub>3</sub>), 44.6 (C-11/11'), 52.1 (C-12/12'), 103.5 (C-CN), 115.3 (C-9/9'), 118.6 (CN), 124.2 (C-7), 128.6 (C-3), 130.5 (C-4), 131.1 (C-2), 131.4 (C-8/8'), 132.0 (C-1), 132.4 (C-Cl), 135.0 (C-5), 148.8 (C-6), 151.7 (C-10)

MS (EI+):

$m/z$  (%) = 337 (100, M<sup>+</sup>)

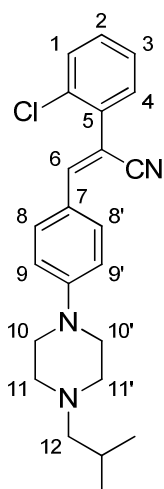
HRMS (EI+):

$m/z$  C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 337.134576 gef.: 337.134666

**EA:**  $C_{20}H_{20}ClN_3$  ber.: C: 71.10 H: 5.97 N: 12.44

gef.: C: 70.13 H: 5.97 N: 12.07

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): über Zersetzungspunkt

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-isobutylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**50**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 15 % Ausbeute (18 mg, 0.05 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:4.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.93 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz; CH<sub>3</sub>), 1.75–1.87 (sm, 1H, CH), 2.14 (d, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz; 2H, H-12), 2.53–2.55 (sm, 4H, H-11/11'), 3.33–3.35 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; 2H, H-9/9'), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.28–7.33 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.46 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

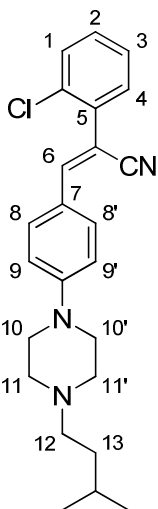
MS (ESI+):

m/z (%) = 380 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 346 (32, [M-Cl+H]<sup>+</sup>)

HRMS (EI+):

m/z C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 379.181526 gef.: 379.184022



2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-isopentylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**51**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 51 % Ausbeute (93 mg, 0.24 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:3.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

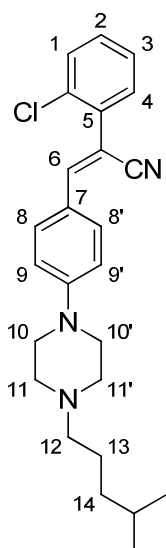
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.92 (d, 6H,  $^3J = 6.6$  Hz; CH<sub>3</sub>), 1.40–1.45 (m, 2H, H-13), 1.53–1.66 (sm, 1H, CH), 2.38–2.42 (m, 2H, H-13), 2.57–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.36–3.34 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; 2H, H-9/9'), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.28–7.32 (m, 2H, H-2+3), 7.39–7.46 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8')

**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 394 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 393.197176 gef.: 393.196349

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-(4-methylpentyl)piperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**52**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 37 % Ausbeute (70 mg, 0.17 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:4.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

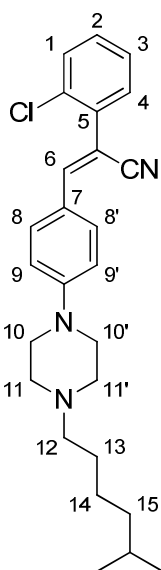
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.89 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz; CH<sub>3</sub>), 1.17–1.23 (m, 2H, H-14), 1.49–1.60 (m, 3H, CH+H-13), 2.34–2.38 (m, 2H, H-12), 2.58–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; 2H, H-9/9'), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.29–7.31 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

MS (ESI+):

m/z (%) = 408 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

HRMS (EI+):

m/z C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 407.212826 gef.: 407.210154

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-(5-methylhexyl)piperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**53**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 20 % Ausbeute (40 mg, 0.09 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:6.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.87 (d, 6H,  $^3J = 6.6$  Hz; CH<sub>3</sub>), 1.17–1.22 (m, 2H, H-15), 1.28–1.36 (m, 2H, H-14), 1.47–1.59 (m, 3H, CH+H-13), 2.37–2.40 (m, 2H, H-12), 2.57–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; 2H, H-9/9'), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.29–7.31 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.85 (psd,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8')

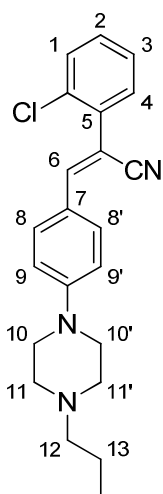
**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 422 ([M+H]<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

$m/z$  C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 421.228476 gef.: 421.230266

## 2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-propylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril ( 54)



Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 23 % Ausbeute (53 mg, 0.14 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:6.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

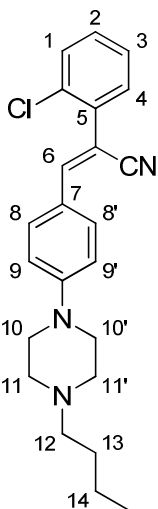
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.91–0.95 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.51–1.60 (m, 2H, H-13), 2.34–2.38 (m, 2H, H-12), 2.58–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.29–7.31 (m, 2H, H-2+3), 7.39–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.85 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.7 Hz; H-8/8')

MS (ESI+):

*m/z* (%) = 366 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

HRMS (EI+):

*m/z* C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 365.165876 gef.: 365.163388

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-butylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**55**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 42 % Ausbeute (99 mg, 0.26 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:3.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

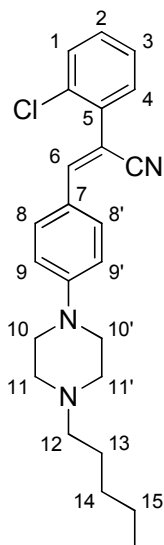
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.92–0.96 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31–1.40 (m, 2H, H-14), 1.46–1.55 (m, 2H, H-13), 2.37–2.41 (m, 2H, H-12), 2.57–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.29–7.31 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-8/8')

MS (ESI+):

$m/z$  (%) = 380 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

HRMS (EI+):

$m/z$  C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 379.181526 gef.: 379.183797

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-pentylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**56**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 48 % Ausbeute (112 mg, 0.28 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 400 MHz):

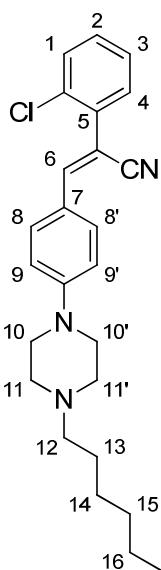
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.90–0.93 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.25–1.38 (m, 4H, H-14+15), 1.45–1.57 (m, 2H, H-13), 2.36–2.40 (m, 2H, H-12), 2.57–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-9/9'), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.28–7.32 (m, 2H, H-2+3), 7.40–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8')

**MS** (ESI+):

$m/z$  (%) = 394 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**HRMS** (EI+):

$m/z$   $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClN}_3$  ber.: 393.197176 gef.: 393.198493

2-(2-Chlorphenyl)-3-(4-(4-hexylpiperazin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**57**)

Die Titelverbindung wurde Methode D folgend (Eluent: DCM/MeOH, 99:1) in 42 % Ausbeute (106 mg, 0.26 mmol) als gelbes Wachs erhalten im *E/Z*-Verhältnis 1:3.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

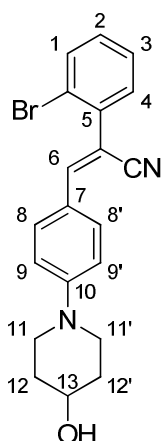
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 0.86–0.91 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25–1.34 (m, 6H, H-14+15+16), 1.45–1.54 (m, 2H, H-13), 2.32–2.40 (m, 2H, H-12), 2.58–2.60 (sm, 4H, H-11/11'), 3.34–3.37 (sm, 4H, H-10/10'), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.27–7.32 (m, 2H, H-2+3), 7.39–7.45 (m, 2H, H-1+4), 7.84 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-8/8')

**MS** (ESI+):

*m/z* (%) = 408 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub> ber.: 407.212826 gef.: 407.210785

