

**Entwicklung polymerer Carbanionen-Äquivalente zur
Anwendung in milden C-C-Verknüpfungen und deren
Einsatz in der Synthese von Aspartylprotease-
Inhibitoren des Norstatin-Typs**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

STEFFEN WEIK

Tag der mündlichen Prüfung 27.10.2004

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Rademann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn PROF. DR. JÖRG RADEMANN

im Arbeitskreis von

Herrn PROF. DR. GÜNTHER JUNG

in der Zeit von Oktober 2000 bis Juni 2004 am Institut für Organische Chemie der
EBERHARD-KARLS-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn PROF. DR. JÖRG RADEMANN danke ich sehr herzlich für die intensive Förderung und
Betreuung, die interessante Aufgabenstellung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn PROF. DR. GÜNTHER JUNG danke ich sehr für die hervorragenden Arbeits-
bedingungen, für die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und sein mir
entgegengebrachtes Vertrauen.

Danksagungen

MICHAEL BARTH, JÖRG BAUER und DR. UDO MARQUARDT danke ich vielmals für das sehr gute Arbeitsklima im Labor 10M31, für anregende Diskussionen und Hilfe in der Not.

PROF. DR. MARTIN E. MAIER danke ich für die Möglichkeit zur Mitbenutzung verschiedener Ressourcen seines Arbeitskreises (LC-MS, Ozon-Generator).

ANDREAS PETRI, ALEXANDER BAYER und DR. CHRISTIAN HERB danke ich für zahlreiche apparative Unterstützung und Einarbeitung in die LC-MS-Anlage.

DR. ROLAND BROCK und RAINER FISCHER danke ich für die Erlaubnis zur Benutzung und die Einarbeitung in die präparative HPLC-Anlage.

Den Mitgliedern der AG SÜBMUTH danke ich für die analytische Unterstützung durch MS- und LC-MS-Messungen.

GRAEME NICHOLSON danke ich für die GC-/GC-MS-Untersuchungen.

PROF. DR. GERHARD KLEBE, DR. ANDREAS EVERS, ALEXANDER HILLEBRECHT, TORSTEN LUKSCH und JARK BÖTTCHER, Universität Marburg, danke ich für die Zusammenarbeit beim Molecular Modelling und der biologischen Testung der synthetisierten Norstatine.

PAUL SCHULER danke ich für die Durchführung von NMR-Messungen und seine Hilfsbereitschaft bei allen Fragen zur NMR-Spektroskopie.

Frau NGUYEN danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren.

URSULA BECKER-SANZENBACHER danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen und Problemen.

JÖRG BAUER und DR. GERHARD SORG danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen, die nicht namentlich erwähnt worden sind, danke ich für das sehr gute Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau ANTJE für ihre Unterstützung und Geduld während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ALLGEMEINER TEIL	1
1.1 EINLEITUNG.....	1
1.2 MODERNE METHODEN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE.....	3
1.2.1 Targetidentifizierung, -validierung und -charakterisierung.....	4
1.2.2 Assay-Entwicklung und Hochdurchsatz-Screening.....	5
1.2.3 Kombinatorische Chemie und Festphasen-unterstützte Synthese.....	8
1.2.3.1 Das Prinzip der Kombinatorischen Chemie.....	8
1.2.3.2 Das Prinzip der Festphasen-Synthese.....	9
1.2.3.3 Kombinatorische Synthese in Lösung.....	10
1.2.4 Computer-unterstütztes Drug Design.....	12
1.2.4.1 Klassische QSAR und 3D-QSAR.....	13
1.2.4.2 Struktur-basiertes Liganden-Design.....	15
1.2.4.3 <i>De novo</i> -Design und Docking.....	16
1.3 PROTEASEN ALS MOLEKULARE TARGETS.....	17
1.3.1 Bedeutung der Proteasen.....	17
1.3.2 Einteilung der Proteasen.....	19
1.3.3 Wirkmechanismus der Proteasen.....	22
1.4 MALARIA.....	24
1.5 PROTEASE-INHIBITOREN.....	29
1.5.1 Strukturelemente potenzieller Protease-Inhibitoren.....	29
1.5.2 Bekannte synthetische Inhibitoren von Plasmeypsin II.....	34
1.6 NORSTATINE.....	37
1.6.1 Synthetische Norstatine als Aspartylprotease-Inhibitoren.....	37
1.6.2 Norstatine als Naturstoffe.....	39
1.6.3 Synthetischer Zugang zu Norstatinen.....	40
1.6.3.1 Synthesen in Lösung.....	41
1.6.3.2 Synthesen an der festen Phase.....	48
1.7 CARBANIONEN-ÄQUIVALENTE.....	51

2 AUFGABENSTELLUNG	58
3 POLYMERE (CYANMETHYLEN)PHOSPHORANE	60
3.1 EINLEITUNG	60
3.2 AUFBAU VON POLYMEREN PEPTIDYL- α -KETOPHOSPHORANEN.....	62
3.2.1 Darstellung von polymerem WITTIG-Phosphonium-Salz	62
3.2.2 Deprotonierung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran	64
3.2.3 Acylierung von polymerem (Cyanmethylen)phosphoran.....	67
3.2.4 Festphasen-Peptidsynthese am Phosphoran-Linker	72
3.2.5 Chemische Charakterisierung acylierter (Cyanmethylen)phosphoran-Harze	74
3.3 OXIDATIVE ABSPALTUNG ZU α -KETO-VERBINDUNGEN UND REDUKTION.....	76
3.3.1 Oxidative Abspaltung zu α -Ketoestern.....	76
3.3.2 Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoestern	83
3.3.3 Oxidative Abspaltung zu α -Ketosäuren.....	85
3.3.4 Oxidative Abspaltung zu α -Ketoamiden	86
3.3.5 Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoamiden	89
3.4 ANSÄTZE FÜR EINE OPTIMIERUNG DER REAKTIONSSEQUENZ	91
3.5 DESIGN EINER VIRTUELLEN VERBINDUNGSKOLLEKTION POTENZIELLER PLASMEPSIN II- INHIBITOREN.....	94
3.6 ABWANDLUNG DER VORGESTELLTEN REAKTIONSSEQUENZ	98
3.6.1 Oxidative Abspaltung zu Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethylestern	98
3.6.2 Reduktion von Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethylestern.....	102
3.6.3 Racemisierungsfreie Acylierung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes.....	107
3.6.4 Verseifung von Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethylestern	114
3.6.5 Kupplung von Peptidyl- α -hydroxysäuren auf Peptidyl-TCP-Harz	115
3.7 SYNTHESE DER NORSTATIN-VERBINDUNGSKOLLEKTION	117
3.7.1 Synthese der Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethylester.....	117
3.7.2 Erweiterte Untersuchung auf Erhalt der Konfiguration	121
3.7.3 Synthese der Norstatin-Zielverbindungen	123
3.8 BIOLOGISCHE TESTUNG DER SYNTHETISIERTEN NORSTATIN-KOLLEKTION	127
3.8.1 Plasmepsin II-Assay	127
3.8.2 HIV-Protease-Assay	130
3.9 SYNTHESE WEITERER NORSTATINE.....	131
3.9.1 Synthese des Naturstoffs Probestin	131
3.9.2 Synthese eines Norstatins mit Caspase-3-Erkennungssequenz	132
3.10 DIASTEREOSELEKTIVE REDUKTION	139

4 POLYMERE FORMALDEHYDDHYDRAZONE	146
4.1 EINLEITUNG	146
4.2 SYNTHESE VON AP-HARZ	149
4.2.1 Synthese von (3 <i>R</i>)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol	149
4.2.2 Immobilisierung von (3 <i>R</i>)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol	150
4.2.3 Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe zum AP-Harz	151
4.2.4 Charakterisierung des AP-Harzes	152
4.3 SYNTHESE UND ANWENDUNG VON FH-HARZ	154
4.3.1 Formaldehydhydrazonbildung an AP-Harz	154
4.3.2 Nucleophile Addition von FH-Harz an Fmoc-Phenylalaninal	156
4.3.3 Einführung einer O-Silylschutzgruppe	157
4.3.4 Synthese-Monitoring durch IR-Spektroskopie	158
4.3.5 Freisetzung des Reaktionsproduktes durch Hydrazon-Spaltung	159
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	163
6 EXPERIMENTELLER TEIL	166
6.1 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	166
6.2 GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN	166
6.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	166
6.2.2 Infrarotspektroskopie (FT-ATR-IR)	167
6.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	167
6.2.4 Massenspektrometrie (ES-MS)	168
6.2.5 HPLC-ES-MS-Kopplung	169
6.2.6 GC-/GC-EI-MS-Analytik zur Konfigurationsbestimmung von α -Hydroxy- β -aminosäure-Bausteinen	169
6.2.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	170
6.2.8 Mikrowellenunterstützte Synthesen	170
6.2.9 KAISER-Test	171
6.2.10 Ermittlung der Harzbelegung durch UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung	171
6.2.11 Ozonolyse	172
6.2.12 Polarimetrie	172
6.3 POLYMERE (CYANMETHYLEN)PHOSPHORANE	173
6.3.1 Synthese von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (85)	173
6.3.2 Synthese von α -Hydroxymethylestern, α -Hydroxyamiden und α -Ketosäuren	174
6.3.2.1 Acylierung von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz und Peptidsynthese	174
6.3.2.2 Oxidative Abspaltungen vom Phosphoran-Linker mit Ozon und Reduktion der Abspaltprodukte	175
6.3.3 Synthese einer Norstatin-Verbindungskollektion	179
6.3.3.1 Aufbau polymerer Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)phosphorane	179

6.3.3.2 Oxidative Abspaltung von Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethern und Reduktion (Verbindungen IH Xa,b-E)	180
6.3.3.3 Umsetzung von Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethern zu Norstatinen (Verbindungen IH Xa,b)	184
6.3.4 Synthese des Naturstoffs Probestin	187
6.3.5 Synthese eines Norstatins mit Caspase-3-Erkennungssequenz	189
6.3.6 Versuche zur diastereoselektiven Reduktion	190
6.4 POLYMERE FORMALDEHYDHYDRAZONE	191
6.4.1 Synthese von (3 <i>R</i>)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (183).....	191
6.4.2 Synthese von Formaldehydhydraton-Harz (FH-Harz) (175)	192
6.4.3 Homologisierung von Fmoc-Phenylalaninal zum geschützten α -Hydroxyaldehyd (179).....	194
7 LITERATURVERZEICHNIS	197

Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurde gemäß den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem* **1984**, *138*, 9-37] der Ein- oder Dreibuchstaben-Code verwendet.

Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AP	1-Aminopyrrolidin
AMCA	6-{{(7-Amino-4-methyl-cumarin-3-yl)acetyl}amino}hexansäure
BEMT	2-Brom-3-ethyl-4-methylthiazolium-tetrafluoroborat
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluoro-phosphat
BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
Bz	Benzoyl
CDI	1,1'-Carbonyl-diimidazol
CIP	CAHN-INGOLD-PRELOG
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N-Ethyldiisopropylamin
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMDO	Dimethyldioxiran
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.r.	Diastereomerenverhältnis
EA	Elementaranalyse
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid
EC	Enzyme commission
EI-MS	Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

eq.	Äquivalente
ES-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FH	Formaldehydhydrazon
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HIV	human immunodeficiency virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
IC ₅₀	Konzentration, die 50 % Enzyminhibierung verursacht
IR	Infrarot
kD	Kilodalton
<i>K_i</i>	Komplexbildungs-/Inhibitionskonstante
λ	Wellenlänge
LC	Flüssigkeitschromatographie
M	Molarität
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
MW	Mikrowelle
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N	Normalität
n.b.	nicht bestimmt
NMR	Kernresonanzspektroskopie
p.a.	pro analysi
PASP	Polymer-Assisted-Solution-Phase
PG	Protecting group
pH	potentia hydrogenii (pH-Wert)
PP	Polypropylen
PET	Polyethylenterephthalat
ppm	parts per million
PS	Polystyrol

PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
R	Rest
RFU	Relative Fluoreszenz-Einheit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAMP	(<i>S</i>)-1-Amino-2-(methoxymethyl)pyrrolidin
SPOS	Solid-Phase-Organic-Synthesis
SPPS	Solid-Phase-Peptide-Synthesis
t	Triplett
t	Zeit
TASF	Tris-(dimethylamino)-sulfonium-difluortrimethylsilicat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyl-dimethylsilyl
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenchromatogramm
TIS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TMOF	Orthoameisensäure-trimethylester
TMSE	Trimethylsilylethyl
TMSEtOH	Trimethylsilylethanol
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl (Cbz)

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Die Behandlung und Heilung von bereits lange bekannten und auch neu auftretenden Krankheiten durch in planmäßiger Art und Weise hergestellte Arzneien war und ist ein Menschheitstraum. Bereits im Zeitalter der Alchemisten war man auf der Suche nach dem Allheilmittel, dem Wunderelixier, welches man *Arkanum* nannte. Der Traum blieb unerfüllt. Die Erkenntnis, dass nicht alle Leiden auf gleiche Weise behandelbar sind, erscheint aus heutiger Sicht selbstverständlich, doch verändert sie die Ausgangslage nur unwesentlich – das Auffinden wirksamer Arzneimittel steht am Ende eines in der Regel mühevollen, zeitaufwändigen und kostenintensiven Prozesses.

Dabei ist auf keinen Fall zu verkennen, dass bereits die frühe Volksmedizin, eventuell noch verknüpft mit allerlei Aberglaube und Unwissen, brauchbare Behandlungsansätze mehr oder weniger durch Zufall hervorbrachte. Wirkstoffe bestanden aus Mineralien sowie pflanzlichen und tierischen Inhaltsstoffen. Erst mit dem Aufkommen der Organischen Chemie im 19. Jahrhundert wurde dieses Spektrum auf chemisch modifizierte Naturstoffe mit verbesserter oder andersartiger Wirkungsweise ausgeweitet, wobei erste Erfolge bei der Strukturaufklärung hilfreich waren. Charakteristisch für diesen historischen Abschnitt der Wirkstoffsuche sind prominente Naturstoffe bzw. Analoga, denen in jener Zeit großes Anwendungspotenzial vorhergesagt wurde, z. B. Heroin und Kokain, Kandidaten, die aus offensichtlichen Gründen dann doch nur bedingt geeignet waren. Schließlich hielten bei der Bekämpfung von Seuchen und Infektionskrankheiten, die bis dahin mehr Menschenleben als alle Kriege gefordert hatten, verstärkt biologische Konzepte Einzug.

Heute wie damals ist und war die Vorgehensweise geprägt von Versuch und Irrtum. Wenn sich Experimente nicht mit einer vorher aufgestellten Arbeitshypothese zur Deckung bringen lassen, müssen neue verfeinerte Hypothesen aufgestellt werden. Dennoch erfolgt die Suche nach neuen Medikamenten unter Einbeziehung aller inzwischen existierenden Erkenntnisse der Naturwissenschaften heutzutage viel professioneller und planmäßiger. Der wesentlichste Unterschied dürfte dabei in der Tatsache liegen, dass man zunächst die zu bekämpfende Krankheit an sich aufklärt, um Licht in ihre molekularen Ursachen und Mechanismen zu bringen und Ansätze für eine Therapie zu erkennen. Zufällig aufge-

fundene Wirkstoffe und solche unbekannter Wirkungsweise sollen damit der Vergangenheit angehören, die Zahl der Wirkstoffe zunehmen.

In seiner gesamten Komplexität mit allen wechselseitigen Abhängigkeiten und Rückkopplungen ist in Abb. 1-1 der Weg dargestellt, der bei der Arzneimittelentwicklung üblicherweise beschritten wird. Hierbei stellen die Identifizierung eines biologischen Targets, das Auffinden einer Leitstruktur und deren Optimierung die wichtigsten Etappen dar. Nur ein Zusammenspiel vieler (natur)wissenschaftlicher Disziplinen kann zur Entwicklung eines marktreifen Wirkstoffs führen.

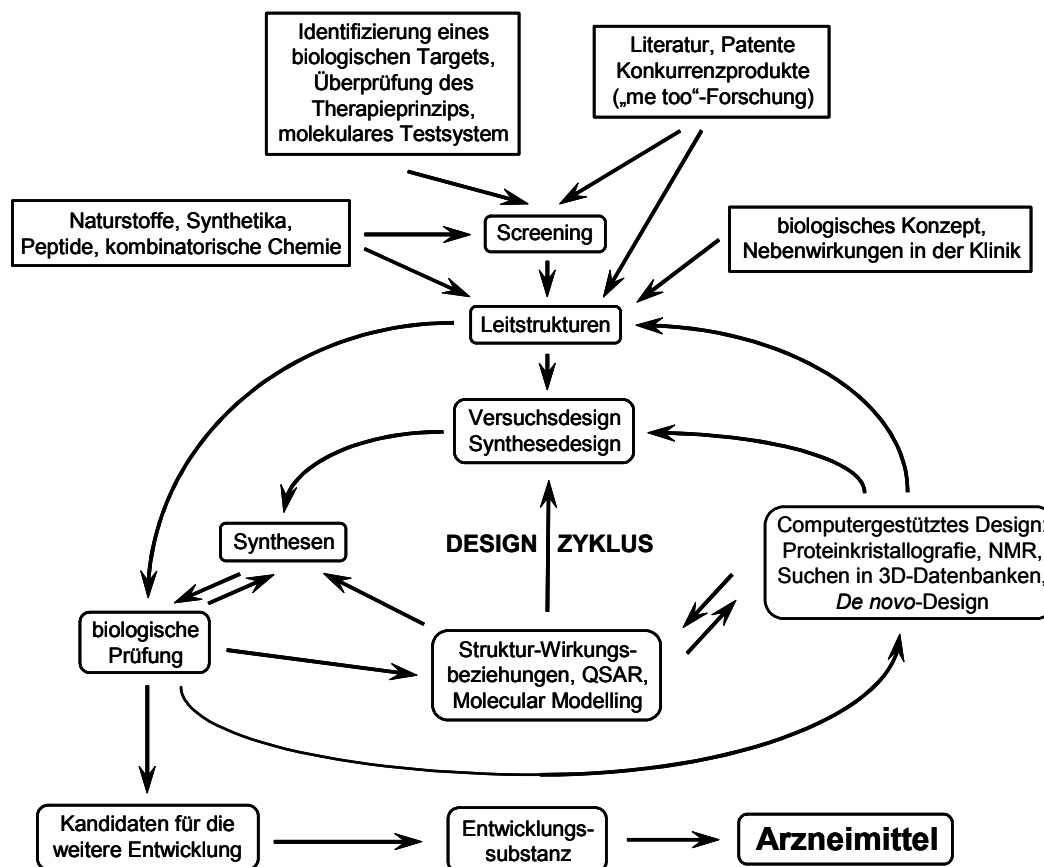


Abb. 1-1: Prinzipieller Ablauf bei der Entwicklung eines Arzneimittels.

Die vorliegende Arbeit hat Teilaspekte und Ausschnitte dieses Entwicklungsprozesses zum Gegenstand: Übergeordneter thematischer Zusammenhang sind weltweite Bemühungen zur besseren Behandlung der Malaria. Die Malaria ist eine sehr gründlich untersuchte Erkrankung, deren molekulare Ursachen und Zusammenhänge teilweise gut verstanden sind. Bei der Betrachtung möglicher Therapieansätze zur Heilung geraten als biologische Targets unweigerlich spezifische, vom Malaria-Erreger eingesetzte Enzyme ins Blickfeld der Forschung. Aufgrund ihrer Beteiligung am Fortschreiten der Krankheit identifiziert,

charakterisiert und validiert sind dabei besonders so genannte Plasmepepsine aus der Familie der Hydrolasen, bzw. genauer der Proteasen. Durch die Inhibition dieser Proteasen wird eine Möglichkeit zur Heilung der Erkrankung vermutet.

Der synthetische Schwerpunkt der Arbeit setzt an diesen Erkenntnissen an. Aus Vorarbeiten zur Inhibition dieser Proteasen bzw. bezüglich des Wirkmechanismus vergleichbarer Protease-Familien sind strukturelle Elemente als übergeordnete Inhibitor-Leitstruktur aus rationaler peptidomimetischer Abwandlung natürlicher Substrate und durch das Auffinden von hemmenden Naturstoffen bekannt. Ziel der Arbeit war die Entwicklung neuer Festphasen-unterstützter Synthesen und Synthesekonzepte zum Aufbau dieser Strukturelemente, bei denen es sich im konkreten Fall um α -Hydroxycarbonyl-Verbindungen, so genannte Norstatine, und Verbindungen mit Hydroxyethylamin-Baustein handelt. Zu deren Aufbau werden synthetisch üblicherweise Methoden zur C-C-Knüpfung angewendet. Diese Gerüst-aufbauenden C-C-Verknüpfungen werden hier durch polymere, carbanionische Linker-Reagenzien realisiert. Die Festphasen-unterstützte Chemie erfährt dadurch in diesem Bereich eine Erweiterung auf einen bisher relativ unerschlossenen Reaktionstypus.

Über den synthetischen Gesichtspunkt hinaus beinhaltet die Arbeit weiterhin die im Rahmen einer Kooperation verfolgte Anwendung theoretischer Methoden der Computational Chemistry bzw. des Molecular Modelling. So wurde versucht, potenzielle, später zu synthetisierende Inhibitoren über Docking-Experimente rational zu planen und somit bereits zu Beginn virtuell zu testen. Die tatsächliche biologische Testung synthetisierter Inhibitoren und ein Vergleich mit den Vorhersagen schließen den Prozess ab.

In den folgenden Abschnitten werden einige der in Abb. 1-1 dargestellten Teilbereiche, die mit dieser Arbeit in engerem Zusammenhang stehen, näher erläutert.

1.2 Moderne Methoden der Medizinischen Chemie

Die Medizinische Chemie ist die Wissenschaft von der Entdeckung und dem Design neuer therapeutisch verwendbarer chemischer Verbindungen und deren Entwicklung zu Arzneimitteln. Sie umfasst dabei die Synthese neuer Substanzen, Untersuchungen über Beziehungen zwischen Struktur natürlicher und/oder synthetischer Verbindungen und deren biologischen Aktivitäten, Aufklärung ihrer Wechselwirkungen mit unterschiedlichen

Rezeptoren sowie mit Enzymen und DNA und die Bestimmung von Absorption, Transport, Verteilungseigenschaften und Metabolismus dieser Substanzen^[1]. Die entlang der Wertschöpfungskette der Arzneimittelforschung beteiligten Schlüsseltechnologien und -aktivitäten werden im Folgenden beleuchtet^[2].

1.2.1 Targetidentifizierung, -validierung und -charakterisierung

Der Prozess der Wirkstoffentwicklung beginnt mit der Identifizierung biologischer Targets, von denen angenommen wird, dass sie mit bestimmten Krankheitsstadien in direkter Verbindung stehen. Informationen darüber, wie die Rolle dieser Targets bei der Regulierung des Krankheitsverlaufes genau aussieht, können auf vielfältige Weise gewonnen werden. Bedeutende Fortschritte im Verständnis der grundlegenden und wesentlichen Prozesse der Signalübertragung in und zwischen Zellen sowie neuere Teildisziplinen wie Genom- und Proteomanalyse (Functional Genomics, Proteomics)^[3,4] und Bioinformatik^[5] tragen ihren Teil dazu bei, dass eine Fülle neuartiger Targets als potenzielle Therapieansätze zur Verfügung stehen. Nicht zuletzt Großprojekte wie die Aufklärung des menschlichen Genoms führen zur Identifizierung neuer Gene, deren exprimierte Proteine nach Validierung ihrer physiologischen oder pathologischen Bedeutung als Startpunkte dienen können. Zu den Standardtechniken gehören dabei neben der automatisierten Sequenzierung und Klonierung differenzielle Genexpressionsanalysen mit DNA-Mikroarray-Chips (Expression Profiling)^[6] zum Vergleich des Protein-Pools gesunder und im Krankheitsbild veränderter Zellen sowie die Suche nach Homologien zwischen neuen und bereits in Datenbanken erfassten Gensequenzen zur Eingruppierung in bekannte Genfamilien mit möglicherweise schon bekannten Funktionen.

Nicht nur die Frage, ob ein Target an einem Krankheitsgeschehen beteiligt ist muss bei seiner Validierung beantwortet werden, sondern auch die, ob die Beeinflussung des entsprechenden biologischen Systems zu der gewünschten Beeinflussung der Krankheit führt. Obwohl ein endgültiger Beweis erst durch klinische Studien an Patienten erbracht werden kann, bemüht man sich aus offensichtlichen Gründen bereits in einer sehr frühen Phase, eine möglichst umfassende Aufklärung der Zusammenhänge zu erreichen. Hierbei kommen molekularbiologische Verfahren zum Aufbau von *in-vivo*-Modellen, wie z. B. transgenen oder Knockout-Mäusen (homologe Rekombination), zum Einsatz. Antisense-Technologien, Ribozyme und neutralisierende Antikörper stellen weitere wichtige Methoden dar.

Zur strukturellen Charakterisierung von Target-Proteinen werden vor allem zwei Verfahren angewendet: die Kristallstrukturanalyse^[7] und die hochauflösende mehrdimensionale NMR-Spektroskopie^[8]. Weitere praktische Bedeutung, vor allem bei der Strukturaufklärung membrangebundener Proteine, hat die Elektronenmikroskopie^[9].

Die Kristallstrukturanalyse, mit der bisher Proteine bis zu einer Größenordnung von ca. 4000 Aminosäuren aufgeklärt wurden, beginnt mit der teilweise sehr mühsamen Kristallisation des Proteins. Teilweise müssen schlecht kristallisierbare Proteine bei ihrer molekularbiologischen Herstellung durch Punktmutationen und damit Austausch von Aminosäuren strukturell abgewandelt werden, um eine Kristallisation durch veränderte Oberflächeneigenschaften zu ermöglichen. Durch Röntgenbeugung, d. h. Bestimmung der Elektronendichte, ergibt sich die Verteilung der Atome und damit die Strukturinformation, wobei aber z. B. Wasserstoff-Atome nicht zu sehen sind.

Mit mehrdimensionalen NMR-Techniken, bei denen man wechselseitig induzierte Informationsübertragung der Magnetisierungszustände benachbarter Kerne detektiert, kann man heute Spektren von Proteinen mit bis zu 300 Aminosäuren interpretieren. Man erhält dabei nicht nur Informationen über die unmittelbare, über kovalente Bindungen verknüpfte Nachbarschaft der Kerne, sondern auch über Geometriebeziehungen zwischen unterschiedlichen, nicht direkt kovalent verknüpften Abschnitten des Makromoleküls (nuklearer OVERHAUSER-Effekt, NOE). Es können dadurch intramolekulare Abstände ermittelt werden, die zusammen mit der Konnektivität, d. h. dem Wissen über die Sequenz eines Proteins, über Distanzgeometrie-Rechnungen letztlich zu den Raumkoordinaten der Atome führen. In der Regel ergibt sich dabei eine Schar von Strukturvorschlägen, die durch Moleküldynamik-Simulationen weiter verfeinert werden.

1.2.2 Assay-Entwicklung und Hochdurchsatz-Screening

Nach der Identifizierung eines interessanten biologischen Targets stellt dessen Einbindung in einen Bioassay, aus dem sich eine biologische Aktivität auslesen lässt, die nächste Herausforderung dar. Die Bandbreite potenzieller Targets, die von Enzymen und Rezeptoren bis hin zu gesamten zellulären Systemen reichen kann, spiegelt sich in den Techniken zum Aufbau eines Assays und den verfügbaren Assay-Typen unmittelbar wieder. Ziel eines Assays ist die Möglichkeit zur direkten oder indirekten Messung einer Beeinflussung der biologischen Aktivität eines Targets, beispielsweise durch Wechselwirkung mit einem

möglichen Wirkstoff. Die Etablierung eines Assays ist Grundvoraussetzung für das Hochdurchsatz-Screening (High-throughput Screening, HTS) und Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (Structure-activity relationship, SAR). Beispiele für erfolgreiches Assay-Design sind Assays zur Messung von Enzym-Substrat- oder Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen, Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion, Rezeptorantagonismus und -agonismus, Zelltod und Zellproliferation. Unabhängig vom speziellen Anwendungsproblem muss ein Assay so gestaltet werden, dass seine Parameter den natürlichen Gegebenheiten möglichst genau nachempfunden sind, um *in vitro* unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden zu können. Schon beim Aufbau sollte eine mögliche Anwendung im automatisierten HTS einkalkuliert werden, die große Anforderungen an Stabilität, Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit des Assays stellt. Üblicherweise dienen bereits existierende, ähnliche Assays als Ausgangspunkt und werden aktuellen Erfordernissen angepasst. Bei der Übertragung eines etablierten Assays in ein parallelisiertes, miniaturisiertes und automatisiertes HTS-Format müssen zahlreiche weitere Faktoren berücksichtigt werden. Logistisch ergeben sich Fragen des Proben- und Flüssigkeitsmanagements, Geräte-technisch werden hohe Anforderungen an die Pipettiermethode und -genauigkeit gestellt und auch die Verwaltung der gesammelten Messdaten muss geordnet ablaufen, um systembedingte falsch-positive oder falsch-negative Hits zu unterdrücken.

Assays lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, in biochemische und zelluläre Techniken. Innerhalb dieser Gruppen ergeben sich weitere Unterscheidungen aufgrund der Detektionstechnik. Die wichtigsten dabei sind die radiochemische Detektion sowie die Messung von Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz, wobei jede Kombination ihre spezifischen Vor- aber auch Nachteile besitzt^[10,11]. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal stellt die Frage nach der Homogenität oder Nichthomogenität eines Assays dar. In einem homogenen Assay wird nach Vereinigung der Reagenzien und Inkubation der durch die zu testenden Verbindungen ausgelöste Effekt direkt vermessen, bei einem nicht-homogenen Assay müssen noch Separations- bzw. Waschschrte eingeschoben werden. Die homogene Testung gilt als effektiveres Format, dennoch basieren viele Assays auch auf nicht-homogenen Varianten, insbesondere des ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Die auf Fluoreszenz-Detektion basierenden, vor allem mit homogenen Methoden kompatiblen Detektionstechniken nutzen die Fluoreszenz-Polarisation (Fluorescence polarization, FP)^[12], Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Fluorescence correlation spectroscopy,

FCS)^[13] und den Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[14].

Im Kontrast zu wohldefinierten biochemischen Einzeltarget-Assays repräsentieren zelluläre Assays ein Netzwerk miteinander gekoppelter Transduktionswege, entlang derer Testsubstanzen eine Antwort auslösen können. Es ist bei zellulären Assays von Vorteil, dass Testsubstanzen oftmals gleichzeitig auf absolut notwendige Stoffeigenschaften vorselektiert werden, z. B. auf Membrangängigkeit und geringe Zelltoxizität.

Nach Etablierung eines Assays bezeichnet Hochdurchsatz-Screening letztlich den Prozess, bei dem eine sehr große Anzahl von Verbindungen aus verschiedensten Quellen wie z. B. aus synthetischen Verbindungskollektionen, Naturstoffextrakten und durch kombinatorische Chemie erzeugten Bibliotheken gegen biologische Targets getestet wird. Dem Ansatz liegt der Gedanke zu Grunde, dass allein durch die riesige Zahl getesteter Verbindungen das Auffinden entwickelbarer, aktiver Wirkstoffe in dieser frühen Phase der Leitstruktur-Entwicklung wahrscheinlich wird. Es handelt sich meist um ein rein durch den Zufall bedingtes Screening.



Abb. 1-2: Automatisiertes Hochdurchsatz-Screening.

Im Anschluss an das Primär-Screening erfolgt eine Analyse und Validierung der aktiven Verbindungen. Dazu werden bereits in die Messung Kontroll- und Blindmessungen integriert, Mehrfachmessungen durchgeführt und statistische Schwankungen abgeglichen. Außerdem wird möglichst früh quantitativ definiert, wo die Grenze zwischen einer repräsentativen Anzahl aktiver und inaktiver Analoga verläuft. Das Primär-Screening schließt damit, dass identifizierte, aktive Verbindungen direkt im Anschluss weiteren Assays in einem funktionellen Sekundär-Screening zugeführt werden.

Die Aktivität einer chemischen Verbindung an einem Target ist eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Anforderung an einen medikamentös einsetzbaren Wirkstoff. Neben der Aktivität muss der Wirkstoff über ausreichende Selektivität verfügen. Darüber hinaus gibt es weitere Anforderungsprofile bezüglich Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität (ADMET-Kriterien). Diese Aspekte spielen inzwischen bereits in einer sehr frühen Entwicklungsphase einer so genannten Leitstruktur eine sehr wichtige Rolle. So wird eine aktive Verbindung mit weiteren etablierten Assays umgehend auch z. B. auf Inhibition humaner Leberenzyme, Mutagenese-Aktivität und mögliche kardiologische Nebenwirkungen geprüft. Dies, zusammen mit eher empirisch aufgestellten, wenn auch auf experimentellen und Computermethoden basierenden Anforderungen wie LIPINSKIS „Rule of five“^[15], führt schließlich dazu, eine Leitstruktur aus dem HTS heraus in die Entwicklung zu führen.

1.2.3 Kombinatorische Chemie und Festphasen-unterstützte Synthese

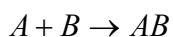
Mit der sehr schnellen Bereitstellung sehr großer Verbindungszahlen für ein Hochdurchsatz-Screening an etablierten Assays sind die klassischen Methoden der organischen Synthese überfordert. Ebenso stellen sie für eine strukturelle Abwandlung einer Leitstruktur im Zuge einer Leitstruktur-Optimierung nicht die geeignetsten Werkzeuge zur Verfügung. So wurde verstärkt seit etwa 1992 unter Einbeziehung der Kombinatorik die organische Festphasen-Synthese (Solid-phase organic synthesis, SPOS) entwickelt^[16-21]. Sie ist eine Weiterentwicklung und Ausdehnung der bereits von MERRIFIELD 1963 vorgestellten Festphasen-Peptidsynthese (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)^[22].

1.2.3.1 Das Prinzip der Kombinatorischen Chemie

Dem Prinzip der Natur folgend, die mit zweimal vier Nucleotiden und 20 α -Aminosäuren als Bausteine in der Lage ist, eine sehr große Anzahl von Peptiden und Proteinen aufzubauen, versucht man in der Kombinatorischen Chemie, mit möglichst wenigen Reaktionsschritten möglichst sterisch wie elektronisch diverse Strukturen zu erzeugen. Es werden im Gegensatz zur klassischen Synthese nicht zwei Edukte (A, B) zu einem Produkt umgesetzt, sondern es werden so genannte „Building Blocks“, Eduktbausteine A_m, B_n

miteinander kombiniert (Abb. 1-3). Die Umsetzung definierter Mischungen der „Building Blocks“ miteinander führt zu so genannten Verbindungsbibliotheken, nach Durchführung paralleler Reaktionsansätze in einzelnen Kompartimenten werden Arrays von Einzelverbindungen erhalten^[23,24].

Klassische Synthese:



Kombinatorische Synthese:

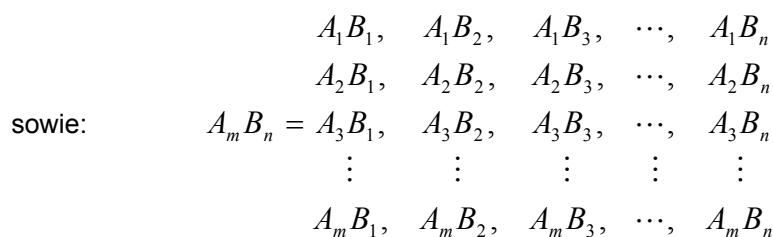


Abb. 1-3: Schematischer Vergleich zwischen klassischer und kombinatorischer Synthese. A_m und B_n bezeichnen Synthesebausteine zum Aufbau einer großen Verbindungsanzahl.

1.2.3.2 Das Prinzip der Festphasen-Synthese

Zur Synthese an fester Phase wird ein Edukt über einen so genannten Linker kovalent an ein polymeres Trägermaterial angebunden. Die chemische Anbindung muss mit den folgenden, Harz-gebundenen Reaktionsschritten kompatibel sein, nach der Reaktionssequenz aber auch die Abspaltung des aufgebauten Produktmoleküls erlauben.

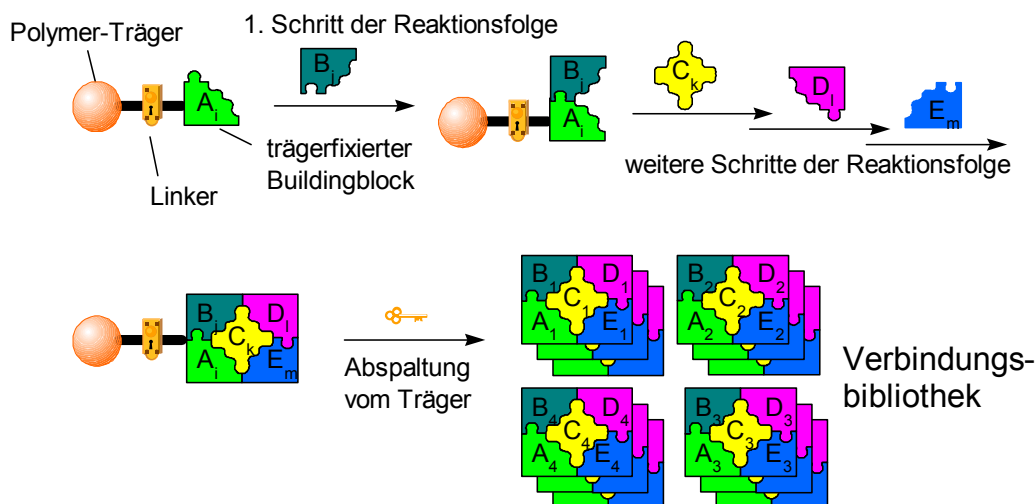


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Festphasen-Synthese: Möglichkeit zur parallelen Synthese von Verbindungskollektionen.

1.2.3.3 Kombinatorische Synthese in Lösung

Trotz geringerer Parallelisierungsmöglichkeiten hat die kombinatorische Lösungssynthese in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen^[25,26].

Die Vorteile der Synthese in Lösung allgemein sind vor allem die freie Wahl der Reaktionsbedingungen wie z. B. Temperatur, Reagenzien und heterogene oder homogene Reaktionsführung. Außerdem können jederzeit Standardmethoden zur Reaktionskontrolle und Analytik eingesetzt werden. Nachteilig wirkt sich vor allem die notwendige Aufarbeitung und Reinigung von Zwischenprodukten aus, welche den Einsatz von Reagenzienüberschüssen erschwert und deshalb teilweise nur unvollständige Umsetzungen bedingt. Außerdem sind Lösungssynthesen schwieriger automatisierbar.

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu vermeiden oder teilweise zu lösen, ist das Arbeiten mit Polymer-gebundenen Reagenzien. Die Synthese unter Verwendung polymerer Reagenzien (Polymer-assisted solution phase synthesis, PASP)^[27,28] unterscheidet sich von der traditionellen Festphasen-Synthese darin, dass das Polymer nicht als Anker, d. h. als Schutzgruppe beim Aufbau organischer Moleküle fungiert, sondern die Aufgabe hat, unerwünschte Nebenprodukte, verbrauchte Reagenzien und nicht umgesetzte Edukte zurückzuhalten bzw. zu entfernen. Das gewünschte Produkt wird in Lösung synthetisiert und ist zu keiner Zeit dauerhaft kovalent an das Polymer gebunden. Damit nimmt die Polymer-unterstützte Flüssigphasen-Synthese eine Zwischenstellung zwischen reiner Lösungs- und reiner Festphasen-Chemie ein und verbindet die jeweiligen Vorteile.

Für polymere Reagenzien gibt es drei grundlegende Anwendungsformen. Das polymere Material dient hierbei als Reagenz, Katalysator oder Scavenger. Bei Verwendung als Scavenger kann zwischen der Entfernung von Nebenprodukten oder der Isolierung des Produktes aus dem Reaktionsansatz unterschieden werden.

Die Modifizierung eines polymeren Materials zu einem chemischen Reagenz stellt die weitaus häufigste Anwendung bei PASP-Synthesen dar. Ein Substrat reagiert dabei mit einem funktionalisierten Polymer zu einem neuen chemischen Produkt ab (Abb. 1-5). Nach der Reaktion werden überschüssiges sowie verbrauchtes Reagenz durch Waschen und Filtrieren entfernt.

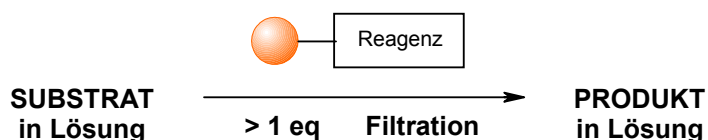


Abb. 1-5: Umsetzung von Substraten mit reaktiven Polymeren: stöchiometrische polymere Reagenzien.

In ähnlicher Weise können Polymer-gebundene Katalysatoren eingesetzt werden. Nach der Reaktion wird der Katalysator durch einfaches Filtrieren entfernt (Abb. 1-6) und kann u. U. wieder verwendet werden.

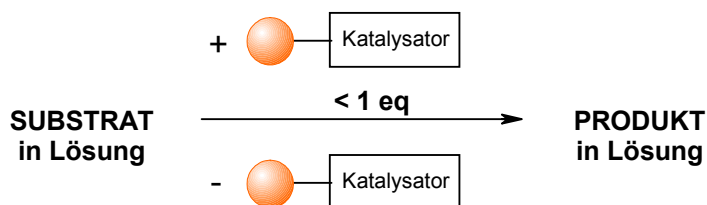


Abb. 1-6: Verwendung eines Polymer-unterstützten Katalysators.

Polymere Scavenger werden zur Aufarbeitung von Reaktionslösungen nach beendeter Reaktion benutzt, d. h. die eigentliche Umsetzung läuft analog der klassischen Synthese in Lösung. Es lassen sich auf diese Weise nicht umgesetztes Edukt, unerwünschte Nebenprodukte und andere Reaktionszusätze (z. B. Säuren, Basen, Kupplungsreagenzien etc.) selektiv entfernen (Abb. 1-7; Festphasen-Extraktion). Voraussetzung ist, dass Verunreinigung und Scavenger über zueinander komplementäre Reaktivitäten verfügen (sauer \Leftrightarrow basisch; elektrophil \Leftrightarrow nucleophil)^[29].

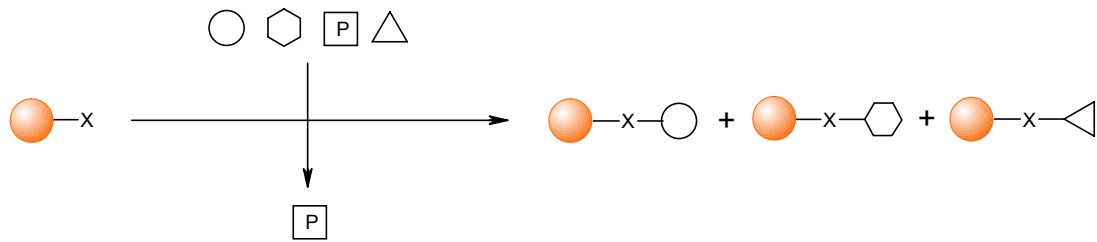


Abb. 1-7: Verwendung polymerer Scavenger-Reagenzien: Aufreinigung des Produktes P durch Entfernung von überschüssigem Substrat sowie Nebenprodukten und Zusätzen.

Ein zur vorgestellten Scavenger-Technik inverses Vorgehen stellt die sehr verwandte „Catch-and-release“-Technik^[30] dar (Abb. 1-8). Hierbei wird das Produkt durch Anbindung an ein Polymer aus dem Reaktionsgemisch isoliert, anschließend wieder freigesetzt und damit aufgereinigt.

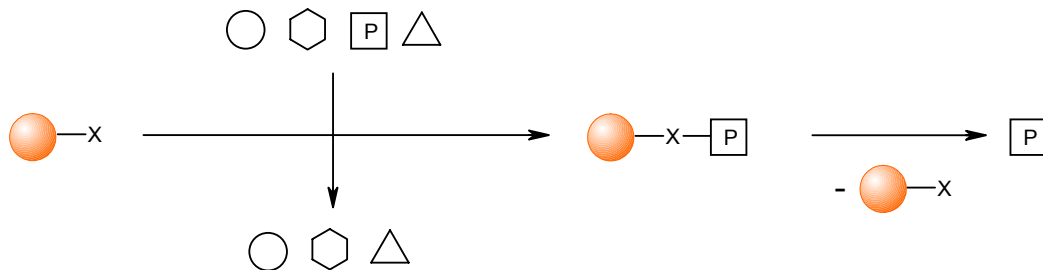


Abb. 1-8: Verwendung eines Polymer-unterstützten Scavengers bei der „Catch-and-release“-Technik.

1.2.4 Computer-unterstütztes Drug Design

Rationales Design zeichnet sich dadurch aus, dass aus gemeinsamen Merkmalen aktiver Verbindungen und strukturellen Unterschieden zu schwächer wirksamen bzw. unwirksamen Analoga Hypothesen zur Wechselwirkung zwischen Target und Ligand aufgestellt werden, um durch Optimierung unter Erhalt der Wirkqualität zu höherer Wirkstärke oder besserer Selektivität zu kommen. Durch hohe Graphik- und Rechenleistung moderner Computer wird dieser Ansatz heute bei der Wirkstoffentwicklung durch das neu etablierte Arbeitsgebiet Molecular Modelling unterstützt und vorangetrieben. Einige der Methoden aus Tab. 1-1 werden im Folgenden näher betrachtet.

Tab. 1-1: Übersicht über die wichtigsten Methoden des Molecular Modelling bei der Wirkstoffentwicklung.

Teilgebiet	Methoden
<i>Interaktive Computergraphik</i>	Darstellung von 3D-Stukturen
<i>Modellierung kleiner Moleküle</i>	Strukturerzeugung Molekülmechanik – Kraftfelder Moleküldynamik Quantenmechanische Verfahren Konformationsanalyse Berechnung physikochemischer Eigenschaften
<i>Molekülvergleich</i>	Überlagerung von Molekülen nach ihrer Ähnlichkeit Volumenvergleich 3D-QSAR (z. B. CoMFA-Methode)
<i>Modellierung von Proteinen</i>	Sequenzvergleiche von Proteinen Protein-Homologie-Modelling Simulation der Proteinfaltung
<i>Modellierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen</i>	Berechnung von Bindungskonstanten Docking von Liganden
<i>Liganden-Design</i>	Suche in 3D-Datenbanken Strukturbasiertes Liganden-Design <i>De novo</i> -Design

1.2.4.1 Klassische QSAR und 3D-QSAR

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (Quantitative structure-activity relationships, QSAR) erfassen die Zusammenhänge zwischen chemischen Strukturen und biologischen Wirkungen und beschreiben sie quantitativ mit mathematischen Modellen. Direkt verglichen werden können Substanzen mit strukturell ähnlichen Grundgerüsten, die am gleichen biologischen Target mit identischem Wirkmechanismus angreifen. Bei QSAR

wird davon ausgegangen, dass Unterschiede in der relativen Stärke der Wechselwirkung von Substanzen mit biologischen Makromolekülen in den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen bedingt sind und dass solche Wechselwirkungen in erster Näherung additiv zur Affinität eines Wirkstoffs an seinen Rezeptor beitragen. Die biologische Aktivität Φ ist also eine Funktion der chemischen Struktur C: $\Phi = f(C)$.

Bei den Arten der Wechselwirkung handelt es sich um unpolare, polare, elektronische und sterische Wechselwirkungen (Eigenschaften wie Lipophilie, Polarisierbarkeit, Volumen etc.), die über entsprechende Parameter erfasst werden. So sind die Werte dieser Eigenschaften für alle wichtigen Substituenten in Tabellen zusammengestellt. Über ein Inkrement-System lässt sich abschätzen, wie eine Änderung des Substitutionsmusters an einer Gerüststruktur die Wirkstärke beeinflusst. QSAR-Betrachtungen können erweitert werden, indem man Parameter einführt, die sich auf den Zusammenhang von Struktur und Toxizität oder Stabilität beziehen, d. h. es wird auch die Wechselwirkung mit anderen Targets berücksichtigt, die im Gesamtsystem einer toxischen Wirkung entspricht. So lässt sich über eine geeignete QSAR-Gleichung ein mathematischer Zusammenhang zwischen therapeutischem Effekt, Toxizität, chemischer Stabilität und physikochemischen Eigenschaften herleiten, wodurch wiederum Abschätzungen darüber möglich sind, ob mit einer Verbindungsklasse ein noch nicht erreichtes Ziel überhaupt realistisch ist, oder ob das Forschungsprojekt in dieser Richtung besser eingestellt werden sollte.

Im Gegensatz zu klassischen QSAR-Verfahren versuchen die so genannten 3D-QSAR-Methoden, die Bindungseigenschaften mit Kenngrößen zu korrelieren, die ausschließlich aus der 3D-Struktur eines Liganden abgeleitet werden. Dabei werden zu Beginn nur sterische und elektrostatische Wechselwirkungen in der Bindetasche in Betracht gezogen.

Ein allgemein anwendbares Verfahren stellt die vergleichende molekulare Feldanalyse (Comparative molecular field analysis, CoMFA)^[31,32] dar. Mit dieser Methode können aus einem Vergleich der Wechselwirkung verschiedener Liganden am gleichen Target Aussagen über in bestimmten Raumbereichen bevorzugte Strukturelemente gemacht werden. Man wählt dazu einen Satz von Verbindungen aus, die tatsächlich synthetisiert und am Target auf ihre Affinität getestet wurden. Diese Verbindungen müssen ähnliche Strukturen besitzen, an der gleichen Stelle binden und dennoch eine gewisse strukturelle Vielfalt aufweisen. Außerdem sollten sich die Dimensionen der Bindungsaffinitäten über einige Zehnerpotenzen erstrecken. Für die Strukturen der Moleküle des Verbindungssatzes werden rechnerisch wahrscheinliche Konformationen bestimmt, welche schließlich über-

lagert werden. Der Satz überlagerter Moleküle wird in ein virtuelles Sondengitter mit einer Maschenweite von 1-2 Å eingepasst. Sondengitter bedeutet, dass an den Gitterpunkten Sonden mit den Eigenschaften von Wasserstoff-, Kohlenstoff- oder Sauerstoff-Atomen angenommen werden, deren abstandsabhängige Wechselwirkung mit den eingepassten Molekülen bestimmt wird. Die Gesamtheit dieser Wechselwirkungsbeiträge bezeichnet man als Feld des entsprechenden Moleküls. Abschließend werden die Felder der Moleküle des Datensatzes miteinander verglichen und mit der experimentell bestimmten Bindungsaffinität korreliert. Aus dem Modell lässt sich ablesen, an welchen Gitterpunkten Feldbeiträge auftreten, die signifikant zur Erklärung der Bindungsaffinität beitragen. Diese Beiträge lassen sich nach ihrer Wichtigkeit für die verschiedenen Felder konturieren und verweisen auf Volumenbereiche um die Moleküle, in denen Änderungen der Feldbeiträge parallel oder gegenläufig zu Affinitätsänderungen im Datensatz laufen. Graphisch lassen sich Konturdiagramme darstellen, die Hilfsmittel beim Wirkstoff-Design sind, indem sie angeben, an welchen Stellen durch eine Leitstrukturänderung eine Affinitätssteigerung zu erwarten ist. Die Literatur ist reich an beispielhaften Durchführungen solcher CoMFA-Analysen^[33].

1.2.4.2 Struktur-basiertes Liganden-Design

Struktur-basiertes Liganden-Design setzt die genaue strukturelle Kenntnis des mit einem Wirkstoff zu adressierenden Targets voraus. Die Zahl der strukturell aufgeklärten Targets hat dabei in den letzten fünfzehn Jahren stark zugenommen. Mit entsprechender Software lassen sich die Oberflächen von Proteinen nach geeigneten Bindestellen für verschiedene funktionelle Gruppen absuchen. Zumeist gehen mit der Strukturaufklärung von Proteinen auch schon Strukturaufklärungen von Protein-Ligand-Komplexen einher, so dass sich Struktur-Wirkungsbeziehungen und Schlüsse über essenzielle Wechselwirkungen ziehen lassen. Eventuell noch nicht von Liganden belegte Bereiche in der Bindungstasche oder wechselwirkungsarme Teilstrukturen der Liganden lassen sich identifizieren und für potenzielle Strukturoptimierungen und Vereinfachungen hin zu höherer Affinität ausnutzen. Wesentlich für den Erfolg des Struktur-basierten Wirkstoff-Designs ist eine iterative Vorgehensweise (Abb. 1-9). Dabei ist die 3D-Struktur des Proteins Ausgangspunkt für den Entwurf eines Liganden, welcher synthetisiert und getestet wird. Bei einer guten Bindung wird die Struktur des Protein-Ligand-Komplexes aufgeklärt und ist Ausgangspunkt

des nächsten Design-Zyklus. Zahlreiche Erfolge des mit diesem Ansatz erfolgten Liganden-Designs wurden veröffentlicht^[34].

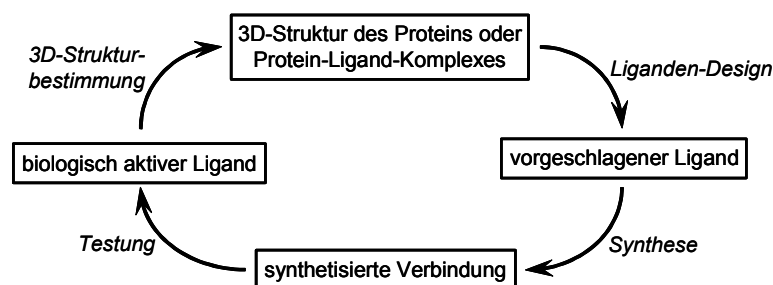


Abb. 1-9: Iteratives Vorgehen beim Struktur-basierten Wirkstoffdesign.

1.2.4.3 De novo-Design und Docking

Geht der Design-Zyklus beim Struktur-basierten Liganden-Design von bekannten Protein-Ligand-Komplexen aus, so wird auch nach mehrmaligem Durchlaufen der Optimierungsschritte die eigentliche Leitstruktur, also das Grundgerüst, nicht oder nur unwesentlich verändert. Völlig neuartige Leitstrukturen werden sich nicht ableiten lassen.

Ein alternativer Ansatz ist das *De novo*-Design. Für das *De novo*-Design sind zunächst dieselben Rahmenbedingungen notwendig, nämlich eine sehr gut charakterisierte Bindetasche mit potenziellen Bindungsstellen. Dann aber wird versucht, einen optimal passenden Liganden zu kreieren, ohne bereits aus anderen Liganden bekannte Strukturelemente vorzugeben. Dies führt im Grunde am ehesten zu völlig neuen, optimal passenden Strukturen, ist aber auch nicht unproblematisch, da sich eine enorme Vielfalt möglicher Strukturen ergeben kann, die nur schwer einzuordnen sind. Außerdem wird die Frage der synthetischen Zugänglichkeit eher weniger berücksichtigt. Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen, integriert man verschiedene Datenbanken als Informationsquellen in den Design-Prozess. Beispielsweise verwendet man Kristallstrukturen kleiner organischer Moleküle, wie sie zahlreich in Datenbanken zugänglich sind, um generelle Orientierungspräferenzen von z. B. Wasserstoffbrücken, gemittelt über alle fassbaren Kristalle, zu studieren und diese Erkenntnisse auf mögliche Wasserstoffbrücken in Protein-Ligand-Komplexen zu übertragen.

Den konzeptionell einfachsten Ansatz zum Auffinden neuer Protein-Liganden mit dem Computer stellt das Docking dar. Dazu wird eine Datenbank mit Strukturen kleiner organischer Moleküle benötigt, die virtuell darauf untersucht werden, ob sie in die Bindetasche hineinpassen. Als Struktur-Datenbanken lassen sich unter anderen solche der großen

Chemikalienversorger einsetzen. Dies gewährleistet, dass Struktur motive untersucht werden, deren Teilstrukturen auch kommerziell erhältlich sind, was wiederum eine leichtere synthetische Zugänglichkeit wahrscheinlich macht. Von den Einträgen der Datenbanken werden 3D-Strukturen und eventuell auch Konformere erzeugt und abgespeichert. Anschließend werden die Moleküle in die Bindetasche eingepasst, Erfolg versprechende Strukturen herausgefiltert und schließlich bewertet und geordnet. Von RASTELLI et al. stammt eine beispielhafte Veröffentlichung zur Vorgehensweise beim Docking aus dem Jahr 2003^[35].

1.3 Proteasen als molekulare Targets

1.3.1 Bedeutung der Proteasen

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch vollständige Sequenzierung bedeutet nur den ersten Schritt auf dem Weg zu einem größeren Verständnis der mit dem Leben verbundenen molekularen Zusammenhänge. Es lässt sich damit nun bestimmen, wann und ob welche Proteine wo auftreten können, über Funktionen ist in den meisten Fällen sehr wenig bekannt.

Abb. 1-10 macht qualitativ und quantitativ deutlich, welche Target-Familien durch humane Gene kodiert werden. Bei über 40 % der Proteine konnte nach bisherigem Stand der Forschung noch keine molekulare Funktion zugeordnet werden. Ein bedeutender Anteil von etwa zehn Prozent der Proteine gehört zur Klasse der Enzyme. Insgesamt bekannt sind mehr als 2000 verschiedene Enzymarten zu deren Klassifizierung ein System eingeführt wurde, das Wirkungs- und Substratspezifität berücksichtigt. Jedes Enzym wird unter einer vierstelligen EC-Nummer im Enzymkatalog geführt. Aus Abb. 1-10 ist die Einteilung in sechs Hauptklassen (Synthasen/Synthetasen und Ligasen werden üblicherweise gemeinsam erfasst) ersichtlich.

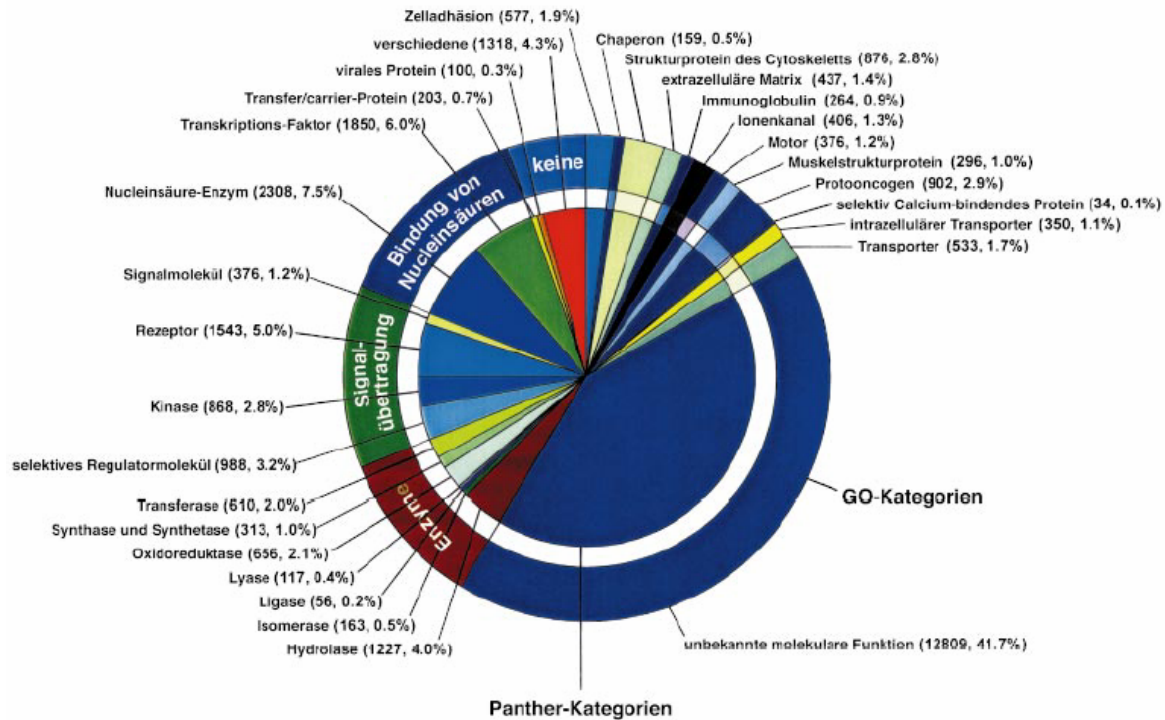


Abb. 1-10: Funktionen der durch humane Gene kodierten Proteine.

Den größten Anteil der Enzyme repräsentieren die Hydrolasen (EC 3), die Hydrolysen katalysieren. Wenn dabei Peptidbindungen gespalten werden, spricht man von Proteasen (EC 3.4). Man geht davon aus, dass in den meisten Organismen ca. zwei Prozent der Gene Proteasen kodieren.

Physiologisch sind Proteasen von allergrößter Bedeutung. Sie sind an praktisch allen Abläufen, wie z. B. Verdauung, Vermehrung, Wachstum, Differenzierung, Signalübertragung, Immunabwehr, Wundheilung, Zelltod etc., essenziell beteiligt. Neben der herausragenden Bedeutung bei Menschen und Tieren bedienen sich auch alle weiteren Formen des Lebens der Proteasen als molekulare Werkzeuge, d. h. sie sind auch in Bakterien, Viren, Protozoen, Pflanzen und Pilzen verbreitet. Es wird deshalb unmittelbar klar, dass sie viel versprechende Targets für Wirkstoffe darstellen. Zum einen können krankheitsbedingte Veränderungen des Proteoms durch Einflussnahme über Wirkstoffe auf Proteasen behoben oder zumindest reguliert, zum anderen körperfremde Pathogene gezielt bekämpft werden. Über Proteasen ist somit eine Beeinflussung von Krebs- sowie Entzündungs-, Immun-, Atemwegs-, Herz-Kreislauf-, Infektions- und neurodegenerativen Erkrankungen möglich.

1.3.2 Einteilung der Proteasen

Generell werden Proteasen in vier große Gruppen eingeteilt, nämlich Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 3.4.22), Aspartyl- (EC 3.4.23) und Metalloproteasen (EC 3.4.24). Die nähere Bezeichnung stammt dabei vom Aminosäure-Rest, der am katalytischen Prozess unmittelbar beteiligt und entscheidend ist. Eine weitere Unterscheidung erfolgt in Exo- und Endoproteasen, d. h. nach Lage der gespaltenen Peptidbindung im Substrat, wobei sich weiter oben angeführte EC-Nummern auf die häufigeren Endoproteasen beziehen. Die meisten Proteasen, die sich nicht in diese vier Gruppen einteilen lassen weil ihr Wirkmechanismus unklar oder unbekannt ist, werden unter der EC-Nummer 3.4.99 zusammengefasst.

Die hauptsächliche Wirkung der Serinproteasen, die die am häufigsten vorkommende und am besten charakterisierte Gruppe sind, geht von der Hydroxy-Funktion einer Serin-Seitenkette aus^[36]. Neben dem Serin spielen weitere, in der Sequenz zwar entfernte, durch Proteinfaltung aber räumlich benachbarte Aminosäure-Seitenketten eine wichtige Rolle. Sehr oft bildet ein Asparaginsäure- und Histidin-Rest zusammen mit dem Serin die so genannte katalytische Triade. Innerhalb der Serinproteasen ergibt sich durch teilweise Sequenzhomologie bzw. ähnliches Faltungsmuster eine strukturelle Verwandtschaft verschiedener Vertreter. Entsprechend werden die Serinproteasen über diese Ähnlichkeit, soweit vorhanden, weiter in Trypsin-, Elastase- und Chymotrypsin-artig klassifiziert. Charakteristisch für die in die einzelnen Klassen eingeordneten Proteasen ist das über die Substrat-Sequenz gegebene, jeweils gleiche bzw. ähnliche Erkennungsmuster. Trypsin (Verdauungsenzym) erkennt und schneidet dabei bevorzugt hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, Elastase (Gewebeabbau) hinter den kleinen, hydrophoben Resten des Alanins und Valins und Chymotrypsin (Verdauungsenzym) hinter den großen, hydrophoben Resten von Phenylalanin, Tyrosin und Leucin. Weitere prominente Serinproteasen sind die in die Blutgerinnung involvierten Enzyme Thrombin und Faktor Xa sowie die NS3-Protease des Hepatitis C-Virus.

Cysteinproteasen entfalten ihre Wirkung über eine Cystein-Seitenkette^[37]. Eine engere Einteilung erfolgt in Papain-, Caspase-1- (Erkennung von Asparaginsäure) und Picorna-Virus-artig (Erkennung von Glutamin). Cysteinproteasen kommen in Viren (Rhino-, Polio- und Hepatitis A-Virus), Bakterien (Staphylo- und Streptokokken) und Pflanzen (Papain in Papaya) vor. In Säugern haben Calpaine im Cytoplasma und Cathepsine in den Lysosomen große Bedeutung.

Metalloproteasen sind durch Zink(II)-Ionen im katalytischen Zentrum charakterisiert^[36]. Dabei wird das Zink durch in der Regel drei Donor-Gruppen, meist Histidin- oder Glutaminsäure-Reste, koordinativ fixiert. Wird dem Enzym das Zink durch Komplexbildung entzogen, so lässt sich keine Proteaseaktivität mehr nachweisen. Viele therapeutisch wichtige Enzyme sind Metalloproteasen, vor allem das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), welches das in einer Reaktionskaskade aus Angiotensinogen entstandene Angiotensin I zu Angiotensin II umsetzt und damit den Blutdruck beeinflusst. Weitere Beispiele sind Thermolysin (bakterielle Protease) und Carboxypeptidasen (Verdauung).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die hier zuletzt angeführte Gruppe der Aspartylproteasen^[36,38,39]. Sie zeichnet sich durch zwei Asparaginsäure-Reste im katalytischen Zentrum des Proteins aus. Aspartylproteasen zeigen ihre höchste Aktivität bei niedrigen pH-Werten, wobei sich der pH-Bereich insgesamt von ca. pH 2 bis 7,4 erstrecken kann^[40]. Bemerkenswert ist dabei, dass beide Carboxy-Gruppen nicht äquivalent sind. Sie verfügen im gleichen Milieu durch die jeweiligen lokalen Gegebenheiten über unterschiedliche pK_a-Werte, was zur Konsequenz hat, dass sehr wahrscheinlich eine Gruppe deprotoniert als Carboxylat, die andere protoniert als freie Säure vorliegt^[41]. Dies wird allgemein anerkannt, jedoch durch verschiedene experimentelle Untersuchungen zumindest in bestimmten Fällen auch in Zweifel gezogen^[42-45]. Eine endgültige Feststellung durch kristallografische Aufklärung ist nicht möglich, da die Lage von Protonen mit Röntgenstrahlung nicht auflösbar ist^[46,47]. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Aspartylproteasen liegt bei etwa 35 kD. Charakteristisch für sehr viele Aspartylproteasen ist auch die kompetitive Hemmung ihrer Aktivität durch den aus den Kulturfiltraten von *Streptomyces*-Arten isolierten Naturstoff Pepstatin A (**1**).

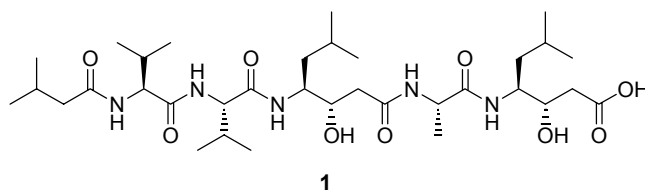


Abb. 1-11: Mikrobieller Naturstoff Pepstatin A aus *Streptomyces*-Kulturfiltrat mit Hemmwirkung bei einer großen Zahl von Aspartylproteasen.

Die Erkennung der Schnittstelle in einem Substrat durch die verschiedenen Proteasen geschieht nicht ausschließlich durch Identifizierung einer Aminosäure-Seitenkette. Vielmehr ist eine Erkennungssequenz aus mehreren benachbarten Seitenketten notwendig. Diese Seitenketten adressieren dabei mehr oder weniger spezifisch verschiedene Bindungs-

taschen der Protease, so dass das Substrat in räumlich geeigneter Weise für den folgenden Angriff auf die zu spaltende Peptidbindung fixiert wird. Bei Aspartylproteasen liegt die Länge dieser Erkennungssequenz durchschnittlich zwischen sechs und zehn Aminosäuren, Serin- und Cysteinproteasen haben im Schnitt etwas kürzere Erkennungsmuster und sind damit tendenziell etwas unselektiver. Für die Bezeichnung der Wechselwirkungen der Substrat-Seitenketten mit den entsprechenden Bindungstaschen der Protease wurde von SCHECHTER und BERGER^[48] eine Standardnomenklatur entwickelt (Abb. 1-12).

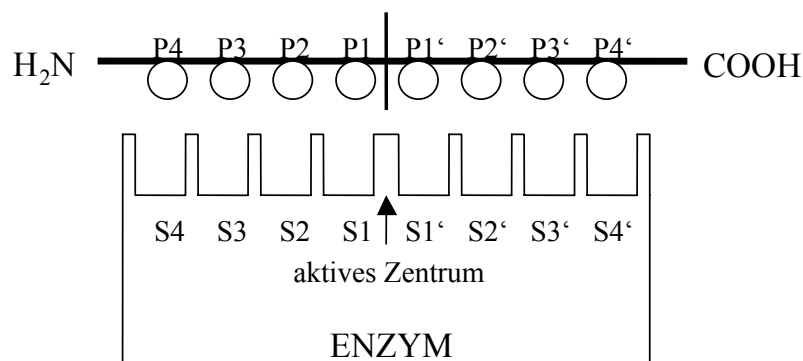


Abb. 1-12: Standardnomenklatur zur Bezeichnung der Wechselwirkung von Substrat-Seitenketten mit Bindungstaschen der Protease nach SCHECHTER und BERGER^[48].

Therapeutisch haben Aspartylproteasen große Bedeutung. So spielt bei der Blutdruck-Regulation über die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin II neben der Metalloprotease ACE die Aspartylprotease Renin eine entscheidende Rolle (Freisetzung des Dekapeptids Angiotensin I aus Angiotensinogen). Zahlreiche Inhibitoren des äußerst selektiven Renins wurden zwar gefunden, scheiterten jedoch in der klinischen Phase sowie aus rein wirtschaftlichen Gründen, da sie in direkter Konkurrenz zu bereits etablierten ACE-Inhibitoren stehen. Des Weiteren von großer Bedeutung ist die Bekämpfung von AIDS durch Inhibition der HIV-Protease und die Beeinflussung der ALZHEIMER-Erkrankung über die humane β -Secretase (β -Site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE). An der Ausbreitung von bakteriellen Infektionen von z. B. *Candida albicans* sind eine Reihe von Aspartylproteasen beteiligt, die Abheilung von Magengeschwüren kann durch Regulation des Verdauungsenzyms Pepsin erleichtert werden, und Cathepsin D steht im Verdacht, am krankhaften Wachstum und der Ausbreitung von Tumoren beteiligt zu sein.

Es ist bemerkenswert, dass bis jetzt nur acht Aspartylproteasen im menschlichen Genom identifiziert wurden. Dies steht in starkem Kontrast zu den dutzenden bis hunderten Vertretern der Metallo- bzw. Cysteinproteasen, spricht aber dafür, dass durch Therapieansätze

gegen Pathogene auf Basis dieser Targetklasse relativ gesehen weniger Nebenwirkungen zu erwarten sind^[49].

Die Beteiligung von Aspartylproteasen an der Entstehung und am Krankheitsbild der Malaria wird in Kap. 1.4 behandelt.

1.3.3 Wirkmechanismus der Proteasen

Die Aufgabe von Proteasen ist die Hydrolyse von chemisch recht stabilen Peptidbindungen unter sehr milden physiologischen Bedingungen. In chemischen Lösungssynthesen stellt die Spaltung einer Amidbindung in den meisten Fällen eine Reaktion unter verhältnismäßig harschen Reaktionsbedingungen dar.

Die katalytische Wirksamkeit der Proteasen ist in ihrer chemischen Struktur begründet, wobei sich die vier Protease-Klassen im Wesentlichen in zwei Wirkmechanismen aufteilen lassen. Wie im Folgenden ausgeführt wird besteht engere mechanistische Verwandtschaft zwischen einerseits Serin- und Cystein-, bzw. andererseits zwischen Metallo- und Aspartylproteasen:

Hauptmerkmal der **Serin- und Cysteinproteasen** sind ihre nucleophilen Hydroxy- bzw. Thiol-Gruppen in der Seitenkette. Diese ermöglichen in einem ersten Schritt den nucleophilen Angriff auf einen räumlich perfekt ausgerichteten, elektrophilen Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Amidbindung. Der nucleophile Charakter der angreifenden Einheit wird dabei durch die Anwesenheit basischer Protonenakzeptoren in Form weiterer, räumlich benachbarter Protease-Seitenketten, z. B. dem Imidazol-Ring eines Histidins oder der Carboxylat-Einheit einer deprotonierten Asparaginsäure (katalytische Triade bei Serinproteasen), verstärkt. Der Angriff führt zur Ausbildung eines tetraedrisch substituierten, sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffs bzw. eines Oxyanions, dessen negative Ladung wiederum durch weitere benachbarte Wasserstoffbrücken-Donoren stabilisiert wird (so genanntes Oxyanion-Loch). Dieses primär gebildete Intermediat zerfällt Säure-katalysiert zu einem Peptid-/Proteinfragment mit freier Amino-Funktion, welches abdiffundiert, und der nunmehr an der Hydroxy- bzw. Thiol-Gruppe acylierten Protease (Ausbildung einer Ester- bzw. Thiolester-Bindung). Dabei fungieren die ursprünglichen Protonen-Akzeptoren, d. h. letztlich ein Imidazolium-Ring, nun umgekehrt als Protonen-Donoren. Der zweite Teil des Katalyse-Zyklus besteht in der Hydrolyse des kovalenten Acyl-Enzym-Komplexes. Dabei wird, wie bereits im ersten Teil, ein Wassermolekül durch den Imida-

zol-Akzeptor für einen nucleophilen Angriff aktiviert, das erneut entstehende Oxyanion stabilisiert und schließlich ein Proton vom Imidazolium-Ring zurückübertragen. Der Acyl-Enzym-Komplex zerfällt dabei zur im Vergleich zum Anfang unveränderten Protease und dem Peptid-/Proteinfragment mit freier Säure-Funktion.

Der Mechanismus der Serinproteasen ist in der dargelegten Form durch zahlreiche Experimente bestimmt und wiederholt belegt worden. Trotz großer Ähnlichkeit ist es sehr wahrscheinlich, dass sich der Mechanismus der Cysteinproteasen in feinen Details davon unterscheidet, z. B. scheint hier nur die Dyade Cys/His beteiligt zu sein. Außerdem unterscheiden sich Hydroxy- und Thiol-Funktion in ihrer Nucleophilie, wobei jedoch genauere Erkenntnisse über Auswirkungen auf den Mechanismus nicht vorliegen^[50].

Der durch **Metallo- und Aspartylproteasen** katalysierte Hydrolyse-Mechanismus verläuft grundsätzlich anders. Hier erfolgt keine Aktivierung über nucleophilen Angriff von Seitenketten, wenngleich für Aspartylproteasen auch ein solcher Mechanismus unter nucleophiler Beteiligung einer Carboxylat-Funktion zumindest postuliert wurde^[51,52]. Die Wirkung des Zink(II)-Ions bzw. der Aspartyl-Dyade beruht auf der Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls.

Das LEWIS-saure Zink-Ion einer Metalloprotease komplexiert und aktiviert sowohl das angreifende Wasser als auch den anzugreifenden Carbonyl-Kohlenstoff.

Bei Aspartylproteasen wird das Wassermolekül durch die Carboxylat-Gruppe des deprotonierten Aspartyl-Restes polarisiert (Akzeptor-Funktion) und die Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffs durch H-Brücken-Bildung und schließlich Protonenübertragung des zweiten, protonierten Aspartyl-Restes (Donor-Funktion) verstärkt (Abb. 1-13). Der nach nucleophilem Angriff des Wassers intermediär entstehende, tetraedrische Übergangszustand wird durch H-Brücken stabilisiert, es gibt aber keine kovalente Anbindung der Protease an das Substrat. Im zweiten Teil des Zyklus zerfällt der Übergangszustand unter Umkehrung von Donor- und Akzeptorwirkung zu den Spaltprodukten und der unverändert vorliegenden Protease.

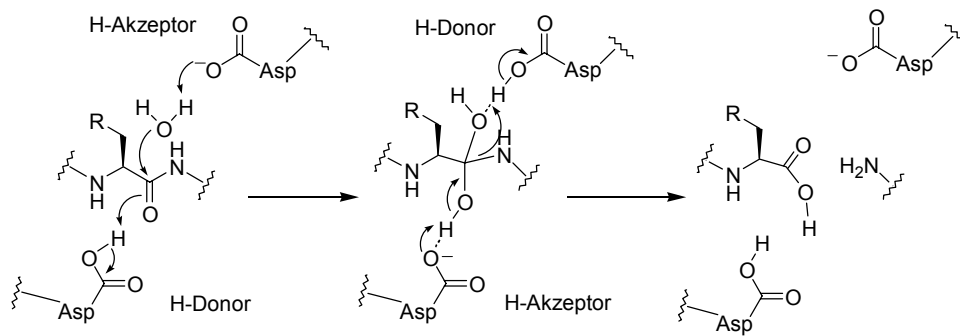


Abb. 1-13: Katalytischer Mechanismus der Substrat-Hydrolyse durch Aspartylproteasen.

Neben dem angreifenden Wassermolekül geht man bei den meisten Aspartylproteasen, z. B. der HIV-Protease, von einer Beteiligung eines weiteren, zur Protease gehörenden und von dieser koordinativ fixierten Wassermoleküls aus. Dieses Wasser bildet H-Brücken zu den der Spaltstelle links und rechts benachbarten Amidbindungen aus und bewirkt hierbei eine Verdrillung des Substrats. Durch diese Verdrillung wird die Stabilisierung der zu spaltenden Amidbindung durch Mesomerie unter Beteiligung des freien Elektronenpaares des Stickstoffs geschwächt und das Substrat einem nucleophilen Angriff zugänglicher.

1.4 Malaria

Die Malaria stellt mit 300-500 Millionen Erkrankungen jährlich bei bis zu 1,5 Millionen Todesfällen die weltweit verbreitetste Krankheit dar und gehört damit, zusammen mit AIDS und Tuberkulose, zu den bedrohlichsten Infektionskrankheiten. Etwa 40 % der Weltbevölkerung lebt in den tropischen und subtropischen Malariagebieten und wird potenziell von ihr bedroht. Obwohl die Krankheit Ende der 1950er-Jahre bereits als beinahe ausgerottet galt, ist sie in den letzten Jahrzehnten wieder auf dem Vormarsch, wofür hauptsächlich folgende Gründe verantwortlich sind:

- Im nachhinein betrachtet falscher Einsatz von existierenden Therapien und damit einhergehende Ausbildung von Resistenzen
- Vernachlässigung der Wirkstoff-Forschung seit Mitte der 1970er-Jahre wegen fehlendem politischem/militärischem Interesse und geringem Marktpotenzial
- Schwierigkeiten bei der Durchführung effektiver Kontrollen in politisch instabilen Entwicklungsländern (kriegsbedingte Bevölkerungsbewegungen)
- Umwelt- und Klimaveränderungen

Entsprechend wird gegenwärtig versucht, durch öffentliche Förderung neue Anstöße für eine effektive Bekämpfung zu lancieren (Multilateral Initiative on Malaria, MIM; Medicines for Malaria Venture, MMV).

Ausgelöst wird die Erkrankung durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, einem Parasiten. Es sind vier den Menschen befallende *Plasmodium*-Arten und ihre spezifischen Krankheitsbilder bekannt: *P. falciparum* (Malaria tropica), *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana) und *P. malariae* (Malaria quartana). Die Übertragung des Parasiten erfolgt über Stechmücken der Gattung *Anopheles* (Abb. 1-14).



Abb. 1-14: Malaria-übertragende *Anopheles*-Stechmücke.

Der Lebenszyklus des Erregers lässt sich in ein Mücken-, Leber- und Blut-Stadium unterteilen. Nach Übertragung durch einen Stich auf den Wirt, z. B. Menschen, kommt es zunächst zu einer Symptom-freien Infektion der Leber. Nach ca. einer Woche werden von dort aus Erythrozyten im Blut befallen und diese schließlich zerstört, was mit den Symptomen Fieber und Blockade von Blutgefäßen einhergeht, zu komatösen Zuständen und unbehandelt zum Tod führt. Die Zerstörung der Erythrozyten hängt im Wesentlichen mit dem Abbau von bis zu 80 % des für den Sauerstoff-Transport zuständigen Metalloproteins Hämoglobin zusammen. Der Erreger selbst verfügt über keine Quelle für essenzielle Aminosäuren und verdaut deshalb das Hämoglobin in seine Bestandteile. Die meisten tödlich verlaufenden Infektionen beim Menschen gehen von *P. falciparum* aus.

