

**SYNTHESE UND TESTUNG ELEKTROPHILER VERBINDUNGEN ALS
INHIBITOREN DER
SEKRETORISCHEN ASPARTAT-PROTEASEN (SAPs)
VON *CANDIDA ALBICANS***



**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Björn Degel
aus Königsberg i. Bayern

Würzburg 2006

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg.

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation.

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: ..

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister von Januar 2003 bis März 2006 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Martina E., Stiefl N., Degel B., Schulz F., Breuning A., Schiller M., Vicik R., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T. Screening of electrophilic compounds yields an aziridinyl peptide as new active-site directed SARS-CoV main protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (24), 5365-5369.

Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrabe U. Comparison of the separation of aziridine isomers applying heptakis(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)beta-CD and heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)beta-CD in aqueous and nonaqueous systems. *Electrophoresis* **2005**, *26* (20), 3897-3903.

Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrabe U. Development and validation of a separation method for the diastereomers and enantiomers of aziridine-type protease inhibitors. *Electrophoresis* **2005**, *26* (12), 2313-2319.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Möglichkeit danken, mit einem sehr attraktiven Thema in einem medizinisch-chemischen, Target-orientierten Forschungsgebiet völliges Neuland zu betreten. Ihr reges Interesse und viele anregende Diskussionen haben sehr zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Unterstützung danken:

Prof. Dr. Joachim Morschhäuser und Dr. Peter Staib, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an den *Candida albicans*-Zellkulturen und die Überlassung der SAP2,

PD Dr. Knut Baumann und Dipl.-Biol. Josef Scheiber, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Docking-Experimente,

Dr. Christoph Gelhaus und Prof. Dr. Matthias Leippe, Institut für Zoologie, Universität Kiel, für die *In-vitro*-Testungen an *Plasmodium falciparum*,

Prof. Dr. Gerhard Klebe, Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg, für die Überlassung von Plasmepsin II,

Prof. Dr. Philip Rosenthal, University of California, San Francisco, für die Überlassung des Falcipain 2-Plasmids und Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck, für die Expression von Falcipain 2 aus *Plasmodium falciparum*,

Prof. Dr. James McKerrow und Dr. Connor Caffrey, University of California, San Francisco, für die Überlassung von Rhodesain aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*,

PD Dr. August Stich, Missionsärztliches Institut, Abteilung Tropenmedizin, Würzburg, für die Testungen an *Trypanosoma brucei brucei*,

Prof. Dr. Heidrun Moll und Prof. Dr. Alicia Ponte-Sucre, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an *Leishmania major*,

PD Dr. Wilma Ziebuhr und Dr. Knut Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an Bakterien,

Prof. Dr. John Ziebuhr, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an den Coronaviren,

PD Dr. Ute Hentschel und Dipl.-Biol. Jan Schulke, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für das Bereitstellen der lyophilisierten Schwämme,

Prof. Dr. Gerhard Bringmann und Dipl.-Chem. Tobias Gulder, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Zusammenarbeit bei den Schwammprojekten,

Dr. Werner Schmitz, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Physiologie II, Universität Würzburg, für die MS-Messungen an der SAP2,

Dipl.-Chem. Franziska Schulz, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Messung der ESI-Massenspektren und die Testungen an *Plasmodium falciparum* sowie an Falcipain 2 und 3,

Dipl.-Pharm. Erika Martina, Institut für Pharmazie, Universität Padua, für die Mitentwicklung des fluorimetrischen FRET-Assays für SAP2 und für die Messungen an verschiedenen Cystein-Proteasen,

Dr. Radim Vičák und Dr. Ulrich Käppler, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Einweisung in die Durchführung und Auswertung der Enzymassays,

Dipl.-Chem. Markus Schiller und Dipl.-Chem. Alexander Breuning, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Messung der NMR-Spektren.

Meinen Kollegen, Franziska Schulz, Dr. Birgit Vedder, Erika Martina, Dr. Radim Vičák, Dr. Ulrich Käppler, Markus Schiller, Alexander Breuning, Thomas Pfeuffer und Christian Büchold danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft.

Den Werkstättenlern, Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, den Bau besonderer Aparaturen und die netten Gespräche.

Meinen Mitstreitern im 1.Semester, Tanja „Tänscha“ Grimm, Dr. Birgit Vedder, Josef Scheiber, Thomas Pfeuffer und Dr. Radim Vičák, gilt mein Dank für das „erträglichgestalten“ der Studentenbetreuung.

Meinen Eltern

Und

Meinen drei Lieblingen

ABKÜRZUNGEN

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| abs.: absolut | HOSuc: <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| Abz: 2-Aminobenzoessäure | IBCF: Isobutylchloroformiat |
| AMC: 7-Amino-4-methylcumarin | i. Vak.: im Vakuum |
| AS: Aminosäure, 3-Buchstaben-Code, L-konfiguriert, <i>D</i> -AS explizit bezeichnet | <i>m</i> -CPBA: <i>meta</i> -Chlorperbenzoessäure |
| Äq.: Äquivalent(e) | Me: Methyl |
| Bn: Benzyl | M ^{pro} : Main Protease |
| Boc: <i>tert</i> -Butoxycarbonyl | Mts: 2,4,6-Trimethylphenylsulfonyl |
| BSA: Bovines Serum Albumin | NBS: <i>N</i> -Bromsuccinimid |
| Bzl: Benzoyl | NEt ₃ : Triethylamin |
| Cbz: Benzyloxycarbonyl | NMM: <i>N</i> -Methylmorpholin |
| DabcyI: 4'-Dimethylaminoazobenzol-4-carboxylat | Ph: Phenyl |
| DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en | Ph ₃ P: Triphenylphosphin |
| DC: Dünnschichtchromatographie | PLE: Pig liver esterase |
| DCC: Dicyclohexylcarbodiimid | <i>p</i> Tos: <i>para</i> -Toluolsulfonsäure |
| DIBALH: Diisobutylaluminiumhydrid | PE: Petrolether 40-60 |
| DIEA: Diisopropylethylamin | PyBOP: 1-Benzotriazoloxyltrispyrrolidinophos- phoniumhexafluorophosphat |
| DMAP: 4-Dimethylaminopyridin | RT: Raumtemperatur |
| DMF: Dimethylformamid | RP: Reversed-Phase-Kieselgel |
| DMSO: Dimethylsulfoxid | SAP: sekretorische Aspartat-Protease |
| DPPA: Diphenylphosphorylazid, Phosphorsäurediphenylesterazid | SC: Säulenchromatographie |
| DPSI: Diphenylsulfimin Monohydrat | TBAF: Tetrabutylammoniumfluorid |
| DTT: Dithiothreitol | TBDMS: <i>tert</i> butyldimethylsilyl |
| EDANS: 5-(Aminoethyl)aminonaphthylsulfonat | TEA: Triethylamin |
| EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure | TFA: Trifluoressigsäure |
| Et: Ethyl | THF: Tetrahydrofuran |
| EtOAc: Ethylacetat | TMS: Tetramethylsilan |
| EtOH: Ethanol | TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Et ₂ O: Diethylether (Ether) | |
| ges.: gesättigt | |
| HOBt: <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol | |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. | ALLGEMEINER TEIL..... | 1 |
| 1. | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | VORKOMMEN, FUNKTION UND BEDEUTUNG VON ASPARTAT-PROTEASEN..... | 2 |
| 1.2 | AUFBAU UND STRUKTUR VON ASPARTAT-PROTEASEN DES CLANS AA..... | 5 |
| 1.3 | KATALYSEMECHANISMUS UND SUBSTRATSPEZIFITÄT VON ASPARTAT-PROTEASEN..... | 7 |
| 1.4 | INHIBITOREN VON ASPARTAT-PROTEASEN..... | 9 |
| 1.4.1 | <i>Reversible Inhibitoren.....</i> | <i>10</i> |
| 1.4.2 | <i>Irreversible Inhibitoren.....</i> | <i>14</i> |
| 1.5 | SCHWÄMME..... | 18 |
| 1.6 | ANTIMYKOTIKA..... | 19 |
| 2. | ZIELSETZUNG..... | 21 |
| 3. | SYNTHESEN..... | 23 |
| 3.1 | SYNTHESE VON CIS-KONFIGURIERTEN EPOXIDEN..... | 23 |
| 3.2 | SYNTHESE VON CIS-KONFIGURIERTEN AZIRIDINEN..... | 26 |
| 3.3 | SYNTHESE VON Z-OLEFINEN..... | 34 |
| 3.4 | PEPTIDKUPPLUNGSREAKTIONEN..... | 35 |
| 3.4.1 | <i>Verschiedene Kupplungsverfahren.....</i> | <i>35</i> |
| 3.4.2 | <i>Synthese der Peptidfragmente und Aminosäurederivate.....</i> | <i>39</i> |
| 3.4.3 | <i>Aminosäure- und Peptid-verknüpfte Epoxide.....</i> | <i>42</i> |
| 3.4.4 | <i>Aminosäure- und Peptid-verknüpfte Aziridine.....</i> | <i>50</i> |
| 3.4.5 | <i>Aminosäure- und Peptid-verknüpfte Z-Olefine.....</i> | <i>58</i> |
| 3.4.6 | <i>Aminosäure-verknüpfte E-Olefine.....</i> | <i>61</i> |
| 3.4.7 | <i>Aminosäure-verknüpftes Bernsteinsäurederivat.....</i> | <i>63</i> |
| 3.5 | BIOTIN-MARKIERUNG VON FLAVOPHOSPHOLIPOL..... | 64 |
| 4. | ENZYMSSAYS..... | 66 |
| 4.1 | EINFÜHRUNG..... | 66 |
| 4.2 | CHARAKTERISIERUNG IRREVERSIBLER HEMMUNG..... | 67 |
| 4.3 | KONTINUIERLICHER ASSAY NACH TIAN UND TSOU..... | 72 |
| 4.4 | VERDÜNNUNGSASSAY NACH KITZ UND WILSON..... | 73 |
| 4.5 | CHARAKTERISIERUNG NICHT-ZEITABHÄNGIGER HEMMUNG..... | 74 |
| 4.6 | ENZYMATISCHE TESTUNGEN AN SAP2..... | 75 |
| 4.6.1 | <i>Photometrischer Assay.....</i> | <i>75</i> |
| 4.6.2 | <i>Fluorimetrischer Assay.....</i> | <i>76</i> |
| 4.6.3 | <i>Nachweis der Irreversibilität der Hemmung.....</i> | <i>86</i> |
| 4.7 | UNTERSUCHUNGEN ZUR HEMMUNG VON CYSTEIN-PROTEASEN DER PAPAIN-FAMILIE..... | 88 |
| 4.8 | UNTERSUCHUNG AN CORONAVIRALEN CYSTEIN-PROTEASEN..... | 90 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5. | BIOLOGISCHE TESTUNGEN..... | 95 |
| 5.1 | HEMMUNG VON <i>CANDIDA ALBICANS</i> IN ZELLKULTUREN | 95 |
| 5.2 | ANTIPLASMODIALE AKTIVITÄT | 100 |
| 5.3 | AKTIVITÄT GEGEN <i>LEISHMANIA MAJOR</i> UND <i>TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI</i> | 104 |
| 5.4 | AKTIVITÄT GEGEN BAKTERIEN | 106 |
| 6. | DOCKING | 111 |
| 6.1 | EPOXIDE | 111 |
| 6.2 | OLEFINE | 112 |
| 6.3 | AZIRIDINE | 114 |
| 7. | DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN..... | 118 |
| 7.1 | SELEKTIVITÄT BEZÜGLICH DER ENZYME | 118 |
| 7.2 | EINFLUSS DER STEREOCHEMIE | 118 |
| 7.3 | EINFLUSS DER SUBSTITUENTEN | 120 |
| 7.4 | EINFLUSS DES ELEKTROPHILEN SYSTEMS | 124 |
| 7.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 127 |
| 8. | BINDUNGSSTUDIEN VON BIOTIN-MARKIERTEM FPL AN PENICILLIN- BINDEPROTEINE VON <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> | 128 |
| 9. | SCHWAMMPROJEKT | 129 |
| 9.1 | EXTRAKTION | 129 |
| 9.2 | TESTUNG AUF PROTEASE-AKTIVITÄT | 130 |
| 9.3 | EINGRENZUNG DER CATHEPSIN L-AKTIVITÄT DER AKTIVEN SCHWAMMEXTRAKTE | 133 |
| 9.4 | DISKUSSION | 135 |
| 10. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 137 |
| 11. | SUMMARY | 142 |
| II. | EXPERIMENTELLER TEIL..... | 147 |
| 12. | ALLGEMEINE ANGABEN | 147 |
| 12.1 | VERWENDETE MESSGERÄTE, ANALYTISCHE UND CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN | 147 |
| 12.2 | ENZYM-ASSAYS | 149 |
| 12.3 | ENZYME, SUBSTRATE UND REAGENZIEN | 152 |
| 12.4 | ARBEITSMETHODEN | 153 |
| 13. | ALLGEMEINE SYNTHETISCHE METHODEN | 154 |
| 13.1 | METHODE A: EPOXIDSYNTHESEN | 154 |
| 13.2 | METHODE B: AZIRIDINSYNTHESEN | 155 |
| 13.3 | METHODE C: Z-OLEFINSYNTHESEN | 157 |
| 13.4 | METHODE D: HYDROLYSEN | 158 |
| 13.5 | METHODE E: SYNTHESE VON AMINOSÄUREDERIVATEN UND PEPTIDEN | 159 |

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 13.6 | METHODE F: SCHUTZGRUPPEN..... | 160 |
| 13.7 | METHODE G: AMINOSÄURE- / PEPTIDKUPPLUNGEN..... | 161 |
| 13.8 | METHODE H: BIOTIN-MARKIERUNG VON FPL..... | 163 |
| 14. | SYNTHESIERTE VERBINDUNGEN | 164 |
| 14.1 | EPOXID-BAUSTEINE | 164 |
| 14.2 | AZIRIDIN-BAUSTEINE..... | 168 |
| 14.3 | Z-OLEFIN-BAUSTEINE | 177 |
| 14.4 | AMINOSÄUREDERIVATE | 179 |
| 14.5 | PEPTIDE..... | 181 |
| 14.6 | AS- / PEPTID-VERKNÜPFTE EPOXIDE | 186 |
| 14.7 | AS / PEPTID-VERKNÜPFTE AZIRIDINE | 201 |
| 14.8 | AS- / PEPTID-VERKNÜPFTE Z-OLEFINE | 215 |
| 14.9 | AS-VERKNÜPFTE E-OLEFINE..... | 230 |
| 14.10 | AS-VERKNÜPFTE BERNSTEINSÄUREDERIVATE..... | 235 |
| 14.11 | BIOTIN-MARKIERTES FLAVOPHOSPHOLIPOL (FPL) | 236 |
| 15. | ÜBERSICHT DER SYNTHETISIERTEN UND GETESTETEN VERBINDUNGEN | 237 |
| 16. | LITERATURVERZEICHNIS | 241 |
| 17. | LEBENS LAUF, VERÖFFENTLICHUNGEN UND ERKLÄRUNG | 248 |

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

Proteasen sind protein- und peptidspaltende Enzyme, die laut IUBMB- oder EC-System (International Union of Biochemistry and Molecular Biology bzw. Enzyme Commission) zur Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4) gehören. Nach der Position der Spaltstelle innerhalb des Substrats werden sie in Endopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Exopeptidasen (EC 3.4.21-99) unterteilt. Auf Grundlage der Aminosäuren im aktiven Zentrum und des daraus resultierenden Hydrolysemechanismus erfolgt die weitere Aufteilung der Proteasen in die 5 Untergruppen Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metallo-Proteasen.^[1]

Das MEROPS-System^[2] gruppiert Enzyme aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen zu Familien zusammen. Die Zusammenfassung zu verschiedenen Clans erfolgt für Familien, die sich genetisch aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein entwickelt haben (homologe Proteine), wobei Familien desselben Clans ähnliche Tertiär- bzw. Quartärstrukturen aufweisen.^[3] Tabelle 1-1 zeigt wichtige Familien innerhalb der Aspartat-Proteasen mit ihren typischen Proteasen. Das Vorkommen der Aspartat-Proteasen der unterschiedlichen Clans in verschiedenen Organismen ist in Tabelle 1-2 zusammengefasst. Weitere Informationen bietet die MEROPS Datenbank: <http://www.merops.sanger.ac.uk>.

Tab. 1-1: Klassifizierung von Aspartat-Proteasen nach MEROPS

| Clan | Familie | typische Proteasen | Aktives Zentrum | Organismen |
|------|---------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| AA | A1 | Pepsin | 2 x Asp + H ₂ O | Mensch, Tiere |
| | | Renin | | Mensch, Tiere |
| | A2 | Cathepsin D, E | | Mensch, Tiere |
| | | Memapsin1, 2 | | Mensch |
| | | SAP1-10 | | Pilze |
| | | HIV-1-Protease | | Viren |
| AB | A6 | Nodavirus Peptidase | Asp, Asn + H ₂ O | Viren |
| | A21 | Tetravirus Peptidase | | Viren |
| AC | A8 | Signal Peptidase II | 2 x Asp + H ₂ O | Bakterien, Tiere |
| AD | A22 | Presenilin1 | 2 x Asp | Mensch |
| AE | A25 | Gpr-Peptidase | 2 x Asp + H ₂ O | Bakterien, Archaea |
| | A31 | HybD-Peptidase | | Bakterien |
| AF | A26 | Omptin | Asp, His + 2 x Asp | Bakterien |
| A- | A5 | Thermopsin | unbekannt | Archaea |

Tab. 1-2: Vorkommen der Aspartat-Protease-Clans in verschiedenen Organismen

| Clan | Bakterien | Archaea | Protozoen | Pilzen | Pflanzen | Säugetiere | Viren |
|------|-----------|---------|-----------|--------|----------|------------|-------|
| AA | - | - | + | + | + | + | + |
| AB | - | - | - | - | - | - | + |
| AC | + | - | - | - | - | + | - |
| AD | + | + | + | + | + | + | - |
| AE | + | + | - | - | - | - | - |
| AF | + | - | - | - | - | - | - |
| A- | - | + | - | - | - | - | - |

1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Aspartat-Proteasen

Neben den Cystein-Proteasen sind auch die Aspartat-Proteasen bei Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und bei Säugetieren, also auch dem Menschen, weit verbreitet.^[4] Die nur als Endopeptidasen vorkommenden Aspartat-Proteasen spielen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle, da sie an zahlreichen physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.^[5-7]

Die Aspartat-Protease Pepsin ist z. B. für die Nahrungsverdauung zuständig und Renin übernimmt eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse des α_2 -Globulins Angiotensinogen, dem ersten Schritt im Renin-Angiotensin-System (RAS), bei dem Angiotensin I freigesetzt wird.^[7]

Durch Überexpression oder Fehlregulation der Proteasen kann es zu unerwünscht hohen Enzymaktivitäten kommen, wodurch dann auch körpereigene Strukturen abgebaut werden. Dies ist vor allem bei den ubiquitären, lysosomalen Aspartat-Proteasen Cathepsin D und E der Fall, denen eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion und der Metastasierung bei Brustkrebs zugesprochen wird.^[8-10] Das ebenfalls zur Pepsinfamilie gehörende Memapsin 2, das auch unter dem Namen BACE („ β -Site APP Cleaving Enzyme) bekannt ist sowie das Presenilin 1 spielen eine wichtige Rolle bei der Alzheimer-Demenz. Die membranständige β -Sekretase Memapsin 2 spaltet das Amyloid-Precursor-Protein (APP) und generiert so das Substrat für die ebenfalls membrangebundene γ -Sekretase Presenilin 1. Dieses spaltet das Fragment in der Plasmamembran weiter, wobei das 4 kDa große, C-terminale A β -Peptid, die Quelle für die Amyloid-Plaques, den postulierten Auslösern der Alzheimer-Demenz freigesetzt wird.^[11-17]

Physiologische und pathophysiologische Funktionen einiger humaner Aspartat-Proteasen sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 1-3).^[5-7]

Tab. 1-3: Physiologische und pathophysiologische Funktion von humanen Aspartat-Proteasen

| humane Aspartat-Proteasen | | |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| beteiligte Enzyme | physiologische Funktion | pathophysiologische Funktion |
| Pepsin | Abbau von Nahrungsproteinen | |
| Renin | Blutdruckregulation | Bluthochdruck |
| Cathepsin D, E | unspezifischer Proteinabbau | Tumorinvasion und Metastasierung bei Brustkrebs; Alzheimer; Entzündungen |
| Memapsin 2 Presenilin 1 | | Alzheimer |

Neben den humanen Aspartat-Proteasen gibt es eine Reihe weiterer Aspartat-Proteasen, die speziell bei Virenerkrankungen (z.B. AIDS), Protozoenerkrankungen (z.B. Malaria) und Pilzkrankheiten (z.B. Infektionen durch den Hefepilz *Candida albicans*) wichtige Pathogenitätsfaktoren darstellen.