2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(4-hydroxypiperidin-1-yl)phenyl)acrylnitril ( **58** )

Zu einer Lösung von 2-Bromphenylacetonitril (3.1 g, 16 mmol, 2 eq.) und 4-(4-Hydroxypiperidino)benzaldehyd (1.6 g, 8 mmol, 1 eq.) in MeOH (8 ml) wurde Pyrrolidin (568 mg, 8 mmol, 1 eq.) gegeben und für 6 d bei 60 °C gerührt. Die Lösung wurde auf Kieselgel adsorbiert und Flashchromatographie (DCM/MeOH, 97:3) ergab die Titelverbindung als gelbes Wachs (1.1 g, 3 mmol, 37 % Ausbeute) im *E/Z*-Verhältnis 1:5.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.60–1.68 (m, 2H, H-12/12'), 1.89–2.00 (m, 3H, H-12/12'+OH), 3.06–3.12 (m, 2H, H-11/11'), 3.69–3.94 (m, 2H, H-11/11'), 3.87–3.94 (m, 1H, H-13), 6.92 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.5 Hz; H-9/9'), 7.07 (s, 1H, H-6), 7.19–7.26 (m, 1H, H-2), 7.31–7.41 (m, 2H, H-3+4), 7.63 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz; H-1), 7.83 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.5 Hz; H-8/8')

**MS** (ESI+):

*m/z* (%) = 383 (100, [M+H]<sup>+</sup>)

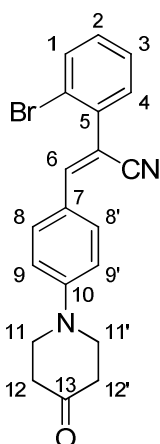
**HRMS** (EI+):

*m/z* C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O ber.: 382.068075 gef.: 382.070032

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O·0.5 H<sub>2</sub>O ber.: C: 61.23 H: 5.14 N: 7.14

gef.: C: 61.48 H: 5.36 N: 7.14



2-(2-Bromphenyl)-3-(4-(4-oxopiperidin-1-yl)phenyl)acrylnitril (**59**)

Zu einer Lösung von **58** (50 mg, 0,13 mmol, 1 eq.) in DCM (10 ml) wurde Dess-Martin-Periodinan (100 mg, 0,24 mmol, 1,8 eq.) und ein Tropfen Wasser gegeben und 12 h gerührt. Zu der Lösung wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (5 ml) sowie 10 %ige Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lsg. (5 ml) gegeben und weitergerührt bis eine klare Emulsion entstand. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Flashchromatographie (Cyclohexan/EtOAc, 2:1) ergab die Titelverbindung als gelbes Wachs (38,2 mg, 0,10 mmol, 77 % Ausbeute) im *E/Z*-Verhältnis 1:5.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 2.56–2.59 (sm, 4H, H-12/12'), 3.74–3.77 (sm, 4H, H-11/11'), 6.97 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.10 (s, 1H, H-6), 7.21–7.25 (m, 1H, H-2), 7.32–7.42 (m, 2H, H-3+4), 7.64 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.8, <sup>4</sup>J = 0.9 Hz; H-1), 7.89 (psd, 2H, <sup>3</sup>J + <sup>5</sup>J = 8.7 Hz; H-8/8')

MS (ESI+):

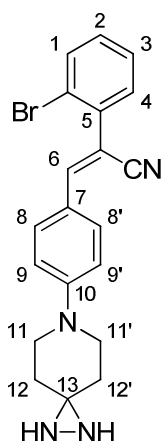
m/z (%) = 381 (100, [M+H]<sup>+</sup>)

HRMS (EI+):

m/z C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O ber.: 380.052424 gef.: 380.052758

EA: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O·0.5 H<sub>2</sub>O ber.: C: 61.55 H: 4.65 N: 7.18

gef.: C: 61.44 H: 4.82 N: 7.20

3-(4-(1,2,6-Triazaspiro[2.5]octan-6-yl)phenyl)-2-(2-bromphenyl)acrylnitril (**60**)

Verbindung **59** (342 mg, 0.9 mmol, 1 eq.) wurde bei 0 °C in 7 M Ammoniak in MeOH (5 ml) gelöst. Nach 30 min wurde Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure (125 mg, 1.0 mmol, 1.1 eq.) zugegeben und 12 h bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und mit DCM ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (DCM/MeOH, Gradient 0–4 % MeOH) ergab das die Titelverbindung als gelben Feststoff (219 mg, 0.6 mmol, 64 % Ausbeute) im *E/Z*-Verhältnis 1:4.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.65–1.92 (m, 4H, H-12/12'), 1.77 (s, 2H, NH), 3.41–3.67 (m, 4H, H-11/11'), 6.97 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.9 Hz; H-9/9'), 7.09 (s, 1H, H-6), 7.21–7.25 (sm, 1H, H-2), 7.36 (dt, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.3, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz; H-3), 7.41 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.6, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz; H-4), 7.65 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz; H-1), 7.86 (psd, 2H, <sup>3</sup>*J* + <sup>5</sup>*J* = 8.7 Hz; H-8/8')

MS (ESI+):

$m/z$  (%) = 395 (100, [M+H]<sup>+</sup>)

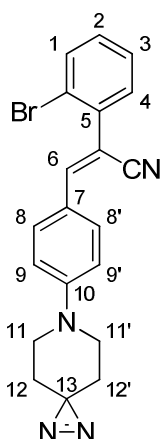
HRMS (EI+):

$m/z$  C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>4</sub> ber.: 394.061612 gef.: 394.064712

EA: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>4</sub> ber.: C: 60.77 H: 4.84 N: 14.17

gef.: C: 60.56 H: 5.00 N: 13.94

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 82 °C

**(Z)-3-(4-(1,2,6-Triazaspiro[2.5]oct-1-en-6-yl)phenyl)-2-(2-bromophenyl)acrylnitril (61)**

Zu einer Lösung von **60** (100 mg, 0.25 mmol) und  $\text{NEt}_3$  (43  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol, 1.2 eq.) in MeOH (5 mL) wurde so lange methanolische 0.05 M  $\text{I}_2$ -Lsg. zugetropft, bis die braune Färbung länger als eine min erhalten blieb. Anschließend wurde die Lösung auf Kieselgel adsorbiert. Flashchromatographie (Cyclohexan/DCM, 4:1) ergab die Titelverbindung als gelben Feststoff (66 mg, 0.16 mmol, 66 % Ausbeute) als reines Z-Isomer.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 1.41–1.44 (sm, 4H, H-12/12'), 3.61–3.63 (sm, 4H, H-11/11'), 6.93 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-9/9'), 7.09 (s, 1H, H-6), 7.23 (ddd,  $^3J = 8.02$ ,  $^3J = 7.45$ ,  $^4J = 1.72$  Hz; 1H, H-2), 7.36 (dt, 1H,  $^3J = 7.5$ ,  $^4J = 1.1$  Hz; H-3), 7.42 (dd, 1H,  $^3J = 7.7$ ,  $^4J = 1.7$  Hz; H-4), 7.65 (dd, 1H,  $^3J = 8.0$ ,  $^4J = 1.1$  Hz; H-1), 7.86 (psd, 2H,  $^3J + ^5J = 8.9$  Hz; H-8/8')

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 21 °C, 100 MHz,  $^1\text{H}$ -gekoppelt):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 26.9 (qui,  $^2J = 6.0$  Hz; C-13), 30.3 (t,  $^1J = 129.6$  Hz; C-12/12'), 46.9 (tt,  $^1J = 138.0$ ,  $^2J = 3.6$  Hz; C-11/11'), 105.6 (d,  $^2J = 3.6$  Hz; C-CN), 114.7 (dd,  $^1J = 158.4$ ,  $^2J = 4.8$  Hz; C-9/9'), 118.4 (d,  $^3J = 14.4$  Hz; CN), 123.1 (m,  $J = 10.0$  Hz; C-Br), 123.5 (m,  $J = 7.2$  Hz; C-7), 128.0 (dd,  $^1J = 164.3$ ,  $^2J = 8.4$  Hz; C-2), 130.0 (dd,  $^1J = 133.1$ ,  $^2J = 8.4$  Hz; C-3), 131.3 (dd,  $^1J = 132.0$ ,  $^2J = 8.4$  Hz; C-4), 131.4 (dt,  $^1J = 158.4$ ,  $^2J = 6.0$  Hz; C-8/8'), 133.6 (dd,  $^1J = 166.7$ ,  $^2J = 8.4$  Hz; C-1), 137.1 (q,  $^2J = 7.2$  Hz; C-5), 147.9 (dt,  $^1J = 145.8$ ,  $^2J = 4.8$  Hz; C-6), 151.7 (sm, C-10)