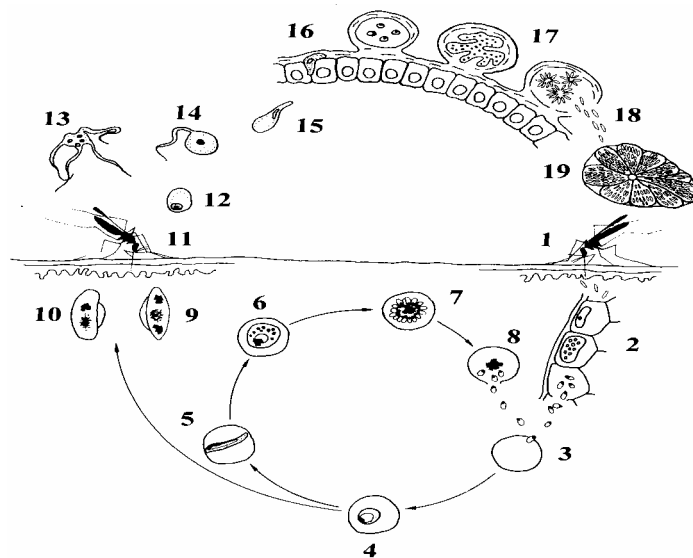


Abb. 1-15: Entwicklungszyklus des Malaria-Erregers *P. falciparum*: Stich einer infizierten Mücke (1), Vermehrung von Sporozoiten in der Leber (2), Freisetzung von Merozoiten und Infektion von Erythrozyten (3), Differenzierung im Ring-Stadium (4), Trophozoiten-Stadium (5), Schizonten (6), Segmenter-Stadium (7), Infektion neuer Erythrozyten (8), Differenzierung in weibliche (9) und männliche Gametozyten (10), Möglichkeit der Übertragung auf Mücken (11), Entwicklung in der Mücke zu Makrogameten aus weiblichen (12) und Mikrogameten aus männlichen Gametozyten (13), Verschmelzung der Gameten (14) zur Zygote (15), Durchdringung des Darmepithel (16), Wuchs zur Oocyste (17), Freisetzung von Sporozoiten (18), Wanderung in die Speicheldrüse (19).

Bereits Anfang des 18. Jahrhunderts wurden Versuche unternommen, die Malaria medikamentös zu behandeln. Aus der indianischen Naturmedizin stammt die Rinde des in den Anden beheimateten Cinchona-Baums. Extrakte aus diesem Naturprodukt waren bereits früher bei Fieber eingesetzt worden. Als aktiver Inhaltsstoff wurde 1820 Chinin (2) identifiziert und isoliert. Malaria ist somit eine der ersten Krankheiten, die durch eine chemische Reinsubstanz behandelt wurde. Durch strukturelle Abwandlung und zufällige Entdeckungen, z. B. der Wirksamkeit von Methylenblau (3) (erster, beim Menschen eingesetzter, synthetischer Wirkstoff) ergaben sich in der Folge weitere Substanzen, deren Wirkmechanismus jedoch völlig im Dunkeln lag. Aus diesen Bemühungen resultierte schließlich das 1934 synthetisierte und seit 1946 eingesetzte Chloroquin (4). Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um das historisch wichtigste und effektivste Mittel. Durch übermäßige Verwendung (z. B. prophylaktischer Zusatz zu Nahrungsmitteln) entwickelten sich jedoch schon Ende der 1950er-Jahre Resistenzen. Resistente *Plasmodium*-Stämme sind heute weit verbreitet und erschweren die Bekämpfung der Krankheit. Nicht auf den Erreger selbst, sondern seinen Überträger, die *Anopheles*-Mücke, zielte der Einsatz des Insektizids Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT, 5), welches jedoch wegen seiner schlechten Abbaubarkeit und damit Anreicherung in Organismen umstritten blieb und dessen Einsatz heute in vielen Ländern verboten ist. Es kam aber auch hier zu einer Resistenz der Mücken gegen diese Substanz.

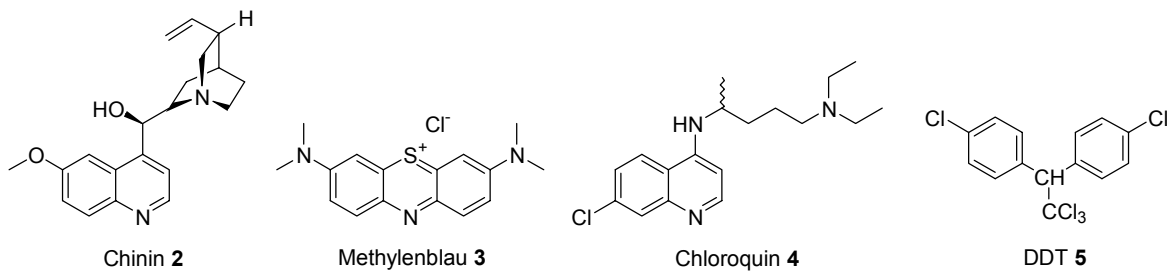


Abb. 1-16: Historisch bedeutende Wirkstoffe in der Malaria-Therapie und -Bekämpfung.

Eine Vielzahl weiterer Substanzen wurde in der Folge entwickelt, über deren molekulare Angriffspunkte erst heute mehr bekannt ist. Bisher bekannte Wirkstoffe beeinflussen hauptsächlich den Häm- und Folat-Stoffwechsel. Das durch den Parasiten beim Hämoglobin-Abbau freigesetzte Häm ist für diesen selbst toxisch, weshalb er es über Hematin zu Hämozoin polymerisiert und metabolisiert. Ein weiterer Weg ist eine Oxidation des Häms oder ein Glutathion-abhängiger Abbau^[53-55]. Bisher bekannte Wirkstoffe inhibieren diesen Weg der Entgiftung. Andere Wirkstoffe hemmen im Folat-Stoffwechsel die Enzyme Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Dihydropterat-Synthase.

Heutige Hoffnungen basieren vor allem auf den bei der vollständigen Genom-Sequenzierung des Erbmaterials von *P. falciparum* gewonnenen Erkenntnissen^[56]. Neben der Einflussnahme auf die Häm-Detoxikation können eventuell folgende Stoffwechsel-Wege blockiert werden (Abb. 1-17):

- Metabolismus der Fettsäure-Biosynthese über Typ II-Fettsäuresynthase (FAS II)
- Vorgang der Protein-Farnesylierung über Farnesyl-Transferase
- Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Synthese über DOXP-Reduktoisomerase
- Glykolyse über Laktat-Dehydrogenase, Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase oder Triosephosphat-Isomerase
- Cholin-Transportersystem der Cholin-Aufnahme
- Normale RNA- und Protein-Synthese
- Proteolytischer Hämoglobin-Abbau

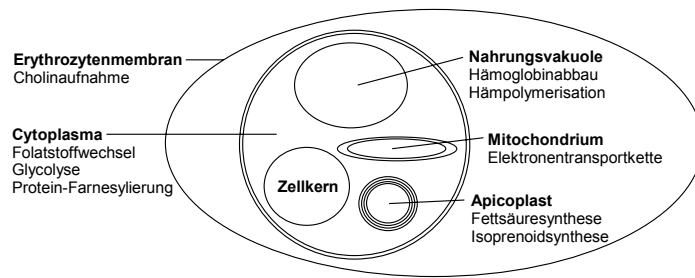


Abb. 1-17: Schematische Darstellung eines *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit der intrazellulären Lokalisation verschiedener Wirkstoff-Targets.

Ein Teil der beteiligten Enzyme sind auch beim Menschen bekannt und von großer Bedeutung. Jedoch unterscheiden sich die humanen Vertreter in ihrer Sequenz zum Teil beträchtlich, was Hoffnung auf selektive Inhibition gibt.

Besonders die Blockade des Hämoglobin-Abbaus im Trophozoiten-Stadium erscheint Erfolg versprechend. Das heterotetramere Hämoglobin ist ein Komplex aus jeweils zwei so genannten α - bzw. β -Protein-Ketten, die jeweils eine Häm-Gruppe tragen. Die Protein-Ketten werden bei parasitärem Befall in mehreren Stufen bis in ihre Aminosäure-Bausteine zerlegt (Abb. 1-18)^[57,58]. An dieser Spaltung sind eine ganze Reihe von Proteasen/Hämoglobinasen beteiligt. Im Genom wurden mindestens zehn verschiedene Aspartylproteasen, Plasmepsin I-X, identifiziert, deren Funktion aber nur teilweise geklärt ist. Nur Plasmepsin I, II und IV sind am Hämoglobin-Abbau in der sauren Nahrungsvakuole direkt beteiligt.

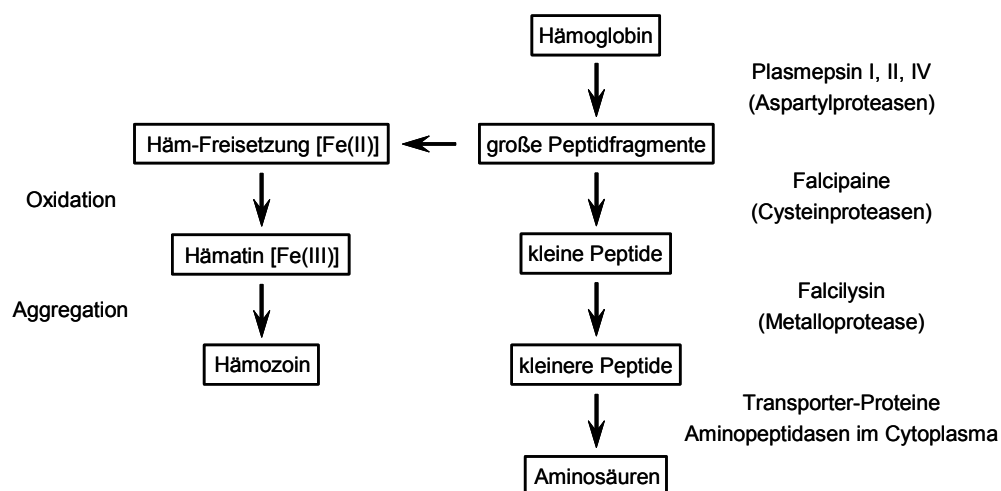


Abb. 1-18: Sukzessiver proteolytischer Abbau von Hämoglobin und daran beteiligte Enzyme.

Im besonderen Fokus sind Plasmeypsin I und II. Beide Aspartylproteasen sind zu ca. 75 % Sequenz-homolog und zeigen größte Aktivität im pH-Bereich 4,5-5. Beide initiieren den ersten Spaltungsschritt der α -Kette zwischen Phe33 und Leu34 ^[59,60]. Plasmeypsin II wird auch noch eine Beteiligung an der Auflösung der Erythrozyten-Membran im späten Schizonten-Stadium beim Befall neuer Erythrozyten zugeschrieben, so dass eine Ausschaltung dieses Enzyms an zwei Stellen den Lebenszyklus des Parasiten unterbrechen könnte. Eventuell könnte es mit Inhibitoren auch gelingen, mehrere der Aspartylproteasen gleichzeitig zu inhibieren, was die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung deutlich minimieren würde.

Eine große Herausforderung stellt die selektive Adressierung der Plasmeypsin in Anwesenheit von humanem Cathepsin D des Wirtes dar. Es ist bekannt, dass Cathepsin D beim Menschen von essenzieller Bedeutung ist, obwohl nicht alle seine Funktionen im Detail bekannt sind. Knock-out-Mäuse, denen ein Cathepsin D-Gen fehlt, sterben sehr schnell. Die Bindungstaschen von Plasmeypsin I und II bzw. Cathepsin D sind sich sehr ähnlich. Insgesamt zeigt Plasmeypsin I 73 % und Plasmeypsin II 35 % Sequenz-Homologie zu Cathepsin D.

Da die Möglichkeit zur Prophylaxe der Malaria durch eine Schutzimpfung in absehbarer Zeit nicht gegeben sein wird, werden große Hoffnungen in die Entwicklung von Protease-Inhibitoren gesetzt. Am Ende dieser Entwicklung müssen dabei effektive, sichere und vor allem billige Medikamente stehen^[61-63].

1.5 Protease-Inhibitoren

1.5.1 Strukturelemente potenzieller Protease-Inhibitoren

Die strukturelle Annäherung an einen möglichen Inhibitor erfolgt außer beim *De novo*-Design sehr oft vom natürlichen Substrat ausgehend. Das Substrat-Protein wird dabei in einem ersten Schritt auf einen kurzen, peptidischen Ausschnitt, der die Schnittstelle und eine Erkennungssequenz enthält, reduziert, der dann systematisch abgewandelt wird. Die Abwandlung erstreckt sich sowohl auf die Schnittstelle selbst als auch auf die Peripherie mit dem Ziel, ein stabiles, stärker mit der Protease wechselwirkendes Molekül abzuleiten, das außerdem möglichst geringen peptidischen Restcharakter aufweist. Was die Abwandlung der Schnittstelle betrifft, ergeben sich entsprechend der Einteilung der Proteasen in

Gruppen gemäß deren Wirkungsweise auch etwas unterschiedliche, Mechanismus-basierte Ansätze.

Das wichtigste Konzept zur Inhibition von **Serin- und Cysteinproteasen** sieht dabei vor, anstatt der natürlichen Amidbindung andere elektrophile Strukturelemente einzusetzen, welche von den nucleophilen Hydroxy- bzw. Thiol-Funktionen angegriffen werden. Die entsprechende kovalente Wechselwirkung blockiert damit zum einen die essenzielle Seitenkette, zum anderen kommt es in den meisten Fällen, wie beim natürlichen Substrat, zur Ausbildung tetraedrischer Addukte. Da Proteasen ihre Aktivität im Besonderen der Möglichkeit verdanken, tetraedrische Übergangszustände während der Hydrolyse zu stabilisieren, vermag ein solcher Inhibitor auch die Bindungstasche optimal und dauerhaft zu besetzen. Die wichtigsten Vertreter sind Aldehyde, Perfluoralkylketone, α -Ketosäuren, -ester und -amide, α,β -Diketone, Halo- und Acyloxymethylketone, Epoxide, Nitrile und MICHAEL-Akzeptoren. Bei einigen Beispielen, wie etwa den Perfluoralkylketonen, ist nicht in allen Fällen klar, ob es überhaupt zu kovalenter Wechselwirkung mit der Protease kommt. Die durch das benachbarte Fluor stark aktivierte Carbonyl-Gruppe lagert von selbst schon Wasser zum entsprechenden Hydrat mit tetraedrischer Struktur an. Eventuell beruht die inhibitorische Wirkung hier ausschließlich auf optimaler, stabilisierter Ausfüllung der Bindungstasche durch das Hydrat und nicht auf Blockade der funktionellen Gruppe.

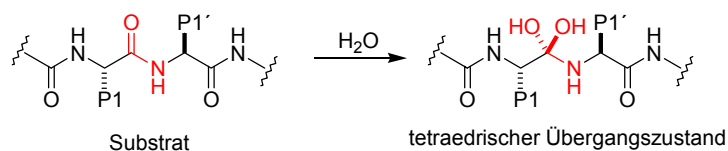
Die wichtigste Möglichkeit zur Deaktivierung von **Metalloproteasen** stellt die Komplexierung dar. Starke Koordination an das Zink(II)-Ion vermindert dessen Aktivität als LEWIS-Säure. Wichtigste Beispiele dafür sind Inhibitoren mit Hydroxamat-Funktionalität.

Bei **Aspartylproteasen** schließlich wird nicht das Ziel verfolgt, die beiden beteiligten Aspartyl-Reste zu blockieren. Hier wird ausschließlich der Weg beschritten, so genannte Übergangszustandsanaloga zu entwerfen, die dem Übergangszustand einer normalen Hydrolyse der Amidbindung nachempfunden aber stabil sind, d. h. nicht wie das natürliche Substrat zerfallen. Man spricht hier auch von Isosteren. Wenn diese Analoga eine stärkere Wechselwirkung zur Bindungstasche ausbilden als der natürliche Übergangszustand liegt eine kompetitive Hemmung vor, deren Stärke sich über den Unterschied der Gleichgewichtskonstanten bemessen lässt. Da die Stabilisierung des Übergangszustandes unter anderem in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken durch die Aspartyl-Reste besteht, muss auch die Struktur eines Übergangszustandsanalogons diese Wechselwirkung ermög-

lichen. Formal wird also beim Strukturentwurf eine Amidbindung entfernt und durch einen tetraedrisch substituierten Kohlenstoff mit einem polaren Element, wie z. B. einer Hydroxy-Gruppe, ersetzt.

Die am häufigsten eingesetzten Isoster-Strukturen sind in Tab. 1-2 zusammengefasst. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass dort die Strukturen aus dem natürlichen peptidischen Substrat abgeleitet werden. Die Bezeichnungen dürfen jedoch nicht zu streng angewendet werden, d. h. im Zuge einer Herabsetzung des peptidischen Gesamtcharakters wird man in einem späteren Stadium auch die peptidische Struktur der Peripherie modifizieren, die Bezeichnung der Isostere aber so beibehalten. So können die Abfolge von Seitenketten, Carbonyl- und Amino-Funktionen um die isostere Einheit beliebig variieren und alternative Verknüpfungen verwendet werden.

Tab. 1-2: Strukturen und Bezeichnungen der gängigsten Übergangszustandsanaloga beim Design von Aspartylprotease-Inhibitoren.



Pos.	Strukturausschnitt ^[a]	Isoster-Bezeichnung
1		Statin ^[64] $\Psi[-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-]$
2		Norstatin $\Psi[-\text{CH}(\text{OH})-\text{CO}-\text{NH}-]$
3		α -Ketoamid ^[65] $\Psi[-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}-]$
4		Hydroxyethylen ^[66-69] $\Psi[-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-]$
5		Hydroxyethylamin ^[70-74] $\Psi[-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}-]$

Tab. 1-2: Fortsetzung

Pos.	Strukturausschnitt ^[a]	Isoster-Bezeichnung
6		reduziertes Amid ^[75-77] $\Psi[-\text{CH}_2-\text{NH}-]$
7		Dihydroxyethylen ^[78] $\Psi[-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-]$
8		Difluorketon ^[79,80] $\Psi[-\text{CO}-\text{CF}_2-]$
9		Keton ^[65] $\Psi[-\text{CO}-\text{CH}_2-]$
10		Aminostatin $\Psi[-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-]$
11		Phosphinsäure ^[81-84] $\Psi[-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{CH}_2-]$
12		Phosponamid $\Psi[-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{NH}-]$
13		Silandiol ^[85] $\Psi[-\text{Si}(\text{OH})_2-\text{CH}_2-]$

^[a] Strukturausschnitt ergibt sich durch Austausch der Amidbindung gegen die entsprechende isostere Einheit $\Psi[\dots]$.

Die in Tab. 1-2 unter Pos. 3, 8 und 9 aufgeführten, elektrophilen Keto-Strukturen, die eigentlich mehr aus dem Bereich der Serin- und Cysteinprotease-Inhibitoren bekannt sind, werden also auch durchaus in Form ihrer Hydrate als Übergangszustandsanaloga aufgefasst.

Das Konzept der Übergangszustandsanaloga ist der Natur selbst entlehnt. Wie in Kap. 1.3.2 erwähnt, hemmt der bakterielle Naturstoff Pepstatin A (Abb. 1-11) unselektiv eine große Zahl von Aspartylproteasen. Baustein von Pepstatin A ist die ungewöhnliche

β -Hydroxy- γ -aminosäure Statin (**6**) [(3*S*,4*S*)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure, AHMHA]. Daraus abgeleitet werden gewöhnlich Inhibitoren mit diesem β -Hydroxy- γ -aminosäure-Motiv als Ersatz der Amidbindung als Statine bezeichnet.

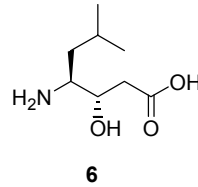


Abb. 1-19: Ungewöhnliche β -Hydroxy- γ -aminosäure Statin = (3*S*,4*S*)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure (AHMHA).

Von der Gruppe der Statine sind ihrerseits die Norstatine abgeleitet, wobei die Vorsilbe „Nor-“ auf das Fehlen einer Methylen-Gruppe hinweist. Die Norstatine zeichnen sich also formal durch den Einbau einer α -Hydroxy- β -aminosäure aus. Zur Bezeichnung der meisten anderen Isoster-Strukturen wird einfach der Name der Einheit, die anstatt der Amidbindung zum Einsatz kommt, verwendet, so z. B. Hydroxyethylen oder Hydroxyethylamin. Dass das Konzept zum Erfolg führen kann, zeigen die Beispiele der im Rahmen einer Kombinationstherapie bei HIV-Erkrankungen zugelassenen und eingesetzten Wirkstoffe Saquinavir (**7**), Nelfinavir (**8**), Ritonavir (**9**) und Indinavir (**10**) (Abb. 1-20). Bei diesen Verbindungen wird außerdem deutlich, wie der peptidische Charakter in der Peripherie aus Gründen der Bioverfügbarkeit und Stabilität deutlich vermindert wurde.

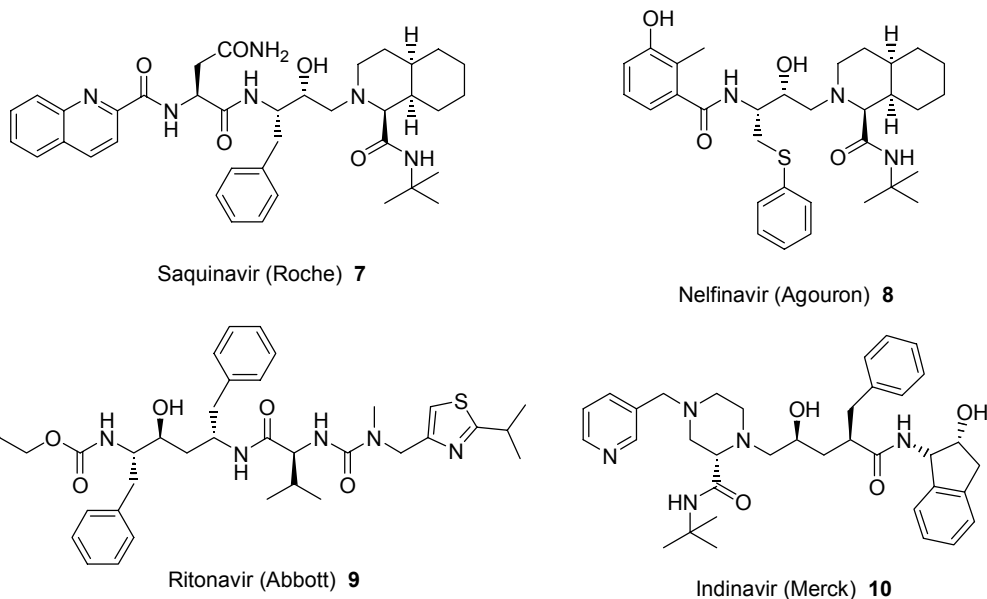


Abb. 1-20: Zugelassene Wirkstoffe mit Hydroxyethylamin- (**7**, **8**) bzw. Hydroxyethylen-Isoster (**9**, **10**) in der Kombinationstherapie der HIV-Erkrankung.

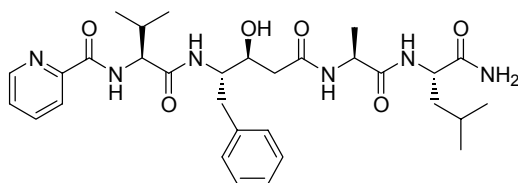
1.5.2 Bekannte synthetische Inhibitoren von Plasmepsin II

Seit der Publikation der Kristallstruktur eines Plasmepsin II/Pepstatin A-Komplexes 1996 durch SILVA et al. stehen strukturelle Informationen zum Protein-Ligand-Bindungsmodus zur Verfügung^[86].

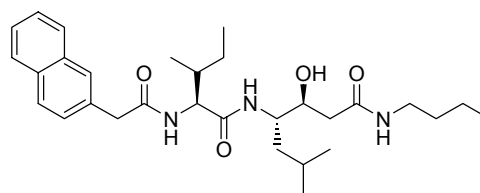


Abb. 1-21: Kristallstruktur des Plasmepsin II/Pepstatin A-Komplexes.

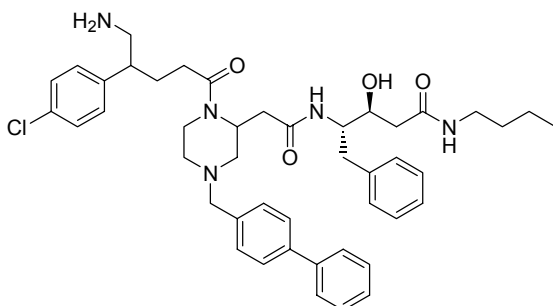
Die sehr niedrige Inhibitionskonstante K_i des Pepstatin A von nur 0,006 nM führte dazu, in ersten Versuchen Pepstatin A als Leitstruktur einzusetzen und strukturell abzuwandeln. Bereits in der gleichen Veröffentlichung wurden deshalb Derivate hergestellt und sowohl gegen Plasmepsin II als auch Cathepsin D getestet, um nicht nur Aktivität, sondern auch unbedingt wichtige Selektivität zu überprüfen. Verbindung **11** zeigte dabei das relativ günstigste Verhältnis von Aktivität zu Selektivität. Auch eine Gruppe der Firma Pharmacoepia entwarf und synthetisierte drei von Statin-Leitstrukturen inspirierte Verbindungskollektionen, deren jeweils potenteste Vertreter (**12**, **13** und **14**) zwar eine schlechtere Aktivität, teilweise aber eine mehr als doppelt so große Selektivität aufwiesen^[87].



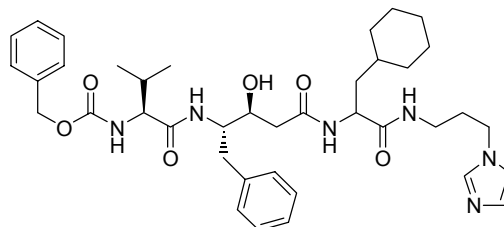
11, $K_i(\text{Plm II}) = 0,56 \text{ nM}$, $K_i(\text{Cat D}) = 21 \text{ nM}$



12, $K_i(\text{Plm II}) = 50 \text{ nM}$, $K_i(\text{Cat D}) = 320 \text{ nM}$



13, $K_i(\text{Plm II}) = 490 \text{ nM}$, $K_i(\text{Cat D}) = 45000 \text{ nM}$



14, $K_i(\text{Plm II}) = 7,0 \text{ nM}$, $K_i(\text{Cat D}) = 530 \text{ nM}$

Abb. 1-22: Statin-basierte Inhibitoren von Plasmeptin II.

Auch ELLMAN et al. untersuchten und verglichen Inhibitoren an Plasmeptin II und Cathepsin D, jedoch wählten sie das Hydroxyethylamin-Motiv. Aus einer großen Anzahl ursprünglich für Cathepsin D konzipierter Verbindungen^[88,89] bestimmten sie diejenigen mit der größten Aktivität an Plasmeptin II und führten daran weitere Optimierungsschritte durch. Bester Vertreter dieses Ansatzes ist Verbindung **15**^[90]. Ein weiterer, sehr ähnlicher Inhibitor aus dieser Verbindungskollektion mit der Bezeichnung EH58 wurde mit Plasmeptin II kokristallisiert, so dass hier die genauen Wechselwirkungen aus der Kristallstruktur bekannt sind^[91]. NÖTEBERG et al. betrachteten **11** als Leitstruktur, ersetzten die Statin- durch eine Hydroxyethylamin-Einheit, verkürzten das Molekül und variierten in P3 und P1' (**16** und **17**)^[92,93]. Gute bis sehr gute Selektivität wurde in derselben Gruppe durch Verwendung eines C₂-symmetrischen Mannitol-Gerüsts (**18**) erzielt.

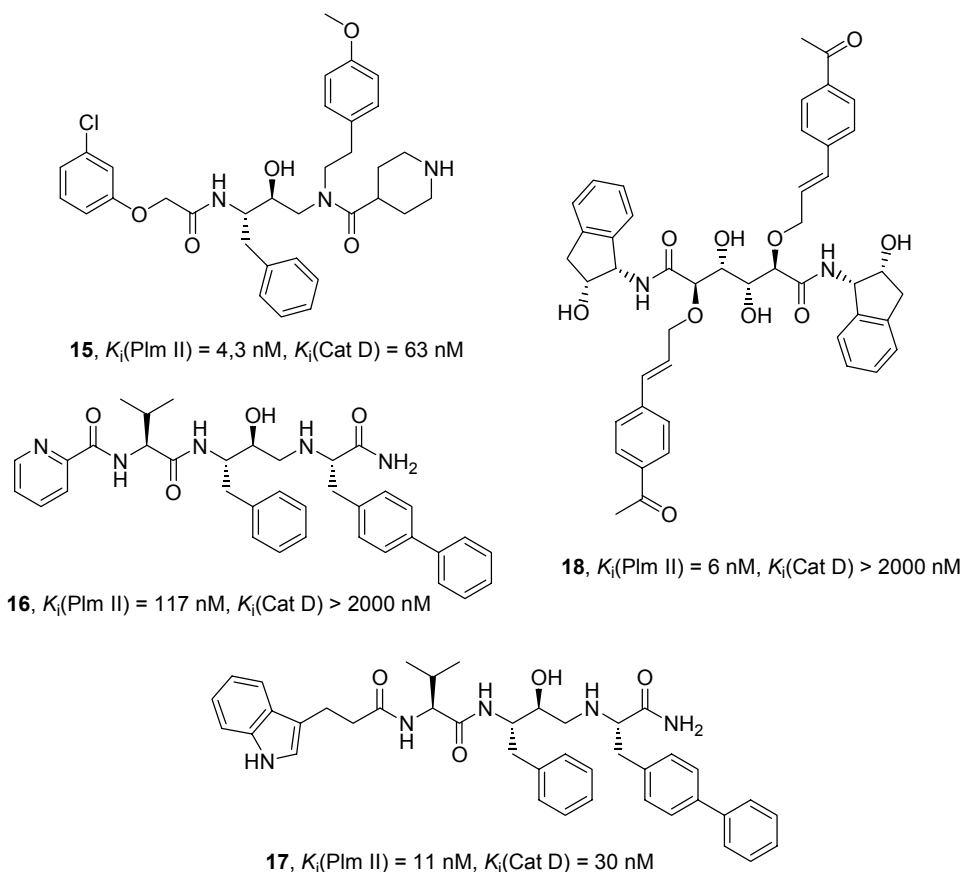


Abb. 1-23: Hydroxyethylamin- und Mannitol-basierte Inhibitoren von Plasmeptin II.

Weitere Inhibitor-Strukturen aus der industriellen Forschung von Actelion und Roche basieren auf substituierten Piperidinen. Diese Inhibitoren haben überhaupt keinen peptidischen Charakter mehr, stellen aber dennoch Übergangszustandsanaloga dar. Der durch iteratives Vorgehen erhaltene Inhibitor **19** von Actelion verfügt über hervorragende Selektivität (ca. Faktor 3700)^[49], die aus einem Renin-Inhibitor-Programm bei Roche^[94,95] stammenden Verbindungen **20** und **21** zeigen in Zell-Assays an befallenen Erythrozyten resistenter Stämme IC_{50} -Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich^[96]. Ebenfalls auf Erkenntnissen aus der Renin-Forschung aufbauend wurde durch DIEDERICH et al. durch Computer-unterstütztes *De novo*-Design das 11-Azatricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2(7),3,5-trien-Gerüst als Grundstruktur identifiziert und mit verschiedenen Substituenten synthetisiert (z. B. Inhibitor **22**)^[97].

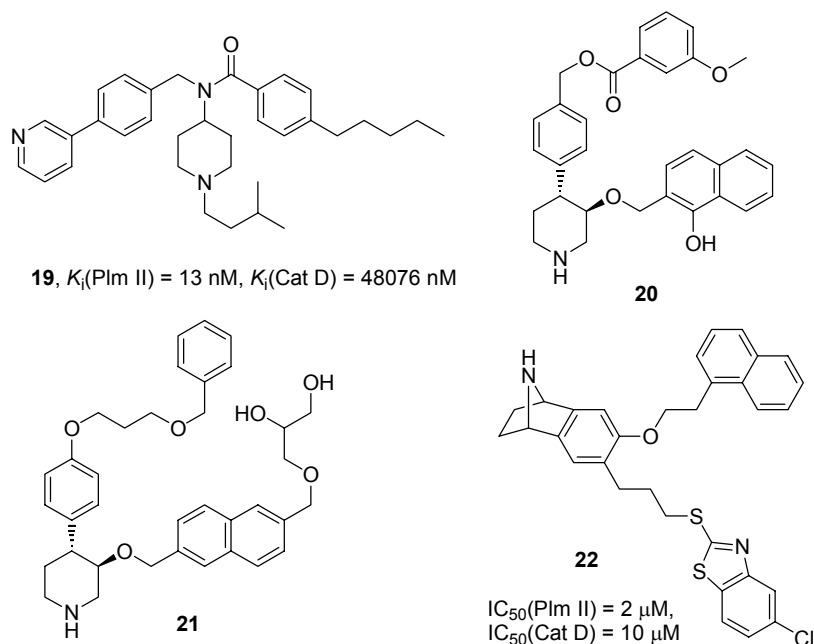


Abb. 1-24: Sonstige Plasmepsin II-Inhibitoren.

1.6 Norstatine

Bei der Aufzählung bereits bekannter, synthetischer Inhibitoren von Plasmepsin II in Kap. 1.5.2 wurden Inhibitoren mit Norstatin-Isoster bewusst ausgeklammert. Da diese Struktureinheit im Mittelpunkt vorliegender Arbeit steht, wird der Bedeutung von Norstatin-Inhibitoren, bekannten Naturstoffen und synthetischen Konzepten zum Aufbau dieser Strukturen dieses eigene Kapitel gewidmet.

1.6.1 Synthetische Norstatine als Aspartylprotease-Inhibitoren

Historisch handelt es sich bei der Aspartylprotease Renin wahrscheinlich um die mit am frühesten und intensivsten untersuchte Protease überhaupt. Viele Erkenntnisse konnten später auf andere Aspartylproteasen übertragen werden. IIZUKA et al. demonstrierten bereits 1988 mit dem Inhibitor KRI-1230 (**23**) den Zugang zu aktiven Renin-Inhibitoren auf Basis von Norstatinen^[98].

Das prominenteste Target der 1990er-Jahre stellte die HIV-Protease dar. Vor allem durch KISO et al. wurden im Verlauf dieses Jahrzehntes sukzessive, ausgehend vom natürlichen Substrat der HIV-Protease und dessen Erkennungsmotiv Phe-Pro bzw. Tyr-Pro, immer

potentere und selektivere Inhibitoren, die so genannten Kynostatine wie z. B. KNI-272 (**24**) und der pharmakokinetisch daraus optimierte Inhibitor JE-2178 (**25**) abgeleitet^[99-103]. Ähnliche Strategien, d. h. systematische Abwandlung der Erkennungsstruktur, wurden auch in zahlreichen weiteren Veröffentlichungen verfolgt^[65,104,105]. Besonders hervorzuheben sind Arbeiten von TAKASHIRO et al., in denen auch der Benzyl-Rest des Phenylalanins systematisch verändert wurde^[106].

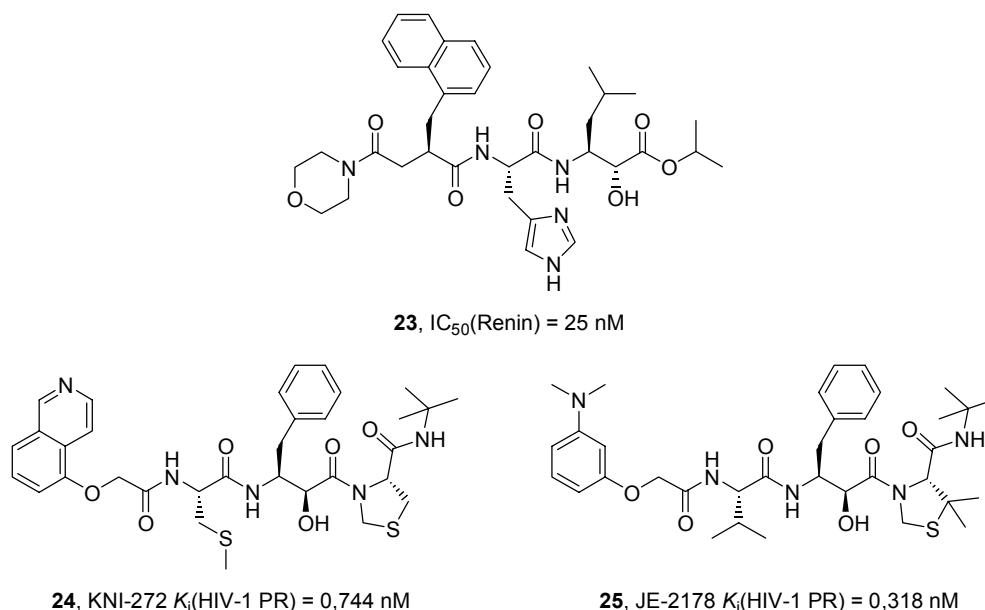


Abb. 1-25: Norstatin-Inhibitoren des humanen Renins und der HIV-Protease.

Bei β -Secretase (BACE) und Plasmepsin II handelt es sich um neuere, sehr aktuelle Targets. Auch hier sind schon Inhibitoren mit Norstatin-Gerüst bekannt:

Im Falle der β -Secretase besitzen die veröffentlichten Inhibitoren^[107] wie etwa KMI-008 (**26**) noch sehr ausgeprägten peptidischen Charakter, sind also dem β -Amyloid-Precursor-Protein, dem natürlichen Substrat, noch sehr ähnlich^[108].

Erfolgreich gegen Plasmepsin II getestete Norstatin-Inhibitoren stammen aus ursprünglich für die HIV-Protease konzipierten Verbindungskollektionen. So gehören die Inhibitoren KNI-727 (**27**) und daraus hervorgegangenes KNI-10006 (**28**) zu den bereits weiter oben erwähnten Kynostatinen mit guter Aktivität gegen Plasmepsin II und Selektivität gegenüber Cathepsin D^[109,110].

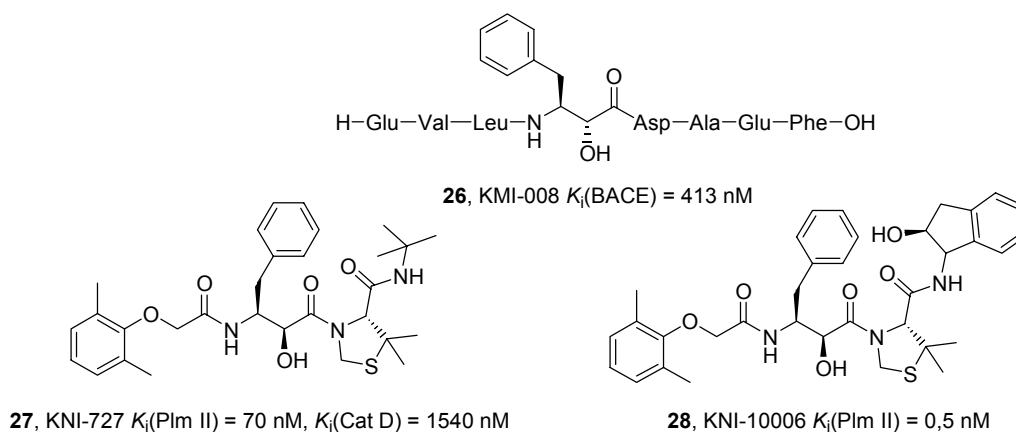


Abb. 1-26: Norstatin-Inhibitoren der β -Secretase und des Plasmeypsin II.

1.6.2 Norstatine als Naturstoffe

So wie es sich bei Statinen mit Pepstatin A (**1**) um einen natürlichen Vertreter handelt, sind auch von Norstatinen zahlreiche Naturstoffe mit entsprechendem Einbau von α -Hydroxy- β -aminosäuren bekannt. Zu den einfachsten Beispielen zählen die von kurzen Peptiden abgeleiteten Verbindungen Bestatin (**29**), Probestin (**30**)^[111,112], Phebestin (**31**)^[113] und Amastatin (**32**)^[114]. Bei dem von UMEZAWA et al. 1976 aus Kulturfiltrat von *Streptomyces olivoreticuli* isolierten und strukturell aufgeklärten Bestatin^[115,115] handelt es sich um [(2*S*,3*R*)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-L-leucin^[116]. Bestatin ist ein kompetitiver und spezifischer Inhibitor der Leucin-Aminopeptidase, der Aminopeptidase B und der Triaminopeptidase, inhibiert also einige Metalloproteasen. Weitere gängige Proteasen wie Aminopeptidase A, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Papain, Pepsin und Thermolysin werden nicht inhibiert.

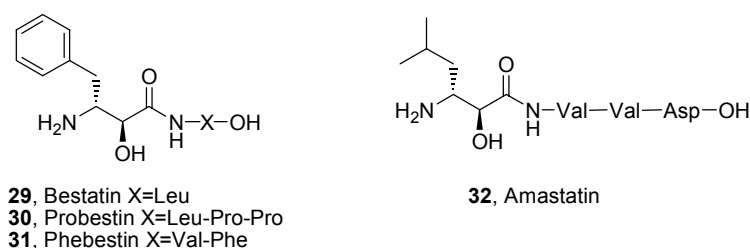


Abb. 1-27: Einfache peptidische Naturstoffe mit Norstatin-Struktureinheit.

Außer in diesen einfachen, linearen Strukturen findet man die α -Hydroxy- β -amino-Einheit auch in so komplexen Gerüsten wie dem des Diterpens Taxol (**33**)^[117], einem interessanten

Wirkstoff zur chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren und im ebenfalls zytotoxischen, aus einem Schwamm der Gattung *Theonella* isolierten, zyklischen Peptid Keramid F (KF, **34**)^[118]. Dieses Cyclopeptid mit zahlreichen ungewöhnlichen Einzelbausteinen verfügt neben der eigentlichen Norstatin-Einheit auch noch über eine strukturell sehr verwandte α -Ketoamid-Gruppe. Weitere zyklische Beispiele sind Calophycin^[119], Perthamid B^[120] und das zyklische Glykopeptid Theonegramid^[121].

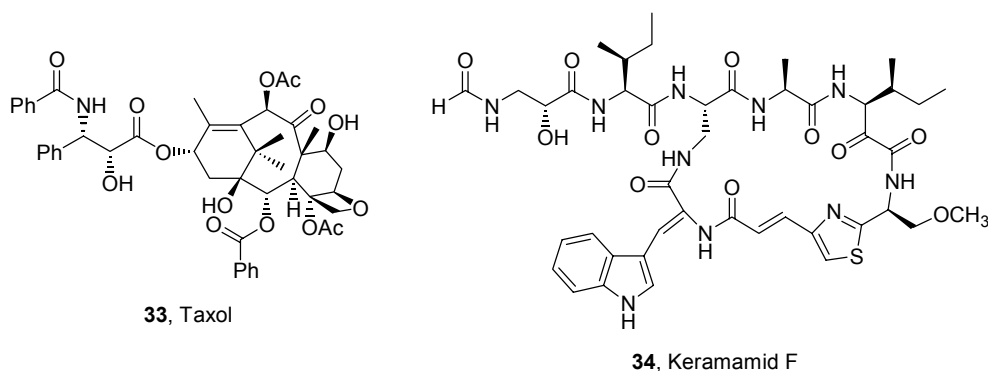


Abb. 1-28: Komplexe Naturstoffe Taxol und Keramid F mit Norstatin-Einheit.

Neben Keramid F verfügen noch einige weitere Naturstoffe zwar nicht über α -Hydroxy- dafür aber über α -Ketoamid-Teilstruktur. Sie sollen der Vollständigkeit halber hier noch aufgezählt werden, auch weil ihre Totalsynthesen teilweise im vorletzten Schritt über die α -Hydroxy-Stufen verlaufen, die abschließend oxidiert werden: Cyclotheonamid A^[122,123], Orbiculamid A^[124], Eurystatin A bzw. B^[125] und Poststatin^[126].

1.6.3 Synthetischer Zugang zu Norstatinen

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1986 berichteten OKUYAMA et al. über Erkenntnisse zum Biosyntheseweg von Bestatin^[127]. Dabei wurde durch Isotopenmarkierung festgestellt, dass, wie zu erwarten, sowohl Phenylalanin als auch Leucin als Bausteine eingesetzt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass die verbindende α -Hydroxycarbonyl-Einheit aus Essigsäure bzw. Acetat stammt, es also zu einer Decarboxylierung des Phenylalanins mit sich anschließender C-C-Knüpfung unter C-Kettenverlängerung und Oxidation kommt. An diesem Mechanismus sind mit großer Wahrscheinlichkeit carbanionische Intermediate beteiligt.

Im Mittelpunkt der meisten Synthesen von Norstatinen steht die Verfügbarkeit von α -Hydroxy- β -aminosäuren. Diese Verbindungsklasse mit drei funktionellen Gruppen und in der Regel zwei Stereozentren stellt synthetisch eine Herausforderung dar. Kommerziell sind entsprechende Bausteine nur sehr eingeschränkt erhältlich. Es existieren jedoch auch solche Synthesen, bei denen nicht explizit zunächst α -Hydroxy- β -aminosäuren hergestellt werden, sondern sich die strukturelle Einheit aus anderen Vorstufen in einem Schritt ergibt. Ein dritter Ansatz führt schließlich zunächst zu α -Keto-Strukturen, an die sich eine Reduktion zu den Endprodukten anschließt. In den beiden folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Wege, sowohl in Lösung als auch an fester Phase kurz vorgestellt und diskutiert werden. Der in der Praxis überaus bedeutende Aspekt der Diastereoselektivität wird dabei ausgeklammert und der Fokus ausschließlich auf die Methoden zur Bindungsknüpfung gerichtet.

1.6.3.1 Synthesen in Lösung

C₁-Verlängerung von α -Aminoaldehyden und α -Aminosäuren

Zum Aufbau trifunktioneller Verbindungen wie α -Hydroxy- β -aminosäuren mit zwei Stereozentren bietet es sich an, den Pool der natürlichen bzw. kommerziell erhältlichen α -Aminosäuren einzusetzen, welche bereits über zwei funktionelle Gruppen und definierte Konfiguration verfügen. Die Aufgabe besteht in diesem Fall darin, unter C₁-Kettenverlängerung und Erhalt der Konfiguration zur Zielstruktur zu kommen. Für die Durchführung einer solchen Kettenverlängerung sind zahlreiche Möglichkeiten bekannt.

Die vielleicht älteste Variante (Weg 1, Abb. 1-29) setzt geschützte α -Aminoaldehyde zum entsprechenden Cyanhydrin um. Anschließende Nitril-Verseifung führt zur α -Hydroxy- β -aminosäure, welche als Baustein eingesetzt werden kann^[128-132].

Als weitere Möglichkeit existiert die Addition von Vinyl- oder Ethinyl-GRIGNARD-Reagenzien (Weg 2 und 3) oder den entsprechenden lithiumorganischen Verbindungen an geschützte α -Aminoaldehyde. In den erhaltenen Propargyl- bzw. Vinylalkoholen werden die Mehrfachbindungen nach Schützung der Hydroxy-Funktion oxidativ mit z. B. NaIO₄/RuCl₃ gespalten und dadurch die Säure-Funktion generiert^[133,134]. Diese Methode kann auch direkt von der geschützten α -Aminosäure ausgehend durchgeführt werden, die in Form eines WEINREB-Amids oder so genannter Urethan-N-carboxyanhydride (UNCAs)

aktiviert ist. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, die durch Substitution entstehenden Propargyl- bzw. Vinylketone in einem separaten Schritt diastereoselektiv zu reduzieren^[106,135,136].

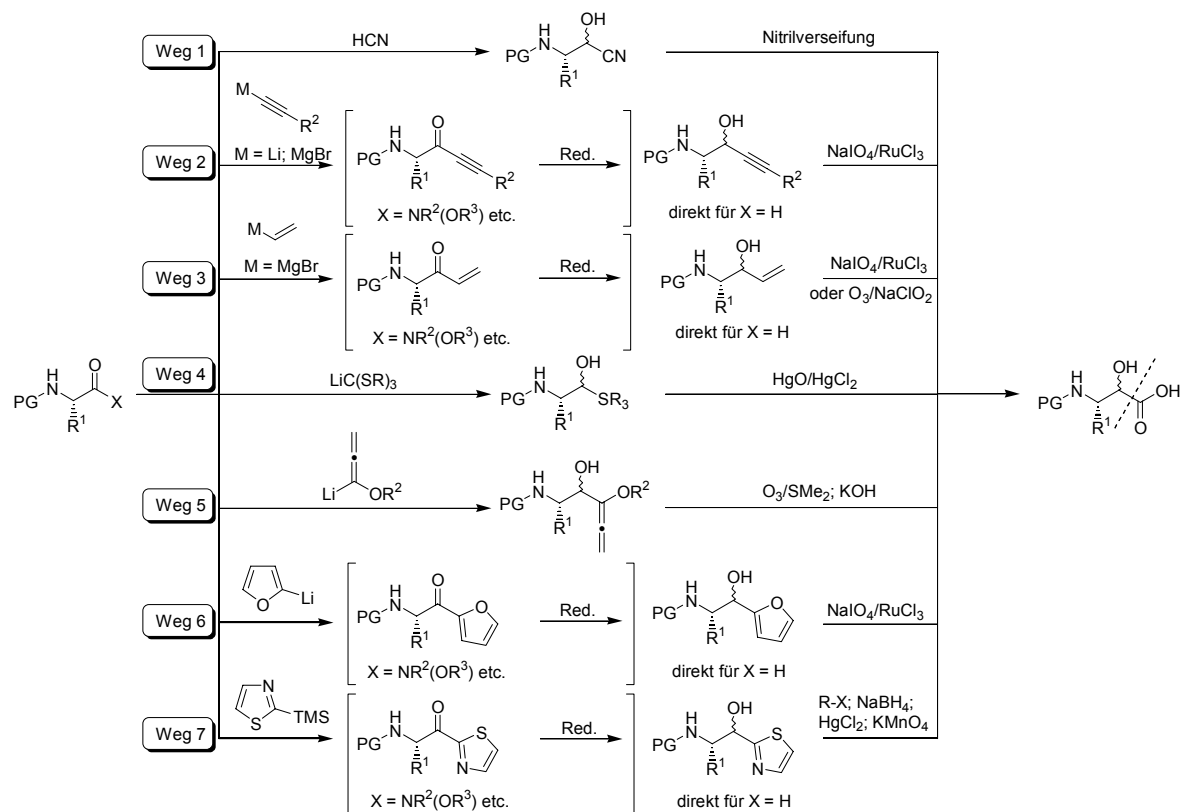


Abb. 1-29: Möglichkeiten der C_1 -Kettenverlängerung von geschützten α -Aminoaldehyden und α -Aminosäuren.

Als weitere C_1 -Bausteine zur Addition an geschützte α -Aminoaldehyde kommen lithiiertes Trialkylorthoformiat (Weg 4)^[137-140], lithiiertes Alkoxyallen (Weg 5)^[141] und Furfuryllithium (Weg 6)^[142] in Frage. Die maskierte Carboxy- bzw. Carboxylat-Funktion muss in allen drei Fällen durch oxidativen Abbau des primären Additionsproduktes, im Falle des Orthothioformiats durch HgO/HgCl_2 , aus dem Alkoxyallen durch Ozon und durch den Abbau des Furan-Rings mit $\text{NaIO}_4/\text{RuCl}_3$, freigesetzt werden.

Eine weitere sehr wichtige Variante zur Homologisierung der Kohlenstoff-Kette stellt die von DONDONI vorgestellte, auf Thiazol basierende Methodik dar (Weg 7). Dabei werden 2-Lithium- oder 2-Trimethylsilylthiazol an geschützte α -Aminoaldehyde addiert bzw. aus geschützten α -Aminosäuren erhaltene WEINREB-Amide substituiert und anschließend reduziert. Abbau des Thiazol-Rings über Alkylierung zum Thiazolium-Salz, Reduktion

zum Thiazolidin und Spaltung mit HgCl_2 führt zum geschützten α -Hydroxy- β -aminaldehyd, der oxidativ in die entsprechende Säure überführt werden kann^[143-145].

Aminohydroxylierung α,β -ungesättigter Carbonsäuren/Carbonsäureester

Bei den bisher vorgestellten Synthesen unter C_1 -Kettenverlängerung wurde der spätere Carboxy-Kohlenstoff eingeführt und der Alkohol aus einem Carbonyl-Kohlenstoff des Eduktes reaktiv erhalten, während die Amino-Gruppe bereits im Edukt vorhanden war. In den folgenden Beispielen werden sowohl Hydroxy- als auch Amino-Gruppe neu eingeführt. Dies lässt sich als Aminohydroxylierung an eine α,β -ungesättigte Säure, einen Ester oder ein Säureamid formulieren. Das Kohlenstoff-Gerüst ist bereits im Edukt ausgebildet.

Tatsächlich lässt sich eine solche Aminohydroxylierung durch MICHAEL-Addition eines z. B. aus Dibenzylamin und Butyllithium *in situ* erzeugten Amids an einen α,β -ungesättigten Ester und direkt angeschlossene Hydroxylierung mit z. B. Campherylsulfonyloxaziridin in einer Tandem-Reaktion durchführen (Abb. 1-30, Weg 1)^[146,147].

Methodisch sehr ähnlich ist auch die asymmetrische Aminohydroxylierung nach SHARPLESS (Weg 2). Bei dieser Reaktion wird *in situ* ein N-Chloralkylcarbamat aus einem Alkylcarbammat, Alkylhypochlorit und NaOH als nucleophile Stickstoffquelle freigesetzt und Osmium-katalysiert [Kaliumosmat(VI)-Dihydrat, $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$] an die Doppelbindung addiert, wobei gleichzeitig durch das als Cosolvens eingesetzte Wasser als Sauerstoffquelle die Hydroxy-Gruppe gebildet wird. Asymmetrische Induktion und Regioselektivität ergeben sich durch den Zusatz von Phthalazin-Alkaloid-Liganden [(DHQD)₂-PHAL und (DHQ)₂-PHAL]^[148-151].

Eine Aminohydroxylierung in zwei voneinander getrennten Schritten ergibt sich bei der Reaktionsfolge Epoxidierung und regioselektive, katalysierte Epoxidöffnung mit einem N-Nucleophil (Weg 3). Als N-Nucleophile kommen dabei Azide^[152], Nitrile unter LEWIS-Säure-Katalyse (modifizierte RITTER-Reaktion)^[153] oder direkt Amine^[154] in Frage.

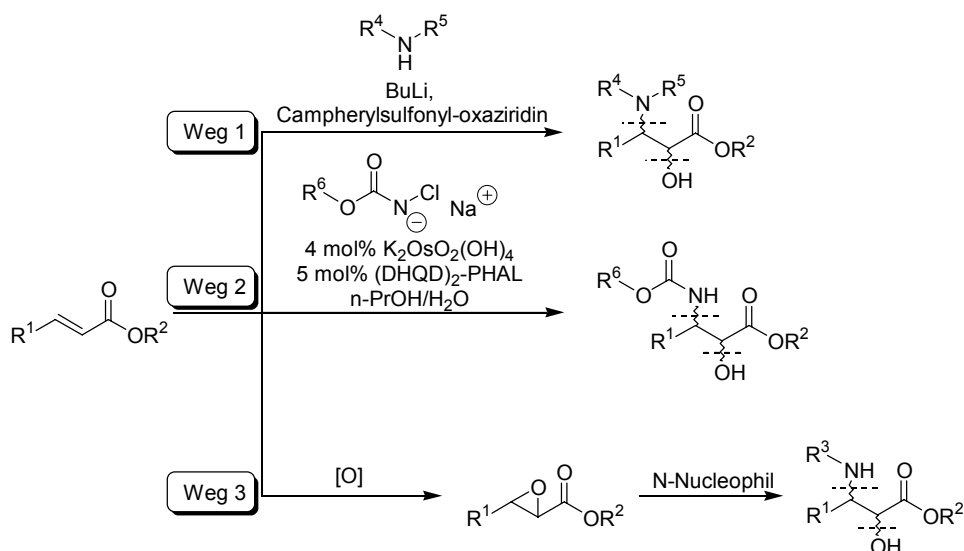


Abb. 1-30: Aminohydroxylierung von α,β -ungesättigten Carbonsäureestern.

Addition an Aldimine

Bei der LEWIS-Säure-katalysierten Addition von α -Silyloxysilylketenacetalen (C_2 -Baustein) an N-Benzylaldimine erfolgt die Verknüpfung zwischen dem späteren α - und β -Kohlenstoff, d. h. es wird eine maskierte α -Hydroxycarboxy-Gruppe nucleophil übertragen (Abb. 1-31)^[155,156].

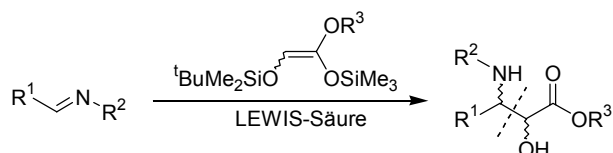


Abb. 1-31: LEWIS-Säure-katalysierte Addition von α -Silyloxysilylketenacetalen an Aldimine.

Ebenfalls von Aldiminen geht die STAUDINGER-Reaktion aus. Es handelt sich dabei um eine [2+2]-Cycloaddition *in situ* erzeugter Ketene (C_2 -Baustein) an Aldimine. Die C-C-Verknüpfung erfolgt wiederum zwischen dem späteren Kohlenstoff 2 und 3, gleichzeitig kommt es zur Ausbildung eines β -Lactams. Ketene-Bildung erfolgt üblicherweise durch Basenzugabe aus α -Alkoxy- oder α -Silyloxyessigsäurechloriden. Die gebildeten β -Lactame lassen sich direkt durch Hydrolyse, Alkoholyse oder Aminolyse zu den entsprechenden, mit Schutzgruppen versehenen α -Hydroxy- β -aminosäuren, -estern oder -amiden öffnen (Abb. 1-32)^[157-160].

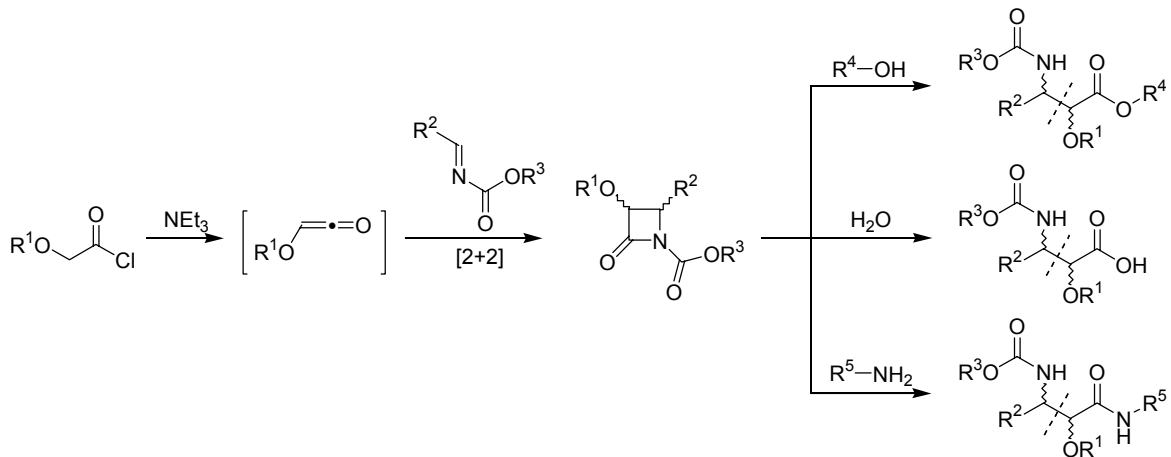


Abb. 1-32: STAUDINGER-Reaktion: [2+2]-Cycloaddition von Keten und Aldimin zum β -Lactam.

Nitroaldol-Reaktion

Bei der Synthese von α -Hydroxy- β -aminosäuren mit Hilfe der Nitroaldol-Reaktion unter Einsatz von Nitroalkanen gibt es grundsätzlich zwei Vorgehensweisen. Die aciden Nitroalkane können entweder an elektrophile Glyoxalsäureester oder -amide (C_2 -Baustein) oder an geschützte α -Aminoaldehyde addiert werden. Im ersten Fall (Weg 1, Abb. 1-33) entsteht durch Reduktion der Nitro-Gruppe die β -Amino-Gruppe^[161], im zweiten Fall (Weg 2) wird durch stark saure Hydrolyse eine Nitroalkan-Spaltung durchgeführt. Üblicherweise wird dabei Nitromethan verwendet, welches als C_1 -Baustein fungiert^[162].

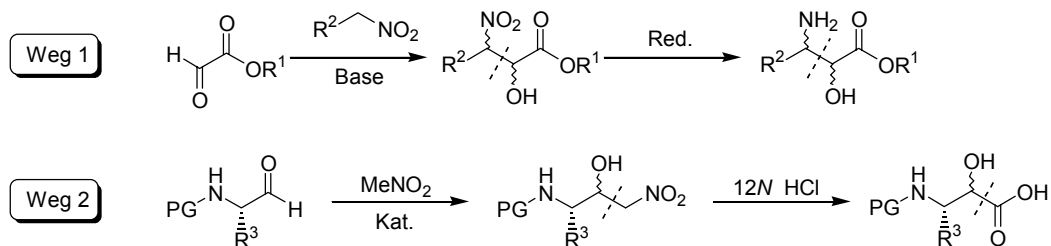


Abb. 1-33: Nitroaldol-Reaktion: Umsetzung von Aldehyden mit Nitroalkanen.

PASSERINI-Reaktion

Im Unterschied zu den bisher vorgestellten Methoden, die vor allem die Synthese von α -Hydroxy- β -aminosäuren als Bausteine für den Einbau in Peptidstrukturen zum Gegenstand hatten, handelt es sich bei der PASSERINI-Reaktion um eine Umsetzung, in der simultan aus den drei Komponenten Isonitril (C_1 -Baustein), geschützter α -Aminoaldehyd und Carbonsäure die α -Hydroxy- β -aminosäureamid-Struktur unter C-Kettenverlängerung auf-

gebaut werden kann. Primäres Reaktionsprodukt ist jedoch ein α -Acyloxy- β -amino-säureamid mit geschützter Amino-Gruppe. Nach Entschützung der β -Amino-Gruppe kommt es jedoch spontan zu einem O,N-Acylshift von der α -Hydroxy- zur β -Amino-Gruppe. Damit wird die zentrale α -Hydroxy- β -aminosäure sowohl C- als auch N-terminal über Amidbindungen verlängert (Abb. 1-34, Weg 1). Alternativ kann das primäre, geschützte α -Acyloxy- β -aminosäureamid bei Wahl einer entsprechenden Säurekomponente, z. B. Trifluoressigsäure, zum α -Hydroxy- β -aminosäureamid verseift werden (Weg 2). Die PASSERINI-Reaktion hat beim Aufbau der hier vorgestellten Strukturen große Bedeutung erlangt, was sich in zahlreichen Veröffentlichungen widerspiegelt. Es wurde über Anwendungen zur Synthese peptidomimetischer Inhibitoren^[163-165] sowie von Naturstoffen wie dem in Kap 1.6.2 erwähnten Cyclotheonamid A^[166] und Eurystatin A^[167,168] berichtet. Auch diastereoselektive Durchführungen wurden untersucht^[169].

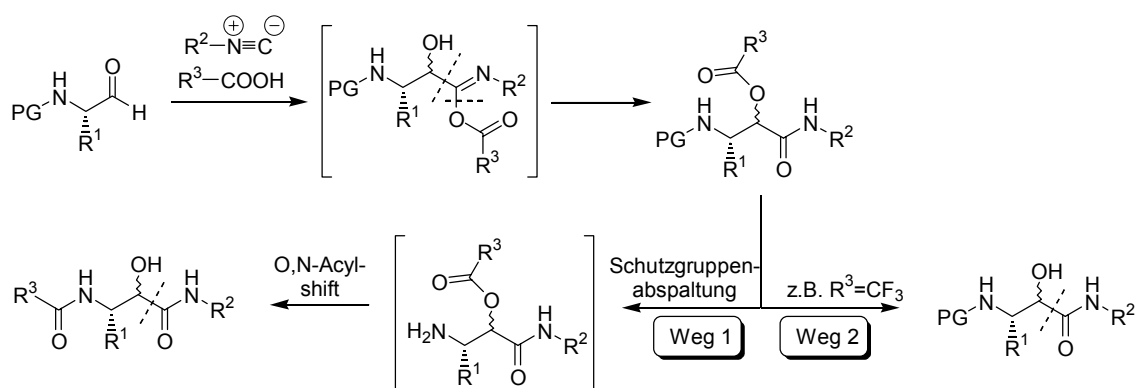


Abb. 1-34: PASSERINI-Dreikomponenten-Reaktion: Isonitril, α -Aminoaldehyd und Carbonsäure.

Modifizierte DAKIN-WEST-Reaktion

Ein Zugang zu α -Hydroxy- β -amino-Strukturen kann auch über die entsprechenden α -Keto-Verbindungen erfolgen, die abschließend reduziert werden. Dabei bilden sich aus α -N-Acylaminosäuren, wobei die Acyl-Gruppe auch eine Peptidkette darstellen kann, zunächst unter den Reaktionsbedingungen 5(4*H*)-Oxazolone, die ihrerseits in der 4-Position acyliert werden können. In der DAKIN-WEST-Reaktion selbst geschieht dies durch Acetanhydrid^[170]. Eine decarboxylierende Ringöffnung führt schließlich zum α -Acylaminomethylketon (Abb. 1-35, Weg 1). Wird die Reaktion dahingehend modifiziert, dass mit Oxalsäuremonoesterchlorid acyliert wird, so werden nach Ringöffnung β -N-Acylamino- α -ketoester erhalten (Weg 2)^[79,171,172].

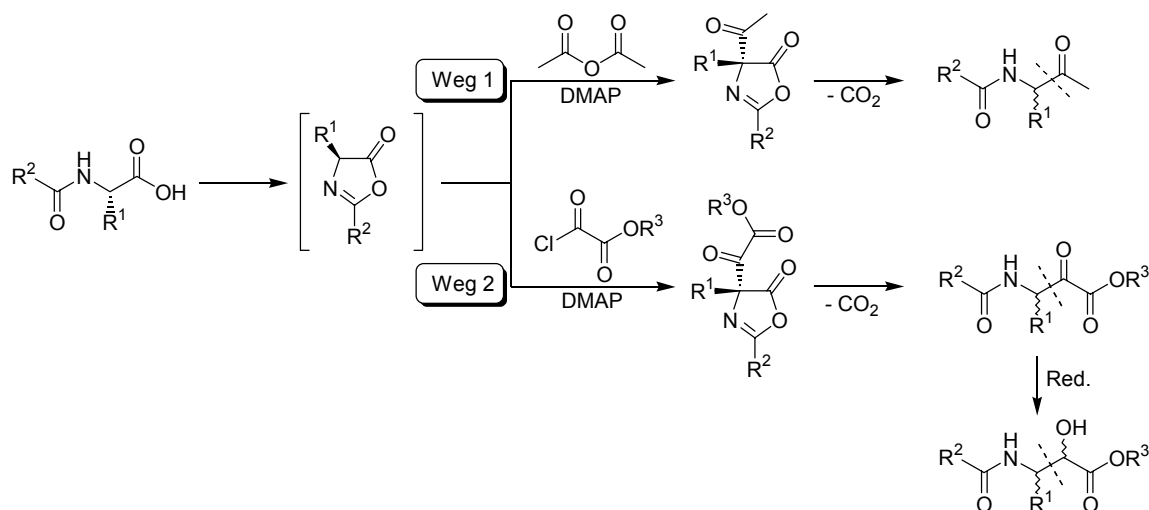


Abb. 1-35: Normale (Weg 1) und modifizierte DAKIN-WEST-Reaktion: Acylierung eines 5(4H)-Oxazolons mit Oxalsäuremonoesterchlorid und decarboxylierende Ringöffnung zum α -Ketoester (Weg 2).

Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Methode

Ein weiterer Zugang zu α -Ketosäuren, -estern und -amiden eröffnet sich über eine von WASSERMAN etablierte Methode mittels Phosphor-Yliden. Dabei wird Triphenylphosphin mit Bromacetonitril zum Phosphoniumbromid-Salz alkyliert und anschließend sehr leicht zum stabilisierten WITTIG-Ylid, einem (Cyanmethylen)phosphoran, deprotoniert. Die Kupplung mit einer Carbonsäure, z. B. einer geschützten α -Aminosäure, führt zum Acyl-(cyanmethylen)phosphoran. Oxidative Spaltung der C-P-Doppelbindung nach erfolgter Acylierung setzt neben Triphenylphosphinoxid ein hochreaktives α,β -Diketonitril frei, welches mit Alkoholen, Wasser oder Aminen zum entsprechenden α -Ketoester, zur α -Ketosäure oder dem α -Ketoamid abreagiert. Die gebildeten α -Keto-Verbindungen können schließlich zu α -Hydroxy-Verbindungen reduziert werden (Abb. 1-36). Die Acyl-(cyanmethylen)phosphoran-Methode steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Alle weiteren Einzelheiten werden im Kontext der präsentierten Ergebnisse noch näher erörtert. Nach der Präsentation der Methode in einer ersten Veröffentlichung^[173] zeigten WASSERMAN et al. die breite Anwendbarkeit bei der Synthese der Naturstoffe Eurystatin A^[174], Poststatin^[175], Bestatin, Probestin und Phebestin^[176]. Zahlreiche weitere Veröffentlichungen über die Verwendung bei der Synthese von Peptidomimetika und Inhibitor-Strukturen untermauern die Bedeutung^[177-182].

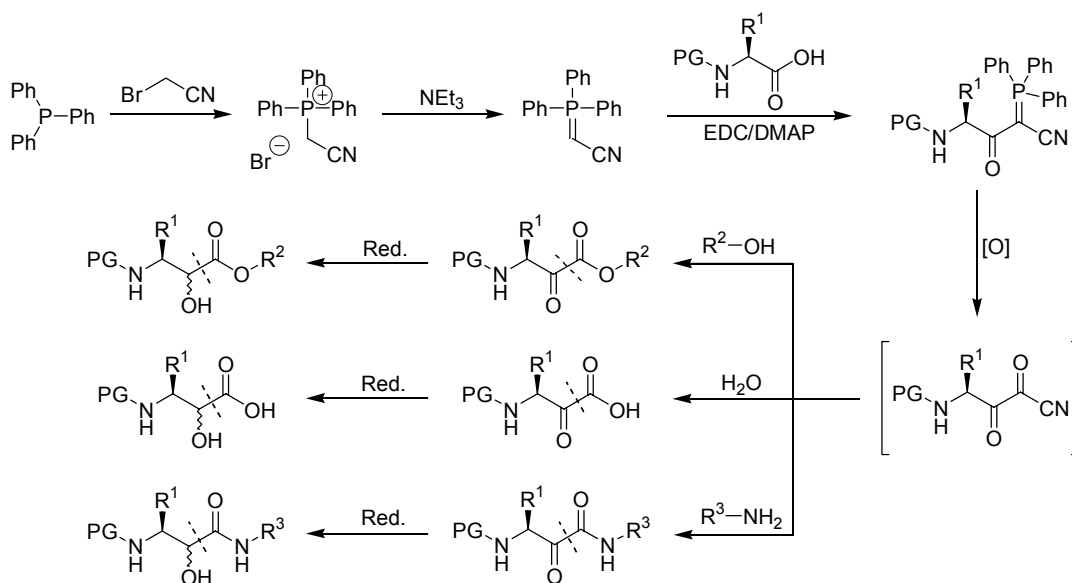


Abb. 1-36: Acyl(cyanmethyl)phosphoran-Methode nach WASSERMAN.

1.6.3.2 Synthesen an der festen Phase

Prinzipiell ist der Einbau eines Norstatin-Isosters in eine ansonsten peptidische Struktur sehr einfach zu realisieren. Im Verlauf einer normalen Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) muss an der entsprechenden Stelle anstatt einer α -Amino- eine α -Hydroxy- β -aminosäure eingebaut werden. Entsprechend wird auch verfahren, wobei das entstehende Peptid C-terminal über einen Linker am Polymer verankert ist. Die zu kuppelnde α -Hydroxy- β -aminosäure wird dabei vorher nach einer der zahlreichen in Kap. 1.6.3.1 vorgestellten Methoden in Lösung diastereomerenrein synthetisiert. Die Kupplungsbedingungen sind denen einer α -Aminosäure analog, d. h. die Hydroxy-Gruppe bedarf in der Regel keiner Schutzgruppe, eine etwaige Verzweigung über den sekundären Alkohol tritt nicht auf^[99,100,103,108,181]. Für den Fall, dass die α -Hydroxy- β -aminosäure C-terminal als erster Baustein eingesetzt wird, kann auch eine Immobilisierung über die Hydroxy-Gruppe an einen von ELLMAN eingeführten Dehydropyran(DHP)-Linker erfolgen^[107].

Als Baustein in der Festphasen-Peptidsynthese zum Aufbau von Norstatinen kommen nicht nur die α -Hydroxy- β -aminosäuren selbst, sondern auch durch STAUDINGER-[2+2]-Cycloaddition erhaltene α -Hydroxy- β -lactame (**35**) in Frage (vgl. Abb. 1-32). OJIMA et al. berichteten über deren Kupplung unter Ringöffnung auf den freien Amino-Terminus im Rahmen einer SPPS (Abb. 1-37)^[157,158,183].

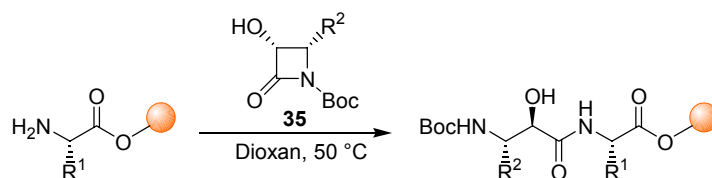


Abb. 1-37: Ringöffnende Peptidkupplung an fester Phase mit β -Lactamen^[183].

In einer Veröffentlichung von MELDAL et al. wurden ebenfalls in Lösung vorsynthetisierte Bausteine in der Festphasen-Synthese an SPOCC-1500-Harz verwendet^[184]. Im Rahmen einer Synthese von α -Ketoamid-Peptiden wurden dabei über die Acyl(cyanmethyl)phosphoran-Methode erhaltene Dipeptide (**36**) (Abb. 1-38) aus einer α -Keto- β -aminosäure und einer α -Aminosäure gekuppelt, wobei die Keto-Funktion als 1,3-Dithiolan geschützt wurde (**37**). Die α -Ketoamid-Peptide (**38**) sollten schließlich Harz-gebunden einem Screening zugeführt werden.

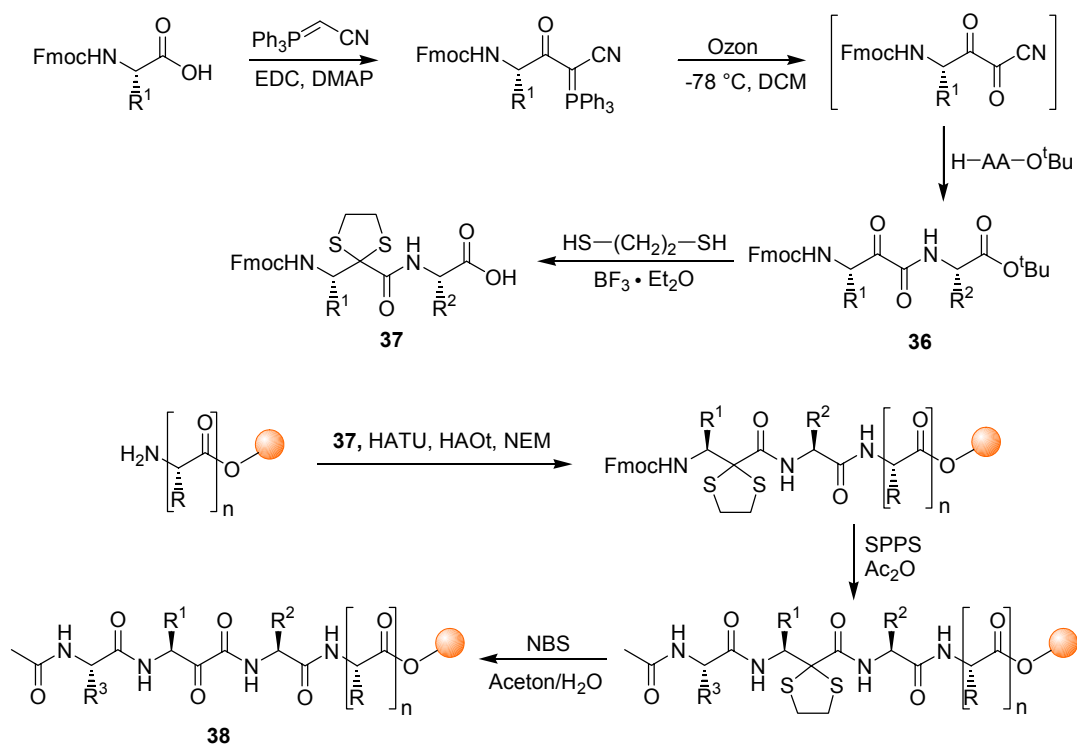


Abb. 1-38: Festphasen-Synthese von α -Ketoamid-Peptiden^[184].

Ebenfalls von MELDAL et al. stammt eine Publikation zum Aufbau des Norstatin-Isosters an der festen Phase unter Anwendung der Nitroaldol-Reaktion^[185]. Es ist dies innerhalb dieser Aufzählung das erste Beispiel, bei dem das Isoster selbst in einer Festphasen-Reaktion generiert wird, also nicht aus Lösungssynthesen bereitgestellte Bausteine verwendet werden. Ein N-terminales Serin eines Harz-gebundenen Peptids (**39**, Abb. 1-39) wird

dabei mit Natriumperiodat zum Glyoxylsäureamid (**40**) abgebaut. Nitroaldol-Reaktion mit verschiedenen Nitroalkanen führt zu einer α -Hydroxy- β -nitro-Einheit (**41**), die reduktiv in die α -Hydroxy- β -amino-Struktur (**42**) übergeht. Die Peptidkette lässt sich dann am neuen Amino-Terminus weiter verlängern. Das Ziel der Arbeit lag darin, die gebildeten Norstatine Harz-gebunden auf inhibitorische Wirkung an Renin zu untersuchen.

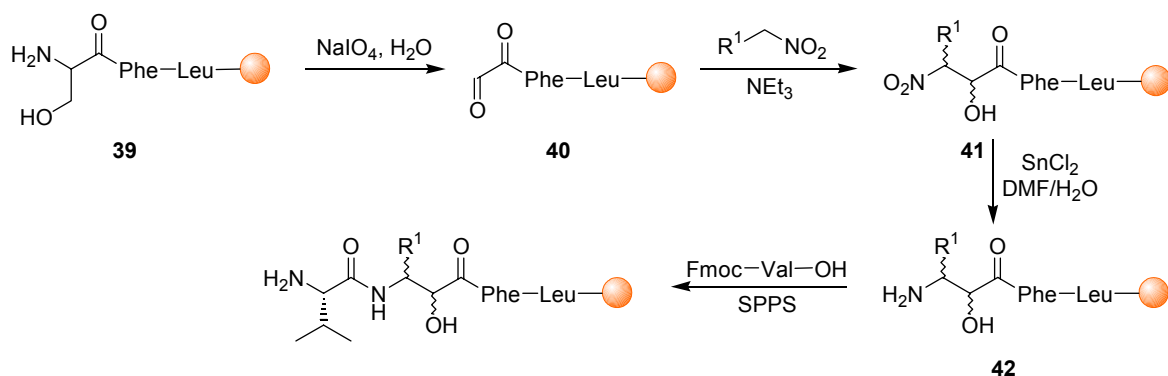


Abb. 1-39: Aufbau des Norstatin-Isosters an fester Phase durch Nitroaldol-Reaktion ^[185].

Auch die PASSERINI-Reaktion ist für eine Übertragung an die feste Phase sehr gut geeignet. BANFI et al. demonstrieren dies an polymeren, durch Formylierung und Dehydratisierung aus Amino-Gruppen gewonnenen Isonitrilen (**43**), die mit geschützten α -Aminoaldehyden und verschiedenen Carbonsäuren zur Reaktion gebracht werden und primär zu α -Acyloxy- β -aminosäuramiden (**44**) abreagieren ^[186,187]. Entfernung der Schutzgruppe auf dem Amino-Terminus und basische Reaktionsbedingungen führen nach O,N-Acyloxyshift zum Tripeptid-Analogon (**45**) mit zentraler Norstatin-Einheit.