Die Proteasen der Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die Plasmepepsine, die zur Gruppe der parasitären Hemoglobinasen gehören, spielen eine entscheidende Rolle im Lebenszyklus des Parasiten, da sie essentiell für den Abbau des Hämoglobins, der Hauptnahrungsquelle des Malaria-Erregers, sind.^[7]

Die wohl bekannteste Aspartat-Protease ist die HIV-1-Protease (human immunodeficiency virus 1) des HI-Virus, der die Immunschwäche AIDS auslöst. Die Protease spielt eine wichtige Rolle im Replikationszyklus der Retroviren und war das erste Target für die Entwicklung von antiretroviralen Arzneistoffen.^[7] Der AIDS-Erreger stammt sehr wahrscheinlich von dem bei Schimpansen gefundenen SI-Virus (simian immunodeficiency virus) ab und wurde wohl bereits in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts durch den Verzehr von Schimpansenfleisch auf den Menschen übertragen.^[18]

Der Hefepilz *Candida albicans* (lat. *candidus*: glänzend weiß; *albicare*: weiß werden), der etwa bei der Hälfte aller Menschen die Haut und die Schleimhäute des Verdauungstraktes besiedelt und in der vaginalen Flora vorkommt, ist eigentlich ein harmloser Begleiter.^[19-21] Dieser wichtigste Erreger von Pilzinfektionen beim Menschen ist ein typischer opportunistischer Mikroorganismus, der für eine Vielzahl von lokalen und systemischen Mykosen verantwortlich ist.^[21] Bei geschwächter Immunabwehr, z. B. durch Organtransplantationen, schwere Diabetes, Antibiotika-Therapie, Krebs oder AIDS, verursacht der Hefepilz Kandidosen der Mund- und Rachenschleimhäute sowie Genitalkrankheiten und Allergien.^[19,21,22] Nach Dissemination über die Blutbahn führt der Pilz zu lebensbedrohlichen Organschädigungen, vor allem der Leber und der Niere.^[19-21,23] Auf Grund der sehr schwer zu behandelnden Infektionen innerer Organe ohne gleichzeitige Schädigung des Wirtsorga-

nismus^[24] und der immer größer werdenden Zahl von Resistenzen von *Candida albicans* liegt die Mortalitätsrate systemischer Candidainfektionen bei etwa 35%.^[25-27] Die Pathogenese von *C. albicans* lässt sich in mehrere Infektionsstadien unterteilen, für die der Pilz eine Vielzahl von Mechanismen benutzt, die es ihm ermöglichen sich an verschiedenste Bedingungen anzupassen.^[21] Wichtige Virulenzfaktoren des Hefepilzes *C. albicans* sind die sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAPs), die 1965 erstmals beschrieben wurden.^[28] Bis jetzt sind 10 verschiedene SAP-Isoenzyme identifiziert (SAP1-10).^[29-31] Die Aufgaben der SAPs während einer Infektion reichen von der initialen Anlagerung des Pilzes, über den Abbau von Wirtsproteinen zur Nahrungsbereitstellung und der Schwächung der Immunabwehr durch Abbau von Immunoglobulinen, bis hin zur Zerstörung von Verteidigungsbarrieren des Wirtes durch Gewebeschädigungen.^[20,21,32,33] Verschiedene SAPs übernehmen dabei jeweils spezifische Aufgaben, was durch Expression zu unterschiedlichen Phasen der Infektion deutlich wird.^[19,20,34,35] Die SAPs lassen sich aufgrund ihrer homologen Aminosäuresequenzen (75 bzw. 90%) und ihres gemeinsamen Auftretens bei Infektionsphasen in die Untergruppen SAP1-3 bzw. SAP4-6 zusammenfassen.^[19,21,23,36] Die zu Beginn der Infektion auftretenden Enzyme SAP1-3 sind für die Anlagerung des Pilzes und Gewebeschädigungen verantwortlich,^[19,21,23,34,36-38] wohingegen SAP4-6 vor allem beim Befall der inneren Organe Leber und Niere vorherrschen.^[20,39,40] Auch die am stärksten exprimierte Protease SAP2 tritt bei den späteren Infektionsphasen der Organschädigungen auf.^[20,21] Die Funktionen der letzten vier SAP-Isoenzyme bei Infektionen sind noch nicht so genau untersucht. Bekannt ist jedoch, dass SAP8 den beiden SAP-Untergruppen sehr verwandt ist, während SAP7 nur noch geringe Homologie zu diesen aufweist.^[21] Bei den untereinander sehr homologen SAP9,10 handelt es sich um Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine.^[19,30,34,36,41]

In Tabelle 1-4 sind parasitäre, virale und durch Pilze verursachte Krankheiten aufgezeigt, bei denen Aspartat-Proteasen beteiligt sind.

Tab. 1-4: Parasitäre, virale und fungale Erkrankungen unter Beteiligung von Aspartat-Proteasen

| | | |
|------------------------------|-----------------------|----------------|
| parasitär | | |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | Plasmepsine I, II, IV | Malaria |
| virale | | |
| HIV | HIV-1/2-Protease | AIDS |
| fungale | | |
| <i>Candida albicans</i> | SAP1-10 | Pilzkrankungen |

1.2 Aufbau und Struktur von Aspartat-Proteasen des Clans AA

Die Struktur der Aspartat-Proteasen des Clans AA, Familie A1 lässt sich prinzipiell als ein Zwei-Domänen-Protein beschreiben.^[42]

Obwohl die Sequenz-Homologie der Aspartat-Proteasen untereinander sehr gering ist, ist ihre räumliche Struktur, die durch β -Faltblätter bestimmt wird, sehr ähnlich, und die Sequenz im Bereich der Bindungstasche ist hoch konserviert (vgl. Abb. 1-1). Die Tertiär-Struktur besteht aus zwei ähnlichen, fassartig aussehenden β -Domänen, die durch einen großen Spalt getrennt sind und je einen katalytisch aktiven Aspartat-Rest am Ende des Spaltes enthalten. Stabilisiert wird die Struktur durch drei Disulfid-Brücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen.^[43,44] Die Größe der Aspartat-Proteasen liegt zwischen 328 und 342 Aminosäuren, wobei die Plasmepsine die kürzeste und SAP2 die längste Sequenz aufweisen.^[24,45]

Wird ein Substrat im Bindungsspalt (active site cleft) zwischen den beiden Domänen gebunden, so sorgt eine flexible Schleife im aminoterminalen Bereich der Proteasen für eine Art „Umzäunung“ in der Bindungstasche.^[44]

Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Aspartat-Proteasen der Familie A1 des Clans AA zeigt vor allem die Struktur der sekretorischen Aspartat-Protease SAP2 einige Unterschiede im Vergleich zu den humanen Aspartat-Proteasen und den Plasmepsinen.^[21] Auffallend sind vor allem die größere S3-Tasche und eine, diese Tasche überlagernde zweite Schleife, die in allen SAP-Isoenzymen vorkommen.^[24,46,47] Der Vergleich der AS-Sequenz der verschiedenen SAP-Isoenzyme mit SAP2 zeigt zwar einige Homologie-Unterschiede (vgl. Kapitel 1.1), die Region der Bindungstasche mit den beiden katalytisch aktiven Aspartat-Resten Asp32 und Asp218 sowie der Aspartat-Rest Asp86 an der Spitze der ersten Schleife sind jedoch bei allen SAPs, sogar bei den GPI-verankerten SAP9-10, hoch konserviert. Der letztgenannte Aspartat-Rest stellt einen weiteren Unterschied der SAPs zu den anderen Aspartat-Proteasen der A1-Familie des Clans AA dar. Während bei den humanen Aspartat-Proteasen bzw. bei den Plasmepsinen an Position 86 der AS-Sequenz ein Threonin bzw. Serin sitzt, tragen die SAPs ein Aspartat. Diese Veränderung führt zu einer modifizierten Konformation des Proteinrückgrats und bedingt eine zusätzliche Grube am Zugang zum aktiven Spalt. Diese Unterschiede erklären vielleicht auch die größere Substratvariabilität, die es den SAPs ermöglicht, Proteine wie Albumin, Hämoglobin oder Immunoglobulin A, Moleküle der Extrazellulärmatrix wie Keratin, Kollagen, Laktoperoxidase sowie Enzyme der Blutgerinnungskaskade und den natürlichen Proteaseinhibitor α_2 -Makroglobulin zu spalten.^[21,30,33,48-56]

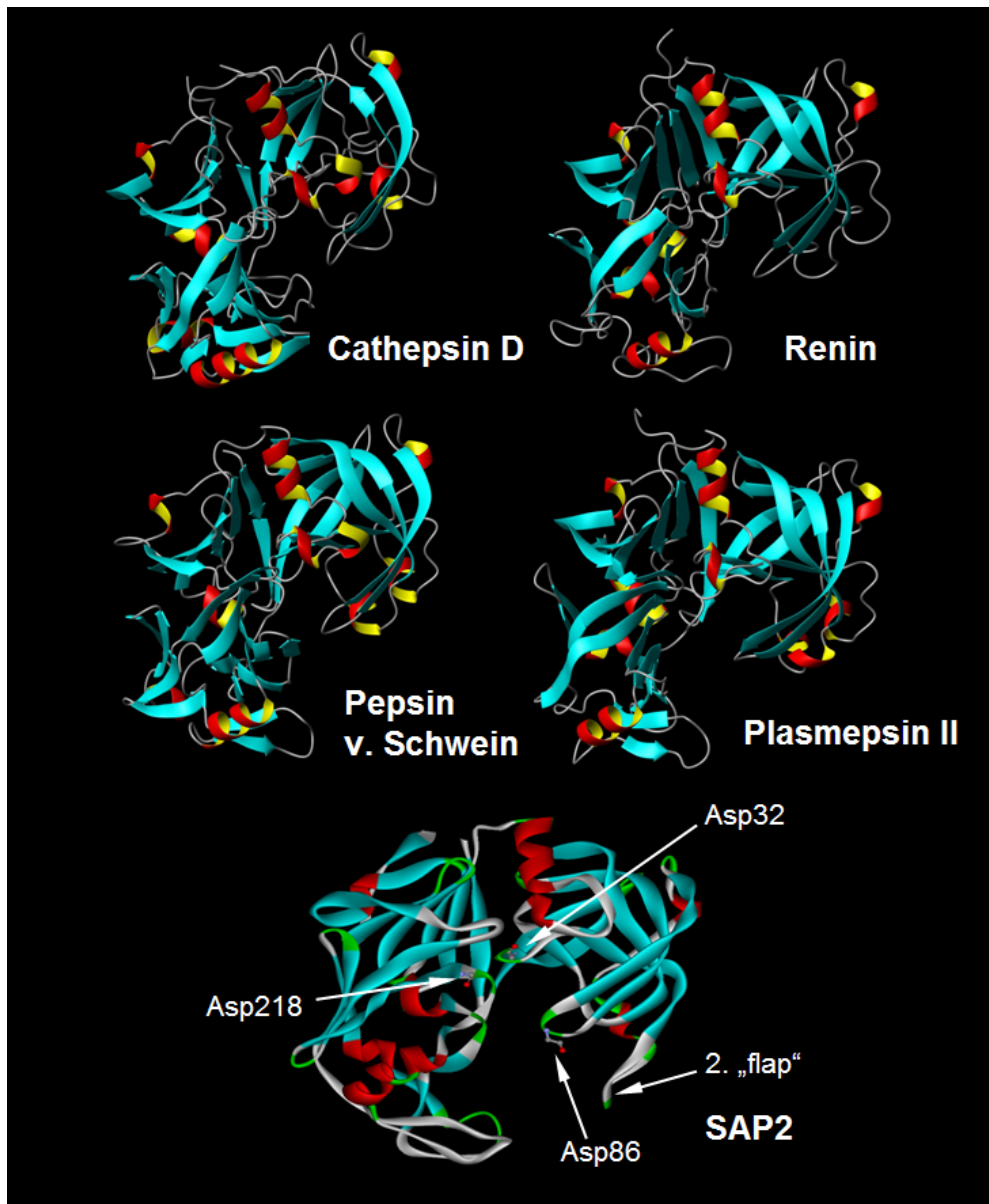


Abb. 1-1: Hohe strukturelle Ähnlichkeit von Aspartat-Proteasen des Clans AA, Familie A1; (3D-Strukturen entnommen aus der PDB)

Ein großer struktureller Unterschied zeigt sich zu der zur Familie A2 zählenden retroviralen HIV-1-Protease. Im Gegensatz zur „Pseudo-Dimer-Struktur“ der Aspartat-Proteasen der Familie A1 (humane, SAPs, Plasmepsine) handelt es sich bei der HIV-1-Protease um ein „echtes“ Homodimer (vgl. Abb. 1-2). Das Homodimer setzt sich aus zwei identischen, jeweils 99 Aminosäuren umfassenden Monomeren (vgl. Abb. 1-2) zusammen und zeigt eine fast perfekte C₂-Symmetrie. Stabilisiert wird das Dimer durch ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt („dimer interface“). Das aktive Zentrum befindet sich an der Grenzfläche der beiden monomeren Untereinheiten, die je einen katalytisch aktiven Aspartat-Rest tragen. Diese Grenzfläche stellt eine von drei Interaktionsstellen des Homodimers dar. Im Gegensatz zu

den anderen Aspartat-Proteasen hat die HIV-1-Protease zwei flexible Schleifen („flaps“), je eine pro Monomer, die nach Substratbindung von einer offenen in eine geschlossene Konformation übergehen und so den Enzym-Substrat-Komplex stabilisieren. Eine weitere Besonderheit der retroviralen Protease ist das „two-methyl-cluster“-Motiv. 40% der Aminosäuren tragen Methylseitenketten, wohingegen bei zellulären Aspartat-Proteasen aromatische Seitenketten überwiegen. Durch das „two-methyl-cluster“-Motiv wird die Dimerstruktur stabilisiert, aber auch ihre Flexibilität erhöht, was eine bessere Anpassung an unterschiedlichste Substrate zur Folge hat.^[7,57]

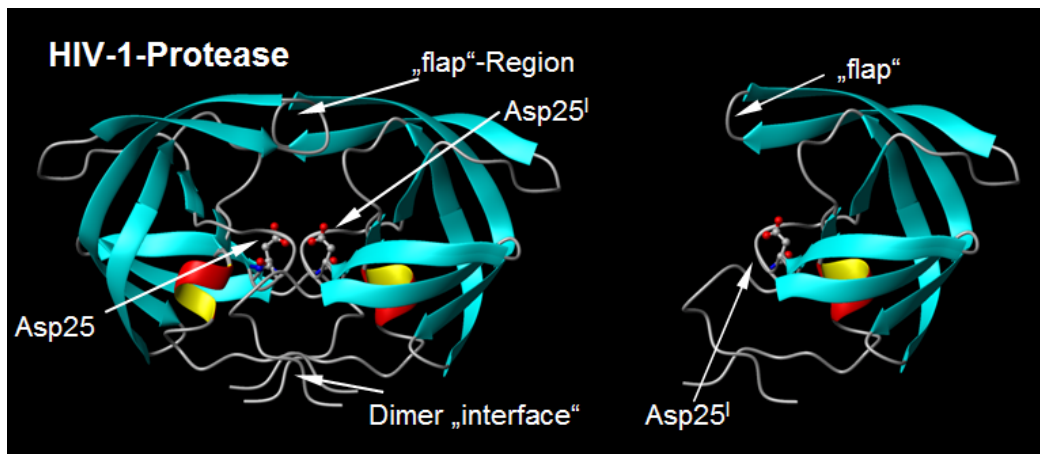


Abb. 1-2: 3-D-Struktur des HIV-1-Protease Homodimers (links) und des HIV-1-Protease Monomers (rechts)

1.3 Katalysemechanismus und Substratspezifität von Aspartat-Proteasen

Am Katalysemechanismus von Aspartat-Proteasen des Clans AA sind im aktiven Zentrum zwei Aspartat-Reste beteiligt.

Bei der Hydrolyse einer peptidischen Bindung greift ein durch den deprotonierten Aspartat-Rest des aktiven Zentrums aktiviertes Wassermolekül den Carboxyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Bindung nucleophil an (vgl. Abb. 1-3a). Die folgende Protonierung des Amid-Stickstoffs durch den zweiten katalytisch aktiven Aspartat-Rest führt zur Bildung eines tetrahedralen, zwitterionischen Intermediats (vgl. Abb. 1-3b), das anschließend in das regenerierte, freie Enzym und die beiden Spaltprodukte des Substrates zerfällt (vgl. Abb. 1-3c).^[7,58]

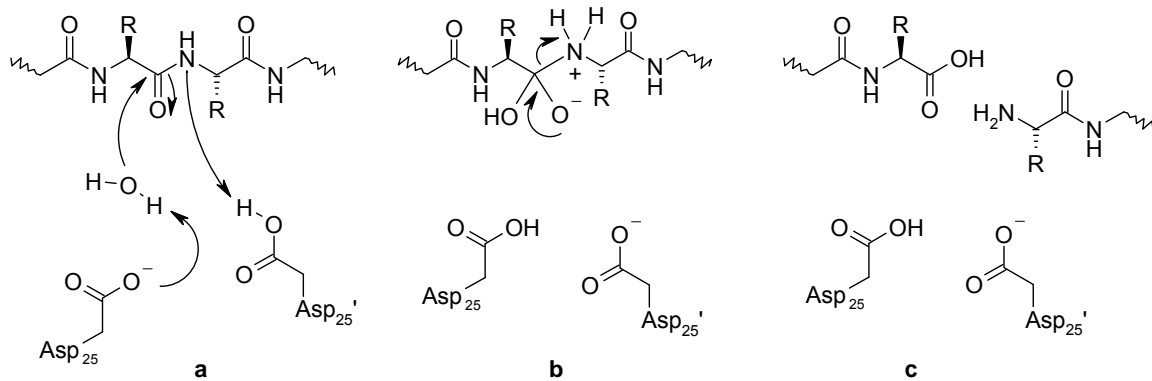


Abb. 1-3: Katalytischer Hydrolysemechanismus von Aspartat-Proteasen am Beispiel der retroviralen HIV-1-Protease

Die Aspartat-Proteasen des Clans AA sind Endopeptidasen und bevorzugen hydrophobe Reste in P1 und P1'. Die Spezifität beruht zum einen darauf, dass mehrere hydrophobe Reste das aktive Zentrum umgeben und zum anderen, dass sich drei hydrophobe Reste in der flexiblen Schleife befinden. Wechselwirkungen, vor allem Wasserstoff-Brückenbindungen, mit der Hauptkette des Substrats bewirken eine für das Erreichen des Übergangszustands geeignete Ausrichtung des Peptidrückgrats in der Substratbindungstasche. Die Wahl der Spaltstelle hingegen hängt von den Interaktionen des Enzyms mit den Seitenketten des Substrats ab. Die zur Spaltung benötigte Peptidkettenlänge liegt bei sechs bis zehn Aminosäuren und dient als Erkennungssequenz für das Enzym. Das pH-Optimum der Aspartat-Proteasen liegt im sauren Bereich. Renin, Cathepsin D und E sowie die Plasmapepsine bevorzugen einen pH von 3-4, wohingegen Pepsin sein pH-Optimum bei 1.5-3 hat, und die retroviralen HIV-Proteasen pH 4-6 bevorzugen.^[6,7,42]

Die Bezeichnung der Bindung des Substrats erfolgt nach der von Schechter und Berger etablierten Nomenklatur (vgl. Abb. 1-4),^[59] bei der die Aminosäuren des Substrates von der Spaltstelle aus in Richtung des N-Terminus als P1, P2, P3... usw., in Richtung des C-Terminus als P1', P2', P3'... usw. bezeichnet werden. Die Bindungstaschen (sog. „subsites“) auf der Enzymseite werden entsprechend den Aminosäuren des Substrates, die sie binden, analog als S1, S2...(non-prime) bzw. S1', S2'... (prime) benannt.

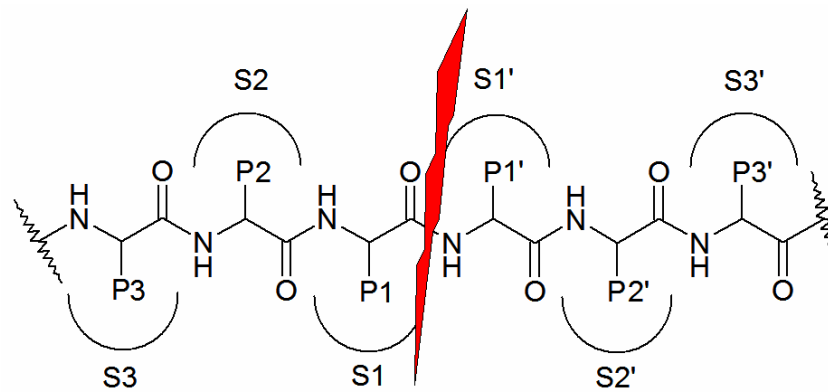


Abb. 1-4: Terminologie nach Berger und Schechter

1.4 Inhibitoren von Aspartat-Proteasen

Die Entwicklung von Aspartat-Protease-Inhibitoren basiert meist auf dem klassischen Substrat-basierten Prinzip.

Die Inhibitoren besitzen einen Peptidteil als Erkennungssequenz für die Protease. Dieser muss der Sequenz eines guten Substrats oder der eines natürlich vorkommenden peptidischen Inhibitors entsprechen. Die gute Bindung an das Enzym soll die reaktive Gruppe des Inhibitors an das aktive Zentrum dirigieren, so dass diese mit den Aspartat-Resten interagieren und die katalytische Fähigkeit des Enzyms blockieren kann.

Bei fast allen bisher bekannten Inhibitoren erfolgt die Hemmung des Enzyms reversibel. Die Verbindungen imitieren den tetraedrischen Übergangszustand der Hydrolyse eines Substrats und wirken so als Übergangszustandsanaloge.