**MS** (ESI+):

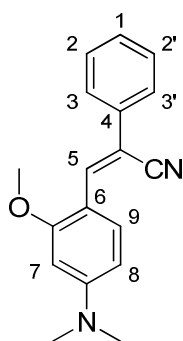
$m/z$  (%) = 311 (100,  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{N}_2)\text{CH}_2]^+$ ), 393 (38,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 417 (30,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )

**EA:**  $C_{20}H_{17}BrN_4$  ber.: C: 61.08 H: 4.36 N: 14.25

gef.: C: 61.42 H: 4.57 N: 13.86

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 113 °C



**(Z)-3-(4-(Dimethylamino)-2-methoxyphenyl)-2-phenylacrylnitril (64)**

Die Titelverbindung wurde Methode B folgend nach 1 d in 79 % (308 mg, 1.10 mmol) Ausbeute als gelber Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 400 MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 3.07 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.18 (s, 1H, H-7), 6.40 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 8.9, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz; H-8), 7.27–7.32 (sm, 1H, H-1), 7.37–7.42 (m, 2H, H-2/2'), 7.63–7.67 (m, 2H, H-3/3'), 7.93 (s, 1H, H-5), 8.26 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz; H-9)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21 °C, 100 MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 40.3 (NCH<sub>3</sub>), 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 94.0 (C-7), 104.1 (C-CN), 104.7 (C-8), 111.4 (C-6), 120.0 (CN), 125.6 (C-3/3'), 127.8 (C-1), 128.9 (C-2/2'), 129.2 (C-9), 136.1 (C-4), 137.0 (C-5), 153.5 (C-O), 159.9 (C-N)

**MS** (EI+):

m/z (%) = 278 (100, M<sup>+</sup>)

**HRMS** (EI+):

m/z C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: 278.141913 gef.: 278.138746

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ber.: C: 77.67 H: 6.52 N: 10.06

gef.: C: 77.52 H: 6.51 N: 9.88

**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 111 °C

## 5.3 Biologie

### 5.3.1 Verwendete Geräte

Zentrifugen	Beckmann Coulter Avanti J-25 Heraeus Biofuge pico Heraeus Multifuge 3
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Innova 4200 New Brunswick Scientific Innova 4300
Ultraschall	Branson Sonifier 250
FPLC	GE Healthcare ÄKTA Basic
Säulen	GE Healthcare Ni Sepharose High Load 15 ml, GE Healthcare HiLoad™-26/60-Superdex 75
PCR-Cycler	MJ Research PCR Mini Cycler
UV/Vis	Thermo Scientific NanoDrop 2000c

### 5.3.2 Verwendete Kits und Reagenzien

PCR	Agilent QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit
Plasmidpräparation	Peqlab peqGold Plasmid Miniprep Kit I
Lysozym	Roth, 20.000 U/mg
Benzonase Nuclease	Novagen, 25 u/μL



### 5.3.3 Verwendetes Plasmid

Aminosäuresequenz:

MGHHHHHGSQYNPQVADLKAFSKHIYNAYLKNFNMTKKKARSILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEKGLVWKQL  
 VNGLPPYKEISVHVYFRCQCTTVETVRELTEFAKSIPSFSSFLNDQVTLLKYGVHEAIFAMLASIVNKDGLLVA  
 NGSQFVTRFLRSLRKPFSDIIEPKFEFAVKFNALELDDSDLALFIAAIIILCGDRPGLMNVPRVEAIQDTILRAL  
 EFHLQANHPDAQYLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQMMQRIKKTETETSLHPLLQEIYKDMY

DNA-Sequenz (5'→3'):

ATG GGG CAC CAT CAC CAT CAC CAC GGG AGC CAG TAC AAC CCA CAG GTG GCC GAC CTG  
 AAG GCC TTC TCC AAG CAC ATC TAC AAT GCC TAC CTG AAA AAC TTC AAC ATG ACC AAA  
 AAG AAG GCC CGC AGC ATC CTC ACC GGC AAA GCC AGC CAC ACG GCG CCC TTT GTG ATC  
 CAC GAC ATC GAG ACA TTG TGG CAG GCA GAG AAG GGG CTG GTG TGG AAG CAG TTG GTG  
 AAT GGC CTG CCT CCC TAC AAG GAG ATC AGC GTG CAC GTC TTC TAC CGC TGC CAG TGC  
 ACC ACA GTG GAG ACC GTG CGG GAG CTC ACT GAG TTC GCC AAG AGC ATC CCC AGC TTC  
 AGC AGC CTC TTC CTC AAC GAC CAG GTT ACC CTT CTC AAG TAT GGC GTG CAC GAG GCC  
 ATC TTC GCC ATG CTG GCC TCT ATC GTC AAC AAG GAC GGG CTG CTG GTA GCC AAC GGC  
 AGT GGC TTT GTC ACC CGT GAG TTC CTG CGC AGC CTC CGC AAA CCC TTC AGT GAT ATC  
 ATT GAG CCT AAG TTT GAA TTT GCT GTC AAG TTC AAC GCC CTG GAA CTT GAT GAC AGT  
 GAC CTG GCC CTA TTC ATT GCG GCC ATC ATT CTG TGT GGA GAC CGG CCA GGC CTC ATG  
 AAC GTT CCA CGG GTG GAG GCT ATC CAG GAC ACC ATC CTG CGT GCC CTC GAA TTT CAC  
 CTG CAG GCC AAC CAC CCT GAT GCC CAG TAC CTC TTC CCC AAG CTG CTG CAG AAG ATG  
 GCT GAC CTG CGG CAA CTG GTC ACC GAG CAC GCC CAG ATG ATG CAG CGG ATC AAG AAG  
 ACC GAA ACC GAG ACC TCG CTG CAC CCT CTG CTC CAG GAG ATC TAC AAG GAC ATG TAC  
 TAA TAA

Enthalten in einem pET23a(+) Vektor.

### 5.3.4 Allgemein Verwendete Lösungen

LB-Medium                    10 g/L Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 1 g/L NaCl

### 5.3.5 Allgemeine Vorschriften

#### 5.3.5.1 Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Korrekturfaktor von 0.748 wurde mittels ProtParam berechnet: <http://web.expasy.org/protparam/> (zuletzt abgerufen am 1.10.2013).

#### 5.3.5.2 Gensequenzierung

Gensequenzierungen wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

#### 5.3.5.3 SDS-Page

Verwendete Lösungen:

Probenpuffer	250 mM Tris pH 6.8, 8 % (w/v) SDS-Puffer 10 % (Roth), 200 mM DTT, 40 % (v/v) Glycerin, 0.04 % (w/v) Bromphenolblau
Laemmli-Puffer	0.25 M Tris, 2 M Glycerin, pH 8.3
Färbelösung	40 % MeOH, 10 % EtOAc, 0.05 % Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärbelösung	40 % MeOH, 10 % EtOAc

Gelzusammensetzung (8.0 x 6.0 x 0.75 cm)

Trenngel (15 %)	Sammelgel	
1 mL	600 µL	1.5 M Tris, pH 8.8
1.5 mL	500 µL	30 % Acrylamid/Bisacrylamid (47.5:1)

30 µL	30 µL	SDS-Puffer 10 % (Roth)
470 µL	1.87 mL	Wasser
3 µL	3 µL	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)
30 µL	30 µL	10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Die Proben wurden mit Probenpuffer verdünnt (5:1) und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Je Spur wurden 10 µL Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 140–180 V über 1–2 h in einer BioRad Elektrophoresekammer mit Laemmli-Puffer, als Marker diente Marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Abbildung 5.3). Die Auswertung erfolgte durch Färben (~5 min, ~60 °C) und Entfärben (3–5x ~5 min, ~60 °C) mit den entsprechenden Lösungen.