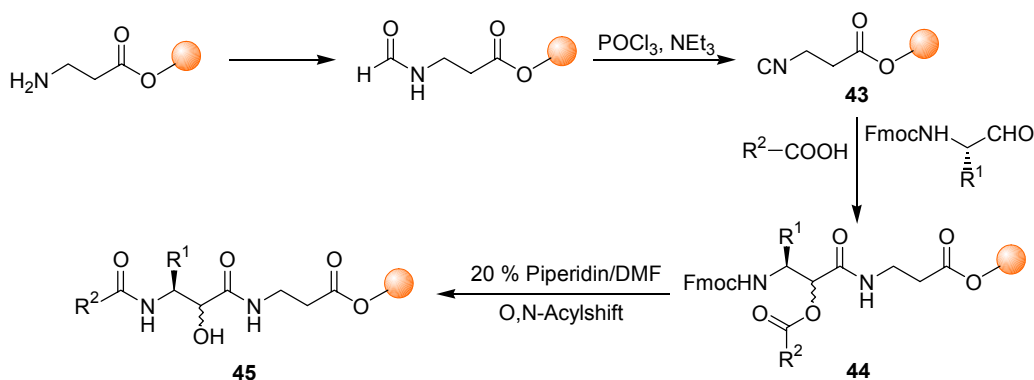


Abb. 1-40: Festphasen-Variante der PASSERINI-Dreikomponenten-Reaktion ^[186].

1.7 Carbanionen-Äquivalente

Dem Grundprinzip folgend, dass bei organischen Synthesen in nahezu allen Fällen elektrophile mit nucleophilen Zentren reagieren und dabei neue Bindungen ausgebildet werden, ergibt sich bei C-C-Verknüpfungen die Notwendigkeit, neben einem positiv auch einen negativ polarisierten Kohlenstoff mit carbanionischem Charakter zu generieren. Bis auf wenige Ausnahmen wird dabei in den in Kap. 1.6.3 vorgestellten synthetischen Zugängen zu α -Hydroxy- β -aminosäure-Derivaten zur letztendlichen Synthese von Norstatinen ein carbanionischer C₁-Baustein mit einem von einer α -Aminosäure abgeleiteten Elektrophil verknüpft.

Formal lassen sich zum Aufbau der Zielverbindungen Carboxy- (**46**), Formylester- (**47**), Formamid- (**48**) bzw. Formylanionen (**49**) [allgemein Acylanionen (**50**)] als C₁-Bausteine formulieren (Abb. 1-41), die jedoch als direktes Synthons nicht verfügbar sind. Aus diesem Grund werden verschiedenste maskierte Anionen-Äquivalente eingesetzt. Entsprechende d¹-Synthons verfügen über ein von positiv nach negativ umgepoltes Kohlenstoff-Atom, aus dem nach Umsetzung mit dem Elektrophil die gewünschte Funktionalität zurückerhalten wird.

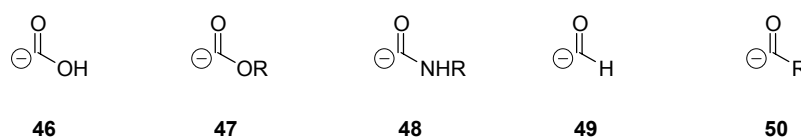


Abb. 1-41: Formale d¹-Anionen-Äquivalente.

Das Konzept der Reaktivitätsumpolung geht maßgeblich auf SEEBACH zurück, der vor allem 1,3-Dithiane als Acylanionen-Äquivalente einführte (Abb. 1-42) ^[188,189].

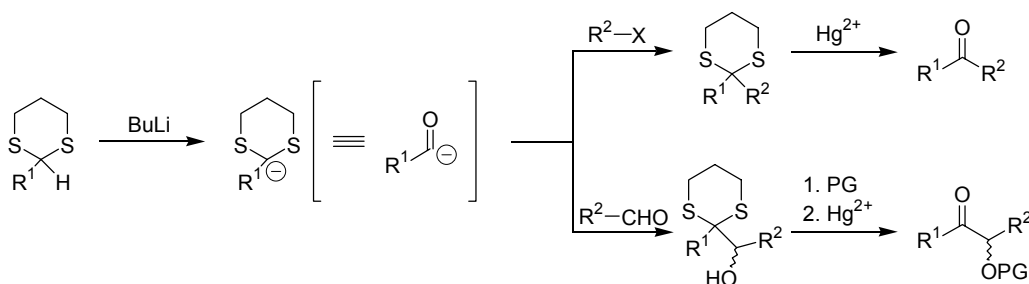


Abb. 1-42: Konzept der Reaktivitätsumpolung nach SEEBACH: Dithiane als Acylanion-Äquivalente.

Die in Kap. 1.6.3.1 beschriebenen Bausteine zur C₁-Verlängerung (**51-57**) lassen sich entsprechend auch als maskierte Carboxy- bzw. Formylesteranionen interpretieren (Abb. 1-43), wobei berücksichtigt werden muss, dass nicht nur das Äquivalent selbst, sondern auch die Art der Demaskierung auf die letztlich erhaltene Funktionalität Einfluss nimmt.

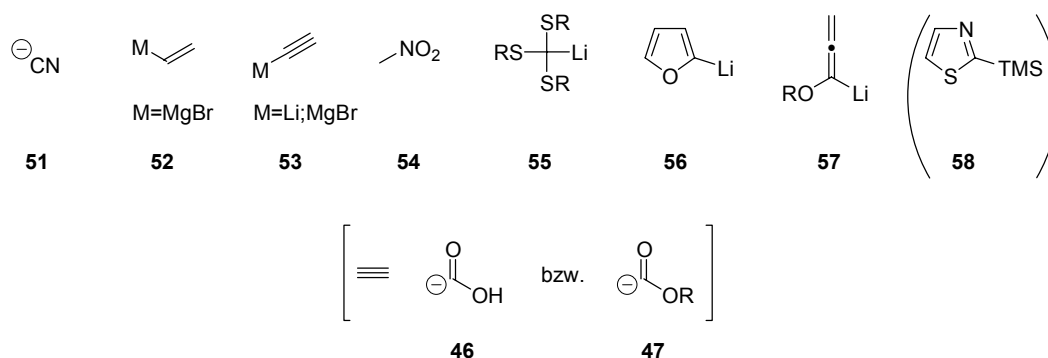


Abb. 1-43: Mögliche maskierte Carboxy- und Formylesteranion-Äquivalente zur C₁-Verlängerung.

Bei Furyllithium (**56**) und lithiiertem Alkoxyallen (**57**) handelt es sich bei näherer Betrachtung um metallierte Enoether-Derivate der allgemeinen Form **59** (Abb. 1-44). Diese können zusammen mit daraus ableitbaren metallierten Vinylthioethern (**60**) und Enaminen (**61**) auch als maskierte Acylanionen fungieren, da sich durch Hydrolyse Carbonyl-Gruppen freisetzen lassen.

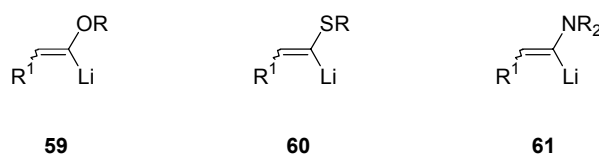


Abb. 1-44: Lithiierte Enoether, Vinylthioether und Enamine als Acylanionen-Äquivalente.

Lithiiertes bzw. sehr häufig im Anschluss trimethylsilyliertes Thiazol (**58**) wird üblicherweise als Formylanion betrachtet und eingesetzt, die entstehenden Aldehyde lassen sich aber auch sehr leicht zur Carbonsäure oxidieren. In diesem Fall genauso wie bei Thiazolidin (**62**)^[190], Oxazolidin (**63**)^[191] und anderen, vor allem N,S-Acetalen (**64**)^[192] (Abb. 1-45), spricht man von Heteroatom-dirigierter Metallierung. Besonders in den letztgenannten Fällen lassen sich durch chirale Heterocyclen enantio- oder diastereoselektive nucleophile Additionen an Elektrophile, z. B. Aldehyde, realisieren. Aus den verwendeten Heterocyclen wird hydrolytisch die Carbonyl-Gruppe erhalten.

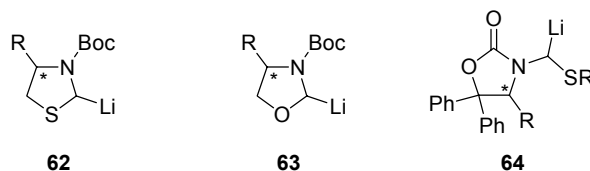


Abb. 1-45: Verwendung metallierter Heterocyclen zur enantio- bzw. diastereoselektiven Addition.

Weiterhin große Bedeutung als Acyl- bzw. Formylanion-Äquivalente haben substituierte Hydrazone erlangt. BALDWIN et al.^[193-195] verwendeten dabei lithiierte N-monoalkyl-substituierte Hydrazone (Azoanionen) (**65**, Abb. 1-46). Solche, mit einer sperrigen N-Alkylgruppe versehene Spezies verfügen über stark ausgeprägte C-Nucleophilie, was durch Formulierung mesomerer Grenzstrukturen verdeutlicht werden kann. Sie sind zu Substitutions- oder Additions-Reaktionen mit z. B. Halogenalkanen, Aldehyden, Ketonen und MICHAEL-Substraten befähigt. Abschließende Hydrazon-Hydrolyse führt zur entsprechenden Carbonyl-Verbindung (**66**).

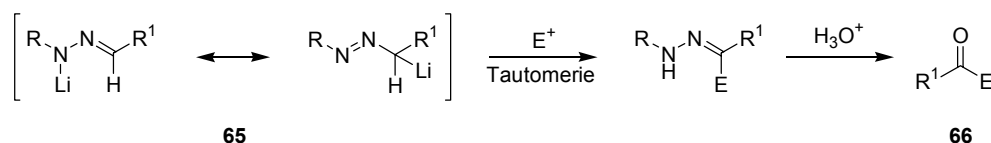


Abb. 1-46: Lithiierte N-monoalkylsubstituierte Aldehydhydrazone als Acylanion-Äquivalente.

Bereits 1968 konnten BREHME et al. zeigen, dass N,N-dialkylsubstituierte Aldehydhydrazone bei entsprechenden Substituenten bereits an sich über C-Nucleophilie verfügen. Hauptsächlich wurden dabei von N,N-Dimethylhydrazin und 1-Aminopyrrolidin abgeleitete Phenyl- und einfache Alkylhydrazone untersucht. Die Nucleophilie am eigentlich positiv polarisierten Hydrazon-Kohlenstoff von **67** (Abb. 1-47) lässt sich durch die Donor-Funktion des freien Elektronenpaares am dialkylsubstituierten Stickstoff erklären, die besonders bei Einbindung dieses Stickstoffs in einen Fünfring stark ausgeprägt ist. Weiter verdeutlichen lässt sich der carbanionische Charakter durch die Verwendung der Bezeichnung „Azaenamin“. In zahlreichen Veröffentlichungen^[196-201] wurden als Elektrophile Sulfonylisocyanat sowie MANNICH- und VILSMEIER-Iminium-Reagenzien eingesetzt^[202].

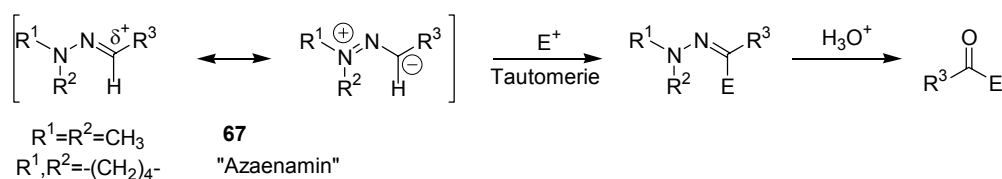


Abb. 1-47: Nucleophile N,N-Dialkylhydrazone als aza-analoge Enamine (Azaenamine).

Aufgegriffen wurde das Konzept in jüngerer Zeit durch eine Kooperation der Arbeitsgruppen LASSALETTA und ENDERS^[203,204]. Es werden dabei mit SAMP-analogen N,N-Dialkylhydrazinen Formaldehyd-N,N-dialkylhydrazone (**68**) gebildet, welche Formylanionen repräsentieren und verschiedene Substrate nucleophil angreifen können (Abb. 1-49). Als Substrate werden (aktivierte) Aldehyde^[205-207], Nitroolefine^[208-212], Iminium-Ionen, α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen^[213-218] und Trifluormethylketone^[219,220] verwendet, wobei z. B. die Elektrophilie der Aldehyde zum Teil durch LEWIS-Säure-Katalyse erhöht wird. Für die Freisetzung der Zielverbindungen aus den Hydrazonen wird üblicherweise eine Ozonolyse der C-N-Doppelbindung und reduktive Aufarbeitung mit Dimethylsulfid präferiert.

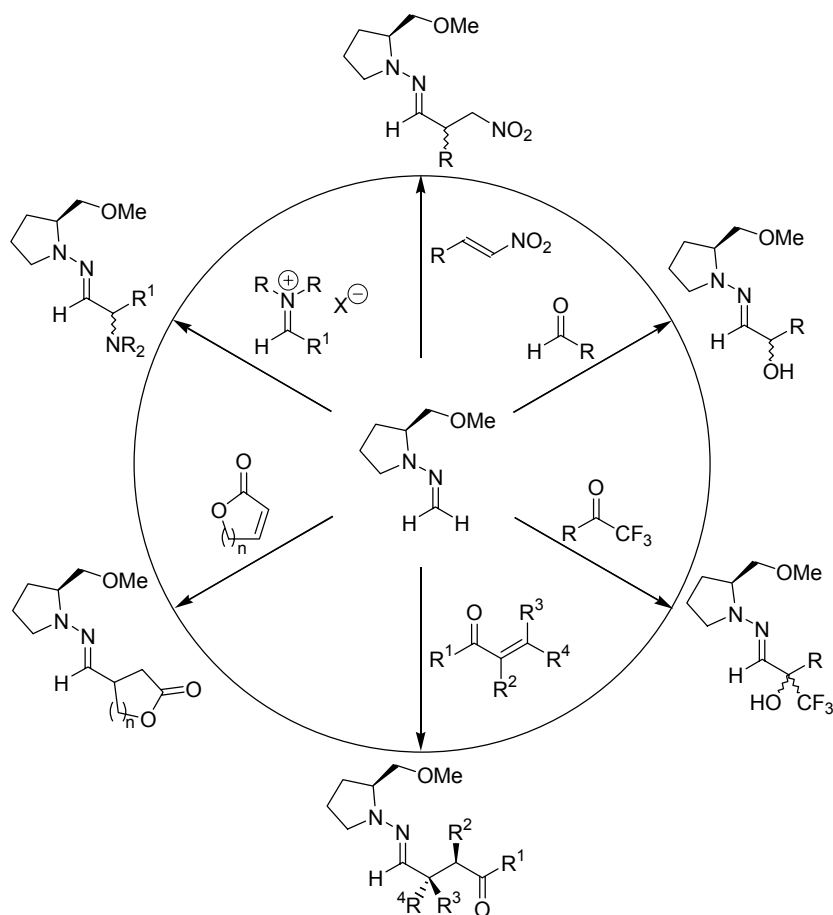


Abb. 1-48: Addition von SAMP-Formaldehydhydrazonen an verschiedene elektrophile Substrate.

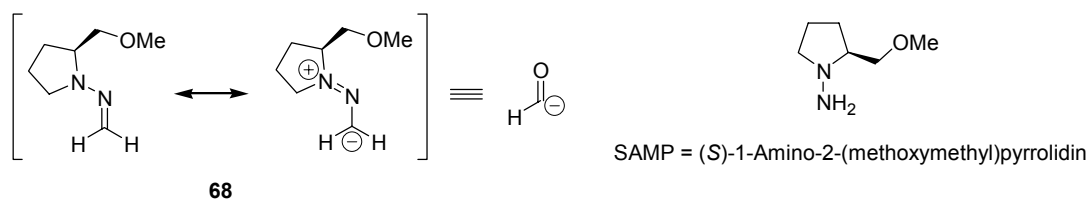


Abb. 1-49: SAMP-Formaldehydhydrazone (Azaenamine) als Formylanion-Äquivalente.

Synthese-Äquivalente mit bemerkenswerter Reaktivität sind auch die verschiedensten Formen so genannter 1,1-Dipol-Synthons. Bei diesen Spezies sind die Eigenschaften eines Acylanions und -kations auf einem Kohlenstoff-Atom vereint, so dass sie gleichzeitig als a^1 - und d^1 -Synthons fungieren. Die Reaktivität besitzt Ähnlichkeit mit der des Kohlenmonoxids CO, das bei allen Übergangsmetall-katalysierten Carbonylierungsreaktionen im Bereich der Anorganischen Chemie sowohl Donor- als auch Akzeptorverhalten zeigt.

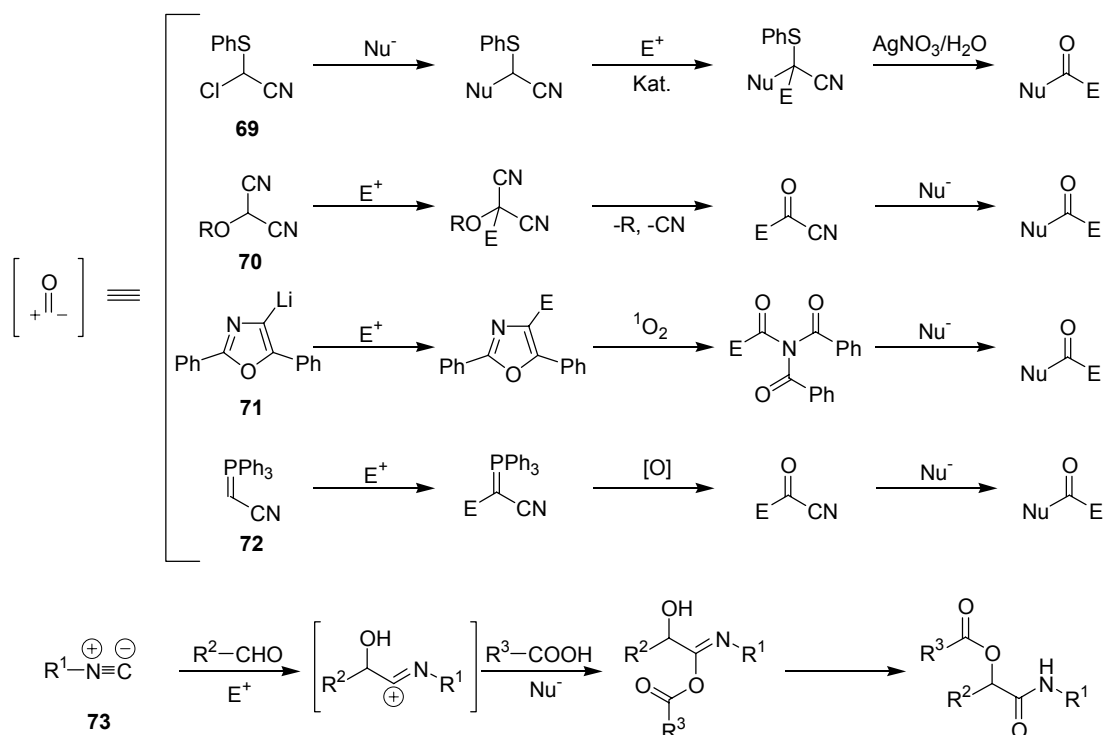


Abb. 1-50: Verschiedene 1,1-Dipol-Synthons und ihre Umsetzung mit Elektrophilen und Nucleophilen.

Bekannte 1,1-Dipol-Synthons sind Chlor-(phenylthio)-acetonitril (**69**)^[221], Alkoxyalodinitril (**70**)^[222] sowie lithiierte Oxazole (**71**)^[223]. Die bereits in Kap. 1.6.3 vorgestellten (Cyanmethylen)phosphorane (**72**)^[173], die im Zentrum vorliegender Arbeit stehen, sind auch dieser Synthon-Klasse zuzuordnen (Abb. 1-50). Auch die im Sinne einer PASSERINI-Reaktion eingesetzten Isonitrile (**73**) können in diesem Kontext als 1,1-Dipole aufgefasst

werden, da es sich bei ihnen formal um die Imine des Kohlenmonoxids handelt. Ebenso sind Schwefel-Ylide dipolare Synthons.

Auffallend in den Strukturen der Abb. 1-50 ist das häufige Auftreten der Cyano-Gruppe. Ursache dafür ist, dass eine Cyano-Gruppe induktiv einen α -Kohlenstoff positiv polarisiert, damit die Acidität eines Wasserstoffs an einem α -Kohlenstoff erhöht, nach einer Deprotonierung ein entstehendes Carbanion durch Mesomerie stabilisiert und schließlich eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt.

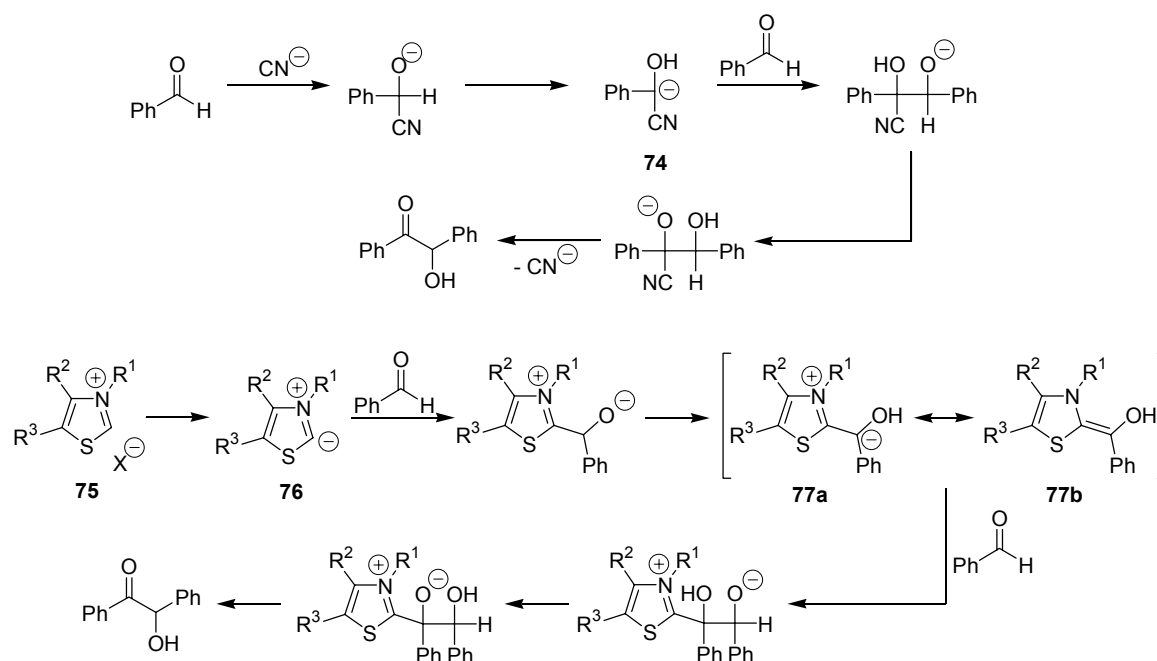


Abb. 1-51: Cyanid- und Thiazolium-katalysierte Benzoin-Kondensation.

Aus diesem Grund lassen sich Cyanid-Ionen, wie z. B. in der Benzoin-Kondensation (Abb. 1-51), katalytisch zur Generierung intermediärer Carbanionen (74) einsetzen. Sehr ähnlich verhalten sich in derselben Reaktion katalytisch eingesetzte Thiazolium-Salze (75). Thiazolium-Salze lassen sich leicht in der 2-Position am Heteroaromaten zur Ylid-Struktur (76) deprotonieren und können z. B. Benzaldehyde nucleophil angreifen. Ein intermediär ausgebildetes Carbanion am so genannten Aktivvaldehyd (77a,b) wird durch Mesomerie unter Ringbeteiligung stabilisiert und kann einen weiteren Benzaldehyd attackieren. Zum Ende des Katalyse-Zyklus fungiert das Thiazolium-Salz als Abgangsgruppe. Der Einsatz der Thiazolium-Salze für diese Reaktion ist der Wirkungsweise des natürlichen Thiamin (Vitamin B₁), welches als Thiaminpyrophosphat das Coenzym der Transketolasen und Decarboxylasen darstellt, nachempfunden. Davon abgeleitete, vereinfachte Thiazolium-

Katalysatoren werden in der organischen Synthese z. B. in der STETTER-Reaktion eingesetzt^[224].

Zusammenfassend soll noch kurz auf einen möglichen Einsatz vorgestellter Anionen-Äquivalente in der Festphasen-Synthese zum Aufbau des Norstatin-Motivs eingegangen werden:

Grundsätzlich besteht ein Unterschied darin, ob ein Carbanionen-Äquivalent in immobilisierter Form in einem Polymer erzeugt wird, welches dann mit einem elektrophilen Substrat aus der Lösung unter Kettenverlängerung abreagiert, oder ob es sich entsprechend umgekehrt verhält. Bei der Betrachtung der vorgestellten Methoden wird deutlich, dass der weitaus größte Teil aus lithiierten Spezies besteht. Die Verwendung sehr starker Basen und die Feuchtigkeitsempfindlichkeit erschweren die Generierung eines Carbanions in einem Polymer. Der einfachere und oft genutzte Weg ist deshalb die Immobilisierung eines Substrates, welches als Elektrophil mit in Lösung *in situ* metallierten Spezies abreagiert. Auf diese Weise wurde z. B. im Arbeitskreis eine Verlängerung eines Polymergebundenen Aldehyds zum α -Hydroxyaldehyd mit Lithiumthiazol nach DONDONI durchgeführt^[225]. Da bei einem Zielmolekül von noch deutlich peptidischer Struktur eine Kettenverlängerung am C-Terminus erfolgen muss, kann in diesem Fall der C-Terminus, wie ansonsten bei Peptidsynthesen üblich, nicht zur Immobilisierung verwendet werden. Außerdem wird bei einer Immobilisierung über den N-Terminus die problematischere, inverse Peptidsynthese nötig.

Besonders elegant wären deshalb nicht metallierte, polymere Anionen-Äquivalente, welche auch als Linker fungieren können. Insbesondere die vorgestellten (Cyanmethylen)phosphorane (**72**) und Formaldehyd-N,N-dialkylhydrazone (z. B. **68**), die ihre Nucleophilie auch ohne Metallierung entfalten, erscheinen deshalb für eine Übertragung an die Festphase Erfolg versprechend.

2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollten zwei aus der klassischen organischen Synthese in Lösung bekannte, und in Kap. 1.7 vorgestellte carbanionische Äquivalente zum Einsatz im Rahmen einer Festphasen-Synthese weiterentwickelt werden: (Cyanmethyl)phosphorane und Formaldehyd-N,N-dialkylhydrazone mit Pyrrolidin-Fünfring.

Sie sollten als Linker zwischen Polymer und aufzubauender Zielstruktur fungieren und gleichzeitig den maßgeblichen und entscheidenden Schritt einer C-C-Knüpfung unter milden Bedingungen ermöglichen, was durch die Begriffe „polymere Linker-Reagenzien“ oder „Reaktivlinker“ erfasst und bezeichnet werden kann. Das Konzept sollte synthetischen Zugang zu Strukturen der allgemeinen Form **78** ermöglichen und freie Variation der Reste R^1 - R^3 erlauben.

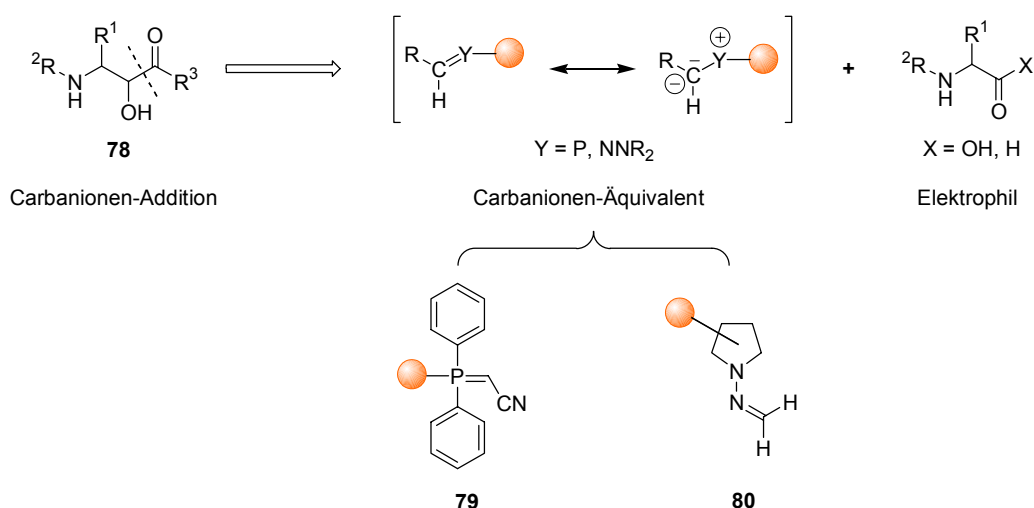


Abb. 2-1: Konzept Polymer-gestützter Carbanionen-Äquivalente zum Aufbau von α -Hydroxycarbonyl-Strukturen.

Im ersten Teil des Projektes sollte die Synthese polymerer (Cyanmethyl)phosphorane (**79**) und ihre Verwendung zur Synthese von α -Keto- bzw. nach Reduktion α -Hydroxyestern, -säuren und -amiden erarbeitet werden. Dabei sollte vor allem auf den Erhalt der Konfiguration der chiralen Synthese-Bausteine geachtet und die Möglichkeiten einer diastereoselektiven Reduktion untersucht werden. Nach Etablierung des Reaktionsweges sollte eine Verbindungskollektion potenzieller Plasmepsin II-Inhibitoren mit Norstatin-Isooster synthetisiert und in einem Assay getestet werden, wobei Ergebnisse von theoretischen Docking-Untersuchungen einfließen sollten.

Im zweiten Teil sollten polymere, dem SAMP-Hydrazin nachempfundene N,N-Dialkylhydrazine erzeugt sowie ihre Umsetzung zu Formaldehydhydrazonen (**80**) und ihr nucleophiler Charakter bei der Umsetzung mit Fmoc-Aminoaldehyden untersucht werden.

3 Polymere (Cyanmethylen)phosphorane

3.1 Einleitung

Phosphorane, phosphororganische Verbindungen der Koordinationszahl und Wertigkeit fünf, sind wichtige Spezies in der organischen Synthese, die sehr eng mit den Arbeiten GEORG WITTIGS verknüpft sind. WITTIG erkannte, dass Phosphonium-Salze (**81**), die durch Alkylierung von Trialkylphosphinen mit Alkylhalogeniden erhalten werden, durch Umsetzung mit sehr starken Basen wie z. B. Methyllithium nicht zu Pentaalkylphosphoranen, sondern durch Abstraktion eines Protons unter Methan-Bildung zu Alkylidenphosphoranen reagieren, deren Struktur am besten durch die mesomeren Grenzformeln eines dipolaren Ylids (**82a**) und eines unpolaren Ylens (**82b**) beschrieben wird.

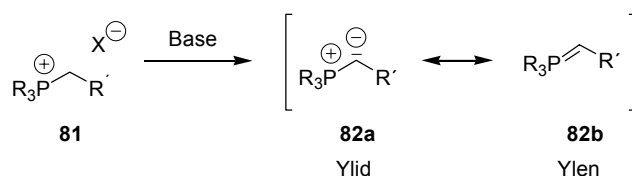


Abb. 3-1: WITTIG-Ylide: Alkylidenphosphorane mit Phosphonium-Ylid-/Phosphor-Ylen-Grenzstrukturen.

Präparative Bedeutung besitzen Alkylidenphosphorane, vor allem die von Triphenylphosphin abgeleiteten, bei der Carbonyl-Olefinierung von Aldehyden und Ketonen, der so genannten WITTIG-Reaktion, die zusammen mit ihren vielfältigen Variationen zu den wichtigsten Olefinierungsreaktionen gehört und bei der Synthese vieler Naturstoffe wie Vitamin A, Carotinoiden etc. auch industrielle Anwendung findet.

Im Zusammenhang mit dem Einsatz polymerer Reagenzien in Polymer-unterstützt durchgeführten Lösungssynthesen wurde seit Anfang der 1970er-Jahre mehrfach über polymere WITTIG-Ylide und ihre Umsetzung mit Aldehyden und Ketonen berichtet^[226-228]. Einer der Vorteile einer WITTIG-Reaktion mit polymeren Yliden besteht in der Möglichkeit, durch einfache Filtration das entstandene, Polymer-gebundene Phosphinoxid zu entfernen, was bei Durchführung in Lösung problematisch sein kann^[229].

Neben der bekannten Verwendung von WITTIG-Yliden zur Carbonyl-Olefinierung zeigten mehrere Forschergruppen im Falle stabilisierter Ylide mit elektronenziehenden Substituenten, etwa Carboxylat-Funktionen [(Carboxylatmethylen)phosphorane], die Möglichkeit einer Acylierung mit Säurechloriden^[230-235].

Aufgegriffen wurde diese Möglichkeit seit 1989 von WASSERMAN, der ausgehend von (Carboxylatmethylen)phosphoranen vicinale 1,2,3-Tricarbonyl-Verbindungen (α,β -Diketoester) synthetisierte^[236,237]. WASSERMAN übertrug auch das Konzept der Acylierung von (Carboxylatmethylen)- auf (Cyanmethylen)phosphorane und verwendete neben Säurechloriden die Carbonsäuren direkt, die er *in situ* aktivierte^[173].

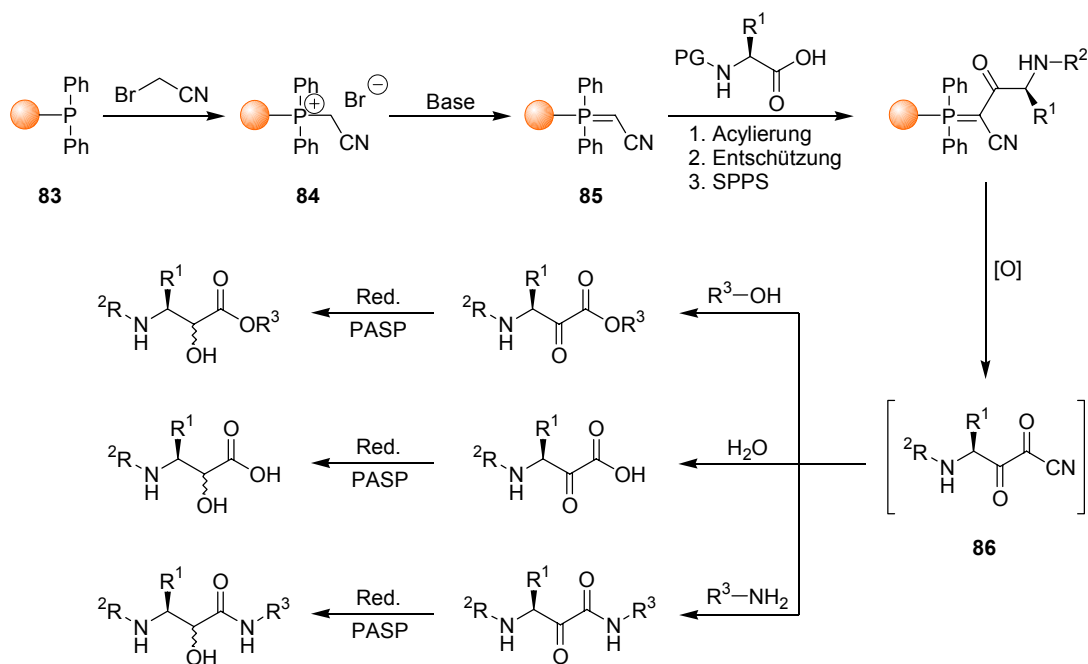


Abb. 3-2: Konzept zur Festphasen-unterstützten Durchführung der Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Methode (vgl. Abb. 1-36)

Eine Verwendung polymerer (Cyanmethylen)phosphorane über die normale WITTIG-Reaktion hinaus im Kontext eines Reaktivlinkers und 1,1-Dipol-Synthons erfolgte bisher nicht. Es sollte deshalb zunächst eine Übertragung der bereits in Abb. 1-36 vorgestellten Methodik an die Festphase erarbeitet werden, indem eine Acylierung und damit Möglichkeit zur Variation von R^1 am polymeren Ylid (**85**) durchgeführt wird (Abb. 3-2). Die sich anschließende Variation in R^2 durch beispielsweise Peptidsynthese wird durch die mögliche Durchführung an der Festphase sehr erleichtert. Nach oxidativer Spaltung des Phosphorans, d. h. Abspaltung des α,β -Diketoneitrils (**86**) vom Polymer, verläuft der Syntheseweg analog der ursprünglichen Vorgehensweise, d. h. in Lösung, wobei allerdings polymere Reagenzien zur Reduktion und im Falle der α -Ketoamide als Scavenger nicht umgesetzten Amins im Sinne einer PASP-Synthese verwendet werden sollten.

3.2 Aufbau von polymeren Peptidyl- α -ketophosphoranen

3.2.1 Darstellung von polymerem WITTIG-Phosponium-Salz

Beim polymeren Trägermaterial, das den Ausgangspunkt der folgenden Reaktionssequenz bildet, handelt es sich um ein diphenylphosphiniertes Copolymer aus Styrol und 1 % Divinylbenzol, so genanntes mikroporöses Polystyrol wie es allgemein in der Festphasen-Synthese sehr häufig eingesetzt wird. Durch die Diphenylphosphinierung des polymeren Backbones entsteht formal ein Triphenylphosphin, weshalb auch häufig der Ausdruck „polymeres Triphenylphosphin“ verwendet wird.

Triphenylphosphin-Harz ist kommerziell erhältlich und kann in verschiedenen Reaktionen eingesetzt werden. Neben der bereits weiter oben erwähnten Umsetzung zu polymeren WITTIG-Yliden kann es in MITSUNOBU-Reaktionen^[238], zur Komplexbildung von Übergangsmetallen^[239,240] und nach Umwandlung zu polymeren Triphenylphosphindihalogeniden oder anderen Komplexen als polymeres Reagenz z. B. für Halogenierungen benutzt werden^[241-243].

Ebenso wie tertiäre Amine lassen sich auch die entsprechenden Phosphine durch Alkylierungsmittel quarternisieren, wobei im Falle von Triphenylphosphin Alkyltriphenylphosphonium-Salze gebildet werden. Die Alkylierung wird üblicherweise, ob am Polymer oder in Lösung, durch Erhitzen des (polymeren) Triphenylphosphins zusammen mit dem Alkylhalogenid in Toluol oder anderen Lösungsmitteln durchgeführt^[228,244] und kann unter konventionellem Reflux je nach Alkylhalogenid zwischen 30 Minuten und 14 Tagen dauern. Als Alternative wurde sowohl in Lösung als auch am Polymer über eine signifikante Beschleunigung des Alkylierungsschrittes durch Mikrowellen-unterstütztes Heizen berichtet^[245]. Verschiedenste Phosponium-Salze wurden in Reaktionszeiten von zwei bis fünf Minuten bei Temperaturen im Bereich von 150 °C in ausgezeichneten Ausbeuten erhalten. Für die im Rahmen des hier verfolgten Konzeptes durchzuführende Alkylierung von Triphenylphosphin-Harz (**83**) mit Bromacetonitril zu (Cyanmethyl)-phosphoniumbromid-Harz (**84**) wurde dementsprechend auch ein Mikrowellengerät eingesetzt^[227].

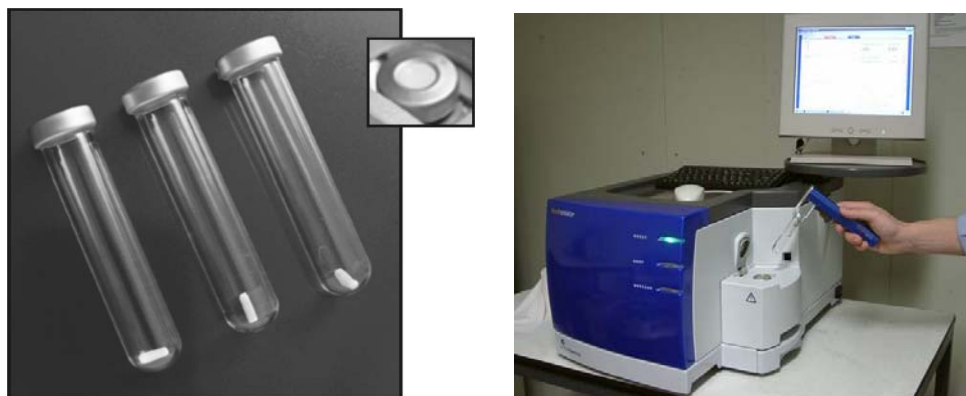


Abb. 3-3: Druckstabile Reaktionsgefäße mit Spezialverschlüssen und SmithSynthesizer™ von Personal Chemistry zur Durchführung von Mikrowellenreaktionen.

Dazu wurde das Polymer zusammen mit einem Rührfisch in spezielle, druckstabile Reaktionsgefäße gefüllt, in trockenem Toluol vorgequollen und nach Zusatz von fünf Äquivalenten Bromacetonitril mit einem Spezialverschluss verschlossen. Da die Umsetzung mit Bromacetonitril laut Literatur bei herkömmlichem Heizen mit einer Reaktionszeit von 14 Tagen am langsamsten von allen Beispielen verläuft, wurde die Reaktionszeit der Mikrowellenreaktion auf 15 Minuten bei 150 °C verlängert.

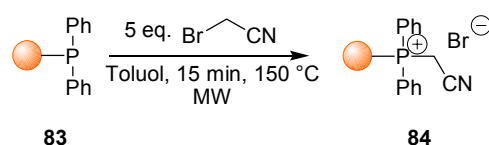


Abb. 3-4: Alkylierung von Triphenylphosphin-Harz mit Bromacetonitril zu (Cyanmethylen)phosphoniumbromid-Harz.

Durch die Alkylierung kommt es am Edukt-Harz zu einer Farbänderung von beige nach hellorange. Eine nach gründlichem Waschen und Trocknen durchgeführte Elementaranalyse auf Stickstoff und Brom ergibt eine Umsetzung von über 97 %, wobei berücksichtigt werden muss, dass der Hersteller die Beladung mit Phosphin-Funktionalitäten nur ungenau mit ca. 1,6 mmol/g angibt. Die Aufnahme eines ATR-IR-Spektrums nach Reaktion (Abb. 3-5, C) und Vergleich mit dem Spektrum des Edukt-Harzes (B) zeigt die IR-Absorptionsbande der C-N-Dreifachbindung eines Nitrils bei 2249 cm^{-1} , jedoch nur mit verhältnismäßig geringer Intensität. Weiterhin charakteristisch ist eine sehr intensive Bande bei einer Wellenzahl von 1112 cm^{-1} . Zur besseren Unterscheidung der Triphenylphosphin-Einheiten vom polymeren Backbone wurde auch freies Triphenylphosphin vermessen (A). Phosphine allgemein sind oxidationsempfindlich und bilden mit Sauerstoff leicht Phosphinoxide. Der Hersteller gibt für das vermessene freie Triphenylphosphin einen Phosphinoxid-Gehalt von 1-3 % an. Die nur schwach ausgeprägte Bande einer P-O-

Doppelbindung bei ca. 1180 cm^{-1} bestätigt diese nur geringe Oxid-Menge und zeigt die gute Qualität des Edukt-Harzes **83**.

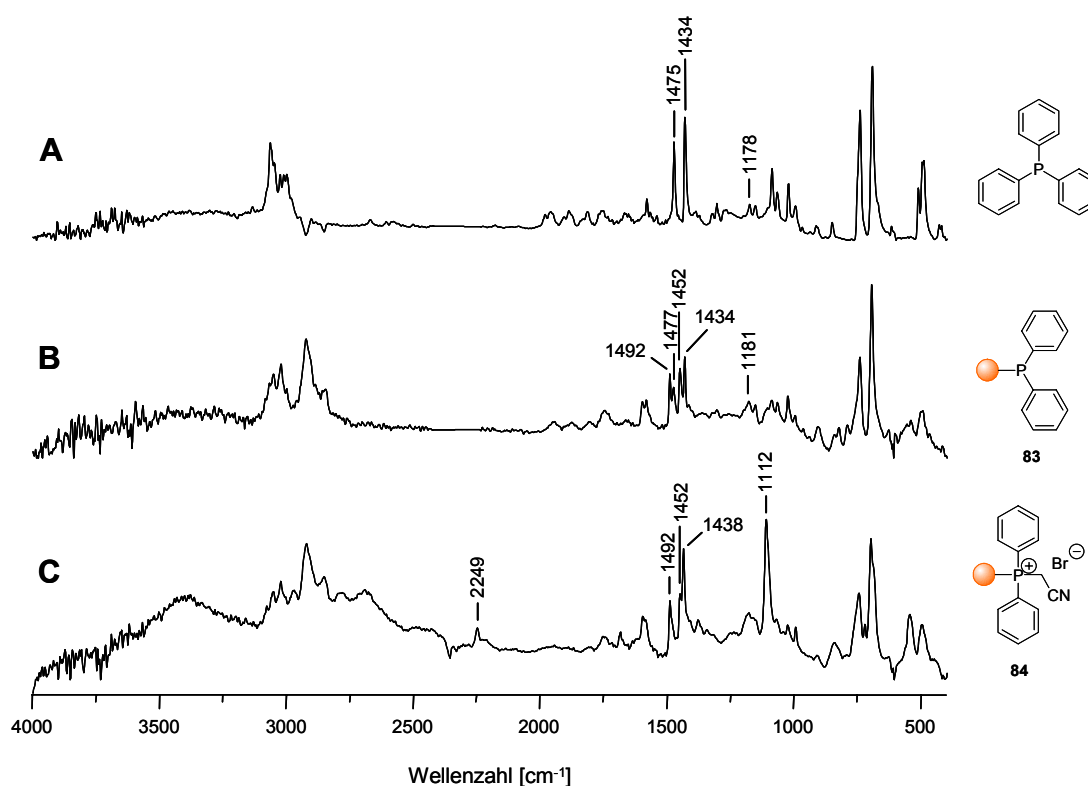


Abb. 3-5: ATR-IR-Spektren von freiem Triphenylphosphin (A), Triphenylphosphin-Edukt-Harz **83** (B) und dem Produkt-Harz **84** nach Mikrowellen-unterstützter Alkylierung (C).

3.2.2 Deprotonierung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran

Der Alkylierung zum WITTIG-Salz schließt sich die Deprotonierung zum WITTIG-Ylid an. In den meisten Fällen ist die C-H-Acidität der WITTIG-Phosponium-Salze der allgemeinen Struktur **81** gering, so dass sehr starke, meist lithiumorganische Basen verwendet werden müssen und dabei hochreaktive, instabile Ylide **82** entstehen. Die Acidität, Stabilität und Reaktivität hängt entscheidend vom entsprechenden Rest R' ab. Elektronenziehende Reste mit z. B. Carbonyl- oder Cyano-Gruppe erhöhen die Acidität beträchtlich und stabilisieren das gebildete Ylid, setzen dabei aber die Nucleophilie und damit die Reaktivität für eine weitere Umsetzung herab. Als Base reichen bereits die relativ schwächeren organischen Basen TEA^[246,247] oder DIEA^[248] oder anorganische Basen wie Carbonat^[227] aus. Die gebildeten Ylide lassen sich isolieren und als Reinsubstanzen lagern. Im Falle des (Cyanmethylen)triphenylphosphorans (**88**) trägt außerdem erweiterte Mesomerie zur Stabilisierung bei. Neben die üblichen Ylid- (**88a**) bzw. Ylen-Grenzstrukturen

(**88b**) tritt durch Konjugation mit der C-N-Dreifachbindung eine dritte Grenzstruktur (**88c**)^[249].

An dieser Stelle lässt sich die Frage erörtern, ob eventuell bereits beim (Cyanmethylen)-triphenylphosphonium-Salz **87** ein Tautomerie-Gleichgewicht zwischen einer Cyano- (**87a**) und einer Ketenimin-Form (**87b**) vorliegt. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, dass das IR-Spektrum des polymeren Phosphonium-Salzes (**84**) (Abb. 3-5, C) eine sehr breite Absorptionsbande bei ca. 3400 cm⁻¹ aufweist, was von Form und Lage einer N-H-Schwingung entsprechen könnte.

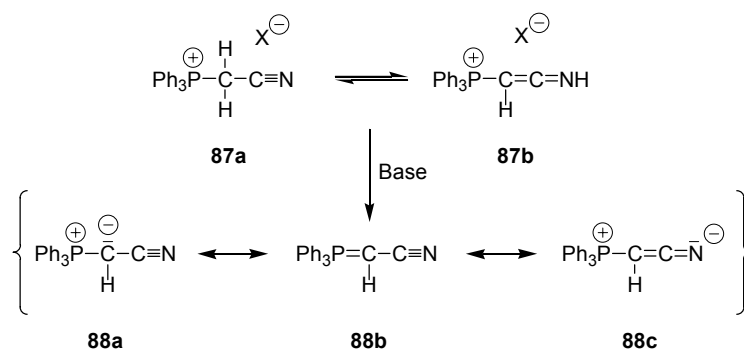


Abb. 3-6: Mesomeriestabilisierung des (Cyanmethylen)triphenylphosphorans und Überlegung zu einem eventuellen Tautomerie-Gleichgewicht des entsprechenden Phosphonium-Salzes.

Konkret wurde das Phosphonium-Harz (**84**) durch fünf Äquivalente Triethylamin in Dichlormethan bei RT in zwei Stunden zum polymeren Ylid (**85**) deprotoniert.

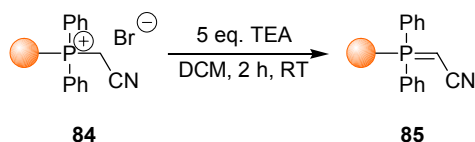


Abb. 3-7: Deprotonierung von Phosphoniumbromid-Harz **84** zu (Cyanmethylen)phosphoran-Harz **85**.

Durch die Deprotonierung nimmt das Harz eine noch etwas kräftigere Orangefärbung an. Elementaranalyse auf Brom lässt auf eine hohe Umsetzung schließen (mind. 90 %), wobei jedoch der Restbrom-Gehalt auch auf eventuell nur schwer zu entfernendes Triethylammoniumbromid zurückzuführen sein könnte. Die Aufnahme eines IR-Spektrums nach Deprotonierung (Abb. 3-8, D) zeigt eine im Vergleich zum Phosphonium-Salz (C) sehr intensive Absorptionsbande bei 2149 cm⁻¹. Offensichtlich führt die Konjugation bzw. Mesomerie zu einer bedeutenden Intensitätssteigerung sowie einer Verschiebung zu niedrigerer Wellenzahl. Die breite Bande im Bereich von ca. 3400 cm⁻¹ verschwindet, was die weiter oben geäußerte Vermutung stützt. Freies, kommerziell erhältliches (Cyan-

methylen)triphenylphosphoran (**88**) wurde zum Vergleich ebenfalls vermessen (**E**) und zeigt große Übereinstimmung in der Bandenlage.

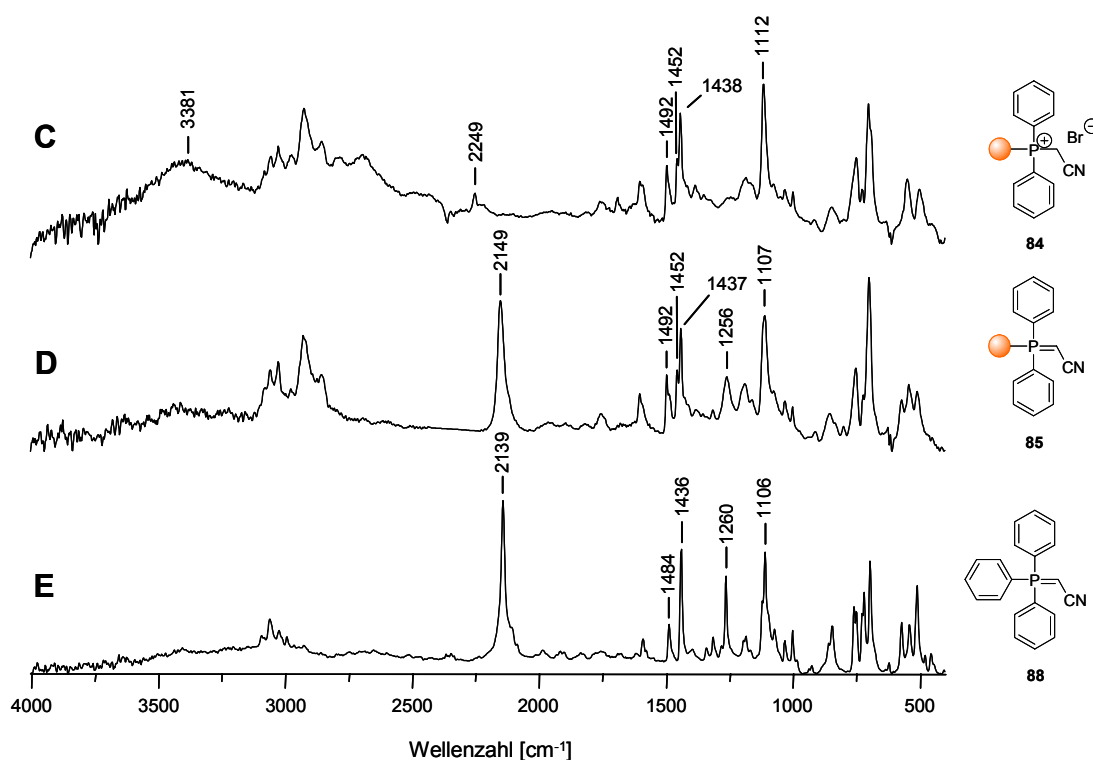


Abb. 3-8: ATR-IR-Spektren von Phosphoniumbromid-Harz **84** (**C**), und (Cyanmethylen)phosphoran-Harz **85** (**D**) nach Deprotonierung im Vergleich zu freiem (Cyanmethylen)triphenylphosphoran **88** (**E**).

Zur weiteren Synthesekontrolle wurde das erhaltene (Cyanmethylen)phosphoran-Harz (**85**) in einer WITTIG-Reaktion getestet. Es wurden dazu fünf Äquivalente polymeres Phosphoran als polymeres Reagenz in THF bei RT mit Fmoc-Phenylalaninal (**89**) umgesetzt und Fmoc-(2*E*)-4-amino-5-phenyl-2-pentennitril (**90**) in einer Reinheit von 91 % erhalten.

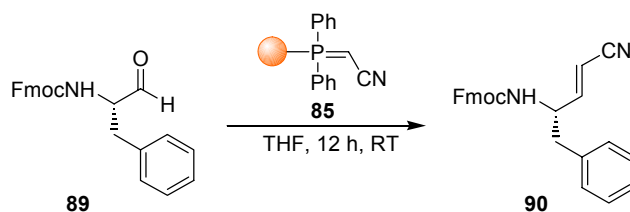


Abb. 3-9: WITTIG-Reaktion von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz (**85**) mit Fmoc-Phenylalaninal.

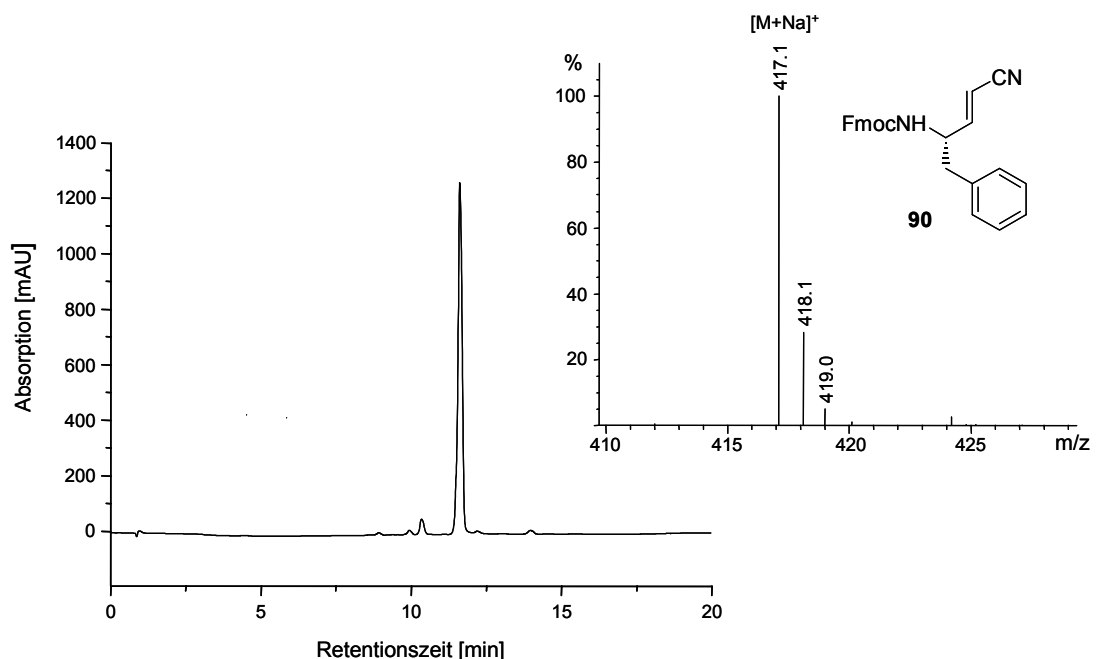


Abb. 3-10: HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum nach Umsetzung von Fmoc-Phenylalaninal mit (Cyanmethylen)phosphoran-Harz (85).

3.2.3 Acylierung von polymerem (Cyanmethylen)phosphoran

Neben einem nucleophilen Angriff an Aldehyden und Ketonen, die in der WITTIG-Reaktion unter Oxaphosphetan-Bildung und Eliminierung von Triphenylphosphinoxid zur Carbonyl-Olefinierung führt, können stabilisierte Ylide auch aktivierte Carbonsäuren attackieren und werden dabei acyliert. Als aktiviertes Säurederivat wurden ursprünglich häufig Säurechloride und -anhydride zusammen mit N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) als „Protonenschwamm“ verwendet^[173,250,251]. Etwas später gelang auch die direkte Verwendung von Carbonsäuren, insbesondere von α -Aminosäuren mit Z-, Boc-, und Fmoc-Schutzgruppen, nach Aktivierung mit Kupplungsreagenzien, welche auch in der Peptidsynthese gebräuchlich sind. Als Kupplungsreagenz der Wahl kristallisierte sich dabei N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) zusammen mit 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) heraus, welches in den weitaus meisten Fällen verwendet wird und je nach geschützter Aminosäure zu Kupplungsausbeuten zwischen ca. 50 und 90 % führt. Weitere beschriebene Formen der Aktivierung sind EDC/HOBT^[182], EDC alleine^[252], EDC/DIEA^[181], DCC/DMAP^[253], Chlorameisensäureester^[254,255] und 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI)^[256,257], das jedoch an anderer Stelle zusammen mit Phosphorsäure-diphenylester-azid (DPPA) und Cyanphosphorsäure-diethylester (DEPC) als ungeeignet beschrieben wird^[250].

Tab. 3-1: Kupplungsausbeuten von Fmoc-Phenylalanin auf (Cyanmethylen)phosphoran-Harz **85** unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen.

Position	Kupplungsbedingungen ^[a]	Kupplungsausbeute ^[b]
1	5 eq. EDC, 0.75 eq. DMAP	90 %
2	5 eq. EDC, 5 eq. DIEA	23 %
3	5 eq. EDC	45 %
4	5 eq. EDC, 5 eq. HOBt · H ₂ O	0 %
5	5 eq. EDC, 0.75 eq. DMAP, 5 eq. HOBt · H ₂ O	7 %
6	5 eq. EDC, 0.75 eq. DMAP, 5 eq. HOBt	40 %
7	5 eq. DIC, 0.75 eq. DMAP	35 %
8	5 eq. DIC, 5 eq. HOBt · H ₂ O	11 %
9	5 eq. DIC, 0.75 eq. DMAP, 5 eq. HOBt · H ₂ O	11 %
10	5 eq. CDI	7 %
11	5 eq. TBTU, 10 eq. DIEA ^[c]	60 %
12	5 eq. TBTU, 10 eq. DIEA	36 %

^[a] jeweils mit 5 eq. Fmoc-Phe-OH in DCM bei RT für 12 h falls nicht anders vermerkt; ^[b] unter näherungsweise quantitativer Umsetzung zu **85** und exakter Beladungsangabe von **83** durch den Hersteller; ^[c] in DMF.

Vor diesem Hintergrund wurden Acylierungsversuche von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz **85** mit Fmoc-Phenylalanin unternommen, wobei die Kupplungsausbeute UV-photometrisch durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Konzentrationsbestimmung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes nach LAMBERT-BEER bestimmt wurde.

Die Auswertung der Acylierungen zeigt, dass die aus der Lösungssynthese bekannte Umsetzung mit EDC/DMAP mit 90 % deren Größenordnung erreicht und die bei weitem besten Ergebnisse liefert (Tab. 3-1, Pos. 1). Die dort übliche Menge DMAP von 10 mol% oder weniger wurde hier auf 15 mol% erhöht. Die weiteren, in der Literatur genannten Varianten unter Verwendung von EDC (Pos. 2-4) liefern im Vergleich unbefriedigende Ausbeuten bzw. funktionieren gar nicht. Offensichtlich wirkt sich der Zusatz von HOBt, welches als Hydrat eingesetzt wurde, besonders negativ aus und führt zu einem Abfall auf 7 % (Pos. 5). Wasserfreies HOBt ermöglicht eine höhere Ausbeute, die mit 40 % trotzdem weit zurückbleibt (Pos. 6).

Da EDC in erster Linie für Acylierungen in Lösung entwickelt wurde, um den sich bildenden, wasserlöslichen Harnstoff bei der wässrigen Aufarbeitung entfernen zu können, stellte sich hier bei der ersten Acylierung eines polymeren Ylids die Frage, ob anstatt des EDC auch das sehr ähnliche DIC eingesetzt werden kann. Die Frage der Aufarbeitung spielt bei der Festphasen-Synthese in diesem Fall keine Rolle, so dass auf diesen Vorteil des EDC verzichtet werden könnte. Tatsächlich zeigte sich aber, dass EDC im Vergleich zu DIC (Pos. 7) wesentlich bessere Kupplungseigenschaften aufweist. Eventuell besteht trotz struktureller Verwandtschaft ein Unterschied, der mit der Neigung des EDC (**91**) zusammenhängt, in Lösung intramolekular unter Ringschluss zwei tautomere Guanidinium-Strukturen (**92a,b**) auszubilden ^[258].

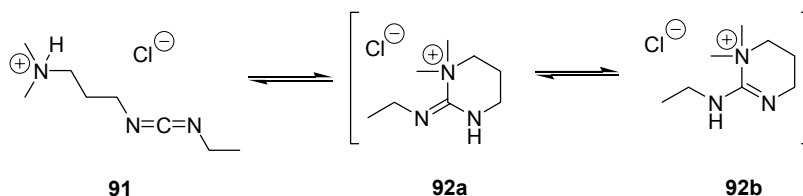


Abb. 3-11: Ringschluss und Tautomerie-Gleichgewicht der Guanidinium-Struktur des Kupplungsreagenzes EDC in Lösung.

Im IR-Spektrum nach Acylierung ergeben sich signifikante Veränderungen: Die Nitril-Bande verschiebt sich durch Umsetzung mit Fmoc-Phenylalanin von 2149 cm^{-1} wieder zu höherer Wellenzahl von 2175 cm^{-1} (Abb. 3-12, **D** bzw. **F**). Diese Verschiebung kann qualitativ und eventuell auch quantitativ für eine Aussage über die Effektivität der Acylierung herangezogen werden. So lässt sich die unbefriedigende Kupplung mit DIC/DMAP bereits aus dem IR-Spektrum ablesen (**G**). Ganz zum Verschwinden kann die Nitril-Eduktbande jedoch auch mit EDC/DMAP nicht gebracht werden, d. h. die Acylierung bleibt in geringem Maße unvollständig.

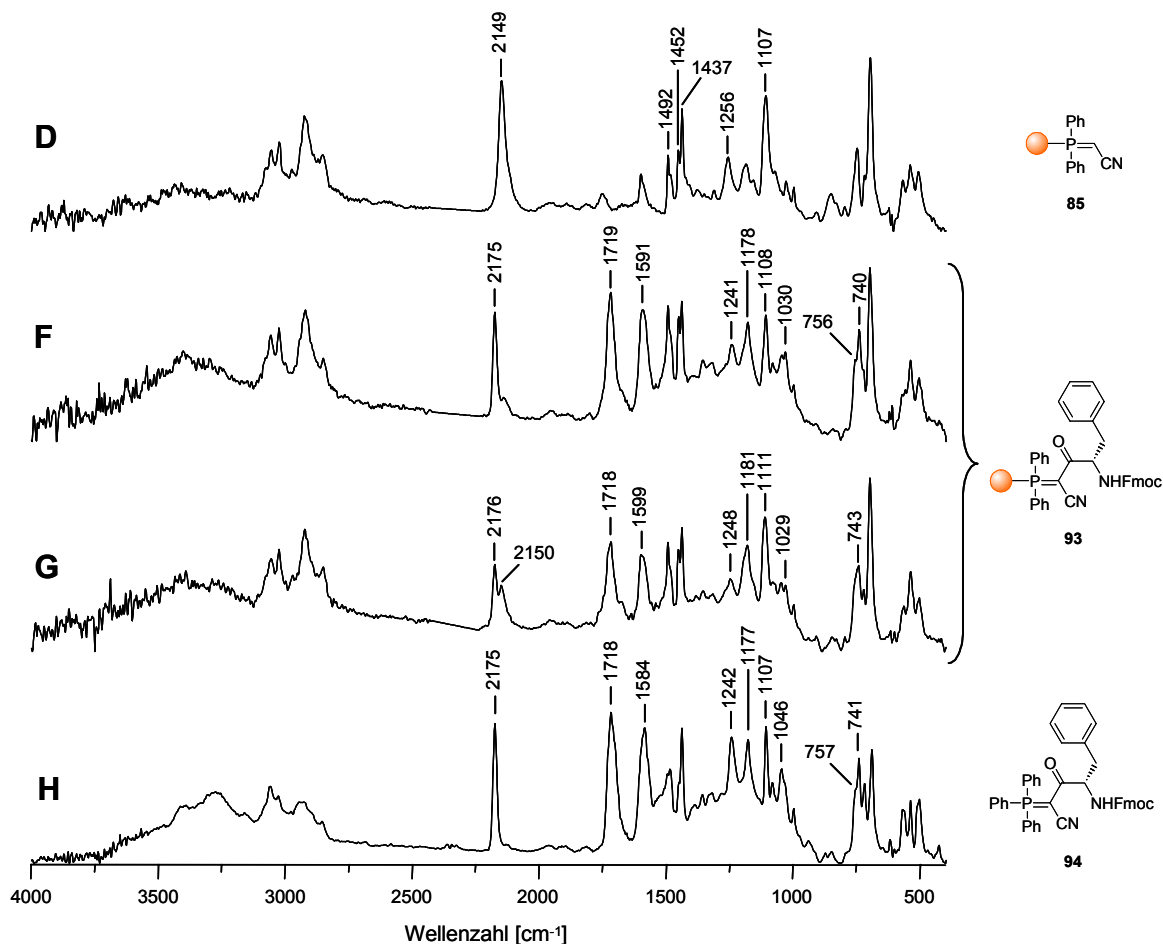


Abb. 3-12: ATR-IR-Spektren von mit *Fmoc-Phe-OH* acylierten (Cyanmethylen)phosphoran-Harzen **93** (EDC/DMAP, **F**; DIC/DMAP, **G**) im Vergleich zum Edukt-Harz **85** (**D**) sowie dem entsprechenden, in Lösung synthetisierten Acyl(cyanmethylen)phosphoran **94** (**H**).

Weiterhin charakteristisch ist die Bande der neuen α -Ketocarbonyl-Gruppe bei 1591 cm^{-1} , die für eine Carbonyl-Funktion sehr niederfrequent absorbiert. Die Ursache der niederfrequenten Lage der Absorptionsbande dürfte in der Ausweitung des konjugierten Systems liegen, das durch vier mesomere Grenzstrukturen (**95a-d**) beschrieben werden kann. Dabei schreibt eine Enolat-Struktur (**95c**) der dem Phosphor benachbart liegenden C-C-Bindung partiellen Doppelbindungscharakter mit vermutlich bevorzugt cisoider Konformation zu^[259].

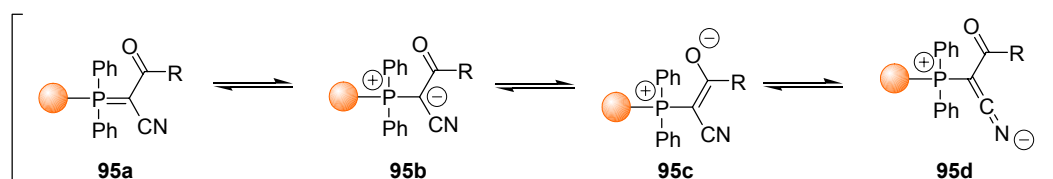


Abb. 3-13: Mesomere Grenzstrukturen von (polymeren) Acyl(cyanmethylen)phosphoranen.

Darüber hinaus sind deutlich die Carbonyl-Gruppe der Carbamat-Schutzgruppe bei 1719 cm^{-1} und zwei charakteristische, wenn auch hier schlecht aufgelöste Fluoren-Gerüstschwingungen bei 756 cm^{-1} bzw. 740 cm^{-1} zu erkennen.

Die Acylierungsreaktion wurde zum Vergleich auch in Lösung durchgeführt, das Produkt (**94**) aufgereinigt und ein IR-Spektrum gemessen (**H**), welches sehr große Übereinstimmung in den Bandenlagen zeigt.

Die Aktivierung über EDC/DMAP wurde im Folgenden auf weitere Fmoc-Aminosäuren, auch solche mit geschützter Seitenkettenfunktionalität, erweitert, wobei gute bis sehr gute Ausbeuten erzielt werden konnten.

Tab. 3-2: Kupplungsausbeuten verschiedener Fmoc-Aminosäuren auf (Cyanmethylen)phosphoran-Harz **85**.

Position	Fmoc-Aminosäure mit Rest R ¹ ^[a]	Kupplungsausbeute ^[b]
1	Fmoc-Leu-OH	79 %
2	Fmoc-Ala-OH · H ₂ O	0 %
3	Fmoc-Ala-OH	68 %
4	Fmoc-Met-OH	83 %
5	Fmoc-Trp(Boc)-OH	74 %
6	Fmoc-Asn(Trt)-OH	81 %
7	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	70 %
8	Fmoc-His(Trt)-OH	74 %
9	Fmoc-2-Nal-OH	72 %
10	Fmoc-Pro-OH	54 %
11	Fmoc-3,5-Difluor-Phe-OH	77 %
12	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	79 %

^[a] jeweils mit 5 eq. Fmoc-Aminosäure in DCM bei RT für 12 h; ^[b] unter näherungsweise Annahme einer quantitativen Umsetzung zu **85** und exakter Beladungsangabe von **83** durch den Hersteller.

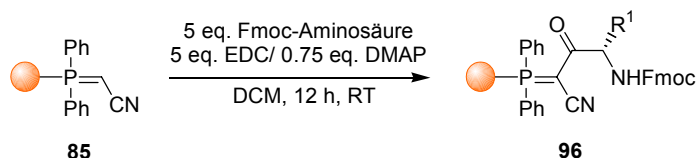


Abb. 3-14: Kupplung verschiedener Fmoc-Aminosäuren mit EDC/DMAP.

Besonders fällt der Unterschied in der Effizienz der Umsetzung zwischen Fmoc-Alanin-Hydrat und wasserfreiem Fmoc-Alanin auf (Tab. 3-2, Pos. 2 bzw. 3). Eine Kupplung des Hydrates ist nicht möglich. Daran zeigt sich, auch unter Berücksichtigung des weiter oben angeführten Ergebnisses bei der Verwendung von HOBt-Hydrat (Tab. 3-1, Pos. 4 und 5), dass die Reaktion sehr empfindlich auf das Vorhandensein von Wasser reagiert.

3.2.4 Festphasen-Peptidsynthese am Phosphoran-Linker

Nach Kupplung einer Fmoc-Aminosäure auf das polymere (Cyanmethylen)phosphoran **85**, welches auch die Funktion eines Linkers zwischen aufzubauender Zielstruktur und polymerem Backbone übernimmt, besteht nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe die Möglichkeit, mit Standardmethoden der Festphasen-Peptidsynthese eine Peptidkette aufzubauen. Eine der dabei sehr häufig eingesetzten Methoden der Aktivierung ist die Verwendung von DIC und HOBt.

Auch für die Peptidverlängerung am Phosphoran-Linker **96** wurde mit DIC/HOBt aktiviert. Wie in Kap. 3.2.3 gezeigt ist die Kombination DIC/HOBt nur schlecht für die C-C-Bindungsknüpfung am polymeren (Cyanmethylen)phosphoran geeignet. Es besteht somit nur eine geringe Gefahr, neben dem freien Amino-Terminus auch noch eventuell im ersten Schritt nicht acyliertes (Cyanmethylen)phosphoran zu acylieren, so dass auf ein Capping verzichtet werden kann.

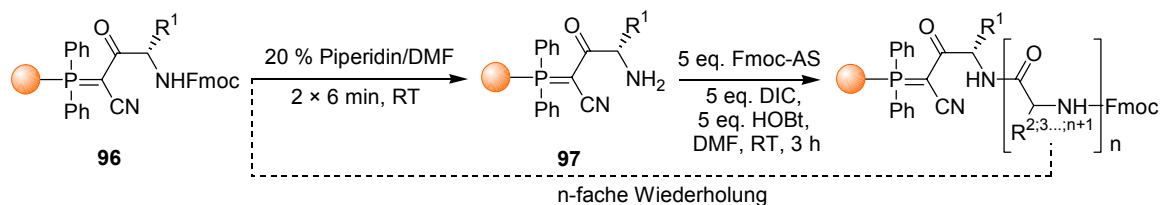


Abb. 3-15: Festphasen-Peptidsynthese nach Standard-Fmoc-Strategie und Aktivierung mit DIC/HOBt am Phosphoran-Linker.

Der Verlauf der Peptidsynthese wurde mit dem KAISER-Test kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass direkt nach der Kupplung der ersten Aminosäure auf das (Cyanmethylen)phosphoran-Harz und erfolgter Entschützung mit 20 % Piperidin/DMF (**97**) der KAISER-Test nicht eindeutig positiv ausfiel. Erst nach Kupplung und Entschützung der zweiten Fmoc-Aminosäure sowie aller weiteren zeigte der KAISER-Test normales Verhalten und konnte zur Kontrolle eines vollständigen Umsatzes herangezogen werden. Literaturbeschrieben ist in diesem Zusammenhang eine intramolekulare Addition der freien Amino-Gruppe an die C-N-Dreifachbindung unter Ausbildung einer Amidin-Struktur (**98**), welche man in Lösung bei der Entfernung von Z-Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung, nicht aber beim Entfernen von Fmoc-Schutzgruppen beobachtete^[174,175]. Eventuell kommt es bei der Entschützung des Amino-Terminus zu einer solchen reversiblen Addition, die weitere Kupplungsschritte ermöglicht aber zum uneindeutigen KAISER-Test führt.

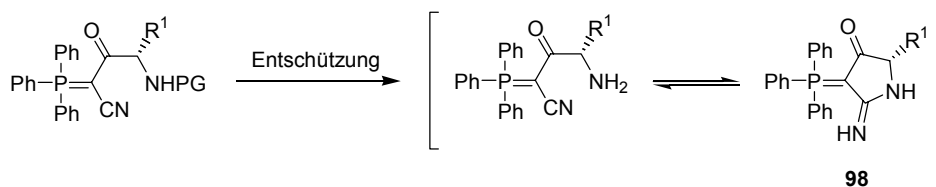


Abb. 3-16: Vermutete intramolekulare Addition zur zyklischen Amidin-Struktur **98** nach Entschützung der ersten Aminosäure als Erklärung für den uneindeutigen KAISER-Test.

Eine Fmoc-Bestimmung nach Kupplung der zweiten Fmoc-Aminosäure zeigte eine Beladung, die den Erwartungen gemäß der Kupplungsausbeute im ersten Schritt voll entsprach.

Beispielhaft wurde auf diese Weise ein Tripeptidyl- α -ketophosphoran mit der Sequenz Ala-Ile-Phe am Polymer aufgebaut und der Amino-Terminus des Alanins nach Fmoc-Entschützung acetyliert (**99**). Das IR-Spektrum dieses Harzes zeigt an neuen Signalen die sehr intensive Carbonyl-Absorptionsbande der Amide (drei Amidbindungen) bei 1661 cm⁻¹ und die entsprechenden Amid-N-H-Schwingungen bei ca. 3300 cm⁻¹.

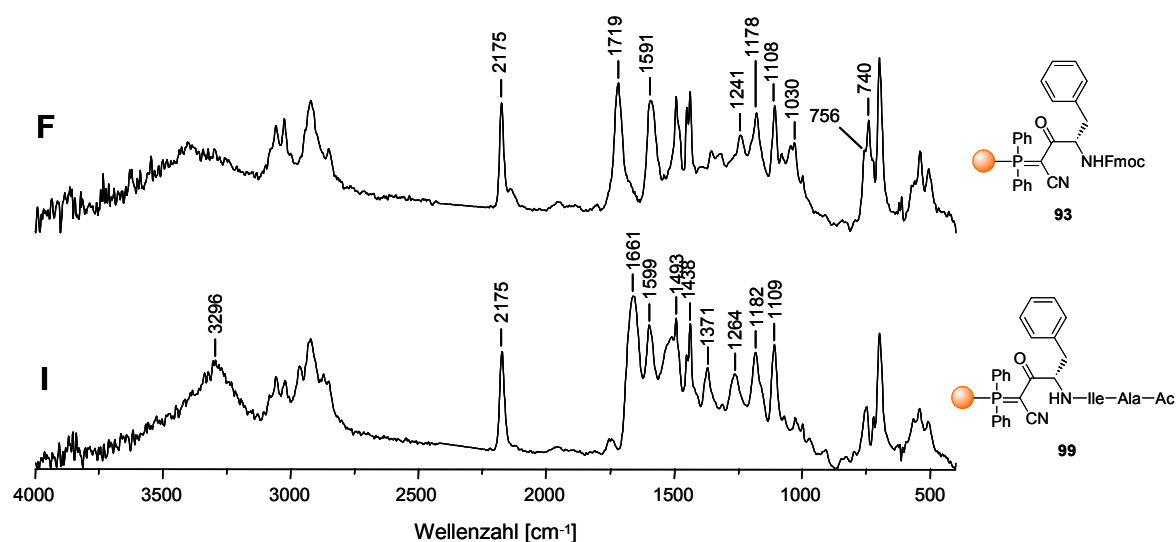


Abb. 3-17: ATR-IR-Spektrum nach Kupplung von Fmoc-Phenylalanin zum Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz (F) und nach Aufbau eines acetylierten Tripeptidyl- α -ketophosphorans (I).

3.2.5 Chemische Charakterisierung acylierter (Cyanmethylen)phosphoran-Harze

Nach der Etablierung der Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans wurde durch verschiedene Umsetzungen die Reaktivität der erhaltenen Acyl(cyanmethylen)phosphorane, vor allem die der α -Keto-Funktion, näher beleuchtet. Da die Keto-Funktion auf dem Reaktionsweg zu den angestrebten Zielverbindungen reaktiv in eine Hydroxy-Funktion übergehen muss, stellt sich insbesondere die Frage, ob es möglich ist, Polymergebundene Acyl(cyanmethylen)phosphorane (**100**, Abb. 3-18) zu reduzieren.

Die Basizität der Acyl(cyanmethylen)phosphorane ist sehr gering. Durch die Acylierung und damit Einführung einer zweiten elektronenziehenden Gruppe ist die Ylid-Struktur extrem stabil. So gelang es auch mit 4N HCl in Dioxan nicht, die Acyl(cyanmethylen)phosphorane in ihre Phosphonium-Salze (**101**, Weg 1) zu überführen. Beurteilt wurde dies durch Auswertung der IR-Spektren vor und nach Säureeinwirkung, die keine Unterschiede zeigten. Vor allem die Lage der Absorptionsbande der C-N-Dreifachbindung sollte sich durch Protonierung signifikant verschieben.

Auch der Versuch einer direkten Reduktion mit Natriumborhydrid zum α -Hydroxyphosphoran (**103**, Weg 2) scheiterte. In der Literatur findet sich keinerlei Hinweis dafür, dass solche Reduktionen durchführbar sind. Es wird nur über die Reduktion auf der Stufe des Phosphonium-Salzes, vergleichbar einer Umsetzung des Phosphorans **101** zu **102**,

berichtet^[260]. Da die Protonierung zum Phosphonium-Salz wie beschrieben nicht möglich ist, entfällt auch diese Möglichkeit einer indirekten Reduktion.

Abschließend war auch nach Zusatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin laut IR keine Derivatisierung zum Hydrazon (**104**, Weg 3) erkennbar (Ausbleiben signifikanter aromatischer Nitro-Banden).