Bei irreversiblen Inhibitoren wird durch die Peptidsequenz eine reaktive elektrophile Kopfgruppe, das sog. „warhead“, so an das aktive Zentrum des Enzyms gebracht, dass ein katalytisch aktiver Aspartat-Rest durch Reaktion mit dieser irreversibel alkyliert wird.

Bisher sind irreversible Aspartat-Protease-Inhibitoren nur bei der HIV-1-Protease bekannt. Als elektrophile Kopfgruppen dienen hierbei α,β -ungesättigte Ketone, z.B. Derivate des Haloperidols,^[60,61] und *cis*-konfigurierte Epoxide.^[62]

Ein Nachteil peptidischer Inhibitoren ist ihre schlechte Bioverfügbarkeit und ihre Anfälligkeit für enzymatische Hydrolyse. Zur Optimierung geht die Entwicklung in Richtung peptidomimetischer Inhibitoren, bei denen die Peptidkette durch Abwandlungen des Peptidrückgrats, Modifikation der Seitenketten der Aminosäuren oder den Einbau unnatürlicher oder nicht-proteinogener Aminosäuren (cyclische AS, *D*-AS) modifiziert wird.

1.4.1 Reversible Inhibitoren

1.4.1.1 Nichtpeptidische Inhibitoren

Für Aspartat-Proteasen sind bisher nur wenige reine nichtpeptidische Inhibitoren beschrieben.^[7,63]

Einer dieser Vertreter ist die Diphenylharnstoff-Verbindung WR-099445 (Abb. 1-5a), die durch Screening von kommerziell verfügbaren Substanzen gefunden wurde. Sie ist zwar sehr selektiv an den isolierten Enzymen, bei denen ihre Aktivität gegen Plasmeypsin II um den Faktor 1000 größer ist als gegen Cathepsin D, zeigt aber keine Hemmung an Zellkulturen von *Plasmodium falciparum*.^[63]

Für Renin sind ebenfalls nichtpeptidische Inhibitoren bekannt. Die Röntgenstruktur eines solchen Inhibitors (Abb. 1-5b) mit Piperidin-Gerüst zeigt, dass der protonierte Piperidinstickstoff im Enzym-Inhibitor-Komplex zwischen den zwei katalytisch aktiven Aspartat-Resten lokalisiert ist und mit beiden Wasserstoffbrücken ausbildet.^[64,65]

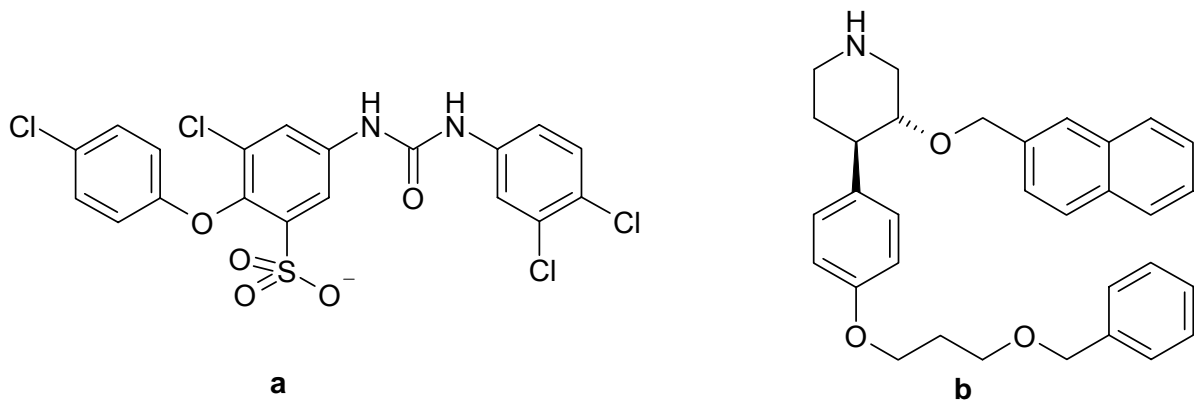


Abb. 1-5: Nichtpeptidische Inhibitoren: Plasmeypsin-II-Inhibitor WR-099445 (a), Renin-Inhibitor (b)

De-novo-Design bei der Firma DuPont-Merck führte zu cyclischen Harnstoff-Derivaten. Optimierungen ergaben den nichtpeptidischen HIV-Protease Inhibitor DMP-450 (Abb. 1-6a), der sich zur Zeit in klinischer Prüfung befindet.^[66,67]

Wegen der unklaren Rolle als therapeutisches Target sind für Cathepsin D bisher nur wenige Inhibitoren bekannt. Einen nichtpeptidischen Vertreter zeigt die in Abbildung 1-6b dargestellte Verbindung.^[68,69]

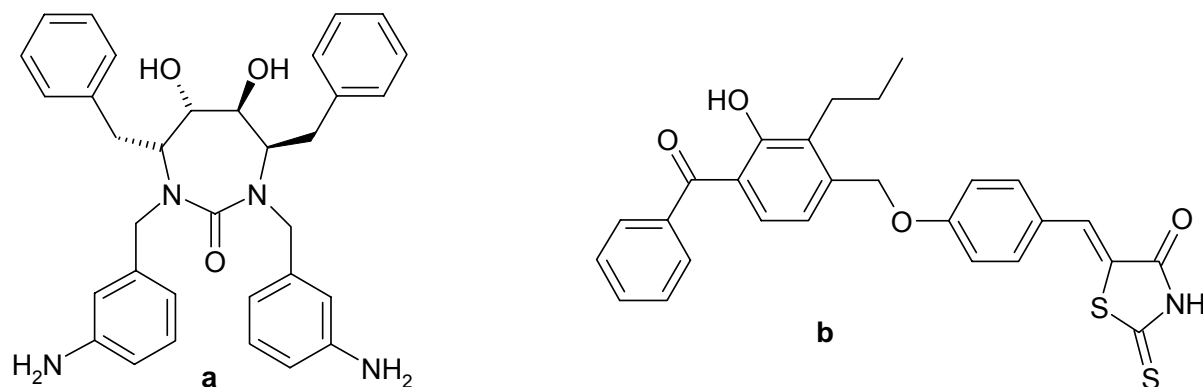


Abb. 1-6: Nichtpeptidische Inhibitoren: HIV-1-Protease-Inhibitor DMP-450 (a), Cathepsin-D-Inhibitor (b)

1.4.1.2 Peptidische und peptidomimetische Übergangszustandsanaloga

Neben dem als Standard eingesetzten Aspartat-Protease-Inhibitor Pepstatin A (Abb. 1-7), einem Hydroxyethylcarbonyl-Isoster, das aus den Kulturfiltraten von *Streptomyces*-Arten isoliert wurde, gibt es eine Vielzahl peptidischer und peptidomimetischer Übergangszustandsanaloga, die reversible Inhibitoren von Aspartat-Proteasen darstellen.

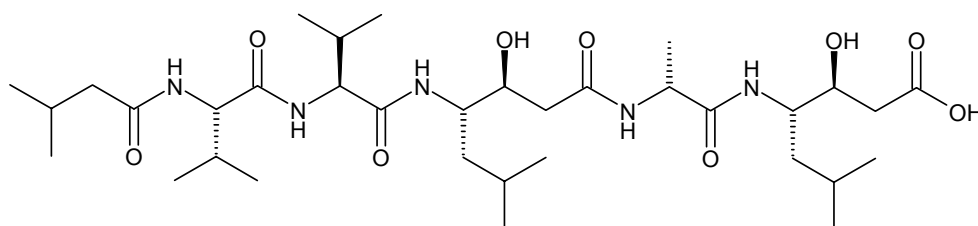


Abb. 1-7: Als Standard eingesetzter Aspartat-Protease-Inhibitor Pepstatin A

Das Beispiel der am besten untersuchten Aspartat-Proteasen, der HIV-Proteasen, zeigt, dass es gelingen kann, hochwirksame und selektive Inhibitoren zu entwickeln. Gegen die Immunschwäche AIDS sind schon einige selektiv wirksame Übergangszustandsanaloga im Handel, so z. B. der erste auf Grundlage der 3-D-Struktur (= strukturbasiert) entwickelte Protease-Inhibitor, der peptidomimetische HIV-1-Protease-Inhibitor Saquinavir (Abb. 1-8a).^[70-72] Ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der HIV-1-Protease-Inhibitoren, der ebenfalls eine Hydroxyethylaminstruktur besitzt, ist Ritonavir (Abb. 1-8b).^[7]

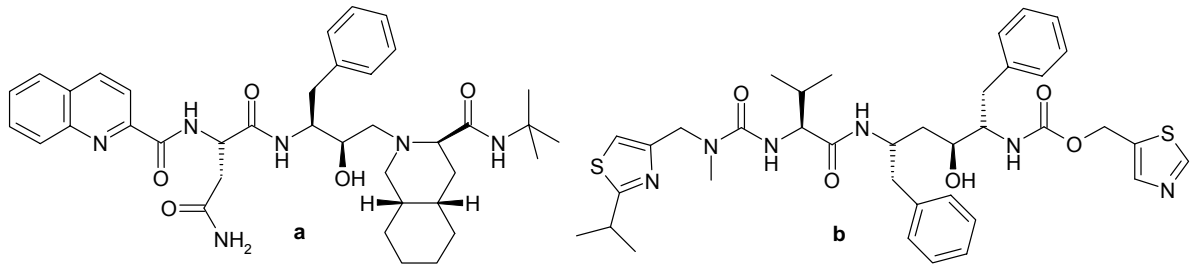


Abb. 1-8: HIV-1-Protease Inhibitoren Saquinavir (a) und Ritonavir (b)

Auch gegen die Protozoenerkrankung Malaria sind Übergangszustandsanaloga als reversible Inhibitoren der Plasmeptine entwickelt worden. Einer ist SC-5003 (Abb. 1-9a),^[7,73] der erste selektive peptidomimetische Plasmeptin-II-Inhibitor.

Röntgenstrukturanalysen von Plasmeptin II mit Pepstatin A und daraus resultierende Dockingstudien,^[74] sowie kombinatorische Synthese führten zur Entwicklung potenter peptidischer Plasmeptin-II-Inhibitoren (Abb. 1-9b, c).^[74,75] Ihre Hydroxyethylcarbonylstruktur zeigt deutlich die Anlehnung an Pepstatin A.

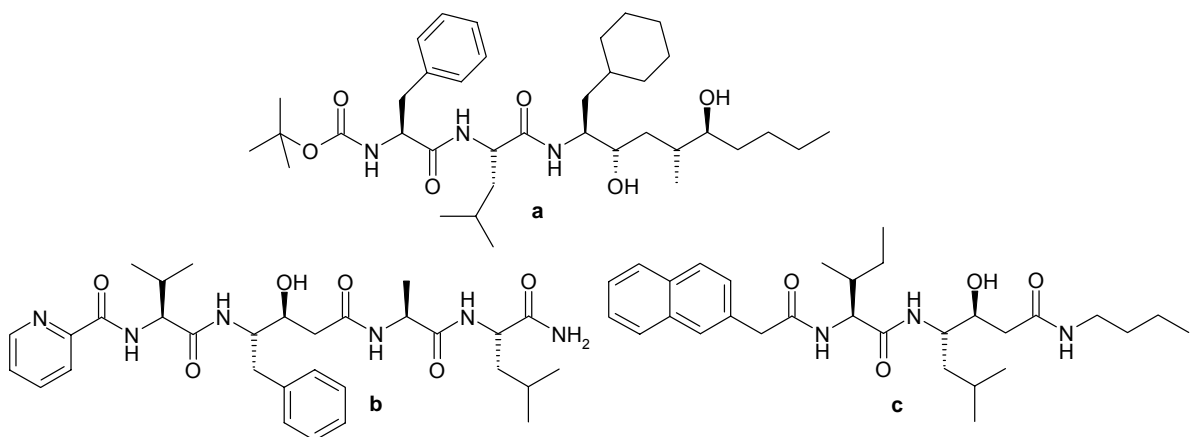


Abb. 1-9: Plasmeptin-II-Inhibitor SC-5003 (a) und Plasmeptin-II-Inhibitoren (b,c)

Hochwirksame, aber unselektive peptidomimetische Plasmeptin-II-Inhibitoren mit exzellenter Bioverfügbarkeit stellen die durch Docking entwickelten Allophenylnorstatin-Verbindungen, wie z. B. KNI-727 (Abb. 1-10a), dar.^[76] Einen anderen Ansatz, aus dem z. B. der in Abbildung 1-10b dargestellte peptidomimetische Plasmeptin-II-Inhibitor hervorging, bietet der „double-drug“-Approach, der den Antimalaria-Wirkstoff Primaquon und Plasmeptin-II-Inhibitoren mit Statin-Struktur kombiniert.^[77]

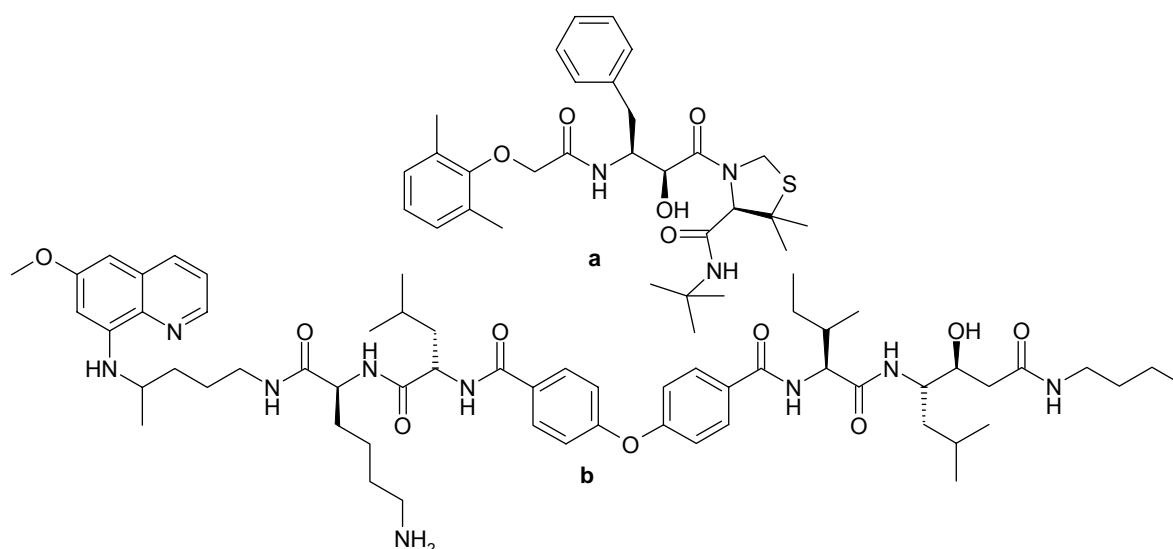


Abb. 1-10: Peptidomimetische Plasmeptin-II-Inhibitoren

Inhibitoren der humanen Aspartat-Protease Renin wurden hauptsächlich durch Modifikation von Substratfragmenten des Angiotensinogens entwickelt.^[7] Viele dieser Inhibitoren erreichten die klinische Phase II, so z. B. Enalkiren (Abb. 1-11a). Ihr hoher peptidischer Charakter und die damit verbundene geringe Stabilität und schlechte Bioverfügbarkeit verhinderten jedoch ihren klinischen Fortschritt.^[7,78]

Einen der bisher wenigen peptidischen Cathepsin-D-Inhibitoren stellt die auf Grundlage der 3-D-Struktur entwickelte und in Abbildung 1-11b gezeigte cyclische Verbindung dar.^[74]

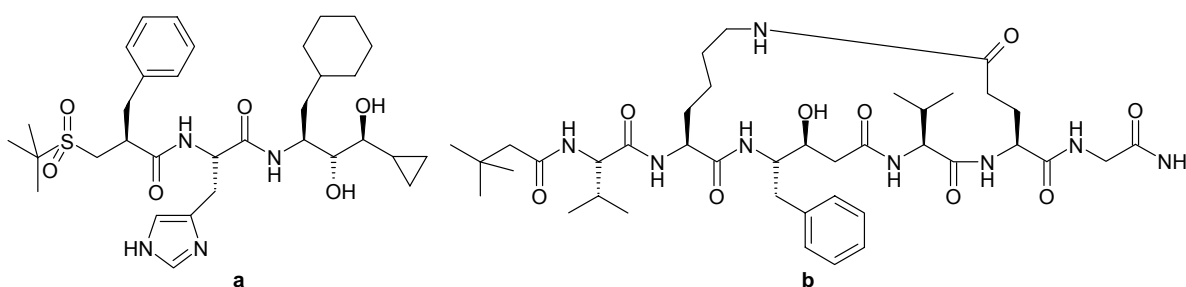


Abb. 1-11: Renin-Inhibitor Enalkiren (a), Cathepsin-D-Inhibitor (b)

Peptidomimetische Übergangszustandsanaloga als Hemmstoffe für die sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAPs) von *Candida albicans* sind die eine Hydroxyethylenstruktur besitzenden Inhibitoren A-70450 (Abb. 1-12a)^[24,46,47] und TS-98 (Abb. 1-12b).^[79] Inhibitor A-70450 weist eine höhere SAP2-Aktivität als Pepstatin A auf und ist der bisher potenteste bekannte reversible SAP2-Inhibitor. Beide Verbindungen sind jedoch relativ unselektiv. A-70450 hemmt neben SAP2 auch Renin im unteren nanomolaren sowie Cathepsin D im

submikromolaren Bereich.^[24] TS-98 zeigt für SAP2 wie auch für die HIV-1-Protease einen IC_{50} -Wert im unteren mikromolaren Bereich.^[79]

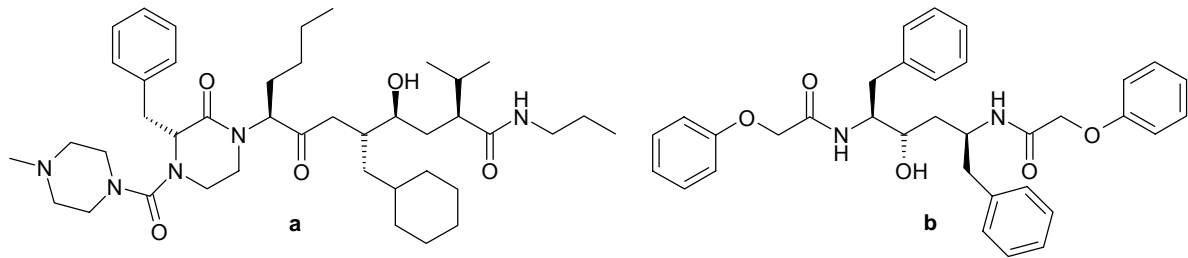


Abb. 1-12: Unselektive reversible SAP2-Inhibitoren A-70450 (a) und TS-98 (b)

1.4.2 Irreversible Inhibitoren

1.4.2.1 Michael-Systeme

Ein neuer Ansatz bei der AIDS-Therapie, an die durch die sehr große Wandlungs- und Anpassungsfähigkeit der retroviralen HIV-Proteasen und die damit verbundenen Resistenzen ständig neue Anforderungen gestellt werden, ist das Design irreversibler HIV-Protease-Inhibitoren.

Eine mögliche Klasse solcher Inhibitoren stellen die Michael-Systeme dar, deren elektrophile Gruppe eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung ist. Ein Aspartat-Rest im aktiven Zentrum kann mit dem β -Kohlenstoffatom in einer Michael-Reaktion unter Ausbildung eines Esters reagieren und so das aktive Zentrum des Enzyms irreversibel blockiert werden.

Untersuchungen von α,β -ungesättigten Keton-Derivaten des Neuroleptikums Haloperidol (Abb. 1-13) zeigten, dass die beiden retroviralen HIV-Proteasen durch diese Michael-Systeme irreversibel gehemmt werden. Der vermutete Wirkmechanismus ist jedoch nicht die irreversible Blockade eines Aspartat-Restes des aktiven Zentrums, sondern eine kovalente Bindung an eine allosterische Peptidsequenz der Protease.^[60,61,80]

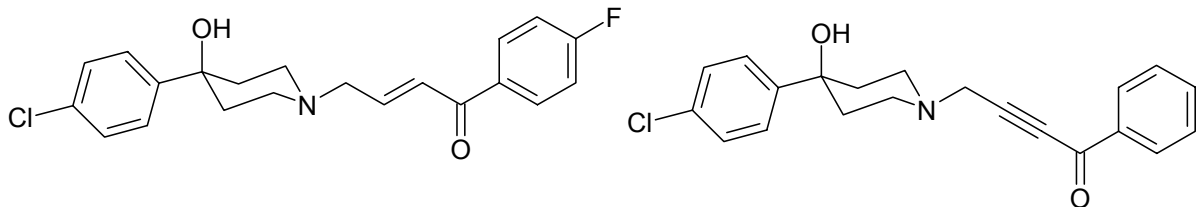


Abb. 1-13: Irreversible HIV-Protease-Inhibitoren mit Michael-System

Für andere Aspartat-Proteasen sind keine Ansätze mit Michael-Systemen als irreversible Inhibitoren bekannt.