#### **5.3.5.4 Agarose Gel**

Verwendete Lösungen:

50x TAE-Puffer                      2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 7.8

Vorschrift:

0.5 g Agarose wurden in 50 mL TAE-Puffer (1fach) angelöst und in einer Haushaltsmikrowelle bei 600 W bis zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 0.5 µL SYBR Green I (Invitrogen) zugegeben und das Gel gegossen. Die Proben wurden mit 6x MassRuler DNA Loading Dye (Fermentas) verdünnt (5:1). Nach Erstarren wurde das Gel mit Proben (10 µL pro Tasche) und Marker (Fermentas FastRuler Middle Range DNA Ladder, 4 µL pro Tasche) beladen und ~60 min bei 100 V laufen gelassen. Die Auswertung erfolgte durch Anregung bei 494 nm.

### 5.3.5.5 PCR

Verwendete Primer (5'→3'):

L-Insertion    CAC CAC GGG AGC **CTG** CAG TAC AAC CCA C  
                   G TGG GTT GTA CTG **CAG** GCT CCC GTG GTG

QJN→VPR        GGG AGC CTG **GTG CCG CGC** CCA CAG GTG  
                   CAC CTG TGG **GCG CGG CAC** CAG GCT CCC

PQ→GS            CTG GTG CCG CGC **GGC AGC** GTG GCC GAC  
                   GTC GGC CAC **GCT GCC** GCG CGG CAC CAG

Vorschrift:

- 40 µL Wasser
- 5 µL 10x Puffer
- 1 µL Plasmid (86 ng/µL)
- je 0.25 µL Primer (100 pmol/µL)
- 1 µL dNTP Mix
- 1.5 µL QuickSolution
- 1 µL Polymerase

Temperaturprogramm:

- |            |       |
|------------|-------|
| 1. 2 min   | 95 °C |
| 2. 20 s    | 95 °C |
| 3. 10 s    | 60 °C |
| 4. 2.5 min | 68 °C |
| 5. 5 min   | 68 °C |
| 6. 0 min   | 4 °C  |
| 7. stopp   |       |

Schritt 2. bis 4. 18 mal Wiederholen.

Anschließend wurden 2 µL *dpn I* zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert.

### 5.3.5.6 Hitzeschock-Transformation

50 µL kompetente Zellen wurden mindestens eine Stunde lang auf Eis aufgetaut und mit 2 µL Plasmid aus der PCR versetzt. Nach einer weiteren Stunde auf Eis wurde 30 s auf 42 °C erhitzt und wieder 10 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 950 µL LB-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37 °C hochgezüchtet und bei 13000 UpM (16089 g) für 1 min

abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **5.3.5.7 Plasmidpräparation**

10 mL LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM hochgezüchtet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Standardprotokoll des verwendeten Kits (Peqlab peqGold Plasmid Miniprep Kit I).

### **5.3.5.8 PPAR $\beta/\delta$ Expression und Aufreinigung**

Verwendete Lösungen:

SLB-Medium:	25 g/L Pepton, 15 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/mL, finale Verdünnung: 1 mL/L
Chloramphenicol-Stammlösung:	34 mg/mL in EtOH, finale Verdünnung: 1 mL/L
Ni-Puffer A:	20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 1 mM $\beta$ -ME, 20 mM Imidazol, pH 7.5
Ni-Puffer B:	20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 1 mM $\beta$ -ME, 500 mM Imidazol, pH 7.5
SEC-Puffer:	20 mM HEPES, 500 mM NH <sub>4</sub> OAc, 1 mM $\beta$ -ME, pH 7.5

Alle Medien wurden autoklaviert, Puffer wurden sterilfiltriert und entgast. Antibiotika oder  $\beta$ -ME wurde erst kurz vor Verwendung zugegeben.

Expression:

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie der Bakterien (Rosetta2(DE3)) angeimpft und für 1h bei 37° im Schüttelinkubator inkubiert. Mit je 1 ml dieser Kultur wurden 4x 200ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator (140 UpM)

hochgezüchtet. Vor dem Animpfen der Hauptkulturen wurden die vier Vorkulturen vereinigt und je 50 ml / 1.6 L Hauptkultur zum Animpfen verwendet. 4x 1.6 L SLB-Medium in 5000ml Schikanekolben wurden ~6 h bei 37°C und 120 UpM auf eine OD<sub>600</sub> von ~2.5 hochgezüchtet. Die Temperatur wurde auf 20 °C gesenkt und die Bakterien bis OD<sub>600</sub>>2.8 hochgezüchtet. Anschließend erfolgte die Induktion mit 1.6 mL 0.5 M IPTG-Lösung je 1.6 L und die Expression über Nacht bei 20 °C. Die Zellen wurden bei 6000 UpM (6371 g) für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Zellpellets wurden entweder bei -20 °C gelagert oder direkt aufgeschlossen.

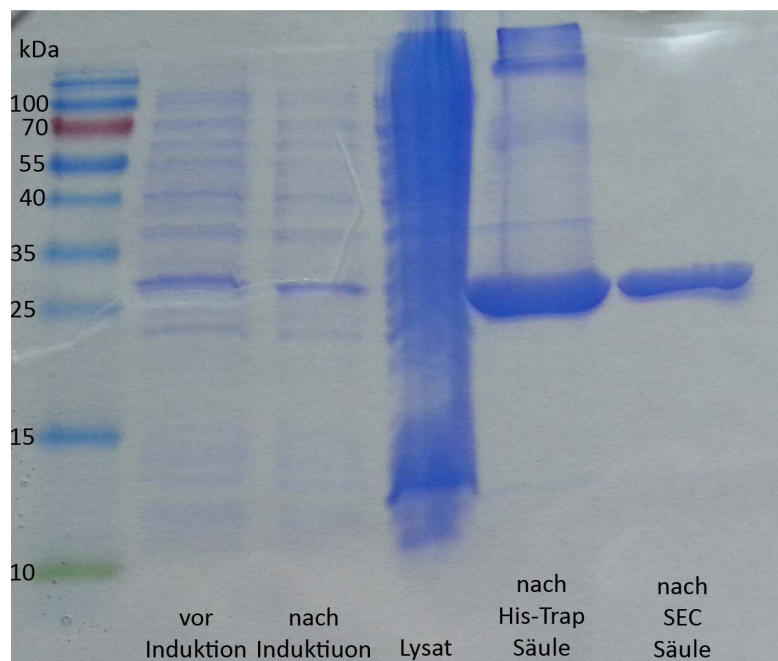
#### Zellaufschluss und Aufreinigung:

Die Zellen wurden in ~50 mL Ni-Puffer A suspendiert und nach Zugabe von 1 µL DNase/Benzonase sowie einer Spatelspitze Lysozym für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis sonifiziert (5x 90 s bei 20 % Leistung mit 1 s Intervallen) und mit 20000 UpM (48384 g) für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Bodensatz wurde verworfen und das Lysat bei 4 °C über eine 15 mL Ni Sepharose Säule aufgereinigt (Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1** Vorgehensweise zur PPAR $\beta/\delta$ -Aufreinigung über eine Ni Sepharose Säule

Schritt	Flussrate	Dauer	Ni-Puffer B	Fraktionierung
Auftragen	2 mL/min	-	0 %	Nein
Waschen	2 mL/min	100 mL	0 %	Nein
Elution	4 mL/min	150 mL	0–100 %	5 mL

Ein 10 kDa Dialyseschlauch wurde mit den vereinten Proteinfractionen befüllt und über Nacht bei 4 °C in 4 L SEC-Puffer gelagert. Die Proteinlösung wurde auf unter 10 mL aufkonzentriert (Vivaspin 20 10 kDa, 4600 UpM/3761 g) und bei 4 °C mit 2 mL/min auf eine Superdex 75 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 300 mL SEC-Puffer bei 2 mL/min und einer Fraktionsgröße von 3 mL. Die Ausbeute betrug 2–4 mg Protein pro Liter Medium.