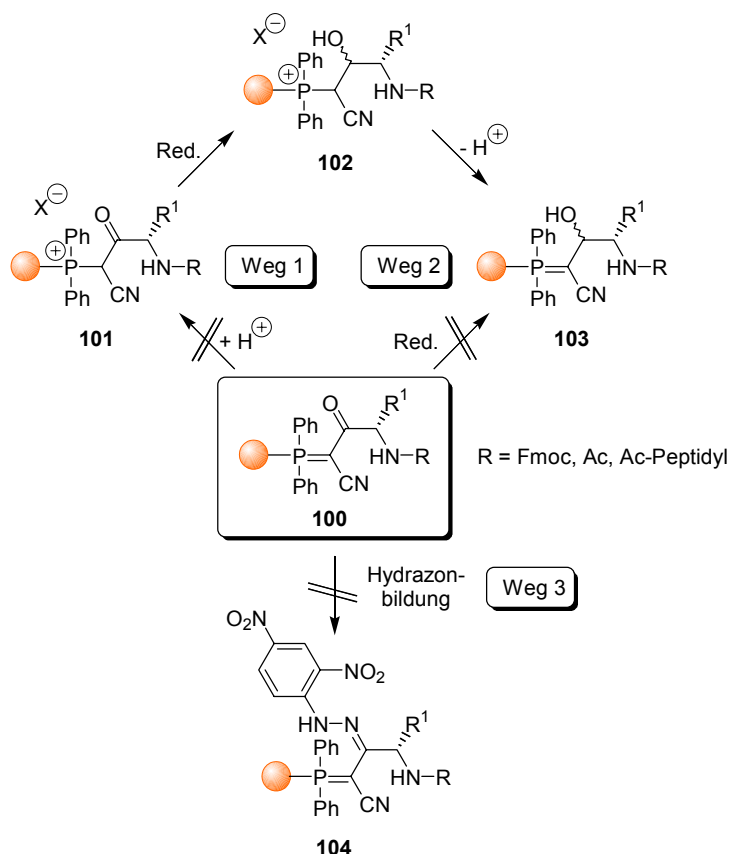


Abb. 3-18: Testreaktionen zur Charakterisierung der Reaktivität Polymer-gebundener Acyl(cyanmethylene)-phosphorane (**100**): Basizität, Möglichkeit der Reduktion und Derivatisierung.

Vorstehende Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass acylierte (Cyanmethylene)phosphorane zu einem großen Anteil in einer Enolat-Struktur vorliegen (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 3-13).

3.3 Oxidative Abspaltung zu α -Keto-Verbindungen und Reduktion

3.3.1 Oxidative Abspaltung zu α -Ketoestern

Nach erfolgreicher Acylierung polymerer (Cyanmethylen)phosphorane und Modifizierung, beispielhaft gezeigt durch Peptidsynthese am Phosphoran-Linker, stellt die Abspaltung von α -Keto-Verbindungen als wichtige Zwischenprodukte der Reaktionssequenz die nächste Herausforderung dar. Phosphorane als Linker-Konzept wurden bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Die hohe Sauerstoffaffinität des Phosphors bedingt die Möglichkeit einer oxidativen Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor-Doppelbindung. Auch in der WITTIG-Reaktion wird der Phosphoran-Phosphor zum Phosphinoxid bei gleichzeitiger Reduktion einer Carbonyl-Verbindung zum Alken oxidiert.

Für die Freisetzung eines Carbonyl-Kohlenstoffs aus einem Phosphoran sind hauptsächlich drei Oxidationsmittel bekannt: Ozon, Dimethyldioxiran oder Oxon. Für die Spaltung des Phosphoran-Linkers im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst Ozon präferiert.

Ozon stellt ein sehr starkes Oxidationsmittel dar, welches in der Lage ist, viele elektronenreiche funktionelle Gruppen zu oxidieren. Die breiteste Verwendung findet es in der Lösungssynthese zur Spaltung von Alkenen, wo je nach Art der Aufarbeitung verschiedene Derivate erhalten werden können. Das Arbeiten mit Ozon stellt besondere Anforderungen an die Apparatur. Es dürfen für Zu- oder Ableitungen, Dichtungen o. ä. keine einfachen Kunststoffe verwendet werden, da sie sich durch das hochreaktive Gas sofort zersetzen.

Diese Eigenschaft des Ozons lässt einen Gebrauch in Festphasen-Reaktionen zunächst fraglich erscheinen, da hier eine Zersetzung des polymeren Backbones droht. Üblicherweise werden Reaktionen mit Ozon in Lösung bei tiefen Temperaturen, etwa $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, durchgeführt. Unter diesen Bedingungen, d. h. bei herabgesetztem Oxidationspotential, werden z. B. Aromaten nicht angegriffen. Damit werden auch Reaktionen an einem aromatischen Polystyrol-Synthese-Harz bei tiefen Temperaturen möglich. Verwendet wurde Ozon in der Festphasen-Synthese bisher zur Alken-Spaltung^[261-263], dabei z. B. zur Abspaltung von Peptidylaldehyden^[264,265].

Mit diesem Hintergrundwissen wurden Versuche zur Abspaltung vom Phosphoran-Linker unternommen. Im Unterschied zu einer normalen Ozonolyse, bei der nach entsprechender

Aufarbeitung direkt stabile Produkte erhalten werden, führt die Ozonolyse hier zur Freisetzung hochreaktiver, instabiler und elektrophiler α,β -Diketonitrile (**86**), die mit verschiedenen Nucleophilen abreagieren können. Zunächst wurde das Abfangen mit Methanol zu den entsprechenden α -Ketomethylestern (**105**) untersucht. Dazu wurde die Ozonolyse bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in DCM/MeOH (2:1) für ca. zehn Minuten durchgeführt bis eine Blaugrün-Färbung des Lösungsmittels durch Ozon das Ende der Reaktion anzeigt. Methanol bzw. Alkohole allgemein werden dabei von Ozon nicht angegriffen, so dass das Nucleophil bereits während der Ozonolyse als Cosolvens anwesend sein kann.

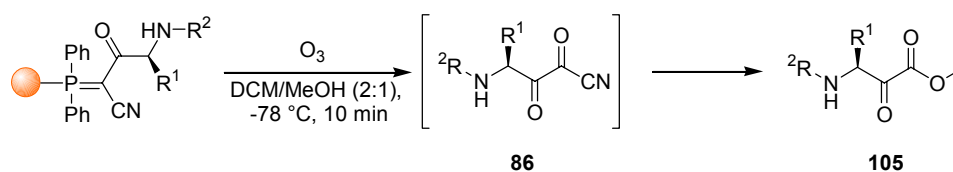


Abb. 3-19: Durchführung der Ozonolyse zur Abspaltung von α -Ketomethylestern von polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphoranen.

Als einfachstes Beispiel wurde die Abspaltung am polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphoran **106** durchgeführt, d. h. direkt nach Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans mit Fmoc-Phenylalanin, Fmoc-Abspaltung und Acetylierung des freien Amino-Terminus.

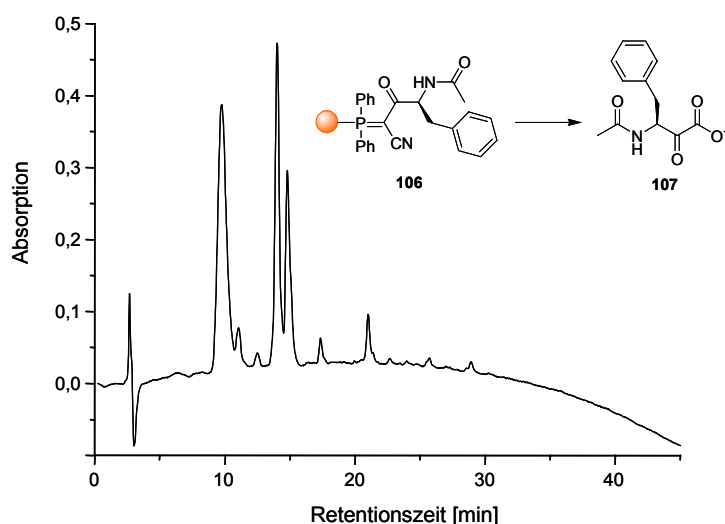


Abb. 3-20: HPLC-Chromatogramm nach oxidativer Abspaltung von Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz **106**.

Das HPLC-Chromatogramm des erwarteten Abspaltproduktes (**107**) zeigte neben einem breiten, mutmaßlichen Produkt-Peak bei ca. zehn Minuten einen Doppelpeak bei ca.

14 Minuten. Zur genaueren Identifizierung des Produktes und eventueller Nebenprodukte wurden LC-MS-Untersuchungen durchgeführt.

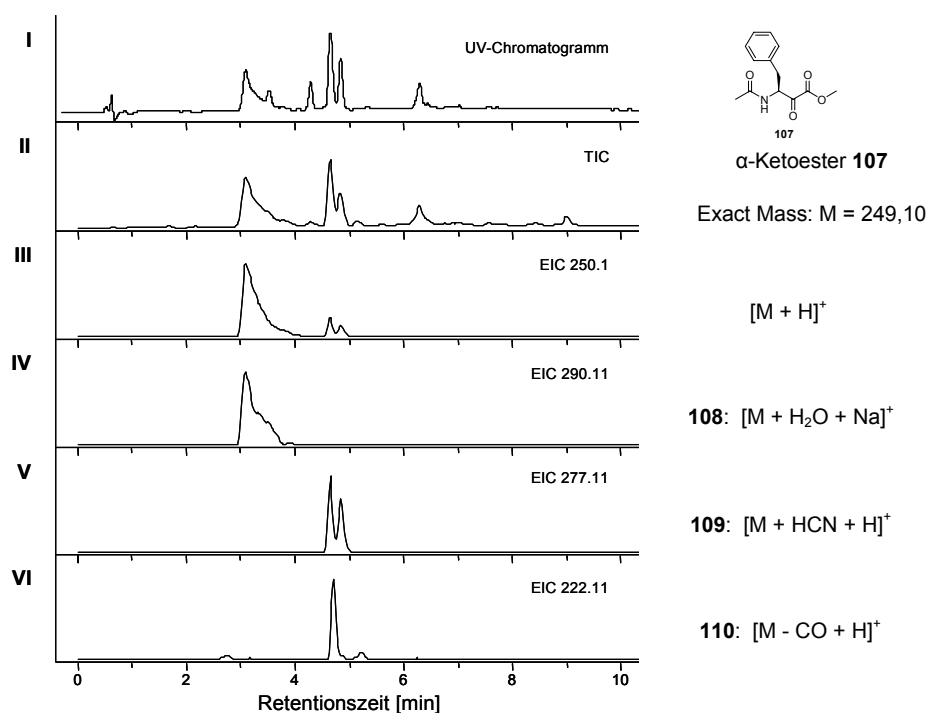


Abb. 3-21: LC-MS-Analytik nach oxidativer Abspaltung von Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz **106**: I, UV-Chromatogramm 214 nm; II, Totalionenstrom; III, Massenspur α -Ketomethylester (**107**); IV, Massenspur Hydrat (**108**); V, Massenspur Cyanhydrine (**109**); VI, Massenspur Decarbonylierungsprodukt (**110**).

Die Auswertung des LC-MS-Laufes (Abb. 3-21) zeigte die Existenz mehrerer Verbindungen an, die aber alle mit dem erwarteten Produkt (**107**) in enger Beziehung stehen. So stellte sich heraus, dass der α -Ketomethylester unter den LC-Bedingungen, d. h. im Acetonitril/Wasser-Eluenten reversibel im Gleichgewicht mit seinem Hydrat (**108**) steht, was zur extremen Peakverbreiterung führt. Des Weiteren bilden sich mit der freigewordenen Blausäure die beiden diastereomeren Cyanhydrine (**109**), die im vorliegenden Fall deutlich abgesetzt bei längerer Retentionszeit eluieren. Eine nähere Betrachtung des entsprechenden LC-Ausschnitts zeigte weiter, dass sich unter den Cyanhydrin-Peaks noch in geringer Menge eine weitere Verbindung verbirgt, deren Masse zum erwarteten Produkt eine Massendifferenz von 28 Masseneinheiten aufweist. Es ist zu vermuten, dass diese Differenz vom Verlust einer CO-Einheit, d. h. einer Decarbonylierung, herrührt und als Nebenprodukt der α -Aminosäureester (**110**) erhalten wird.

Für das Vorhaben, über Acyl(cyanmethylen)phosphorane und daraus freigesetzte α -Ketoester letztlich durch Reduktion zu α -Hydroxyestern zu gelangen, stellen die gefundenen

Produktgleichgewichte dann kein Problem dar, wenn es gelingt, sowohl α -Ketoester, Hydrat und Cyanhydrine, eventuell unter Gleichgewichtsverschiebung, vollständig zum selben Reduktionsprodukt umzusetzen (vgl. Kap. 3.3.2).

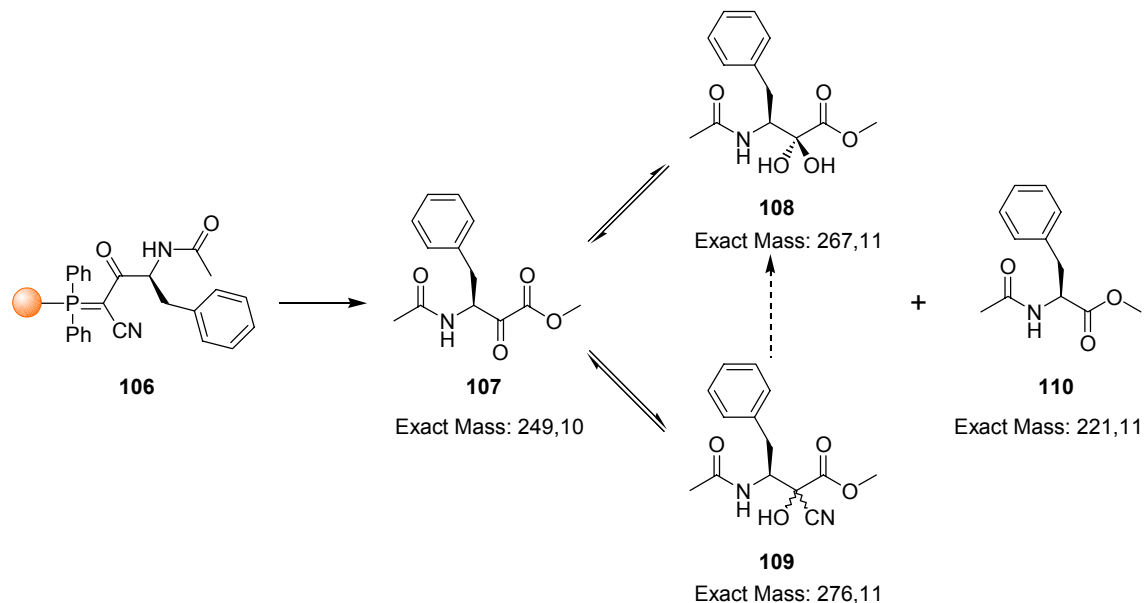


Abb. 3-22: Durch LC-MS-Analytik identifizierte Abspaltprodukte von Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz **106** und Produktgleichgewichte.

Alle weiteren durchgeführten Abspaltungen von anderen Harzen zu α -Ketomethylestern zeigten gleichfalls das bei Verbindung **107** aufgezeigte Charakteristikum eines aus mehreren Peaks zusammengesetzten Chromatogramms. Im Gegensatz zu **107** eluieren die Produkte in der HPLC in den meisten Fällen jedoch in einem breiten, nicht aufgelösten Peak über eine Zeitdauer von bis zu fünf Minuten, was eine Identifizierung und Quantifizierung der Bestandteile erschwert. Als Beispiel zeigt Abb. 3-23 das HPLC-Chromatogramm des α -Ketoesters Fmoc-Phe-COOME (**111**), bei dem im breiten Signal gerade noch die scharfe Kontur der Cyanhydrine zu erkennen ist.

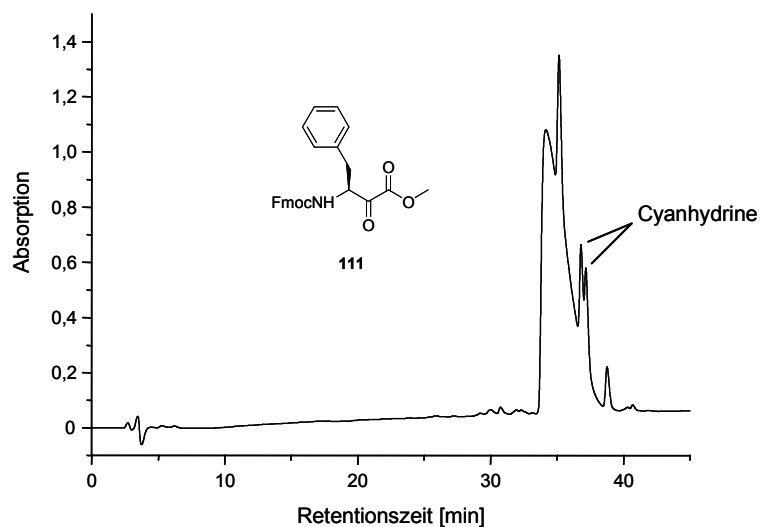


Abb. 3-23: HPLC-Chromatogramm des α -Ketomethylesters Fmoc-Phe-COOMe (**111**): Zusammengesetzter Peak aus α -Ketoester, Hydrat und Cyanhydrinen.

Die Aufnahme von NMR-Spektren, insbesondere eines ^{13}C -Spektrums (Abb. 3-24), zeigt für das Rohprodukt (nicht lyophilisierte Probe \rightarrow kein Hydrat) hohe Produktreinheit und erlaubt eine sehr gute Zuordnung der Signale. Spezifische Signale der Cyanhydrine werden nicht beobachtet.

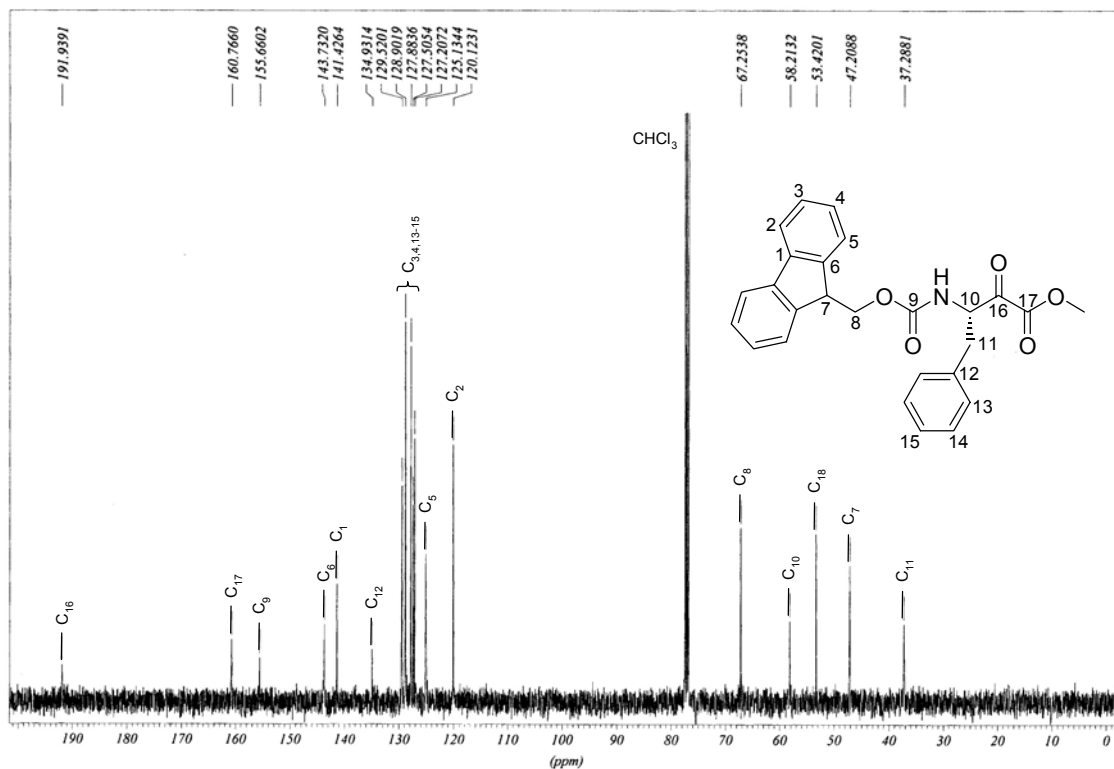


Abb. 3-24: ^{13}C -NMR-Spektrum von Fmoc-Phe-COOMe (Rohprodukt).

Besonders gut lässt sich die Zusammensetzung und Verteilung der Abspaltprodukte unter LC-Bedingungen bei LC-MS-Untersuchungen nach Abspaltung des α -Ketomethylesters Fmoc-Ser(tBu)-COOMe (**112**) verdeutlichen. Während das eigentliche Produkt im hinteren Bereich des breiten Peaks angereichert ist (Abb. 3-25, **II**), bildet das polarere Hydrat auf der Umkehrphase die vordere Peakflanke (**III**). Die Cyanhydrine finden sich in diesem Fall etwa in der Mitte (**IV**).

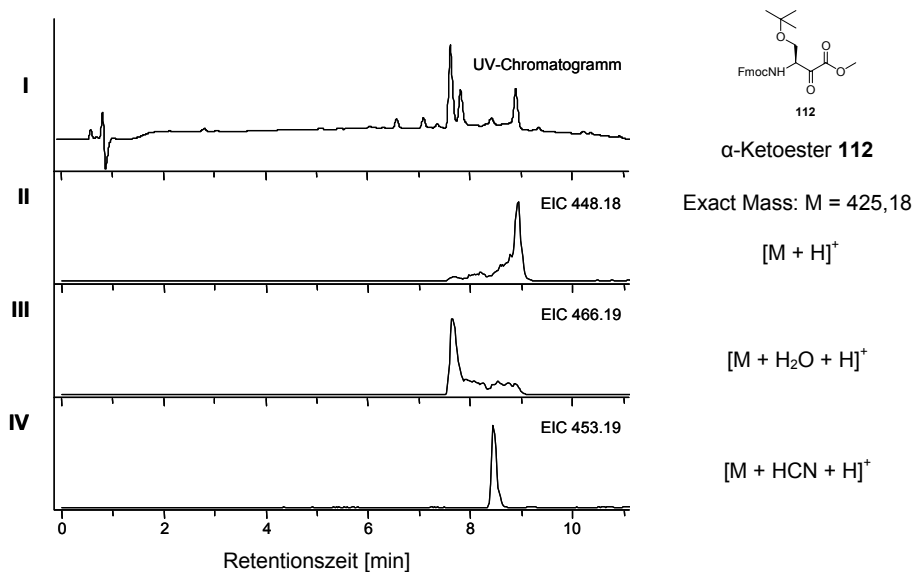
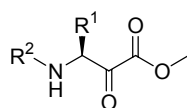


Abb. 3-25: Zusammensetzung und Verteilung des Produktgemisches nach Abspaltung von Fmoc-Ser(tBu)-COOMe (**112**): **I**, UV-Chromatogramm 214 nm; **II**, Massenspur α -Ketomethylester **112**; **III**, Massenspur Hydrat; **IV**, Massenspur Cyanhydrine.

Insgesamt wurden ozonolytisch auf die vorgestellte Weise eine Anzahl von N-Acetyl- bzw. N-Fmoc- α -keto- β -aminosäuremethylester und N-Acetyl-tripeptidyl- α -ketosäuremethylester abgespalten und charakterisiert (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: *N*-Acetyl- bzw. *N*-Fmoc- α -keto- β -aminosäuremethylester sowie *N*-Acetyl-tripeptidyl- α -ketosäuremethylester durch Ozonolyse von polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphoranen in Methanol.



107, 111-122

Produkt	R ¹ [a]	R ²	Ausbeute	Reinheit ^[b]
107	Phe	Ac	65 %	88 %
111	Phe	Fmoc	57 %	90 %
112	Ser(tBu)	Fmoc	52 %	89 %
113	Leu	Fmoc	54 %	86 %
114	Pro	Fmoc	39 %	75 %
115	Met ^[c]	Fmoc	63 %	87 %
116	Lys(Boc)	Fmoc	50 %	72 %
117	Asp(OtBu)	Fmoc	55 %	88 %
118	Asn(Trt)	Fmoc	59 %	99 %
119	Phe	Ac-Lys(Boc)-Gly	42 %	75 %
120	Phe	Ac-Gly-Leu	44 %	80 %
121	Phe	Ac-Asp(OtBu)-Val	43 %	80 %
122	Phe	Ac-Ser(tBu)-Ile	30 %	81 %

[a] Seitenkette der entsprechenden Aminosäure; [b] HPLC, Detektion 214 nm, Addition der Peakflächen des Produktgleichgewichtes; [c] oxidiert zum Sulfoxid.

Die Produkte wurden dabei in sehr guten Reinheiten und befriedigenden bis guten Ausbeuten erhalten. Die Ausbeuten beziehen sich dabei auf die Menge des eingesetzten (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes. Unter Berücksichtigung der Kupplungsausbeuten der Fmoc-Aminosäuren (vgl. Tab. 3-2), die im Schnitt bei 70-80 % liegen, lässt sich für die Effizienz der Abspaltung ein mittlerer Wert im Bereich von 70-75 % errechnen. Im Falle der Tripeptidyl-Produkte liegt die Abspaltungsausbeute etwas niedriger. Die Aufnahme eines IR-Spektrums nach erfolgter Ozonolyse bestätigt, dass die Abspaltung unvollständig ist, da die IR-Absorptionsbande der Cyano-Gruppe bei 2175 cm⁻¹ immer noch sichtbar

bleibt (Abb. 3-26, **J**, im Vergleich zu **F** vor Ozonolyse). Deutlich ist die Bande der P-O-Doppelbindung des Phosphinoxids bei 1179 cm^{-1} erkennbar.

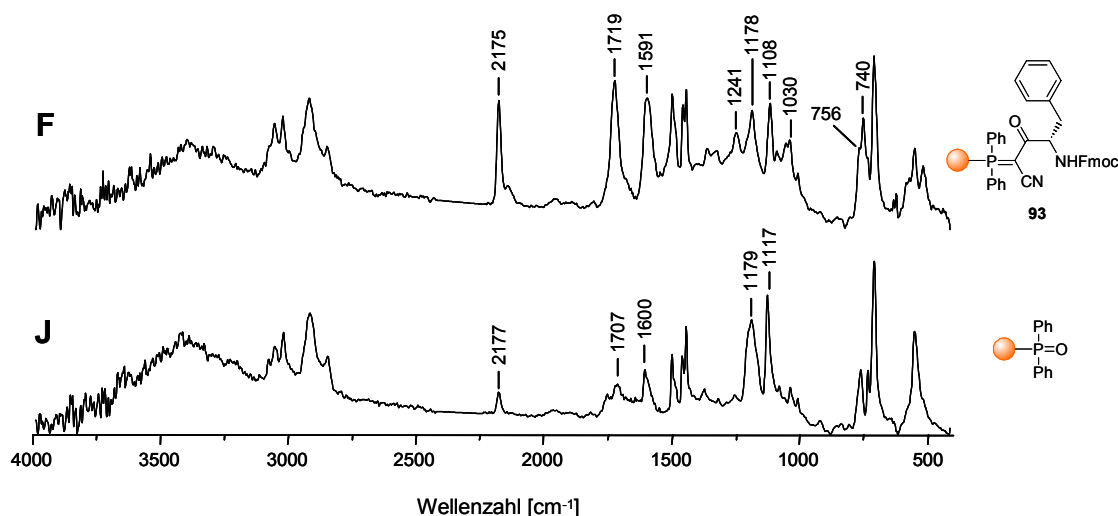


Abb. 3-26: ATR-IR-Spektren von Acyl(cyanmethylen)phosphoran **93** vor (**F**) und nach (**J**) Ozonolyse.

3.3.2 Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoestern

Entscheidend für das verfolgte Synthesekonzept ist die Möglichkeit, die erhaltenen α -Keto-Produkte zu den α -Hydroxy-Verbindungen zu reduzieren. Wie in Kap. 3.3.1 dargestellt kommt es darauf an, dass auch die Hydrate und Cyanhydrine, die neben dem eigentlichen Produkt im Gleichgewicht gefunden werden, reduzierbar sind.

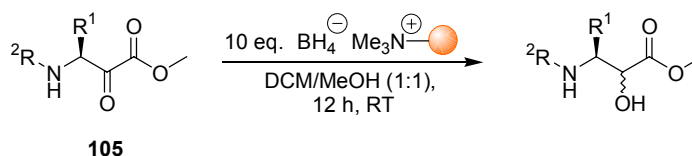


Abb. 3-27: Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoestern mit polymerem Borhydrid.

Um dies zu untersuchen wurden Umsetzungen mit Borhydrid durchgeführt, wobei jedoch kein freies Borhydrid, etwa NaBH_4 , sondern Polymer-gebundenes Borhydrid verwendet wurde. Polymer-gebundenes Borhydrid ist ein gängiges, kommerziell erhältliches polymeres Reduktionsreagenz für die Polymer-unterstützte Synthese in Lösung^[242,266]. Es basiert auf einem mit quartären Ammonium-Gruppen funktionalisierten, makroporösen Polystyrol, etwa den Ionenaustauscher-Harzen Amberlyst A26 oder Amberlyte IRA900 in der Chlorid-Form, deren Anionen gegen Borhydrid-Anionen ausgetauscht sind. Der große

Vorteil der Polymer-unterstützten Reaktionsführung liegt auch hier in der einfachen Aufarbeitung des Reaktionsansatzes durch Filtration.

Einige der durch Ozonolyse erhaltenen α -Ketoester wurden in DCM/MeOH (1:1) gelöst, mit zehn Äquivalenten polymerem Borhydrid versetzt und für zwölf Stunden gerührt. Analyse der Reaktionsprodukte nach Filtration zeigte vollständige Umsetzung der Edukte zu den diastereomeren α -Hydroxylestern, d. h. weder Hydrat, Cyanhydrine noch α -Keto-Form konnten detektiert werden.

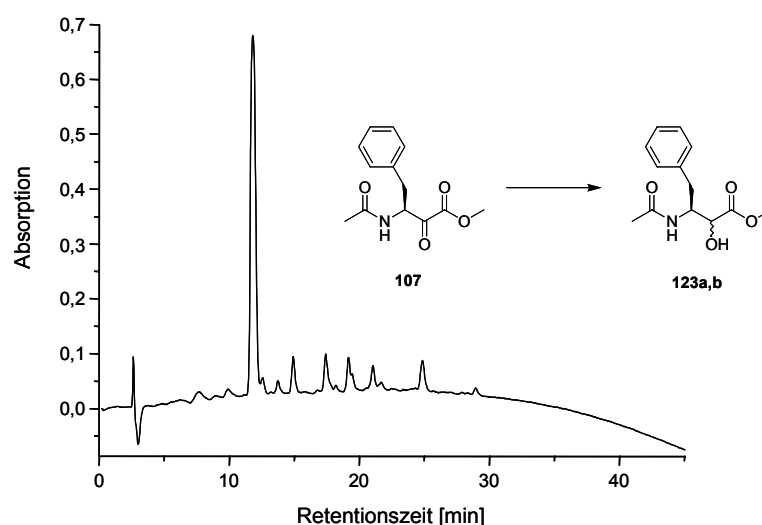
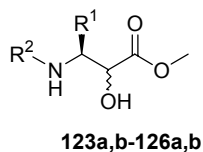


Abb. 3-28: HPLC-Chromatogramm nach Reduktion von α -Ketoester **107** mit polymerem Borhydrid: Vollständige Umsetzung von α -Keto-Edukt sowie Hydrat und Cyanhydrinen zum α -Hydroxymethylester (Koelution der Diastereomere).

Tab. 3-4: *N*-Acetyl- bzw. *N*-Fmoc- α -hydroxy- β -aminosäuremethylester sowie *N*-Acetyl-tripeptidyl- α -hydroxysäuremethylester durch Reduktion der α -Ketoester mit polymerem Borhydrid.



Produkt	R ¹ [a]	R ²	Ausbeute	Reinheit [b]
123a,b	Phe	Ac	76 %	72 %
124a,b	Asn(Trt)	Fmoc	>95 %	62 %
125a,b	Phe	Ac-Ser(tBu)-Ile	87 %	84 %
126a,b	Phe	Ac-Asp(tBu)-Val	90 %	79 %

[a] Seitenkette der entsprechenden Aminosäure; [b] HPLC, Detektion 214 nm.

3.3.3 Oxidative Abspaltung zu α -Ketosäuren

Neben der Möglichkeit, die durch die Ozonolyse freigesetzten α,β -Diketonitrile mit Alkoholen zu den α -Ketoestern abzufangen, kann auch Wasser zum Quenchen des Reaktionsansatzes verwendet und dadurch die α -Ketosäuren erhalten werden.

Diese Variante wurde nur an einem Beispiel (**127**) untersucht, um die grundsätzliche Machbarkeit zu demonstrieren. Dazu wurde das polymere Acyl(cyanmethyl)phosphoran **93** in Dichlormethan ohne Zugabe eines Nucleophils bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ozonolytisch und anschließend mit einer THF/Wasser-Mischung gequencht. Vergleichbar wird auch in verschiedenen Publikationen verfahren^[173,177], wobei dort der Zugang zu den Säuren auch indirekt über das Abfangen zu Estern und deren Verseifung beschriftet wird^[181,182].

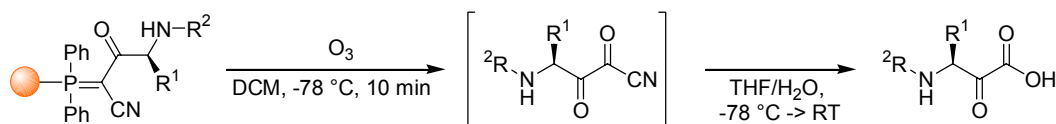


Abb. 3-29: Durchführung der Ozonolyse und Quenchen mit Wasser zur Abspaltung von α -Ketosäuren von polymeren Acyl(cyanmethyl)phosphoranen.

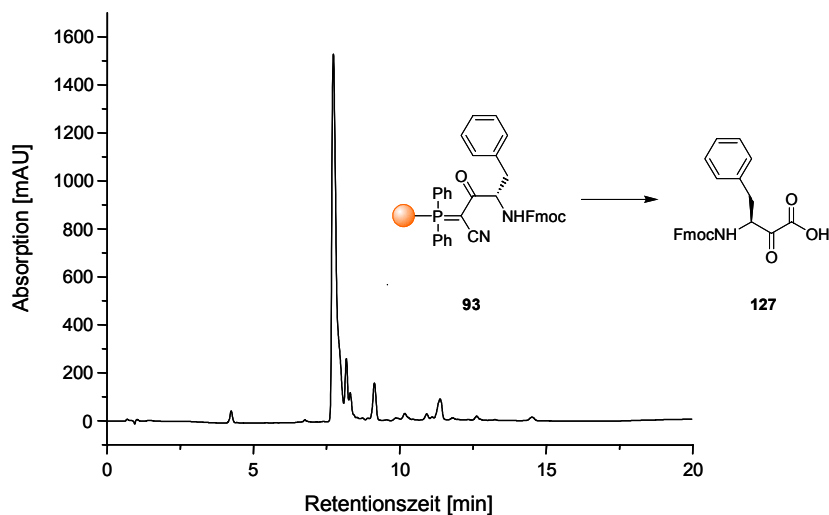
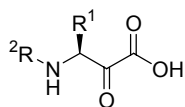


Abb. 3-30: Ozonolyse von Acyl(cyanmethyl)phosphoran-Harz (**93**) und Abfangreaktion zur α -Ketosäure (**127**) mit Wasser.

Tab. 3-5: N-Fmoc- α -keto- β -aminosäure durch Ozonolyse von polymerem Acyl(cyanmethylen)phosphoran und Quenchen mit Wasser.

Produkt	R ¹ [a]	R ²	Ausbeute	Reinheit [b]
127	Phe	Fmoc	56 %	75 %

[a] Seitenkette der entsprechenden Aminosäure; [b] HPLC, Detektion 214 nm.

3.3.4 Oxidative Abspaltung zu α -Ketoamiden

Für den Erhalt von Norstatinen, deren α -Hydroxy- β -aminosäure-Motiv aus einer entsprechenden α -Keto-Vorstufe generiert wird und sowohl N- als auch C-terminal über Amidbindungen in eine peptidomimetische Gesamtstruktur integriert ist, bedeutet das Abfangen des reaktiven α,β -Diketonitrils mit einem Amin den direktesten Zugang. WASSERMAN et al. benutzten diesen Weg bei der Synthese der Naturstoffe Bestatin, Probestin, Phebestin, Poststatin, Eurystatin A^[174-176,267], Verongamin, Hemibastadin-2 und Aerothionin^[252], während andere Gruppen auf diese Weise sonstige, nicht natürliche α -Ketoamide darstellten^[178-180,184]. In den zitierten Beispielen fanden neben einfachen Alkylaminen auch Aminosäure- und Dipeptidester als Amino-Komponente Verwendung.

Zur Umsetzung des α,β -Diketonitrils mit Aminen muss methodisch anders als etwa mit Alkoholen verfahren werden, da die Amine wegen ihrer Oxidationsempfindlichkeit nicht schon während der Ozonolyse zugegen sein können. Es wird in diesem Fall nach erfolgter Ozonolyse in DCM das überschüssige Ozon durch Einleiten eines Inertgases wie z. B. Stickstoff verdrängt und erst dann das Amin zugegeben. Dabei ist zu beachten, dass auch bei Amin-Zugabe die Temperatur auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten wird, da sich α,β -Diketonitrile, etwa beim Erwärmen auf Raumtemperatur, leicht zersetzen^[173,179]. Außerdem müssen vor allem Aminosäure- und Dipeptidester, die bei ihrer Synthese meist als Salze anfallen und wegen ihrer größeren Stabilität auch nur so kommerziell erhältlich sind, zum freien Amin deprotoniert werden.

Um die Möglichkeit einer oxidativen Abspaltung vom Phosphoran-Linker zu den α -Ketoamiden zu untersuchen, wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, wobei jedoch noch weitere Aspekte in Betracht gezogen werden müssen. Zwar ist die Größenordnung der

Beladung des Harzes, von welchem abgespalten werden soll, relativ genau bekannt, jedoch kommt es, wie bereits ausgeführt, zu einer Abhängigkeit der Abspaltungseffizienz von der aufgebauten Struktur/Sequenz. Es ist deshalb nur ungefähr abzuschätzen, welche Stoffmenge abgespalten wird und damit schwierig, die benötigte Menge des Amins vorauszuberechnen.

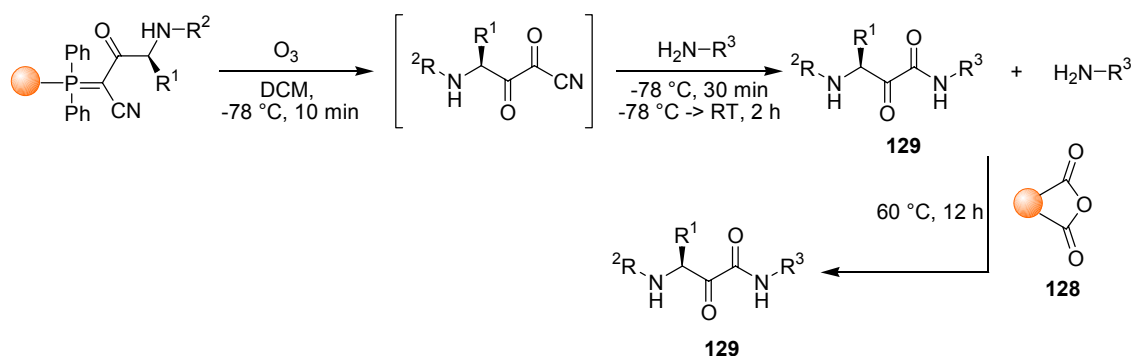


Abb. 3-31: Durchführung der Ozonolyse zur Abspaltung von α -Ketoamiden von polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphoranen und Einsatz eines Amin-Scavenger-Harzes zur Entfernung von Amin-Überschüssen.

Als Konsequenz erschien es deshalb am sinnvollsten, die Amino-Komponente in einem geringen, sicheren Überschuss von 1,5 Äquivalenten bezüglich der maximal möglichen Abspaltausbeute einzusetzen und nicht umgesetztes Amin durch Festphasen-Extraktion mit einem elektrophilen Amin-Scavenger, z. B. einem mit Säureanhydrid-Gruppen funktionalisierten, makroporösen Harz großer Kapazität (**128**), zu entfernen, um so das α -Ketoamid (**129**) aufzureinigen.

Es wurden am Beispiel des polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphorans **106** nach Ozonolyse verschiedene Amine wie 4-(Trifluormethyl)benzylamin, Piperonylamin, Cyclohexylamin und *n*-Butylamin, Aminosäureester wie H-Phe-OMe, H-Pro-OMe und H-Ile-OMe und schließlich Dipeptidester wie H-Ala-Ala-OtBu, H-Gly-Leu-OMe und H-Ala-Gly-OMe zugegeben. Die analytische Untersuchung der Reaktionsansätze durch LC-MS zeigte in allen Fällen das Entstehen der erwarteten α -Ketoamide, welche analog den α -Ketoestern wiederum zusammen mit Hydrat, Cyanhydrinen und einem Decarbonylierungsprodukt auftreten und breite Elutionspeaks über mehrere Minuten hervorrufen.

Im Unterschied zu den α -Ketoestern ergeben sich jedoch für die Amide vor allem schlechte Produktreinheiten. Als leicht identifizierbare Verunreinigung treten dabei die eingesetzten Amine auf, welche, entgegen der Annahme, in den meisten Fällen durch den polymeren Amin-Scavenger bei RT nur schlecht, bei 60 °C meist immer noch unvoll-

ständig entfernt wurden. Gute Ergebnisse lieferten lediglich die Reaktionen mit Piperidin und Tryptamin.

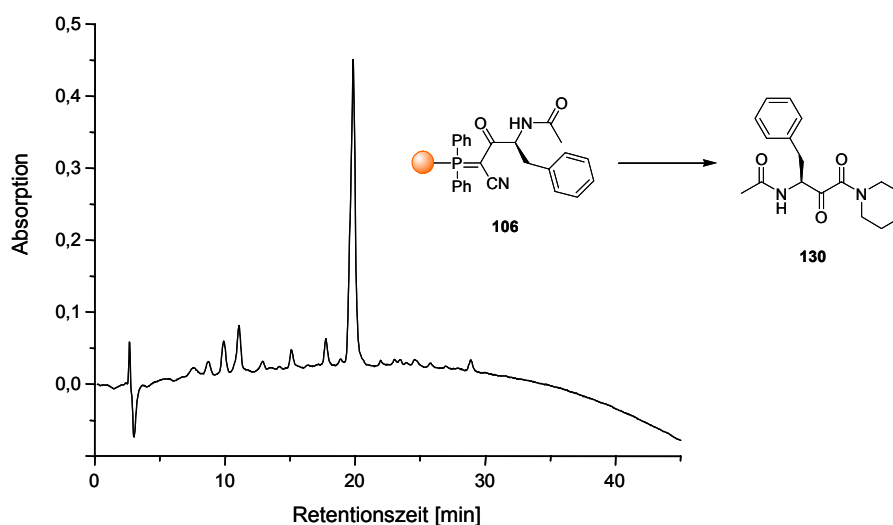
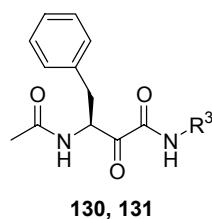


Abb. 3-32: HPLC-Chromatogramm des α -Ketoamid-Produktes **130** nach ozonolytischer Abspaltung, Abfangreaktion mit Piperidin und Entfernen des Piperidin-Überschusses.

α -Ketoamid **130** zeigt dabei im HPLC-Chromatogramm im Gegensatz zu nahezu allen anderen Beispielen einen relativ schmalen Produkt-Peak, der sich, wie LC-MS-Untersuchungen bestätigen, wiederum aus α -Keto-Produkt, Hydrat, Cyanhydrinen und Decarbonylierungsprodukt zusammensetzt, die hier aber zufällig koeluieren.

Tab. 3-6: *N*-Acetyl- α -keto- β -aminosäureamide durch Ozonolyse von polymeren Acyl(cyanmethylen)phosphoranen, Abfangen der α,β -Diketonitrile mit Aminen und Entfernung von Amin-Überschüssen mit Scavenger-Harz.



Produkt	Amino-Komponente mit R ³	Ausbeute	Reinheit ^[a]
130		53 %	77 %
131		55 %	69 %

^[a] HPLC, Detektion 214 nm, Addition der Peakflächen des Produktgleichgewichtes und des Decarbonylierungsproduktes.

3.3.5 Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoamiden

Wie die α -Keto- β -aminosäureester wurden auch die erhaltenen Amide durch polymeres Borhydrid-Harz einer Reduktion unterzogen.

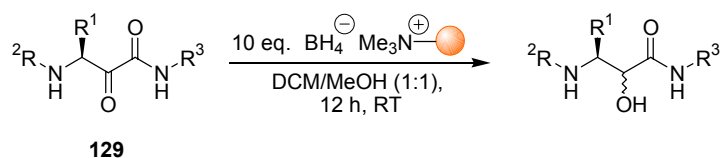


Abb. 3-33: Polymer-unterstützte Reduktion von α -Ketoamiden mit polymerem Borhydrid.

Dabei bestätigte sich besonders für das Edukt **130** sehr anschaulich die Zusammensetzung des HPLC-Peaks (vgl. Abb. 3-32). Während α -Ketoamid, Hydrat und Cyanhydrine einheitlich zu den diastereomeren Alkoholen **132a,b** reduziert wurden, die bei kürzerer Retentionszeit eluieren, verbleibt das Decarboxylierungsprodukt, bei dem es sich in diesem Fall um ein Amid des N-Acetyl-phenylalanins handelt, unverändert.

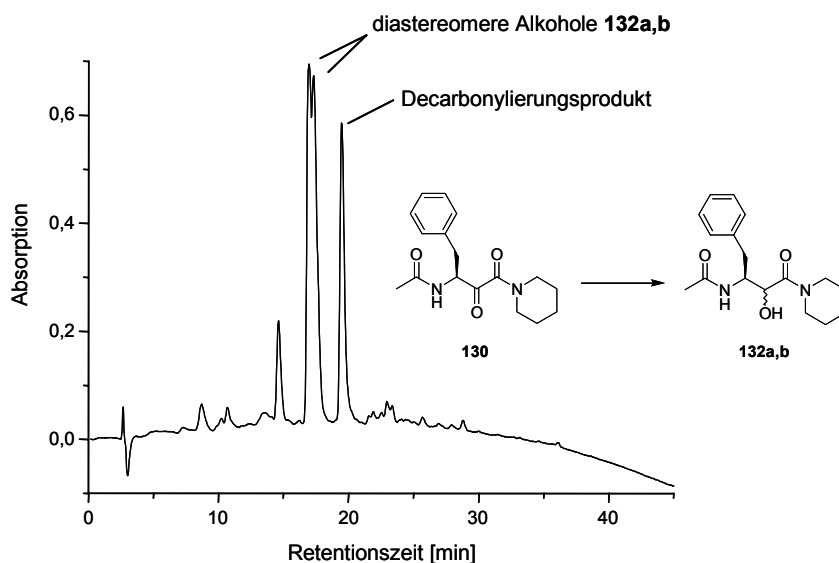


Abb. 3-34: HPLC-Chromatogramm nach Reduktion von α -Ketoamid **130** mit Borhydrid-Harz.

Nach Identifizierung der maßgeblichen HPLC-Peaks durch LC-MS und Integration der Peakflächen ergibt sich für das Ausmaß der Decarboxylierung als Nebenreaktion ein Wert von ca. 27 %. Der Nebenprodukt-Anteil durch Decarboxylierung ist damit bei der Umsetzung mit Aminen im Vergleich zu Alkoholen deutlich höher.

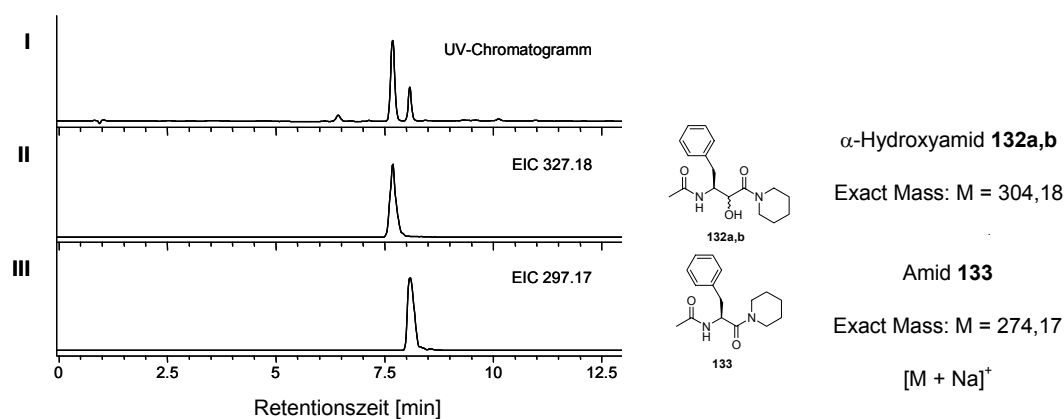
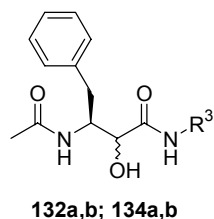


Abb. 3-35: Identifizierung von diastereomeren *N*-Acetyl- α -hydroxy- β -aminosäureamiden (Hauptprodukt, Diastereomere hier nicht getrennt, **132a,b**) und *N*-Acetyl- α -aminosäureamid (Nebenprodukt durch Decarboxylierung, **133**) durch LC-MS: **I**, UV-Chromatogramm 214 nm; **II**, Massenspur *N*-Acetyl- α -hydroxy- β -aminosäureamid **132a,b**; **III**, Massenspur *N*-Acetyl- α -aminosäureamid.

Tab. 3-7: *N*-Acetyl- α -hydroxy- β -aminosäureamide durch Reduktion der α -Ketoamide mit polymerem Borhydrid.



Produkt	Amino-Komponente mit R ³	Ausbeute	Reinheit ^[a]
132a,b	<chem>C1CCNCC1</chem>	76 %	72 % (27 %)
134a,b	<chem>NCCc1c[nH]c2ccccc12</chem>	72 %	65 % (30 %)

^[a] HPLC, Detektion 214 nm, in Klammern: Anteil der Peakfläche des Decarboxylierungsproduktes an der Gesamtpeakfläche.

3.4 Ansätze für eine Optimierung der Reaktionssequenz

Die bisher vorgestellten Ergebnisse belegen grundsätzlich die Möglichkeit, mit Hilfe Polymer-gebundener (Cyanmethylen)phosphorane in Analogie zur Lösungssynthese zu vergleichbaren Produkten zu gelangen, offenbaren jedoch noch verschiedene Mängel:

Die Detektion einer Decarbonylierung, welche die C-Kettenverlängerung quasi wieder rückgängig macht, ist dabei die größte Einschränkung. Ein Anteil von annähernd 30 % eines Nebenproduktes erscheint nicht tolerierbar, zumal es chemisch ähnlich und dadurch unter Umständen chromatographisch nur schwer und nicht in allen Fällen vollständig entfernt werden kann. Die Beobachtung, dass die Decarbonylierung beim Abfangen mit Aminen stark, beim Abfangen mit Alkoholen aber nur geringfügig wenn auch detektierbar auftritt, könnte auf eine Ursache in der längeren Verweilzeit auf der Stufe des α,β -Diketonitrils hinweisen, da die Amine erst nach der Ozonolyse zugegeben werden können. In der Literatur findet sich kein Hinweis zum Auftreten einer Decarbonylierung bei genau vergleichbarer Reaktion, jedoch übertreffen die Ausbeuten beim Abfangen mit Aminen selten 50 %, so dass ein entsprechendes Nebenprodukt möglicherweise nicht charakterisiert wurde.

Weiterhin nicht untersucht ist die Frage der stereochemischen Reinheit. Auch hier erscheint die gezeigte Vorgehensweise problematisch. Die durch die Abfangreaktion mit einem Überschuss eines (basischen) Amins erhaltenen α -Ketoamid-Zwischenprodukte verlieren, vor allem unter basischen Bedingungen, in der β -Position sehr leicht ihre definierte, durch die verwendete Aminosäure vorgegebene Konfiguration. Das Risiko einer Racemisierung/Epimerisierung erhöht sich weiter durch die Notwendigkeit, beim Entfernen des Überschusses durch das Scavenger-Harz auf 60 °C zu erwärmen. Bezüglich der Gefahr einer Racemisierung während der Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans, welche im weiteren Reaktionsverlauf zur Ausbildung von Epimeren führen würde, wurde erwartet, dass durch Anwendung der gängigen Aktivierung mit EDC/DMAP ein vollständiger Konfigurationserhalt realisierbar sein sollte. Es gibt in der Literatur keine Hinweise auf entsprechende Probleme. Außerdem lagen nach Auswertung repräsentativer NMR-Spektren der erhaltenen Produkte keinerlei Anzeichen für eine Racemisierung/Epimerisierung vor.

Unklar bleibt auch, inwieweit es mit Amin-Überschüssen an der α -Keto-Gruppe zur Imin-Bildung kommen kann, welche nach Reduktion zu unbeabsichtigter reduktiver Alkylierung führt.

Schließlich erscheint die angestrebte, breite Variationsmöglichkeit in R^3 nur eingeschränkt möglich. Da die Amine, also auch Peptide, in Lösung zugegeben werden müssen, wird die vorherige Synthese entsprechender Ester notwendig. Dies schränkt die Anzahl leicht und schnell realisierbarer Variationen stark ein.

Insofern wurden folgende Ziele für eine Optimierung beginnend mit dem Schritt der oxidativen Abspaltung verfolgt (Abb. 3-36):

- Vergleich der Ozonolyse mit anderen Möglichkeiten der Abspaltung (z. B. Dimethyldioxiran, Oxon)
- Abfangen des α,β -Diketonitrils (**86**) in Form eines leicht verseifbaren Esters, z. B. zum α -Ketotrimethylsilylethylester (**135**) mit Trimethylsilylethanol, welcher mit Fluorid-Ionen verseift werden kann
- Vor Verseifung direkte Reduktion zum α -Hydroxytrimethylsilylethylester (**136**) ohne Isolierung der Ketoverbindung, um jede Möglichkeit zur Racemisierung/Epimerisierung zu unterbinden
- Verseifung und direkte Kupplung der α -Hydroxysäure (**137**) auf ein zweites Synthese-Harz, welches ein immobilisiertes Amin, z. B. eine Peptidstruktur, mit freiem Amino-Terminus trägt,
- Abspaltung der Zielverbindung mit Norstatin-Isoster (**138**).

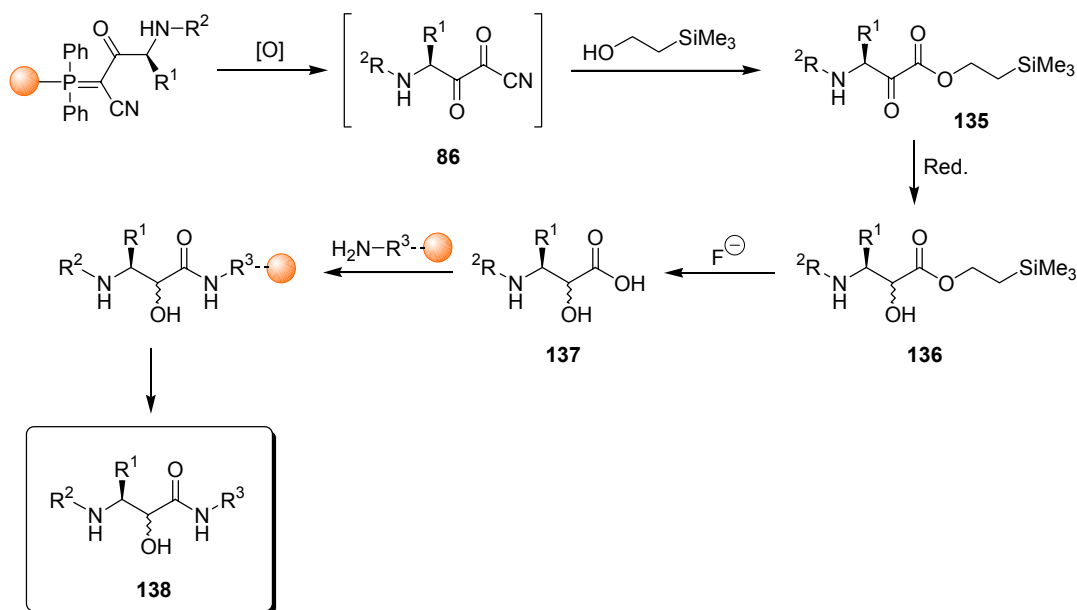


Abb. 3-36: Vorgesehene Abwandlung der Reaktionssequenz zur Optimierung.

Der Umweg über eine Abfangreaktion zum Ester wurde wegen der zu erwartenden, weniger stark ausgeprägten Tendenz zur Decarboxylierung favorisiert. Die Alternative einer Abfangreaktion mit Wasser direkt zur α -Ketosäure wurde aus zwei Gründen nicht verfolgt: Zum einen lassen sich α -Ketosäuren selbst nur schlecht als Bausteine in Peptidsynthesen nutzen^[171,268], zum anderen erscheinen α -Ketosäuren als Substrate für eine Reduktion zu α -Hydroxysäuren problematisch. Für entsprechende Reduktionen finden sich in der Literatur überwiegend enzymatische Methoden oder Übergangsmetall-katalysierte Hydrierungen.

Für die Reduktion der α -Keto-TMSE-ester wurde die Verwendung von polymerem Borhydrid aufgegeben, da sich das verwendete Reagenz als qualitativ unzuverlässig erwies. Mit dem Einsatz von Natriumborhydrid, welches gleichfalls eine sehr einfache Aufarbeitung der Reaktionsansätze erlaubt, sollte die Reaktion klassisch durchgeführt und auch Untersuchungen zur diastereoselektiven Reduktion mit bekannten, speziell dafür entwickelten Reduktionsmitteln vorbereitet werden.

Die Kupplung auf Polymer-gebundene Amine eröffnet eine große Variationsbreite, indem für den Amino-Baustein wiederum die Vorteile der Festphasen-Synthese genutzt werden können.

Neben die Fragen zur optimierten Durchführung der Synthese traten in dieser Phase der Arbeit Überlegungen zum Design einer interessanten Verbindungskollektion potenzieller

Plasmepsin II-Inhibitor-Strukturen, die mit den theoretischen Methoden des Molecular Modelling unternommen wurden.

3.5 Design einer virtuellen Verbindungskollektion potenzieller Plasmepsin II-Inhibitoren

Im Rahmen einer Kooperation wurden für das strukturelle Design der zu synthetisierenden Zielverbindungen theoretische Methoden angewendet. Wesentlicher Vorteil des aufgezeigten Syntheseweges ist die leichte Variierbarkeit des Restes R^1 (P1), welcher die Bindungstasche S1 des Enzyms adressiert und über die Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans eingeführt werden kann. Es sollte deshalb an einem jeweils gleichen Norstatin-Grundgerüst nur P1 verändert und die entsprechende Auswirkung auf die Bindungsaffinität durch biologische Testung der Substanzen bestimmt werden. Eine solche systematische Variation in P1 wurde für Plasmepsin II bisher nicht durchgeführt.

Als Grundgerüst (**139**) wurde der literaturbeschriebene, Pepstatin-ähnliche Statin-Inhibitor **11** in eine Norstatin-Struktur umgewandelt und etwas vereinfacht.

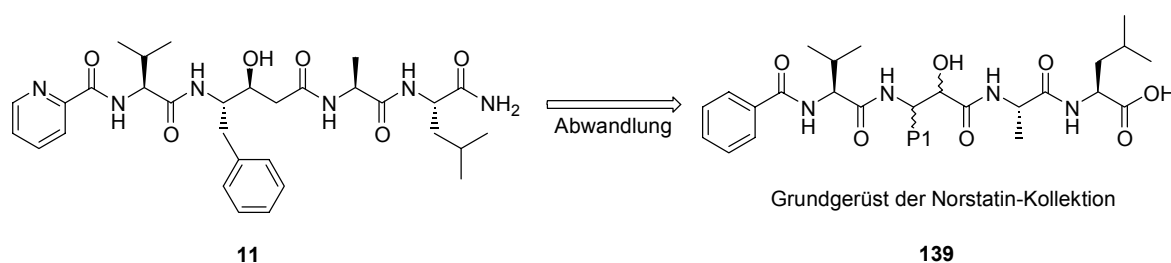


Abb. 3-37: Strukturelle Abwandlung eines bekannten Statin-Inhibitors zum Grundgerüst der Norstatin-Kollektion.

Neben einer hohen Bindungsaffinität ist eine hohe Selektivität eines Liganden von großer Bedeutung. Im Falle des Plasmepsin II bezieht sich diese vor allem auf die Selektivität gegenüber der humanen Aspartylprotease Cathepsin D mit strukturell sehr ähnlicher Bindungstasche S1.

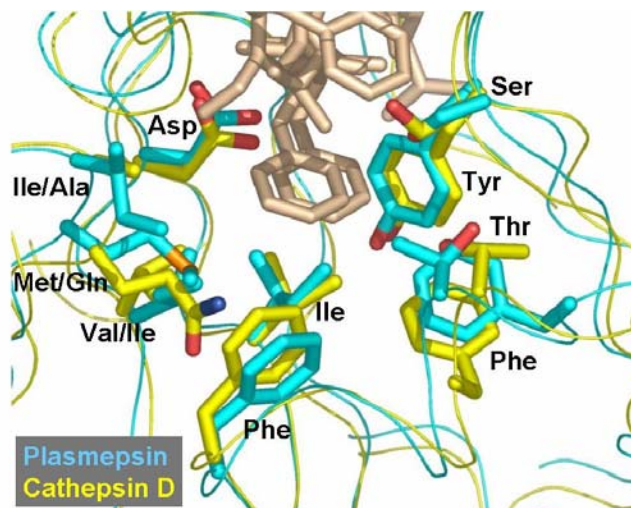


Abb. 3-38: Superposition der S1-Bindungstaschen von Plasmepsin II (dunkelgrau) und Cathepsin D (hellgrau) mit Bezeichnung der entsprechenden Aminosäuren, welchen der bekannte Inhibitor EH-58 eingeschrieben ist (Phenyl-Ringe im Zentrum oben).

Die Ähnlichkeit lässt sich z. B. durch Docking des bekannten Inhibitors EH-58 (**140**) in die jeweilige Bindungstasche und Superposition der Enzymausschnitte veranschaulichen (Abb. 3-38), wobei im Falle des Plasmepsin II die Lage des Inhibitors durch Kristallstrukturanalyse bereits genau bestimmt wurde^[91]. Wesentlicher Unterschied ist auf der linken Seite das Vorliegen eines Methionins (Plasmepsin) im Vergleich zu einem Glutamin (Cathepsin D) mit dahinterliegendem Isoleucin (Plasmepsin) bzw. Valin (Cathepsin D).

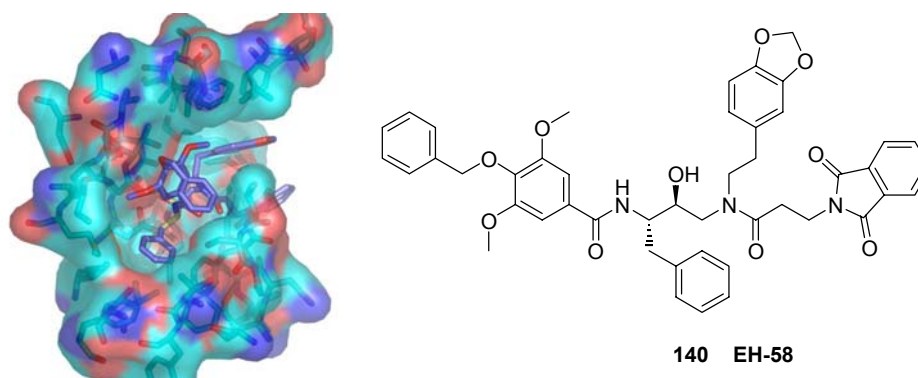


Abb. 3-39: Durch Kristallstrukturanalyse bestimmte Lage und Struktur des Inhibitors EH-58 in der Bindungstasche von Plasmepsin II.

Obwohl es sich bei EH-58 um einen Inhibitor mit Hydroxyethylamin-Isostere handelt, zeigt das Docking verschiedener anderer Isostere, z. B. von Statinen und Norstatinen, dass insbesondere die Lage und Ausrichtung von P1 vergleichbar sind. Deshalb wurden die experimentell bestimmten und aus Datenbanken zugänglichen Verhältnisse am EH-58/Plasmepsin II-Komplex als Ausgangsparameter für Docking-Experimente gewählt. Dazu wurde im Docking-Programm *FlexX* die Lage der Hauptkette von EH-58 vorgegeben und

festgelegt und Aminosäure-Reste P1 aus Datenbanken von Sigma-Aldrich und ACD durch das Programm positioniert. Über verschiedene Scoring-Funktionen wurden die Docking-Lösungen bewertet.

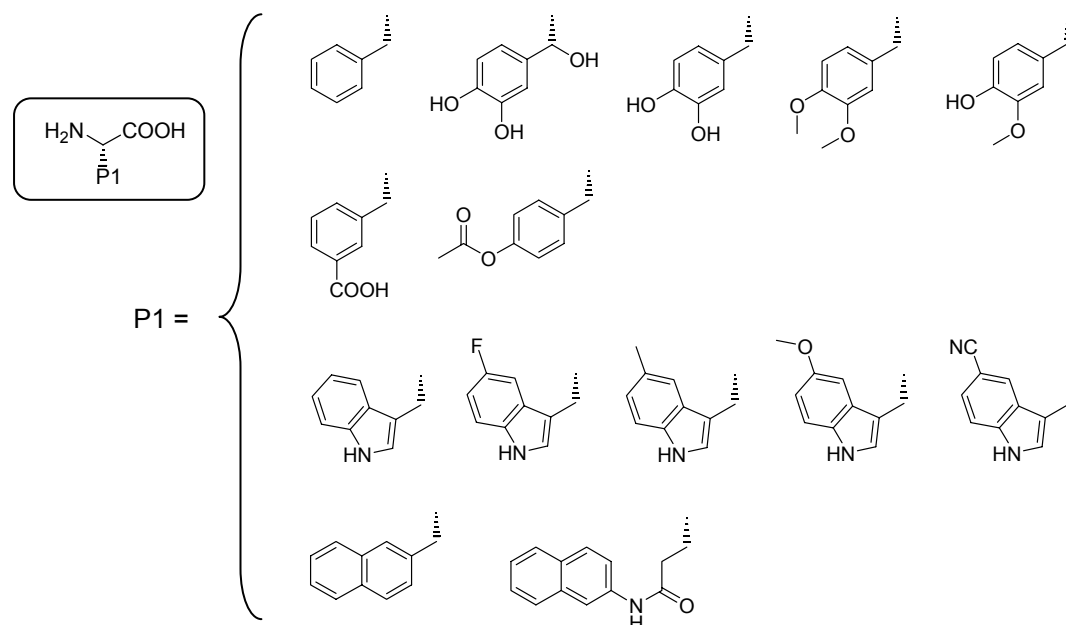


Abb. 3-40: Gedockte α -Aminosäuren aus Sigma-Aldrich- und ACD-Datenbank mit höchstem Score.

Die gedockten und durch die Scoring-Funktion hoch bewerteten Aminosäure-Reste in P1 lassen sich im Wesentlichen in drei Gruppen einteilen. Erwartungsgemäß wird Phenylalanin, welches auch im natürlichen Substrat Hämoglobin mit der S1-Tasche des Enzyms wechselwirkt, aber auch weitere substituierte Phenylalanine hoch bewertet. Darüber hinaus werden Tryptophan sowie substituierte Tryptophane und Aminosäuren mit Naphthyl-Rest vorgeschlagen.

Aus dem Scoring, der räumlichen Darstellung und einer Betrachtung der Wechselwirkung der Reste mit dem Enzym lassen sich folgende grundsätzliche Tendenzen ableiten:

- Das Docking prognostiziert günstige Wechselwirkungen von zusätzlichen polaren Substituenten am Phenylalanin. Diese ermöglichen eventuell H-Brücken mit der Seitenkette eines Serins, der einzigen polaren Komponente in der ansonsten hydrophoben S1-Bindungstasche. Die dabei relevanten Entfernungen bewegen sich in der entsprechenden Größenordnung. Eine Untersuchung auf so genannte „Hot Spots“ (= Bereiche/Felder, bei denen aufgrund der Wechselwirkung mit der Proteinumgebung das Auftreten eines Atomtyps im Liganden positiven Einfluss auf die Bindungsaffinität hat) deutet auf günstige Beiträge durch Sauerstoff- und

Stickstoff-haltige Substituenten hin. In gleicher Weise wird auch die Wechselwirkung mit Tryptophanen über H-Brücken erwartet.

- Die günstige Bewertung von Indolyl- und Naphthyl-Rest legt die Vermutung nahe, dass sich in der Bindungstasche über den Phenyl-Ring hinaus noch etwas Platz für sterisch anspruchsvollere, unpolare Reste befindet.

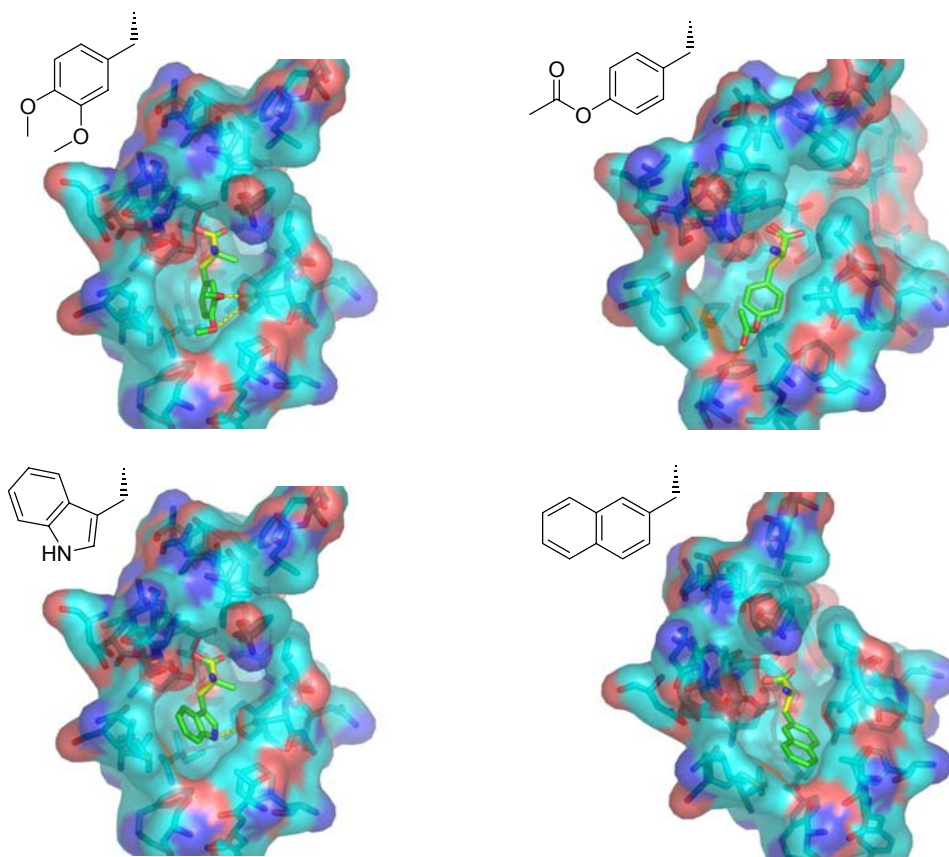


Abb. 3-41: Räumliche Darstellung der Docking-Ergebnisse verschiedener Aminosäure-Reste in die S1-Bindungstasche von Plasmeprin II und entsprechende Wechselwirkungen (ausgewählte Beispiele).

Ausgehend von den Docking-Ergebnissen wurde ein Synthesepfad für 17 Norstatine der allgemeinen Struktur **139** aufgestellt, wobei in diesem ersten Variationsansatz nicht eine direkte Umsetzung der Strukturvorschläge, sondern eine Berücksichtigung der durch das Docking vorhergesagten, vorteilhaften Elemente angestrebt wurde. So enthält die virtuelle Kollektion neben dem Phenyl-Rest des Phenylalanins als Stammverbindung, sowohl in *S*- als auch in *R*-Konfiguration, größere unpolare Gruppen, unter anderem Naphthyl-Reste, den mit polaren und unpolaren Substituenten versehenen Phenyl-Ring und den Indolyl-Rest des Tryptophans.

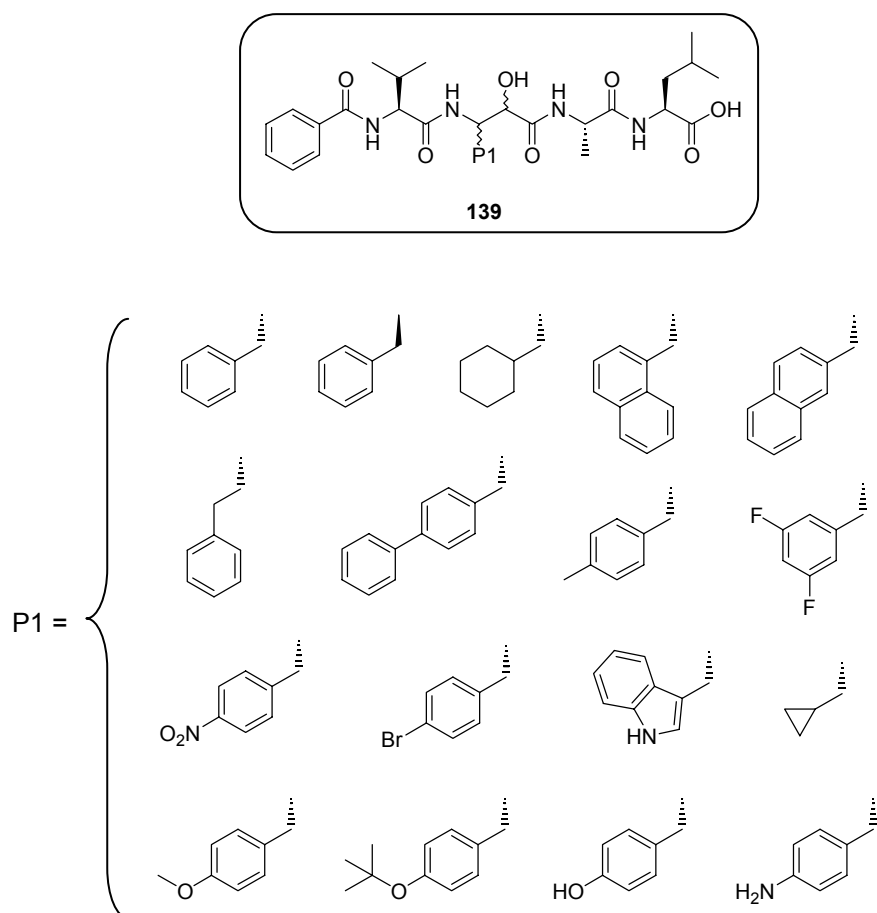


Abb. 3-42: Abgeleitete virtuelle Verbindungskollektion von 17 Norstatinen unter Berücksichtigung wesentlicher Ergebnisse der durchgeführten Docking-Experimente.

3.6 Abwandlung der vorgestellten Reaktionssequenz

3.6.1 Oxidative Abspaltung zu Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethylestern

Während die Decarboxylierung von α -Ketosäuren unter sehr sauren Bedingungen häufig beschrieben wurde^[269-271], ist über eine Decarboxylierung von α -Ketoamiden, sowohl im Allgemeinen als auch im Zusammenhang mit der Spaltung von (Cyanmethylen)phosphoranen, wenig bekannt. WASSERMAN et al. berichten über eine Decarboxylierung bei der Spaltung eines (Cyanmethylen)phosphorans (**141**), jedoch wird in diesem besonderen Fall ein α,β -Diketoamid (**142**) erhalten^[272]. Für den Mechanismus, der zum Decarboxylierungsprodukt (**143**) führt, wird der direkte Angriff des Amins an der α -Keto-Gruppe vorgeschlagen, wobei Kohlenmonoxid und Cyanid als Abgangsgruppe fungieren.

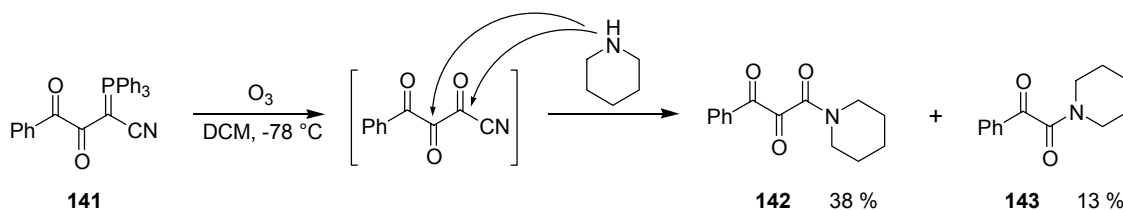


Abb. 3-43: Von WASSERMAN beobachtete Decarbonylierung bei der Spaltung von (Cyanmethylen)phosphoran zum α,β -Diketoamid^[272].

Eine Decarbonylierung an einem vergleichbaren System wurde auch von HUA et al. gefunden^[273], wobei hier genauso wie bei MELDAL et al.^[184] postuliert wird, dass der CO-Verlust der α -Keto-Verbindungen nicht während der Synthese, sondern während der Lagerung danach stattfindet. Letztere beobachten die Decarbonylierung bei der Behandlung von α -Ketoamiden mit Trifluoressigsäure und schlagen eine über ein Carbeniumion verlaufende Umlagerung des Amid-Stickstoffs vor.

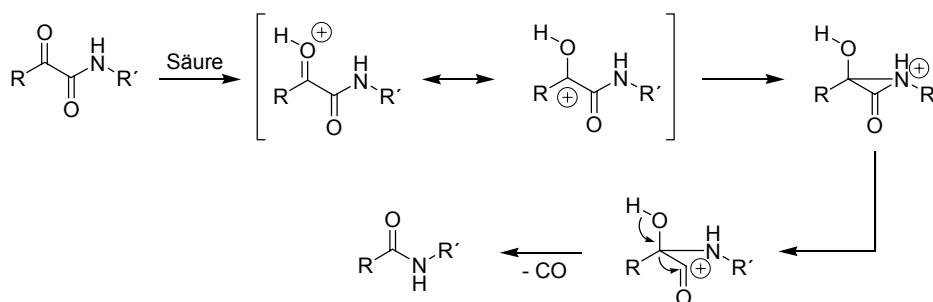


Abb. 3-44: Mechanismus der Decarbonylierung von α -Ketoamiden bei der Behandlung mit Säure nach MELDAL^[184].

Da die Decarbonylierung bei der Ozonolyse sowohl für die Umsetzung zu Estern als auch zu Amiden unter neutralen bis basischen Bedingungen beobachtet wurde, erklärt dieser Mechanismus das im Rahmen dieser Arbeit auftretende Problem nicht. Wahrscheinlicher erscheint eine Decarbonylierung auf der Stufe des α,β -Diketonitrils bzw. bei der Reaktion mit dem Nucleophil. Dabei könnte sich u. U. durch einen nucleophilen Angriff des aciden γ -Kohlenstoffs intermediär ein Cyclopropandion (**144**) bilden, welches unter CO-Abspaltung in das Keten (**145**) übergeht und mit dem jeweiligen Nucleophil abreagiert.

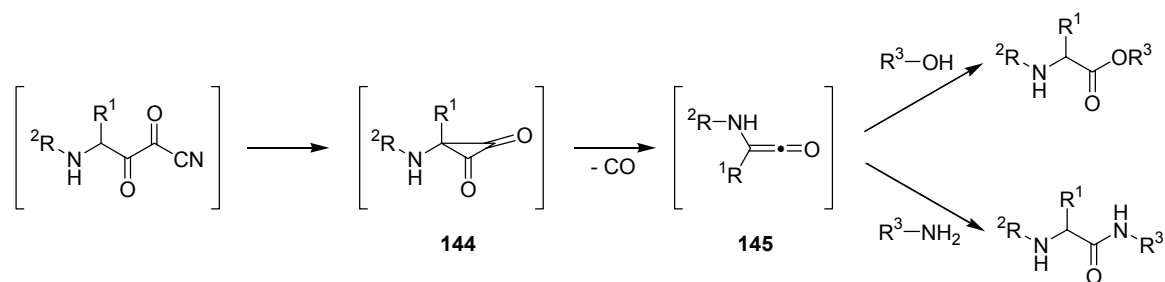


Abb. 3-45: Möglicher Mechanismus einer Decarbonylierung auf der Stufe des α,β -Diketonnitrils über ein intermediäres Keten.

Durch die fehlende Kenntnis des exakten Mechanismus erschien eine günstige Einflussnahme und Unterdrückung des CO-Verlustes durch Variation der Reaktionsbedingungen unwahrscheinlich. Umso erfreulicher zeigten erste Untersuchungen nach alternativer Durchführung der oxidativen Abspaltung zum α -Ketomethylester Fmoc-Phe-COOME (**111**) mit Dimethyldioxiran (DMDO) hohe Produktreinheit und völliges Ausbleiben einer Decarbonylierung.