1.4.2.2 Elektrophile Ringe

Viele irreversible Inhibitoren tragen als pharmakophore Gruppe einen kleinen elektrophilen Ring. Abgeleitet wurden diese Stoffe zum einen vom Naturstoff E-64 (Abb. 1-14), einem *trans*-Epoxysuccinylpeptid, das aus *Aspergillus japonicus* isoliert wurde und der Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Vielzahl verschiedener Cystein-Protease-Inhibitoren war.^[81,82] Zum anderen ist bekannt, dass Epoxide, wie 1,2-Epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propan (EPNP, Abb. 1-14) die Aspartat-Protease Pepsin^[83] sowie die HIV-1-Protease irreversibel hemmen.^[84]

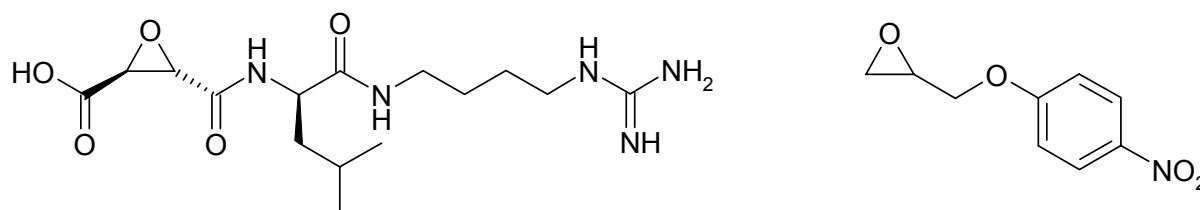


Abb. 1-14: Naturstoff E-64 aus *Aspergillus japonicus* (links) und Epoxid EPNP (rechts)

Durch die Kenntnis, dass für die Hemmung von Aspartat-Proteasen die *cis*-Konfiguration essentiell ist, wurden Inhibitoren mit *cis*-konfiguriertem Epoxid als neue Leitstrukturen entwickelt.^[18,60-62,85-87]

Diese Kenntnis beruht auf dem postulierten Wirkmechanismus der irreversiblen Hemmung von Aspartat-Proteasen durch Epoxide (vgl. Abb. 1-15), bei der sich die *cis*-Konfiguration der Epoxide als besser zugänglich für die Aspartat-Proteasen herausstellte (vgl. Abb. 1-16).

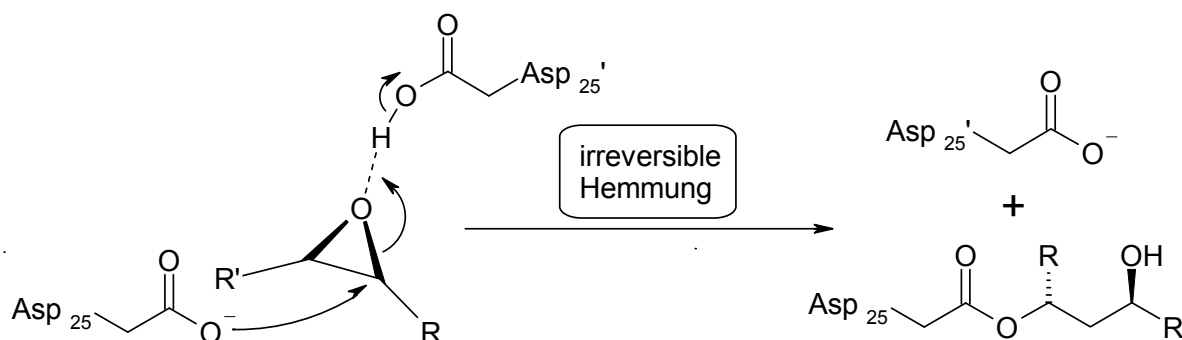


Abb. 1-15: Ringöffnung *cis*-konfigurierter Epoxide – Postuliertes Prinzip der irreversiblen Hemmung von Aspartat-Proteasen am Beispiel der HIV-1-Protease

Der Epoxidring fungiert als elektrophiler Baustein, der durch einen der beiden beteiligten Aspartat-Reste aktiviert wird. Der zweite katalytisch aktive, deprotonierte Aspartat-Rest (Asp-CO_2^-) greift das aktivierte Epoxid nucleophil an und öffnet den Dreiring unter Ausbildung

einer kovalenten, nicht weiter hydrolysierbaren Bindung. Die Ringöffnung zum Alkohol und somit auch die Hemmung der Aspartat-Protease sind irreversibel.

Ausschlaggebend für die Hemmung ist neben dem elektrophilen Dreiring dessen *cis*-Konfiguration. *Trans*-Epoxyde, so wird postuliert, werden von den Aspartat-Proteasen aufgrund der sterischen Hinderung des nucleophilen Ringangriffs „ignoriert“.^[80] Im Gegensatz dazu ist für die Hemmung von Cystein-Proteasen die *trans*-Konfiguration von Epoxyden ein „Muss“.

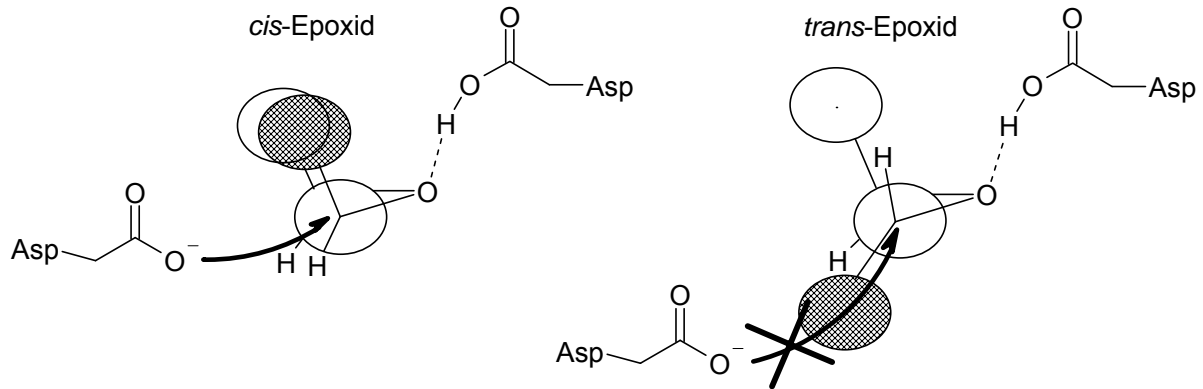


Abb. 1-16: Vergleich des Hemmmechanismus durch *cis*- und *trans*-konfigurierte Epoxyde

Dieser neue Ansatz führte zu verschiedenen irreversiblen HIV-1-Protease-Inhibitoren, wie dem Tripeptidylepoxyd (Abb. 1-17a)^[62] und dem peptidomimetischen *cis*-Epoxyd LB71097 (Abb. 1-17b).^[85,86]

Beide Substanzen sind gute, zeitabhängige und somit irreversible Inhibitoren der HIV-1-Protease. Untersuchungen zum Hemmmechanismus zeigten, dass das katalytisch aktive Asp25 den Epoxidring nucleophil angreift und ihn unter Ausbildung einer Esterbindung öffnet (vgl. Abb. 1-15).^[88]

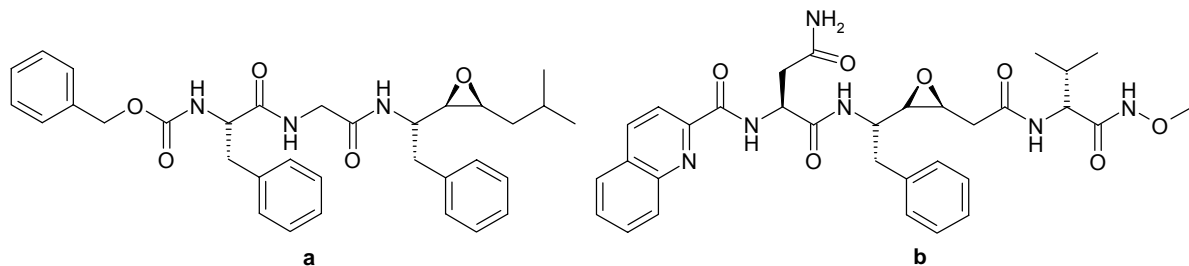


Abb. 1-17: Irreversible HIV-1-Protease-Inhibitoren mit *cis*-konfiguriertem Epoxid

Zwei Naturstoffe, die ebenfalls einen kleinen elektrophilen Ring tragen, sind die (S,S)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure,^[89] isoliert aus einer *Streptomyces*-Art, und das Miraziridin A (Abb. 1-18), isoliert aus dem Schwamm *Theonella mirabilis*.^[90]

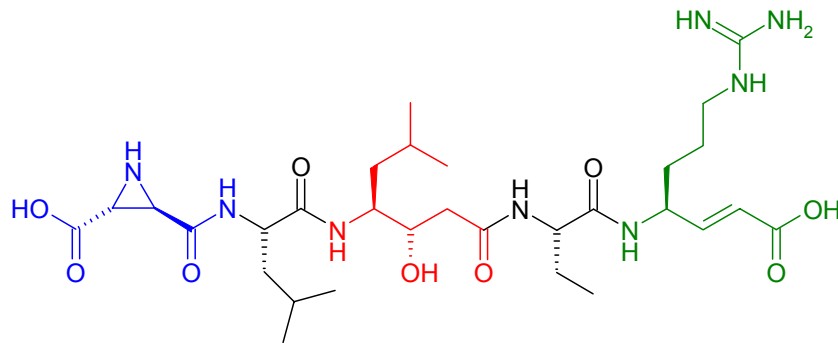


Abb. 1-18: Naturstoff Miraziridin A aus dem Schwamm *Theonella mirabilis*

Der Naturstoff Miraziridin A hemmt unspezifisch Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen, wofür drei verschiedene Protease-hemmende Strukturen, i) (*R,R*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure, ii) Statin, (*3S,4S*)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure und iii) ein vinyloges Arginin, die er in sich vereint, verantwortlich sind.^[91]

Die Hemmkonstanten des Naturstoffs sind in nachfolgender Tabelle angezeigt.

Tab. 1-5: Proteasehemmung durch Miraziridin A

| Protease-Klasse | Protease | IC ₅₀ | k _{2nd} [M ⁻¹ min ⁻¹] |
|--------------------|-------------|------------------|-------------------------------------------------------|
| Serin-Proteasen | Trypsin | 60 µM | |
| Cystein-Proteasen | Cathepsin L | | 60000000 |
| | Cathepsin B | | 900000 |
| Aspartat-Proteasen | Pepsin | 14 nM | |

Für die Hemmung der Aspartat-Proteasen durch Miraziridin A ist der Statin-Rest als Übergangszustandsanalogon verantwortlich.

1.5 Schwämme

Auf der Suche nach neuen Naturstoffen, die oft Leitstrukturen für verschiedenste Arzneistoffe darstellen, stehen marine Organismen und dabei vor allem die Schwämme im besonderen Interesse der Forschung. Meeresschwämme setzen zur Verteidigung gegen ihre Feinde oft chemische Abwehrstoffe ein, wobei meist nicht geklärt ist, ob die Substanzen vom Schwamm selbst oder den mit ihm in Symbiose lebenden Bakterien stammen. Solche Substanzen besitzen nicht selten nützliche und therapeutische Eigenschaften und gelten daher als wichtige Kandidaten für zukünftige Arzneimittel.

Heute bekannte Naturstoffe aus marinen Schwämmen besitzen verschiedenste Aktivitäten und hohes pharmazeutisches Potential.

Schon in den frühen fünfziger Jahren begann das National Cancer Institute (NCI) bei seiner Suche nach neuen anti-Tumor-Wirkstoffen mit der Isolierung von Naturstoffen aus Schwämmen. Dabei wurden die ersten biologisch aktiven Verbindungen aus Schwämmen, die Nucleoside Spongouridin und Spongothymidin, isoliert. Verwendung fanden sie als Nucleosidanaloga in der Krebs- und antiviralen Therapie.^[92] Ihre antivirale Wirkung beruht auf dem Abbruch der Nucleinsäuresynthese und dem damit verbundenen Abbruch der Virusreplikation.

Andere Substanzen aus Schwämmen, wie das Halichondramid aus *Halichondria sp.*, zeigten *In-vitro*-Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*.^[93]

Antivirale Substanzen, die die HIV-Proteasen hemmen, konnten ebenfalls schon aus Schwämmen isoliert werden. So lieferte der Schwamm *Xestospongia muta* bromierte polyacetylierte Säuren, die die retrovirale Aspartat-Protease inhibieren.^[94] Aus dem Mittelmeerschwamm *Dysidea avara* ging das Sesquiterpen Avarol, das in Zellkulturen das HI-Virus tötet und nicht infizierte Zellen vor Infektionen schützt, hervor.^[95]

Die Meersbewohner lieferten auch antimykotische Substanzen. So wirkt z. B. das Cyclopeptide Jasplakinolid, isoliert aus dem Schwamm *Jaspis sp.*, fungizid gegen den humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans*. Die minimale Hemmkonzentration beträgt dabei 25 µg / mL.^[96]

Neben dem hier Erwähnten zeigt auch das Beispiel von Miraziridin A (vgl. Abb. 1-18), dass Schwämme eine gute Quelle zur Isolierung von Naturstoffen, darunter auch von Substanzen, die als Leitstrukturen für Protease-Inhibitoren dienen können, darstellen.

1.6 Antimykotika

In den letzten Jahren haben Pilzinfektionen zugenommen und bakterielle Infektionen nahezu überholt, wofür vor allem der massive Einsatz von Medikamenten, wie Breitband-Antibiotika, Krebsmitteln und Entzündungshemmern, sowie operative Eingriffe, die die Körperabwehr schwächen, verantwortlich sind. Die Pilze der Gattung *Candida*, die mehr als 200 Vertreter umfassen und eigentlich harmlose Begleiter sind, lösen bei diesen immungeschwächten Patienten schwere Infektionen aus. Einer der gefährlichsten Vertreter dieser Gattung ist der Hefepilz *Candida albicans*.

Die Pilzinfektionen haben die unterschiedlichsten Formen und reichen von oberflächlichen Infektionen von Haut, Haarwurzeln, Schleimhäuten und Nägeln bis hin zu Infektionen innerer Organe, die sehr schwer zu behandeln sind, ohne dabei den Wirtsorganismus zu schädigen.^[21,24]

Zur Behandlung von Pilzinfektionen gibt es eine Vielzahl von Antimykotika. Aufgrund der immer größer werdenden Resistenzen von *Candida albicans* steht aber nur ein relativ kleines Repertoire für die Therapie zur Verfügung.

Bewährte Pilzmittel mit breitem Wirkspektrum sind die Azol-Antimykotika. Sie greifen in die Ergosterolbiosynthese ein, in dem sie die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen der Pilze hemmen, und schädigen so die Membran der Pilze. Ein bekannter Vertreter der vielen Azol-Antimykotika ist das Fluconazol (Abb. 1-19a), das nicht nur äußerlich angewendet, sondern auch oral verabreicht und so bei Systemmykosen eingesetzt werden kann.^[47]

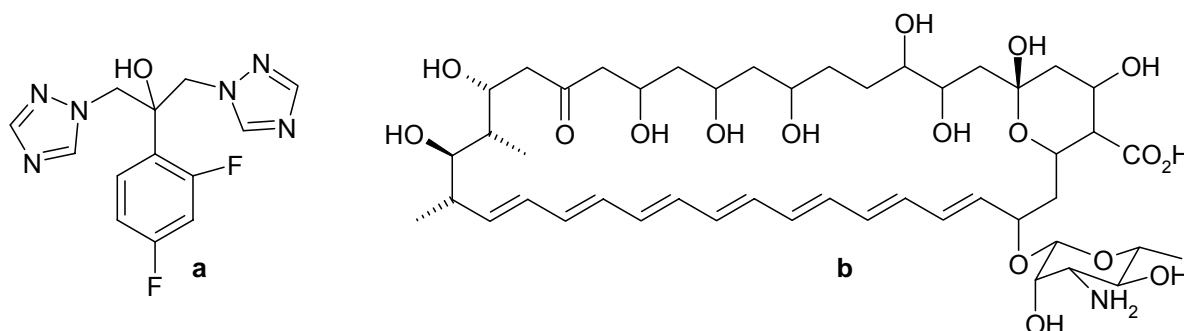


Abb. 1-19: Azol-Antimykotikum Fluconazol (a); Polyen-Antibiotikum Amphotericin B (b)

Eine zweite Antimykotika-Klasse, die für die Behandlung von *Candida-albicans*-Infektionen eingesetzt wird, sind die Polyen-Antibiotika, antimykotisch wirksame Antibiotika, die aus verschiedenen Mikroorganismen gewonnen werden. Ihre Wirkung beruht auf Komplexbildung mit der Pilzmembran und der damit verbundenen Blockade wichtiger Stoffwechselfvorgänge der Pilze. Das in Abbildung 1-19b dargestellte Amphotericin B kann dabei als

einziges Polyen-Antibiotikum auch intravenös als Infusion gegen Systemmykosen verwendet werden.^[47]

Andere fungizide Verbindungen, die viel versprechende Kandidaten in klinischen Tests darstellen, leiten sich vom Echinocandin B (Abb. 1-20), einem *Candida*-Metabolit ab. Ihre Wirkung entfalten die Verbindungen durch Eingriff in die Zellwandbiosynthese und die Hemmung der β -D-Glucansynthase.^[47]

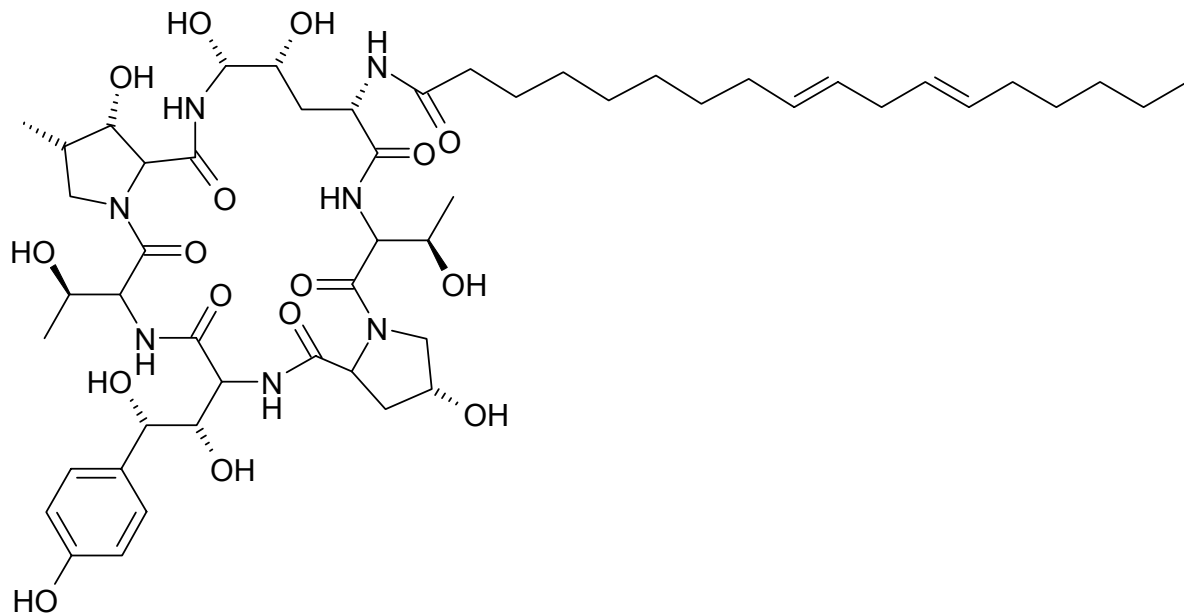


Abb. 1-20: *Candida*-Metabolit Echinocandin B

Die bisherigen Erfahrungen über die vorhandenen Resistenzen von *Candida albicans* geben Grund zur Annahme, dass die Wirkstoff-Resistenz von *Candida* auch in Zukunft weiter zunimmt. Deshalb müssen neue Wirkstoffe gegen Pilze gefunden werden.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese einer Reihe peptidischer Inhibitoren mit elektrophilen Bausteinen als potentielle irreversible Inhibitoren der sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAPs) des Hefepilzes *Candida albicans* und deren Testung an SAP2 sowie anderen Proteasen.

Als reaktive elektrophile Bausteine sollten *cis*-konfigurierte Epoxide und Aziridine, sowie *Z*-konfigurierte Olefine dienen.

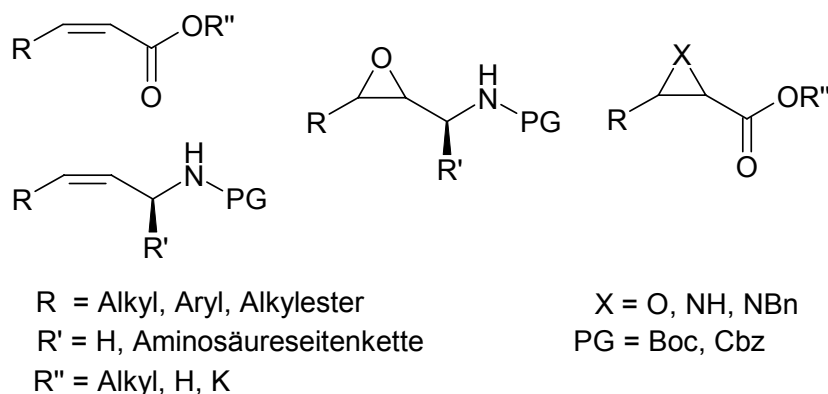


Abb. 2-1: Elektrophile Bausteine

Zum einen sollte geklärt werden, ob neben der HIV-1-Protease auch andere Aspartat-Proteasen durch *cis*-konfigurierte Epoxide irreversibel hemmbar sind.