**Abbildung 5.3** SDS-Page der verschiedenen Expressions- und Aufreinigungsschritte von PPAR $\beta/\delta$ .

Die DLS-Spektren wurden an einem Xtal-Concepts Spectro size 300 über 30 s mit 25 Wiederholungen aufgenommen.

### 5.3.5.9 Kristallplatten

Verwendete Screens:

Die verwendeten Screens waren AmSO<sub>4</sub>, Anions, Classics, Classics Lite, Cryos, JCSG, JCSG Core I–IV, MBC I–II und PACT von den Firmen Hampton Research, Emerald Bio und Qiagen.

Kristallisationsbedingungen:

Nach dem Aufkonzentrieren auf ~2 mg/mL wurde Ligand in DMSO (500  $\mu$ M, Endkonzentration 50  $\mu$ M) zugegeben, weiter aufkonzentriert auf 5–6 mg/mL und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Ausplattiert wurde in 2 Drop Innovadyne Platten mit 80  $\mu$ L Reservoir und einer Tropfenzusammensetzung von 0.3  $\mu$ L Reservoir mit 0.3  $\mu$ L Protein mittels eines Cartesian Microsys<sup>TM</sup> SQ 4000.

Erfolgreiche Bedingungen:

**Tabelle 5.2** Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen für ST-247.

Screen	well	Puffer	pH	Salz	Präzipitant
Anions 18	E3	NaOAc 0.1 M	8.0	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M
	E9	MES 0.1 M	8.0	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M
	F3	HEPES 0.1 M	4.9	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M
	F9	TRIS 0.1 M	8.0	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.9 M
Classics 18	C3	TRIS 0.1 M	8.0	-	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 2 M
	D10	HEPES 0.1 M	8.0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.8 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.8 M
JCGS Core 1	B6	HEPES 0.1 M	4.9	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.8 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 0.8 M
JCGS Core 2	A11	TRIS 0.1 M	8.0	-	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 2 M
MCB 2	H12	MES 0.1 M	8.0	-	NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> 1.5 M

**Tabelle 5.3** Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen für PT-S58 in Gegenwart von nHeptyl-β-D-Glucopyranosid (15 % w/v).

Screen	well	Puffer	pH	Präzipitant
Anions 18	C2	NaOAc 0.1 M	8.0	NaCO <sub>2</sub> H 1.75 M
Classics 18	D11	NaOAc 0.1 M	8.0	NaCO <sub>2</sub> H 2 M
Core 3 18	H1	NaOAc 0.1 M	8.0	NaCO <sub>2</sub> H 2 M

### 5.3.5.10 Plasmakinetiken

Verwendete Geräte:

HPLC            Waters Alliance 2795

Säule            Phenomenex Kinetex C18 2,6 μ 100 Å 50x2,1 mm

MS                Waters Quattro Micro



Parameter:

HPLC 80 % MeCN, 20 % 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, 0.2 mL/min, 10 µL inject, 8 min Laufzeit

MS 3 kV Kapillarspannung bei 140 °C

Acetonitrilpräzipitation:

1. 50 µL Plasma mit 200 µL MeCN versetzen und 5 min leicht schütteln
2. Niederschlag bei 6000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugieren
3. 180 µL in ein neues Gefäß überführen und mit 100 µL Wasser verdünnen
4. Bei 3900 g für 15 min zentrifugieren
5. 200 µL in das Vial überführen

Für die Kalibriergeraden wurden 45 µL Plasma mit 5 µL Ligandlösung (DMSO/Wasser, 1:1) der zehnfachen Zielkonzentration versetzt und wie oben aufgearbeitet.

**Tabelle 5.4** Kalibriergeraden zur Berechnung der Plasmakonzentration.

Konz. [ng/mL]	PT-S 141 AUC	PT-S 264 AUC	PT-S 272 AUC
0			133
1		22	295
2.5		42	405
5		81	743
10		263	2116
50	20	646	7276
250	264	4530	43091
1000	839	18554	145797
2500	1903	76169	442774
5000	4947	173375	896485
R <sup>2</sup>	0.985	0.990	0.998

Für PT-S 271 konnte keine lineare Korrelation erreicht werden.

Die verabreichte Dosis lag bei 25 mg/kg (PO) bzw. 5 mg/kg (IV). Die Plasmaproben wurden 45 min (PO) oder 15 min (IV) nach Verabreichung entnommen.

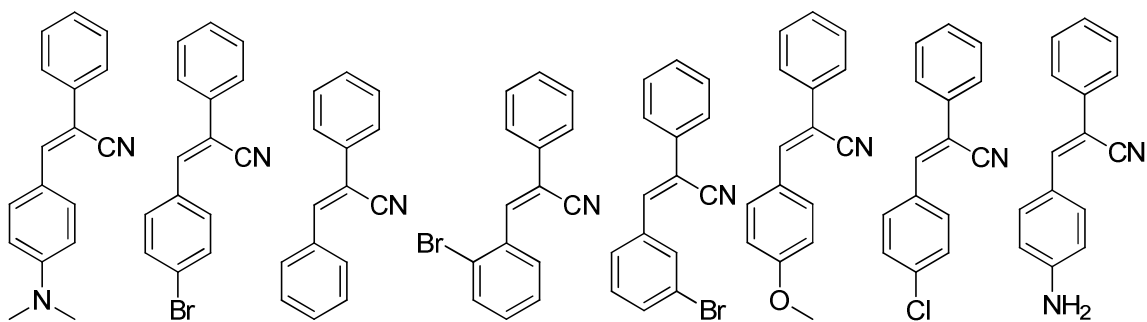
**Tabelle 5.5** Berechnete Plasmakonzentrationen.

	PT-S 141 [ng/mL]	PT-S 264 [ng/mL]	PT-S 272 [ng/mL]	PT-S 264 [nM/L]	PT-S 272 [nM/L]
IV	0	728	2	1502.3	3.8
IV	0	646	5.2	1333.1	9.9
IV	0	571	3.8	1178.3	7.2
Mittel IV	0	648.3	3.7	1337.9	6.9
$\sigma$	-	78.5	1.6	162.0	3.0
PO	0	13	0.4	26.8	0.8
PO	0	31	0.4	64.0	0.8
PO	0	11	0.6	22.7	1.1
Mittel PO	0	18.3	0.5	37.8	0.9
$\sigma$	-	11.0	0.1	22.7	0.2

### 5.3.5.11 Photoaffinitätslabeling

50  $\mu$ L Protein (1–2 mg/mL) wurde jeweils mit einem, fünf und zehn Äquivalenten Photoaffinitätsligand **61** versetzt. Die Ligandkonzentration der DMSO Stocklösung wurde dabei so gewählt, dass nicht mehr als 5  $\mu$ L Stocklösung zugegeben werden mussten. Die Bestrahlung erfolgte für 3 h bei 366 nm mit 2 cm Abstand von der Lampe. Das Protein wurde dabei mit Eis gekühlt. Die anschließende Massenanalyse erfolgte in der Massenabteilung des FB Chemie der Universität Marburg.