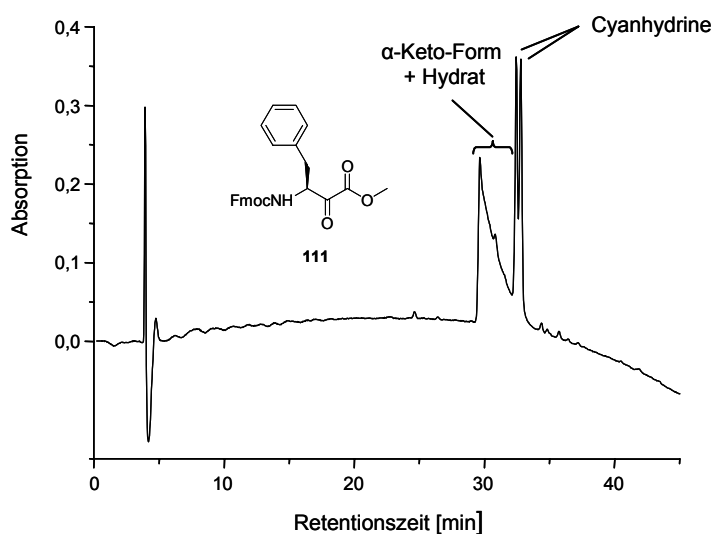


Abb. 3-46: HPLC-Chromatogramm nach Abspaltung des α -Ketomethylesters Fmoc-Phe-COOME (**111**) mit Dimethyldioxiran.

Bei DMDO handelt es sich um ein Reagenz, das nicht in Reinform verfügbar ist, sondern nur als Lösung in Aceton durch Oxidation mit in der Regel Oxon hergestellt werden kann. Das verwendete DMDO wurde nach Standardmethode^[274,275] jeweils frisch bereitete und die Konzentration der Lösungen mit Hilfe von $^1\text{H-NMR}$ bestimmt, indem der Anteil der Umsetzung einer Thioanisol-Maßlösung zum entsprechenden Sulfoxid durch Integration der jeweiligen Phenyl-Protonen quantifiziert wurde. Für die erhaltenen DMDO-Lösungen

in Aceton ergab sich dabei eine mittlere Konzentration von 0,072 mmol/ml, die damit etwas hinter dem entsprechenden Literaturwert (0,1 mmol/ml) zurückblieb.

Das Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz wurde zur Abspaltung in wenig trockenem DCM vorgequollen und mit kalter DMDO-Lösung/MeOH (4:1) versetzt, wobei die Farbe des Harzes allmählich von braun-orange nach farblos wechselte. Die eingesetzte Menge DMDO entsprach dabei 2,5 Äquivalenten, wobei zur Spaltung eines Mols Phosphoran jeweils zwei Mol Oxidationsmittel verbraucht werden. Die unter diesen Bedingungen erhaltene Produktmenge lag mit 75 % der theoretischen Ausbeute etwa in der gleichen Größenordnung wie die der ozonolytischen Abspaltung.

Eine weitere Variante der oxidativen Abspaltung mit fünf Äquivalenten Tetrabutylammonium Oxon in DCM/MeOH (3:1) blieb erfolglos und lieferte kein Produkt.

Für alle weiteren Abspaltungen wurde in der Folge Dimethyldioxiran verwendet, wobei als weitere Neuerung die Abspaltung zum α -Ketotrimethylsilylethylester durch Verwendung von Trimethylsilylethanol anstelle von Methanol untersucht wurde. Zum in wenig DCM vorgequollenen Acyl(cyanmethylen)phosphoran-Harz wurden dazu 30 Äquivalente Trimethylsilylethanol gegeben, mit DMDO-Lösung versetzt und bei 0 °C für 30 Minuten abgespalten.

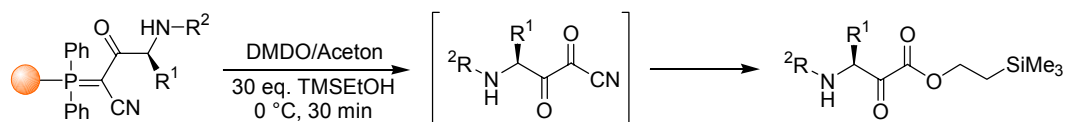


Abb. 3-47: Oxidative Abspaltung vom Phosphoran-Linker mit DMDO zum α -Keto-TMSE-ester.

Als konkretes Beispiel wurde dabei die Spaltung des polymeren Peptidyl- α -ketophosphorans **146** durchgeführt. Der dabei erhaltene Peptidyl- α -keto-TMSE-ester (**147**) stellt ein wichtiges Zwischenprodukt auf dem Weg zur Stammverbindung der virtuellen Norstatin-Kollektion dar.

Wie bei den Methylestern wird wiederum im HPLC-Chromatogramm ein mehrere Minuten breiter Peak, welcher sich aus α -Keto-Verbindung, Hydrat und Cyanhydrinen zusammensetzt, beobachtet. Eine Decarbonylierung bleibt mit DMDO auch beim Abfangen mit Trimethylsilylethanol aus. Eine weitere, scharfe Elutionsbande im HPLC-Chromatogramm bei ca. 42 Minuten lässt sich durch LC-MS als Halbketal durch Addition von Trimethylsilylethanol an den α -Ketoester identifizieren.

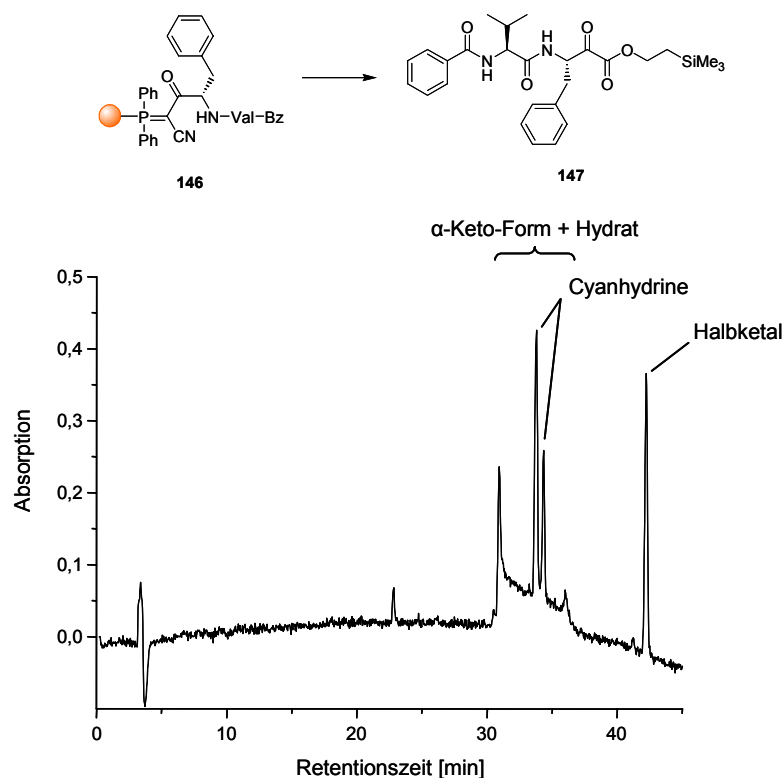


Abb. 3-48: HPLC-Chromatogramm nach Abspaltung zu Bz-Val-Phe-COOTMSE mit Dimethyldioxiran/Trimethylsilylethanol.

3.6.2 Reduktion von Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethern

Wie in Kap. 3.3 dargestellt, lassen sich die Produkte der oxidativen Abspaltung, bei denen es sich immer um ein Gemisch aus α -Keto-Verbindung, entsprechendem Hydrat und Cyanhydrinen handelt, Polymer-unterstützt einheitlich zu den diastereomeren Alkoholen reduzieren. Im Fall der Abspaltung zu α -Keto-TMSE-estern enthält dieses Gemisch noch ein TMSE-Halbketal, welches definiert entsteht und analytisch nachgewiesen werden kann.

Nach Beendigung der Abspaltreaktion wurden überschüssiges DMDO und das Lösungsmittel Aceton vollständig im Vakuum entfernt und damit die Abspaltprodukte im höhersiedenden Trimethylsilylethanol aufkonzentriert. Zur Reduktion wurden 0,625 Äquivalente Natriumborhydrid (2,5 Äquivalente Hydrid) in DCM/EtOH (1:1) bei 0 °C und einer Reaktionszeit von 30 Minuten eingesetzt. Die Aufarbeitung der Reaktionsansätze erfolgte durch Filtration der Lösungen durch eine dünne Kieselgel-Schicht, wobei alle anorganischen Salze entfernt werden konnten.

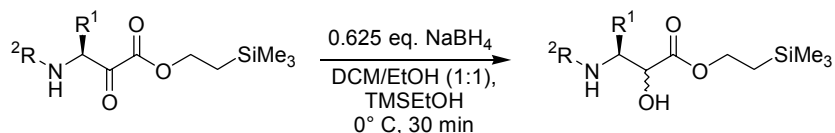


Abb. 3-49: Reduktion von α -Keto-TMSE-estern zu α -Hydroxy-TMSE-estern mit Natriumborhydrid.

Die analytische Untersuchung des Produktes der Reduktion von Bz-Val-Phe-COOTMSE (**147**) mittels HPLC zeigte das Verschwinden des breiten Edukt-Peaks zu Gunsten der schmalen Peaks der diastereomeren α -Hydroxy-Verbindungen (**148a,b**) mit $2R,3S$ - bzw. $2S,3S$ -Konfiguration, wobei auch die vollständige Umsetzung des Halbketals beobachtet werden konnte. Eine genauere Betrachtung der Produkt-Peaks offenbarte jedoch die Anwesenheit eines Nebenproduktes bei etwas verlängerter Retentionszeit.

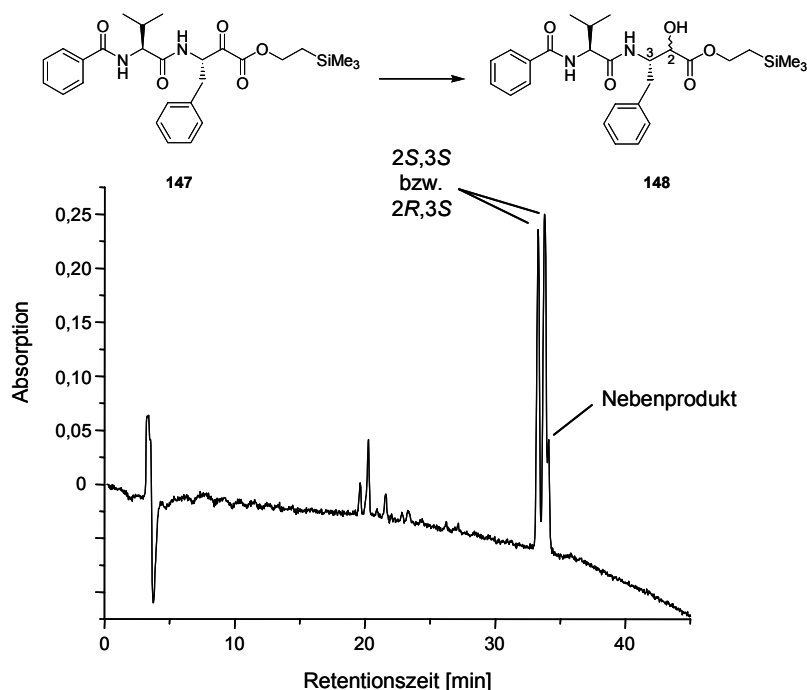


Abb. 3-50: HPLC-Chromatogramm nach Reduktion von Bz-Val-Phe-COOTMSE zu den diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-estern ($2R,3S$ bzw. $2S,3S$) mit Natriumborhydrid.

Da α -Keto-Verbindungen wie **147**, welche in β -Position ein Stereozentrum besitzen, besonders im Basischen, aber auch grundsätzlich in Lösung epimerisierungsempfindlich sind^[139,276], wurden als Nebenprodukt weitere diastereomere α -Hydroxy-TMSE-ester (**149a,b**) mit $2R,3R$ - bzw. $2S,3R$ -Konfiguration vermutet. Durch die Anwesenheit des dritten, eindeutig S -konfigurierten Stereozentrums am Valin ergeben sich vier mögliche Diastereomere, die keine Enantiomerenpaare bilden und damit u. U. auf achiralen Trennphasen unterschieden werden können.

Um die Vermutung zu stützen, wurde deshalb zunächst in einem parallelen Ansatz Fmoc-D-Phenylalanin zur Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans verwendet und die beiden mutmaßlich entstandenen Epimere definiert hergestellt.

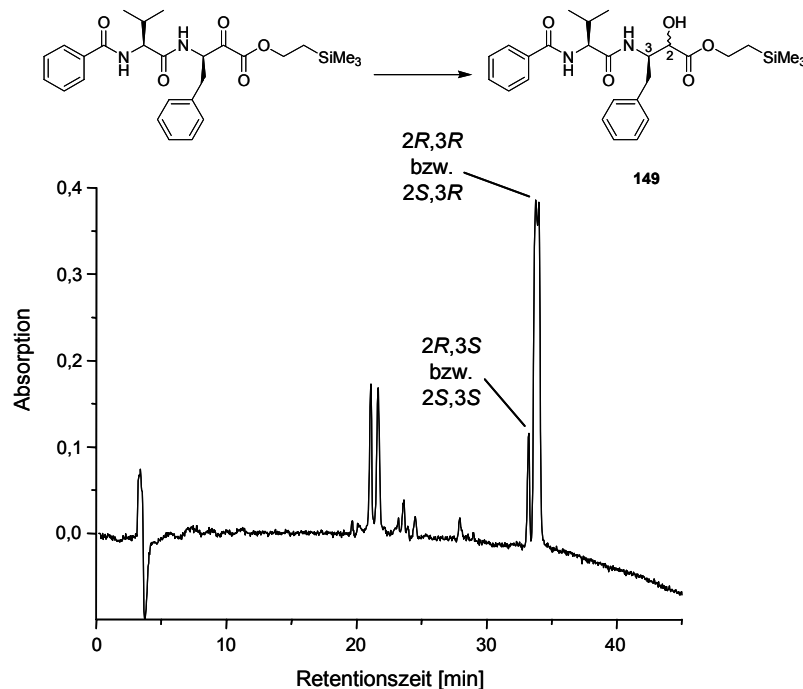


Abb. 3-51: HPLC-Chromatogramm nach Reduktion von Bz-Val-D-Phe-COOTMSE zu den diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-estern (2R,3R bzw. 2S,3R) mit Natriumborhydrid.

Bereits ein Vergleich der Retentionszeiten der erhaltenen HPLC-Chromatogramme erhärtete den Verdacht, dass es sich bei den jeweiligen, ähnlichen Nebenprodukten um die Epimere handelt.

Neben den eigentlichen Produkten fallen in den Chromatogrammen (Abb. 3-50 bzw. Abb. 3-51) noch weitere Peaks im Bereich von ca. 21 Minuten auf. LC-MS-Untersuchungen zeigen, dass es sich dabei um die diastereomeren α -Hydroxysäuren **150a,b** bzw. **151a,b** handelt. Diese α -Hydroxysäuren entstehen durch Reduktion einer α -Ketosäure, welche bei der oxidativen Abspaltung mit feuchter DMDO-Lösung in Aceton gebildet wird. Spuren von Wasser in den hergestellten DMDO-Lösungen entstammen der Destillation aus wässriger Lösung, können aber weitestgehend durch Zusatz von aktiviertem Molekularsieb (4 Å) entfernt werden. Die diastereomeren α -Hydroxysäuren stellen an sich keine störenden Verunreinigungen dar, da auch die α -Hydroxy-TMSE-ester im nächsten Schritt verseift werden.

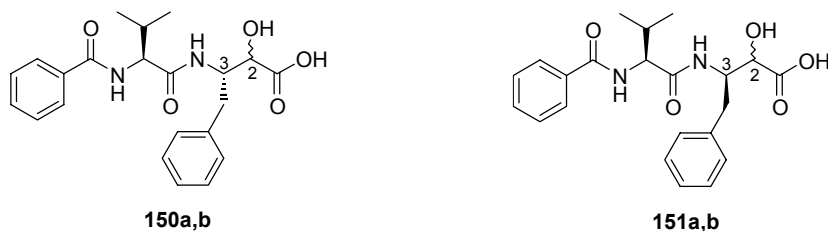


Abb. 3-52: Detektierte diastereomere α -Hydroxysäuren **150a,b** (2*R*,3*S* bzw. 2*S*,3*S*) und **151a,b** (2*R*,3*R* bzw. 2*S*,3*R*) bei oxidativer Abspaltung mit feuchter DMDO-Lösung.

Zur endgültigen Identifizierung und Quantifizierung der als Nebenprodukt entstandenen Epimere wurde chirale GC- und GC-MS-Analytik eingesetzt. Obwohl die Aminosäure-Analytik von derivatisierten Totalhydrolysaten an chiralen GC-Phasen eine Standardtechnik der Peptidchemie und Naturstoffaufklärung ist, liegt die besondere Schwierigkeit im vorliegenden Fall in der Tatsache, dass es sich bei dem zu untersuchenden Fragment nicht um ein Derivat einer α -Amino-, sondern einer α -Hydroxy- β -aminosäure handelt. Für solche Spezies ist sowohl das Verhalten bei der Hydrolyse und Derivatisierung als auch die für eine Trennung einzusetzende chirale Phase weitestgehend unbekannt, so dass zunächst diese Punkte optimiert werden müssen. Um dies zu erleichtern wurde ausgenutzt, dass drei der vier diastereomeren Fmoc-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuren (**152a,b,c**) als Referenzsubstanzen aus kommerzieller Quelle zur Verfügung standen.

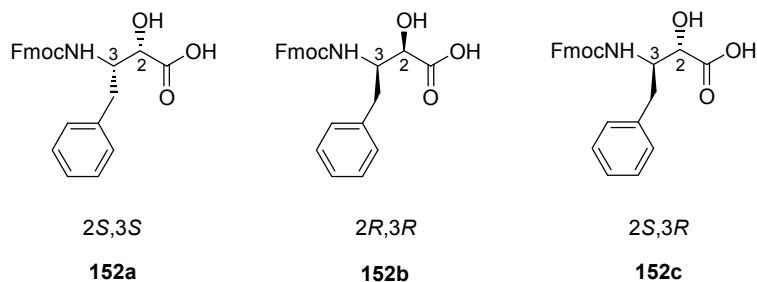


Abb. 3-53: Als Referenzsubstanzen für chirale GC-Untersuchungen verwendete, kommerziell erhältliche Fmoc-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuren.

Nach Fmoc-Abspaltung, Umsetzung mit HCl/EtOH zum Ethylester und Trifluoracetylierung der Amino- und Hydroxy-Gruppe wurden Chromatogramme der Referenzsubstanzen an chiralen Kapillarsäulen aufgenommen, wobei insbesondere die Möglichkeit zur Trennung der derivatisierten Enantiomere **152a** und **152b** betrachtet wurde. Während an einer Lipodex E-Säule nur eine Trennung der Diastereomere, nicht aber des Enantiomerenpaares möglich war, gelang mit einer Chiralsil-Val-Säule eine vollständige Trennung. Die Verbindungen wurden zusätzlich über eine GC-EI-MS-Kopplung identifiziert.

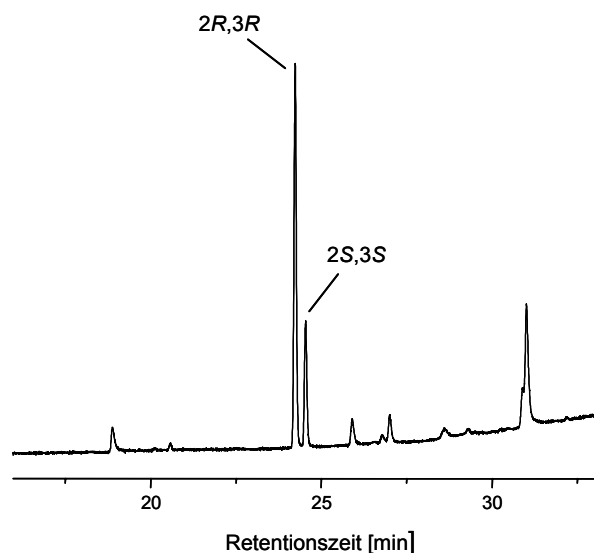


Abb. 3-54: Ausschnitt aus dem GC-Chromatogramm einer Mischung der derivatisierten, enantiomeren Fmoc-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuren **152a** (2S,3S) und **152b** (2R,3R) an Chirasil-Val.

Entsprechend wurden die α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** und **149a,b** der Totalhydrolyse unterzogen, derivatisiert und die Anteile der verschiedenen diastereomeren 3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuren bestimmt. Dabei konnten die beiden unerwünschten Epimere in einem Anteil von 20-25 % eindeutig nachgewiesen werden.

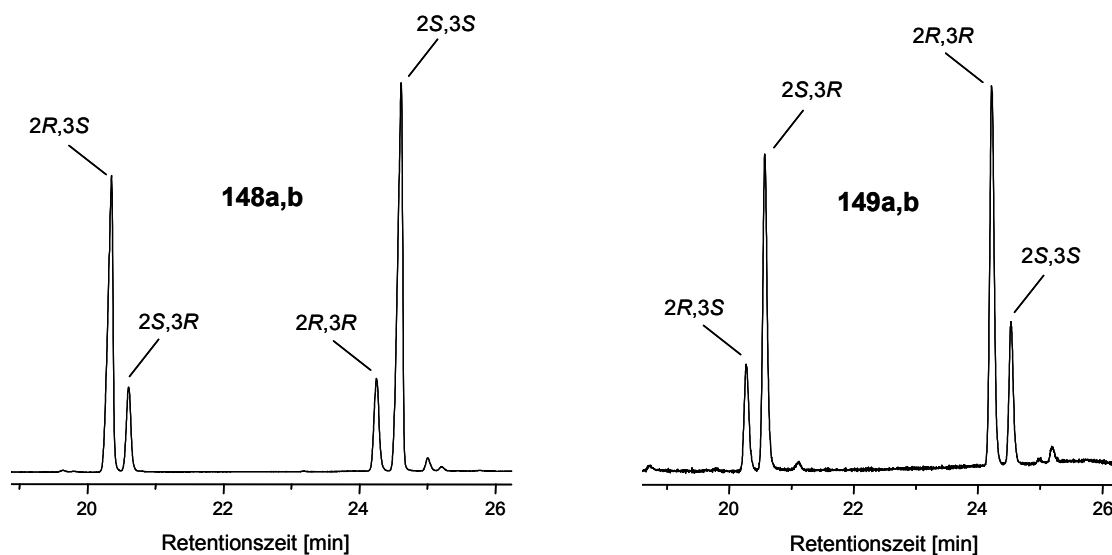


Abb. 3-55: Nachweis unerwünschter Epimere durch chirale GC-Analyse des derivatisierten Totalhydrolysats der synthetisierten α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** bzw. **149a,b** (Ausschnitte aus den GC-Chromatogrammen, Flammenionisationsdetektor).

Da die Ursache für das Auftreten der unerwünschten Nebenprodukte zunächst in der Durchführung der oxidativen Abspaltung und Reduktion vermutet wurde, wurde versucht, durch schnelles Arbeiten, direkte Reduktion und Vermeidung eines Erwärmens während

der Evaporation eine günstige Beeinflussung zu erreichen. Da alle Maßnahmen jedoch keine Verbesserung brachten, wurde auch der Acylierungsschritt des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans durch die Aktivierung von Fmoc-Phenylalanin mit EDC/DMAP in die Untersuchungen eingeschlossen.

3.6.3 Racemisierungsfreie Acylierung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes

Im Gegensatz zu den in der Lösungssynthese dokumentierten Acylierungen von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran, bei denen in den meisten Fällen 10 mol% DMAP eingesetzt werden, wurden für die Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans bis zu diesem Zeitpunkt 15 mol% verwendet. Da die Menge des verwendeten DMAP das Ausmaß der zu beobachtenden Racemisierung im Acylierungsschritt mit großer Wahrscheinlichkeit negativ beeinflusst, wurde versucht, die DMAP-Menge herabzusetzen. Tatsächlich zeigte sich, dass sich DMAP problemlos von 15 mol% (Tab. 3-8, Pos. 1) auf 5 mol% (Pos. 3) ohne merklichen Abfall der Umsetzung reduzieren lässt. Erst bei 2 mol% (Pos. 4) lässt die Kupplungsausbeute deutlich nach und erreicht ohne DMAP-Katalyse nur noch 47 % (Pos. 5). Jedoch verdeutlichte die Aufnahme eines HPLC-Chromatogramms nach oxidativer Abspaltung und Reduktion zum α -Hydroxy-TMSE-ester, dass selbst bei Durchführung mit nur 2 mol% DMAP Epimere weiterhin entstehen.

Tab. 3-8: Auswirkung der Herabsetzung der eingesetzten Menge DMAP auf die Kupplungsausbeute bei der Acylierung von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz mit Fmoc-Phe-OH.

Position	Kupplungsbedingungen ^[a]	Kupplungsausbeute ^[b]
1	5 eq. EDC, 0.75 eq. DMAP	87 %
2	5 eq. EDC, 0.375 eq. DMAP	86 %
3	5 eq. EDC, 0.25 eq. DMAP	79 %
4	5 eq. EDC, 0.1 eq. DMAP	62 %
5	5 eq. EDC	47 %

^[a] jeweils mit 5 eq. Fmoc-Phe-OH in DCM bei RT für 12 h; ^[b] unter näherungsweise quantitativer Umsetzung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran und exakter Beladungsangabe des Triphenylphosphin-Harzes durch den Hersteller.

Weitere Betrachtungen bezüglich der notwendigen Kupplungsdauer führten zum Ergebnis, dass die maximale Kupplungsausbeute bereits nach einer Stunde erreicht wird. Durch eine Verkürzung der Reaktionszeit konnte allerdings der Anteil der Epimere nicht gesenkt werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde geschlossen, dass sich eine racemisierungsärmere Acylierung nur durch eine Abkehr von der Aktivierung mit EDC/DMAP erreichen lässt. Unter Berücksichtigung der bereits früher durchgeführten Variationen zur Erreichung hoher Acylierungsausbeuten (vgl. Tab. 3-1) wurden deshalb andere Kupplungsreagenzien getestet, über deren Verwendung im Kontext einer Acylierung von Phosphoranen noch nie berichtet wurde.

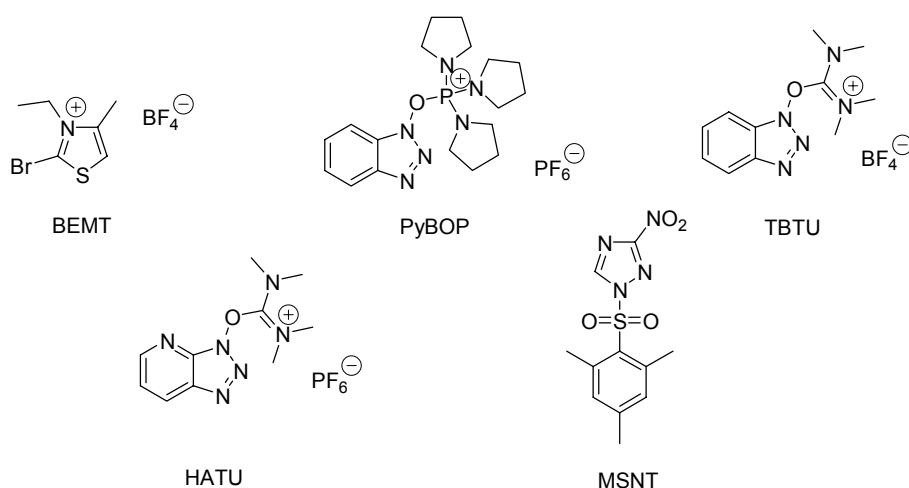


Abb. 3-56: Zur Acylierung von (Cyanmethyl)phosphoran-Harz getestete Kupplungsreagenzien aus der Peptidsynthese.

Erfreulicherweise zeigten außer der Aktivierung mit BEMT/DIEA^[277,278] (Tab. 3-9, Pos. 1) alle Reaktionsansätze gute bis sehr gute Umsetzungen, wobei besonders die Aktivierungen mit HATU/DIEA (Pos. 4) und MSNT/1-Methylimidazol (Pos. 5) hervorzuheben sind.

Tab. 3-9: Kupplungsausbeuten bei der Acylierung von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz unter verschiedenen Kupplungsbedingungen mit bekannten Kupplungsreagenzien aus der Peptidsynthese.

Position	Kupplungsbedingungen ^[a]	Kupplungsausbeute ^[b]
1	5 eq. BEMT, 7 eq. DIEA in DCM	20 %
2	4.9 eq. PyBOP, 10 eq. DIEA in DMF	54 %
3	4.9 eq. TBTU, 10 eq. DIEA in DMF	59 %
4	5 eq. HATU, 10 eq. DIEA in DCM/DMF (1:1)	74 %
5	5 eq. MSNT, 5 eq. 1-Methylimidazol in DCM	87 %

^[a] jeweils mit 5 eq. Fmoc-Phe-OH bei RT für 12 h; ^[b] unter näherungsweise quantitativer Umsetzung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran und exakter Beladungsangabe des Triphenylphosphin-Harzes durch den Hersteller.

Das Reagenz MSNT, welches ursprünglich aus der Nucleosid- und Nucleotidsynthese stammt und zur Phosphorylierung von Hydroxy-Gruppen verwendet wird^[279-281], erschien zusammen mit der Base 1-Methylimidazol besonders interessant, weil diese Kombination in der Festphasen-Synthese bereits zur Durchführung von Veresterungen eingesetzt wird. Untersuchungen von FRANK et al. zeigten, dass sich Veresterungen mit besonders racemierungsanfälligen Aminosäuren dabei unter weitestgehendem Konfigurationserhalt und kurzer Reaktionszeit durchführen lassen^[282]. Eigene Versuche zur Ermittlung der optimalen Reaktionsdauer ergaben, dass die maximale Kupplungsausbeute nach ca. 45 Minuten erreicht ist, weswegen alle folgenden Acylierungen mit zweimal je 2,5 Äquivalenten Fmoc-Aminosäure/MSNT/1-Methylimidazol in Doppelkupplungen von jeweils 45 Minuten Dauer durchgeführt wurden.

Zur Untersuchung der stereochemischen Auswirkungen wurde die veränderte Form der Aktivierung bei der Synthese des polymeren Peptidyl- α -ketophosphorans **146** für die erste Aminosäure verwendet. Nach oxidativer Abspaltung und Reduktion machte bereits ein HPLC-Chromatogramm der erhaltenen Modellverbindung **148a,b** (Abb. 3-57) eine Verbesserung deutlich (vgl. Abb. 3-50).

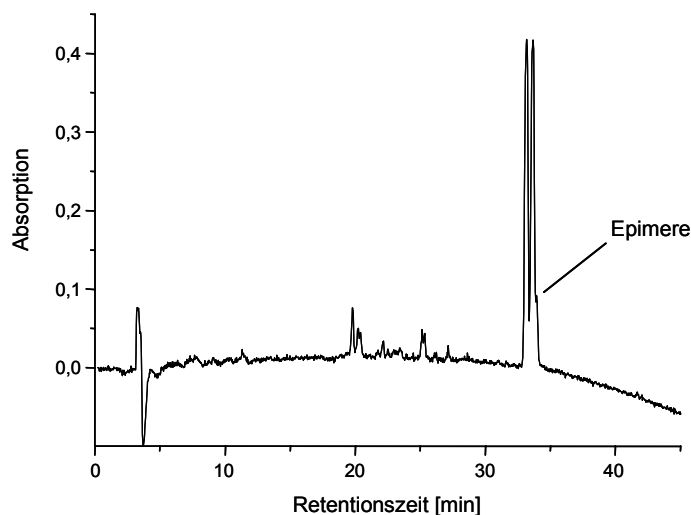


Abb. 3-57: HPLC-Chromatogramm der diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-ester (2R,3S bzw. 2S,3S) nach Durchführung der Acylierung mit MSNT/1-Methylimidazol.

Eine erneute quantitative Betrachtung durch GC an Chirasil-Val bestätigte den zuerst gewonnenen Eindruck. Die Verminderung des Epimer-Anteils auf nur noch ca. 3 % beweist, dass die Ursache für das Auftreten unerwünschter Diastereomere nicht in der Instabilität des α -Keto-Zwischenproduktes, sondern in einer Racemisierung während der Acylierung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes zu suchen ist.

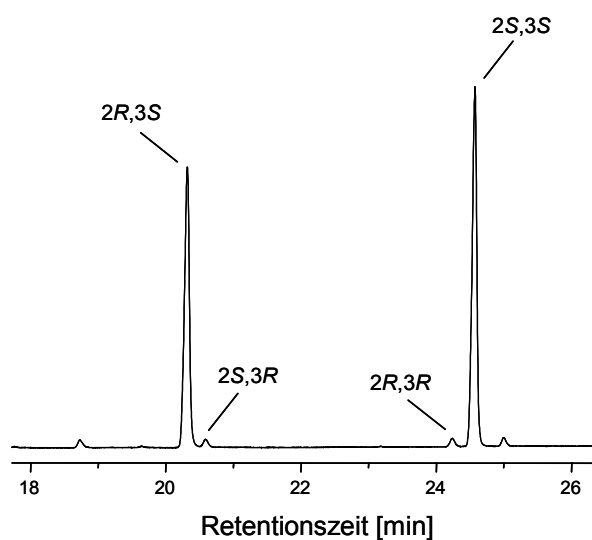


Abb. 3-58: Verminderung des Epimer-Anteils durch Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans mit MSNT/1-Methylimidazol auf ca. 3 %; Quantifizierung durch chirale GC-Analyse des derivatisierten Totalhydrolysats der erhaltenen α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** (Ausschnitt aus dem GC-Chromatogramm, Flammenionisationsdetektor).

Die erzielte, signifikante Verbesserung bildete den Ausgangspunkt für Versuche einer weiteren Optimierung. Aus den Arbeiten von FRANK et al. ist bekannt, dass bei Veresterungen eine größere Menge Base die Kupplungsausbeute positiv, das Ausmaß der

Racemisierung jedoch negativ beeinflusst, weshalb ein Verhältnis von Fmoc-Aminosäure, MSNT und 1-Methylimidazol von 1:1:0,75 vorgeschlagen wird.

In diesem Sinne wurde versucht, weniger 1-Methylimidazol zu verwenden, was allerdings einen starken Rückgang der Umsetzung zur Folge hatte (Tab. 3-10, Pos. 2). Mit nur geringer Herabsetzung der absoluten Basenmenge auf 2,4 Äquivalente wurden weiterhin DIEA, Pyridin und 2,6-Lutidin als alternative Basen getestet (Pos. 3, 4 und 5), wobei jedoch nur DIEA und 2,6-Lutidin zu hohen Ausbeuten führten. Abschließend wurde noch die Möglichkeit zur Verwendung von DMF als Lösungsmittel im Falle von eventuell auftretenden Löslichkeitsproblemen evaluiert (Pos. 6 und 7).

Tab. 3-10: Variation der Basen-Äquivalente, Base und Lösungsmittel zur weiteren Optimierung der Acylierung mit MSNT.

Position	Kupplungsbedingungen ^[a]	Kupplungsausbeute ^[b]
1	2.5 eq. MSNT, 2.5 eq. 1-Methylimidazol	87 %
2	2.5 eq. MSNT, 1.875 eq. 1-Methylimidazol	55 %
3	2.5 eq. MSNT, 2.4 eq. DIEA	88 %
4	2.5 eq. MSNT, 2.4 eq. Pyridin	38 %
5	2.5 eq. MSNT, 2.4 eq. 2,6-Lutidin	81 %
6	2.5 eq. MSNT, 2.5 eq. 1-Methylimidazol ^[c]	85 %
7	2.5 eq. MSNT, 2.5 eq. DIEA ^[c]	88 %

^[a] jeweils mit 2.5 eq. Fmoc-Phe-OH in DCM bei RT, 2 x für jeweils 45 min falls nicht anders vermerkt; ^[b] unter näherungsweise Annahme einer quantitativen Umsetzung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran und exakter Beladungsangabe des Triphenylphosphin-Harzes durch den Hersteller; ^[c] in DMF.

Wiederum wurde Peptidyl- α -ketophosphoran-Harz **146** unter MSNT/DIEA- bzw. MSNT/2,6-Lutidin-Aktivierung synthetisiert, oxidativ gespalten, reduziert und die erhaltenen Produkte mit HPLC und chiraler GC charakterisiert.

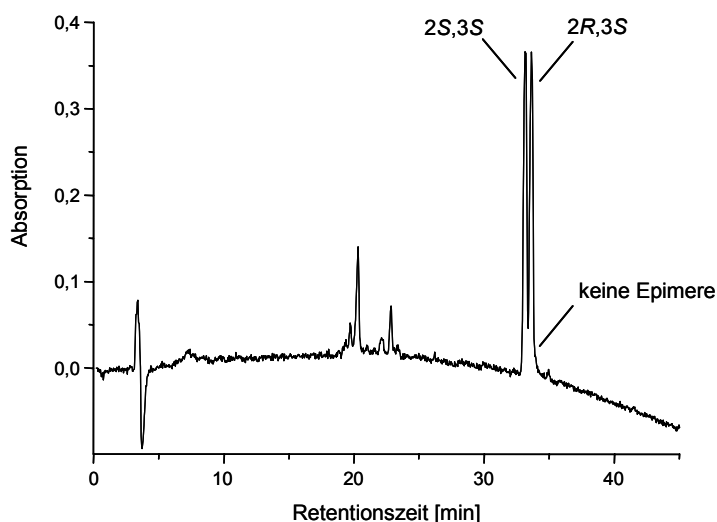


Abb. 3-59: HPLC-Chromatogramm der diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-ester ($2R,3S$ bzw. $2S,3S$) nach Durchführung der Acylierung mit MSNT/2,6-Lutidin.

Das Fehlen einer Schulter im HPLC-Chromatogramm, sowohl bei der Verwendung von DIEA als auch von 2,6-Lutidin, findet seine Bestätigung im Ergebnis der GC-Analyse: Während bei DIEA noch eine Racemisierung von jedoch nur unter 1 % detektiert werden kann, verläuft die Kupplung mit MSNT/2,6-Lutidin völlig racemisierungsfrei.

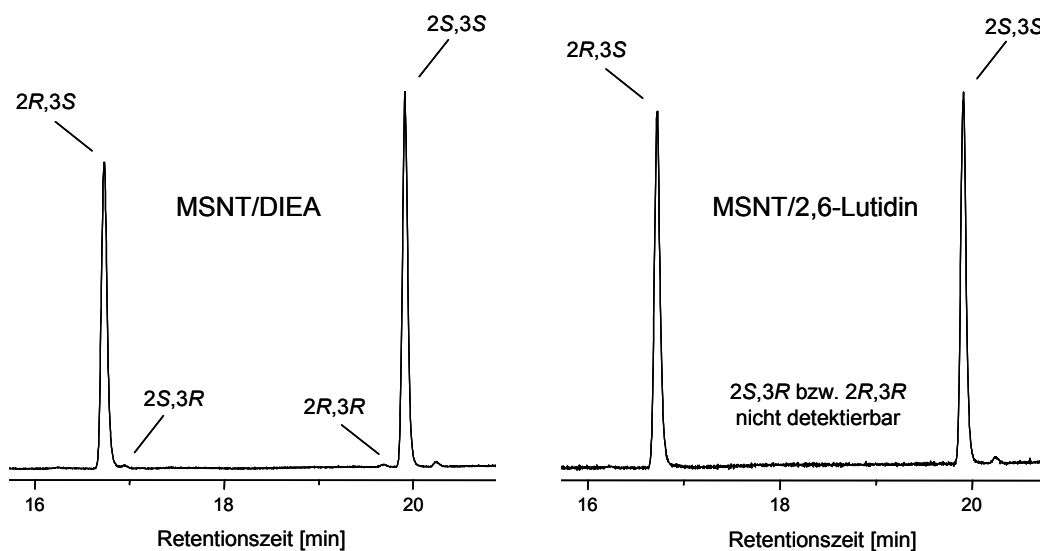


Abb. 3-60: Verminderung des Epimer-Anteils durch Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans mit MSNT/DIEA (< 1 %) bzw. MSNT/2,6-Lutidin (keine Epimere detektierbar); Quantifizierung durch chirale GC-Analyse des derivatisierten Totalhydrolysats der erhaltenen α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** (Ausschnitt aus den GC-Chromatogrammen, Flammenionisationsdetektor).

Durch präparative Trennung der beiden diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** und GC-Analyse konnte dem früher eluierenden Produkt die Konfiguration $2S,3S$ (**148a**), dem später eluierenden Produkt entsprechend $2R,3S$ (**148b**) zugeordnet werden. Außerdem wurden NMR-Spektren der aufgetrennten Diastereomere aufgenommen.

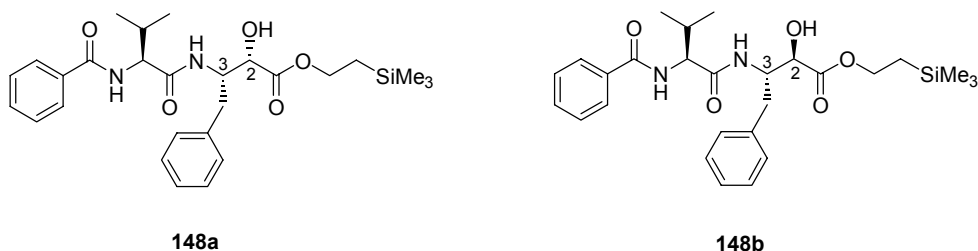


Abb. 3-61: Zuordnung der Konfiguration der diastereomeren α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b**.

Aufgrund des erzielten Resultats wurden als Standardbedingungen für alle weiteren Acylierungen von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz jeweils 2,5 Äquivalente Fmoc-Aminosäure, 2,5 Äquivalente MSNT und 2,4 Äquivalente 2,6-Lutidin in Doppelkupplungen von je 45 Minuten festgelegt. Die etwas geringere Kupplungsausbeute wird dabei durch das günstige stereochemische Verhalten mehr als kompensiert.

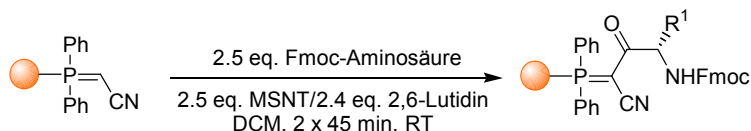


Abb. 3-62: Standardbedingungen der racemisierungsfreien Acylierung von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz mit MSNT/2,6-Lutidin.

Tab. 3-11 fasst noch einmal die einzelnen Stufen der Optimierung hin zur racemisierungsfreien Acylierung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes zusammen.

Tab. 3-11: Zusammenfassung der einzelnen Optimierungsschritte zur Unterdrückung der Racemisierung bei der Acylierung von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz.

Kupplungsbedingungen ^[a]	Ausmaß der Racemisierung ^[b]
5 eq. Fmoc-Phe-OH, 5 eq. EDC, 0.75 eq. DMAP	20 %
2.5 eq. Fmoc-Phe-OH, 2.5 eq. MSNT, 2.5 eq. 1-Methylimidazol ^[c]	2,8 %
2.5 eq. Fmoc-Phe-OH, 2.5 eq. MSNT, 2.4 eq. DIEA ^[c]	0,8 %
2.5 eq. Fmoc-Phe-OH, 2.5 eq. MSNT, 2.4 eq. 2,6-Lutidin ^[c]	nicht detektierbar

^[a] jeweils in DCM bei RT; ^[b] bestimmt durch chirale GC-Analyse an Chirasil-Val; ^[c] Doppelkupplung.

3.6.4 Verseifung von Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethern

Mit der Optimierung der Acylierung, oxidativen Abspaltung und Reduktion zu α -Hydroxy-TMSE-estern sind die wesentlichen Schritte der Synthese, vor allem der Aufbau der isosteren Einheit unter C-C-Verknüpfung, gelungen. Es verblieb somit auf dem Weg zur Modellverbindung **153a,b** nur noch die Umwandlung zum α -Hydroxysäureamid, deren erster Schritt in der Verseifung des α -Hydroxy-TMSE-esters zur α -Hydroxysäure (**154a,b**) besteht.

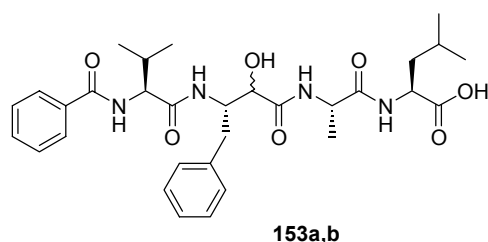


Abb. 3-63: Stammverbindung der geplanten Norstatin-Kollektion und Modellverbindung bei der Optimierung der Reaktionssequenz.

Gängigstes Reagenz zur Entfernung von Trimethylsilylethyl-Schutzgruppen allgemein ist dabei TBAF, welches als TBAF-Trihydrat erhältlich ist. Im konkreten Fall der Verseifung der α -Hydroxy-TMSE-ester **148a,b** wurden in einem Syntheseversuch drei Äquivalente TBAF-Trihydrat in DMF eingesetzt. Die direkte Untersuchung einer aus dem Ansatz gezogenen Probe mittels HPLC zeigte dabei eine vollständige Verseifung innerhalb von zwei Stunden bei RT an, wobei die beiden diastereomeren α -Hydroxysäuren koeluierten (Abb. 3-65).

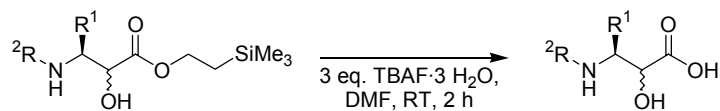


Abb. 3-64: Verseifung der α -Hydroxy-TMSE-ester mit TBAF-Trihydrat.

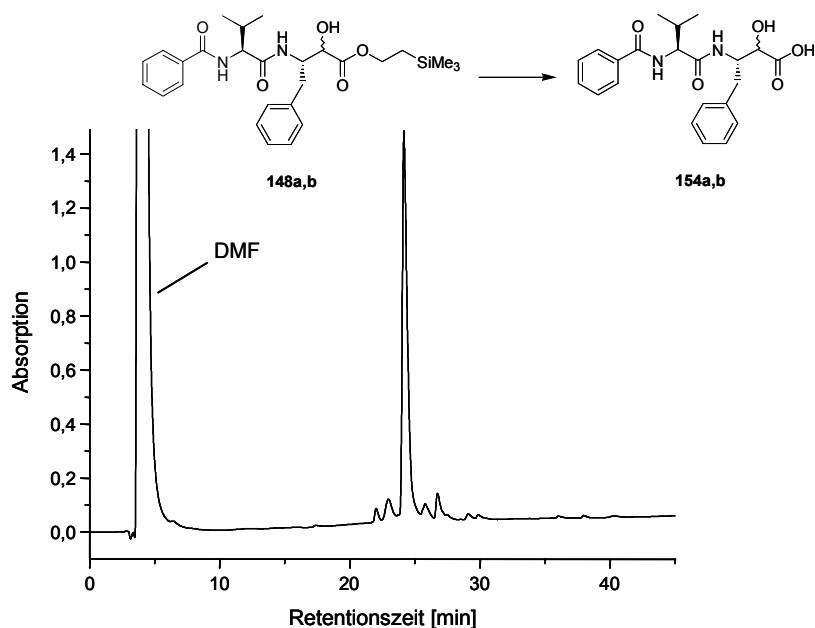


Abb. 3-65: HPLC-Chromatogramm nach Verseifung des α -Hydroxy-TMSE-esters **148a,b** mit TBAF-Trihydrat (direkte Probe aus dem Reaktionsansatz in DMF).

3.6.5 Kupplung von Peptidyl- α -hydroxysäuren auf Peptidyl-TCP-Harz

Die durch die Verseifung mit TBAF-Trihydrat erhaltenen α -Hydroxysäuren wurden nicht isoliert, sondern direkt aktiviert und weiter umgesetzt.

Für die Verwendung N-geschützter α -Hydroxy- β -aminosäuren in Peptidkupplungen sind sowohl in Lösung als auch an der festen Phase^[99,108] unter verschiedensten Bedingungen zahlreiche Beispiele mit Kupplungsreagenzien wie BOP^[100,140], EDC^[65,103,106], DIC oder DCC^[101,102] bekannt. Allen Varianten gemeinsam ist der Verzicht auf eine Schutzgruppe für die α -Hydroxy-Gruppe, welche offensichtlich nur schwer acyliert werden kann.

Da für die Modellverbindung **153a,b** sowie die weiteren geplanten Inhibitor-Strukturen die isostere Einheit in eine ansonsten peptidische Struktur eingebaut, d. h. die α -Hydroxy- β -aminosäure C-terminal durch zwei Aminosäuren verlängert werden sollte, wurde die Einführung dieses Molekülteils durch Kupplung des am Phosphoran-Harz vorsynthetisierten Bausteins auf ein zweites Synthese-Harz beabsichtigt.

Dazu wurde im konkreten Fall TCP-Trityl-Harz nach Angaben des Herstellers mit Fmoc-Leucin beladen und nach Fmoc-Abspaltung mit Fmoc-Alanin zum Polymergebundenen Dipeptid umgesetzt. Für die Aktivierung der α -Hydroxysäure **154a,b** wurde EDC und HOBt gewählt, wobei die Kupplungsreagenzien unmittelbar nach dem Ver-

seifungsschritt dem DMF bei weiterer Anwesenheit von TBAF-Trihydrat zugesetzt wurden. Die erhaltene Lösung wurde daraufhin zum entschützten Ala-Leu-TCP-Harz gegeben, dessen genaue Beladung vorher exakt bestimmt wurde. Die eingesetzte Menge Ala-Leu-TCP-Harz wurde dabei so gewählt, dass die Menge der verwendeten α -Hydroxysäure einem 1,5-fachen Überschuss entspricht. Trotz einer noch unvollständigen Absättigung der freien Amino-Gruppen nach zwölfstündiger Reaktion, welche durch einen positiven KAISER-Test angezeigt wurde, erschien die Kupplungsausbeute ausreichend hoch, weshalb alle weiteren Kupplungen von α -Hydroxysäuren unter den gewählten Bedingungen durchgeführt wurden. Eine dadurch bedingte Verunreinigung durch das Dipeptid Ala-Leu im Endprodukt nach Abspaltung könnte ggf. durch präparative HPLC beseitigt werden.

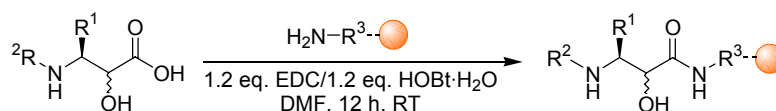


Abb. 3-66: Kupplung des am Phosphoran-Harz synthetisierten Bausteins auf Peptidyl-TCP-Harz.

Es ist anzumerken, dass eine negative Beeinflussung der Peptidkupplung durch das noch aus der Verseifung stammende TBAF-Trihydrat, welches in polaren Lösungsmitteln eine starke Base darstellt, nicht beobachtet wurde. Eine eventuelle Epimerisierung der aktivierten α -Hydroxysäure ist im vorliegenden Fall bedeutungslos, da die eingesetzten α -Hydroxysäuren durch die nicht diastereoselektive Reduktion in α -Position sowieso sowohl in *S*- als auch in *R*-Konfiguration vorliegen.

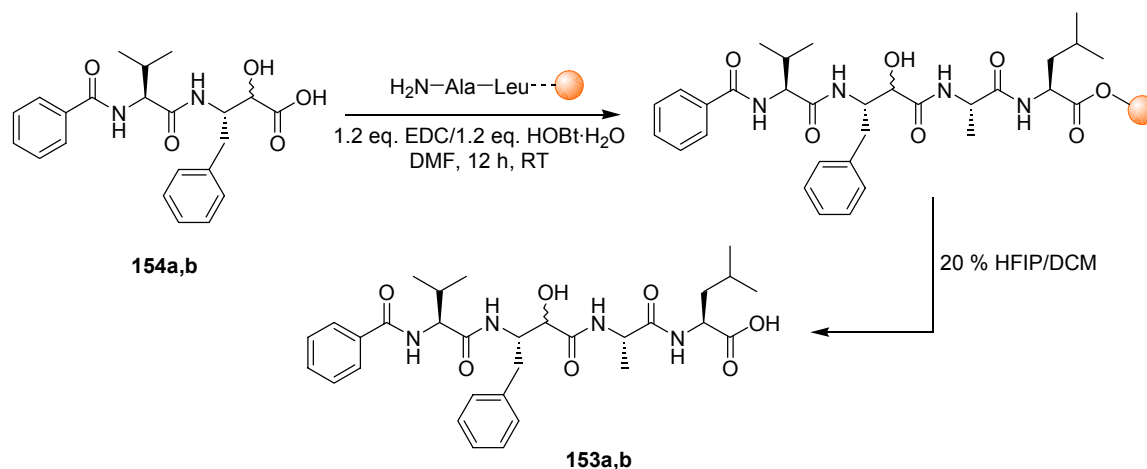


Abb. 3-67: Aktivierung der α -Hydroxysäure, Kupplung auf vorbereitetes Dipeptid-TCP-Harz und Abspaltung des Endproduktes mit 20 % HFIP/DCM am Beispiel der Modellverbindung **153a,b**.

Mit der vorgestellten Reaktionssequenz konnte nach Abspaltung vom TCP-Harz mit 20 % HFIP in DCM die Modellverbindung **153a,b** laut HPLC in einer Reinheit von 91 % erhalten werden, wobei beide Diastereomere bei gleicher Retentionszeit eluieren.

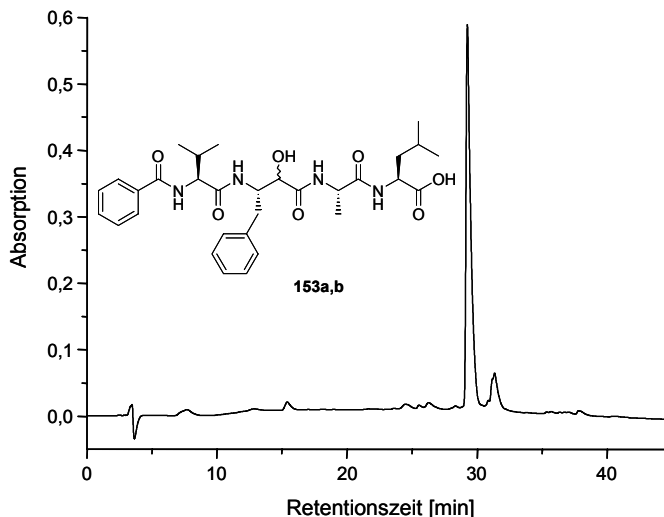


Abb. 3-68: HPLC-Chromatogramm der Modellverbindung **153a,b**: Stammverbindung der zu synthetisierenden Norstatin-Kollektion mit Rest der Aminosäure Phenylalanin in P1.

3.7 Synthese der Norstatin-Verbindungskollektion

Nach erfolgter Optimierung der Reaktionsbedingungen und erfolgreicher Synthese der Modellverbindung **153a,b** konnte die vollständige Umsetzung des mit Hilfe des Molecular Modelling aufgestellten Synthesepfades von insgesamt 17 Norstatinen (vgl. Abb. 3-42) verfolgt werden, wobei die als Zwischenprodukt auftretenden α -Hydroxy-TMSE-ester ebenfalls charakterisiert wurden. Alle Ansätze wurden nach Kupplung der ersten Aminosäure und Entschützung des N-Terminus durch Standard-Fmoc-Peptidsynthese (DIC/HOBt) mit Valin und Benzoesäure verlängert (vgl. Kap. 3.2.4), mit DMDO/ TMSEtOH abgespalten (vgl. Kap. 3.6.1) und reduziert (vgl. Kap. 3.6.2) Als nicht diastereoselektives Reduktionsmittel wurde in allen Fällen Natriumborhydrid benutzt, so dass jeweils zwei Diastereomere erhalten wurden.

3.7.1 Synthese der Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethylester

Die für die Verwirklichung des Synthesepfades durchzuführende Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans mit Fmoc-Aminosäuren (vgl. Abb. 3-69), die bis dahin

noch nicht auf ihre Kupplungseigenschaften hin untersucht worden waren, erbrachte für alle Vertreter Kupplungsausbeuten von 69-88 %. Von den Standardkupplungsbedingungen mit MSNT/2,6-Lutidin wurde dabei nur im Falle von Fmoc-4-nitrophenylalanin (**IH 10a,b-E**) abgewichen. Die bei dieser Aminosäure auftretenden Löslichkeitsprobleme konnten durch die Verwendung von DIEA als Base umgangen werden, wobei vermutlich auch ein Umstieg auf DMF als Lösungsmittel Abhilfe geschaffen hätte. Reinheit und Identität aller Reaktionsprodukte wurde durch HPLC bzw. LC-MS überprüft, wobei für die Diastereomeren ein Verhältnis im Bereich von 3:2 bzw. 2:3 bestimmt werden konnte. Im Falle der mit **148a,b** identischen Verbindung **IH 1a,b-E** eluiert das Produkt mit 2*S*-Konfiguration bei kürzerer Retentionszeit als das entsprechende 2*R*-Produkt. Ein vergleichbares Verhalten aller anderen Vertreter ist denkbar, jedoch nicht sicher, so dass eine Zuordnung der Konfiguration über das Elutionsverhalten spekulativ bleibt. Das angegebene Diastereomerenverhältnis bezieht sich deshalb nur auf die Relation zwischen erst- und zweiteluierendem Produkt.

Eine Besonderheit stellt der Einbau der Indolyl-Seitenkette des Tryptophans als P1-Rest dar. Die Synthese führte in diesem Fall zu α -Hydroxy-TMSE-estern mit nur geringer Reinheit. Die bekannte Oxidationsempfindlichkeit der C-C-Doppelbindung im Indolyl-Fünfring der Tryptophan-Seitenkette konnte in einer Testreaktion demonstriert werden. Dabei zeigte Fmoc-Tryptophan durch Zugabe von DMDO-Lösung eine Umsetzung zu mehreren unspezifischen Produkten. Durch Herabsetzung der Menge eingesetzter DMDO-Lösung in eine stöchiometrische Größenordnung und langsames Zutropfen konnte jedoch auch der Ester **IH 12a,b-E** in ca. 30 % Reinheit bei allerdings geringerer Abspaltungsausbeute erhalten werden. Es wurde deshalb bei diesem Beispiel ein größerer Reaktionsansatz notwendig und der Ester vor der weiteren Umsetzung mit präparativer HPLC aufgereinigt. Weitere erfolgreiche Versuche an einer Modellverbindung mit His(Trt)-Seitenkette zeigten, dass Stickstoff-Heterocyclen nicht grundsätzlich problematisch sein müssen.

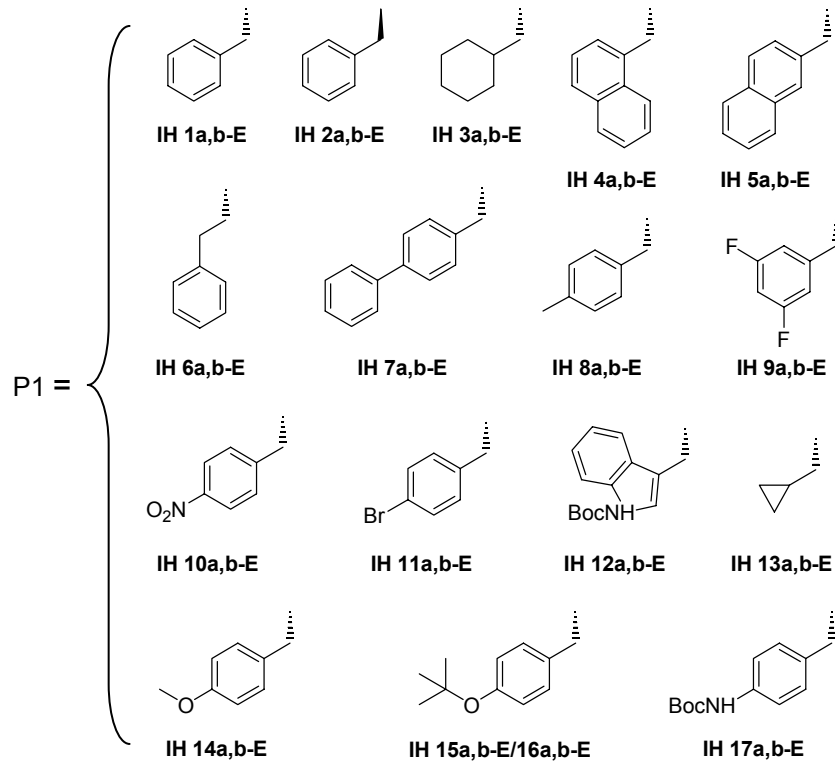
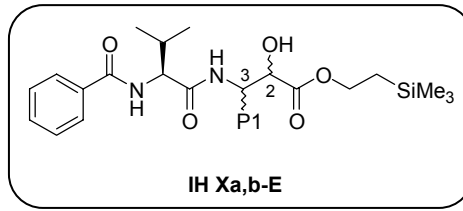


Abb. 3-69: P1-Reste einer Kollektion von Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-estern als Zwischenprodukte der Norstatin-Synthese.

Tab. 3-12: Ausbeuten und analytische Daten bei der Synthese von Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-estern.

Bezeichnung	P1 ^[a]	Ausbeute Acylierung ^[b]	Ausbeute Ester ^[c]	Reinheit / d.r. ^[d]
IH 1a,b-E	Phe (148a,b)	80 %	70 % (84,3 mg)	87 % / 49:51
IH 2a,b-E	D-Phe	83 %	71 % (88,4 mg)	78 % / n.b. ^[e]
IH 3a,b-E	Cha	71 %	72 % (77,9 mg)	83 % / 54:46
IH 4a,b-E	NaI(1)	79 %	72 % (93,6 mg)	75 % / 64:36
IH 5a,b-E	NaI(2)	79 %	67 % (87,5 mg)	88 % / 48:52
IH 6a,b-E	Homo-Phe	79 %	72 % (88,2 mg)	73 % / 54:46
IH 7a,b-E	4-Phenyl-Phe	77 %	72 % (96,3 mg)	94 % / 48:52
IH 8a,b-E	4-Methyl-Phe	79 %	78 % (95,6 mg)	90 % / 49:51
IH 9a,b-E	3,5-Difluor-Phe	74 %	54 % (63,5 mg)	78 % / 46:54
IH 10a,b-E	4-Nitro-Phe	88 % ^[f]	67 % (95,8 mg)	84 % / 46:54
IH 11a,b-E	4-Brom-Phe	69 %	69 % (82,3 mg)	87 % / 48:52
IH 12a,b-E	Trp(Boc)	70 %	^[g]	~30 % / 55:45
IH 13a,b-E	Cpa	75 %	77 % (80,5 mg)	77 % / 60:40
IH 14a,b-E	Tyr(Me)	79 %	72 % (90,7 mg)	89 % / 50:50
IH 15a,b-E/ IH 16a,b-E	Tyr(tBu) ^[h]	87 %	71 % (106,2 mg)	89 % / 48:52
IH 17a,b-E	4-Boc-Amino-Phe	75 %	63 % (86,8 mg)	85 % / 55:45

^[a] Seitenkette der entsprechenden Aminosäure ^[b] jeweils mit 2.5 eq. Fmoc-Aminosäure, 2.5 eq. MSNT und 2.4 eq. 2,6-Lutidin in DCM bei RT, 2 x 45 min falls nicht anders vermerkt, unter näherungsweise Annahme einer quantitativen Umsetzung zum polymeren (Cyanmethylen)phosphoran und exakter Beladungsangabe des Triphenylphosphin-Harzes durch den Hersteller; ^[c] Ausbeute bezogen auf die Beladung mit der ersten Aminosäure durch Acylierung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes (vgl. Spalte 3) ^[d] HPLC 214 nm, Verhältnis von erst- zu zweiteluierendem Produkt; ^[e] d.r. wegen Koelution nicht bestimmbar; ^[f] Base DIEA; ^[g] nicht bestimmt, vgl. Text; ^[h] Zwischenprodukt für zwei Norstatine mit Tyr(tBu)- und Tyr-Rest.

3.7.2 Erweiterte Untersuchung auf Erhalt der Konfiguration

Die in Kap. 3.6.3 vorgestellte Optimierung der Acylierung hin zu einer racemisierungsfreien Durchführung unter Konfigurationserhalt an C3 wurde am Beispiel der Kupplung von Fmoc-Phenylalanin am Zwischenprodukt **148a,b (IH 1a,b-E)** gezeigt. Die dabei ermittelten Reaktionsbedingungen wurden auf alle weiteren Fmoc-Aminosäuren in der Hoffnung auf ähnlich günstige Kupplungseigenschaften übertragen. Um dies zu überprüfen, wurden aus dem Pool der synthetisierten α -Hydroxy-TMSE-ester **IH Xa,b-E** als Stichprobe drei Vertreter (**IH 3a,b-E**, **IH 7a,b-E**, **IH 9a,b-E**) mit aliphatischem P1-Rest bzw. ziehenden und schiebenden Substituenten am Phenyl-Ring ausgewählt und mit chiraler GC untersucht. Erweitert wurden die Untersuchungen auch auf einen in anderem Zusammenhang synthetisierten Ester mit der Seitenkette der Asparaginsäure in P1 (vgl. Kap. 3.9.2). Auch Asparaginsäure wird zu den racemisierungsanfälligeren Aminosäuren gezählt.

Die GC-Untersuchungen sind in allen diesen Fällen aufwändiger, da im Gegensatz zu den früheren Beispielen keine α -Hydroxy- β -amino-Bausteine zur möglichen Derivatisierung und Verwendung als Referenz zur Verfügung standen. Vor allem lässt sich dadurch nicht genau im Voraus ermitteln, ob und unter welchen Bedingungen sich eventuell zu erwartende Enantiomerenpaare überhaupt trennen lassen. Aus diesem Grund wurde als Trennmateriale wiederum die Chirasil-Val-Kapillarsäule unter vergleichbaren Parametern verwendet und eine Identifizierung durch GC-EI-MS-Kopplung angestrebt. Untersucht wurden neben den mit MSNT/2,6-Lutidin synthetisierten Proben auch ältere Proben, so vorhanden, welche noch mit EDC/DMAP umgesetzt worden waren. Anhand der darin mit großer Wahrscheinlichkeit enthaltenen Epimere lässt sich die Trennleistung der Säule auch ohne sonstige Referenzsubstanzen überprüfen.

Alle unter den als optimal bestimmten Bedingungen hergestellten Verbindungen zeigen im GC-Chromatogramm jeweils zwei weit aufgetrennte und mit EI-MS identifizierte Diastereomere entsprechend 2*R*,3*S*- bzw. 2*S*,3*S*-Konfiguration, die Enantiomere dazu wurden nicht gefunden.

Am Beispiel der Verbindung **IH 9a,b-E** lässt sich der Vergleich mit einer unter EDC/DMAP-Aktivierung durch Fmoc-3,5-difluor-phenylalanin eingeführten Seitenkette P1 besonders deutlich darstellen (Abb. 3-70). Hier zeigt das GC-Chromatogramm vier

Peaks, die jeweils ein identisches Massenspektrum mit charakteristischen Fragmenten zeigen und damit vier Diastereomeren entsprechen.

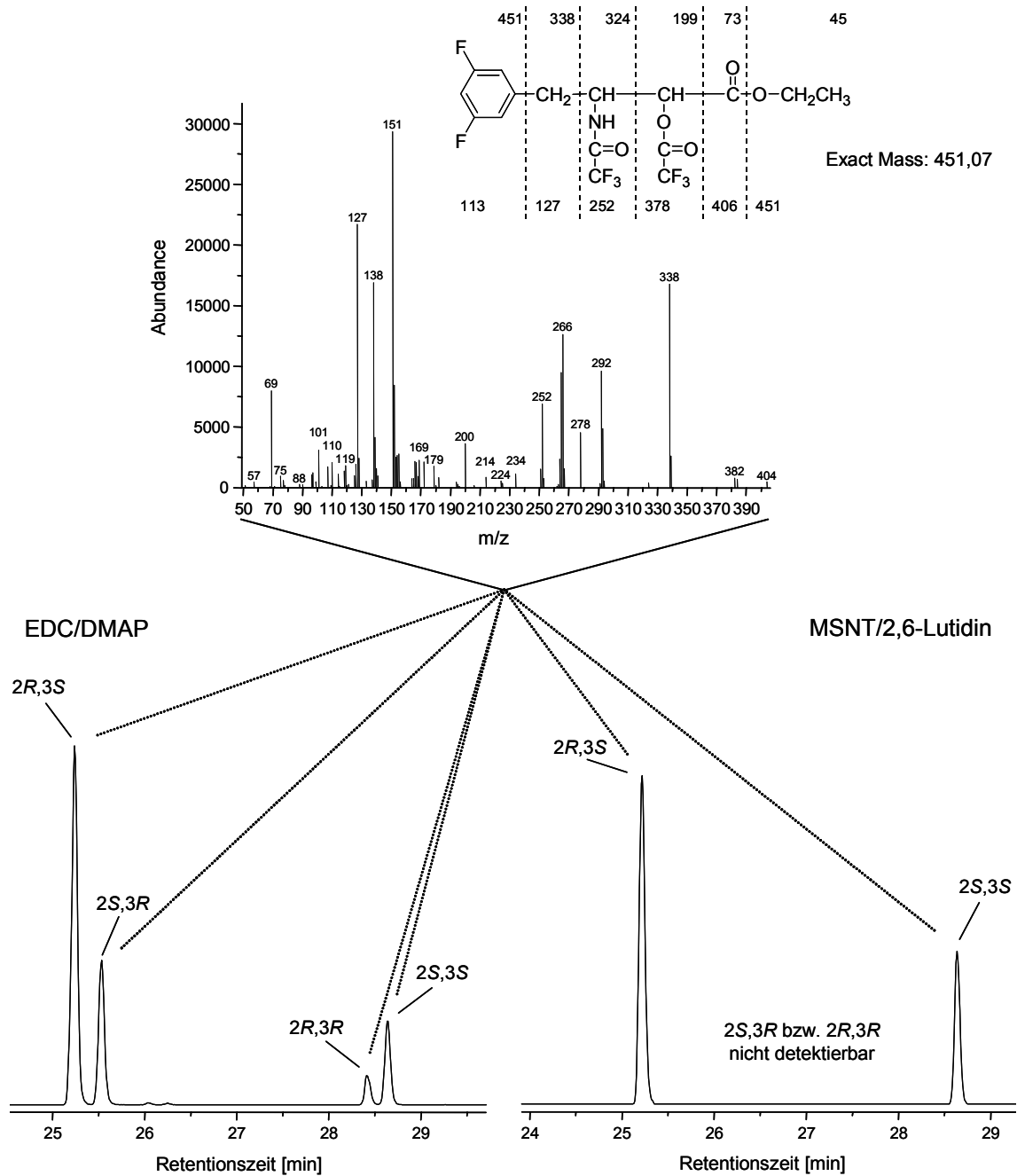


Abb. 3-70: Chirale GC-EI-MS-Untersuchungen an Verbindung **IH 9a,b-E** nach Totalhydrolyse und Derivatisierung: Vergleich der Racemisierung bei der Acylierung des polymeren (Cyanmethylen)phosphorans mit EDC/DMAP (links) bzw. MSNT/2,6-Lutidin (rechts, keine Racemisierung detektierbar); Identifizierung der Diastereomere durch Vergleich der EI-MS-Spektren (Ausschnitt aus den GC-Chromatogrammen, Totalionenstrom TIC).

3.7.3 Synthese der Norstatin-Zielverbindungen

In völliger Analogie zum Vorgehen bei der mit **IH 1a,b** identischen Modellverbindung **153a,b** wurden alle erhaltenen α -Hydroxy-TMSE-ester **IH Xa,b-E** mit TBAF-Trihydrat verseift, mit EDC/HOBt-Aktivierung in 1,5-fachem Überschuss auf ein vorsynthetisiertes, entschütztes Ala-Leu-TCP-Harz gekuppelt und schließlich mit 20 % HFIP/DCM abgespalten. Norstatine mit säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen in P1 wurden zusätzlich mit 95 % TFA/5 % H₂O behandelt. Alle erhaltenen Rohprodukte **IH Xa,b** wurden in guten Ausbeuten und sehr guten Reinheiten (HPLC) erhalten und über LC-MS identifiziert. Bei der Berechnung der Ausbeute, die sich wie beim α -Hydroxy-TMSE-ester-Zwischenprodukt auf die Beladung des (Cyanmethylen)phosphoran-Harzes mit der ersten Aminosäure durch Acylierung bezieht, wurde weiterhin mit einkalkuliert, dass der Ester in 1,5-fachem Überschuss verwendet wurde und damit ein Drittel auf jeden Fall verloren wird. Als Erklärung für die sehr guten Reinheiten lässt sich anführen, dass durch die Kupplung des Zwischenproduktes praktisch eine Zwischenreinigung erfolgt, indem spezifisch nur Säuren reagieren können und verschiedene unreaktive Verunreinigungen durch Filtration und Waschen entfernt werden.

In den HPLC-Chromatogrammen lässt sich das Vorhandensein von jeweils zwei Diastereomeren nur in den wenigsten Beispielen erkennen. Im Regelfall koeluierten beide Verbindungen oder werden nur in geringem Maße angetrennt, wobei die stärkere Antrennung tendenziell bei den polaren Seitenketten in P1 auftritt. Als einziges Beispiel sind die Diastereomere **IH 17a,b** im Chromatogramm basisliniengetrennt. Aus diesem Grund wurde bei der Aufreinigung der Rohprodukte mittels präparativer HPLC am zur Verfügung stehenden Trennmittel außer für **IH 17a,b** keine Separierung erzielt. Bis auf diese Ausnahme verblieben alle übrigen Norstatine als Diastereomeren-Mischung, welche auch in dieser Form für die biologische Testung verwendet werden sollte. Die bei der präparativen HPLC erzielte, für solche Trennungen recht hohe Wiederfindungsrate von durchschnittlich ca. 50 % der auf die Säule aufgetragenen Substanz bestätigt die hohe Reinheit des Rohproduktes und zeigt gleichzeitig, dass die systematische Verunreinigung durch nicht umgesetztes Dipeptid Ala-Leu ebenfalls nur geringfügig ist.

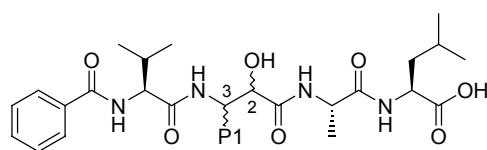
Da durch die häufige Koelution der Diastereomerenpaare eine Angabe des Diastereomerenverhältnisses über HPLC nicht möglich ist, wurde dieses durch Auswertung von ¹H-NMR-Spektren ermittelt. Dabei wurden die für die C2-Konfiguration charakteristischen

Signale der am C2-Kohlenstoff (α -C) der isosteren Einheit gebundenen H-Atome jeweils integriert und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Im gebildeten Quotienten wurde das Integral bei tieferem Feld im Zähler, das bei höherem Feld im Nenner angeordnet. Durch eine Literaturrecherche nach NMR-Daten von α -Hydroxy- β -aminosäuren bzw. entsprechenden Derivaten wurde versucht, die Signale einer Konfiguration zuzuordnen^[186,283-288]. Die gefundenen Literaturbeispiele deuten darauf hin, dass im Falle einer 3*S*-Konfiguration an C3 ein Wasserstoff-Atom am 2*S*-konfigurierten C2-Kohlenstoff eine größere chemische Verschiebung besitzt als an einem 2*R*-Kohlenstoff. Dementsprechend würde das angegebene Diastereomerenverhältnis 2*S*,3*S*:2*R*,3*S* lauten. Inwiefern allerdings von den publizierten Beispielen allgemein auf beliebige Reste an C3 geschlossen werden darf, bleibt unsicher. Anderweitige Betrachtungen oder Versuche wurden zu diesem Thema nicht durchgeführt.

Unklar bleibt, wie die über NMR ermittelten Diastereomerenverhältnisse der Endprodukte **IH Xa,b** mit denjenigen der Zwischenprodukte **IH Xa,b-E** (mittels HPLC bestimmt) korrespondieren bzw. in Bezug zu setzen sind. Eventuell ergibt sich auch während der Umsetzung von **IH Xa,b-E** zu **IH Xa,b** die Möglichkeit zu einer Veränderung des Verhältnisses. So ist möglicherweise die Kupplung einer der beiden diastereomeren α -Hydroxysäuren nach Verseifung mit TBAF-Trihydrat auf das TCP-Harz gegenüber der anderen begünstigt. Außerdem kann sich das Verhältnis durch das Verwerfen unsauberer Fraktionen bei der präparativen Aufreinigung verändern. Eine Betrachtung der in Tab. 3-13 aufgeführten d.r.-Werte zeigt unter der weiter oben gemachten Annahme bezüglich der Konfiguration, dass einheitlich jeweils der Nenner größer, die Mischung also an 2*R*,3*S*-Produkt angereichert ist. Bei der einzigen Ausnahme, Produkt **IH 16a,b**, dürfte es sich um eine Auswirkung der Aufreinigung handeln, da hier tatsächlich beträchtliche Mengen des zweiteluierenden Diastereomeren in unsauberer Fraktionen verworfen wurde.

Von allen synthetisierten Norstatinen **IH X** wurden neben ¹H- auch ¹³C- und mehrdimensionale NMR-Spektren aufgenommen. Abb. 3-71 gibt die interpretierten ¹H-Spektren der beiden getrennten diastereomeren Norstatine **IH 17** wieder.

Tab. 3-13: Ausbeuten und analytische Daten bei der Synthese der Norstatin-Zielverbindungen.



IH X-E

Bezeichnung	P1 ^[a]	Ausbeute Rohprodukt ^[b]	Reinheit ^[c]	isolierte Ausbeute ^[d]	d.r. ^[e]
IH 1a,b	Phe	48 % (45,0 mg)	91 %	21 % (21 mg)	34:66
IH 2a,b	D-Phe	46 % (44,3 mg)	86 %	25 % (24 mg)	30:70
IH 3a,b	Cha	53 % (44,8 mg)	87 %	27 % (23 mg)	48:52
IH 4a,b	Nal(1)	48 % (48,6 mg)	90 %	22 % (22 mg)	43:57
IH 5a,b	Nal(2)	47 % (47,2 mg)	88 %	22 % (22 mg)	34:66
IH 6a,b	Homo-Phe	54 % (51,7 mg)	90 %	26 % (25 mg)	51:49
IH 7a,b	4-Phenyl-Phe	56 % (57,4 mg)	87 %	28 % (29 mg)	42:58
IH 8a,b	4-Methyl-Phe	54 % (51,6 mg)	95 %	27 % (26 mg)	34:66
IH 9a,b	3,5-Difluor-Phe	39 % (35,9 mg)	87 %	18 % (17 mg)	30:70
IH 10a,b	4-Nitro-Phe	42 % (46,7 mg)	84 %	20 % (22 mg)	40:60
IH 11a,b	4-Brom-Phe	50 % (45,5 mg)	74 %	23 % (22 mg)	30:70
IH 12a,b	Trp	35,7 mg	81 %	12 mg	43:57
IH 13a,b	Cpa	60 % (49,6 mg)	90 %	28 % (23 mg)	47:53
IH 14a,b	Tyr(Me)	49 % (47,9 mg)	94 %	25 % (24 mg)	35:65
IH 15a,b	Tyr(tBu)	61 % (70,2 mg)	91 %	32 % (37 mg)	40:60
IH 16a,b	Tyr	51 % (51,7 mg)	90 %	22 % (22 mg)	67:33
IH 17a,b	4-Amino-Phe	42 % (37,4 mg)	80 %	21% (19 mg) ^[f]	42:58 ^[g]

^[a] Seitenkette der entsprechenden Aminosäure ^[b] Ausbeuteberechnung unter Einbeziehung der Beladung mit der ersten Aminosäure durch Acylierung des (Cyanmethyl)phosphoran-Harzes und dem verwendeten 1,5-fachen Überschuss bei der Kupplung auf Ala-Leu-TCP-Harz; ^[c] HPLC 214 nm; ^[d] nach präp. HPLC; ^[e] Verhältnis der Integrale α -CHOH im ¹H-NMR-Spektrum; ^[f] Summe beider getrennten Diastereomere; ^[g] über Auswaage der getrennten Diastereomere und Vergleich der ¹H-NMR-Spektren.