Die Aziridiny-Peptide sollten eine Aussage liefern, inwiefern auch andere elektrophile Ringe in der Lage sind, als irreversible Aspartat-Protease-Inhibitoren zu fungieren.

Mit den *Z*-Olefinen sollte eine Antwort gefunden werden, ob auch elektronenarme Michael-Systeme zur irreversiblen Hemmung von Aspartat-Proteasen dienen können. Außerdem sollte geklärt werden ob die *Z*-Konfiguration der Olefine ebenso wichtig ist wie die *cis*-Konfiguration bei Epoxiden.

Wegen der Substratspezifität der Aspartat-Proteasen für hydrophobe Aminosäuren in P1 und P1' sollten die Bausteine zuerst mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin verknüpft werden. Durch Testung der Phe-verknüpften Verbindungen auf ihre SAP2-Aktivität sollte der Einfluss der unterschiedlichen „warheads“ auf die Hemmung herausgefunden werden.

Um die Wichtigkeit der einzelnen Substratbindungstaschen der SAPs, vor allem derer des am stärksten exprimierten SAP-Isoenzym SAP2, in P- sowie in P'-Richtung zu klären, sollten anschließend die hochaffinsten elektrophilen Bausteine mit Peptiden unterschiedlicher Länge, die der für die SAPs von *Candida albicans* charakteristischen Substratsequenz

entsprechen, verknüpft werden. Als Peptidsequenzen sollten die Peptide Phe-Leu-Ala-Pro (P1-P4) und Phe-Ala-Leu (P1'-P3') eingesetzt werden. Diese Sequenzen wurden dem bisher besten Substrat der SAP2,^[97] welches mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes des potentesten, reversiblen SAP2-Inhibitors A-70450^[24] entwickelt wurde, entnommen.

Da für die Testungen an den SAPs neben aufwändig durchzuführenden und / oder relativ unempfindlichen photometrischen Assays^[34,36,97] bisher nur ein sehr kostspieliger fluorimetrischer Assay^[98] bekannt war, sollte zur Testung zuerst ein einfach durchzuführender und kostengünstiger fluorimetrischer Assay für das von *Candida albicans* am besten exprimierte Isoenzym SAP2 aufgebaut werden. Dabei sollte die inhibitorische Aktivität der peptidischen Verbindungen auf die Spaltung eines FRET-Substrats durch SAP2 gemessen werden. Dieser Assay sollte später auch für Testungen an anderen SAP-Isoenzymen und für Selektivitätsuntersuchungen bezüglich anderer Aspartat-Proteasen, wie Pepsin, Cathepsin D und den Plasmepsinen, angewendet werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Morschhäuser und Dr. Staib vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, sollten die Verbindungen außerdem auf ihre Hemmwirkung bezüglich *Candida albicans*-Zellkulturen untersucht werden.

Eine zweite Aufgabenstellung der Arbeit befasste sich mit der Isolierung und Struktur- aufklärung von Protease-aktiven Naturstoffen aus marinen Schwämmen.

Hierbei sollten verschiedenste Schwämme extrahiert und die Protease-Aktivität der Extrakte mittels fluorimetrischer Assays ermittelt werden. Aktive Extrakte sollten dann zur Aufklärung der Protease-hemmenden Wirkung durch chromatographische Methoden weiter aufgetrennt und die Strukturen der aktiven Metabolite dann mittels HPLC-NMR sowie HPLC-MS aufgeklärt werden. Dieser Teil der Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Hentschel, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, und dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Bringmann, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, durchgeführt.

Ein drittes, kleineres Projekt in Kooperation mit Dr. Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, umfasste die Biotin-Markierung des Phosphoglycolipids Flavophospholipol zur Untersuchung der Bindung an *Enterococcus faecium*.

3. Synthesen

3.1 Synthese von *cis*-konfigurierten Epoxiden

3.1.1 Synthese enantiomerenreiner 3-Alkyloxiran-2-carboxylate

Ein einfacher und zugleich stereoselektiver Weg zu *cis*-konfigurierten 3-Alkyloxiran-2-carboxylaten ist die Synthese ausgehend von der Aminosäure Threonin.^[99]

Diazotierung und anschließende nucleophile Substitution überführen *L*-Threonin in die 2-Brom-3-hydroxybuttersäure. Durch Nachbargruppeneffekt verläuft die Substitution unter Retention der Konfiguration. Die Zugabe eines Überschusses ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung resultiert in der Bildung des Alkyloxirankaliumcarboxylats **E-03** durch intramolekularen Ringschluss unter S_N2 -Bedingungen. Die Reaktion mit Kaliumhydrogensulfat verwandelt das Salz in die freie Säure. Das Alkyloxirankaliumcarboxylat **E-03** wird in 83% Ausbeute erhalten und die Umsetzung zur *cis*-Epoxybutansäure **E-05** verläuft mit 70%.

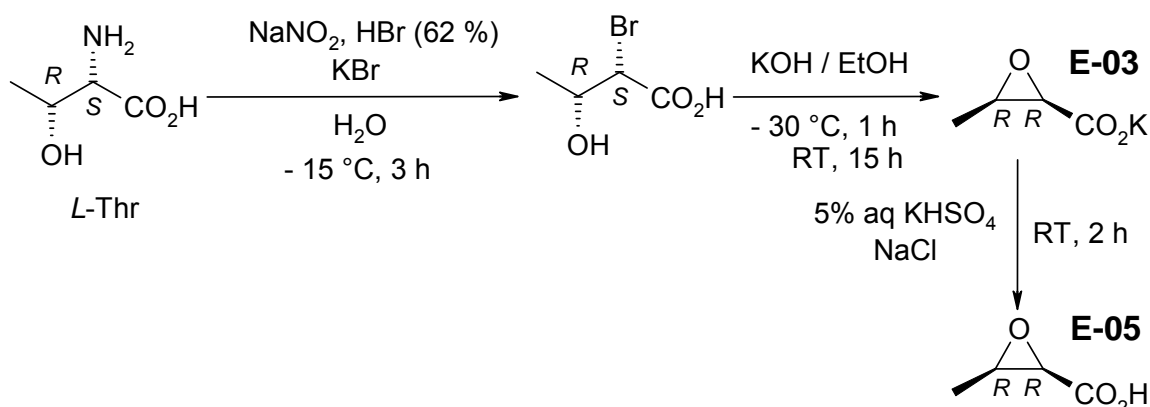


Abb. 3-1: Synthese von *cis*-Epoxybutansäure aus *L*-Threonin

Auf dem gleichen Syntheseweg erhält man ausgehend von *D*-Threonin das (2*S*,3*S*)-3-Methyloxiran-2-kaliumcarboxylat **E-12**.

3.1.2 Synthese racemischer 3-Aryloxiran-2-carboxylate

Eine Variante des Epoxidbausteins **E-05** erhält man durch die Einführung einer Phenylgruppe in 3-Position.

Die Darzens-Glycidestersynthese, bei der ein Aldehyd bzw. Keton mit einem α -Halogenester umgesetzt wird, bietet für die Darstellung solcher 3-Aryloxiran-2-carboxylate einen guten Weg.

Acetophenon wird mit Chloressigsäureethylester unter Basenkatalyse mit Kalium*tert*butanolat umgesetzt.^[100] Als Produkt wird ein *cis* / *trans*-Gemisch der jeweils racemischen 3-Methyl-3-phenyloxiran-2-carboxylate **E-21** und **E-21-t** in 55%iger Ausbeute im Verhältnis 0.86 / 1 erhalten. Die Zuordnung der Verbindungen des nicht weiter aufgetrennten, sondern direkt in der anschließenden Hydrolyse und DPPA-vermittelten Kupplung (vgl. Kapitel 3.4.3.1.2) eingesetzten Gemisches, erfolgt durch Vergleich der NMR-Spektren mit Literaturwerten.^[100,101]

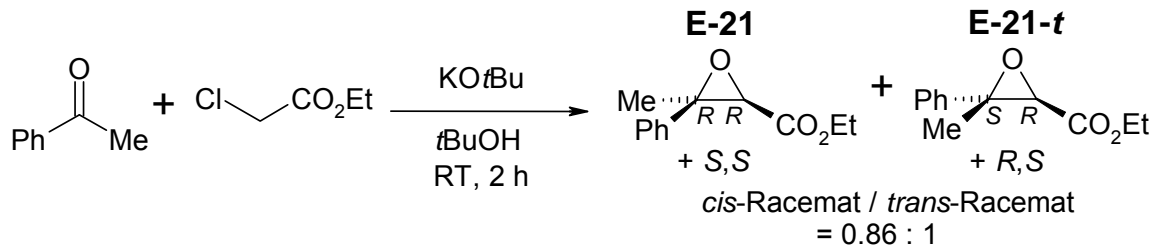


Abb. 3-2: Darzens-Glycidestersynthese

Der erste Schritt der Reaktion ist die Deprotonierung des Chloressigsäureethylesters durch das Kalium*tert*butanolat unter Ausbildung des stabilisierten Esterenolats **A**. Dieses greift dann nucleophil am Acetophenon an, wodurch das Alkoholat **B** entsteht. Der abschließende Schritt ist dann der Ringschluss zum Epoxid **E-21** durch intramolekulare nucleophile Substitution des Chlors unter S_N2 -Bedingungen.

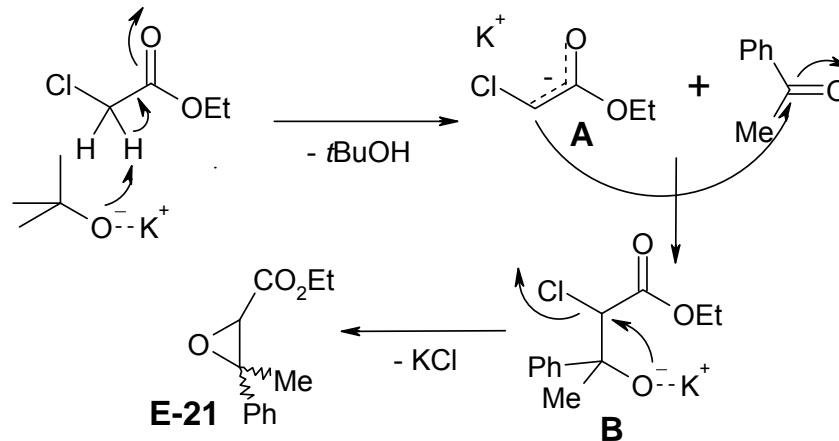


Abb. 3-3: Mechanismus der Glycidestersynthese

3.1.3 Synthese der *meso*-Epoxy Succinate

Neben Oxiran-2-carboxylaten stellen auch Oxiran-2,3-dicarboxylate interessante Zielverbindungen dar.

Ein großer Vorteil der Epoxy Succinate liegt in der Erhöhung der Elektrophilie des Rings, wodurch der Angriff von Nucleophilen erleichtert wird. Dieses Prinzip der Erhöhung der Reaktivität ist für die als Cystein-Protease-Inhibitoren fungierenden *trans*-Epoxy Succinate schon bewiesen.^[102] Ein weiteres Plus dieser Verbindungen ist die Möglichkeit der Peptidkupplung an beiden Seiten des Dreirings.

Synthetisch stellt die Darstellung von Epoxy Succinaten jedoch eine größere Herausforderung als die Synthese der Oxiran-2-carboxylate dar, da hierbei ein sehr elektronenarmes Doppelbindungssystem epoxidiert werden muss.

Versuche zur Epoxidierung mittels gängiger Epoxidierungsreagenzien, wie *meta*-Chlorperbenzoesäure oder Wasserstoffperoxid lieferten am sehr elektronenarmen Doppelbindungssystem der Maleate wie fast erwartet keinen Erfolg.

Eine literaturbeschriebene Möglichkeit zur direkten Epoxidierung von elektronenarmen Doppelbindungssystemen über die Darstellung einer hochreaktiven fluorierten Sauerstoffspezies, die dann als Epoxidierungsreagenz wirkt,^[103] wurde wegen des großen und teuren apparativen Aufwands nicht durchgeführt.

Auch die in der Literatur von Payne und Williams beschriebene Methode^[104] der direkten Epoxidierung von Maleinsäure mittels Wasserstoffperoxid unter Natriumwolframat-Katalyse lieferte nicht nur sehr schlechte Ausbeuten, sondern auch immer ein nicht trennbares Gemisch aus *cis* / *trans*-Disäuren und *cis* / *trans*-Dinatriumsalzen.

Die Methode der Wahl zur direkten Epoxidierung der Maleinsäureester stellte die von Moore beschriebene Syntheseroute dar.^[105,106] Bei dieser Weitz-Schäffer-Epoxidierung fungiert das *in situ* gebildete Lithium*tert*butylhydrogenperoxid als Sauerstofftransferreagenz und überführt die Maleinsäurediester in die *meso*-Epoxy Succinate.

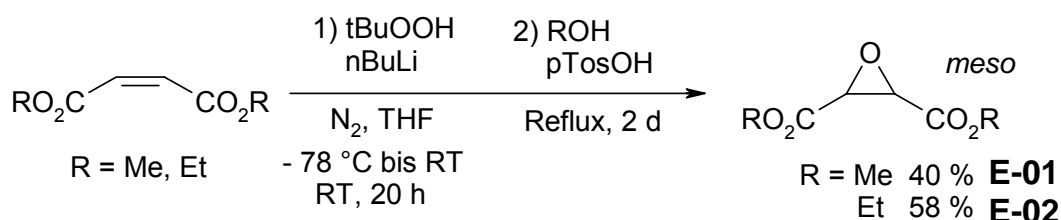


Abb. 3-4: Weitz-Schäffer-Epoxidierung

Die Bestimmung der Konfiguration erfolgte durch Aufnahme von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden so erhaltenen Epoxysuccinate, der im Arbeitskreis ausgehend von den beiden *L*-Tartraten synthetisierten enantiomerenreinen *trans*-Epoxysuccinate mit (*R,R*)-Konfiguration^[102] und von Proben bestehend aus gleichen Teilen der *meso*- und *trans*-Verbindungen. Die Spektren zeigten bei beiden *meso*-Epoxysuccinaten jeweils eine, mit den Literaturangaben^[105-107] übereinstimmende Tieffeldverschiebung der Ring-Protonen zu höheren ppm-Werten.

3.2 Synthese von *cis*-konfigurierten Aziridinen

Cis-konfigurierte Aziridine sollten als weitere elektrophile Bausteine für irreversible Aspartat-Protease-Inhibitoren dienen.

Im Vergleich zu den Epoxiden weisen die Aziridine die Möglichkeit der Substitution am Stickstoff auf und bieten durch diese zusätzliche Verknüpfungsstelle eine größere Variabilität für Kupplungen mit AS bzw. Peptiden.

Bei unsubstituierten oder *N*-alkylierten Aziridinen bewirkt der Stickstoff eine stärkere pH-Abhängigkeit der Hemmung. Außerdem kann der Stickstoff in Wasserstoff-Brückenbindungen auch als Proton-Donor fungieren, wohingegen der Sauerstoff im Epoxid nur Akzeptor-Funktion aufweist.

3.2.1 Synthese racemischer Aziridin-2-carboxylate

Eine gute Möglichkeit für die Synthese von *cis*-konfigurierten Aziridin-2-carboxylaten ist das Cromwell-Verfahren.^[108,109] Bei diesem werden aus *E*-Olefinen *cis*-konfigurierte Aziridine im Überschuss erhalten.

Die α,β -ungesättigten Ester der Zimt- bzw. Crotonsäure werden zuerst in die Dibromverbindungen überführt. Anschließender Ringschluss durch aufeinander folgende intermolekulare und intramolekulare nucleophile Substitution der beiden Brom-Substituenten durch die Stickstoff-Verbindung Benzylamin liefert dann in Verhältnissen von ca. 3-4 / 1 ein Gemisch der *cis* / *trans*-Racemate der Aziridin-2-carboxylate.

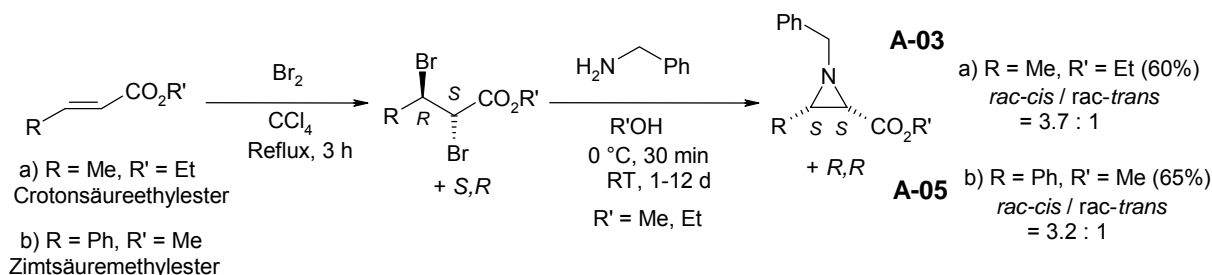


Abb. 3-5: Cromwell-Synthese zu racemischen *cis*-Aziridin-2-carboxylaten

Durch Trennung der *cis*- von den *trans*-Verbindungen mittels Säulenchromatographie werden die racemischen *cis*-Aziridin-2-carboxylate **A-03** und **A-05** in Ausbeuten von 60% bzw. 65% erhalten.

Die Feststellung, welche Verbindungen *cis*- und welche *trans*-konfiguriert sind, liefert der Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten.^[108,109]

Die als Nebenprodukte anfallenden *trans*-konfigurierten Aziridinbausteine dienen zur Überprüfung der Wichtigkeit der Konfiguration auf die Hemmwirkung an den SAPs.

3.2.2 Stereoselektive Synthese von Aziridin-2-carboxylaten

Eine stereoselektive Synthese ausgehend von *L*-Threonin führt zur Darstellung des (2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonsäureethylesters **A-03a**.^[110] Mittels Ethanol und Thionylchlorid wird die AS zu ihrem Ethylesterhydrochlorid umgesetzt. Die Benzylieerung des Stickstoffs gelingt durch Reaktion mit Benzaldehyd und anschließende Natriumborhydrid-Reduktion des gebildeten Imins. Der Ringschluss zum Aziridin erfolgt durch Redoxkondensation nach Mukaiyama. Dabei greift das freie Elektronenpaar der Aminogruppe nucleophil an der aktivierten Hydroxygruppe an und cyclisiert das Intermediat **A** intramolekular, unter gleichzeitiger Abspaltung von Triphenylphosphinoxid, zum Aziridin. Chromatographische Reinigung ergibt den (2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonsäureethylester **A-03a** in einer Gesamtausbeute von 24%.^[110]

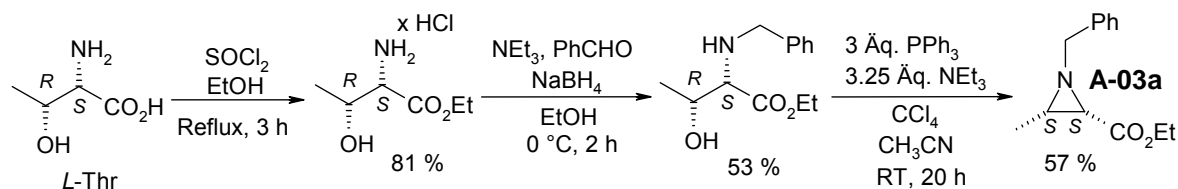


Abb. 3-6: Stereoselektive Syntheseroute von *L*-Threonin zum *S,S*-Aziridin-2-carboxylat

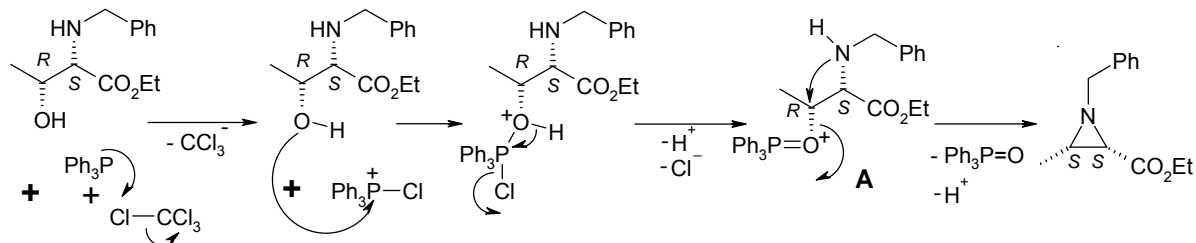


Abb. 3-7: Mechanismus der Mukaiyama-Redoxkondensation

3.2.3 Stereoselektive Synthese eines methylenverbrückten Aziridin-2-carboxylats

Ausgangspunkt dieser insgesamt sechsstufigen Synthese ist Boc-*L*-PheOMe. Der Methylester wird zunächst mittels DIBALH-Reduktion in seinen Aldehyden überführt.^[111] Anschließende Umsetzung des Aldehyds mit dem *in situ* aus *n*Butyllithium, Diisopropylamin und Ethylacetat dargestellten Lithiumenolat liefert ein 1 / 1-Gemisch der diastereomeren Statinanaloga **Stat-01** und **Stat-02**.^[112] Nach säulenchromatographischer Trennung wird das (*S,S*)-Isomer (**Stat-01**) mittels Trifluoressigsäure entschützt und der Stickstoff durch Reaktion mit Benzaldehyd und anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid benzyliert. Der intramolekulare Ringschluss zum Aziridin erfolgt durch Redoxkondensation nach Mukaiyama (vgl. Abb. 3-7) und liefert (*2R,3S*)-1-Benzyl-3-benzylaziridin-2-methylencarbonsäureethylester **A-10** in einer Gesamtausbeute von 4%.