## 5.4 Strukturverzeichnis



2

4

5

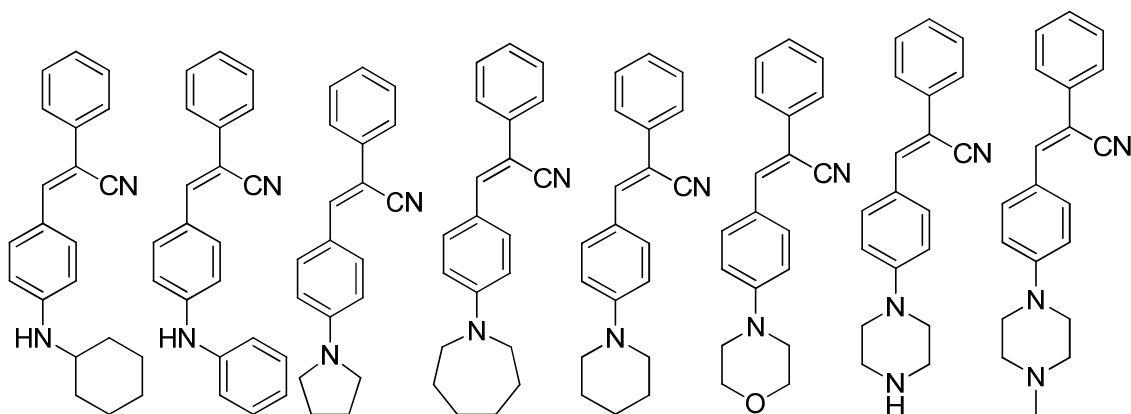
6

7

8

9

11



12

13

14

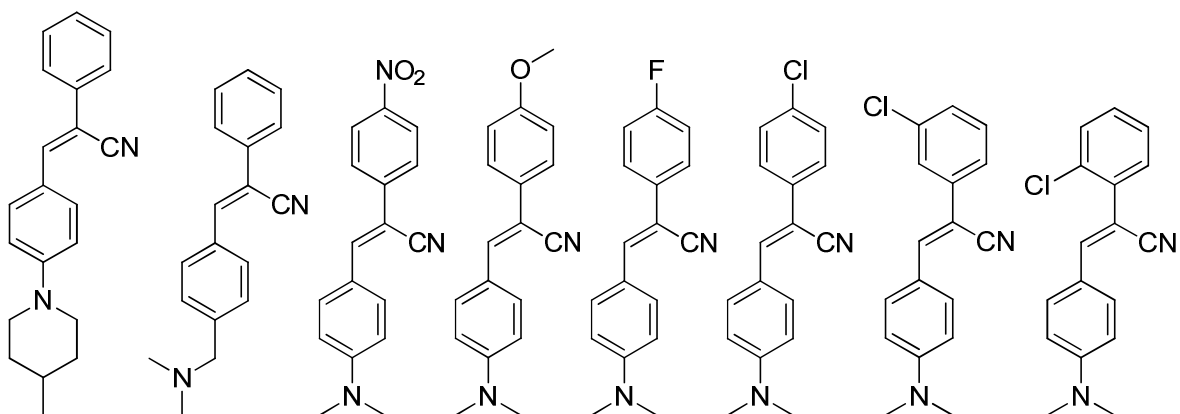
15

16

17

18

19



20

21

22

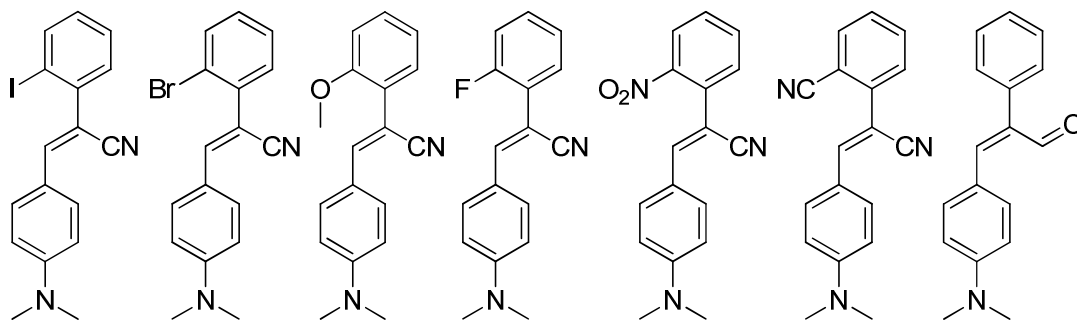
23

24

25

26

27



28

29

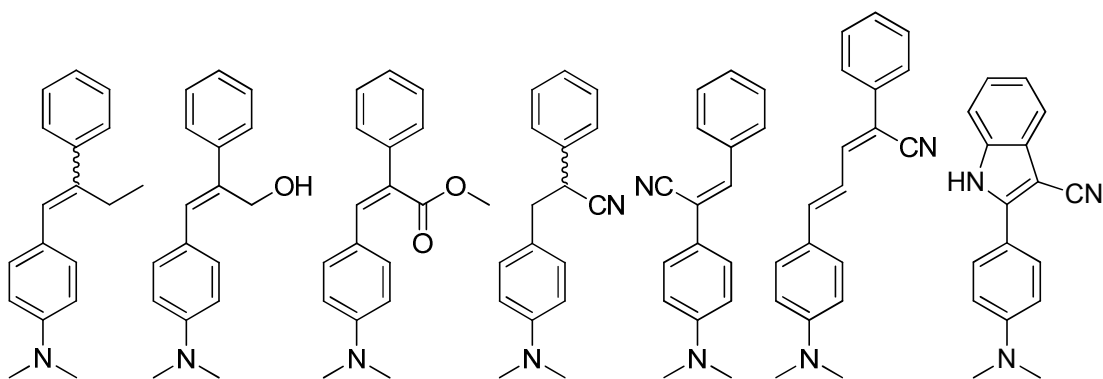
30

31

32

33

34



35

36

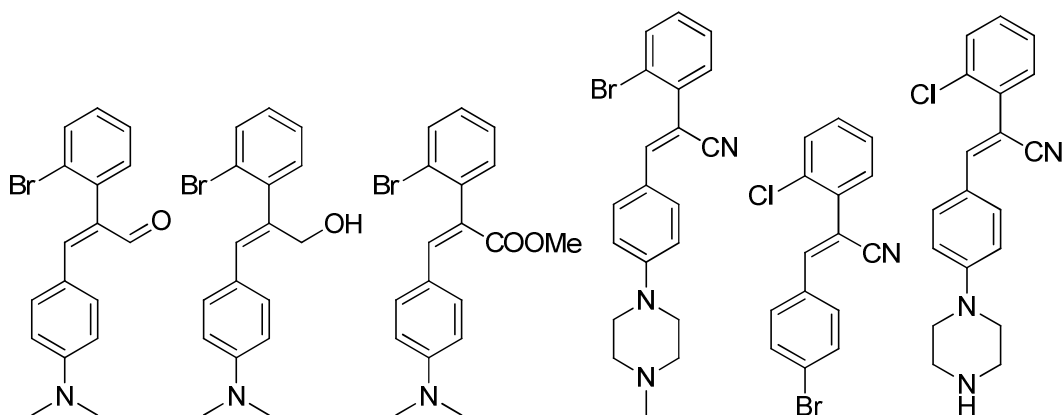
37

38

39

40

41



43

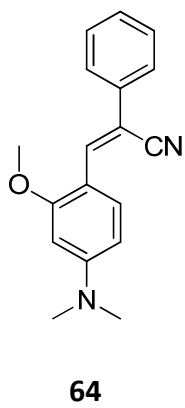
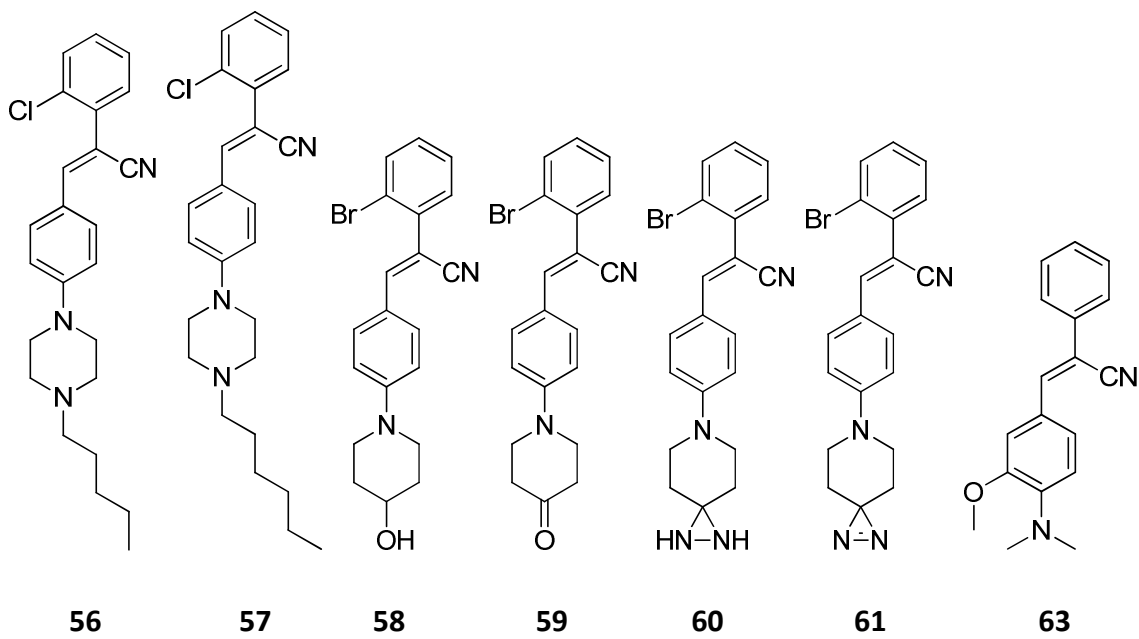
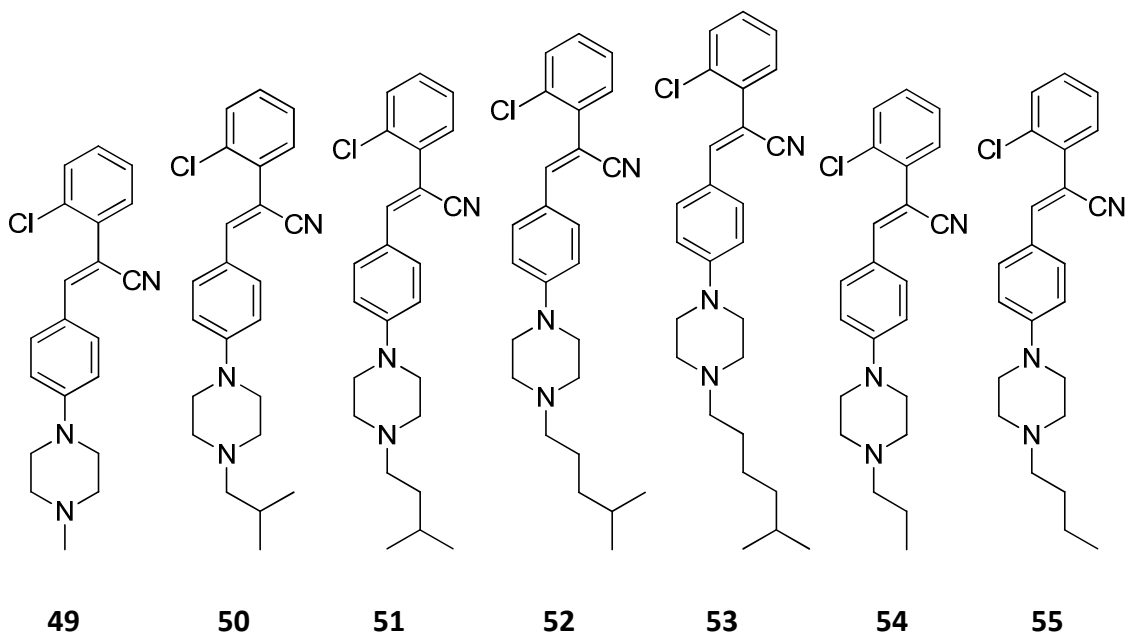
44

45

46

47

48





## 6 Literatur

- 1 Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993–996 (2006).
- 2 a) Hughes, B. 2007 FDA drug approvals: a year of flux. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 107–109 (2008).  
b) Hughes, B. 2008 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 93–96 (2009).  
c) Hughes, B. 2009 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 89–92 (2010).  
d) Mullard, A. 2010 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 82–85 (2011).  
e) Mullard, A. 2011 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 91–94 (2012).  
f) Mullard, A. 2012 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 87–90 (2013).
- 3 Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
- 4 Dreyer, C. *et al.* Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68**, 879–887 (1992).
- 5 Peters, J. M., Shah, Y. M. & Gonzalez, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, 181–195 (2012).
- 6 Harmon, G. S., Lam, M. T. & Glass, C. K. PPARs and Lipid Ligands in Inflammation and Metabolism. *Chem Rev* **111**, 6321–6340 (2011).
- 7 Michalik, L. *et al.* International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 726–741 (2006).
- 8 Friedland, S. N. *et al.* The Cardiovascular Effects of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonists. *Am J Med* **125**, 126–133 (2012).
- 9 Lockyer, P., Schisler, J. C., Patterson, C. & Willis, M. S. Minireview: Won't Get Fooled Again: The Nonmetabolic Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in the Heart. *Mol Endocrinol* **24**, 1111–1119 (2010).
- 10 Shirinsky, I., Polovnikova, O., Kalinovskaya, N. & Shirinsky, V. The effects of fenofibrate on inflammation and cardiovascular markers in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatol Int* (2012).
- 11 Goto, M. A comparative study of anti-inflammatory and antidyplipidemic effects of fenofibrate and statins on rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* **20**, 238–243 (2010).
- 12 <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm173081.htm> (abgerufen am 10.07.2013)