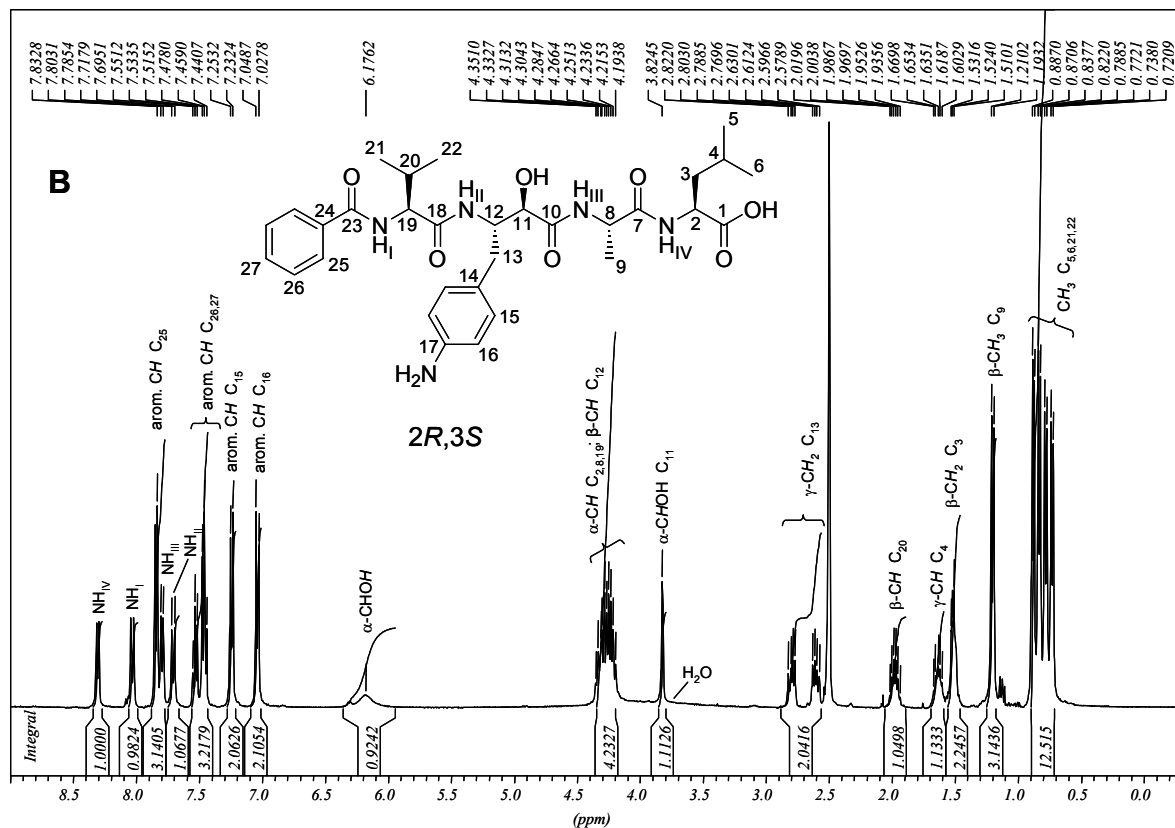
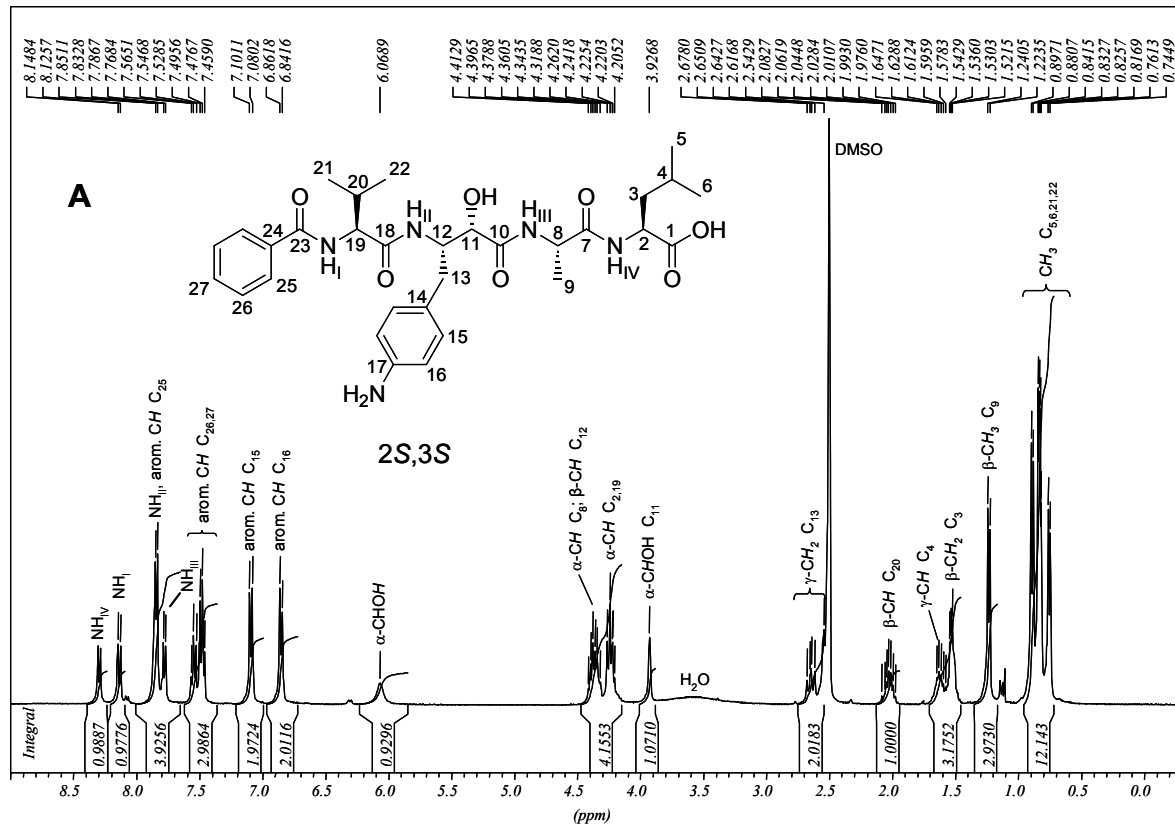


Abb. 3-71: Interpretierte ¹H-NMR-Spektren der beiden diastereomeren Norstatine **17a,b** nach präparativer Trennung: **A** Norstatin mit 2S,3S- bzw. **B** Norstatin mit 2R,3S-Konfiguration der isosteren Einheit.

3.8 Biologische Testung der synthetisierten Norstatin-Kollektion

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe KLEBE, Universität Marburg, wurde die synthetisierte Norstatin-Kollektion gegen Plasmepsin II getestet. Außerdem sollte zum Vergleich ein Screening gegen HIV-Protease und Cathepsin D durchgeführt werden, um eventuelle, über den P1-Rest gegebene Spezifitäten zu untersuchen. Da bei der präparativen Aufreinigung nur in einem Fall eine Diastereomerentrennung erzielt wurde, wurde in allen anderen Fällen jeweils die erhaltene Diastereomeren-Mischung getestet, deren jeweiliges Diastereomerenverhältnis durch die Auswertung von NMR-Spektren bekannt ist (vgl. Tab. 3-13, letzte Spalte). Dies erschwert zum einen die Beurteilung und vor allem den Vergleich der ermittelten IC_{50} -Werte, zum anderen werden die vermutlich unterschiedlichen Inhibitionsanteile der beiden Diastereomere gemeinsam erfasst. Dennoch lässt sich durch diese Vorgehensweise das Potenzial der einzelnen Strukturen abschätzen. Den ermittelten IC_{50} -Werten bzw. -Größenordnungen liegen die Gesamtkonzentrationen, d. h. die Addition beider Diastereomerkonzentrationen, zu Grunde. Damit könnten in Fällen, bei denen nur ein Diastereomer überhaupt Inhibition zeigt die tatsächlichen IC_{50} -Werte etwa bis zur Hälfte niedriger liegen.

3.8.1 Plasmepsin II-Assay

Durch Expression von Proplasmepsin II, Aufreinigung und Aktivierung zu Plasmepsin II standen ausreichende Mengen des Enzyms zur Verfügung. Als Substrat diente mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMCA = 6-[[[(7-Amino-4-methyl-cumarin-3-yl)-acetyl]-amino]-hexansäure markiertes Hämoglobin (AMCA-Häm).

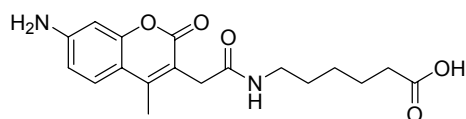


Abb. 3-72: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs AMCA.

Eine unbekannte Anzahl AMCA ist dabei über Amidbindungen an die Amino-Termini der vier Monomere des heterotetrameren Hämoglobins sowie an verschiedene Lysin-Seitenketten gebunden. Es wird vermutet, dass es durch die räumliche Nähe der Häm-Einheiten zur Fluoreszenz-Löschung des Farbstoffes kommt, welche durch die Aktivität der Protease allmählich aufgehoben wird. Die dabei zunehmende Fluoreszenz-Emission in

relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) wird gegen die Zeit gemessen und die IC_{50} -Werte aus den zu berechnenden Anfangssteigungen ermittelt.

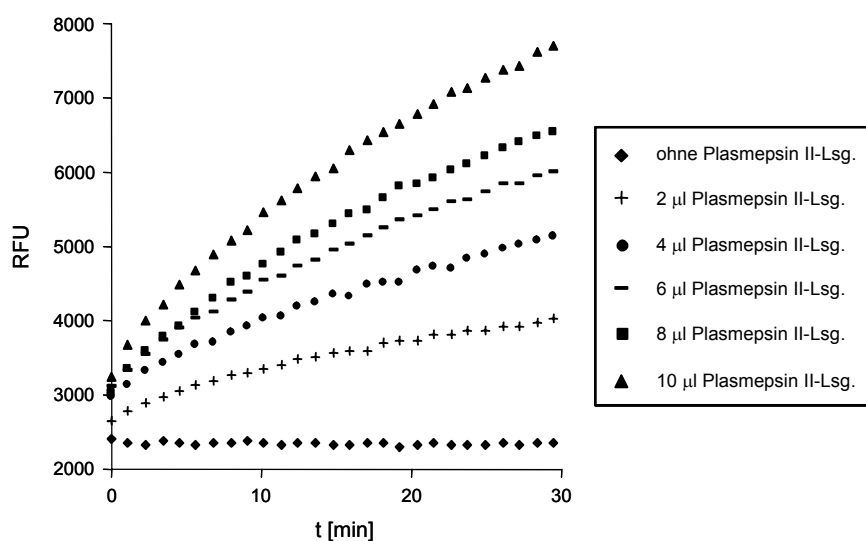


Abb. 3-73: Aktivitätsbestimmung von Plasmeptin II: Zunahme der Fluoreszenz mit der Zeit und Protease-Konzentration

Die bei Fertigstellung der vorliegenden Arbeit noch unvollständigen Messungen, die vorläufig nur eine Abschätzung der IC_{50} -Bereiche erlauben, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Insgesamt weisen die synthetisierten und getesteten Verbindungen trotz ihrer Ähnlichkeit zu Pepstatin A eine geringere inhibitorische Wirkung auf. Dies ist insbesondere auch dann der Fall, wenn als P1-Rest die Seitenkette des Phenylalanins, wie im natürlichen Substrat Hämoglobin, eingebaut wird (**IH 1a,b** bzw. **IH 2a,b**). Klar erkennbar ist, dass – entgegen der Vorhersage durch das Modelling – die Verbindungen mit hydrophilen, polaren Phenyl-Substituenten wie Hydroxy- bzw. Amino-Gruppe zu den schwächsten Inhibitoren gehören (**IH 16a,b** und **IH 17a,b**) und offensichtlich nicht gut für die hydrophobe S1-Tasche geeignet sind. Eine erhoffte Stabilisierung bzw. Favorisierung eines polaren Restes durch die Wechselwirkung mit einer Serin-Seitenkette des Plasmeptins scheint nicht einzutreten. Ebenso sticht weder der Naphthyl- noch Indolyl-Rest als besonders geeignete Leitstruktur hervor.

Drei Inhibitoren heben sich von allen anderen jedoch deutlich ab. Es sind dies die Strukturen mit unpolaren, sterisch anspruchsvolleren Biphenyl- bzw. 4-Brom- und 4-Nitrophenylalanin-Seitenkette (**IH 7a,b**; **IH 11a,b** und **IH 10a,b**).

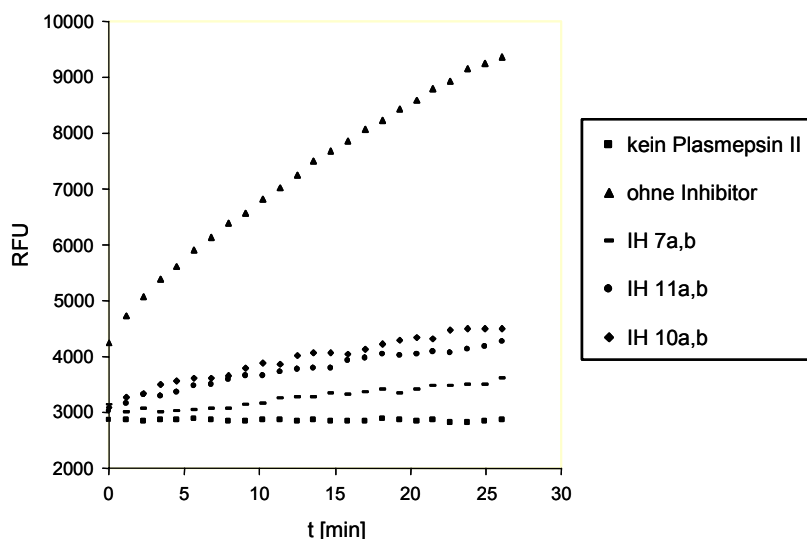


Abb. 3-74: Messung der zeitabhängigen Fluoreszenzänderung bei der ungehemmten Hydrolyse von AMCA-Hämoglobin durch Plasmeprin II sowie bei Zusatz der synthetisierten Norstatine **IH 7a,b**, **IH 10a,b** und **IH 11a,b** (beste Inhibitoren der Verbindungskollektion).

Tab. 3-14: Bestimmte bzw. abgeschätzte IC_{50} -Werte für die Inhibitoren der Norstatin-Kollektion gegen Plasmeprin II.

Inhibitor	IC_{50}	Inhibitor	IC_{50}
IH 1a,b	> 100 μ M	IH 10a,b	~ 15 μ M
IH 2a,b	> 100 μ M	IH 11a,b	~ 15 μ M
IH 3a,b	~ 100 μ M	IH 12a,b	~ 100 μ M
IH 4a,b	~ 100 μ M	IH 13a,b	> 625 μ M
IH 5a,b	~ 100 μ M	IH 14a,b	~ 100 μ M
IH 6a,b	> 100 μ M	IH 15a,b	> 250 μ M
IH 7a,b	~ 5 μ M	IH 16a,b	> 250 μ M
IH 8a,b	< 90 μ M	IH 17a	> 250 μ M
IH 9a,b	~ 100 μ M	IH 17b	> 250 μ M

Als Ergebnis der Messungen wurde der Biphenyl-Rest als potentester P1-Rest identifiziert. Es wurde versucht, dies theoretisch nachzuvollziehen, indem die Struktur **IH 7a,b** in die dem Design der Verbindungskollektion zu Grunde liegende Plasmeprin II-Konformation gedockt wurde. Die dabei erhaltene Anordnung wurde jedoch durch die Scoring-Funktion

ungünstig, der Biphenyl-Rest als zu groß bewertet. Dies ist vermutlich ein weiteres Beispiel dafür, dass das relativ flexible Enzym Plasmepsin II, wie bekannt, je nach Inhibitor-Struktur individuelle Konformationen einnehmen kann. Zurückzuführen ist diese hohe Flexibilität auf einen als Flap-Region bezeichneten Sequenzabschnitt. Kristallstrukturanalysen von Plasmepsin II/Inhibitor-Komplexen zeigen, dass das Enzym, wie z. B. nach Einlagerung von Pepstatin A, die Kavität durch den „Flap“ völlig abdecken oder wie z. B. beim Inhibitor rs370 auch eine weiter geöffnete Anordnung einnehmen kann.

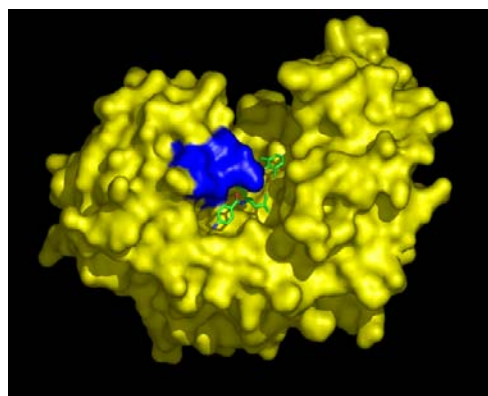
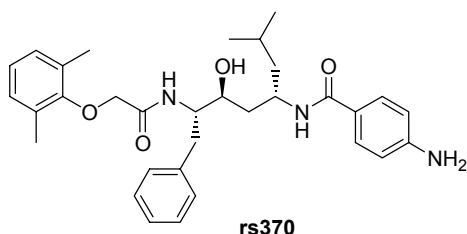
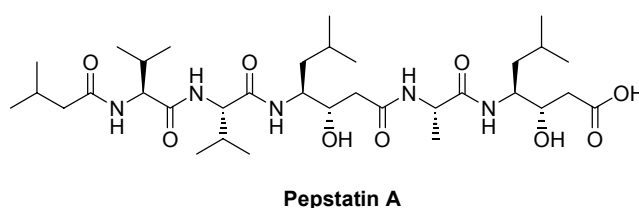
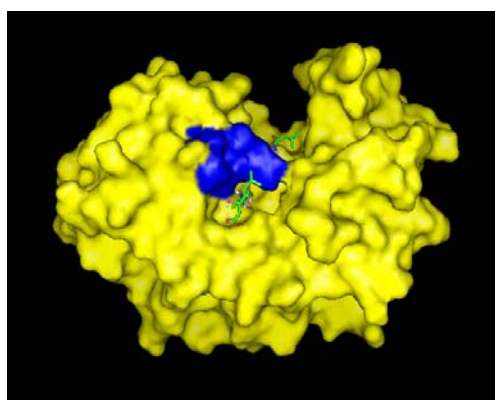


Abb. 3-75: Geschlossene oder weiter geöffnete Anordnung der Flap-Region bei der Komplexbildung von Plasmepsin II mit den Inhibitoren Pepstatin A bzw. rs370.

3.8.2 HIV-Protease-Assay

Auch die Testung eines Teils der Verbindungen **IH Xa,b** gegen HIV-Protease wurde in Kooperation an der Universität Marburg durchgeführt. Als Substrat wurde dabei das Peptid Abz-Thr-Ile-pNph-Phe-Gln-Arg-NH₂ benutzt. Durch Spaltung des Substrates durch HIV-Protease zwischen 4-Nitrophenylalanin und Phenylalanin kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz bei 410 nm. Die aufgenommenen Daten wurden mit dem Programm *GraFit* ausgewertet.

Tab. 3-15: Gemessene und abgeschätzte IC_{50} -Werte für ausgewählte Inhibitoren der Norstatin-Kollektion gegen HIV-Protease.

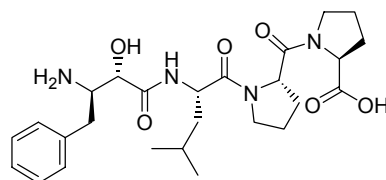
Inhibitor	IC_{50}	Inhibitor	IC_{50}
IH 1a,b	271 μ M	IH 11a,b	15 μ M
IH 2a,b	> 300 μ M	IH 12a,b	> 300 μ M
IH 3a,b	285 μ M	IH 13a,b	128 μ M
IH 5a,b	~ 100 μ M	IH 14a,b	90 μ M
IH 6a,b	> 300 μ M	IH 15a,b	322 μ M
IH 7a,b	14 μ M	IH 16a,b	583 μ M
IH 9a,b	~ 100 μ M	IH 17a/IH 17b	keine Inhibition

3.9 Synthese weiterer Norstatine

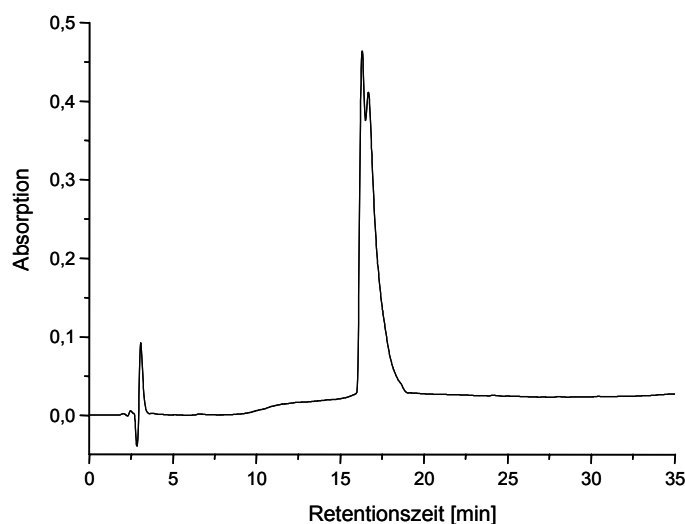
Nach erfolgreicher Synthese der Norstatin-Kollektion sollte die breite Anwendbarkeit der Synthesemethode durch weitere Beispiele demonstriert werden. Es wurden dazu als Zielverbindungen der Naturstoff Probestin und ein potenzieller Norstatin-Inhibitor der Caspase-3, einer Cystein-Protease, mit entsprechender Erkennungssequenz gewählt.

3.9.1 Synthese des Naturstoffs Probestin

Der bereits in Kap. 1.6.2 beschriebene Norstatin-Naturstoff Probestin (**30**) verfügt im Unterschied zu den bisher synthetisierten Strukturen über eine N-terminale isostere α -Hydroxy- β -amino-Einheit. Dies bedeutet, dass bei Anwendung polymerer (Cyanmethylen)phosphorane nur eine Aminosäure, im konkreten Fall Boc-D-Phenylalanin, gekuppelt werden muss, bevor die oxidative Abspaltung und Reduktion zum α -Hydroxy-TMSE-ester erfolgt.

Probestin **30****Abb. 3-76:** Struktur des Norstatin-Naturstoffs Probestin.

Der gemäß der vorgestellten Reaktionssequenz erhaltene α -Hydroxy-TMSE-ester wurde nach Standardmethode verseift, auf ein vorbereitetes Leu-Pro-Pro-TCP-Harz gekuppelt, abgespalten, entschützt und schließlich durch präparative HPLC aufgereinigt. Da die Reduktion nicht diastereoselektiv erfolgte, fiel der Naturstoff mit $2S,3R$ -Konfiguration zusammen mit seinem Diastereomer ($2R,3R$) an (Verhältnis $2S,3R:2R,3R$ 40:60). Beide Verbindungen wurden nicht getrennt. Unter der Annahme einer Acylierungsausbeute von Boc-D-Phenylalanin auf (Cyanmethylen)phosphoran-Harz, die mit der von Fmoc-Phenylalanin vergleichbar ist, beträgt die Ausbeute an gereinigtem Produkt ca. 32 %. Der Vergleich der NMR-Spektren mit publizierten Daten von Probestin bestätigt die Identität der Verbindungen^[267].

**Abb. 3-77:** HPLC-Chromatogramm von Probestin ($2S,3R$, **30**) und Diastereomer ($2R,3R$) nach präparativer Aufreinigung.

3.9.2 Synthese eines Norstatins mit Caspase-3-Erkennungssequenz

Gemäß der in Kap. 1.5.1 vorgestellten, allgemein verbreiteten Theorie zur Inhibition von Proteasen, wonach potenzielle Inhibitoren von Aspartyl- und Metalloproteasen grundsätzlich andersartige Strukturelemente besitzen als die der Serin- und Cysteinproteasen,

sind Inhibitoren mit Norstatin-Isoster für letztere weniger nahe liegend. Vielmehr werden für Serin- und Cysteinproteasen elektrophile Funktionalitäten für reversible oder irreversible, kovalente Wechselwirkungen bevorzugt. Nachteilig wirkt sich bei diesem Konzept die oft fehlende Spezifität und Stabilität (Metabolisierung, Racemisierung etc.) der Strukturen aus. Im Besonderen für Serinproteasen wird deshalb auch die Suche nach nicht-kovalenten Inhibitoren vorangetrieben, während dieser Ansatz für die durch die Thiol-Seitenkette nucleophileren Cysteinproteasen als wenig Erfolg versprechend gilt^[289].

Trotz dieser pessimistischen Vorgaben wurde versucht, eine potenzielle Inhibitor-Struktur mit Norstatin-Isoster zu synthetisieren, um sie eventuell gegen eine Cystein-Protease zu testen. Als Target wurde die im Arbeitskreis vorhandene und in anderem Zusammenhang bearbeitete Cystein-Protease Caspase-3 gewählt. Die Bezeichnung „Caspase“ wird für eine Klasse von Cysteinproteasen verwendet, welche absolute Spezifität für Asparaginsäure im Substrat besitzen (Seitenkette P1 in der Bindungstasche S1), d. h. ihre hydrolytische Aktivität zwischen Asparaginsäure und einer folgenden Aminosäure entfalten. Speziell Caspase-3 wird eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der Apoptose zugeschrieben. Neben der Substrat-Erkennung über einen Aspartyl-Rest in S1 gilt ein weiterer Aspartyl-Rest in S4 als entscheidend, wobei allgemein die Sequenz Asp-Glu-Val-Asp als Erkennungssequenz betrachtet wird. Entsprechend handelt es sich beim Peptidylaldehyd der Sequenz Ac-Asp-Glu-Val-Asp-H um einen äußerst potenten, kovalenten Inhibitor ($K_i = 0,35 \text{ nM}$), dessen Enzym/Ligand-Komplex durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde.

Für das zu synthetisierende Norstatin wurde dementsprechend ebenfalls die Sequenz Asp-Glu-Val-Asp gewählt. In Anlehnung an ein Fluoreszenz-markiertes Peptid, welches im Arbeitskreis für FCS-Messungen als Caspase-3-Substrat synthetisiert und verwendet wurde, wurde die Erkennungssequenz des potenziellen Norstatin-Inhibitors N-terminal um eine acetylierte Glycin-Einheit und C-terminal um die Tripeptid-Einheit Gly-Leu-Ala zur Zielstruktur **155a,b** verlängert^[290].

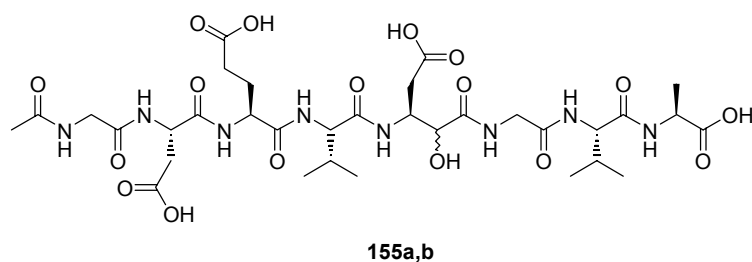


Abb. 3-78: Norstatin-Zielstruktur mit Erkennungssequenz Asp-Glu-Val-Asp (P1-P4) als potenzieller Inhibitor der Cystein-Protease Caspase-3.

Die Synthese des mit der isosteren Einheit beginnenden, linken Molekülteils von **155a,b** gelang unter Anwendung des etablierten Syntheschemas durch Acylierung von (Cyanmethylen)phosphoran-Harz mit Fmoc-Asp(OtBu)-OH (71 % Kupplungsausbeute), Aufbau des acetylierten Pentapeptids am Phosphoran-Linker gemäß Standard-Fmoc-Peptidsynthese, oxidative Abspaltung und Reduktion zum Seitenketten-geschützten Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-ester **156a,b**. Das Zwischenprodukt wurde dabei in 56 % Ausbeute bei einer Reinheit von 88 % erhalten. Beide Diastereomere koeluieren unter den gewählten HPLC-Bedingungen. Chirale GC-MS-Analyse des derivatisierten Totalhydrolysats von **156a,b** zeigte die Anwesenheit von nur zwei Diastereomeren an (vgl. Kap. 3.7.2).

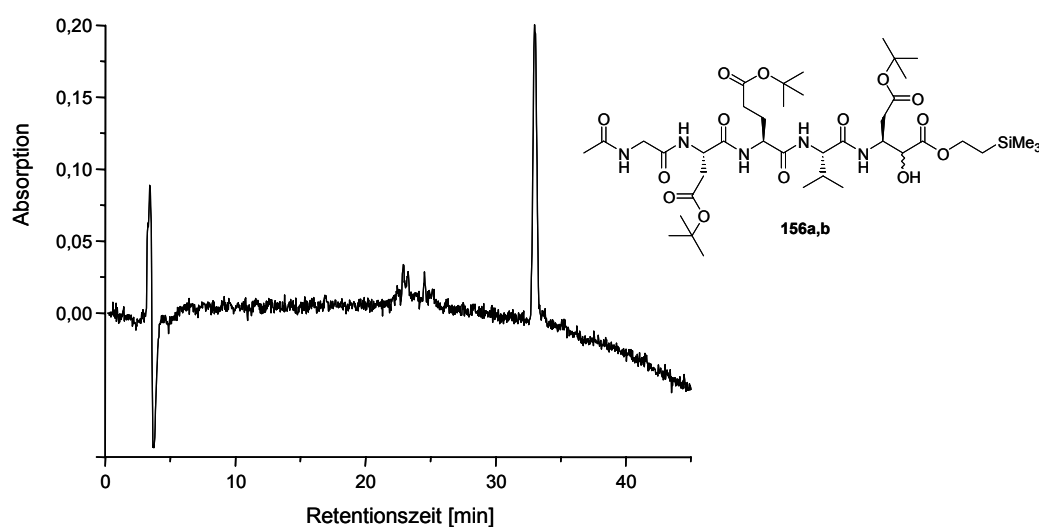


Abb. 3-79: HPLC-Chromatogramm von Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-ester **156a,b**.

Versuche, den Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-ester **156a,b** für die weitere Umsetzung mit TBAF-Trihydrat in DMF zu verseifen, führten zu Schwierigkeiten. Dabei verschwand im HPLC-Chromatogramm der Edukt-Peak, jedoch wurde eine Anzahl verschiedener Produkt-Peaks detektiert, ohne dass ein Hauptprodukt identifiziert werden konnte.

Die Probleme dürften in der ausgeprägten Basizität von Fluorid-Ionen in DMF begründet sein. Es ist bekannt, dass Peptide, die in ihrer Sequenz Asparaginsäure enthalten, besonders dann, wenn sie nach der Boc/Benzyl-Strategie aufgebaut werden, zu Base-katalysierter Aspartimid/Succinimid-Bildung neigen. Ähnliches Verhalten ist als Nebenreaktion bei der Verseifung von Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-ester **156a,b** zu befürchten und im Zusammenhang mit Peptidabspaltungen nach Synthese an Trimethylsilylethyl-analogen Linkersystemen in der Literatur bereits dokumentiert^[291].

Im vorliegenden Fall besteht neben der einfachen Verseifung zur gewünschten freien α -Hydrosäure **157a,b** die mehrfache Möglichkeit zur Nebenprodukt-Bildung durch Zyklisierungen: Während der C-terminale Aspartyl-Rest kein Aspartimid bilden kann, liegt diese Nebenreaktion für den zweiten Aspartyl-Rest im Molekül nahe (**158a,b**). Vermutlich sind auch Bedingungen denkbar, bei denen sich C-terminal ein Lacton-Fünfring ausbildet (**159a,b**). Schließlich sind auch beide Zyklisierungen gleichzeitig (**160a,b**) oder eine sich an die Zyklisierung anschließende Ringöffnung unter α,β -Umlagerung am linken Aspartyl-Rest zu einem weiteren Nebenprodukt (**161a,b**) formulierbar.

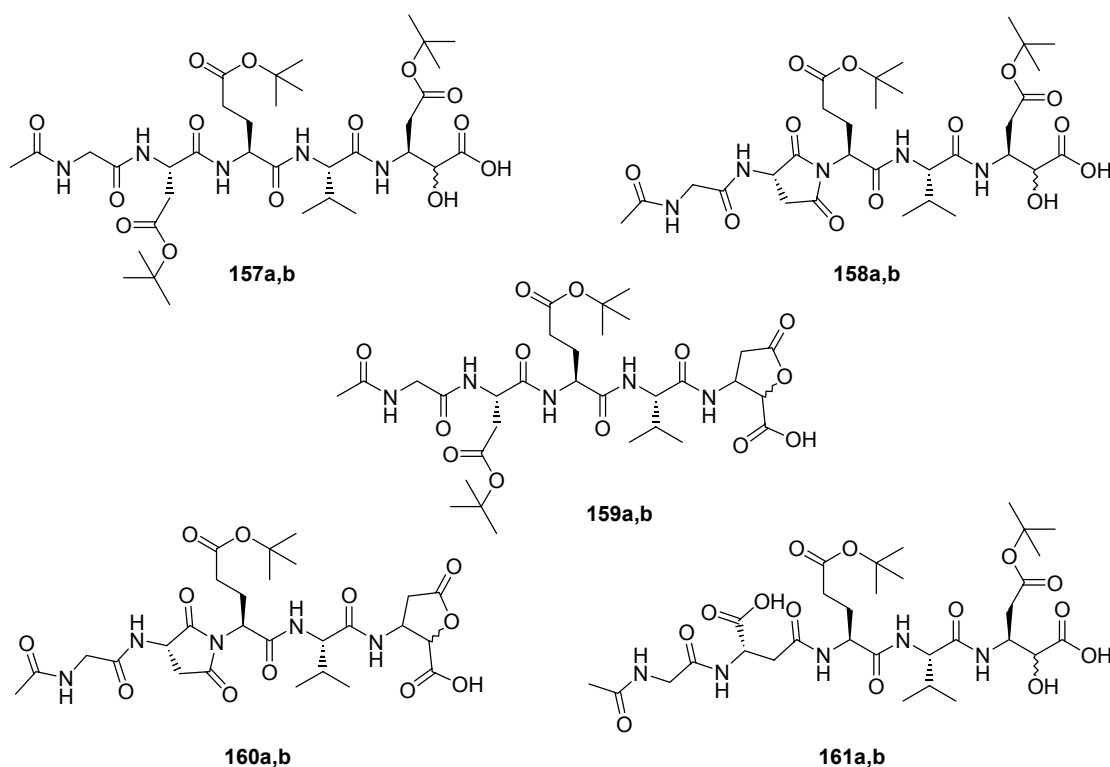
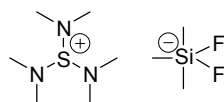


Abb. 3-80: Mögliche Nebenprodukt-Bildung bei der Verseifung von Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-ester **156a,b** durch z. B. Zyklisierung zum Aspartimid oder Lacton.

Um die angeführten Nachteile einer Verseifung mit TBAF-Trihydrat zu umgehen, wurden alternative Methoden zur Verseifung einer Trimethylsilylethyl-Schutzgruppe gesucht. Eine literaturbekannte Methode zur Abspaltung von Silyl-Schutzgruppen an Base-labilen Substraten sieht dabei die Verwendung von Tris-(dimethylamino)-sulfonium-difluortrimethylsilicat (TASF) vor^[292].



TASF

Abb. 3-81: Struktur von Tris-(dimethylamino)-sulfonium-difluorotrimethylsilicat (TASF).

Der Austausch von drei Äquivalenten TBAF-Trihydrat gegen drei Äquivalente TASF ermöglichte die vollständige Verseifung des Esters **156a,b**, führte aber dennoch im HPLC-Chromatogramm zu zwei Produkten, für welche jeweils Doppelpeaks detektiert wurden. Mittels LC-MS konnte dem später eluierenden Produkt (geringere Polarität) die Masse der gewünschten Peptidyl- α -hydroxysäure **157a,b**, dem früher eluierenden Produkt (höhere Polarität, Verlust einer *tert.*-Butyl-Schutzgruppe) die mit den Nebenprodukten **158a,b** oder **159a,b** korrespondierende Masse zugeordnet werden.

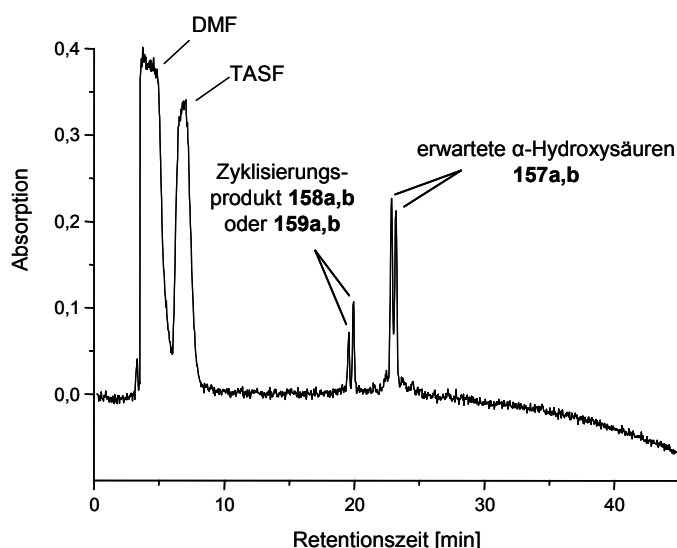


Abb. 3-82: HPLC-Chromatogramm nach Verseifung des Peptidyl- α -hydroxy-TMSE-esters **156a,b** mit TASF (direkte Probe aus dem Reaktionsansatz in DMF).

Da die Aspartimid-Bildung durch basische Reaktionsführung begünstigt wird, während eine Lactonisierung eher Säure-katalysiert zu erwarten ist, erscheint die Entstehung des Nebenproduktes **158a,b**, welches zu ca. 25 % gebildet wird, plausibler. Trotz nicht vollständiger Unterdrückung der Nebenprodukt-Bildung durch Verwendung von TASF, wurde das verseifte Zwischenprodukt durch Zugabe von EDC/HOBt aktiviert, in 1,5-fachem Überschuss auf ein vorsynthetisiertes Gly-Val-Ala-TCP-Harz mit freiem Amino-Terminus gekuppelt und mit 20 % HFIP/DCM abgespalten.

Erwartungsgemäß wurden dabei durch HPLC bzw. LC-MS zwei Produkte detektiert, die laut ihrer Massen dem noch Seitenketten-geschützten Endprodukt (Elution bei längerer Retentionszeit) und einem zyklisierten Nebenprodukt/Aspartimid (kürzere Retentionszeit) entsprechen. Die beobachtete Verschiebung des Aspartimid/Norstatin-Verhältnisses von 25:75 nach 37:63 zu Ungunsten des Norstatins deutet darauf hin, dass durch die Anwesenheit von TASF während der Kupplungsreaktion weiteres Aspartimid gebildet wird.

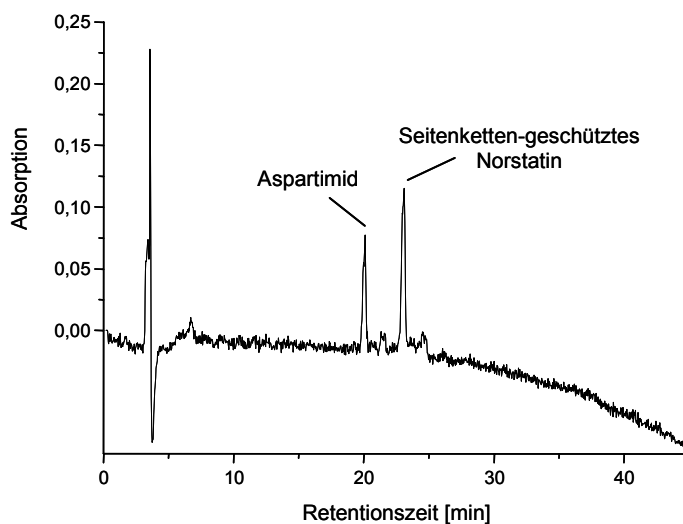


Abb. 3-83: HPLC-Chromatogramm der noch Seitenketten-geschützten Zielverbindung und eines Zyklisierungsproduktes/Aspartimids.

Es erschien an dieser Stelle sinnvoll, die präparative Aufreinigung der deutlich getrennten Verbindungen bereits vor der Seitenketten-Entschützung durchzuführen, um der Gefahr von Trennungsproblemen nach erfolgter Entschützung aus dem Weg zu gehen.

Überraschenderweise lieferte jedoch die Behandlung des durch präparative HPLC aus der Produktmischung isolierten, geschützten Norstatins mit 95 % TFA/5 % H₂O zur Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen nicht einheitlich die gewünschte Zielverbindung **155a,b**.

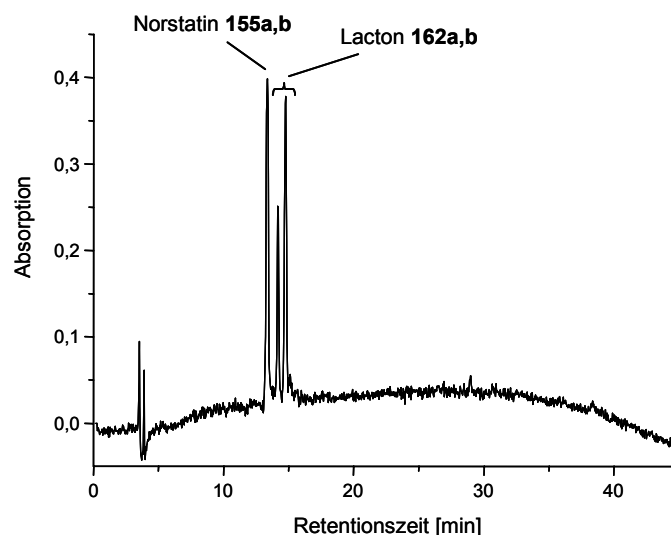


Abb. 3-84: HPLC-Chromatogramm nach Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen vom vollgeschützten Produkt zur Zielverbindung **155a,b**.

Durch Auswertung eines LC-MS-Chromatogramms gelang es, den drei im HPLC-Chromatogramm sichtbaren Peaks Massen zuzuordnen. Demnach entspricht der Produkt-Peak bei kürzester Retentionszeit einem Produkt mit der der gewünschten Zielverbindung **155a,b** entsprechenden Masse, während die beiden später eluierenden Produkte um 18 Masseneinheiten leichter sind. Dies lässt keinen anderen Schluss zu, als dass es bei der Schutzgruppen-Abspaltung mit TFA erneut zu einer Zyklisierung kommt. Da es sich hier jedoch um den Einfluss von Säure handelt, dürfte es sich in diesem Fall nicht um die Bildung des Aspartimids sondern des Lactons **162a,b** handeln.

Um diese Vermutung weiter zu verifizieren, wurde das Produktgemisch in einer Testreaktion mit 0,1N KOH-Lösung versetzt und bei RT gerührt, um unter Verseifung des Lactons und Ringöffnung das einheitliche Produkt **155a,b** zu erhalten. Tatsächlich kann im HPLC-Chromatogramm anschließend nur noch die gewünschte Zielverbindung nachgewiesen werden.

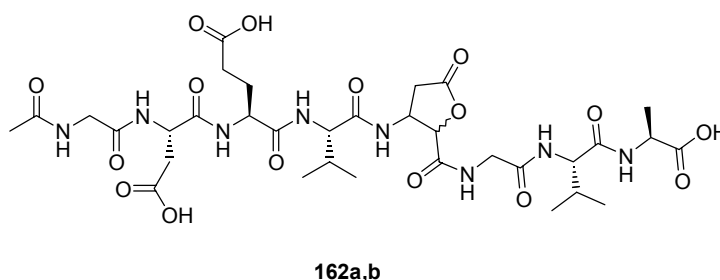


Abb. 3-85: Nebenprodukt-Bildung durch Lactonisierung bei der Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen des geschützten Norstatins.

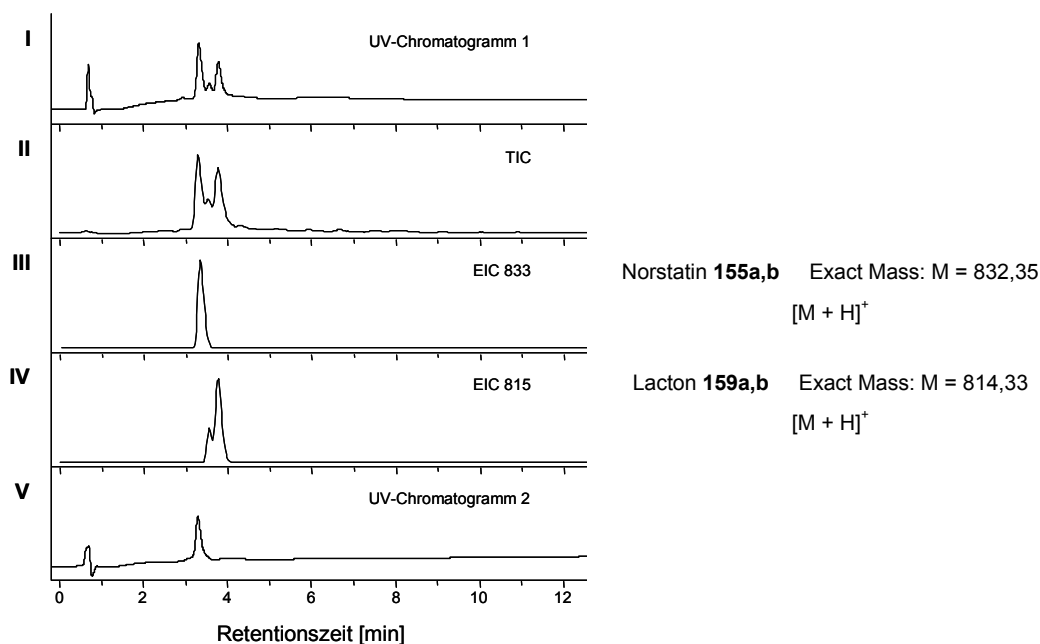


Abb. 3-86: Identifizierung der nach Entschützung mit 95 % TFA/5 % H₂O erhaltenen Produktmischung durch LC-MS: I, UV-Chromatogramm 214 nm; II, Totalionenstrom; III, Massenspur Norstatin-Zielverbindung **155a,b**; IV, Massenspur Lacton-Nebenprodukt **162a,b**; V, UV-Chromatogramm 214 nm nach Behandlung mit 0.1N KOH.

Trotz dieser Tatsache wurde für die Hauptmenge der erhaltenen Substanz auf eine basische Ringöffnung verzichtet und das gewünschte Produkt durch präparative HPLC aus dem Produktgemisch isoliert. Dabei wurden bei dieser durch Nebenprodukt-Bildung geprägten und damit hinsichtlich der Ausbeute nicht optimalen Synthese sechs Milligramm der Zielverbindung erhalten, was einer Ausbeute von ca. 5 % entspricht.

Norstatin **155a,b** zeigte bei der Testung in einem Fluoreszenz-basierten Caspase-3-Assay bei ersten Messungen nur unbefriedigende Inhibitionswirkung, so dass auf die genaue Bestimmung des K_i -Wertes einstweilen verzichtet wurde.

3.10 Diastereoselektive Reduktion

Die bisher im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Norstatin-Synthesen, deren Schlüsselschritte in der Knüpfung einer C-C-Bindung und der Reduktion eines durch oxidative Phosphoran-Spaltung erhaltenen α -Ketoesters bestehen, führten bei der Verwendung von L-Aminosäuren jeweils zu einem Diastereomergemisch der Konfiguration *2R,3S* bzw. *2S,3S*, da die Reduktion nicht diastereoselektiv durchgeführt wurde. Um das Syntheseprojekt inhaltlich zu vervollständigen, sollte abschließend die Möglichkeit einer diastereoselektiven Reaktionsführung untersucht werden.

Die Vorüberlegungen zur diastereoselektiven Reduktion wurden dabei weniger von der Frage bestimmt, unter welchen Bedingungen das jeweils eine oder andere Diastereomer zugänglich ist, sondern vielmehr dadurch, wie die für eine Inhibition von Plasmeptin II vielversprechendere Konfiguration angereichert werden kann. Eine Betrachtung der in Kap. 1.5.2 (Abb. 1-22 bzw. Abb. 1-23) vorgestellten, bekannten und getesteten Plasmeptin-Inhibitoren, welche auf dem Statin- bzw. Hydroxyethylamin-Isoster basieren, zeigt, dass alle bezüglich der räumlichen Ausrichtung an den beiden Stereozentren im Bereich des Isosters identisch sind. Es ist bei der Bezeichnung der Konfiguration am Kohlenstoff der sekundären Hydroxy-Gruppe bei Statinen und Hydroxyethylaminen, verglichen mit derjenigen von Norstatinen, jedoch zu beachten, dass bei Verwendung der *CIP*-Nomenklatur eine *R*-Konfiguration bei Statinen und Hydroxyethylaminen einer *S*-Konfiguration bei Norstatinen entspricht und umgekehrt. Die Ursache dafür liegt in der durch das formale Einfügen einer Methylen-Gruppe geänderten, der *CIP*-Nomenklatur zu Grunde liegenden Prioritätsreihenfolge der Substituenten. Unmissverständlicher und damit geeigneter ist in diesem Fall die Bezeichnung der relativen Konfiguration mit den Deskriptoren „*syn*“ und „*anti*“.

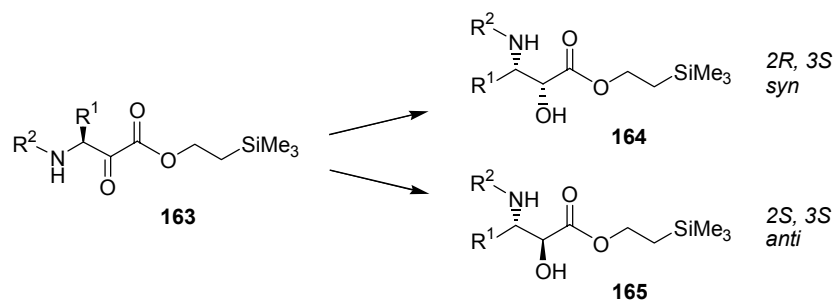


Abb. 3-87: *Syn/anti*-Nomenklatur zur Bezeichnung der relativen Konfiguration zweier Stereozentren am Beispiel der vorliegenden Verbindungsklasse.

Da die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Norstatine in enger Verbindung zum Statin-Inhibitor **11** stehen, bzw. von diesem abgeleitet wurden (vgl. Kap. 3.5), bestand somit größeres Interesse am entsprechenden *syn*-Produkt.

Bei theoretischen Betrachtungen zur Addition von Nucleophilen an α -chirale Carbonyl-Verbindungen wird im Allgemeinen auf die CRAMSche Regel bzw. das FELKIN-ANH-Modell zurückgegriffen.

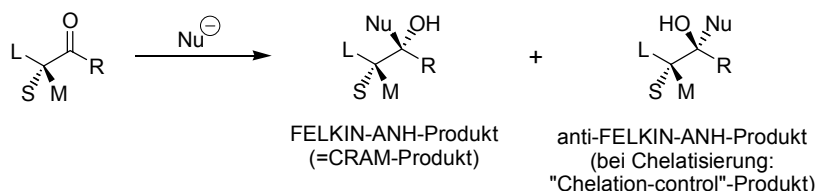


Abb. 3-88: Addition von Nucleophilen an α -chirale Carbonyl-Verbindungen nach CRAM bzw. FELKIN-ANH (Einteilung der Substituenten am α -Kohlenstoff: L = large, M = medium, S = small)

Am gängigen Lehrbuch-Beispiel, der Addition eines Nucleophils an einen α -chiralen Aldehyd oder ein α -chirales Keton, lässt sich dabei sehr anschaulich demonstrieren, wie sich durch verschiedene Reaktionsführungen, bei Reduktionen z. B. durch verschiedene Reduktionsmittel, ein bevorzugter Angriff von der gewünschten Seite erreichen lässt. Es besteht zum Einen die Möglichkeit, die durch die α -Substituenten vorgegebene, bevorzugte Konformation des Substratmoleküls auszunutzen, um ein Reduktionsmittel von der weniger gehinderten Seite her angreifen zu lassen, wobei der Effekt zusätzlich durch Verwendung sterisch anspruchsvoller Reduktionsmittel verstärkt wird (FELKIN-ANH-Produkt). Zum Anderen kann das Substratmolekül z. B. durch Zusatz und Koordination eines chelatisierenden Metallions unter Ausbildung einer zyklischen Struktur in eine Konformation gezwungen werden, welche eine umgekehrte Ausrichtung der α -Substituenten mit sich bringt und deshalb zu einer jeweils anderen Angriffsrichtung des Nucleophils führt (Chelat-kontrolliertes Produkt).

Eine Übertragung der dargestellten Überlegungen auf das Reduktionsverhalten der hier als Substrat vorliegenden Peptidyl- α -keto-TMSE-ester ist nicht trivial und wurde in der Literatur nicht beschrieben. Bei Anwendung des FELKIN-ANH-Modells auf die β -Substituenten des Eduktes **163** ergibt sich die in Abb. 3-89 dargestellte, bevorzugte Konformation, die bei einem Angriff des Nucleophils von der weniger gehinderten Seite zur bevorzugten Bildung des *syn*-Produktes **164** führen sollte.

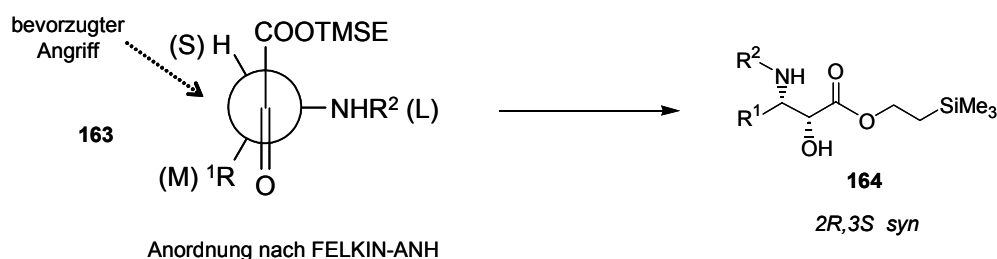


Abb. 3-89: Bildung des FELKIN-ANH-Produktes bei Anwendung des FELKIN-ANH-Modells und Angriff des Nucleophils von der weniger gehinderten Seite.

Bei einer Reaktionsführung unter Anwesenheit von Metallionen, welche zu einer Chelatisierung des Eduktes führen können, fällt eine Vorhersage der bevorzugten Seite schwerer, da zunächst im Gegensatz zu den einfachen Lehrbuch-Beispielen die genaue Art der Chelatisierung unklar ist.

Bei Peptidyl- α -keto-TMSE-estern kommen zahlreiche funktionelle Gruppen für eine Koordination in Frage. Die beiden wahrscheinlichsten Anordnungen dürften jedoch in der überbrückenden Koordination des Metallions zwischen einem Carbonyl-Sauerstoff und einem Amid-Stickstoff bestehen (**166** bzw. **167**). Wie sich durch Übertragung in die NEWMAN-Projektion demonstrieren lässt, ergeben sich je nach Art der Chelatisierung und der dadurch erzwungenen Konformation unterschiedliche bevorzugte Angriffsseiten.

WASSERMAN et al. schlagen für die Chelatisierung von α -Ketoamiden bei der diastereoselektiven Reduktion mit Zinkborhydrid durch Zinkionen ohne nähere Ausführungen die Koordination an zwei Carbonyl-Gruppen vor^[176,267], wobei damit eigentlich nur die Sauerstoff-Atome der α -Keto- und der Carboxylat-Gruppe gemeint sein können. Eine derartige Chelatisierung hätte eine synperiplanare Anordnung der beiden Carbonyl-Gruppen zur Folge, wobei jedoch nicht nachvollziehbar ist, inwiefern eine solche Ausgangssituation zur Bevorzugung einer bestimmten Angriffsseite führen soll. Dieser Erklärungsversuch erscheint somit wenig wahrscheinlich.

Tatsächlich zeigt die diastereoselektive Reduktion von α -Ketoamiden mit Zinkborhydrid (Chelat-kontrolliert), welche in ihrem Verhalten mit α -Ketoestern vergleichbar sein dürften, eine bevorzugte Entstehung des *syn*-Produktes, was für einen Verlauf über ein dem Chelat **167** entsprechendes Zwischenprodukt spricht.

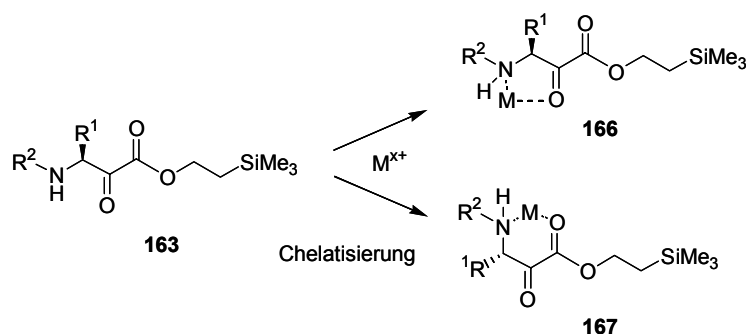


Abb. 3-90: Denkbare Möglichkeiten der Chelatisierung von Peptidyl- α -keto-TMSE-estern.

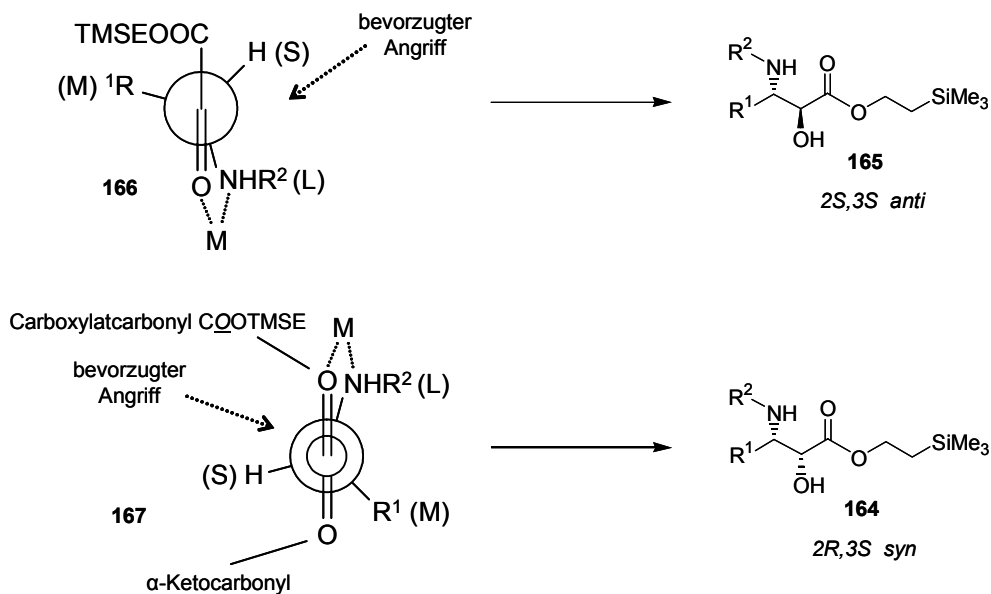


Abb. 3-91: Denkbare Chelatisierungen von Peptidyl- α -keto-TMSE-estern in der NEWMAN-Projektion und Auswirkungen auf die bevorzugte Seite eines nucleophilen Angriffs.

Eine dritte Möglichkeit zur Durchführung einer diastereoselektiven Reduktion besteht in der Verwendung eines Reduktionsmittels, das sowohl sterisch anspruchsvoll als auch zur Koordination befähigt ist. Ein Beispiel dafür stellt das Reduktionsmittel DIBAL-H dar. Durch Koordination des Aluminiums an die zu reduzierende Carbonyl-Gruppe wird dabei das Hydrid in räumliche Nähe gebracht. Die Raumerfüllung der sperrigen, übrigen Alkyl-Reste am Aluminium bewirkt dabei die Anlagerung und den Angriff von der weniger gehinderten Seite. Entgegen der in Abb. 3-89 dargestellten Anordnung nach FELKIN-ANH dürfte jedoch in diesem Fall die Ausbildung der Konformation **168** begünstigt sein, die einen Angriff von der anderen Seite zum *anti*-Produkt ermöglicht.

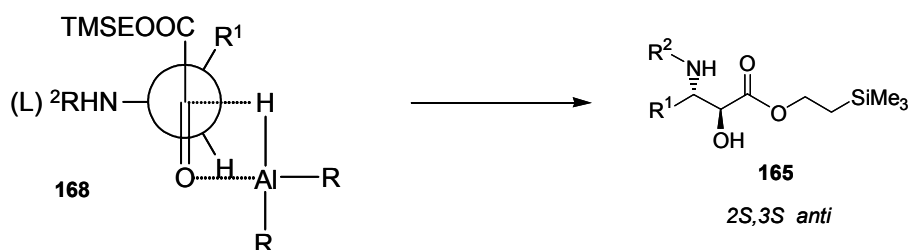


Abb. 3-92: NEWMAN-Projektion des Angriffs von DIBAL-H oder ähnlichen, LEWIS-sauren Reduktionsmitteln von der weniger gehinderten Seite zum *anti*-Produkt.

Zusammenfassend ergibt sich somit aus allen Vorüberlegungen, dass sich bei Anwendung gängiger Strategien zur diastereoselektiven Reduktion eher das *syn*-Produkt im Produktgemisch anreichern lässt. Da im Kontext des Projektes jedoch sowieso die *syn*-Produkte

präferiert werden, stellt dies hier kein Problem dar. Zugang zum *anti*-Produkt ist eventuell über chelatisierende und zugleich sterisch anspruchsvolle Reduktionsmittel möglich.

Zur Untersuchung des stereochemischen Verlaufs an einem konkreten Beispiel wurde wieder auf die Modellverbindung aus der synthetisierten Norstatin-Kollektion zurückgegriffen, mit welcher auch die übrigen Optimierungen wie Racemisierung, Decarbonylierung etc. vorgenommen wurden. Dazu wurde Peptidyl- α -keto-TMSE-ester **169** durch oxidative Abspaltung und Umsetzung mit Trimethylsilylethanol gewonnen und mit verschiedenen Reduktionsmitteln umgesetzt. Alle Reaktionen (außer bei Verwendung von Natriumborhydrid) wurden durch Quenchen mit 10 %-iger Zitronensäure-Lösung beendet und die Ansätze extraktiv aufgearbeitet. Das Verhältnis von *syn*- und *anti*-Produkt wurde anschließend durch HPLC des Rohproduktes ermittelt, Ausbeuten wurden nicht bestimmt.

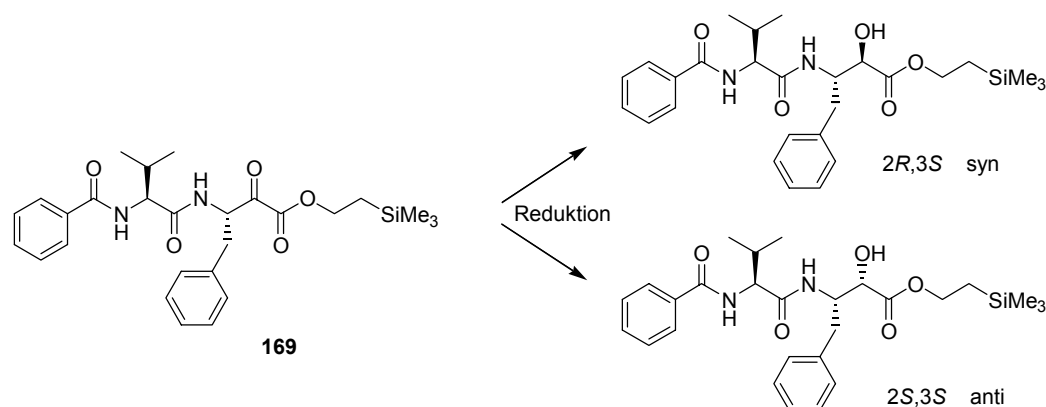


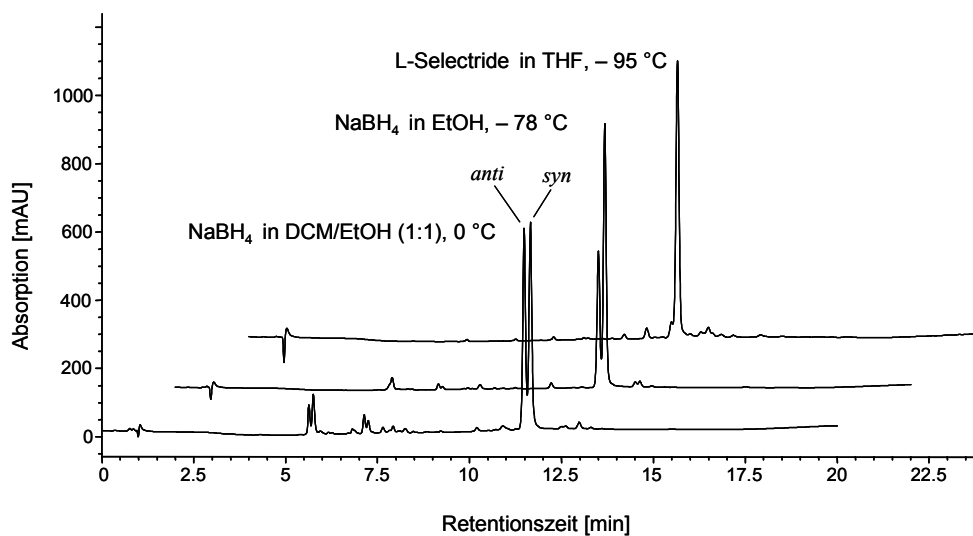
Abb. 3-93: Testreaktion zur Untersuchung einer diastereoselektiven Reduktion von Peptidyl- α -keto-TMSE-estern.

Die erhaltenen und in Tab. 3-16 dargestellten *anti/syn*-Verhältnisse bestätigen die theoretische Vorhersage. Es wird jeweils ein Überschuss des prognostizierten Diastereomers gefunden. Bemerkenswert ist, dass die von WASSERMAN bei α -Ketoamiden mit Zinkborhydrid erreichte *syn*-Selektivität (2:98) beim vorliegenden Substrat deutlich verfehlt wurde (40:60, Pos. 3). Dieses Ergebnis korrespondiert jedoch mit Beobachtungen von HARVEY et al., wonach bei der Reduktion eines α -Ketomethylesters mit Zinkborhydrid ebenfalls keinerlei Selektivität erzielt werden konnte^[283]. Sehr gute *syn*-Selektivität ermöglichte lediglich der Gebrauch von L-Selectride (Pos. 5). Die Tatsache, dass im uneinheitlichen Edukt systembedingt neben der α -Keto-Verbindung das entsprechende Hydrat und Cyanhydrine vorliegen, beeinflusst die Möglichkeit zur diastereoselektiven Reduktion offensichtlich nicht negativ.

Tab. 3-16: Versuche zur diastereoselektiven Reduktion von Peptidyl- α -keto-TMSE-ester **169** und Bestimmung des *anti*/*syn*-Verhältnisses

Pos.	Bedingungen ^[a]	<i>anti</i> : <i>syn</i> ^[b]
1	0.625 eq. NaBH ₄ , DCM/EtOH (1:1), 0 °C ^[c]	48:52
2	0.625 eq. NaBH ₄ , EtOH, -78 °C	33:67
3	0.5 eq. Zn(BH ₄) ₂ , THF, -78 °C	40:60
4	6 eq. DIBAL-H, THF, -78 °C	56:44
5	3 eq. L-Selectride, THF, -95 °C	2:98
6	1.5 eq. LiAlH(OtBu) ₃ , THF, -78 °C	44:56

^[a] Reaktionszeit jeweils 2 h falls nicht anders vermerkt; Äquivalentangabe bezieht sich auf das Reduktionsmittel, nicht auf die Hydrid-Äquivalente; ^[b] HPLC 214 nm
^[c] Reaktionszeit 30 min.

**Abb. 3-94:** Überlagerte Darstellung dreier HPLC-Chromatogramme nach Versuchen zur diastereoselektiven Reduktion der Modellverbindung **169**.

4 Polymere Formaldehydhydrazone

4.1 Einleitung

Im Kontext des in dieser Arbeit verfolgten Konzeptes, der Erzeugung stabiler, carbanionischer Synthese-Äquivalente in Polymeren, stellen polymere N,N-Dialkylformaldehydhydrazone eine denkbare, sehr interessante Erweiterung dar. Wie in Kap. 1.7 ausgeführt (vgl. Abb. 1-47 und Abb. 1-49) besitzen N,N-Dialkylformaldehydhydrazone nucleophile Eigenschaften, können verschiedenste Elektrophile angreifen und führen im Ergebnis nach Hydrazon-Spaltung formal zur Addition von Formaldehyd an eine Doppelbindung des Substrates. Der maskierte Formylanion-Charakter ermöglicht die Ausbildung einer neuen C-C-Bindung.

In Lösung werden für solche Umsetzungen zwei Arten von Formaldehydhydrazonen benutzt, die sich von N,N-Dimethylhydrazin (**170**) und 1-Aminopyrrolidin bzw. substituiertem 1-Aminopyrrolidin (**171**) ableiten. Beide Vertreter weisen signifikante Unterschiede auf. In der Frage der Reaktivität bewirkt der der C-N-Doppelbindung benachbarte Pyrrolidin-Ring eine deutliche Erhöhung der Nucleophilie und damit bessere Ausbeuten. Von den in Frage kommenden Elektrophilen (Aldehyde, Trifluormethylketone, MICHAEL-Substrate) werden mit allen gute bis sehr gute Umsetzungen beobachtet, während bei N,N-Dimethylformaldehydhydrazon nur bei Nitroolefinen gute Ausbeuten erzielt werden, die Reaktivität mit anderen Substraten jedoch unbefriedigend ist.

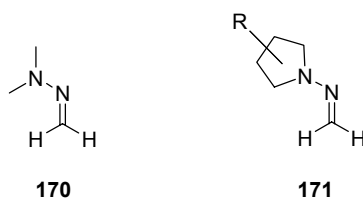


Abb. 4-1: In Lösung als maskierte Formylanionen eingesetzte N,N-Dialkylformaldehydhydrazone.

Durch die stärkere Ausprägung einer Nebenreaktion ist die Umsetzung von **170** mit Aldehyden besonders erschwert. Dabei kommt es anstatt eines nucleophilen Angriffs auf im Ergebnis nur zu einem Austausch mit dem Aldehyd ohne Gerüstverlängerung. Für diesen Hydrazon-Austausch schlagen LASSALETTA et al. nach unveröffentlichter

ab initio-Kalkulation einen [2+2]/retro-[2+2]-Mechanismus vor^[203]. Formaldehydhydrazone **171** zeigen diese Nebenreaktion in geringerem Ausmaß.

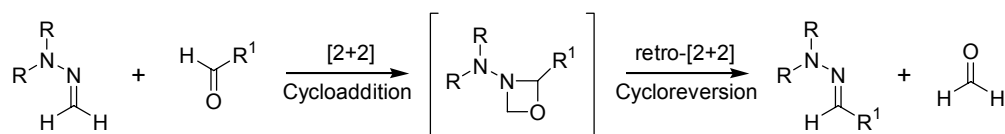


Abb. 4-2: Von LASSALETTA et al. vorgeschlagener Mechanismus zum Hydrazon-Austausch bei der Umsetzung von N,N-Dialkylhydrazonen mit Aldehyden.

Weiterer Unterschied ist die in **171** durch Ring-Substitution vorhandene Chiralität. Da bei der Reaktion in der Regel ein neues Stereozentrum erzeugt wird, ermöglicht dies u. U. einen Beitrag zur diastereoselektiven Reaktionsführung. Hauptsächlich wird für den Ring-Substituent die Methoxymethyl-Gruppe in der 2-Position bevorzugt, d. h. dass von ENDERS in die asymmetrische Synthese eingeführte chirale Auxiliar SAMP verwendet.

Die angeführten Eigenschaften führten zu der grundsätzlichen Entscheidung, bei einer Übertragung der Formylanionen-Äquivalente an die feste Phase die Synthese von polymeren, SAMP-analogen Hydrazinen anzustreben.

Polymere Hydrazine bzw. Hydrazin-ähnliche Funktionalitäten sind in der Festphasen-Chemie selten aber bekannt. Semicarbazid^[293,294] und Carbazat-Linker^[295,296] werden z. B. für die Immobilisierung von Aldehyden oder Ketonen benutzt und später sauer gespalten. LAZNY et al. verwendeten ein polymeres 1-Aminopiperazin zur Immobilisierung und α -Alkylierung von Ketonen^[297]. Zwei Veröffentlichungen von ENDERS et al. demonstrierten den Einsatz polymerer Hydrazine zur Synthese von α -verzweigten primären Aminen^[298,299]. Dabei stellte die Arbeitsgruppe insbesondere in einer Arbeit, deren Veröffentlichung während der Anfertigung vorliegender Arbeit erfolgte, ein SAMP-analoges Hydrazin-Harz (**172**) vor.

Während die Publikation nur die Immobilisierung von Aldehyden an **172**, die anschließende Addition von Lithiumalkylen an die C-N-Doppelbindung und die reduktive Spaltung der N-N-Bindung und damit Abspaltung der Zielverbindungen beschreibt, zeigt KÖBBERLING in seiner Dissertation weiterhin die Verwendung bei der α -Alkylierung von zum Hydrazon derivatisierten Ketonen, der klassischen ENDERS-Chemie^[300].

Eine weitere Dissertation in der Arbeitsgruppe FESSNER an der TU Darmstadt aus dem Jahr 2003 präsentiert gleichfalls ein polymeres SAMP-analoges Hydrazin (**173**) und dessen Einsatz zur α -Alkylierung^[301].

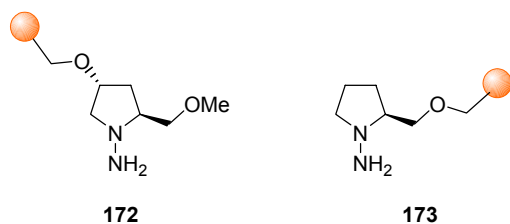


Abb. 4-3: Von KÖBBERLING und SCHOOREN vorgestellte, SAMP-analoge Hydrazin-Harze.

Obwohl die mit dieser Arbeit verfolgte Teilzielsetzung, die Synthese eines von 1-Aminopyrrolidin abgeleiteten polymeren Hydrazins, durch die Arbeiten von KÖBBERLING und SCHOOREN schon erreicht wurde, unterscheidet sich der nachfolgend vorgestellte Ansatz vom Bekannten. Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal ist dabei, dass beabsichtigt wurde, ein N-geschütztes 1-Aminopyrrolidin in Lösung zu synthetisieren und dann zu immobilisieren. Sowohl KÖBBERLING als auch SCHOOREN bauen das Hydrazin erst am Polymer auf, indem sie einen immobilisierten Pyrrolidin-Ring nitrosieren und mit DIBAL-H reduzieren. Von besonderem Nachteil ist dabei die schwierige und nur unvollständige Entfernung der Aluminium-Salze aus dem Polymer nach Reduktion, welche eventuell auch die nucleophile Reaktivität negativ beeinflussen.

In dieser Arbeit sollte in der Frage der Polymer-Anbindung primär ein Baustein verwendet werden, der synthetisch in möglichst wenigen Stufen erreichbar ist. Der Aufwand von acht Synthesestufen in Lösung bei der Synthese von **172** erschien zu hoch. Da das 1-Aminopyrrolidin-Harz nicht zu α -Alkylierungen von Ketonen verwendet werden sollte, ist das Vorhandensein eines Ring-Substituenten in 2-Position, der bei dieser Reaktion maßgeblichen mechanistischen Einfluss nimmt, nicht obligatorisch. Im Gegenteil wurde angenommen, dass durch einen Verzicht bzw. eine Immobilisierung über eine andere Ring-Position eine bessere Zugänglichkeit für das Substrat gegeben sein sollte.

Bezüglich einer asymmetrischen Induktion, d. h. der zusätzlichen Funktion des Harzes als chirales Auxiliar, gilt es anzumerken, dass auch eine Immobilisierung über eine andere Ringposition zwangsläufig zu Chiralität führt. LASSALETTA et al. zeigten jedoch, dass bei der Erzeugung eines neuen Stereozentrums durch nucleophilen Angriff des Formaldehydhydrazons weniger die Chiralität des Hydrazons als vielmehr die eventuell schon vorhandene Konfiguration eines α -Stereozentrums im chiralen Substrat induzierend wirkt^[203].

Aus diesem Grund und unter Berücksichtigung eines geeigneten, kommerziell erhältlichen Eduktes wurde deshalb die Synthese des 1-Aminopyrrolidin-Harzes (AP-Harz) **174** ange-

strebt. Nach Etablierung der Synthese sollte das Formaldehydhydrazone-Harz (FH-Harz) (175) erzeugt und dessen nucleophile Eigenschaften untersucht werden. Bevorzugtes Elektrophil hinsichtlich einer späteren Anwendung des Konzeptes im Kontext von Protease-Inhibition/Isoster-Strukturen stellten dabei N-geschützte α -Aminoaldehyde und deren Verlängerung zu N,O-geschützten α -Hydroxy- β -aminoaldehyden (178) dar. Aldehyde sind im Vergleich zu den anderen angeführten Elektrophilen schwächer elektrophil und bedürfen teilweise einer katalytischen Aktivierung, während Substrate mit elektronenziehenden Gruppen in α -Position, wie bei α -Alkoxy- oder α -Aminoaldehyden gegeben, besser geeignet sind und unkatalysiert reagieren können. Als Modellverbindung sollte die Synthese des durch Verlängerung von Fmoc-Phenylalaninal entstehenden, mit Silyl-Schutzgruppe versehenen α -Hydroxy- β -aminoaldehyds 179 bewerkstelligt werden.

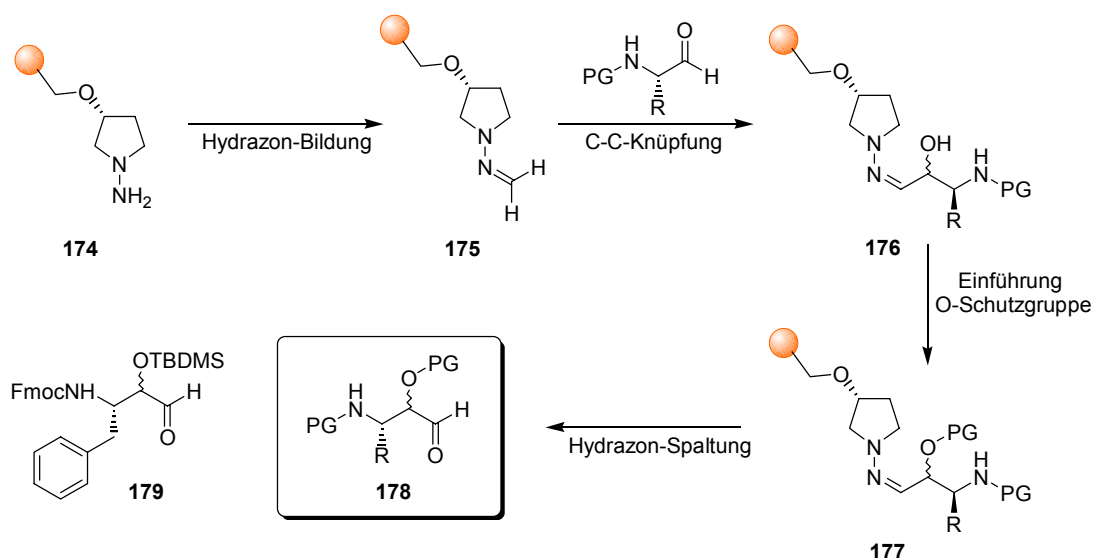


Abb. 4-4: Geplante Reaktionssequenz zum Einsatz von AP-Harz (174) zur Homologisierung von geschützten α -Aminoaldehyden zu N,O-geschützten α -Hydroxy- β -aminoaldehyden.

4.2 Synthese von AP-Harz

4.2.1 Synthese von (3R)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol

Ähnlich wie von KÖBBERLING und SCHOOREN bei der Synthese der SAMP-analogen Hydrazin-Harze 172 bzw. 173 angewendet, sollte auch im AP-Harz eine Verknüpfung eines in Lösung hergestellten Alkohol-Bausteins mit dem Polymer durch eine stabile Ether-Bindung erfolgen, welche z. B. durch nucleophile Substitution des korrespondierenden Alkoholats an MERRIFIELD-Chlormethyl-Polystyrol-Harz erhalten werden kann.

Als Erfolg versprechende Struktur unter Berücksichtigung möglicher Immobilisierungsbedingungen erschien dabei (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**). Obwohl z. B. die Boc-Schutzgruppe im Allgemeinen gegenüber Alkoholaten stabil ist, sollte durch Wahl der Säure-labilen, ansonsten aber sehr stabilen Trityl-Schutzgruppe jede Gefahr einer Nebenreaktion ausgeschlossen werden. Ausgehend von (3*R*)-3-Pyrrolidinol-Hydrochlorid (**180**) wurde durch Nitrosierung mit Natriumnitrit/Essigsäure in Wasser (3*R*)-1-Nitroso-3-pyrrolidinol (**181**) als Rohprodukt in 98 % Ausbeute erhalten. Aufgrund seiner Giftigkeit wurde dieses Zwischenprodukt direkt weiter umgesetzt und mit Lithiumaluminiumhydrid in THF zum Hydrazin (3*R*)-1-Amino-3-pyrrolidinol (**182**) reduziert. Da die Rohausbeute von 91 % durch destillative Aufreinigung des Produktes auf 56 % herabgesetzt wurde und ein beträchtlicher Destillationsrückstand verblieb, wurde im nächsten Ansatz auf eine Destillation verzichtet und das Produkt roh weiter umgesetzt. Die Einführung der Trityl-Schutzgruppe wurde abschließend mit Tritylchlorid/TEA in Chloroform erreicht. Die etwas niedrigere Ausbeute von nur 64 % in dieser letzten Reaktionsstufe geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf Verluste bei der säulenchromatographischen Aufreinigung zurück. Ungünstigerweise wurde auf eine Abpufferung des schwachsauren Kieselgels durch Zugabe von Base zum Elutionsmittel verzichtet, so dass vermutlich partielle Trityl-Abspaltung auftrat. Über alle Reaktionsschritte konnte somit (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**) in einer Ausbeute von 57 % erhalten werden.