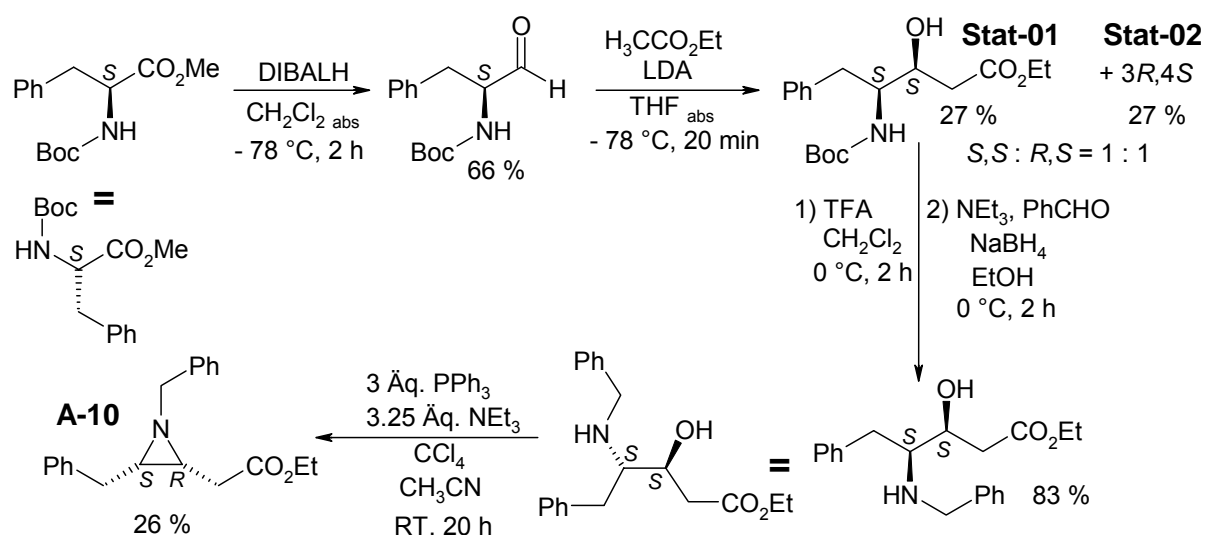


Abb. 3-8: Stereoselektive Synthese des *N*-Benzylaziridin-2-methylencarbonsäureesters

Der Grund für die geringe Ausbeute liegt zum einen in der Bildung der diastereomeren Statinanaloga im zweiten Schritt. Diese entstehen, weil der Angriff von Lithiumenolaten an einfachgeschützte α -Aminoaldehyde nur eine äußerst geringe stereochemische Bevorzugung des „anti-Felkin“-Produkts und so des *syn*-Statinanalogen liefert.^[113]

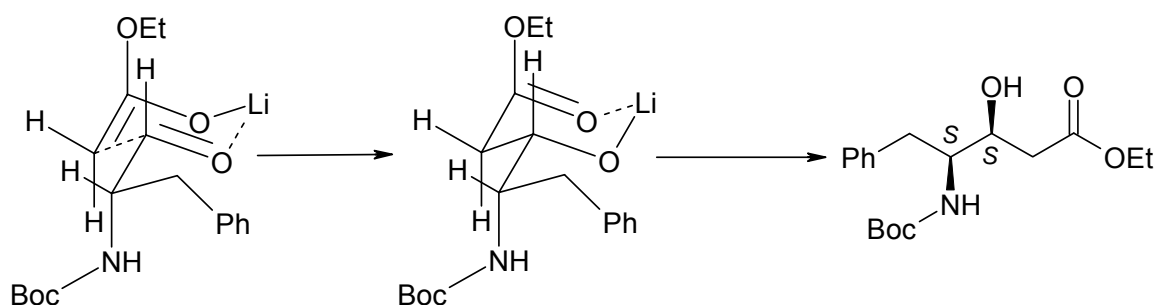


Abb. 3-9: „anti-Felkin“-Übergangszustand zum *syn*-Statinanalogen

Dagegen zeigt die Reaktion der Lithiumenolate von Ethylacetat bzw. Benzylacetat mit dibenzylierten α -Aminoaldehyden den Einfluss von Schutzgruppen. Mit großem diastereomeren Überschuss würde hier der „falsche“ (*S,R*)-konfigurierte *anti*-Aminoalkohol gebildet werden.^[113,114]

Syn-konfigurierte Aminoalkohole könnten mit hohen diastereomeren Überschüssen nur durch aufwändige Reaktionen von einfachgeschützten α -Aminoaldehyden mit silylierten Ketenacetalen^[115,116] bzw. chiralen Devant-Braun-Enolaten^[117] oder durch Umsetzung dibenzylierter α -Aminoaldehyde mit chiralen Boron-Enolaten^[113] erhalten werden.

Auch beim letzten Syntheseschritt, der Mukaiyama-Reaktion, wird die Ausbeute drastisch gesenkt, da als Nebenreaktion eine baseninduzierte Elimination die aktivierte α -CH-acide Verbindung **C** in den α,β -ungesättigten Ester **D** verwandelt.

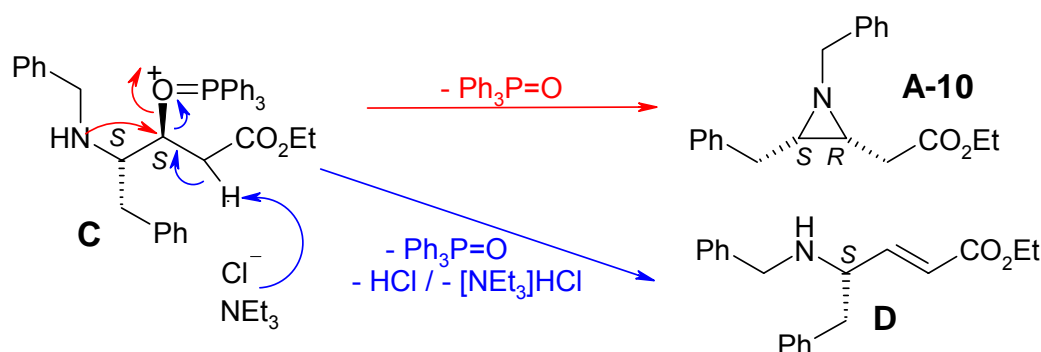


Abb. 3-10: Nebenreaktion zum vinylogenen Ester

3.2.4 Stereoselektive Synthese von Aziridin-2,3-dicarboxylaten

In der Literatur gibt es einige Synthesen, bei denen als Nebenprodukt *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate erhalten werden.

So fallen *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate bei der Michael-Addition von Diphenylsulfimin (DPSI) an Maleate^[118,119] und bei der Cromwell-Synthese mit Fumaraten an.^[120-122]

Eine dritte Synthese, bei der die *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylate als Nebenprodukte erhalten werden, ist die Synthese des enantiomerenreinen *trans*-konfigurierten Naturstoffs (*S,S*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure.^[89]

Da diese Syntheserouten sehr aufwändig sind und die *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylate dabei nur als Nebenprodukte in sehr geringen Ausbeuten und oft auch zusätzlich in schwer trennbaren Produktgemischen entstehen, wurde keiner dieser Wege gewählt.

Nur der letzte Reaktionsschritt der letztgenannten Route,^[89] die unter Mitsunobu-Bedingungen ablaufende Staudinger-Reaktion mit Triphenylphosphin (PPh_3), die einen *syn*-Azidoalkohol stereoselektiv zum *cis*-Aziridin cyclisiert, wurde zur Darstellung der *cis*-konfigurierten (*S,R*)-Aziridin-2,3-dicarboxylate genutzt.

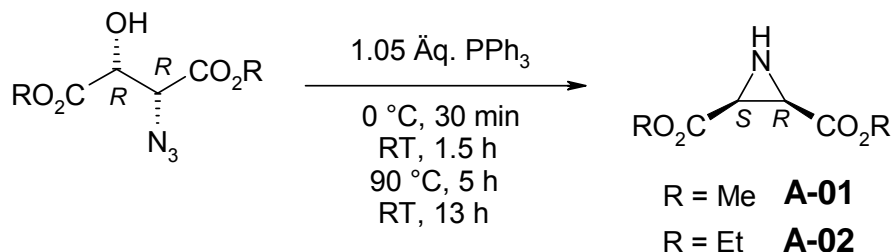


Abb. 3-11: Staudinger-Reaktion zum *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

Der Mechanismus der Staudinger-Reaktion verläuft über zwei Intermediate (Abb. 3-12). Im ersten Schritt bildet sich ein 2-Hydroxyiminophosphoran (**A**), das in einer intramolekularen Addition der OH-Gruppe an die (P=N)-Bindung weiter zum 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidin reagiert (**B**). Nach dem Aufbrechen der P–N-Bindung cyclisiert das 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidin unter Inversion am C-3-Atom zum Aziridinring.^[123]

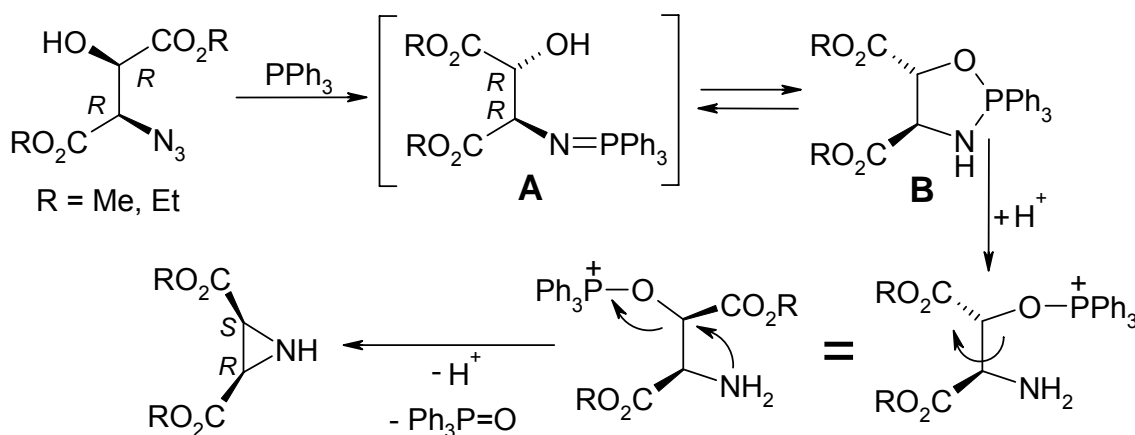


Abb. 3-12: Mechanismus der Staudinger-Reaktion zum *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

3.2.4.1 Synthese der *syn*-Azidoalkohole

Für die Darstellung der *syn*-Azidoalkohole wurde zunächst der Weg über die Dioxathiolane, ein im Arbeitskreis oft angewendetes Verfahren, gewählt, da für diese bekannt ist, dass sie mit dem nucleophilen Natriumazid (NaN_3) in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion an einem Ring-Kohlenstoffatom unter Eliminierung von Schwefeldioxid zu Azidoalkoholen reagieren.^[124-128]

Als Startmaterial der einstufigen Synthese zur Darstellung von 2,5-Dioxathiolan-1-oxo-2,3-diethylidicarboxylat, die ausgehend von den (*R,R*)- bzw. (*S,S*)-Tartraten in quantitativen Ausbeuten verläuft, auf der Bildung des cyclischen Schwefligsäureesters mittels Thionylchlorid beruht und eine schnelle Aufarbeitung ermöglicht (Entfernung des überschüssigen SOCl_2 im Vakuum), wurde (*R,S*)-Diethyltartrat verwendet.

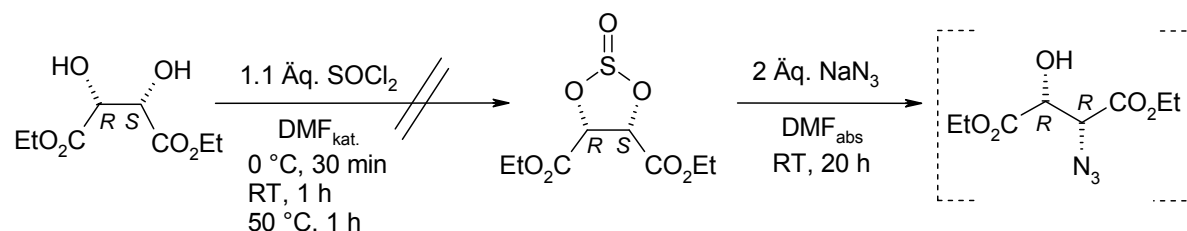


Abb. 3-13: Versuchte Synthese zum *syn*-Azidoalkohol über *R,S*-Dioxathiolan

Das NMR-Spektrum der Verbindung zeigte jedoch, dass nicht das gewünschte (*R,S*)-, sondern das diastereomere (*R,R*)-Dioxathiolan entstand. Bei der Reaktion findet also eine Epimerisierung, vermutlich durch saure Katalyse, statt.

Einen zweiten und letztendlich erfolgreichen Ansatz zur Darstellung der *syn*-Azidoalkohole stellt ihre Synthese aus den entsprechenden *anti*-Bromalkoholen, die nach der Methode von Mori *et al.*^[129,130] aus den *L*-Tartraten gut zugänglich sind, dar.^[131]

Durch nucleophilen Angriff von Natriumazid (NaN_3) wird das Brom des *anti*-Bromalkohols in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion unter Inversion am Kohlenstoff gegen Azid ausgetauscht.

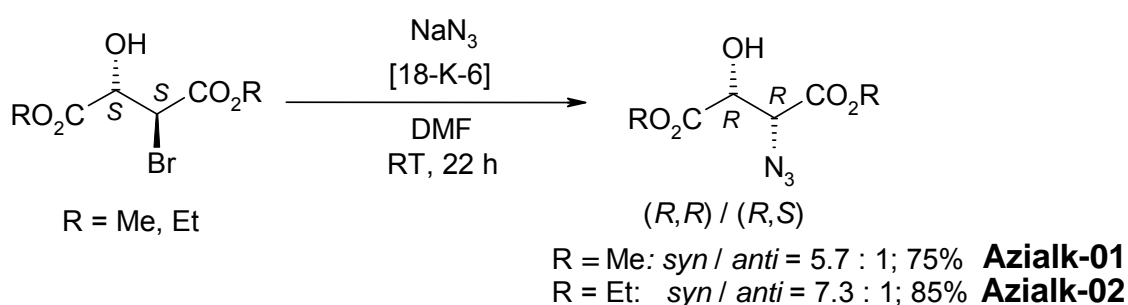


Abb. 3-14: $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion vom *anti*-Bromalkohol zum *syn*-Azidoalkohol

Bei der Reaktion werden neben den *syn*-Azidoalkoholen auch Spuren der diastereomeren *anti*-Azidoalkohole gebildet. Die Epimerisierung zum *anti*-konfigurierten Nebenprodukt resultiert, wie in einer detaillierten NMR-Studie nachgewiesen werden konnte,^[132] aus der Acidität des Protons am C-3 des Azidoalkohols.

Für den Ringschluss zum Aziridin-2,3-dicarboxylat werden die mittels Säulenchromatographie nicht voneinander trennbaren Gemische der *syn* / *anti*-Azidoalkohole eingesetzt. Die bei der Staudinger-Reaktion (vgl. Abb. 3-11) daraus jeweils diastereoselektiv entstehenden *cis* / *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate können dagegen sehr gut voneinander getrennt werden. Säulenchromatographische Abtrennung des überschüssigen Triphenylphosphins und des bei der Reaktion daraus entstehenden Triphenylphosphinoxids und anschließende fraktionierende Kristallisation des *cis* / *trans*-Gemisches aus Ethylacetat / Petrolether 40-60 liefert die *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylate als kristalline Feststoffe. Die Ausbeute beläuft sich je nach Ester auf 19% bzw. 40%.

Die Zuordnung der *cis* / *trans*-Aziridine erfolgt zum einen anhand von Vergleichen der NMR-Spektren mit Literaturdaten.^[89,133] Am Beispiel des Diethylaziridin-2,3-dicarboxylats wurden außerdem NMR-Vergleichmessungen durchgeführt. Dafür wurden ¹H-NMR-Spektren der beiden erhaltenen Aziridine, des im Arbeitskreis ausgehend von *L*-Diethyltartrat über das Epoxid und dessen Umwandlung zum Aziridin dargestellten enantiomerenreinen *trans*-Aziridins (*S,S*)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat^[102] und einer Probe, die eine Mischung aus gleichen Teilen der diastereomeren Aziridine enthielt, aufgenommen. Die Spektren zeigten beim *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat eine Hochfeldverschiebung der Signale für die Ring-Protonen und das Proton am Stickstoff zu niedrigeren ppm-Werten.

Die *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate wurden wie andere *trans*-konfigurierte Bausteine zur Überprüfung der Wichtigkeit der Konfiguration auf die Hemmwirkung an den SAPs verwendet.

Die zur Synthese benötigten *anti*-Bromalkohole werden durch eine einfache zweistufige Synthese aus kommerziell erhältlichen, enantiomerenreinen *L*-Tartraten synthetisiert. Die Ausbeuten betragen je nach Ester 66% bzw. 70%.

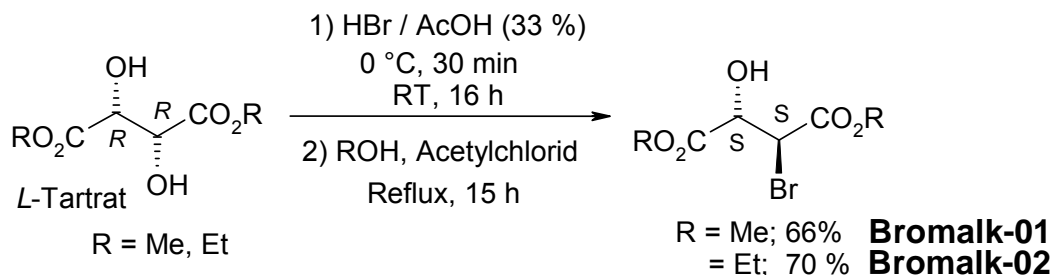


Abb. 3-15: Synthese der *anti*-Bromalkohole

Zunächst wird eine Hydroxygruppe des Tartrats in HBr / Eisessig monoacetyliert. Unter den stark sauren Bedingungen entsteht dann ein cyclisches 1,3-Dioxolan-2-ylum-Ion (**A**),

welches mit Bromwasserstoff (HBr) zu 2-Acetoxy-3-bromsuccinat (**B**) weiterreagiert. Dessen Hydrolyse zum (*S,S*)-2-Brom-3-hydroxysuccinat erfolgt dann durch Acetylchlorid im entsprechenden Alkohol.^[130]

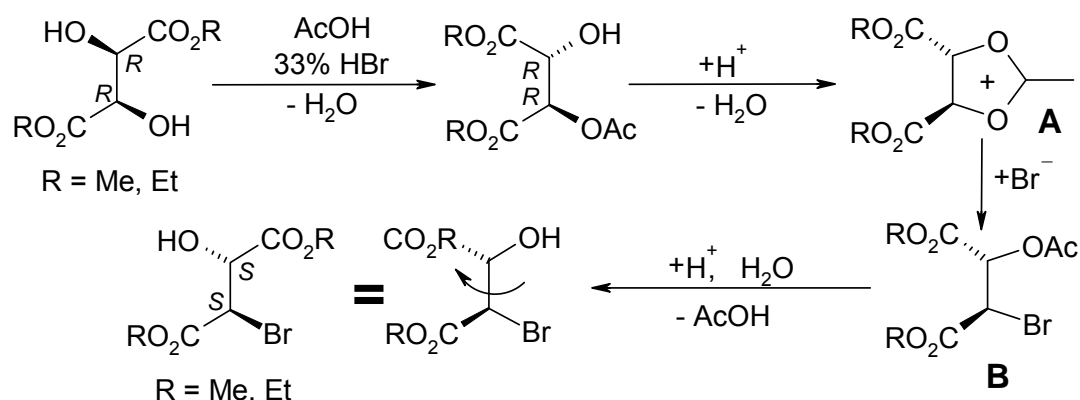


Abb. 3-16: Mechanismus der Synthese der Bromalkohole

Da dieser Weg von den käuflichen *L*-Tartraten über die *syn*-Azidoalkohole in vertretbaren Ausbeuten und mit einfachen Methoden zu den gewünschten *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylaten führt, wurden andere in der Literatur beschriebene Methoden zur Synthese von *syn*-Azidoalkoholen nicht durchgeführt.

Darunter fällt die osmiumkatalysierte asymmetrische Aminohydroxylierung von Fumaraten^[134] und die nucleophile Ringöffnung des *meso*-Dimethyloxiran-2,3-dicarboxylats mittels Trimethylsilylazid.^[135]

Auch auf die Durchführung der Trifluoressigsäure-katalysierten Aza-Darzens-Reaktion zwischen Ethyldiazoacetat und Iminoestern zur Synthese von *N*-alkylierten *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylaten^[136] wurde verzichtet.