- 13 <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm226976.htm> (abgerufen am 5.10.2013)
- 14 <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm259150.htm> (abgerufen am 5.10.2013)
- 15 Choi, J. H. *et al.* Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* **477**, 477–481 (2011).

- 16 Henry, R. R. *et al.* Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha/\gamma$  agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet* **374**, 126–135 (2009).
- 17 Peters, J. M., Foreman, J. E. & Gonzalez, F. J. Dissecting the role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) in colon, breast, and lung carcinogenesis. *Cancer Metast Rev* **30**, 619–640 (2011).
- 18 Wagner, K.-D. & Wagner, N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR $\beta/\delta$ ) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Therapeut* **125**, 423–435 (2010).
- 19 Yang, L. *et al.* Biological Function and Prognostic Significance of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Rectal Cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 3760–3770 (2011).
- 20 Bishop-Bailey, D. & Bystrom, J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  in inflammation. *Pharmacol Therapeut* **124**, 141–150 (2009).
- 21 Bugge, A. & Mandrup, S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Research* **2010**, 1–12 (2010).
- 22 Pirat, C. *et al.* Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Development of Modulators. *J Med Chem* **55**, 4027–4061 (2012).
- 23 Geiger, L. E. *et al.* Rat carcinogenicity study with GW501516, a PPAR delta agonist. *The Toxicologist* **108**, 185 (2009).
- 24 Wang, Y.-X. *et al.* Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR $\delta$ . *Plos Biol* **2**, e294 (2004).
- 25 <http://playtrue.wada-ama.org/news/wada-issues-alert-on-gw501516/> (abgerufen am 27.06.2013)
- 26 Bays, H. E. *et al.* MBX-8025, A Novel Peroxisome Proliferator Receptor- $\delta$  Agonist: Lipid and Other Metabolic Effects in Dyslipidemic Overweight Patients Treated with and without Atorvastatin. *J Clin Endocr Metab* **96**, 2889–2897 (2011).
- 27 Iwaisako, K. *et al.* PNAS Plus: Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor agonist. *P Natl Acad Sci USA* **109**, E1369 (2012).
- 28 Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 950–964 (2004).
- 29 Szanto, A. *et al.* Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* **11**, S126–S143 (2004).
- 30 Zoete, V., Grosdidier, A. & Michelin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *BBA-Mol Cell Biol L* **1771**, 915–925 (2007).
- 31 Xu, H. E. *et al.* Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR $\alpha$ . *Nature* **415**, 813–817 (2002).