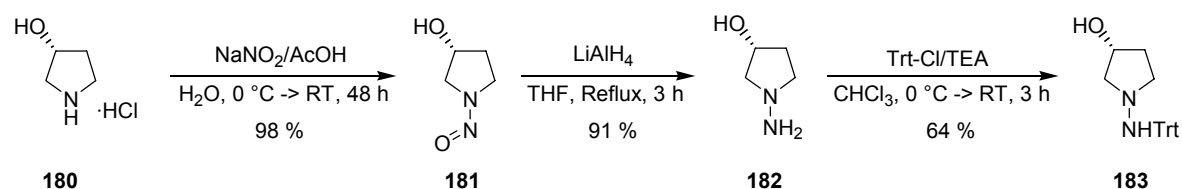


Abb. 4-5: Synthese von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol.

4.2.2 Immobilisierung von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol

Zur Immobilisierung von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**) durch Veretherung der sekundären Hydroxy-Gruppe wurde MERRIFIELD-Harz verwendet. Bei vergleichbaren Reaktionen wird sehr oft in einem ersten Schritt der Alkohol durch Metallhydrid zum Alkoholat deprotoniert, um die Nucleophilie zu erhöhen. Da die Kaliumalkoholate als etwas nucleophiler als Natriumalkoholate gelten, wurde durchgehend Kaliumhydrid als Base verwendet und nach Zugabe des Polymers auf $50\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Einige weitere Bedingungen der Immobilisierungsreaktion wurden zur Ausbeutemaximierung variiert. So

wurde die Immobilisierung in DMF und THF durchgeführt und Reaktionszusätze wie TBAI oder 18-Krone-6 getestet. Die Reaktionsausbeute wurde durch Stickstoff-Elementaranalyse des Polymers nach erfolgter Reaktion ermittelt. Aus dem Stickstoff-Gehalt lässt sich auf die Beladung und damit auch die Ausbeute zurückrechnen. Als vorteilhafteste Reaktionsbedingungen wurde die Verwendung von jeweils drei Äquivalenten (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol und Kaliumhydrid in trockenem THF bei einer Reaktionszeit von 60 Stunden ohne sonstige Zusätze ermittelt. Es wurde dabei eine Umsetzung zu **184** von 76 % bestimmt, was bei der Verwendung eines MERRIFIELD-Harzes mit einer Ausgangsbeladung von 1,48 mmol/g einem Trityl-geschützten AP-Harz mit einer Beladung von 0,77 mmol/g entspricht. Durchführung der Reaktion in DMF ergab eine leicht geringere Ausbeute, die Zugabe von TBAI oder 18-Krone-6 hatte keine positiven Auswirkungen.

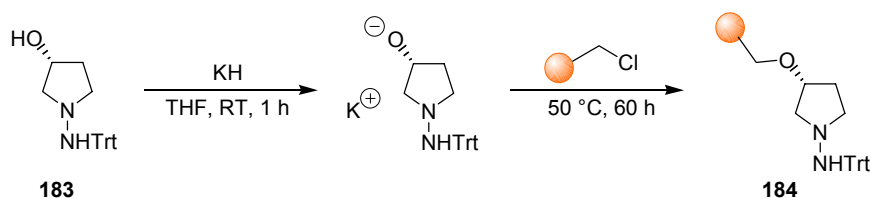


Abb. 4-6: Immobilisierung von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol durch Veretherung mit MERRIFIELD-Harz zum Trityl-geschützten AP-Harz **184**.

4.2.3 Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe zum AP-Harz

Die Abspaltung der Säure-labilen Trityl-Schutzgruppen lässt sich grundsätzlich sehr einfach und schonend durch z. B. 1 % TFA/DCM realisieren. Durch die Reversibilität der Abspaltung sehen jedoch die Standardbedingungen die Verwendung einer Abspaltungslösung DCM/TFA/TIS (94:1:5) vor. Auch mit dieser Mischung wurde eine vollständige Trityl-Abspaltung erst durch häufige Wiederholung realisiert. So wurde für eine Harzmenge von 400 Milligramm **184** ein Ausbleiben der charakteristischen Gelbfärbung erst nach fünfzehnmaliger Behandlung mit jeweils fünf Millilitern Abspaltungslösung für jeweils fünf Minuten erreicht. Die Freisetzung des freien Hydrazins (**174**) aus dem zunächst erhaltenen Hydraziniumtrifluoracetat (**185**) wurde durch Behandlung mit 10 % TEA/DCM durchgeführt. Bei vollständiger Entschützung entspricht die erreichte Beladung 0,95 mmol/g.

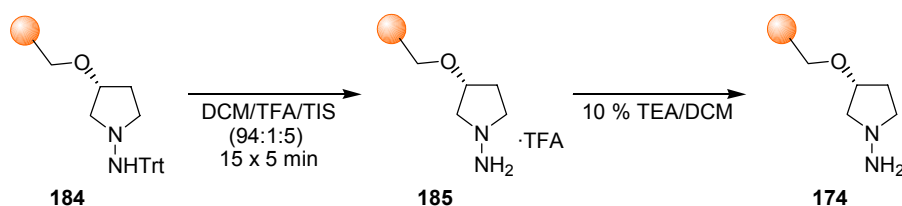


Abb. 4-7: Trityl-Abspaltung zum freien AP-Hydrazin-Harz **174**.

4.2.4 Charakterisierung des AP-Harzes

Nach erfolgter Synthese wurde AP-Harz **184** auf seine chemischen und spektroskopischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurde zunächst ein KAISER-Test, ein übliches Verfahren zur Detektion primärer Amino-Gruppen in Synthese-Harzen, durchgeführt. Entgegen der Erwartung zeigte dieser Test ein positives Ergebnis, was sich mit dem gängigen Mechanismus zur Erklärung der Entstehung des blauen Farbstoffes („RUHEMANN'S Blau“) nicht erklären lässt. Danach findet bei primären Amino-Funktionen eine Transaminierung des Stickstoffs zum Ninhydrin statt, deren Schlüsselschritt in einer Tautomerisierung besteht. Dafür ist unbedingt, wie bei natürlichen α -Aminosäuren gegeben, die Existenz eines α -ständigen Wasserstoffs notwendig.

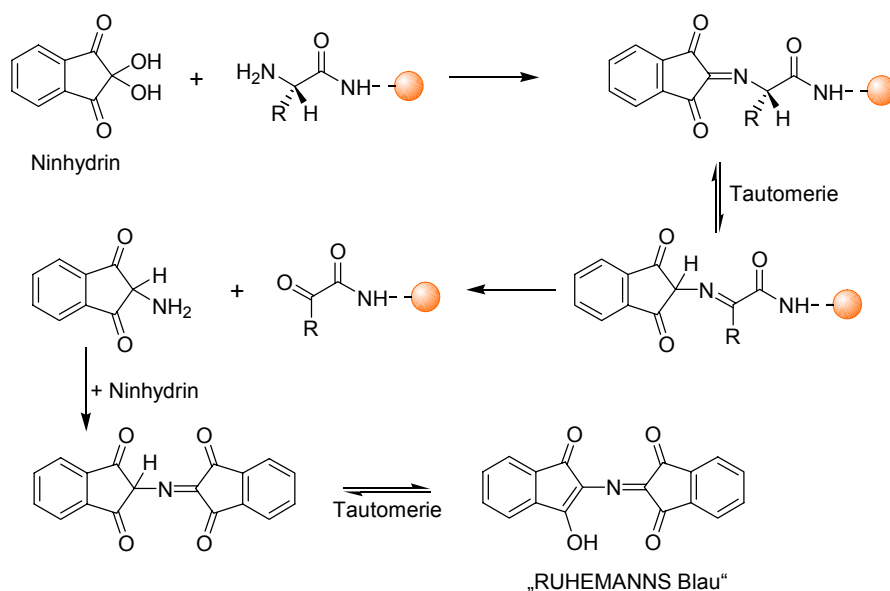


Abb. 4-8: Allgemein akzeptierter, dem KAISER-Test zu Grunde liegender Mechanismus zur Bildung von RUHEMANN'S Blau.

Trotz der unklaren Ursache konnte die positive Farbreaktion als Indikator für eine gelungene Harz-Synthese bzw. bedingt für den weiteren Syntheseverlauf herangezogen werden. In einer Testreaktion wurde dazu AP-Harz mit zehn Äquivalenten 4-Nitrobenz-

aldehyd in THF/TMOF (1:1) versetzt, was zu einer sofortigen Gelbfärbung des Harzes und einem negativen KAISER-Test führte. In einem weiteren Versuch wurde AP-Harz mit Fmoc-Phenylalaninal in THF/TMOF (1:1) für zwölf Stunden bei RT geschüttelt, woraufhin der KAISER-Test ebenfalls negativ ausfiel. Eine anschließende quantitative, photometrische Fmoc-Bestimmung erlaubte eine nochmalige Beladungskontrolle und bestätigte die durch Elementaranalyse ermittelte Größenordnung.

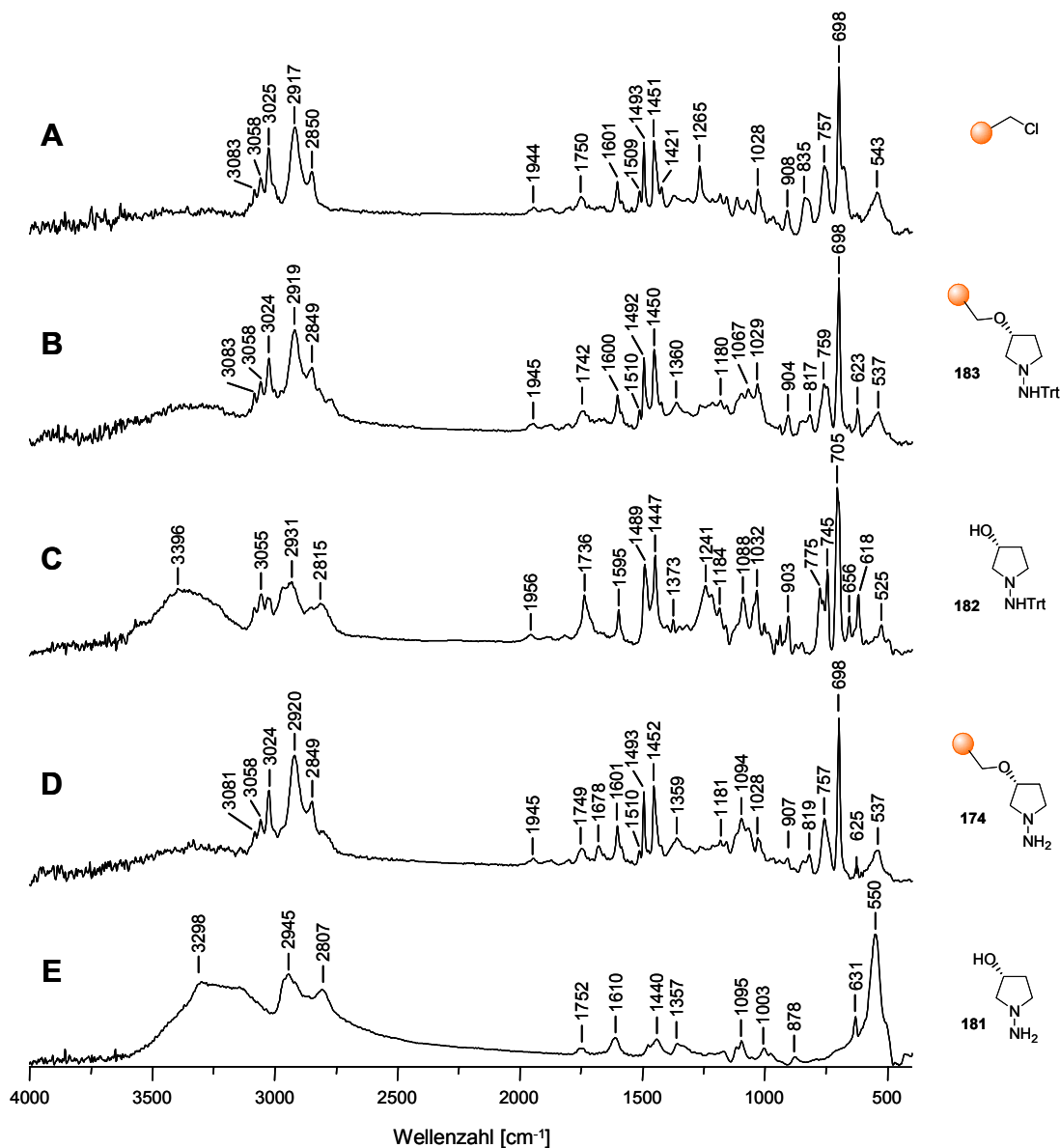


Abb. 4-9: ATR-IR-Spektren von MERRIFIELD-Harz (A), Trityl-AP-Harz (B), (3R)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (C), AP-Harz (D) und (3R)-1-Amino-3-pyrrolidinol (E).

Obwohl die Struktur des AP-Harzes und die Zwischenstufen der Harz-Synthese durch das Fehlen charakteristischer IR-aktiver Gruppen nur wenig charakteristische IR-Spektren erwarten lassen, wurden alle Edukte, Zwischenprodukte und das Endprodukt vermessen (Abb. 4-9).

4.3 Synthese und Anwendung von FH-Harz

4.3.1 Formaldehydhydrazonbildung an AP-Harz

Das für eine nucleophile Addition an einen α -Aminoaldehyd benötigte, polymere Formaldehydhydrazon (**175**) ergibt sich formal durch die Umsetzung von AP-Harz (**174**) mit Formaldehyd, wobei Formaldehyd in chemischen Synthesen üblicherweise als wässrige Lösung (Formalin) oder in polymerer Form (Paraformaldehyd, Trioxan) eingesetzt wird. Auch für die Synthese von SAMP-analogen (**171**) und anderen Formaldehydhydrazonen wird in Lösung polymerer Formaldehyd verwendet, indem das Hydrazin, teilweise unter Erwärmen, mit der entsprechenden Formaldehydmodifikation gerührt wird^[212,219,220,302]. Für die Synthese von FH-Harz wurden parallel Versuche mit allen drei Formen des Formaldehyds unternommen.

Da Trioxan, ein zyklisches Formaldehyd-Trimer, in organischen Lösungsmitteln löslich, kettenförmiger Paraformaldehyd jedoch unlöslich ist, erschien ersteres für eine heterogene Reaktionsführung mit einem Polymer geeigneter. Umsetzungen mit Trioxan wurden deshalb mit 20 Äquivalenten in THF sowohl bei RT als auch bei 50 °C und einer Reaktionszeit von zwölf Stunden durchgeführt.

Für Paraformaldehyd wurde eine Variante in Anlehnung an eine Vorschrift von DIEL et. al gewählt^[303]. Danach lässt sich Paraformaldehyd in Methanol unter Zusatz von TEA depolymerisieren und reagiert bei Anwesenheit eines Hydrazins zum Formaldehydhydrazon ab. Entsprechend wurden Versuche mit 30 Äquivalenten Paraformaldehyd in THF/MeOH (1:1) und Zusatz von TEA bei 70 °C und einer Reaktionszeit von zwölf Stunden gemacht, wobei die zunächst durch suspendierten Paraformaldehyd trübe Reaktionslösung allmählich klar wurde.

Als dritte Alternative wurde direkt Formalin verwendet. Dabei wurde die 30 Äquivalenten Formaldehyd entsprechende Menge zusammen mit THF zum AP-Harz gegeben und zwölf Stunden bei RT geschüttelt.

In Analogie zum weiter oben gezeigten Verfahren bei der Hydrazon-Bildung an AP-Harz mit 4-Nitrobenzaldehyd und Fmoc-Phenylalaninal wurde versucht, den Reaktionsfortschritt der Formaldehyddhydrazon-Bildung bzw. die vollständige Umsetzung durch Anwendung des KAISER-Tests zu detektieren. In keinem Fall wurde, auch nach mehrfacher Wiederholung der einzelnen Synthese-Varianten, ein negativer KAISER-Test erreicht. Jedoch konnte durch Aufnahme von IR-Spektren eine vermutlich erfolgreiche Synthese für die Reaktionen mit Paraformaldehyd und Formalin angenommen werden. Die entsprechenden IR-Spektren weisen eine zusätzliche, verhältnismäßig intensitätsschwache Absorptionsbande bei ca. 1570 cm^{-1} auf, die damit im Bereich der Bande einer C-N-Doppelbindung ($1565\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) liegt, wie sie bei Verbindungen **171** gefunden wurde^[212,220]. Bei der Umsetzung mit Trioxan konnte diese IR-Bande nicht detektiert werden.

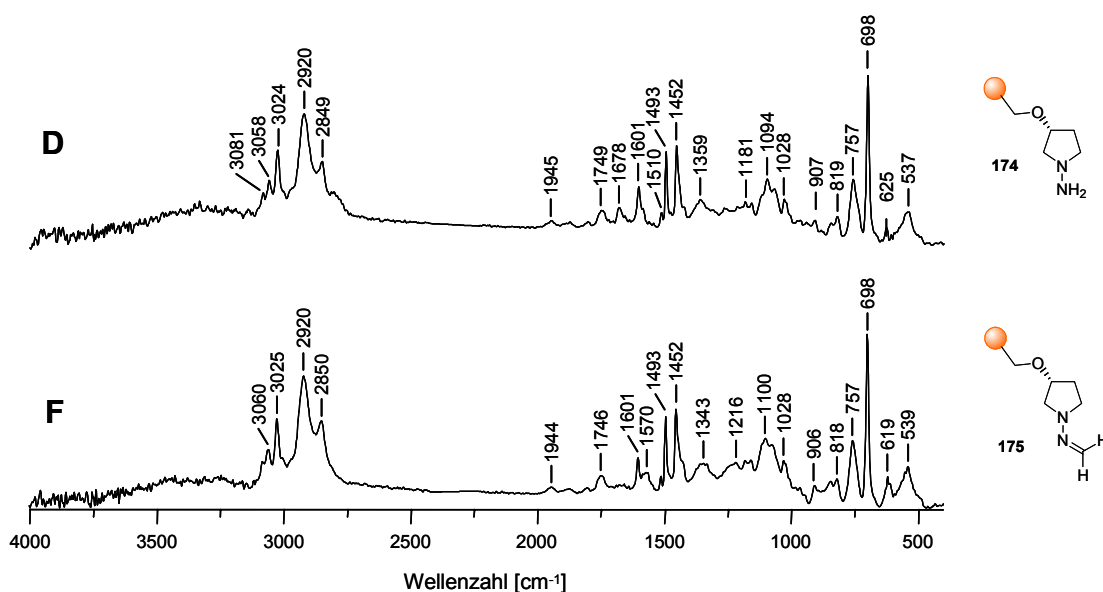


Abb. 4-10: ATR-IR-Spektren von AP-Harz (D) und FH-Harz (F) nach Umsetzung mit Formalin bzw. Paraformaldehyd.

In der Frage des beständig positiven KAISER-Tests ist zu vermuten, dass auch trotz vollständiger Umsetzung zum FH-Harz das gebildete Formaldehyddhydrazon unter den Bedingungen des KAISER-Tests (wässrig, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$) nicht stabil ist und hydrolytisch gespalten wird. Weiteres Indiz einer vollständigen Reaktion zu **175** ist die ausbleibende Gelbfärbung bei Zusatz von 4-Nitrobenzaldehyd.

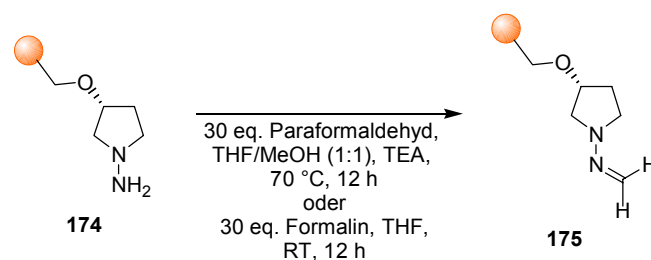


Abb. 4-11: Umsetzung von AP-Harz zu FH-Harz mit Paraformaldehyd oder Formalin.

4.3.2 Nucleophile Addition von FH-Harz an Fmoc-Phenylalaninal

Die gewünschten nucleophilen Eigenschaften des FH-Harzes **175** wurden in einer Modellreaktion mit Fmoc-Phenylalaninal getestet. Umsetzungen von nucleophilen Formaldehydhydrazonen mit N-geschützten α -Aminoaldehyden in Lösung sind bisher nicht intensiv untersucht worden. Einzig eine Publikation beschreibt Umsetzungen mit Boc-Phenylalaninal bzw. Boc-Leucinal^[207]. Mit Boc-Phenylalaninal wird dabei das erwartete Hauptprodukt (**186a,b**) in 82 % Ausbeute, das gemäß der beobachteten Hydrazone-Austauschreaktion (vgl. Abb. 4-2) entstehende Nebenprodukt (**187**) in 8 % Ausbeute isoliert. Für das Diastereomerenverhältnis der Produkte **186a** (2*S*,3*S*; *anti*) und **186b** (2*R*,3*S*; *syn*) wird eine *anti*-Selektivität von 85:15 gefunden, die sich durch Anwendung des FELKIN-ANH-Modells theoretisch vorhersagen lässt.

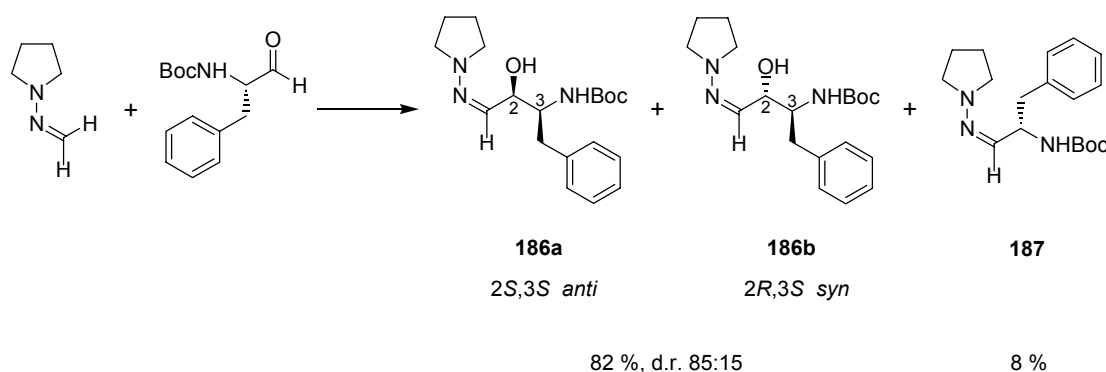


Abb. 4-12: Addition eines nucleophilen Formaldehydhydrazons an Boc-Phenylalaninal^[207].

Für die Modellreaktion wurde Fmoc-Phenylalaninal verwendet, da damit über die quantitative Bestimmung der Fmoc-Schutzgruppe eine Bestimmung der Ausbeute möglich ist. Die Reaktion wurde ausgeführt, indem fünf Äquivalente Fmoc-Phenylalaninal in trockenem DCM ohne weitere Zusätze zum FH-Harz gegeben und bei RT geschüttelt wurde. Abbruch der Ansätze nach verschiedenen Reaktionszeiten und Bestimmung des

Fmoc-Gehaltes offenbarte eine langsame Reaktionsgeschwindigkeit. Während nach 24 Stunden ca. 50 % Umsetzung erreicht wurde, konnte nach drei Tagen eine Ausbeute von 78-88 % bestimmt werden, wobei durch diese Fmoc-Bestimmung sowohl das gewünschte Hauptprodukt (**188a**) als auch das Nebenprodukt (**188b**) erfasst und nicht unterschieden werden können.

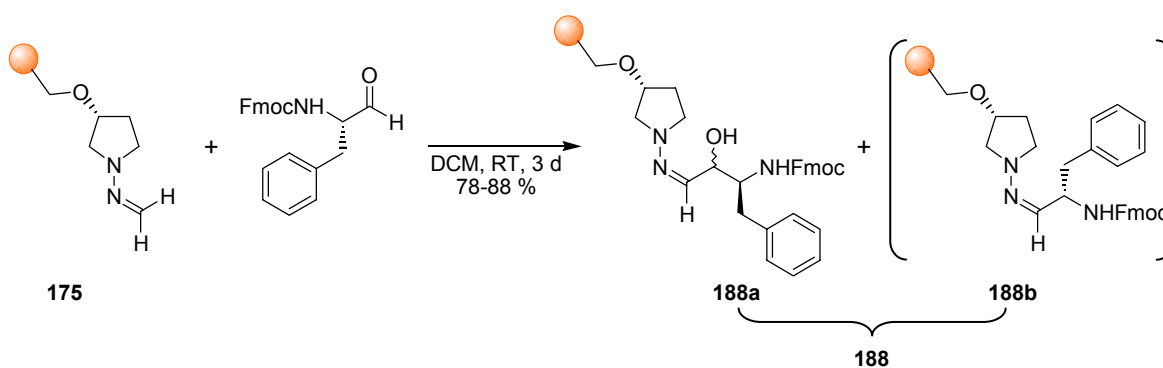


Abb. 4-13: Addition von FH-Harz an Fmoc-Phenylalaninal.

4.3.3 Einführung einer O-Silylschutzgruppe

Der durch die Fmoc-Bestimmung gelungene Nachweis der Existenz von Fmoc-Schutzgruppen im Polymer bestätigt eine stattgefundenene Reaktion, bringt aber noch keine Gewissheit über eine Reaktion im geplanten Sinne. Mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden zur Untersuchung des Polymers fällt eine Unterscheidung zwischen **188a** und **188b** sehr schwer, so dass erst mit der Abspaltung des Produktes vom Harz weitere Aussagen gemacht werden können.

Da α -Hydroxyaldehyde als instabil gelten, wurde vor einer Abspaltung die Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe beabsichtigt. Entsprechend wurde Harz **188** mit jeweils fünf Äquivalenten TBDMS-Chlorid und Imidazol in trockenem DMF bei RT für 24 Stunden zur Reaktion gebracht.

Als Indiz für eine erfolgte Silylierung, die nur bei erfolgreicher Generierung der Hydroxy-Gruppe unter C-Kettenverlängerung zu **188a** stattfinden kann, wurde das Auftauchen einer IR-Absorptionsbande bei ca. $840\text{-}860\text{ cm}^{-1}$ erwartet. In diesem Bereich liegen IR-Schwingungen der Si-C-Bindung.

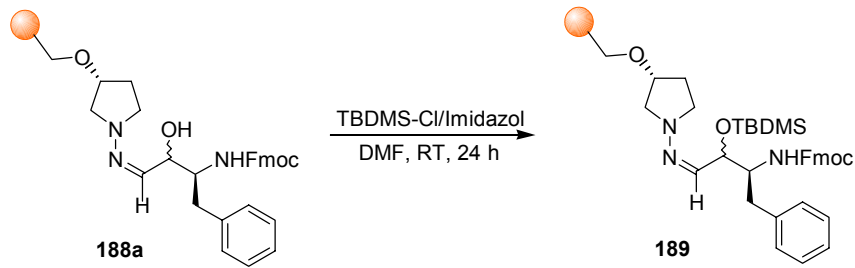


Abb. 4-14: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe auf die im C-C-Knüpfungsschritt entstandene Hydroxy-Funktion.

4.3.4 Synthese-Monitoring durch IR-Spektroskopie

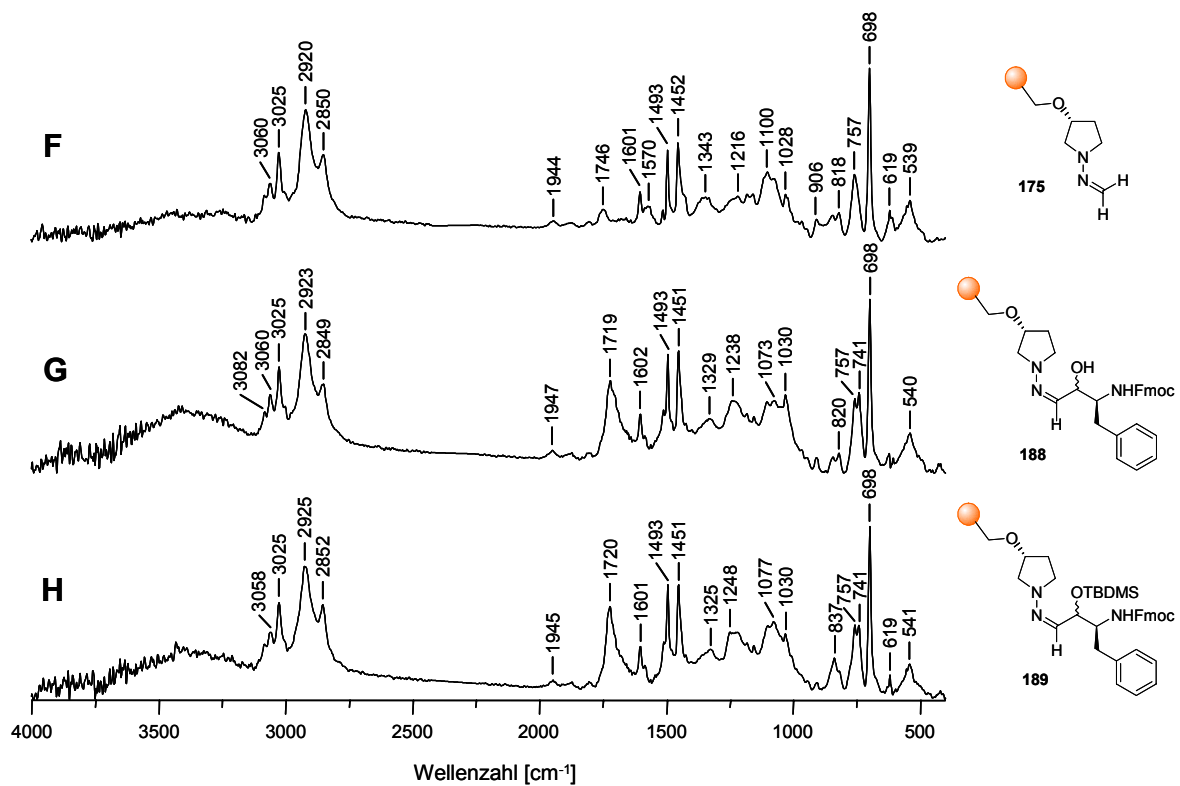


Abb. 4-15: ATR-IR-Spektren des Edukt-FH-Harz (F) sowie nach Addition an Fmoc-Phenylalaninal (G) und Silylierung (H).

Neben der Bestimmung der Fmoc-Gruppen bestand die einzige Möglichkeit zur Verfolgung der Reaktion zwischen Fmoc-Phenylalaninal und FH-Harz sowie der anschließende Silylierung in der Aufnahme von IR-Spektren. Der erste Reaktionsschritt findet im IR-Spektrum (Abb. 4-15, G) seine Entsprechung durch eine Absorptionsbande bei 1719 cm⁻¹ (Carbamat-Carbonyl) und dem für die Fmoc-Schutzgruppe charakteristischen Doppelpeak einer Fluoren-Gerüstschwingung bei 757 cm⁻¹ bzw. 741 cm⁻¹. Die C-N-Absorption der Hydrazone-Doppelbindung bei 1570 cm⁻¹ verschwindet dagegen bzw. wird wahrscheinlich verschoben. Für den potenziellen Syntheserfolg jedoch von entschei-

denderer Bedeutung ist das IR-Spektrum nach versuchter Silylierung (**H**). Dort ist bei 837 cm^{-1} eine Bande zu erkennen, die auf eine erfolgte Silylierung schließen lässt.

4.3.5 Freisetzung des Reaktionsproduktes durch Hydrazone-Spaltung

Zur abschließenden Freisetzung der Modellverbindung **179** besteht die Notwendigkeit zur Spaltung des Hydrazone-Linkers unter Rückbildung einer Carbonyl-Gruppe. Da man SAMP-analoge Hydrazine in Lösung in allen Anwendungen als Auxiliare zur Modifikation von Aldehyden oder Ketonen einsetzt, wobei diese am Ende der Reaktion durch Hydrazone-Spaltung zurückgewonnen werden, sind dafür zahlreiche Substrat-abhängige Varianten entwickelt worden. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um saure Hydrolysen und oxidative Spaltungen. Im Zusammenhang mit der Verwendung von Formaldehydhydrazonen als nucleophile Formylanion-Äquivalente, bei der als Reaktionsprodukte meist Aldehyde erhalten werden, wird fast ausnahmslos eine ozonolytische Hydrazone-Spaltung angewendet. Im Unterschied zur Spaltung von Ketonhydrazonen müssen dabei bei Aldehydhydrazonen die in Analogie zur Ozonspaltung von C-C-Doppelbindungen vermuteten Ozonide durch Zugabe eines Reduktionsmittels zerstört und der Aldehyd damit freigesetzt werden. Sehr häufig übernimmt diese Funktion zugesetztes Dimethylsulfid.

Über die grundsätzliche Möglichkeit, Ozon für Festphasen-Synthesen bzw. oxidative Abspaltungen einzusetzen, wurde bereits in Kap. 3.3 im Zusammenhang mit der oxidativen Spaltung des Phosphoran-Linkers berichtet.

Aufgrund der Säureempfindlichkeit der Zielverbindung **179** wurde der Versuch einer oxidativen Hydrazone-Spaltung unternommen. Dazu wurde Harz **189** in DCM auf -78 °C gekühlt und Ozon bis zum Auftreten einer Blaufärbung der Lösung eingeleitet. Überschüssiges Ozon wurde daraufhin durch einen Stickstoff-Strom verdrängt und zehn Äquivalente Dimethylsulfid zugesetzt. Nach Erwärmen der Probe auf RT wurde für weitere drei Stunden gerührt und schließlich das Harz abfiltriert.

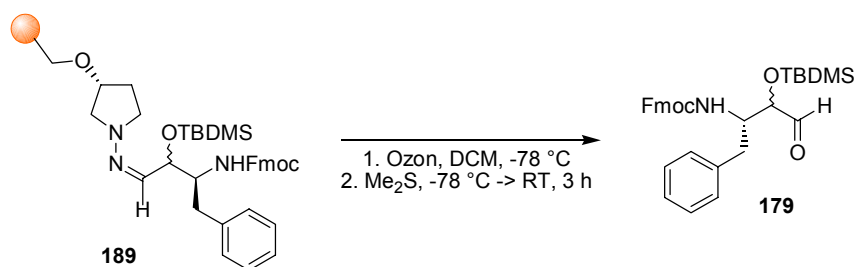


Abb. 4-16: Ozonolytische Hydrazonspaltung/Abspaltung zur Modellverbindung **179**.

Das durch Ozonolyse erhaltene Rohprodukt (ca. 45 % Ausbeute) wurde durch HPLC und LC-MS charakterisiert und der größte Peak bei ca. 40 Minuten eindeutig als Peak des Produktes **179** identifiziert. Die Reinheit beträgt 64 %, wobei die Hauptverunreinigung Fmoc-Phenylalaninal, das Nebenprodukt der erwarteten [2+2]/retro-[2+2]-Cycloaddition, ist. Das Verhältnis von gewünschtem Produkt zu Fmoc-Phenylalaninal beträgt etwa 3:1. Außer der systematischen Verunreinigung ist der Anteil anderweitiger, unbekannter Verunreinigungen gering.

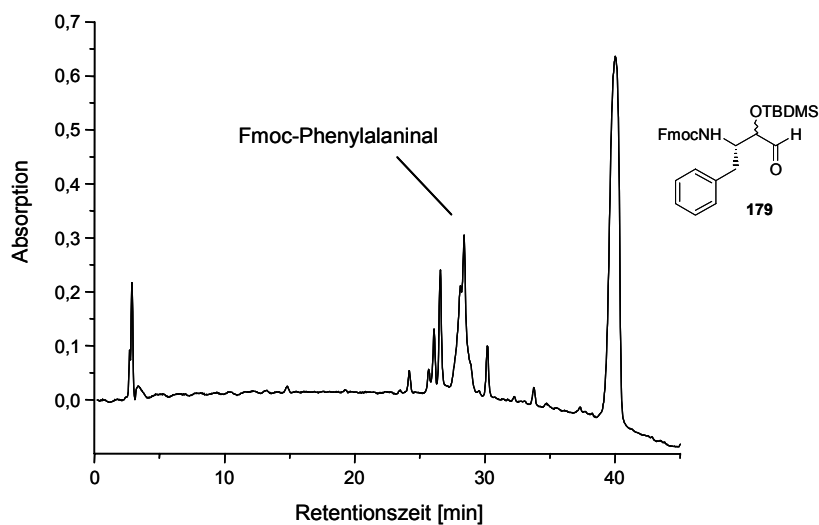


Abb. 4-17: HPLC-Chromatogramm der Modellverbindung **179** nach ozonolytischer Spaltung des Hydrazon-Linkers.

Das Rohprodukt wurde präparativ aufgereinigt. Dabei wurde aufgrund einer Beobachtung von DONDONI et al., wonach sich die analoge, mit Boc- anstatt Fmoc-Schutzgruppe versehene Verbindung bei der Aufreinigung an Kieselgel größtenteils zersetzt^[144], mittels präparativer HPLC aufgereinigt und dort auf den üblichen Zusatz von 0,1 % TFA verzichtet.

Bezüglich der Stereochemie des erhaltenen, silylierten α -Hydroxyaldehyds **179** ist anzumerken, dass theoretisch vier Diastereomere in zwei Enantiomerenpaaren auftreten

können. Im Idealfall sollte dabei an C3 die *S*-Konfiguration wie im Edukt-Aldehyd Fmoc-Phenylalaninal, an C2 bei ausgeprägter *anti*-Selektivität ebenfalls bevorzugt *S*-Konfiguration vorliegen (vgl. Kap. 4.3.2). Obwohl Fmoc-Phenylalaninal laut Drehwert enantiomerenrein eingesetzt wurde, muss durch die Reaktionszeit von drei Tagen mit partieller Racemisierung des Eduktes gerechnet werden. Im Arbeitskreis wurde gezeigt, dass Peptidylaldehyde in Lösung in 24 Stunden bis zu 10 % Epimerisierung aufweisen können^[304]. Es ist daher davon auszugehen, dass alle vier Diastereomere bei einer eventuellen Anreicherung des *anti*-Produktes vorliegen.

Diese Vermutung müsste sich durch das Auffinden zweier separater Signalsätze der jeweiligen Paare in NMR-Spektren bestätigen lassen. Die Auswertung eines ¹H-NMR-Spektrums alleine ist dabei wenig aussagekräftig (Abb. 4-18). Es werden im Bereich der Aldehyd-Protonen ein intensitätsstarkes Signal und zwei weitere, sehr schwache Signale gefunden, die sich aber nicht alle mit der Existenz von Diastereomeren erklären lassen^[305]. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt nur einen Signalsatz, womit vermutlich ein Diastereomer oder Diastereomerenpaar stark überwiegt oder aber zufällige Isochronie der Kerne vorliegt. Zusammen mit der Auswertung weiterer, zweidimensionaler Spektren lässt sich abschließend sagen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit überwiegend ein Diastereomer, vermutlich das *anti*-Produkt (*2S,3S*), vorliegt und die drei übrigen Diastereomere in einem Gesamtanteil von unter 10 % entstanden sind. Damit würden die Verhältnisse am Polymer in Bezug auf Diastereoselektivität in etwa denen in Lösung entsprechen.

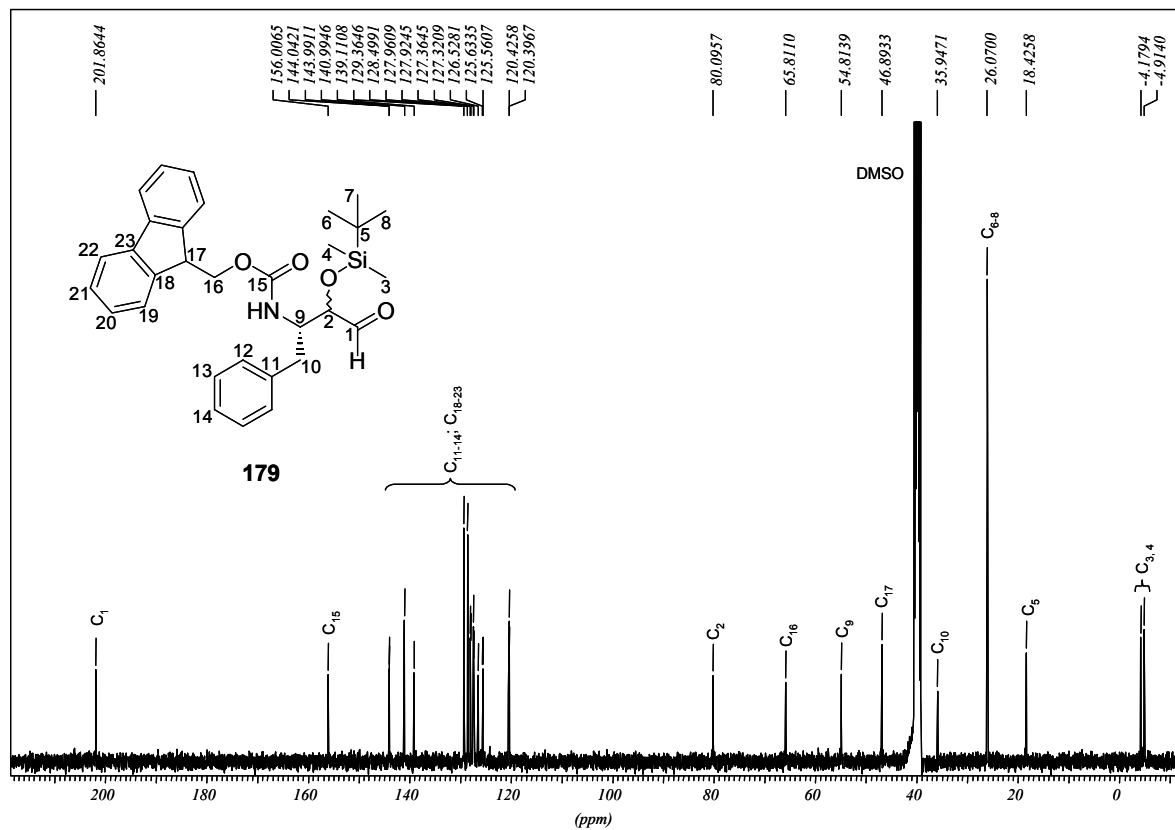
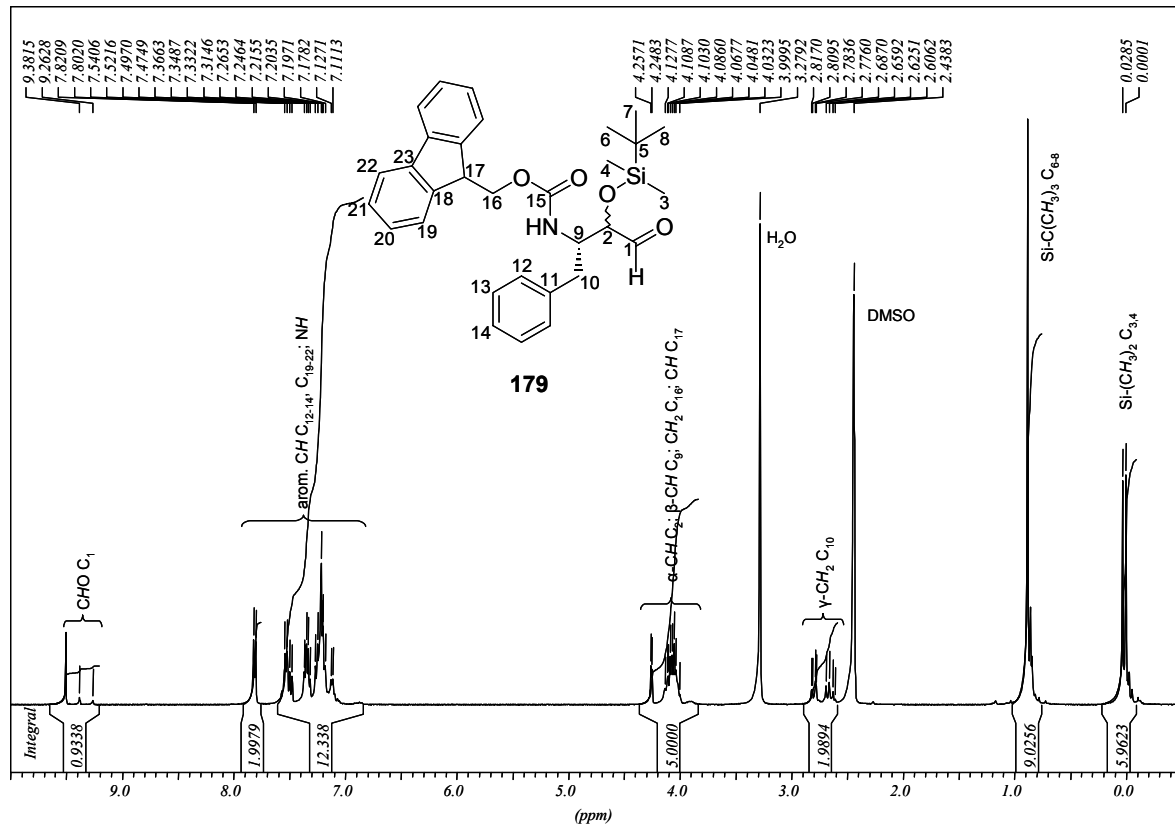


Abb. 4-18: Interpretierte ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren der Modellverbindung 179 (vermutlich 2S,3S).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der erste Teil der Dissertation beschreibt die Verwendung polymerer (Cyanmethylen)-phosphorane zur Synthese von Norstatinen.

Dazu wurde zunächst durch Alkylierung von Triphenylphosphin-Harz mit Bromacetonitril ein polymeres WITTIG-Salz hergestellt, das sehr leicht zum WITTIG-Ylid deprotoniert werden konnte. Entgegen der bisher üblichen Art und Weise wurde das Phosphoran-Harz nicht zur Carbonyl-Olefinierung im Sinne eines polymeren Reagenzes eingesetzt, sondern wie aus der Lösungssynthese bekannt durch Fmoc-Aminosäuren unter Aktivierung mit EDC/DMAP acyliert. Nach erfolgreicher Peptidsynthese am Phosphoran-Linker konnten α -Ketoester, -säuren und -amide durch ozonolytische Phosphoran-Spaltung und Abfangen intermediärer, hochreaktiver α,β -Diketonitrile mit Alkoholen, Wasser und Aminen erhalten werden. Durch anschließende Reduktion wurden entsprechend α -Hydroxyester und -amide zugänglich.

Nachteile der zunächst in Analogie zur Lösungssynthese präsentierten Reaktionssequenz wurden durch sukzessive Optimierung beseitigt. Dabei konnte eine zunächst bei der ozonolytischen Abspaltung beobachtete Decarboxylierung durch Umstellung auf DMDO verhindert werden. Weiterhin wurden als Zwischenprodukte α -Hydroxytrimethylsilylethylester synthetisiert, welche nach Verseifung mit TBAF-Trihydrat direkt auf ein zweites Synthese-Harz mit einer kurzen Peptidsequenz gekuppelt werden konnten. Auf diese Weise wurden Norstatine nicht direkt durch eine Abfangreaktion mit Aminen sondern über Ester synthetisiert. Die Detektion unerwünschter, durch Racemisierung entstandener Diastereomere konnte durch Veränderung der Acylierungsbedingungen am (Cyanmethylen)phosphoran-Harz vollständig unterdrückt werden. Als Kupplungsreagenzien wurden dabei MSNT/2,6-Lutidin verwendet.

Nach vollständiger Optimierung der Reaktion konnte mit dem neuen Syntheseweg eine Kollektion von 17 nur in ihrem P1-Rest verschiedenen potenziellen Plasmepsin II-Inhibitoren hergestellt werden. Beim Design der zunächst virtuellen Verbindungskollektion wurden im Rahmen einer Kooperation theoretische Methoden angewendet und Docking-Experimente durchgeführt, um für eine Inhibition günstige Strukturelemente herauszuarbeiten. Nach Abschluss der Synthese der Inhibitoren wurden diese gegen Plasmepsin II

aber auch HIV-Protease getestet und zeigten einen deutlichen Einfluss des P1-Restes auf die Hemmwirkung.

Zur Demonstration der breiten Anwendbarkeit des ausgearbeiteten Syntheschemas wurde beispielhaft der Norstatin-Naturstoff Probestin sowie ein Norstatin mit Erkennungssequenz der Cysteinprotease Caspase-3 hergestellt, wobei hier die vorteilhafte Verwendung von TASF zur Verseifung von TMSE-estern gezeigt werden konnte.

Abschließend wurde die bis dahin nicht diastereoselektiv durchgeführte Reduktion der α -Ketotrimethylsilylethylester an einer Modellverbindung der Norstatin-Kollektion mit gängigen Reduktionsmitteln zur diastereoselektiven Durchführung untersucht und L-Selectride als geeignetstes Reduktionsmittel zum Erhalt von *syn*-Produkten identifiziert.

Die Verwendung polymerer Phosphorane hat, durch vorliegende Arbeit inspiriert, bereits eine Erweiterung hin zum System der (Carboxylatmethylen)phosphorane erfahren, welche durch Alkylierung mit Bromessigsäureestern erhalten und nach Deprotonierung ebenfalls acyliert werden können^[306]. Nach Verseifung und Decarboxylierung am Polymer können interessante polymere Peptidyl-WITTIG-Ylide oder nach Phosphoran-Spaltung α -Ketoaldehyde erhalten werden. Damit lässt sich das Konzept über die Norstatine hinaus eventuell auf andere Isostere, z. B. Hydroxyethylamine, aber auch auf Gerüste wie das der Sphingosine oder Chalcone erweitern.

Diese Erweiterung auf die Isoster-Struktur der Hydroxyethylamine war auch Hintergedanke der im zweiten Teil der Dissertation präsentierten Vorarbeiten zur Synthese von α -Hydroxyaldehyden. Dazu wurde die maßgeblich durch LASSALETTA geprägte Verwendung von N,N-Dialkylformaldehydhydrazonen als Formylanion-Äquivalente an die feste Phase übertragen. Ähnlich zweier Dissertationen an den Universitäten Aachen und Darmstadt wurde dazu durch Immobilisierung von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol an MERRIFIELD-Harz und Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe ein SAMP-analoges Hydrazin-Harz hergestellt, wobei im Unterschied zu bekannten Verfahren der gesamte Baustein in Lösung synthetisiert wurde. Nach Hydrazon-Bildung mit Paraformaldehyd oder Formalin konnte das Formaldehydhydrazon-Harz (FH-Harz) erhalten und seine Nucleophilie bei der Reaktion mit Fmoc-Phenylalaninal untersucht werden. Dabei reagierte Fmoc-Phenylalaninal sehr langsam, jedoch in guter Ausbeute. Nach Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe auf die entstandene Hydroxy-Funktion wurde die homologisierte Modellverbindung durch Ozonolyse vom Harz abgespalten und charakterisiert.

Neben der Zielverbindung konnte als Nebenprodukt das durch eine bekannte Nebenreaktion nicht homologisierte Fmoc-Phenylalaninal identifiziert werden.

Die Synthese der Modellverbindung zeigt die grundsätzliche Möglichkeit zum Einsatz nucleophiler, polymerer Formaldehydhydrazone. Zukünftig ist an eine Ausweitung auf beliebige α -Aminoaldehyde, eine Beschleunigung der Reaktion durch einen Katalysator und eine weitere Variation, z. B. durch Peptidsynthese am Hydrazon-Linker, zu denken.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm) und Aldrich (Taufkirchen) in p. a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel DMF, DCM, THF, DMSO, Methanol, Toluol und Diethylether stammen von Fluka (Neu-Ulm). Acetonitril und Methanol zur HPLC- sowie MS-Analytik wurden in LiChrosolv[®] Gradient Grade Qualität von Merck (Darmstadt) oder Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) verwendet. Wasser für die HPLC wurde über eine Milli Q-Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) gewonnen.

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel der Firmen Merck (Darmstadt) und Deutero GmbH (Herresbach) verwendet.

Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol stammte ebenfalls von der Firma Merck (Darmstadt).

Harze wurden von den Firmen Merckbiosciences/Novabiochem (MERRIFIELD-Harz; Läfelfingen, Schweiz), Fluka (Triphenylphosphin-Harz; Neu-Ulm) und PepChem (TCP-Harz; Tübingen) bezogen.

Alle anderen Chemikalien und Reagenzien stammen von ABCR (Karlsruhe), Acros (Ulm), Aldrich (Steinheim), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Fluka (Neu-Ulm), IrisBiotech (Marktredwitz), Lancaster (Mühlheim am Rhein), Merck (Darmstadt), Merckbiosciences/Novabiochem (Läfelfingen, Schweiz) und Senn (Dielsdorf, Schweiz) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

6.2 Geräte und analytische Methoden

6.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatogramme wurden auf DC-PET-Folien-Kieselgel (Schichtdicke 0.25 mm, mittlerer Porendurchmesser 60 Å, 4 x 8 cm) mit Fluoreszenzindikator 254 nm der Firma Fluka durchgeführt. Die Verbindungen wurden mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

detektiert und mit Hilfe wässriger KMnO_4 -Lösung (3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 und 5 ml 5 %-ige NaOH in 300 ml Wasser) entwickelt.

6.2.2 Infrarotspektroskopie (FT-ATR-IR)

FT-ATR-IR-Spektren wurden mit einem Bruker Vector 22 aufgenommen. Das Gerät ist mit einer SplitPea[®]-ATR-Einheit der Firma Harrick versehen. Harze und Verbindungen wurden direkt durch Aufpressen auf einen Si-Kristall vermessen. Bei einem Meßbereich von $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ wurden die Spektren mit 16 Scans aufgenommen, Background- und ATR-Korrektur erfolgten automatisch. Kohlendioxid-Absorptionsbanden wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus den Spektren entfernt.

6.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische HPLC:

System 1: System Gold-Anlage (Beckman, Scan Ramon, USA), bestehend aus einem Autosampler 507, einer programmierbaren Pumpeneinheit 126 und einem Photodiodenarraydetektor 126

System 2: Anlage der Firma Waters (Eschborn), bestehend aus einer Steuerungseinheit 600 S, Pumpeneinheit 626, UV-Detektor 486 sowie einem WISP Autosampler 712

Beide Anlagen sind mit einer analytischen Trennsäule Nucleosil 100 RP- C_{18} (5 μm Korngröße, 250 x 2 mm, Fa. Grom, Rottenburg) ausgestattet. Für die Trennungen wurde ein Gradient von Wasser/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min gefahren. Es wurden, je nach Trennproblem, folgende Gradienten eingesetzt:

- 0 % B auf 100 % B innerhalb 45 min
- 10 % B auf 100 % B innerhalb 45 min

Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 214\text{ nm}$, und die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen errechnet. Eine absolute Gehaltsangabe ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Verbindungen nicht möglich.

Präparative HPLC:

System 1: Anlage der Firma Waters (Eschborn), bestehend aus Pumpeneinheit 600, UV-Detektor 481 und Data Module 740. Die Anlage ist mit einer präparativen Trennsäule Grom-SIL 300 ODS-5 ST RP-C₁₈ (10 µm Korngröße, 250 x 20 mm, Fa. Grom, Rottenburg) ausgestattet.

System 2: Gilson Preparative System (Bad Camberg), bestehend aus Pumpeneinheit 321 und UV/Vis-Detektor 156. Die Anlage ist mit einer präparativen Trennsäule Grom-SIL 120 ODS-4 HE RP-C₁₈ (10 µm Korngröße, 250 x 20 mm, Fa. Grom, Rottenburg) ausgestattet.

Für die Trennungen wurde, wenn nicht anders vermerkt, an beiden Anlagen ein Gradient von Wasser/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 10 ml/min gefahren. Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Die für die Trennung erforderlichen Gradienten wurden mittels analytischer Läufe bestimmt.

6.2.4 Massenspektrometrie (ES-MS)

System 1: Quattro II Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (Micromass, Altrincham, UK) in Verbindung mit einer HPLC-Anlage INTEGRAL™ (Perseptive Biosystems, Weiterstadt). Das HPLC-System wurde so eingestellt, dass während der gesamten Dauer der Analysenserie ein konstanter Fluss von 60 µl/min Acetonitril/Wasser (1:1) (mit 0,1 % Ameisensäure) zum Injektor des GILSON 232X-Probengebers (Abimed, Langenfeld) geliefert wurde. Alle 2 min wurden jeweils 10 µl einer Probe (Konzentration ca. 10 µg/ml) injiziert, die durch den konstanten Lösungsmittelfluss zur Quelle des Quattro II ES-MS transportiert wurden. Die Messungen am MS wurden durch Kontaktschluss des Probengebers gestartet. Die Messparameter jeder Probe [Massenbereich, Messrate, Cone-Spannung (üblicherweise 30-40 V)] wurden zuvor in einer Probenliste der Steuersoftware (MassLynx, Version 2.2, Micromass, Altrincham, UK) des MS editiert. Die Proben wurden in Methanol oder Acetonitril gelöst.

System 2: Esquire 3000plus ES-MS-System (Bruker Daltonics, Bremen). Das Ionenfallen-Massenspektrometer wurde mit der *esquireControl*-Software (Bruker Daltonics Esquire

NT 4.0) gesteuert. Alle MS-Daten wurden mit der Bruker-Software *DataAnalysis* ausgewertet.

6.2.5 HPLC-ES-MS-Kopplung

System 1: Kopplung einer Agilent 1100 HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Waldbronn) mit dem unter 6.2.4/System 2 aufgeführten Esquire 3000plus ES-MS-Spektrometer unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (Korngröße 5 µm, 125 x 4 mm, LiChroCART[®] 125-4 Purospher[®] RP-18 endcapped, VWR, Darmstadt). Für die Trennungen wurde ein Gradient von Wasser/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril/0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min gefahren. Es wurden, je nach Trennproblem, folgende Gradienten eingesetzt:

- 10 % B auf 100 % B innerhalb 10 min, 100 % B für 3 min
- 5 % B auf 25 % B innerhalb 3 min, auf 35 % B innerhalb weiterer 10 min, auf 100 % B innerhalb weiterer 2 min, 100 % B für 2,5 min

System 2: Kopplung einer Agilent 1100 HPLC-Anlage mit einem Massenspektrometer 1100 Series LC/MSD (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (Korngröße 5 µm, Porengröße 100 Å, 70 x 3 mm, Typ CC70/3 Nucleosil 100-5 C18 HD, Macherey-Nagel, Düren). Für die Trennungen wurde ein Gradient von Wasser/5 mmol·l⁻¹ NaCl (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gefahren. Es wurde folgender Standardgradient eingesetzt:

- 10 % B auf 80 % B innerhalb 10 min, 80 % B für 5 min, auf 99 % B innerhalb weiterer 2 min, 99 % B für 3 min

6.2.6 GC-/GC-EI-MS-Analytik zur Konfigurationsbestimmung von α -Hydroxy- β -aminosäure-Bausteinen

Konfigurationsbestimmungen von α -Hydroxy- β -aminosäure-Bausteinen wurden sowohl durch GC als auch durch GC-EI-MS-Kopplung an chiraler Phase durchgeführt.

Im Falle der 3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuren wurden die Untersuchungen durch Vergleich mit Referenzsubstanzen sowohl mit als auch ohne MS-Kopplung vorgenommen,

bei andersartig 4-substituierten 3-Amino-2-hydroxybuttersäuren wurde nur mit GC-EI-MS-Kopplung gearbeitet.

Die zu untersuchenden Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylester wurden totalhydrolysiert (6N HCl, 110 °C, 24 h), die Bestandteile des Hydrolysats zu den Ethylestern derivatisiert (2N HCl/EtOH, 110 °C, 30 min) und die Amino- und Hydroxy-Funktionen trifluoracetyliert (TFAA/DCM, RT, 30 min).

Die Fmoc-Schutzgruppe der verwendeten Referenzsubstanzen wurde mit 10 % Piperidin/DCM abgespalten und anschließend wie oben beschrieben derivatisiert.

GC-System: Gaschromatograph CP 9000 der Fa. Chrompack, Trägergas Wasserstoff, Flammenionisationsdetektor

GC-EI-MS-System: GC-EI-MS-Anlage, bestehend aus einem HP 6890 Series GC-System gekoppelt mit einem Mass Selective Detector HP 5973 (EI-Ionisation) von Hewlett Packard (Waldstetten), Trägergas Helium, Ionendetektion

An beiden Anlagen wurden die derivatisierten Verbindungen an der chiralen Kapillarsäule Chirasil-Val (S871) als stationäre Phase aufgetrennt.

Temperaturprogramm: 80 °C/2 min isotherm/4 °C·min⁻¹/190 °C

6.2.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Eindimensionale ¹H- und ¹³C- sowie zweidimensionale NMR-Spektren wurden an einem Bruker AMX 400 MHz Spektrometer bzw. einem Bruker AVANCE 400 MHz Spektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden DMSO-*d*₆, CDCl₃ und MeOD-*d*₄ verwendet. Die Spektren wurden bei 25 °C aufgenommen.

6.2.8 Mikrowellenunterstützte Synthesen

Mikrowellenunterstützte Synthesen wurden auf einem SmithSynthesizerTM (Personal Chemistry, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Es handelt sich um ein Single-Mode Gerät, dessen Steuerung Software-unterstützt erfolgt. Das Probenvolumen beträgt 0,5-5 ml in mit Septen verschlossenen, druckstabilen Reaktionsgefäßen. Ein Magnetron mit einer Leistung

von 15-300 W erzeugt Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2,45 GHz. Der Temperaturbereich erstreckt sich von 60-250 °C bei einer Heizrate von 2-5 °C/min. Der zulässige Druck im Inneren der Reaktionsgefäße beträgt 20 bar. Während der Reaktion wird die Temperatur im Reaktionsgefäß durch kurze Mikrowellenpulse konstant gehalten. Schnelles Abkühlen nach der Reaktion wird mit Druckluft erreicht.

6.2.9 KAISER-Test

Die Vollständigkeit von Acylierungsreaktionen auf primäre Amine bei der Bildung von Peptidbindungen sowie der Hydrazon-Bildung an AP-Harz wurde mittels KAISER-Test (Nachweis primärer Amine mit Ninhydrin) untersucht.

Für den KAISER-Test wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

Lösung I: 50 µl einer 0,01M wässrigen KCN-Lösung werden mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt.

Lösung II: 5 g Ninhydrin werden in 100 ml *n*-Butylalkohol gelöst.

Lösung III: 80 g Phenol werden in 20 ml *n*-Butylalkohol gelöst.

Zur Durchführung werden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Sind freie Amino-Gruppen vorhanden, so tritt Blaufärbung der Lösung auf.

6.2.10 Ermittlung der Harzbelegung durch UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung

Die UV-Spektren zur quantitativen Fmoc-Bestimmung wurden an einem Lambda-5 UV/VIS-Spektrometer von Perkin-Elmer (Überlingen) aufgenommen.

Dazu wurden Proben (5-10 mg) des gewaschenen und getrockneten Harzes entnommen, exakt in einem 10 ml-Maßkolben eingewogen, mit 20 % Piperidin/DMF bis zur Eichmarke aufgefüllt und für ca. 30 min geschüttelt.

Am UV-Spektrometer wird im Wellenlängenbereich von 250-320 nm zunächst mit reinem Piperidin/DMF eine Hintergrundkorrektur durchgeführt und dann die Abspaltung gegen diese Referenz vermessen. Die Extinktionswerte an den drei Absorptionsmaxima des

UV-Spektrums bei $\lambda_1 = 267 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 289 \text{ nm}$ und $\lambda_3 = 301 \text{ nm}$ werden nach folgender Gleichung ausgewertet:

$$x \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{100000 \cdot E_\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot (\text{Einwaage})}$$

x = Harzbelegung

E_λ = Extinktion

ε_λ = Extinktionskoeffizient

(Einwaage) = Harzmenge in [mg]

Dabei werden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\varepsilon_{267} = 17500 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{289} = 5800 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{301} = 7800 \text{ cm}^{-1}$$

Die Harzbelegung ergibt sich durch Mittelung über die drei bei den unterschiedlichen Wellenlängen berechneten Werte.

6.2.11 Ozonolyse

Ozon zur Durchführung der Ozonolysen wurde mit einem Ozon-Generator 502 von Fischer Technology erzeugt.

6.2.12 Polarimetrie

Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer Polarimeter, Modell 241 vermessen. Die Küvettenlänge beträgt 10 cm und der angegebene spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ bezieht sich auf die Konzentration 1 g/100 ml in Chloroform bei 20 °C, Natrium-D-Linie (589 nm).

6.3 Polymere (Cyanmethylen)phosphorane

6.3.1 Synthese von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (85)

Alkylierung von Triphenylphosphin-Harz mit Bromacetonitril zum (Cyanmethylen)-triphenylphosphoniumbromid-Harz (84)

Triphenylphosphin-Harz (0.5 g, 1.6 mmol/g, 0.8 mmol, 1 % Divinylbenzol, 100-200 mesh, Fluka) wird in ein MW-Vial eingewogen und in wasserfreiem Toluol (4 ml) suspendiert. Nach Zugabe von Bromacetonitril (266 μ l, 4 mmol, 5 eq.) wird das Reaktionsgefäß verschlossen und durch Mikrowellen für 15 min auf 150 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird das Reaktionsgefäß geöffnet, das Harz filtriert, mit wasserfreiem Toluol, DCM und Diethylether gewaschen (je 3 x) und im Vakuum getrocknet. Das Harz wird durch EA und FT-ATR-IR charakterisiert.

▪ (Cyanmethylen)triphenylphosphoniumbromid-Harz (84):

EA: N-Analyse (%): ber.: 1,88; gef.: 1,83 (97 %)

ATR-IR: $\nu = 3381, 3053, 3024, 2922, 2853, 2781, 2692, 2249, 1756, 1598, 1492, 1452, 1438, 1181, 1112, 843, 746, 699, 546, 499 \text{ cm}^{-1}$

Deprotonierung von (Cyanmethylen)triphenylphosphoniumbromid-Harz (84) zum (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (85)

Das erhaltene (Cyanmethylen)triphenylphosphoniumbromid-Harz (0.8 mmol) wird in wasserfreiem DCM (5 ml) suspendiert und mit Triethylamin (558 μ l, 4 mmol, 5 eq.) versetzt. Die Mischung wird 2 h bei RT geschüttelt, filtriert, mit MeOH, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Harz wird durch EA und FT-ATR-IR charakterisiert.

▪ (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (85):

EA: Br-Analyse (%): ber.: 0,0; gef.: 1,32 (mind. 90 %)

ATR-IR: $\nu = 3056, 3025, 2926, 2854, 2149, 1750, 1599, 1492, 1452, 1437, 1256, 1185, 1107, 851, 748, 697, 569, 540, 508 \text{ cm}^{-1}$

6.3.2 Synthese von α -Hydroxymethylestern, α -Hydroxyamiden und α -Ketosäuren

6.3.2.1 Acylierung von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz und Peptidsynthese

Acylierung von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz mit Fmoc-Aminosäuren unter EDC/DMAP-Aktivierung (Methode A)

(Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (100 mg, 1.51 mmol/g, 0.151 mmol) wird in wasserfreiem DCM vorgequollen. In einem PP-Röhrchen werden die Fmoc-Aminosäure (0.755 mmol, 5 eq.), EDC (145 mg, 0.755 mmol, 5 eq.) und DMAP (14 mg, 0.113 mmol, 0.75 eq.) eingewogen und in wasserfreiem DCM (3 ml) gelöst. Die Lösung wird zum Polymer gegeben und 12 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration und gründlichem Waschen mit MeOH, DMF, THF und DCM wird das Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz im Vakuum getrocknet und durch Fmoc-Bestimmung sowie FT-ATR-IR charakterisiert.

- Exemplarisch für die Acylierung mit Fmoc-Phe-OH:

ATR-IR: $\nu = 3404, 3058, 3025, 2921, 2852, 2175, 1719, 1591, 1493, 1451, 1438, 1355, 1241, 1178, 1108, 1030, 756, 740, 698, 538, 505 \text{ cm}^{-1}$

Standard-Fmoc-Peptidsynthese am Phosphoran-Linker

Der Amino-Terminus des mit der ersten Fmoc-Aminosäure acylierten (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harzes wird durch Behandlung mit 20 % Piperidin/DMF für 2 x 6 min entschützt. Das Harz wird gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Die jeweilige Fmoc-Aminosäure (5 eq.) wird mit HOBt·H₂O (5 eq.) in ein PP-Röhrchen eingewogen, in wasserfreiem DMF gelöst und mit DIC (5 eq.) versetzt. Nach 5 min Voraktivierung wird die klare Lösung zum Polymer gegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration, gründlichem Waschen mit MeOH, DMF, THF und DCM wird das Harz getrocknet oder erneut der Amino-Terminus entschützt und die Prozedur mit der nächsten Aminosäure wiederholt. Die vollständige Umsetzung kann ab der zweiten, nach diesem Verfahren gekuppelten Aminosäure mit dem KAISER-Test überprüft werden (vgl. Kap. 3.2.4).

Acetylierung/Capping nach Festphasen-Peptidsynthese

Nach Entschützung des Amino-Terminus der letzten gekuppelten Aminosäure mit 20 % Piperidin/DMF wird das Polymer gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Anschließend wird mit wasserfreiem DMF/Ac₂O/DIEA (8:1:1) versetzt und 2 x für jeweils 30 min bei RT geschüttelt. Das Polymer wird filtriert, gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen, im Vakuum getrocknet und gegebenenfalls mit dem KAISER-Test überprüft.

6.3.2.2 Oxidative Abspaltungen vom Phosphoran-Linker mit Ozon und Reduktion der Abspaltprodukte

Allgemeine Vorschrift zur oxidativen Abspaltung zu α -Ketomethylestern

Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz bzw. Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz wird zusammen mit einem Rührfisch in ein SCHLENK-Rohr mit Drehverschluss, Teflon-Septum und -Dichtung eingefüllt, mit wasserfreiem DCM und MeOH (2:1, 30 ml/g Harz) versetzt, auf -78 °C gekühlt und gerührt. Über eine Kanüle wird Ozon aus einem Ozon-Generator in gleichmäßigem Strom durch die Suspension geleitet bis eine Blaugrün-Färbung das Ende der Reaktion anzeigt (ca. 10 min). Überschüssiges Ozon wird durch einen Stickstoff-Strom unter weiterer Kühlung entfernt (ca. 5 min), wobei die Suspension wieder farblos wird. Die Mischung wird nach Erwärmen auf RT für weitere 4 h gerührt, das Harz abfiltriert, mit DCM und MeOH gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Die so erhaltenen Rohprodukte werden aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und anschließend mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert.

Exemplarische NMR-Daten:

▪ Fmoc-Leu-COOMe (**113**):

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.39-7.42 (m, 2H), 7.30-7.34 (m, 2H), 5.23 (d, 1H), 5.05 (dd, 1H), 4.40-4.47 (m, 2H), 4.22 (t, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.64-1.74 (m, 2H), 1.38-1.49 (m, 1H), 1.01 (d, 3H), 0.95 (d, 3H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 193.04, 160.83, 156.12, 143.73, 141.44, 127.86, 127.21, 125.16, 120.12, 67.25, 56.04, 53.32, 47.26, 40.23, 25.13, 23.33, 21.49

▪ Fmoc-Asp(OtBu)-COOMe (**117**):

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.39-7.42 (m, 2H), 7.30-7.33 (m, 2H), 5.85 (d, 1H), 5.05 (dd, 1H), 4.35-4.45 (m, 2H), 4.24 (t, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.90-3.15 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)

▪ Fmoc-Asn(Trt)-COOMe (**118**):

¹H-NMR (400.16 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 8.16 (s, 1H), 7.85 (d, 2H), 7.69 (d, 2H), 7.21-7.43 (m, 19H), 6.80 (d, 1H), 4.98 (dd, 1H), 4.31-4.40 (m, 2H), 4.24 (t, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.10-3.23 (m, 2H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 191.42, 169.92, 162.31, 156.71, 145.73, 144.95, 142.07, 129.74, 128.54, 128.38, 127.96, 127.48, 126.08, 120.81, 71.30, 67.46, 55.36, 52.95, 47.88, 39.13

▪ Ac-Asp(OtBu)-Val-Phe-COOMe (**121**):

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃): δ = 6.84-7.24 (m, 8H), 5.27 (dd, 1H), 4.70 (dd, 1H), 4.13 (dd, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.90-3.19 (m, 2H), 2.55-2.72 (m, 2H), 2.02-2.14 (m, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 0.68-0.80 (m, 6H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 191.59, 171.57, 171.05, 170.92, 170.81, 160.91, 135.42, 129.41, 128.88, 127.41, 82.27, 58.61, 56.70, 53.27, 49.79, 36.81, 36.66, 30.13, 28.15, 23.17, 19.25, 17.43

Allgemeine Vorschrift zur oxidativen Abspaltung zu α-Ketosäuren

Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz bzw. Peptidyl-α-keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz wird zusammen mit einem Rührfisch in ein SCHLENK-Rohr mit Drehverschluss, Teflon-Septum und -Dichtung eingefüllt, mit wasserfreiem DCM (30 ml/g Harz) versetzt, auf -78 °C gekühlt und gerührt. Über eine Kanüle wird Ozon aus einem Ozon-Generator in gleichmäßigem Strom durch die Suspension geleitet bis eine Blaugrün-Färbung das Ende der Reaktion anzeigt (ca. 10 min). Überschüssiges Ozon wird durch einen Stickstoff-Strom unter weiterer Kühlung entfernt (ca. 5 min). Die Mischung wird mit THF/Wasser (3:1) gequenchet, die Kühlung entfernt und nach Erwärmen auf RT filtriert.

Das Harz wird mit THF nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und anschließend mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert.

Allgemeine Vorschrift zur oxidativen Abspaltung zu α -Ketoamiden

Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz bzw. Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz wird zusammen mit einem Rührfisch in ein SCHLENK-Rohr mit Drehverschluss, Teflon-Septum und -Dichtung eingefüllt, mit wasserfreiem DCM (30 ml/g Harz) versetzt, auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und gerührt. Über eine Kanüle wird Ozon aus einem Ozon-Generator in gleichmäßigem Strom durch die Suspension geleitet bis eine Blaugrün-Färbung das Ende der Reaktion anzeigt (ca. 10 min). Überschüssiges Ozon wird durch einen Stickstoff-Strom unter weiterer Kühlung entfernt (ca. 5 min). Über eine Spritze wird die auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlte Lösung eines Amins in DCM (1.5 eq. bezüglich der durch Fmoc-Bestimmung bestimmten Beladung des abzuspaltenden Harzes) zugegeben, für 30 min unterer weiterer Kühlung und für weitere 2 h nach Erwärmung auf RT gerührt. Überschüssiges Amin wird durch Zugabe von makroporösem MP-Anhydrid-Harz (5.8 mmol/g, 7.5 eq., Merckbiosciences/Novabiochem) und Erwärmen des dicht verschlossenen Reaktionsgefäßes auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 12 h entfernt. Nach Abkühlen auf RT werden die Harze abfiltriert, mit DCM nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und anschließend mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert.

Allgemeine Vorschrift zur Reduktion von α -Ketomethylestern und α -Ketoamiden mit polymerem Borhydrid

Die abgespaltenen α -Ketomethylester bzw. α -Ketoamide werden in DCM/MeOH (1:1) gelöst. Zur Lösung wird Borhydrid-Harz (3.2 mmol/g, 10 eq., Merckbiosciences/Novabiochem) zugegeben und 12 h bei RT gerührt. Das verbrauchte Borhydrid-Harz wird abfiltriert, mit DCM und MeOH nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die so erhaltenen Rohprodukte werden aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet, mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert und schließlich durch präparative HPLC aufgereinigt (keine Diastereomerentrennung möglich).

Exemplarische NMR-Daten:

- [2(*RS*),3*S*]-3-(Acetylamino)-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuremethylester (**113**):

zwei Diastereomere *Dia 1* (2*S*,3*S*) und *Dia 2* (2*R*,3*S*), 45:55 (vgl. Kap. 3.7.3)

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃):

Dia 1: δ = 7.20-7.34 (m, 5H), 5.99 (d, 1H), 4.64-4.71 (m, 1H), 4.35 (d, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.78-2.86 (m, 2H), 1.95 (s, 3H)

Dia 2: δ = 7.20-7.34 (m, 5H), 5.99 (d, 1H), 4.57-4.64 (m, 1H), 4.11 (d, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.91-3.00 (m, 2H), 1.94 (s, 3H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃):

Dia 1: δ = 173.05, 170.53, 136.98, 129.47, 128.57, 126.91, 72.25, 53.10, 52.69, 35.38, 23.21

Dia 2: δ = 174.32, 170.26, 137.39, 129.47, 128.76, 126.91, 70.19, 53.10, 52.98, 38.04, 23.18

- *N*-[Ac-Asp(OtBu)-Val-]-[2(*RS*),3*S*]-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuremethylester (**113**):

zwei Diastereomere *Dia 1* (2*S*,3*S*) und *Dia 2* (vermutlich 2*R*,3*S*), 40:60 (vgl. Kap. 3.7.3)

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃):

Dia 1: δ = 6.97-7.13 (m, 5H), 6.93 (d, 1H), 6.91 (d, 1H), 6.63 (d, 1H), 4.56-4.63 (m, 1H), 4.42-4.50 (m, 1H), 4.13 (d, 1H), 3.92-4.00 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.60-2.65 (m, 2H), 2.46-2.52 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.84-1.98 (m, 1H), 1.28 (s, 9H), 0.67 (d, 3H), 0.56 (d, 3H)

Dia 2: δ = 6.97-7.13 (m, 5H), 6.99 (m, 2H), 6.67 (d, 1H), 4.56-4.63 (m, 1H), 4.37-4.46 (m, 1H), 3.94 (d, 1H), 3.92-4.00 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 2.74-2.79 (m, 2H), 2.59-2.63 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.84-1.98 (m, 1H), 1.28 (s, 9H), 0.64 (d, 3H), 0.62 (d, 3H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃):

Dia 1: δ = 172.84, 171.66, 171.54, 171.24, 171.12, 136.90, 129.46, 128.60, 126.97, 82.57, 72.16, 59.67, 53.51, 52.78, 50.04, 36.75, 35.30, 29.98, 28.17, 22.98, 19.26, 17.47

Dia 2: $\delta = 173.95, 171.74, 171.55, 171.32, 171.12, 137.16, 129.51, 128.79, 127.01, 82.57, 70.31, 59.92, 53.46, 53.00, 49.95, 37.92, 36.75, 30.02, 28.17, 22.98, 19.16, 17.71$

- *N*-{[1*S*,2(*RS*)]-1-benzyl-2-hydroxy-3-oxo-3-(1-piperidinyl)-propyl}-acetamid (**113**):

zwei Diastereomere *Dia 1* und *Dia 2*, 60:40

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl₃):

Dia 1: $\delta = 7.14-7.36$ (m, 5H), 6.19 (d, 1H), 4.62 (d, 1H), 4.41-4.44 (m, 1H), 3.46-3.62 (m, 2H), 3.49-3.57 (m, 2H), 2.71-2.80 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.35-1.73 (m, 6H)

Dia 2: $\delta = 7.14-7.36$ (m, 5H), 6.09 (d, 1H), 4.26 (d, 1H), 4.41-4.44 (m, 1H), 3.35-3.50 (m, 2H), 2.92-3.00 (m, 2H), 2.80-2.98 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.35-1.73 (m, 6H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃):

Dia 1: $\delta = 171.82, 169.18, 137.34, 129.04, 128.71, 126.90, 69.76, 52.89, 46.24, 44.23, 33.69, 26.57, 25.58, 24.41, 22.94$

Dia 2: $\delta = 171.64, 170.07, 137.34, 129.50, 128.95, 127.19, 66.60, 52.61, 45.68, 44.23, 38.63, 25.69, 25.22, 24.32, 22.94$

6.3.3 Synthese einer Norstatin-Verbindungskollektion

6.3.3.1 Aufbau polymerer Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)phosphorane

Acylierung von (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz mit Fmoc-Aminosäuren unter MSNT/2,6-Lutidin-Aktivierung (Methode B)

(Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (200 mg, 1.51 mmol/g, 0.302 mmol) wird in wasserfreiem DCM vorgequollen. In jeweils ein PP-Röhrchen wird die Fmoc-Aminosäure (0.755 mmol, 2.5 eq.) bzw. MSNT (224 mg, 0.755 mmol, 2.5 eq.) eingewogen. Die Fmoc-Aminosäure wird in wasserfreiem DCM (4 ml) suspendiert und durch Zugabe von 2,6-Lutidin (84 μ l, 0.725 mmol, 2.4 eq.) gelöst. Das vorbereitete MSNT wird zugesetzt, ebenfalls gelöst, die klare Lösung direkt zum Polymer gegeben und 45 min bei RT geschüttelt. Nach Filtration und Waschen mit wasserfreiem DCM (3 x) wird die Prozedur nochmals wiederholt. Nach der Doppelkupplung wird das Harz gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Kupplungsausbeuten

der einzelnen Fmoc-Aminosäuren und damit die später abspaltbare Stoffmenge werden durch photometrische Fmoc-Bestimmung erhalten.