3.2.5 Synthese von *N*-Alkyl-Aziridin-2,3-dicarboxylaten

Die Synthese des *N*-benzylierten *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylates **A-09** gelingt aus *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat **A-02** (Abb. 3-17). Dabei wird für die Benzylierung des Aziridin-Stickstoffs das Alkylhalogenid Benzylbromid unter Zusatz einer Base verwendet.

Wird als Base Kaliumcarbonat eingesetzt und unter PT-Katalyse gearbeitet, kann auch nach mehreren Tagen bei 50 °C nur Edukt isoliert werden.

Bei einem ähnlichen Versuchsansatz, bei dem als Base Natriumcarbonat eingesetzt und zusätzlich zur Aktivierung Kaliumiodid zugesetzt wird, gelingt die *N*-Benzylierung nach 2 d bei 60 °C mit 88% Ausbeute.^[82]

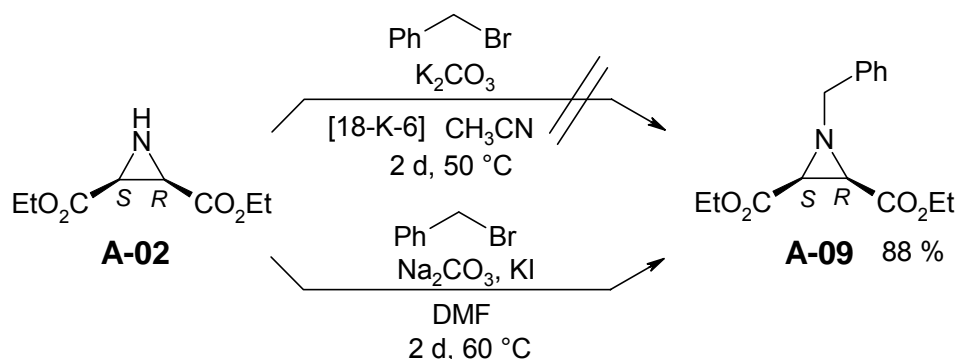


Abb. 3-17: Synthese von *cis*-*N*-Benzyl-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

Grund der Reaktionsträgheit des Aziridin-Stickstoffs der Aziridin-2,3-dicarboxylate ist dessen im Vergleich zu acyclischen α -Aminosäuren geringe Nucleophilie, die durch die besonderen geometrischen Eigenschaften und die damit verbundene Elektronenverteilung des Aziridinrings verursacht wird.^[137] Durch die Verzerrung der Bindungswinkel im Aziridinring auf ca. 60° (gegenüber 109.5° bei sp^3 -Hybridisierung) wird ein höherer p -Anteil in den Ringbindungen induziert, wodurch das freie Elektronenpaar am Stickstoff stärker mit ihnen in Wechselwirkung tritt. Die elektronenziehenden Carboxyl-Gruppen an C-2 und C-3 verringern zusätzlich die Elektronendichte am Stickstoff.

3.3 Synthese von *Z*-Olefinen

Neben den dreigliedrigen Heterocyclen stellen auch Akzeptor-substituierte, *Z*-konfigurierte Olefine potentielle Bausteine für Aspartat-Protease-Inhibitoren dar.

Vorteil dieser Verbindungen ist ihre leichte Zugänglichkeit.

3.3.1 Synthese von Maleinsäurehalbestern

Durch Umsetzung von Maleinsäureanhydrid mit verschiedenen Alkoholen unter Basenkatalyse mit Triethylamin erhält man die entsprechenden Maleinsäurehalbester.^[138,139]

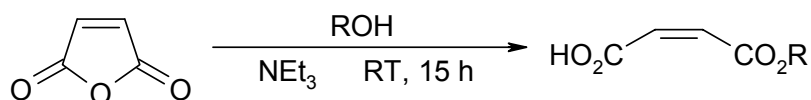


Abb. 3-18: Synthese der Maleinsäurehalbester

Wie Tabelle 3-1 zeigt, hängen die Ausbeuten dabei stark vom eingesetzten Alkohol ab.

So liefert z. B. die Umsetzung mit *tert*butanol die geringste Ausbeute und auch nach mehreren Tagen noch keinen vollständigen Umsatz.

Tab. 3-1: Ausbeute verschiedener Maleinsäurehalbester

| Bez. | Reagenz / Solvens | R in Produkt | Ausbeute |
|--------|-------------------|--------------|----------|
| Mal-01 | MeOH | Me | 47% |
| Mal-02 | EtOH | Et | 70% |
| Mal-03 | BnOH | Bn | 65% |
| Mal-04 | <i>t</i> BuOH | <i>t</i> Bu | 5-10%* |

* Gemisch mit Edukt

Der Versuch, *Monotert*butylmaleat durch Reaktion von Maleinsäuranhydrid mit Kalium-*tert*butanolat darzustellen,^[140] liefert eine wesentlich höhere Ausbeute von 64%. Das NMR-Spektrum zeigt jedoch, dass nicht das gewünschte *Z*-Olefin, sondern ein Gemisch der *Z* / *E*-Olefine im Verhältnis 6.7 / 1 erhalten wurde.

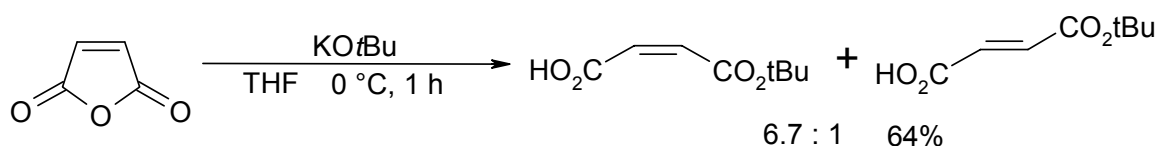


Abb. 3-19: Synthese des *Z*-*Monotert*butylmaleats

3.4 Peptidkupplungsreaktionen

3.4.1 Verschiedene Kupplungsverfahren

In der Literatur sind viele Möglichkeiten für Peptidkupplungsreaktionen beschrieben.^[141,142]

Prinzipiell sind für Peptidkupplungen zwei verschiedene Wege möglich. Zum einen die Segmentkupplung (SegK), bei der ganze Peptidketten als ein Segment gekuppelt werden, und zum anderen die sukzessive Kupplung (SK), bei der die Aminosäuren sukzessive, das heißt einzeln nacheinander, angeknüpft werden. Allen Kupplungsreaktionen liegt jedoch der gleiche entscheidende Schritt zugrunde, die Ausbildung einer Amidbindung, bei der ein Amin mit einer aktivierten Säurekomponente reagiert.

Verschiedene gängige und in der Arbeit angewandte Kupplungsverfahren sind hier aufgeführt.

Eine etablierte Methode für beide Kupplungswege ist unter anderem die Synthese über die Pentafluorphenyl- bzw. *N*-Hydroxysuccinimid-Aktivester (Abb. 3-20).^[141,142]

Aus der Säurekomponente und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wird zunächst *O*-Acylisoharnstoff gebildet. Dieses hochreaktive Intermediat wird dann durch den Sauerstoff der Hydroxygruppe von *N*-Hydroxysuccinimid bzw. Pentafluorphenol nucleophil angegriffen und so der Aktivester ausgebildet. Der als Nebenprodukt dabei ausfallende Dicyclohexylharnstoff (DCU) beschleunigt die Reaktion. Im abschließenden Schritt führt der nucleophile Angriff der Stickstoffkomponente am Aktivester zur Ausbildung der Amidbindung.

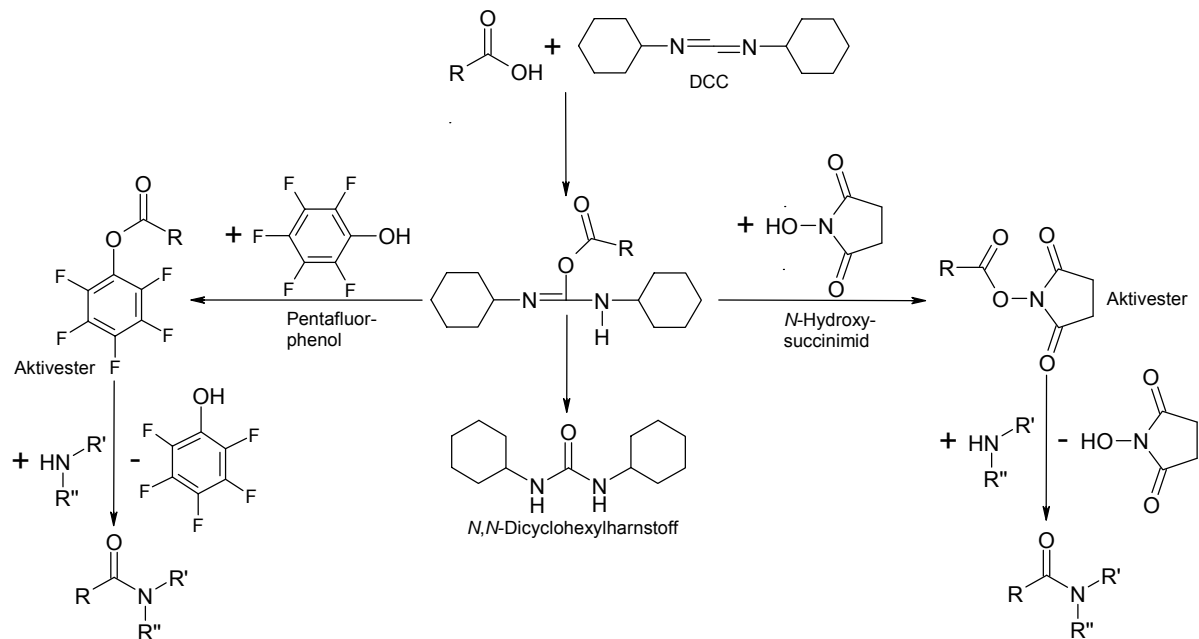


Abb. 3-20: Aktivestermethode über Pentafluorphenyl- bzw. *N*-Hydroxysuccinimidester

Ein anderes Verfahren, das vor allem bei Kupplung einzelner Aminosäuren Anwendung findet, ist die Aktivierung der Säurekomponente mittels Thionylchlorid oder Oxalyldichlorid zum Säurechlorid.^[141,142]

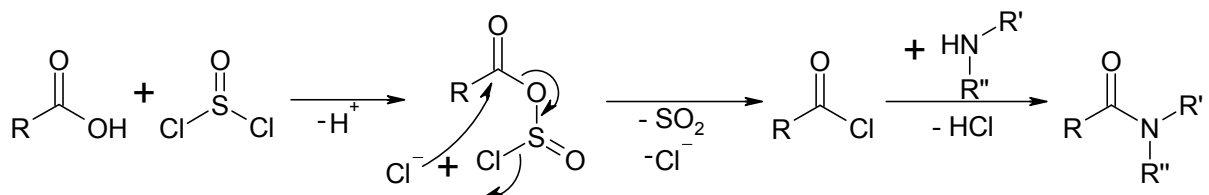


Abb. 3-21: Aktivierung mittels Thionylchlorid

Das bei der Reaktion gebildete „pseudo-unsymmetrische Anhydrid“ wird durch Angriff des freien Chlorids ins Säurechlorid überführt. Die anschließende Aminolyse des reaktiven Säurechlorids liefert die Amidbindung.

Andere häufig angewendete Verfahren sind die beiden Wege der Kupplungen über Anhydride.^[141,142]

Bei der Synthese über unsymmetrische Anhydride wird mittels sterisch anspruchsvoller Säurechloride, wie Pivaloylchlorid bzw. Isobutylchloroformiat aus den Säuren die aktivierte Komponente gebildet (Abb. 3-22).

Beim zweiten Weg, der Synthese über symmetrische Anhydride (Abb. 3-23), erfolgt die Bildung der acylierenden Spezies mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP).

Die Aminolyse des jeweiligen Anhydrids resultiert in der Ausbildung der Amidbindung.

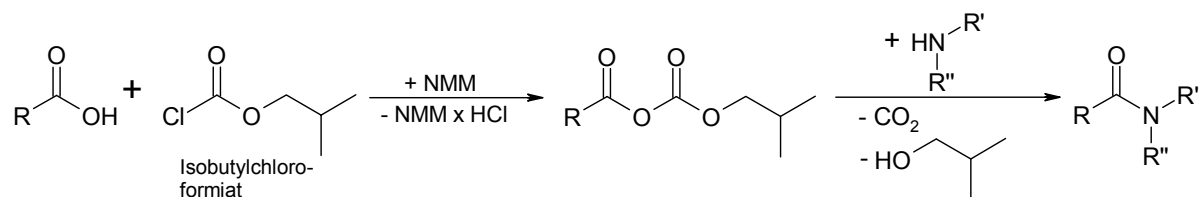


Abb. 3-22: Kondensation über gemischte Kohlensäureanhydride

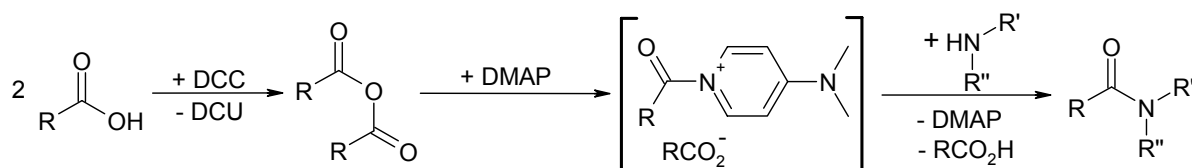


Abb. 3-23: Kondensation über symmetrische Anhydride

Bei der hochreaktiven Methode über die symmetrischen Anhydride, die vor allem für Kupplungen mit einzelnen AS angewendet wird, entsteht zuerst aus einem Äquivalent Säurekomponente und dem Äquivalent DCC das acylierte Carbodiimid (vgl. Abb. 3-20). Der O-Acylisoharnstoff wird dann nucleophil vom zweiten Äquivalent Säurekomponente unter Ausbildung des symmetrischen Anhydrids angegriffen. Mittels DMAP bildet sich aus dem symmetrischen Anhydrid ein Acylpyridinium-Ion, welches durch Angriff des Stickstoffnucleophils ins Amid überführt wird.

Ein Nachteil der Methode der symmetrischen Anhydride ist die Gefahr der Racemisierung der AS, mit der acyliert wird. Aufgrund der hohen Nucleophilie des Katalysators DMAP kann durch Deprotonierung am CH-aciden α -Kohlenstoffatom ein mesomeriestabilisiertes Enolat entstehen, wodurch die Stereochemie verloren geht.^[141]

Racemisierungsgefahr besteht ebenso bei der sowohl zur sukzessiven als auch zur Segmentkupplung einsetzbaren Variante über die gemischten Kohlensäureanhydride.^[141]

Eine weitere Kupplungsmethode, die für sukzessive wie auch Segmentkupplungen anwendbar ist, stellt das sehr reaktive Verfahren der Aktivierung der Säurekomponente durch das Uroniumreagenz PyBOP dar.^[141,142]

Angriff der Säurekomponente an der 3-Position des Benzotriazols führt unter Abspaltung von Tripyrrolidinphosphinoxid zur Ausbildung eines Benzotriazolesters. Aminolyse dieses Aktivesters resultiert in der Bildung des Amids und des Nebenproduktes 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt).

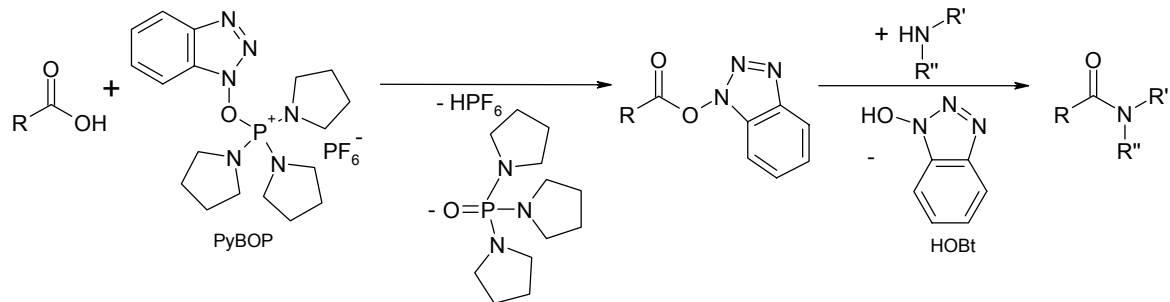


Abb. 3-24: Aktivierung und Kupplung über das Uroniumreagenz PyBOP

Ein weiteres hochreaktives Verfahren zur Darstellung von Peptiden ist die DPPA-Kupplungsmethode, die eine Variante des Azidverfahrens darstellt.^[141,142]

Das ursprünglich für den Curtius-Abbau von Säureaziden zu Urethanen^[143] entwickelte Verfahren beruht auf der Aktivierung der Carboxylkomponente durch Diphenylphosphorylazid (DPPA). Für den Aktivierungsmechanismus sind dabei zwei Wege denkbar und auch in der Literatur beschrieben.^[141] Zum einen die Bildung eines gemischten Phosphorsäureanhydrids und zum andern der Weg über ein Aminosäureazid (Abb. 3-25). Aus beiden Zwischenstufen führt die Aminolyse zum Amid.

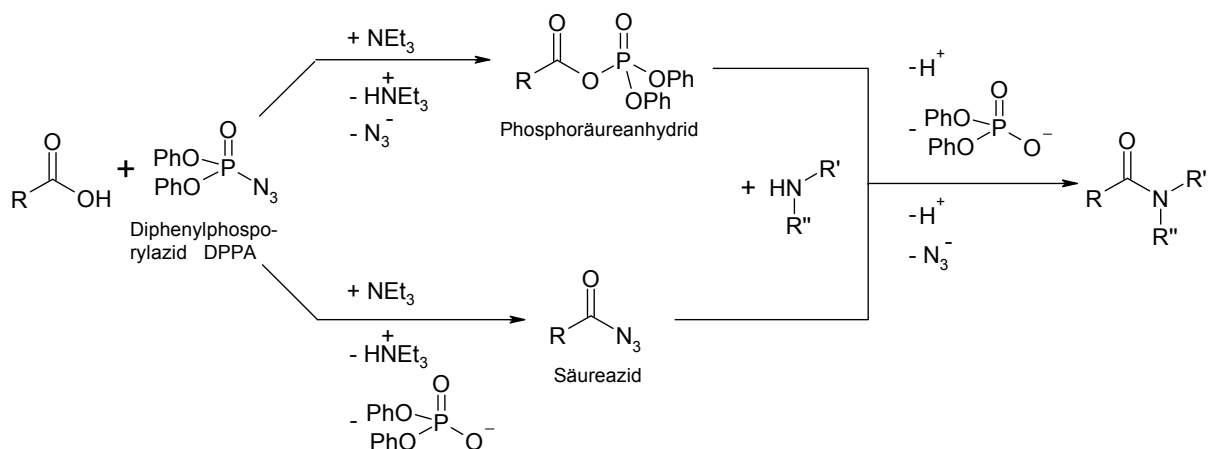


Abb. 3-25: Aktivierung und Kupplung mittels DPPA

Der Vorteil der DPPA-Kupplungsmethode, die es erlaubt sowohl einzelne AS (SK) als auch ganze Peptidsegmente (SegK) zu koppeln,^[82,133] ist der Ablauf ohne Gefahr der Racemisierung am α -Kohlenstoff der acylierenden Komponente.^[141,142]

Die Gefahr der Bildung von Nebenprodukten des Curtius-Abbau wird durch die Reaktionsführung bei niedrigen Temperaturen (0 °C) unterdrückt, so dass einzig die langen Reaktionszeiten als Nachteil dieser Methode bleiben.

3.4.2 Synthese der Peptidfragmente und Aminosäurederivate

Zielstrukturen der Arbeit sind verschiedene, mit den elektrophilen Bausteinen verbundene Aminosäuren, Aminosäurederivate und Peptide.

3.4.2.1 Synthese der Peptidfragmente

Um die Affinität der Verbindungen zum Enzym zu steigern und die Wichtigkeit der einzelnen Substratbindungstaschen der SAPs in P- sowie in P'-Richtung zu klären, sollen neben der für die P1- und P1'-Position vorgesehenen hydrophoben aromatischen Aminosäure Phenylalanin auch Peptide unterschiedlicher Länge, die der für die SAPs von *Candida albicans* charakteristischen Substratsequenz entsprechen, mit den elektrophilen Bausteinen verknüpft werden. Als Peptidsequenzen sollten dafür die Peptide Phe-Leu-Ala-Pro (P1-P4) und Phe-Ala-Leu (P1'-P3'), die sich auch in dem bisher besten SAP2-Substrat^[97] wiederfinden (vgl. Kapitel 2), eingesetzt werden.

Zur Synthese der Di-, Tri- und Tetrapeptide (Abb. 3-26) wurde das DPPA-Verfahren (vgl. Abb. 3-25) gewählt.

Als N-terminale Schutzgruppe der AS wurde *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) verwendet und der C-Terminus der AS war als Benzylester (OBn) geschützt. Für die Abkürzung von AS wird der 3-Buchstaben-Code verwendet und die AS weisen, sofern nicht explizit erwähnt, L-Konfiguration auf. Vor den Kupplungen werden die AS bzw. Peptide aus ihren Hydrochloriden, *para*-Tosylaten bzw. TFA-Salzen mittels Stickstoffbasen, wie Triethylamin (TEA), *N*-Methylmorpholin (NMM) oder Diisopropylethylamin (DIEA) freigesetzt.