- 32 Kenakin, T. Efficacy as a Vector: the Relative Prevalence and Paucity of Inverse Agonism. *Mol Pharmacol* **65**, 2–11 (2004).
- 33 Adhikary, T. *et al.* Genomewide Analyses Define Different Modes of Transcriptional Regulation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ). *PLoS ONE* **6**, e16344 (2011).
- 34 Wadosky, K. M. & Willis, M. S. The story so far: post-translational regulation of peroxisome proliferator-activated receptors by ubiquitination and SUMOylation. *Am J Physiol-Heart C* **302**, H515 (2012).
- 35 Kuenzli, S., phane & Saurat, J.-H. Effect of Topical PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$  Agonists on Plaque Psoriasis. *Dermatology* **206**, 252–256 (2003).
- 36 Romanowska, M. *et al.* Activation of PPAR $\beta/\delta$  Causes a Psoriasis-Like Skin Disease In Vivo. *PLoS ONE* **5**, e9701 (2010).
- 37 Hack, K. *et al.* Skin-Targeted Inhibition of PPAR  $\beta/\delta$  by Selective Antagonists to Treat PPAR  $\beta/\delta$  – Mediated Psoriasis-Like Skin Disease In Vivo. *PLoS ONE* **7**, e37097 (2012).
- 38 Shearer, B. G. *et al.* Identification and Characterization of a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\beta/\delta$  (NR1C2) Antagonist. *Mol Endocrinol* **22**, 523–529 (2007).
- 39 Markt, P. *et al.* Discovery of Novel PPAR Ligands by a Virtual Screening Approach Based on Pharmacophore Modeling, 3D Shape, and Electrostatic Similarity Screening. *J Med Chem* **51**, 6303–6317 (2008).
- 40 Kasuga, J.-i. *et al.* Novel biphenylcarboxylic acid peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\delta$  selective antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 6595–6599 (2009).
- 41 Zaveri, N. T. *et al.* A novel peroxisome proliferator-activated receptor delta antagonist, SR13904, has anti-proliferative activity in human cancer cells. *cbr* **8**, 1252–1261 (2009).
- 42 Palkar, P. S. *et al.* Cellular and Pharmacological Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\beta/\delta$  Antagonist GSK3787. *Mol Pharmacol* **78**, 419–430 (2010).
- 43 Shearer, B. G. *et al.* Identification and Characterization of 4-Chloro- N -(2-([5-trifluoromethyl]-2-pyridyl)sulfonyl)ethyl)benzamide (GSK3787), a Selective and Irreversible Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) Antagonist. *J Med Chem* **53**, 1857–1861 (2010).
- 44 LanthaScreen® TR-FRET PPAR delta Competitive Binding Assay Kit von Invitrogen.
- 45 Inoue, H. *et al.* Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in mice. *Neurosci Lett* **352**, 203–206 (2003).
- 46 Rimando, A. M., Nagmani, R., Feller, D. R. & Yokoyama, W. Pterostilbene, a New Agonist for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ -Isoform, Lowers Plasma Lipoproteins and Cholesterol in Hypercholesterolemic Hamsters. *J Agric Food Chem* **53**, 3403–3407 (2005).
- 47 Wawzonek, S. & Smolin, E. M.  $\alpha$ -PHENYLCINNAMONITRILE. *Org Synth* **29**, 83 (1949); Coll. Vol. **3**, 715 (1955).
- 48 Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (Thieme, Stuttgart, 2005).

- 49 a) Guram, A. S., Rennels, R. A. & Buchwald, S. L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angew Chem Int Edit* **34**, 1348–1350 (1995).  
b) Louie, J. & Hartwig, J. F. Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. *Tet Lett* **36**, 3609–3612 (1995).  
c) *Metal-catalyzed cross-coupling reactions* (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).
- 50 K. Nevin, D., G. Lloyd, D. & Fayne, D. Rational Targeting of Peroxisome Proliferating Activated Receptor Subtypes. *CMC* **18**, 5598–5623 (2011).
- 51 Montanari, R. *et al.* Crystal Structure of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Ligand Binding Domain Complexed with a Novel Partial Agonist: A New Region of the Hydrophobic Pocket Could Be Exploited for Drug Design. *J Med Chem* **51**, 7768–7776 (2008).
- 52 Fleming, F. F., Yao, L., Ravikumar, P. C., Funk, L. & Shook, B. C. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. *J Med Chem* **53**, 7902–7917 (2010).
- 53 Ishmaeva, E. A. *et al.* Polarity and structure of 2-(1-methylbenzimidazol-2-yl)-1-phenyl- and -1,2-diphenyl-1-nitroethenes. *Russ J Gen Chem* **82**, 911–920 (2012).
- 54 Wittig, G. & Geissler, G. Zur Reaktionsweise des Pentaphenyl-phosphors und einiger Derivate. *Liebigs Ann Chem* **580**, 44–57 (1953).
- 55 Müller, S., Liepold, B., Roth, G. J. & Bestmann, H. J. An Improved One-pot Procedure for the Synthesis of Alkynes from Aldehydes. *Synlett* **1996**, 521–522 (1996).
- 56 Michel, P., Gennet, D. & Rassat, A. A one-pot procedure for the synthesis of alkynes and bromoalkynes from aldehydes. *Tet Lett* **40**, 8575–8578 (1999).
- 57 a) Heck, R. F. & Nolley, J. P. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J Org Chem* **37**, 2320–2322 (1972).  
b) *Metal-catalyzed cross-coupling reactions* (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).
- 58 Luche, J. L. Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones. *J Am Chem Soc* **100**, 2226–2227 (1978).
- 59 Corey, E. J., Gilman, N. W. & Ganem, B. E. New methods for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids and esters. *J Am Chem Soc* **90**, 5616–5617 (1968).
- 60 Toth, P. M. *et al.* Development of Improved PPAR $\beta/\delta$  Inhibitors. *ChemMedChem* **7**, 159–170 (2012).
- 61 Ponec, R. & Řeřicha, R. Theoretical study of the catalytic activity of platinum(II) and palladium(II) complexes in cis-trans isomerisations of alkenes. *J Organomet Chem* **341**, 549–557 (1988).
- 62 Oh, K.-B. *et al.* Discovery of Diarylacrylonitriles as a Novel Series of Small Molecule Sortase A Inhibitors. *J Med Chem* **47**, 2418–2421 (2004).
- 63 Berechnet mittels <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>
- 64 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* **23**, 3–25 (1997).

- 65 Zhu, P., Goh, Y. Y., Chin, H. F. A., Kersten, S. & Tan, N. S. Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Biosci Rep* **32**, 211–219 (2012).
- 66 Adhikary, T. *et al.* Inverse PPAR $\beta/\delta$  agonists suppress oncogenic signaling to the ANGPTL4 gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene* **32**, 5241–5252 (2012).
- 67 Toth, P. *Entwicklung von Antagonisten und inversen Agonisten für den Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptor Beta/Delta auf Basis der Struktur von GSK0660* (Verlag Dr. Hut, ISBN 978-3-8439-1069-9, 2013).
- 68 Luckhurst, C. A. *et al.* Discovery of isoindoline and tetrahydroisoquinoline derivatives as potent, selective PPAR $\delta$  agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 492–496 (2011).
- 69 Leslie, B. J. & Hergenrother, P. J. Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents. *Chem Soc Rev* **37**, 1347 (2008).
- 70 Hashimoto, M. & Hatanaka, Y. Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *Eur J Org Chem* **2008**, 2513–2523 (2008).
- 71 Dess, D. B. & Martin, J. C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J Org Chem* **48**, 4155–4156 (1983).
- 72 Hashimoto, M. & Hatanaka, Y. Practical conditions for photoaffinity labeling with 3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine photophore. *Anal Biochem* **348**, 154–156 (2006).
- 73 Dubinsky, L., Krom, B. P. & Meijler, M. M. Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorg Med Chem* **20**, 554–570 (2012).
- 74 Naruhn, S. *et al.* High-Affinity Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$ -Specific Ligands with Pure Antagonistic or Inverse Agonistic Properties. *Mol Pharmacol* **80**, 828–838 (2011).
- 75 Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 350–356 (2008).
- 76 Interne, nicht publizierte, Ergebnisse.



*Ich danke allen, die mich in dieser Zeit begleitet haben.*