Anmerkung: Bei der Acylierung mit Fmoc-4-nitro-phenylalanin wird als Base DIEA (124 μ l, 0.725 mmol, 2.4 eq.) verwendet.

Kupplung von Fmoc-Valin und Benzoesäure

Das mit der ersten Fmoc-Aminosäure beladene Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (ursprünglich 0.302 mmol) wird gemäß der Vorschrift in Kap. 6.3.2.1 mit Fmoc-Valin (512 mg, 1.51 mmol, 5 eq.) und Benzoesäure (184 mg, 1.51 mmol, 5 eq.) in zwei Schritten unter Verwendung von jeweils HOBt·H₂O (231 mg, 1.51 mmol, 5 eq.) und DIC (234 μ l, 1.51 mmol, 5 eq.) zum Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz verlängert.

6.3.3.2 Oxidative Abspaltung von Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethern und Reduktion (Verbindungen IH Xa,b-E)

Herstellung von DMDO-Lösung

In einem 250 ml-Dreihalskolben wird Natriumhydrogencarbonat (12 g) in Wasser (12 ml) und Aceton (13 ml, 177 mmol) suspendiert und effektiv gerührt. Der Kolben wird über ein gebogenes Glasrohr als Destillationsbrücke mit einem Kühlmantel verbunden, welcher mit einer Aceton/Trockeneis-Mischung auf -78 °C gekühlt wird. Als Auffangkolben dient ein 50 ml-Stickstoff-Kolben, der ebenfalls auf -78 °C heruntergekühlt wird. Nach Zugabe von Oxon (25 g, 41 mmol) in einer Portion wird der Dreihalskolben verschlossen und am Stickstoff-Kolben ein schwaches Vakuum (240 mbar) angelegt. Es wird für ca. 30 min destilliert. Man erhält ca. 12 ml einer hellgelben Lösung, die bei -20 °C aufbewahrt und möglichst umgehend verwendet wird.

Gehaltsbestimmung von DMDO-Lösung durch ¹H-NMR-Spektroskopie

Es wird durch genaues Einwiegen von Thioanisol in einen 10 ml-Maßkolben und exaktes Auffüllen bis zur Eichmarke mit Aceton-*d*₆ eine Thioanisol-Maßlösung im Konzentrationsbereich von 0.5-0.6 mmol/ml angesetzt. Eine Probe der zu untersuchenden DMDO-Lösung (1 ml) wird mit der Maßlösung (0.4 ml) in einem Eppendorf-Cup versetzt, 5 min stehen

gelassen und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Aus dem Verhältnis der Integrale der Protonensignale im Phenyl-Bereich (Thioanisol $\delta = 7.1-7.3$, entsprechendes Sulfoxid $\delta = 7.6-7.9$) und unter der Annahme, dass DMDO komplett abreagiert hat, lässt sich die Konzentration der DMDO-Lösung errechnen. Die mit obiger Vorschrift hergestellten, verwendeten DMDO-Lösungen hatten eine mittlere Konzentration von 0.072 mmol/ml.

Oxidative Abspaltung mit DMDO/Trimethylsilylethanol

Das Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (ursprünglich 0.302 mmol) wird in einem 50 ml-Kolben mit wenig wasserfreiem DCM vorgequollen. Zum Harz wird Trimethylsilylethanol gegeben (0.892-1.138 ml, 6.25-7.97 mmol, 30 eq.) und vorsichtig gerührt, wobei sich die genau verwendete Menge des Alkohols auf die jeweils bestimmte Ausbeute im Acylierungsschritt des (Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harzes bezieht (\rightarrow 0.208-0.266 mmol). Anschließend wird mit DMDO-Lösung (12 ml, ca. 0.072 mmol/ml, 0.864 mmol, 3.2-4.1 eq.) versetzt und bei 0 °C für 30 min gerührt, wobei die Orangefärbung des Harzes allmählich verblasst. Das überschüssige DMDO wird zusammen mit Aceton und DCM vorsichtig unter möglichst geringer Erwärmung des Kolbens im Vakuum entfernt und das Abspaltprodukt im höhersiedenden Alkohol aufkonzentriert. Die Suspension wird in 4 ml DCM aufgenommen, das Harz über eine Kunststoff-Fritte abfiltriert und noch je mit 1 x 4 ml DCM und 2 x 4 ml EtOH gewaschen. Das dadurch in DCM/EtOH (1:1) und Trimethylsilylethanol gelöste Abspaltprodukt wird direkt weiter umgesetzt (s. u.).

Reduktion mit Natriumborhydrid

Den folgenden Ansatzberechnungen liegt eine angenommene Abspaltungsausbeute von 80 % zu Grunde: Das in DCM/EtOH (1:1) und Trimethylsilylethanol gelöste Abspaltprodukt (s. o.) wird auf 0 °C gekühlt. Natriumborhydrid (4-5 mg, 0.104-0.133 mmol, 0.625 eq.) gelöst in 0.5 ml EtOH wird zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Die klare Lösung wird auf RT erwärmt und durch eine dünne Schicht Kieselgel filtriert, um anorganische Salze zu entfernen. Nach Entfernen von DCM und EtOH im schwächeren Vakuum wird das höher siedende Trimethylsilylethanol mit einer Ölpumpe entfernt, die Probe aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert. Bei einer Verbindung (**IH 1a,b-E**) wurde zur Strukturaufklärung eine

Trennung der Diastereomere mittels präparativer HPLC vorgenommen und die Konfiguration mit GC-Chromatographie zugeordnet.

Anmerkung zu Verbindung **IH 12a,b-E** (Sequenz mit Tryptophan): Bei dieser Abspaltung wird eine äquimolare Menge DMDO eingesetzt (genaue Konzentrationsbestimmung der DMDO-Lösung), welche über 30 Minuten mit Hilfe einer Spritzenpumpe unter Rühren zugetropft wird. Das Abspaltprodukt wird vor weiterer Umsetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

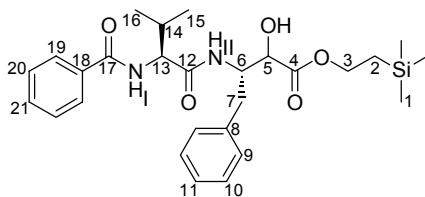
- Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethylester **IH Xa,b-E**:

MS (ES):

Tab. 6-1: ES-MS-Daten der synthetisierten Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethylester **IH Xa,b-E**.

Bezeichnung	$[M + Na]^+$ ^[a]	Bezeichnung	$[M + Na]^+$ ^[a]
IH 1a,b-E	521,3	IH 9a,b-E	557,2
IH 2a,b-E	521,2	IH 10a,b-E	566,2
IH 3a,b-E	527,2	IH 11a,b-E	599,2/601,2 ^[b]
IH 4a,b-E	571,4	IH 12a,b-E	660,3
IH 5a,b-E	571,2	IH 13a,b-E	485,4
IH 6a,b-E	535,2	IH 14a,b-E	551,2
IH 7a,b-E	597,2	IH 15a,b/16a,b-E	593,3
IH 8a,b-E	535,4	IH 17a,b-E	636,3

^[a] aus LC-ES-MS-Messungen an der unter 6.2.5/System 2 beschriebenen Anlage, welche Säure-frei betrieben wird \rightarrow Na-Addukte; ^[b] Brom-Isotope.



- *N*-(Bz-Val)-(*2S,3S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuretrimethylsilylethylester (**IH 1a-E**):

¹H-NMR (400.16 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.09 (d, ³J = 9.09 Hz, 1H, NH_I), 7.89 (d, ³J = 8.84 Hz, 1H, NH_{II}), 7.84 (d, ³J = 7.58 Hz, 2H, arom. CH), 7.46-7.56 (m, 3H, arom. CH), 7.05-7.17 (m, 5H, arom. CH), 5.81 (d, ³J = 6.06 Hz, 1H, α-CHOH), 4.28-4.37 (m, 1H, β-CH), 4.23 (dd, ³J = 8.59 Hz, ³J = 8.59 Hz, 1H, α-CH Val), 3.96-4.04 (m, 1H, α-CHOH), 3.92-4.13 (m, 2H, OCH₂), 2.64-2.80 (m, 2H, γ-CH₂), 1.92-2.02 (m, 1H, β-CH Val), 0.87-0.98 (m, 2H, SiCH₂), 0.81 (d, ³J = 6.57 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.72 (d, ³J = 6.57 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.01 [s, 9H, Si(CH₃)₃]

¹³C-NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.22 (C₄), 170.41 (C₁₂), 166.20 (C₁₇), 138.45 (C₈), 134.41 (C₁₈), 131.26 (C₂₁), 129.20 (C₉), 128.23 (C₁₀), 127.92 (C₁₉), 127.48 (C₂₀), 125.93 (C₁₁), 72.43 (C₅), 62.34 (C₃), 59.11 (C₁₃), 52.67 (C₆), 35.01 (C₇), 30.20 (C₁₄), 19.29, 18.69 (C₁₅ u. C₁₆), 16.86 (C₂), -1.52 (C₁)

- *N*-(Bz-Val)-(*2R,3S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbuttersäuretrimethylsilylethylester (**IH 1b-E**):

¹H-NMR (400.16 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.16 (d, ³J = 8.59 Hz, 1H, NH_I), 7.86 (d, ³J = 7.33 Hz, 2H, arom. CH), 7.76 (d, ³J = 9.35 Hz, 1H, NH_{II}), 7.44-7.57 (m, 3H, arom. CH), 7.09-7.23 (m, 5H, arom. CH), 5.62 (d, ³J = 6.06 Hz, 1H, α-CHOH), 4.30-4.38 (m, 1H, β-CH), 4.25 (dd, ³J = 8.34 Hz, ³J = 8.34 Hz, 1H, α-CH Val), 3.97-4.04 (m, 1H, α-CHOH), 3.99-4.09 (m, 2H, OCH₂), 2.64-2.89 (m, 2H, γ-CH₂), 1.99-2.09 (m, 1H, β-CH Val), 0.85-0.95 (m, 2H, SiCH₂), 0.84 (d, ³J = 6.56 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.79 (d, ³J = 6.56 Hz, 3H, CH₃ Val), -0.03 [s, 9H, Si(CH₃)₃]

¹³C-NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.29 (C₄), 170.43 (C₁₂), 166.33 (C₁₇), 138.38 (C₈), 134.42 (C₁₈), 131.24 (C₂₁), 129.11 (C₉), 128.20 (C₁₀ u. C₁₉), 127.50 (C₂₀), 126.15 (C₁₁), 70.36 (C₅), 62.32 (C₃), 59.03 (C₁₃), 53.08 (C₆), 37.08 (C₇), 29.87 (C₁₄), 19.34, 18.54 (C₁₅ u. C₁₆), 16.77 (C₂), -1.55 (C₁)

6.3.3.3 Umsetzung von Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethern zu Norstatinen (Verbindungen IH Xa,b)

Beladung von TCP-Harz mit Fmoc-Aminosäuren

Trockenes Tritylchlorid-PS-Harz (TCP-Harz, 1 g, 1.5 mmol/g, 1.5 mmol, Pepchem) wird in eine Filtersäule mit Kunststoff-Fritte eingewogen. Die Fmoc-Aminosäure (für Fmoc Leucin: 531 mg, 1.5 mmol, 1 eq.) wird in DCM (10 ml) unter Zusatz von DIEA (770 μ l, 4.5 mmol, 3 eq.) gelöst und die Lösung direkt zum TCP-Harz gegeben. Der Suspension wird soviel DCM zugesetzt, dass sie sich beim Schütteln gut durchmischt. Nach 1 h bei RT wird zum Capping der verbliebenen Tritylchlorid-Funktionen wasserfreies MeOH (3 ml) zugegeben und für weitere 15 min geschüttelt. Nach Filtration wird mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen.

Zur Beladungskontrolle wird eine quantitative Fmoc-Bestimmung durchgeführt. Mit Fmoc-Leucin wurde eine Beladung von 0.81 mmol/g (80 %) erzielt.

Peptidsynthese am mit Fmoc-Aminosäure vorbelegten TCP-Harz

Der Amino-Terminus des vorbelegten TCP-Harzes [für Fmoc-Leu-TCP-Harz (s. o.): 1.2 mmol] wird durch Behandlung mit 20 % Piperidin/DMF für 2 x 6 min entschützt. Das Harz wird gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Die jeweilige Fmoc-Aminosäure (für Leu-TCP-Harz Fmoc-Alanin: 1.98 g, 6 mmol, 5 eq.) wird mit HOBt \cdot H₂O (für TCP-Leu-Harz: 919 mg, 6 mmol, 5 eq.) in ein PP-Röhrchen/Falcon eingewogen, in wasserfreiem DMF gelöst und mit DIC (für Leu-TCP-Harz: 930 μ l, 6 mmol, 5 eq.) versetzt. Nach 5 min Voraktivierung wird die klare Lösung zum Polymer gegeben und für 3 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration, gründlichem Waschen mit MeOH, DMF, THF und DCM wird das Harz getrocknet oder erneut der Amino-Terminus entschützt und die Prozedur mit der nächsten Aminosäure wiederholt.

TBAF-Verseifung von Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylethern IH Xa,b-E

Der Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylester **IH Xa,b-E** (0.119-0.187 mmol) wird in wasserfreiem DMF (2 ml) gelöst. Der Lösung wird TBAF-Trihydrat (113-177 mg, 0.357-0.561 mmol, 3 eq.) zugesetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Lösung der entstehenden Peptidyl- α -hydroxysäure wird direkt für den nächsten Reaktionsschritt (s. u.) verwendet.

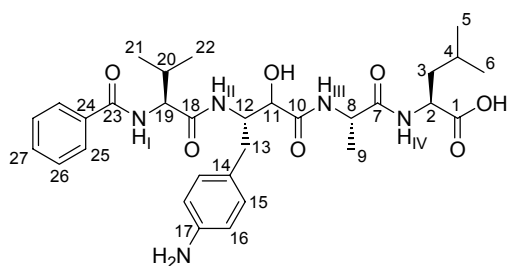
Kupplung von Peptidyl- α -hydroxysäuren auf Ala-Leu-TCP-Harz und Abspaltung

Zur in trockenem DMF zusammen mit TBAF-Trihydrat vorliegenden Peptidyl- α -hydroxysäure (s. o.) (0.119-0.187 mmol) wird EDC (27-43 mg, 0.143-0.224 mmol, 1.2 eq.) und HOBt·H₂O (22-34 mg, 0.143-0.224 mmol, 1.2 eq.) gegeben. In einer Kunststoffspritze mit Fritte wird Fmoc-Ala-Leu-TCP-Harz (103-160 mg, 0.78 mmol/g, 0.080-0.125 mmol, 0.67 eq.) eingewogen, die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin/DMF 2 x 6 min abgespalten, das Harz gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und in wasserfreiem DMF geschüttelt. Zum vorbereiteten Harz wird die Lösung der aktivierten Peptidyl- α -hydroxysäure zugegeben und 12 h bei RT geschüttelt. Es wird abfiltriert, gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Norstatin-Produkt **IH Xa,b** wird durch Behandlung mit 20 % HFIP/DCM für 3 x 20 min vom TCP-Harz abgespalten, die Abspalllösungen vereinigt und im Vakuum eingengt. Produkte mit säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen werden zusätzlich in 95 % TFA/5 % Wasser aufgenommen und 2 x 1 h entschützt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und durch präparative HPLC aufgereinigt. Alle Produkte werden durch HPLC, LC-ES-MS, ES-MS und NMR charakterisiert.

Norstatine **IH Xa,b**:**MS (ES):****Tab. 6-2:** ES-MS-Daten der synthetisierten Norstatine **IH Xa,b**.

Bezeichnung	[M + Na] ⁺ [a]	Bezeichnung	[M + Na] ⁺ [a]
IH 1a,b	605,5	IH 10a,b	650,3
IH 2a,b	605,4	IH 11a,b	683,4/685,2 ^[b]
IH 3a,b	611,5	IH 12a,b	644,4
IH 4a,b	655,4	IH 13a,b	569,4
IH 5a,b	655,5	IH 14a,b	635,4
IH 6a,b	619,4	IH 15a,b	677,5
IH 7a,b	681,3	IH 16a,b	621,4
IH 8a,b	619,4	IH 17a	598,4 ^[c]
IH 9a,b	641,4	IH 17b	598,4 ^[c]

^[a] aus ES-MS-Messungen an der unter 6.2.4/System 2 beschriebenen Anlage, welche unter Zusatz von TFA betrieben wird, Na-Addukte zeigen jedoch das intensivere Signal (außer **IH 17a** und **IH 17b**; ^[b] Brom-Isotope; ^[c] [M + H]⁺.



- *N*-[*N*-(Bz-Val)-(2*S*,3*S*)-3-amino-4-(4-aminophenyl)-2-hydroxybutanoyl]-Ala-Leu-OH bzw. Bz-Val-(4-NH₂-Phe)-ψ[(*S*)-CHOH-CO-NH]-Ala-Leu-OH (**IH 17a**):

¹H-NMR (400.16 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.30 (d, ³J = 7.83 Hz, 1H, NH_{IV}), 8.14 (d, ³J = 9.09 Hz, 1H, NH_I), 7.81-7.91 (m, 3H, arom. CH C₂₅, NH_{II}), 7.78 (d, ³J = 7.33 Hz, 1H, NH_{III}), 7.45-7.58 (m, 3H, arom. CH C_{26,27}), 7.09 (d, ³J = 8.34 Hz, 2H, arom. CH C₁₅), 6.85 (d, ³J = 8.09 Hz, 2H, arom. CH C₁₆), 6.07 (bs, 1H, α-CHOH), 4.30-4.43 (m, 2H, α-CH Ala C₈, β-CH C₁₂), 4.15-4.29 (m, 2H, α-CH Leu C₂, α-CH Val C₁₉), 3.93 (bs, 1H, α-CHOH C₁₁), 2.27-2.49 (m, 2H, γ-CH₂ C₁₃), 1.97-2.08 (m, 1H, β-CH Val C₂₀), 1.58-1.69 (m, 1H, γ-CH Leu C₄), 1.47-1.57 (m, 2H, β-CH₂ Leu C₃), 1.23 (d,

$^3J = 6.82$ Hz, 3H, CH_3 Ala C₉), 0.89 (d, $^3J = 6.57$ Hz, 3H, CH_3 Leu C₅/C₆), 0.80-0.86 (m, 6H, CH_3 Leu C₅/C₆ CH_3 Val C₂₁/C₂₂), 0.75 (d, $^3J = 6.57$ Hz, 3H, CH_3 Val C₂₁/C₂₂)

^{13}C -NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173.84$ (C₁), 171.89 (C₇), 170.85 (C₁₀), 170.46 (C₂₀), 166.41 (C₂₅), 134.50, 131.27, 130.01, 128.27, 127.50, 119.27 (C_{14,15,16,17,24,25,26,27}), 73.25 (C₁₁), 59.09 (C₁₉), 52.98 (C₁₂), 50.18 (C₂), 47.38 (C₈), 39.34 (C₃), 33.51 (C₁₃), 30.27 (C₂₀), 24.27 (C₄), 22.88, 21.26 (C_{5,6}), 19.42, 18.64 (C_{21,22}), 19.05 (C₉)

- *N*-[*N*-(Bz-Val-)-(2*R*,3*S*)-3-amino-4-(4-aminophenyl)-2-hydroxybutanoyl]-Ala-Leu-OH bzw. Bz-Val-(4-NH₂-Phe)- ψ [(*R*)-CHOH-CO-NH]-Ala-Leu-OH (**17b**):

1H -NMR (400.16 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.31$ (d, $^3J = 7.83$ Hz, 1H, NH_{IV}), 8.03 (d, $^3J = 8.59$ Hz, 1H, NH_I), 7.84 (d, $^3J = 7.33$ Hz, 2H, arom. CH C₂₅), 7.80 (d, $^3J = 7.08$ Hz, 1H, NH_{III}), 7.71 (d, $^3J = 9.09$ Hz, 1H, NH_{II}), 7.43-7.56 (m, 3H, arom. CH C_{26,27}), 7.24 (d, $^3J = 8.34$ Hz, 2H, arom. CH C₁₅), 7.04 (d, $^3J = 8.34$ Hz, 2H, arom. CH C₁₆), 6.18 (bs, 1H, α -CHOH), 4.17-4.36 (m, 4H, α -CH Ala C₈, β -CH C₁₂, α -CH Leu C₂, α -CH Val C₁₉), 3.82 (bs, 1H, α -CHOH C₁₁), 2.57-2.83 (m, 2H, γ -CH₂ C₁₃), 1.93-2.03 (m, 1H, β -CH Val C₂₀), 1.58-1.68 (m, 1H, γ -CH Leu C₄), 1.46-1.55 (m, 2H, β -CH₂ Leu C₃), 1.20 (d, $^3J = 6.82$ Hz, 3H, CH_3 Ala C₉), 0.88 (d, $^3J = 6.57$ Hz, 3H, CH_3 Leu C₅/C₆), 0.83 (d, $^3J = 6.32$ Hz, 3H, CH_3 Leu C₅/C₆), 0.78 (d, $^3J = 6.57$ Hz, 3H, CH_3 Val C₂₁/C₂₂), 0.73 (d, $^3J = 6.82$ Hz, 3H, CH_3 Val C₂₁/C₂₂)

^{13}C -NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173.86$ (C₁), 171.90 (C₇), 170.89 (C₁₀), 170.37 (C₂₀), 166.43 (C₂₅), 134.45, 131.22, 130.37, 128.24, 127.48, 121.00 (C_{14,15,16,17,24,25,26,27}), 70.91 (C₁₁), 58.66 (C₁₉), 52.76 (C₁₂), 50.20 (C₂), 47.48 (C₈), 39.74 (C₃), 36.73 (C₁₃), 30.19 (C₂₀), 24.22 (C₄), 22.91, 21.22 (C_{5,6}), 19.39 (C₉), 19.13, 18.34 (C_{21,22})

6.3.4 Synthese des Naturstoffs Probestin

(Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (200 mg, 1.51 mmol/g, 0.302 mmol) wird (Vorschrift vgl. Kap. 6.3.3.1) mit Boc-D-Phenylalanin (200 mg, 0.755 mmol, 2.5 eq.) unter MSNT/2,6-Lutidin-Aktivierung acyliert. Für die Kupplungsausbeute, welche nicht photometrisch bestimmbar ist, werden 80 % angenommen.

Vom erhaltenen Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (ca. 0.242 mmol) wird (Vorschriften vgl Kap. 6.3.3.2) mit Trimethylsilylethanol (1.036 ml, 7.26 mmol, 30 eq.) und DMDO-Lösung (12 ml, ca. 0.072 mmol/ml, 0.864 mmol, 3.6 eq.) oxidativ zum α -Ketotrimethylsilylethylester abgespalten und mit Natriumborhydrid (angenommene Abspaltungsausbeute 80 %, 4.6 mg, 0.121 mmol, 0.625 eq.) zum α -Hydroxytrimethylsilylethylester reduziert.

(Alle Vorschriften vgl. Kap. 6.3.3.3) TCP-Harz wird mit Fmoc-Prolin beladen und zur Sequenz Fmoc-Leu-Pro-Pro-TCP verlängert (0.62 mmol/g). Der erhaltene α -Hydroxytrimethylsilylethylester (90 mg, 0.228 mmol) wird mit TBAF-Trihydrat (216 mg, 0.684 mmol, 3 eq.) verseift, die Säure mit EDC (53 mg, 0.274 mmol, 1.2 eq.) und HOBt·H₂O (42 mg, 0.274 mmol, 1.2 eq.) auf entschütztes Leu-Pro-Pro-TCP-Harz (246 mg, 0.62 mmol/g, 0.153 mmol, 0.67 eq.) gekuppelt, das Produkt mit 20 % HFIP/DCM und die Boc-Schutzgruppe mit 95 % TFA/5 % Wasser abgespalten. Das erhaltene Rohprodukt wird aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet und durch präparative HPLC aufgereinigt. Das Produkt wird durch LC-ES-MS, ES-MS und NMR charakterisiert.

- *N*-[(2*S*,3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-Leu-Pro-Pro-OH (Probestin, **30**, *Dia 1*) und

N-[(2*R*,3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-Leu-Pro-Pro-OH (*Dia 2*), 40:60

Ausbeute: 26 mg (32 %)

MS (ES): $m/z = 503,4 [M + H]^+$

¹H-NMR (400.16 MHz, MeOD-*d*₄): $\delta = 7.23$ -7.40 (m, 5H), 4.59-4.73 (m, 2H), 4.40-4.45 (m, 1H), 4.35 (d, ³J = 3.03 Hz, 0.6H), 4.10 (d, ³J = 3.29 Hz, 0.4H), 3.71-3.94 (m, 3H), 3.60-3.69 (m, 2H), 3.10 (dd, ³J = 7.96 Hz, 13.77 Hz, 0.4H), 3.01 (dd, ³J = 5.55 Hz, 14.40 Hz, 0.6H), 2.92 (dd, ³J = 6.82 Hz, 13.90 Hz, 0.4H), 2.84 (dd, ³J = 9.10 Hz, 14.40 Hz, 0.6H), 2.18-2.38 (m, 2H), 1.96-2.16 (m, 6H), 1.69-1.81 (m, 1H), 1.56-1.68 (m, 2H), 0.97-1.01 (m, 6H)

¹³C-NMR (100.62 MHz, MeOD-*d*₄):

Dia 1: $\delta = 175.27, 173.43, 172.75, 172.30, 136.74, 130.48, 130.09, 128.56, 69.68, 60.34, 59.74, 56.22, 51.35, 48.04, 40.76, 36.45, 29.99, 29.13, 25.90, 25.82, 23.58, 21.98$

Dia 2: $\delta = 175.27, 172.87, 172.61, 172.25, 136.95, 130.48, 129.98, 128.43, 71.74, 60.34, 59.79, 56.99, 51.11, 48.07, 40.96, 34.55, 29.99, 29.13, 26.04, 25.90, 23.70, 21.62$

6.3.5 Synthese eines Norstatins mit Caspase-3-Erkennungssequenz

Synthese eines Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylesters mit DEVD-Sequenz

(Cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (200 mg, 1.51 mmol/g, 0.302 mmol) wird (Vorschriften vgl. Kap. 6.3.3.1) mit Fmoc-Asp(OtBu)-OH (311 mg, 0.755 mmol, 2.5 eq.) unter MSNT/2,6-Lutidin-Aktivierung acyliert. Photometrische Fmoc-Bestimmung ergibt eine Acylierungsausbeute von 71 %. Das erhaltene Acyl(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (0.214 mmol) wird jeweils nach Fmoc-Entschützung mit Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH und Fmoc-Gly-OH unter DIC/HOBt-Aktivierung verlängert und N-terminal acetyliert (Vorschrift vgl. Kap. 6.3.2.1).

Vom Peptidyl- α -keto(cyanmethylen)triphenylphosphoran-Harz (ca. 0.214 mmol) wird (Vorschriften vgl. Kap. 6.3.3.2) mit Trimethylsilylethanol (916 μ l, 6.42 mmol, 30 eq.) und DMDO-Lösung (12 ml, ca. 0.072 mmol/ml, 0.864 mmol, 4.0 eq.) oxidativ zum Peptidyl- α -ketotrimethylsilylester abgespalten und mit Natriumborhydrid (angenommene Abspaltungsausbeute 80 %, 4.1 mg, 0.107 mmol, 0.625 eq.) zum Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylester reduziert.

TASF-Verseifung und Kupplung der Peptidyl- α -hydroxysäure

Der erhaltene Peptidyl- α -hydroxytrimethylsilylester (96 mg, 0.11 mmol) wird in wasserfreiem DMF (2 ml) gelöst. Der Lösung wird TASF (91 mg, 0.33 mmol, 3 eq.) zugesetzt und 2 h bei RT gerührt.

(Alle Vorschriften vgl. Kap. 6.3.3.3) Zur Lösung der entstehenden Peptidyl- α -hydroxysäure wird EDC (26 mg, 0.132 mmol, 1.2 eq.), HOBt-H₂O (21 mg, 0.132 mmol, 1.2 eq.) und vorsynthetisiertes, entschütztes Gly-Val-Ala-TCP-Harz (107 mg, 0.69 mmol/g, 0.073 mmol, 0.67 eq.) zugegeben. Das Produkt wird mit 20 % HFIP/DCM abgespalten und die gewünschte Verbindung durch präparative HPLC von einem Aspartimid-Nebenprodukt getrennt (vgl. Kap. 3.9.2). Nach Behandlung mit 95 % TFA/5 % Wasser zur Seitenketten-Entschützung wird eine erneute präparative HPLC-Trennung zur Abtrennung eines Lacton-Nebenproduktes notwendig. Das Produkt wird durch ES-MS charakterisiert.

- Ac-Gly-Asp-Glu-Val-Asp- ψ [(*RS*)-CHOH-CO-NH]-Gly-Val-Ala-OH (**155a,b**):

Ausbeute: 6 mg (5 %)

MS (ES): $m/z = 833.4$ [M + H]⁺

6.3.6 Versuche zur diastereoselektiven Reduktion

Peptidyl- α -ketotrimethylsilylethylester **169** (10 mg, 0.02 mmol) wird in ein SCHLENK-Rohr mit Rührfisch, Drehverschluss und Septum eingewogen und im entsprechenden wasserfreien Lösungsmittel (2 ml) gelöst und abgekühlt.

Variante 1: Zum in EtOH (2 ml) gelösten Edukt wird NaBH₄ (0.5 mg, 0.0125 mmol, 0.625 eq.) zugegeben und 2 h bei -78 °C gerührt.

Variante 2: Zum in THF (2 ml) gelösten Edukt wird nach Literaturvorschrift^[307] hergestellte Zn(BH₄)₂-Lösung in THF (18.2 μ l, 0.55 mmol/ml, 0.01 mmol, 0.5 eq.) zugegeben und 2 h bei -78 °C gerührt.

Variante 3: Zum in THF (2 ml) gelösten Edukt wird DIBAL-H-Lösung in THF (120 μ l, 1 mmol/ml, 0.12 mmol, 6 eq.) zugegeben und 2 h bei -78 °C gerührt.

Variante 4: Zum in THF (2 ml) gelösten Edukt wird L-Selectride-Lösung in THF (60 μ l, 1 mmol/ml, 0.06 mmol, 3 eq.) zugegeben und 2 h bei -78 °C gerührt.

Variante 5: Zum in THF (2 ml) gelösten Edukt wird LiAlH(OtBu)₃ (7.6 mg, 0.03 mmol, 1.5 eq.) zugegeben und 2 h bei -78 °C gerührt.

Aufarbeitung Variante 1: Der Ansatz wird mit MeOH (4 ml) verdünnt, auf RT erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung Variante 2-5: Der Ansatz wird mit 10 %-iger Zitronensäure-Lösung (2 ml) gequenchet und mit EtOAc (2 x 5 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung (jeweils 5 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, über eine dünne Kieselgel-Schicht filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das *syn/anti*-Verhältnis wird durch analytische HPLC der Rohprodukte bestimmt.

6.4 Polymere Formaldehydhydrazone

6.4.1 Synthese von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**)

Synthese von (3*R*)-1-Nitroso-3-pyrrolidinol (**181**)

In einem 100 ml-Kolben wird (*R*)-3-Pyrrolidinol Hydrochlorid (10 g, 81 mmol) unter Rühren in Wasser (20 ml) gelöst. NaNO₂ (11.18 g, 162 mmol, 2 eq.) gelöst in Wasser (30 ml) wird zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wird Eisessig (6.95 ml, 121.5 mmol, 1.5 eq) langsam zugetropft und nach beendeter Zugabe noch 30 min unter Kühlung gerührt. Die Mischung wird auf RT erwärmt und weitere 48 h gerührt. Die Lösung wird mit Na₂CO₃(s) alkalisch gemacht und mit EtOAc (8 x 70 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt (9.26 g, 98 %), wird als gelbes Öl erhalten, welches im Kühlschrank fest wird. Es wird wegen seiner Giftigkeit ohne weitere Charakterisierung direkt umgesetzt (s u.).

Synthese von (3*R*)-1-Amino-3-pyrrolidinol (**182**)

LiAlH₄ (5.32 g, 140.2 mmol, 1.75 eq.) wird in einem 500 ml-Dreihalskolben in wasserfreiem THF (200 ml) suspendiert. Zur Suspension wird bei RT über einen Tropftrichter das Rohprodukt (s. o.) (3*R*)-1-Nitroso-3-pyrrolidinol (**183**) (9.26 g, 79.7 mmol) gelöst in wasserfreiem THF (50 ml) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 3 h unter Reflux erhitzt. Nach Abkühlung wird der Ansatz mit Wasser (20 ml) gequench und nochmals 30 min refluxiert. Es wird über Celite filtriert, der Filterkuchen mit weiterem THF aufgekocht und erneut filtriert. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum soweit wie möglich eingeeengt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels verbleibt das rohe Reaktionsprodukt als bräunliches Öl (7.44 g, 91 %) und wird in dieser Form weiter umgesetzt (s. u.).

Tritylierung von (3*R*)-1-Amino-3-pyrrolidinol

Nicht weiter aufgereinigtes (3*R*)-1-Amino-3-pyrrolidinol (**182**) (s. o.) (2 g, 19.6 mmol) wird in einem 100 ml-Kolben in wasserfreiem CHCl₃ (50 ml) gelöst und mit TEA (4.1 ml,

29.4 mmol, 1.5 eq.) versetzt. Nach Kühlung mit einem Eisbad wird Tritylchlorid (5.5 g, 19.7 mmol, 1 eq.) in einer Portion zugegeben, 2 h unter Kühlung und nach Erwärmen auf RT eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Wasser gewaschen (2 x 30 ml), getrocknet (Na_2SO_4) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Hex:EtOAc, 68:32) gereinigt (*Achtung: vermutlich Produktverlust durch fehlende Abpufferung von stationärer Phase und Elutionsmittel*).

▪ (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**)

Ausbeute: 4.32 g (64 %) einer farblosen Substanz

R_f -Wert: $R_f = 0.38$ (Hex:EtOAc, 68:32)

ATR-IR: $\nu = 3200\text{-}3550$ (NH-, OH-Absorption), 3055, 3029, 2931, 2815, 1736, 1595, 1489, 1447, 1241, 1184, 1088, 1032, 903, 775, 745, 705, 618 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.40\text{-}7.60$, 7.04-7.25 (m, 15H), 3.97 (bs, 1H), 2.90 (bs, 1H), 2.40-2.60 (m, 1H), 2.25-2.35 (m, 1H), 2.11-2.15 (m, 2H), 1.75-1.90 (m, 1H), 1.31-1.41 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 146.31$, 129.23, 127.81, 126.52, 73.05, 69.97, 66.09, 56.11, 33.53

6.4.2 Synthese von Formaldehydhydrazon-Harz (FH-Harz) (175)

Immobilisierung von (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol

Kaliumhydrid (Dispersion in Mineralöl, ~35 %) wird 3 x in wasserfreiem Heptan aufgeschlemmt, nach Absetzung des Bodensatzes dekantiert und im Vakuum getrocknet. (3*R*)-1-(Tritylamino)-3-pyrrolidinol (**183**) (6.12 g, 17.8 mmol, 3 eq.) wird in einem 100 ml-Stickstoffkolben in wasserfreiem THF (50 ml) unter Schutzgas gelöst und mit vorbereitetem KH (714 mg, 17.8 mmol, 3 eq) versetzt. Der Kolben wird mit einem Blasenähler verschlossen und bis zum Abklingen der Gasentwicklung bei RT gerührt (ca. 1.5 h). MERRIFIELD-Chlormethyl-PS-Harz (4 g, 1.48 mmol/g, 5.93 mmol) wird zugegeben, der Rührfisch entfernt und nach Erwärmen auf 50 °C mit einem KPG-Rührer für 60 h weitergerührt. Nach Abkühlen auf RT wird der Ansatz mit MeOH verdünnt, filtriert, das

Harz gründlich mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. 1-(Tritylamino)pyrrolidinol-Harz (**184**) wird als hellbraunes Polymer erhalten.

- 1-(Tritylamino)pyrrolidinol-Harz (**184**):

EA: N-Analyse (%): ber.: 2,85; gef.: 2,16 (76 %)

ATR-IR: $\nu = 3343, 3083, 3058, 3024, 2919, 2849, 1742, 1600, 1492, 1450, 1360, 1180, 1067, 1029, 904, 817, 759, 743, 698, 623, 537 \text{ cm}^{-1}$

Trityl-Abspaltung zum 1-Aminopyrrolidinol-Harz (AP-Harz) (174)

Die Trityl-Schutzgruppe des 1-(Tritylamino)pyrrolidinol-Harzes (400 mg, 0.77 mmol/g, 0.308 mmol) wird durch Behandlung mit einer Abspaltungslösung DCM/TFA/TIS (94:1:5, 15 x 5 ml, jeweils 5 min) entfernt. Das Harz wird mit DCM gewaschen und mit 10 % TEA/DCM (2 x 5 ml) deprotoniert. Nach gründlichem Waschen mit MeOH, DMF, THF und DCM wird im Vakuum getrocknet.

- 1-Aminopyrrolidinol-Harz (AP-Harz) (**174**):

ATR-IR: $\nu = 3332, 3081, 3058, 3024, 2920, 2849, 1749, 1678, 1601, 1493, 1452, 1359, 1181, 1094, 1028, 907, 819, 757, 698, 625, 537 \text{ cm}^{-1}$

Hydrazon-Bildung zum Formaldehydhydrazon-Harz (FH-Harz) (175)

Variante 1: 1-Aminopyrrolidinol-Harz (**174**) (100 mg, 0.95 mmol/g, 0.095 mmol) wird in THF (3 ml) suspendiert, mit Formalin (214 μl , 37 % w/w, 2.85 mmol, 30 eq.) versetzt und 12 h bei RT geschüttelt. Nach Filtration wird das Harz mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Variante 2: 1-Aminopyrrolidinol-Harz (**174**) (100 mg, 0.95 mmol/g, 0.095 mmol) wird in einem Zentrifugenglas in THF/MeOH (1:1, 6 ml) suspendiert. Zur Suspension wird Paraformaldehyd (86 mg, 2.85 mmol, 30 eq.) und TEA (37 μl , 0.265 mmol, 2.8 eq.) zugegeben, das dicht verschlossene Reaktionsgefäß auf 70 °C erwärmt und 12 h gerührt, wobei die durch Paraformaldehyd hervorgerufene Eintrübung allmählich verschwindet. Nach Filtration wird das Harz mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

- Formaldehydhydrazon-Harz (FH-Harz) (175)

ATR-IR: $\nu = 3060, 3025, 2920, 2850, 1746, 1601, 1570, 1493, 1452, 1343, 1216, 1156, 1100, 1028, 906, 818, 757, 698, 619, 539 \text{ cm}^{-1}$

6.4.3 Homologisierung von Fmoc-Phenylalaninal zum geschützten α -Hydroxyaldehyd (179)

Synthese von Fmoc-Phenylalaninal

Fmoc-Phenylalaninol (2 g, 5.36 mmol) wird in einem 500 ml-Kolben in wasserfreiem DCM (200 ml) gelöst. Zur Lösung wird DESS-MARTIN-Periodinan (4.8 g, 11.25 mmol, 2.1 eq.) gegeben, welches sich mit leichtem Schleier löst. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (200 μ l, 11.1 mmol, 2.1 eq.) gestartet und der Ansatz bei RT gerührt, wobei die Lösung zunehmend milchig wird. Nach 15 min wird weiteres DESS-MARTIN-Periodinan (0.3 g, 0.7 mmol, 0.13 eq.) und Wasser (13 μ l, 0.7 mmol, 0.13 eq.) zugesetzt und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit Diethylether (150 ml) verdünnt. Natriumthiosulfat-Pentahydrat (14.92 g, 60.12 mmol, 11.22 eq) wird in 80 %-gesättigter NaHCO_3 -Lösung (150 ml) gelöst, zur Reaktionsmischung gegeben und 30 min gerührt, wobei die milchige Suspension in eine klare Lösung übergeht. Die wässrige Phase wird mit Diethylether (300 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (1 x 200 ml), Wasser (2 x 200 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (2 x 200 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das laut DC und NMR sehr saubere Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in dieser Form verwendet (Racemisierungsgefahr an Kieselgel).

- Fmoc-Phenylalaninal:

Ausbeute: 1.99 g (100 %) einer farblosen Substanz

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +51.2^\circ$

ATR-IR: $\nu = 3335$ (NH-Absorption), 3027, 2961, 2845, 1728 (Aldehyd C=O), 1689 (Carbamat C=O), 1533, 1445, 1312, 1254, 1156, 1085, 1022, 856, 754, 737, 645 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.56$ (s, 1H), 7.69 (d, $^3\text{J} = 7.58$ Hz, 2H), 7.47 (t, $^3\text{J} = 7.58$ Hz, 2H), 7.33 (t, $^3\text{J} = 7.45$ Hz, 2H), 7.12-7.28 (m, 5H), 7.05 (d, $^3\text{J} = 7.07$ Hz,

2H), 5.25 (d, $^3J = 5.56$ Hz, 1H), 4.24-4.40 (m, 3H), 4.14 (t, $^3J = 6.82$ Hz, 1H), 3.08 (d, $^3J = 6.32$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 198.79, 155.95, 143.83, 141.50, 135.59, 129.48, 128.97, 127.91, 127.36, 127.23, 125.19, 120.17, 67.14, 61.27, 47.34, 35.55$

Nucleophile Addition von Formaldehydhydrazon-Harz an Fmoc-Phenylalaninal (**188**)

Formaldehydhydrazon-Harz (ursprünglich 100 mg AP-Harz mit 0.95 mmol/g, 0.095 mmol, vgl. Kap. 6.4.2) wird in wasserfreiem DCM (2.5 ml) vorgequollen und mit Fmoc-Phenylalaninal (176 mg, 0.475 mmol, 5 eq.) versetzt. Der Ansatz wird 3 d bei RT geschüttelt, filtriert, mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

- α -Hydroxyhydrazon-Harz (**188**):

ATR-IR: $\nu = 3421, 3082, 3060, 3025, 2923, 2849, 1719, 1602, 1493, 1451, 1329, 1238, 1073, 1030, 820, 757, 741, 698, 540 \text{ cm}^{-1}$

Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe (**189**)

Das durch Addition an Fmoc-Phenylalaninal entstandene α -Hydroxyhydrazon-Harz (**188**) (ursprünglich 100 mg AP-Harz mit 0.95 mmol/g, 0.095 mmol, vgl. Kap. 6.4.2) wird in trockenem DMF (2.5 ml) vorgequollen. TBDMSCl (72 mg, 0.475 mmol, 5 eq.) und Imidazol (32 mg, 0.475 mmol, 5 eq.) werden zugegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Es wird filtriert, mit MeOH, DMF, THF und DCM gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

- α -(*tert.*-Butyldimethylsilyl)oxyhydrazon-Harz (**189**):

ATR-IR: $\nu = 3058, 3025, 2925, 2852, 1720, 1601, 1493, 1451, 1325, 1248, 1077, 1030, 837, 757, 741, 698, 541 \text{ cm}^{-1}$

Ozonolytische Hydrazonspaltung zu [2(*RS*),3*S*]-3-[*N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-amino]-2-[(*tert.*-butyldimethylsilyl)oxy]-4-phenylbutanal (**179**)

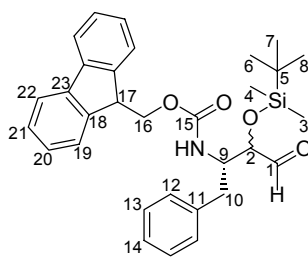
α -(*tert.*-Butyldimethylsilyl)oxyhydrazon-Harz (**189**) (ursprünglich 100 mg AP-Harz mit 0.95 mmol/g, 0.095 mmol, vgl. Kap. 6.4.2) wird mit einem Rührfisch in ein SCHLENK-

Rohr mit Drehverschluss, Teflon-Septum und -Dichtung eingefüllt, in wasserfreiem DCM (3 ml) suspendiert, auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und gerührt. Über eine Kanüle wird Ozon aus einem Ozon-Generator in gleichmäßigem Strom durch die Suspension geleitet bis eine Blaugrün-Färbung das Ende der Reaktion anzeigt (ca. 10 min). Überschüssiges Ozon wird durch einen Stickstoff-Strom unter weiterer Kühlung entfernt (ca. 5 min), wobei die Suspension wieder farblos wird. Dimethylsulfid (70 μl , 0.95 mmol, 10 eq.) wird zugesetzt, auf RT erwärmt und für weitere 3 h gerührt. Das Harz wird abfiltriert, mit DCM nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gefriergetrocknet, anschließend mit HPLC und LC-ES-MS charakterisiert und durch präparative HPLC (TFA-frei) gereinigt.

- [2(*RS*),3(*S*)]-3-[*N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)amino]-2-[(*tert.*-butyldimethylsilyl)oxy]-4-phenylbutanal (**179**):

Ausbeute: Rohprodukt 22.1 mg (45 %), gereinigtes Produkt 11.9 mg (24 %)

MS (ES): $m/z = 538.6$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺



179

¹H-NMR (400.16 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.57$ (s, 1H, CHO C₁), 7.87 (d, ³J = 7.58 Hz, 2H, arom. CH), 7.53-7.66 (m, 3H, arom. CH), 7.37-7.45 (m, 2H, arom. CH), 6.86-7.35 (m, 7H, arom. CH, NH), 4.31 (d, ³J = 3.54 Hz, 1H, α -CH C₂), 4.25-3.85 (m, 4H, β -CH C₉, CH₂O C₁₆, CH C₁₇), 2.66-2.94 (m, 2H, γ -CH₂ C₁₀), 0.94 (s, 9H, SiC(CH₃)₃ C₆₋₈), 0.09 (s, 3H, SiCH₃ C_{3/4}), 0.06 (s, 3H, SiCH₃ C_{3/4})

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 201.86$ (C₁), 156.00 (C₁₅), 144.04, 143.98, 140.99, 139.10, 129.36, 128.49, 127.95, 127.92, 127.36, 127.31, 126.52, 125.63, 125.55, 120.42, 120.39 (alles arom. C₁₁₋₁₄ bzw. C₁₈₋₂₃), 80.09 (C₂), 65.80 (C₁₆), 54.80 (C₉), 46.88 (C₁₇), 35.94 (C₁₀), 26.06 (C₆₋₈), 18.42 (C₅), -4.19 (C_{3/4}), -4.93 (C_{3/4})

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und Pharmazeutische Chemiker*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [2] G. Wess, M. Urmann, B. Sickenberger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3443-3453; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3341-3350.
- [3] A. R. Dongre, S. A. Hefta, *Drug Discov. World* **2000**, *1*, 35-44.
- [4] D. A. Jones, F. A. Fitzpatrick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 71-76.
- [5] D. B. Searls, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 135-143.
- [6] D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, *Nature* **2000**, *405*, 827-836.
- [7] E. Keller, *Chemie in unserer Zeit* **1982**, *16*, 71-88.
- [8] K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3462-3486; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3340-3363.
- [9] D. J. De Rosier, *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 690-692.
- [10] K. Moore, S. Rees, *J. Biomol. Scrng.* **2001**, *6*, 69-74.
- [11] Z. Parandossh, *J. Biomol. Scrng.* **1997**, *2*, 201-204.
- [12] P. Banks, M. Gosselin, L. Prystay, *J. Biomol. Scrng.* **2000**, *5*, 159-167.
- [13] K. J. Moore, S. Turconi, S. Ashman, M. Ruediger, U. Haupts, V. Emerick, A. J. Pope, *J. Biomol. Scrng.* **1999**, *4*, 335-353.
- [14] L. Mere, T. Bennett, P. Coassin, P. England, T. Hamman, T. Rink, S. Zimmerman, P. Negulescu, *Drug Discov. Today* **1999**, *4*, 363-369.
- [15] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [16] B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998.
- [17] *The Combinatorial Index*, (Ed.: B. A. Bunin) Academic Press, San Diego, **1998**.
- [18] F. Zaragoza Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Support*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [19] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.

- [20] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [21] F. Balkenhohl, C. von der Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *35*, 2288-2337.
- [22] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [23] *Combinatorial Chemistry - Synthesis, Analysis, Screening*, (Ed.: G. Jung) Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [24] *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, (Ed.: G. Jung) Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [25] C. M. Baldino, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 89-103.
- [26] V. Austel, in *Combinatorial Chemistry - Synthesis, Analysis, Screening* (Ed.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, 77-124.
- [27] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2000**, 3815-4195.
- [28] A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 670-701; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 650-679.
- [29] J. Eames, M. Watkinson, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *7*, 1213-1224.
- [30] A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4445-4450.
- [31] R. D. Cramer, D. E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959-5967.
- [32] S. A. De Priest, D. Mayer, C. B. Naylor, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5372-5384.
- [33] C. L. Waller, T. I. Oprea, A. Giolitti, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4152-4160.
- [34] H. Kubinyi, *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **1998**, *1*, 4-15.
- [35] G. Rastelli, S. Pacchioni, W. Sirawaraporn, R. Sirawaraporn, M. D. Parenti, A. M. Ferrari, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2834-2845.
- [36] D. Leung, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305-341.
- [37] H. H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.
- [38] J. B. Cooper, *Curr. Drug Targ.* **2002**, *3*, 155-173.
- [39] A. Brik, C.-H. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 5-14.

- [40] T. Hofmann, R. S. Hodges, M. N. G. James, *Biochemistry* **1984**, *23*, 635-643.
- [41] L. J. Hyland, T. A. Tomaszek, T. D. Meek, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8454-8463.
- [42] R. Smith, I. M. Brereton, R. Y. Chai, S. B. H. Kent, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 946-950.
- [43] Y. X. Wang, D. I. Freedberg, T. Yamazaki, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, J. D. Kaufman, Y. Kiso, D. A. Torchia, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9945-9950.
- [44] T. Yamazaki, L. K. Nicholson, D. A. Torchia, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, J. D. Kaufman, C. N. Eyermann, C. N. Hodge, P. Y. S. Lam, Y. Ru, P. K. Jadhav, C. H. Chang, P. C. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10791-10792.
- [45] S. Piana, D. Sebastiani, P. Carloni, M. Parrinello, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8730-8737.
- [46] K. Suguna, E. A. Padlan, C. W. Smith, W. D. Carlson, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7009-7013.
- [47] M. Jaskólski, A. G. Tomasselli, T. K. Sawyer, D. G. Staples, R. L. Henrikson, J. Schneider, S. B. H. Kent, A. Wlodawer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1600-1609.
- [48] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.
- [49] C. Boss, S. Richard-Bildstein, T. Weller, W. Fischli, S. Meyer, C. Binkert, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 883-907.
- [50] A. Storer, R. Ménard, *Meth. Enzymol.* **1994**, *244*, 486-500.
- [51] T. D. Meek, B. D. Dayton, B. W. Metcalf, G. B. Dreyer, J. G. Strickler, M. Gorniak, M. Rosenberg, M. L. Moore, V. W. Magaard, C. Debouck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1841-1845.
- [52] T. Hofmann, B. M. Dunn, A. L. Fink, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5247-5256.
- [53] C. P. Sanchez, M. Lanzer, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2000**, *13*, 653-658.
- [54] O. Famin, M. Krugliak, H. Ginsburg, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 59-68.
- [55] H. Ginsburg, S. A. Ward, P. G. Bray, *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 357-360.
- [56] A. Bahl, B. Brunk, R. L. Coppel, J. Crabtree, S. J. Diskin, M. J. Fraunholz, G. R. Grant, D. Gupta, R. L. Huestis, J. C. Kissinger, P. Labo, L. Li, S. K. McWeeney, A. J. Milgram, D. S. Roos, J. Schug, C. J. Stoeckert, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 87-90.
- [57] K. K. Eggelson, K. L. Duffin, D. E. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32411-32417.

- [58] R. Banerjee, J. Liu, W. Beatty, L. Pelosof, M. Klemba, D. E. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 990-995.
- [59] D. M. Wyatt, C. Berry, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 159-162.
- [60] G. H. Coombs, J. C. Mottram, *Parasitology* **1997**, *114*, 61-80.
- [61] B. Greenwood, T. Mutabingwa, *Nature* **2002**, *415*, 670-672.
- [62] R. G. Ridley, *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 54-59.
- [63] W. E. Gutteridge, *Parassitologia* **1999**, *41*, 452.
- [64] J. Boger, W. S. Lohr, E. H. Ulm, M. Poe, E. H. Blaine, G. M. Fanelli, T.-Y. Lin, L. S. Payne, T. W. Schorn, B. I. LaMont, T. C. Vassil, I. I. Stability, D. F. Veber, D. H. Rich, A. S. Bopar, *Nature* **1983**, *303*, 81-84.
- [65] B. Munoz, C.-Z. Giam, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1085-1090.
- [66] M. W. Holladay, D. H. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4401-4404.
- [67] A. Wlodawer, A. Miller, M. Jaskólski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S. B. H. Kent, *Science* **1989**, *245*, 616-621.
- [68] A. H. Fray, L. K. Kaye, E. F. Kleinman, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4828-4833.
- [69] W. J. Greenlee, *Med. Res. Rev* **1990**, *10*, 173-236.
- [70] E. M. Gordon, J. D. Godfrey, J. Pluscec, D. von Langen, S. Natarajan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 419-426.
- [71] T. T. Tucker, W. C. Lumma, L. S. Payne, J. M. Wai, S. J. deSolms, E. A. Giuliani, P. L. Darke, J. C. Heimbach, J. A. Zugay, W. A. Schleif, J. C. Quintero, E. A. Emini, J. R. Huff, P. S. Anderson, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2525-2533.
- [72] J. G. Dann, D. K. Stammers, C. J. Harris, R. J. Arrowsmith, D. E. Davies, G. W. Hardy, J. A. Morton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *134*, 71-77.
- [73] P. A. Bartlett, W. B. Kezer, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4282-4283.
- [74] D. H. Rich, J. Green, M. V. Toth, G. R. Marshall, S. B. H. Kent, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1285-1288.
- [75] M. Szelke, B. Leckie, A. Hallett, D. M. Jones, B. Sueiras, B. Atrash, A. F. Lever, *Nature* **1982**, *299*, 555-557.
- [76] S. Billich, M.-T. Knoop, J. Hansen, P. Strop, J. Sedlacek, R. Mertz, K. Moelling, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17905-17908.

- [77] M. L. Moore, W. M. Bryan, S. A. Fakhoury, V. W. Magaard, W. F. Huffman, B. D. Dayton, T. D. Meek, L. J. Hyland, G. B. Dreyer, B. W. Metcalf, J. E. Strickler, J. G. Gorniak, C. Debouck, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 420-425.
- [78] A. Wlodawer, J. W. Erickson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 543-585.
- [79] D. V. Patel, K. Rielly-Gauvin, D. E. Ryono, C. A. Free, S. A. Smith, E. W. Petrillo, Jr., *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2431-2447.
- [80] B. L. Podlogar, R. A. Farr, D. Friedrich, C. Tarnus, E. W. Huber, R. J. Cregge, D. Schirlin, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3684-3692.
- [81] S. Ikeda, J. A. Ashley, P. Wirsching, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7604-7606.
- [82] M. C. Allen, W. Fuhrer, B. Tuck, R. Wade, J. Wood, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1652-1661.
- [83] A. Peyman, K.-H. Budt, J. Spanig, D. Ruppert, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1852-1854; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1720-1722.
- [84] D. Grobelny, E. M. Wondrak, R. E. Galardy, S. Oroszlan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *169*, 1111-1116.
- [85] C.-A. Chen, S. M. Sieburth, A. Glekas, G. W. Hewitt, G. L. Trainor, S. E. Viitanen, S. S. Garber, B. Cordova, S. Jeffry, R. M. Klabe, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1161-1166.
- [86] A. M. Silva, A. Y. Lee, S. V. Gulnik, P. Majer, J. Collins, T. N. Bhat, P. J. Collins, R. E. Cachau, K. E. Luker, I. Y. Gluzman, S. E. Francis, A. Oksman, D. E. Goldberg, J. W. Erickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10034-10039.
- [87] C. D. Carroll, H. Patel, T. O. Johnson, T. Guo, M. Orłowski, Z.-M. He, C. L. Cavallero, J. Guo, A. Oksman, I. Y. Gluzman, J. Conelly, D. Chelsky, D. E. Goldberg, R. E. Dolle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2315-2320.
- [88] E. K. Kick, D. C. Roe, A. G. Skillman, G. Liu, T. J. A. Ewing, Y. Sun, I. D. Kuntz, J. A. Ellman, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 297-307.
- [89] C. E. Lee, E. K. Kick, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9735-9747.
- [90] T. S. Haque, A. G. Skillman, C. E. Lee, H. Habashita, I. Y. Gluzman, T. J. A. Ewing, D. E. Goldberg, I. D. Kuntz, J. A. Ellman, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1428-1440.
- [91] O. A. Asojo, S. V. Gulnik, E. Afonina, B. Yu, J. A. Ellman, T. S. Haque, A. M. Silva, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 173-181.

- [92] D. Nöteberg, E. Hamelink, J. Hulten, M. Wahlgren, L. Vrang, B. Samuelsson, A. Hallberg, *J. Med. Chem* **2003**, *46*, 734-746.
- [93] D. Nöteberg, W. Schaal, E. Hamelink, L. Vrang, M. Larhed, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 456-464.
- [94] E. Vieira, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, R. Güller, G. Hirth, H.-P. Märki, M. Müller, C. Oefner, M. Scalone, H. Stadler, M. Wilhelm, W. Wostl, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1397-1402.
- [95] R. Güller, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, G. Hirth, C. Jenny, M. Kansy, F. Montavon, M. Müller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, H.-P. Märki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1403-1408.
- [96] C. Oefner, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, J.-P. Clozel, A. D'Arcy, A. Dorn, W. Fischli, F. Grüniger, R. Güller, G. Hirth, H.-P. Märki, S. Mathews, M. Müller, R. G. Ridley, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, F. K. Winkler, W. Wostl, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 127-131.
- [97] D. A. Carcache, S. R. Hörtner, A. Bertogg, C. Binkert, D. Bur, H.-P. Märki, A. Dorn, F. Diederich, *Chem. Bio. Chem.* **2002**, *3*, 1137-1141.
- [98] K. Iizuka, T. Kamijo, T. Kubota, K. Akahane, H. Umeyama, Y. Kiso, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 701-704.
- [99] T. Mimoto, J. Imai, S. Tanaka, N. Hattori, O. Takahashi, S. Kisanuki, Y. Nagano, M. Shintani, H. Hayashi, H. Sakikawa, K. Akaji, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2465-2467.
- [100] T. Mimoto, J. Imai, S. Tanaka, N. Hattori, S. Kisanuki, K. Akaji, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 3088-3090.
- [101] T. Mimoto, J. Imai, S. Kisanuki, H. Enomoto, N. Hattori, K. Akaji, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2251-2253.
- [102] Y. Kiso, H. Matsumoto, S. Yamaguchi, T. Kimura, *Lett. Pept. Sci.* **1999**, *6*, 275-281.
- [103] T. Mimoto, N. Hattori, H. Takaku, S. Kisanuki, T. Fukazawa, K. Terashima, R. Kato, S. Nojima, S. Misawa, T. Ueno, J. Imai, H. Enomoto, S. Tanaka, H. Sakikawa, M. Shintani, H. Hayashi, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1310-1326.

- [104] T. F. Tam, J. Carrière, I. D. MacDonald, A. L. Castelhana, D. H. Pliura, N. J. Dewdney, E. M. Thomas, C. Bach, J. Barnett, H. Chan, A. Krantz, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1318-1320.
- [105] J. J. Chen, P. J. Coles, L. D. Arnold, R. A. Smith, I. D. MacDonald, J. Carrière, A. Krantz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 435-438.
- [106] E. Takashiro, I. Hayakawa, T. Nitta, A. Kasuya, S. Miyamoto, Y. Ozawa, R. Yagi, I. Yamamoto, T. Shibayama, A. Nakagawa, Y. Yabe, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2063-2072.
- [107] O. B. Wallace, D. W. Smith, M. S. Deshpande, C. Polson, K. M. Felsenstein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1203-1206.
- [108] D. Shuto, S. Kasai, T. Kimura, P. Liu, K. Hidaka, T. Hamada, S. Shibakawa, Y. Hayashi, C. Hattori, B. Szabo, S. Ishiura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4273-4276.
- [109] A. Nezami, I. Luque, T. Kimura, Y. Kiso, E. Freire, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2273-2280.
- [110] A. Nezami, T. Kimura, K. Hidaka, A. Kiso, J. Liu, Y. Kiso, D. E. Goldberg, E. Freire, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8459-8464.
- [111] T. Aoyagi, S. Yoshida, Y. Nakamura, Y. Shigihara, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 143-148.
- [112] S. Yoshida, Y. Nakamura, H. Naganawa, T. Aoyagi, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 149-153.
- [113] M. Nagai, F. Kojima, H. Naganawa, M. Hamada, T. Aoyagi, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 82-84.
- [114] T. Aoyagi, H. Tobe, F. Kojima, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 636-638.
- [115] H. Suda, T. Takita, T. Aoyagi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 100-101.
- [116] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 97-99.
- [117] K. C. Nicolaou, W. M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *106*, 15-44.
- [118] F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, T. Nakamura, T. Sasaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5540-5542.

- [119] S.-S. Moon, J. L. Chen, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1097-1103.
- [120] N. K. Gulavita, S. A. Pomponi, A. E. Wright, D. Yarwood, M. A. Sills, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6815-6818.
- [121] C. A. Bewley, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4849-4852.
- [122] N. Fusetani, S. Matsunaga, H. Matsumoto, Y. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053-7054.
- [123] P. Wipf, H. Kim, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5592-5594.
- [124] N. Fusetani, T. Sugawara, S. Matsunaga, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7811-7812.
- [125] K. Suzuki, S. Toda, T. Furumai, Y. Fukagawa, T. Oki, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 982-991.
- [126] M. Tsuda, Y. Muraoka, M. Nagai, T. Aoyagi, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 909-920.
- [127] A. Okuyama, H. Naganawa, S. Harada, T. Aoyagi, H. Umezawa, *Biochem. Int.* **1986**, *12*, 627-631.
- [128] M. T. Reetz, M. W. Drewes, K. Harms, W. Reif, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3295-3298.
- [129] R. Herranz, J. Castro-Pichel, T. Garcia-Lopez, *Synthesis* **1989**, 703-706.
- [130] H. Harada, A. Tsubaki, T. Kamijo, K. Iizuka, Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2570-2572.
- [131] N. P. Peet, J. P. Burkhart, M. R. Angelastro, E. L. Giroux, S. Mehdi, P. Bey, M. Kolb, B. Neises, D. Schirlin, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 394-407.
- [132] F. Narjes, K. F. Koehler, U. Koch, B. Gerlach, S. Colarusso, C. Steinkuhler, M. Brunetti, S. Altamura, R. De Francesco, V. G. Matassa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 701-704.
- [133] S. Kourtal, J. Paris, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *3*, 73-78.
- [134] G. Veerasha, A. Datta, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5223-5224.
- [135] C. Alemany, J. Bach, J. Farras, J. Garcia, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1831-1834.
- [136] P. Audinn, C. Pothion, J.-A. Fehrentz, A. Loffet, J. Martinez, J. Paris, *J. Chem. Research (S)*. **1999**, 282-283.
- [137] D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1967**, *6*, 442-444.

- [138] J. P. Burkhart, N. P. Peet, P. Bey, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1385-1388.
- [139] E. J. Iwanowicz, J. Lin, D. G. M. Roberts, I. M. Michel, S. M. Seiler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1607-1612.
- [140] M. Hagihara, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6570-6571.
- [141] S. Hormuth, H. U. Reissig, D. Dorsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 121-127.
- [142] J. Deng, Y. Hamada, T. Shioiri, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1811-1813; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1729-1731.
- [143] A. Dondoni, D. Perrone, *Synthesis* **1993**, *11*, 1162-1176.
- [144] A. Dondoni, D. Perrone, T. Semola, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7927-7933.
- [145] A. Dondoni, D. Perrone, *Aldrichimica Acta* **1997**, *30*, 35-46.
- [146] M. E. Bunnage, S. G. Davies, C. J. Goodwin, *Synlett* **1993**, 731-732.
- [147] M. E. Bunnage, S. G. Davies, C. J. Goodwin, O. Ichihara, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3975-3986.
- [148] G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 449-452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 451-454.
- [149] J. Rudolph, P. C. Sennhenn, C. P. Vlaar, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2991-2995; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2810-2813.
- [150] G. Li, H. H. Angert, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2995-2999; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2813-2817.
- [151] S. J. Keding, N. A. Dales, S. Lim, D. Beaulieu, D. H. Rich, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 4463-4470.
- [152] F. Fringuelli, F. Pizzo, M. Rucci, L. Vaccaro, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7041-7045.
- [153] B. Zwanenburg, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 423-430.
- [154] B. Saha, J. P. Nandy, S. Shukla, I. Siddiqui, J. Iqbal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7858-7860.
- [155] K. Hattori, H. Yamamoto, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2785-2792.
- [156] H.-J. Ha, Y.-G. Ahn, G. S. Lee, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2327-2336.
- [157] I. Ojima, F. Delalogue, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 377-386.
- [158] I. Ojima, C. M. Sun, Y. H. Park, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1249-1250.
- [159] L. Li, S. A. Thomas, L. L. Klein, C. M. Yeung, C. J. Maring, D. J. Grampovnik, P. A. Lartey, J. J. Plattner, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2655-2663.

- [160] I. Ojima, Y. H. Park, C. M. Sun, T. Brigaud, M. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5737-5740.
- [161] J. P. Burkhart, N. P. Peet, P. Bey, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3433-3436.
- [162] H. Sasai, W. S. Kim, T. Suzuki, M. Shibasaki, M. Mitsuda, J. Hasegawa, T. Ohashi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6123-6126.
- [163] J. E. Semple, T. D. Owens, K. Nguyen, O. E. Levy, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2769-2772.
- [164] L. Banfi, G. Guanti, R. Riva, A. Basso, E. Calcagno, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4067-4069.
- [165] C. Hulme, T. Nixey, *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **2003**, *6*, 921-929.
- [166] T. D. Owens, J. E. Semple, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3301-3304.
- [167] U. Schmidt, S. Weinbrenner, *Chem. Commun.* **1994**, 1003-1004.
- [168] T. D. Owens, G.-L. Araldi, R. F. Nutt, J. E. Semple, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6271-6274.
- [169] S. E. Denmark, Y. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7825-7827.
- [170] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615.
- [171] Z. Li, A.-C. Ortega-Vilain, G. S. Patil, D.-L. Chu, J. E. Foreman, D. D. Eveleth, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4089-4098.
- [172] W. Lubisch, H. P. Hofmann, H. J. Treiber, A. Möller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2187-2191.
- [173] H. H. Wasserman, W.-B. Ho, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4364-4366.
- [174] H. H. Wasserman, A. K. Petersen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8972-8973.
- [175] H. H. Wasserman, A. K. Petersen, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 953-956.
- [176] H. H. Wasserman, M. D. Xia, A. K. Petersen, M. R. Jorgensen, E. A. Curtis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6163-6166.
- [177] C. Fernández-García, K. Prager, M. A. McKerverey, B. Walker, C. H. Williams, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 433-436.
- [178] H. O. Kim, H. Nakanishi, M. S. Lee, M. Kahn, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 301-302.
- [179] M. K. Wong, C. W. Yu, W. H. Yuen, D. Yang, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3606-3609.
- [180] K. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 351-354.
- [181] N. Fuchi, T. Doi, B. Cao, M. Kahn, T. Takahashi, *Synlett* **2002**, 285-289.

- [182] S. Colarusso, B. Gerlach, U. Koch, E. Muraglia, I. Conte, I. Stansfield, V. G. Matassa, F. Narjes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 705-708.
- [183] I. Ojima, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 383-389.
- [184] M. Meldal, A. Papanikos, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 181-195.
- [185] M. Willert, J. M. Benito, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 91-101.
- [186] A. Basso, L. Banfi, R. Riva, P. Piaggio, G. Guanti, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2367-2370.
- [187] L. Banfi, A. Basso, G. Guanti, R. Riva, *Molecular Diversity* **2003**, *6*, 227-235.
- [188] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 690-700; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 639-649.
- [189] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 259-278.
- [190] R. E. Gawley, Q. Zhang, A. T. McPhail, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2093-2106.
- [191] N. Kise, T. Urai, J.-I. Yoshida, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3125-3128.
- [192] C. Gaul, K. Schärer, D. Seebach, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3059-3073.
- [193] R. M. Adlington, J. E. Baldwin, J. C. Bottaro, M. W. D. Perry, *Chem. Commun.* **1983**, 1040-1041.
- [194] J. E. Baldwin, J. C. Bottaro, J. N. Kolhe, R. M. Adlington, *Chem. Commun.* **1984**, 22-23.
- [195] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, J. C. Bottaro, A. U. Jain, J. N. Kolhe, M. W. D. Perry, I. M. Newington, *Chem. Commun.* **1984**, 1095-1096.
- [196] R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 1159-1163.
- [197] R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 731-736.
- [198] R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1131-1134.
- [199] R. Brehme, B. Stroede, *J. Prakt. Chem.* **1987**, 246-258.
- [200] R. Brehme, A. Klemann, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4113-4118.
- [201] R. Brehme, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 2039-2046.
- [202] R. Brehme, H. E. Nikolajewski, *Z. Chem.* **1968**, *8*, 226-227.
- [203] R. Fernández, J. M. Lassaletta, *Synlett* **2000**, 1228-1240.
- [204] D. Enders, M. Bolkenius, J. Vázquez, J. M. Lassaletta, R. Fernández, *J. Prakt. Chem.* **1998**, *340*, 281-285.

- [205] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5787-5790.
- [206] R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, M. Alcarazo, J. Martín, J. M. Lassaletta, *Synlett* **2001**, *7*, 1158-1160.
- [207] R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5201-5207.
- [208] J. M. Lassaletta, R. Fernández, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3691-3694.
- [209] R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 471-472.
- [210] J. M. Lassaletta, R. Fernández, C. Gasch, J. Vázquez, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9143-9160.
- [211] R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Synthesis* **1996**, 627-632.
- [212] D. Enders, R. Syrig, G. Raabe, R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Synthesis* **1996**, 48-52.
- [213] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, E. Díez, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7002-7003.
- [214] E. Díez, R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, E. Martín-Zamora, J. Vázquez, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5144-5155.
- [215] D. Enders, E. Díez, R. Fernández, E. Martín-Zamora, J. M. Muñoz, R. R. Pappalardo, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6329-6336.
- [216] D. Enders, J. Vázquez, *Synlett* **1999**, 629-631.
- [217] D. Enders, J. Vázquez, G. Raabe, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 893-901.
- [218] J. M. Lassaletta, J. Vázquez, A. Prieto, R. Fernández, G. Raabe, D. Enders, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2698-2703.
- [219] R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, J. Vázquez, E. Díez, A. Monge, J. M. Lassaletta, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3598-3600; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 3428-3430.
- [220] C. Pareja, E. Martín-Zamora, R. Fernández, J. M. Lassaletta, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8846-8854.
- [221] B. M. Trost, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1044-1046.
- [222] H. Nemoto, Y. Kubota, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4515-4516.

- [223] H. H. Wasserman, R. W. DeSimone, W.-B. Ho, K. E. McCarthy, K. S. Prowse, A. P. Spada, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7207-7210.
- [224] H. Stetter, G. Dämbkes, *Synthesis* **1977**, 403-404.
- [225] H. Bandel, *Dissertation*, Universität Tübingen, **2000**.
- [226] S. V. McKinley, J. W. Rakshys, *Chem. Commun.* **1972**, 134-135.
- [227] J. Westman, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3745-3747.
- [228] M. H. Bolli, S. V. Ley, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1998**, 2243-2246.
- [229] A. B. Charette, A. A. Boezio, M. K. Janes, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3777-3779.
- [230] G. Märkl, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3005-3010.
- [231] P. A. Chopperd, R. J. Searle, F. H. Devitt, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1015-1019.
- [232] G. Doleschall, *Synthesis* **1981**, 478-480.
- [233] M. P. Cooke Jr., D. L. Burman, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4955-4963.
- [234] F. Buzzetti, N. Barbugian, C. A. Gandolfi, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2505-2508.
- [235] T. Hiyama, K. Kobayashi, M. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4959-4962.
- [236] H. H. Wasserman, J. Fukuyama, N. Murugesan, J. van Duzer, L. Lombardo, V. Rotello, K. McCarthy, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 371-372.
- [237] H. H. Wasserman, V. M. Rotello, D. R. Williams, J. W. Benbow, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2785-2786.
- [238] A. R. Tunoori, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *37*, 8751-8754.
- [239] J. P. Collman, L. S. Hegedus, M. P. Cooke, J. R. Norton, G. Dolcetti, D. N. Marquardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1789-1790.
- [240] C. U. Pittman, S. E. Jacobson, H. Hiramoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4774-4775.
- [241] P. Hodge, G. Richardson, *Chem. Commun.* **1975**, 622-623.
- [242] D. H. Drewry, D. M. Coe, S. Poon, *Med. Res. Rev* **1999**, *19*, 97-148.
- [243] A. Wells, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 1715-1719.
- [244] N. J. Lawrence, in *Preparation of Alkenes, a Practical Approach* (Ed.: J. M. J. Williams), Oxford University Press, London, **1996**, 19-58.
- [245] J. J. Kiddle, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1339-1341.
- [246] H. Rehman, J. M. Rao, *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 1119-1128.
- [247] B. C. Hamper, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5558-5562.

- [248] F. Zaragoza, H. Stephensen, *J. Org. Chem* **2001**, *66*, 2518-2521.
- [249] H. J. Bestmann, S. Pfohl, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 1688-1693.
- [250] H. H. Wasserman, D. S. Ennis, C. A. Blum, V. M. Rotello, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6003-6006.
- [251] H. H. Wasserman, C. M. Baldino, S. J. Coats, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8231-8235.
- [252] H. H. Wasserman, J. J. Wang, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5581-5586.
- [253] R. M. Adlington, J. E. Baldwin, D. Catterick, G. J. Pritchard, *J. Chem. Soc. Perkin I* **2000**, 299-302.
- [254] H. H. Wasserman, G. H. Kuo, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 873-876.
- [255] H. H. Wasserman, G. H. Kuo, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7071-7082.
- [256] H. H. Wasserman, J. H. Chen, M. D. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1401-1402.
- [257] H. H. Wasserman, J. H. Chen, M. D. Xia, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2607-2616.
- [258] A. Williams, I. T. Ibrahim, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7090-7095.
- [259] I. F. Wilson, J. C. Tebby, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1972**, 31-34.
- [260] G. Märkl, *Z. Naturforsch.* **1963**, *18b*, 1136-1137.
- [261] J. S. Panek, B. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12022-12023.
- [262] C. Sylvain, A. Wagner, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1043-1044.
- [263] A. B. Smith, H. Liu, H. Okumura, D. A. Favor, R. Hirschmann, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2041-2044.
- [264] C. Pothion, M. Paris, A. Heitz, L. Rocheblave, F. Rouch, J. A. Fehrentz, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7749-7752.
- [265] B. J. Hall, J. D. Sutherland, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6593-6596.
- [266] A. Kirschning, *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342*, 508-511.
- [267] H. H. Wasserman, A. K. Petersen, M. Xia, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6771-6784.
- [268] D. H. Slee, K. L. Laslo, J. H. Elder, I. R. Ollmann, A. Gustchina, J. Kervinen, A. Zdanov, A. Wlodawer, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11867-11878.
- [269] G. A. Ropp, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 842-852.
- [270] D. A. Klumpp, S. Lau, M. Garza, B. Schick, K. Kantardjieff, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7635-7637.
- [271] N. Yonezawa, T. Hino, T. Kinuno, T. Matsuki, T. Ikeda, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 1687-1695.

- [272] H. H. Wasserman, K. Lee, M. D. Xia, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2511-2514.
- [273] R. Hua, H. Takeda, Y. Abe, M. Tanaka, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 974-976.
- [274] W. Adam, Y.-Y. Chan, D. Cremer, J. Gauss, D. Scheutzow, M. Schindler, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2800-2803.
- [275] W. Adam, L. Hadjiarapoglou, A. Smerz, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 227-232.
- [276] S. F. Brady, J. T. Sisko, K. J. Stauffer, C. D. Colton, H. Qiu, S. D. Lewis, A. S. Ng, J. A. Shafer, M. J. Bogusky, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1063-1078.
- [277] R. Wischnat, J. Rudolph, R. Hanke, R. Kaese, A. May, H. Theis, U. Zuther, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4393-4394.
- [278] P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8301-8304.
- [279] E. Ohtsuka, M. Ikehara, D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 6553-6570.
- [280] C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yau, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 2727-2730.
- [281] B. S. Sproat, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5771-5774.
- [282] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [283] A. J. Harvey, A. D. Abell, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9763-9771.
- [284] K. Gademann, A. Häne, M. Rueping, B. Jaun, D. Seebach, *Angew. Chem* **2003**, *115*, 1573-1575; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1534-1537.
- [285] R. A. Tromp, M. van der Hoeven, A. Amore, J. Brussee, M. Overhand, G. A. van der Marel, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetrie* **2001**, *12*, 1109-1112.
- [286] C. C. Mak, A. Brik, D. L. Lerner, J. H. Elder, G. M. Morris, A. J. Olson, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2025-2040.
- [287] M. Schuster, B. Munoz, W. Yuan, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1247-1250.
- [288] B. H. Rickman, S. Matile, K. Nakanishi, N. Berova, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5041-5064.
- [289] P. E. J. Sanderson, *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 179-197.
- [290] O. Mader, *Dissertation*, Universität Tübingen, **2004**.
- [291] H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1746-1752.

- [292] K. A. Scheidt, H. Chen, B. C. Follows, S. R. Chemler, D. S. Coffey, W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6436-6437.
- [293] D. V. Siev, J. E. Semple, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 19-22.
- [294] A. M. Murphy, R. Dagnino, P. L. Vallar, A. J. Trippe, S. L. Sherman, R. H. Lumpkin, S. Y. Tamura, T. R. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3157-3159.
- [295] A. Lee, L. Huang, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9907-9914.
- [296] W. J. L. Wood, L. Huang, J. A. Ellman, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 869-880.
- [297] R. Lazny, M. Michalak, *Synlett* **2002**, 1931-1934.
- [298] J. H. Kirchhoff, S. Bräse, D. Enders, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 71-77.
- [299] D. Enders, J. H. Kirchhoff, J. Köbberling, T. H. Peiffer, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1241-1244.
- [300] J. Köbberling, *Dissertation*, RWTH Aachen, **2001**.
- [301] J. Schooren, *Dissertation*, TU Darmstadt, **2003**.
- [302] H. Delalu, A. Marchand, *J. Chim. Phys.* **1984**, *81*, 149-156.
- [303] P. J. Diel, L. Maier, *Phosphorus and Sulfur* **1988**, *36*, 85-98.
- [304] G. Sorg, *Dissertation*, Universität Tübingen, **2003**.
- [305] A. Dondoni, D. Perrone, P. Merino, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8074-8080.
- [306] A. El-Dahshan, *Diplomarbeit*, Universität Tübingen, **2004**.
- [307] S. Narasimhan, R. Balakumar, *Aldrichimica Acta* **1998**, *31*, 19-26.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, K. W. Bock, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel†, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, S. Kemmler-Sack†, H. Kneifel, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann†, H. Pommer, G. Reinhardt, H. Schott, V. Schurig, M. Schwarz, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

Steffen Weik

26. September 1973

geboren in Calw

1980 – 1984

Grundschule Wildberg

1984 – 1993

OTTO HAHN-Gymnasium Nagold

Mai 1993

Abitur

Juni 1993 – August 1994

Zivildienst

Oktober 1994 – August 2000

Chemie-Studium an der
EBERHARD-KARLS-Universität Tübingen

Oktober 1996

Vordiplom

Januar 2000

mündliche Diplomprüfung

März 2000 – August 2000

Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel
„Synthese, Charakterisierung und Anwendung polymerer Reagenzien zum Einsatz in der polymer-unterstützten Flüssigphasensynthese“
am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Rademann und Prof. Dr. G. Jung

Oktober 2000 – Juni 2004

Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel
„Entwicklung polymerer Carbanionen-Äquivalente zur Anwendung in milden C-C-Verknüpfungen und deren Einsatz in der Synthese von Aspartylprotease-Inhibitoren des Norstatin-Typs“
am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Rademann und Prof. Dr. G. Jung