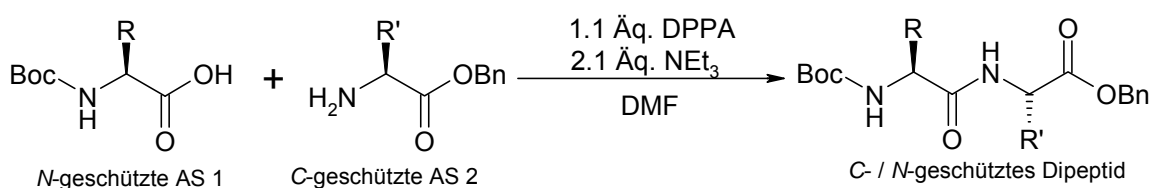


Abb. 3-26: Synthese der Dipeptide

Tabelle 3-2 zeigt die sehr hohen Ausbeuten der mittels DPPA-Kupplung erhaltenen Dipeptide. Der stereochemisch einwandfreie Verlauf dieser milden Kupplungsmethode zeigt sich NMR-spektroskopisch an dem Auftreten nur einfacher Signalsätze.

Tab. 3-2: Synthetisierte Dipeptide

| AS 1 | AS 2 | Dipeptid | Ausbeute |
|-----------|--------|--------------------------------|----------|
| Boc-PheOH | AlaOBn | Boc-Phe-AlaOBn Dipep-01 | 95% |
| Boc-PheOH | LeuOBn | Boc-Phe-LeuOBn Dipep-02 | 91% |
| Boc-ProOH | LeuOBn | Boc-Pro-LeuOBn Dipep-03 | 96% |

Nach der Kupplung zum Dipeptid wird der Benzylester von **Dipep-01** bzw. **Dipep-02** mittels katalytischer Hydrogenolyse bei Atmosphärendruck über Palladium-Kohle abgespalten und durch DPPA-Kupplung mit LeuOBn bzw. mit Ala-ProOMe wird das Tripeptid **Tripep-01** bzw. das Tetrapeptid **Tetpep-01** dargestellt (Abb. 3-27).

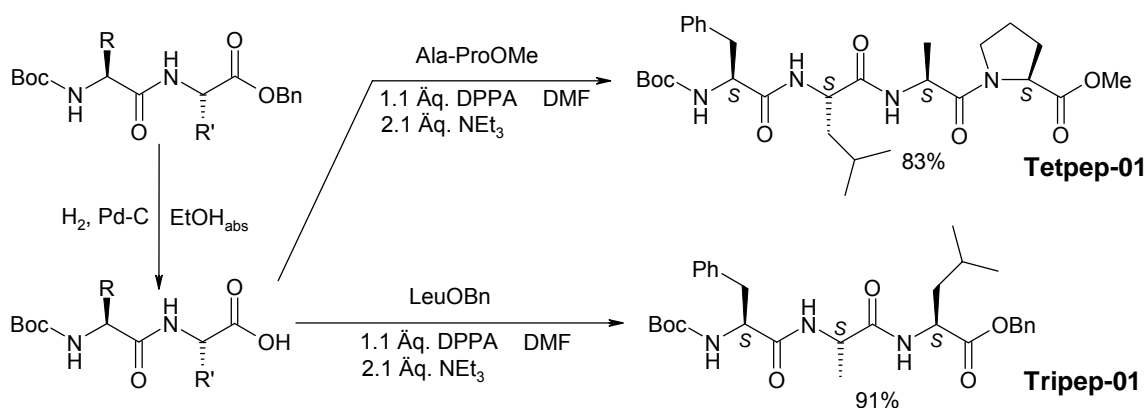


Abb. 3-27: Darstellung des Tri- und Tetrapeptids

Vor den Kupplungen mit den elektrophilen Bausteinen wird die *N*-terminale Boc-Schutzgruppe jeweils durch Reaktion mit TFA bei niedrigen Temperaturen ($0^\circ C$) abgespalten.

3.4.2.2 Synthese von Aminosäurederivaten

Die Darstellung der Phenylalaninole gelingt in einer sehr schnellen Reaktion (15 min) durch Reduktion des aus *N*-geschütztem Phenylalanin, *N*-Methylmorpholin und Isobutylchloroformiat dargestellten unsymmetrischen Anhydrids mittels Natriumborhydrid.^[144]

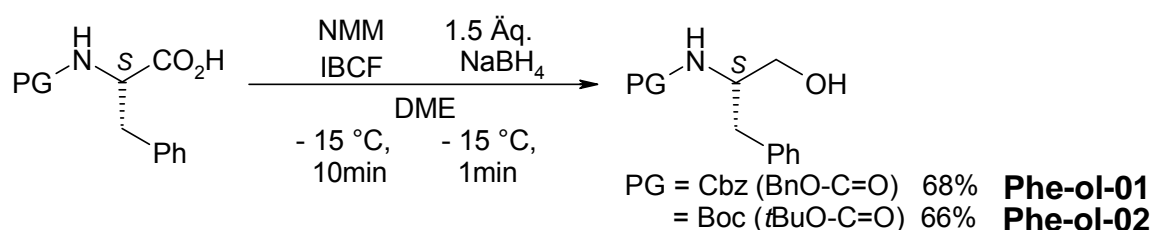


Abb. 3-28: Synthese der Phenylalaninole

Um die Aminoalkohole nicht über ihre Hydroxygruppe, sondern über ihren Stickstoff mit einem elektrophilen Baustein verknüpfen zu können, muss die OH-Gruppe zunächst geschützt und die Schutzgruppe am Stickstoff anschließend abgespalten werden.

Das Schützen der Hydroxygruppe von Cbz-Phenylalaninol **Phe-ol-01** mittels *Tert*butyl-dimethylsilylchlorid (TBDMSCl)^[145,146] und die anschließende katalytische Hydrogenolyse der erhaltenen Verbindung **Phe-ol-03** über Pd-C führt zum gewünschten O-geschützten Aminoalkohol **Phe-ol-04** (Abb. 3-29).^[147]

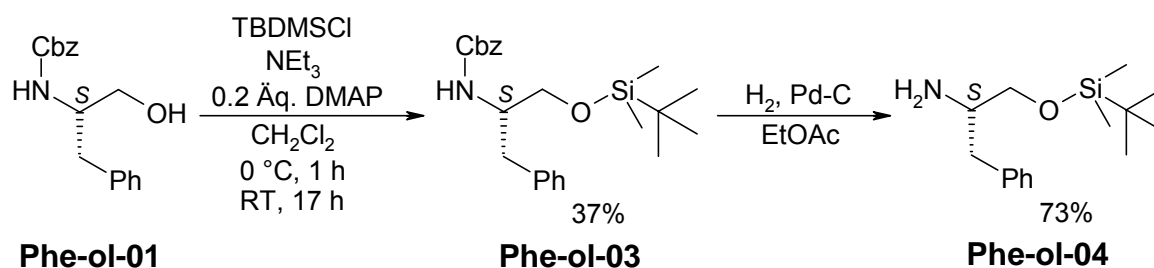


Abb. 3-29: TBDMS-Schätzung von Phenylalaninol

Durch DPPA-vermittelte Kupplung des O-geschützten Aminoalkohols **Phe-ol-04** an den Aziridinbaustein **A-05-Li** und anschließende TBDMS-Entschätzung (vgl. Abb. 3-47) sollte überprüft werden, ob schon allein die freie Hydroxy-Funktion in der Aminosäureseitenkette eine Verbesserung der Hemmwirkung bedingt. Von der Aminosäure Statin, die einen Aminoalkohol darstellt, der neben der Hydroxy-Funktion noch eine Säuregruppe enthält, ist bekannt, dass sie starke Aspartat-Protease-inhibitorische Wirkung besitzt.^[112]

3.4.3 Aminosäure- und Peptid-verknüpfte Epoxide

3.4.3.1 AS- / Peptid-Kupplung an Epoxidbausteine

Durch Kupplung von Aminosäuren bzw. Peptiden an die elektrophilen Bausteine sollte eine Erkennungssequenz für das Enzym aufgebaut und somit die Affinität der Verbindungen erhöht werden.

Als C-terminale Schutzgruppe dient bei den AS bzw. Peptiden der Benzylester. Die Freisetzung der AS bzw. Peptide erfolgt aus ihren Hydrochloriden, *para*-Tosylaten bzw. TFA-Salzen mittels Stickstoffbasen, wie TEA, NMM oder DIEA.

Für die Abkürzung von AS wird der 3-Buchstaben-Code verwendet und die AS weisen, sofern nicht explizit erwähnt, *L*-Konfiguration auf.

3.4.3.1.1 Meso-Epoxy succinate

3.4.3.1.1.1 Hydrolyse der *meso*-Epoxy succinate

Da die meisten Kupplungsmethoden über die Aktivierung der Säurekomponente verlaufen (vgl. Kapitel 3.4.1), muss eine Esterfunktion der Epoxy succinate erst in die freie Säure umgewandelt werden. Wie frühere Arbeiten zeigten, sind von den vielen Verfahren zur Esterspaltung neben den Spaltungen durch Nucleophile in aprotischen Lösungsmitteln auch Lewis-Säure katalysierte Verfahren hier ungeeignet.^[148,149]

Eine geeignete Methode ist die milde, basenkatalysierte Monohydrolyse mittels ethanolscher Kaliumhydroxid-Lösung (Abb. 3-30). Anschließende Umsetzung des Kaliumsalzes mit Kaliumhydrogensulfat führt in guter Ausbeute zum Monoethylepoxy succinat.^[150]

Die Synthese verläuft natürlich nicht stereoselektiv, sondern liefert ausgehend vom *meso*-Epoxy succinat das *cis*-Racemat.

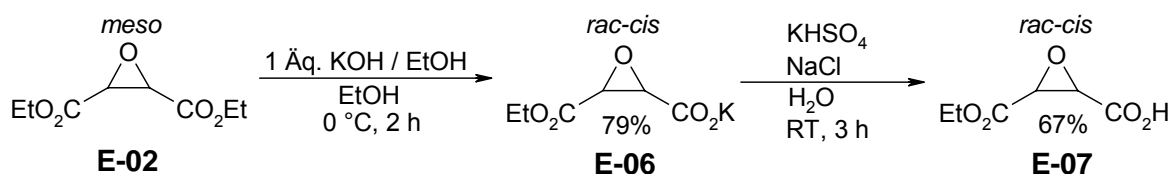


Abb. 3-30: Monohydrolyse zum Monoethylepoxy succinat

Ein Weg, bei dem die Hydrolyse selektiver verlaufen sollte, ist die enzymatische Hydrolyse mit Hilfe der Schweineleberesterase PLE. Diese Serin-Esterase ist ein Gemisch aus mehreren Isoenzymen, die im pH-Bereich zwischen 7 und 9 aktiv sind und sich besonders für die Monohydrolyse symmetrischer Diester eignen, da das bei der Reaktion entstehende Carboxylat kein Substrat mehr für die Esterase darstellt.^[151] So ist aus der Literatur bekannt,

dass mittels enzymatischer PLE-Hydrolyse aus dem *trans*-konfigurierten (*S,S*)-Diethyloxirandicarboxylat selektiv das *trans*-Monoethylepoxysuccinat zugänglich ist.^[152] Auch bei *cis*-konfigurierten Epoxysuccinaten findet mittels PLE nur Monohydrolyse statt. Stereochemisch verläuft die Reaktion jedoch nicht einheitlich. So ist für das *cis*-Dimethyloxirandicarboxylat bekannt, dass dessen PLE-Hydrolyse nur ein 3 / 2-Gemisch der beiden enantiomeren Monoester liefert.^[153] Die Äufklärung der durch die PLE bevorzugt gespaltenen Esterkonfiguration erfolgte durch Umsetzung der erhaltenen Verbindung mit einem chiralen Reagenz und anschließende NMR-spektroskopische Untersuchung. Es zeigte sich, dass bei dem *cis*-Dimethylepoxysuccinat bevorzugt die (*S*)-konfigurierte Estergruppe vom Enzym angegriffen wird.^[153] Mechanistisch wird die bevorzugte (*S*)-Estergruppenspaltung dadurch erklärt, dass kleine hydrophobe Moleküle in die kleinere S1-Tasche der PLE binden, um die hydrophoben Wechselwirkungen zu maximieren. In dieser Tasche kann der Angriff des katalytisch aktiven Serins nur am (*S*)-konfigurierten Ester erfolgen (Abb. 3-31).^[154,155]

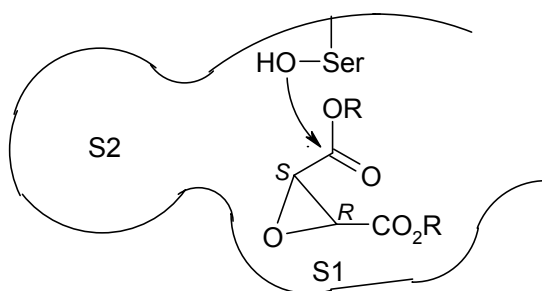


Abb. 3-31: Postulierter Mechanismus der PLE-Hydrolyse kleiner, hydrophober Moleküle

Bei der PLE-Hydrolyse von *cis*-Diethylepoxysuccinat (Abb. 3-32), die analog zur literaturbekannten PLE-Hydrolyse des *cis*-Dimethylesters^[153] durchgeführt wird, wird eine Lösung aus Diester und PLE in einem 0.1 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer durch Zutropfen von Natriumhydroxid konstant auf pH 7.0 gehalten. Nach Zugabe von einem Äquivalent Natriumhydroxid wird die Reaktion abgebrochen. Nicht umgesetzter Diethylester wird durch Ausschütteln mit Diethylether entfernt. Durch anschließendes Ansäuern der Pufferphase auf pH 2.0 und Ausschütteln mit Ethylacetat kann die Monosäure in die organische Phase überführt und isoliert werden.

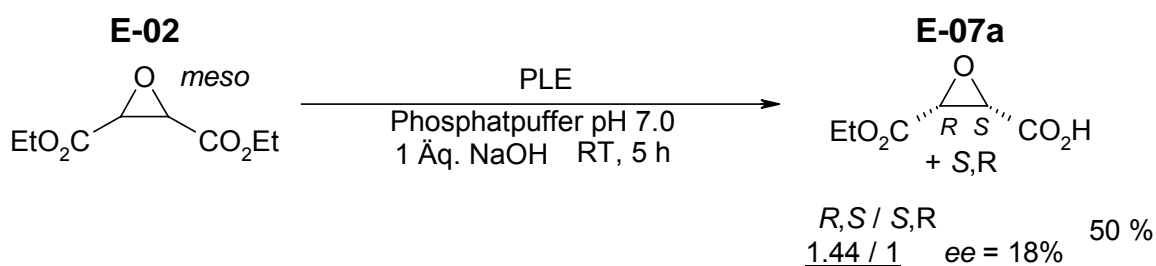


Abb. 3-32: PLE-Hydrolyse des *meso*-Diethylepoxysuccinats

Eine schnelle und einfache Aufklärung des Enantiomeren-Überschuss (ee) vom Monoethylepoxysuccinat **E-07a** durch Bestimmung des Drehwertes ist nicht möglich, da die einzelnen reinen Enantiomere bisher nicht synthetisiert wurden und so keine Vergleichsdaten vorliegen. Auf die Bestimmung der Konfiguration bzw. die Trennung der reinen Enantiomere durch aufwändigere Verfahren, wie der CD-Spektroskopie bzw. chiraler HPLC wird erst einmal verzichtet und die Verbindung **E-07a** mit dem Dipeptid Phe-LeuOBn gekuppelt (vgl. Abb. 3-35). Das nach der PyBOP-vermittelten Kupplung erhaltene Diastereomerenmisch liefert ein Verhältnis von 1.44 / 1 und liegt damit im Bereich des bei der PLE-Hydrolyse von *cis*-Dimethyloxirandicarboxylat erhaltenen Verhältnisses (3 / 2).^[153] Da bei der PLE-Hydrolyse des *cis*-Dimethyloxirandicarboxylats aufgeklärt wurde, dass bevorzugt der (S)-konfigurierte Ester verseift wird, kann diese Bevorzugung auch für die PLE-Hydrolyse von **E-02** angenommen werden. Diese Annahme liefert einen ee von 18%. Auf die Trennung und Aufklärung der absoluten Konfiguration der Diastereomere wurde letztendlich verzichtet, da das Gemisch keine Hemmung an der SAP2 zeigte (vgl. Kapitel 4.6.2.2).

3.4.3.1.1.2 Kupplungen der monohydrolysierten Epoxysuccinate

Die erhaltenen Monoethylepoxysuccinate sollten nun mit Hilfe von verschiedenen Kupplungsmethoden (vgl. Kapitel 3.4.1) an den aromatischen Aminosäureester PheOBn gekuppelt werden.

Bei den Methoden über das Säurechlorid (vgl. Abb. 3-21) sowie über den Pentafluorphenylester (vgl. Abb. 3-20) liefert das durch die alkalische Monohydrolyse erhaltene **E-07** nur komplexe Gemische.

Erst der Weg über die gemischten Kohlensäureanhydride (vgl. Abb. 3-22) liefert die gewünschte Verbindung **E-09**. Die Aminolyse mit PheOBn überführt das aus Monoethylepoxysuccinat **E-07** und Isobutylchloroformiat dargestellte unsymmetrische Anhydrid in das Epoxid **E-09** (Abb. 3-33). Dieses wird dabei als Diastereomerenmisch im Verhältnis 1.17 / 1 in einer Ausbeute von 41% erhalten.

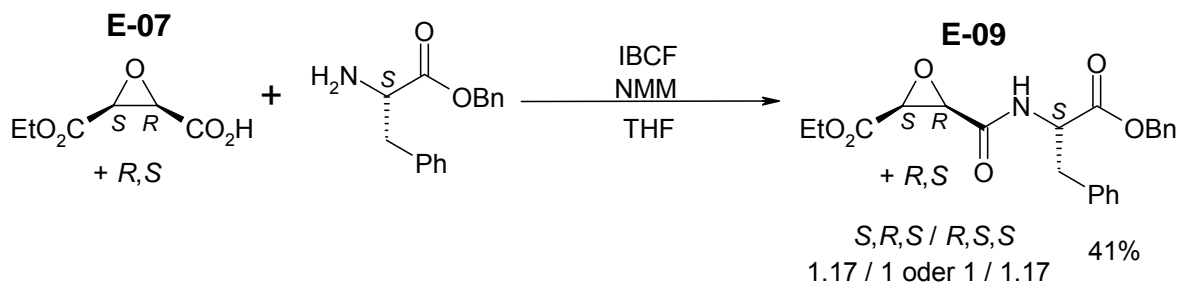


Abb. 3-33: Synthese des Epoxids **E-09** über die Methode des unsymmetrischen Anhydrids

Die Synthese dieses Phenylalaninyl-Epoxids **E-09** gelingt auch über die DPPA-Kupplungsmethode (vgl. Abb. 3-25). Die Umsetzung des racemischen Monokaliumsalzes **E-06** mit PheOBn liefert **E-09** im gleichen Diastereomerenverhältnis (Abb. 3-34).

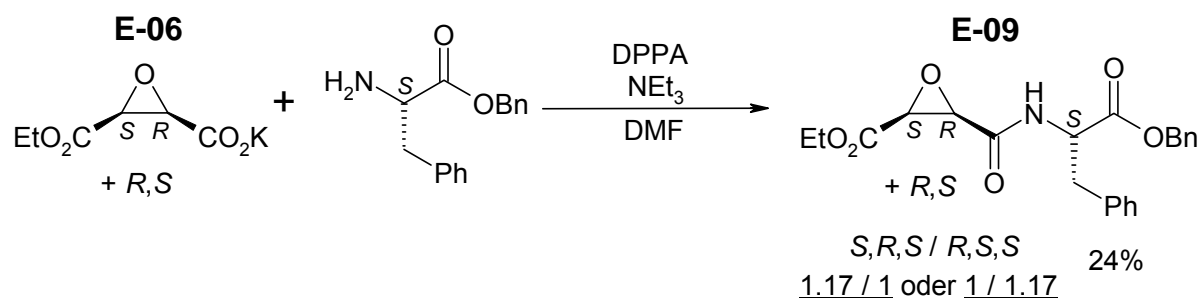


Abb. 3-34: Synthese des Epoxids **E-09** über die DPPA-Kupplungsmethode

Im Vergleich zur Methode über das unsymmetrische Anhydrid ist die Ausbeute bei der DPPA-Kupplungsmethode mit 24% niedriger. Durch den einen Schritt kürzeren Reaktionsweg, der auf die Darstellung der freien Säure verzichtet, wird dies jedoch nahezu ausgeglichen.

Die folgende Tabelle zeigt noch einmal die Ergebnisse der zur Kupplung von PheOBn an das *meso*-Epoxysuccinat durchgeführten Kupplungsmethoden.

Tab. 3-3: Kupplungsmethoden zum Epoxid **E-09**

| Epoxid | Methode | Ausbeute |
|-------------------------------------------------------|---------------------|----------|
| EtO ₂ C-Epox-CO ₂ H E-07 | (COCl) ₂ | - |
| EtO ₂ C-Epox-CO ₂ H E-07 | PfpOH | - |
| EtO ₂ C-Epox-CO ₂ H E-07 | IBCF | 41% |
| EtO ₂ C-Epox-CO ₂ K E-06 | DPPA | 24% |

Die PyBOP-Kupplung (vgl. Abb. 3-24) des durch PLE-Hydrolyse erhaltenen Oxiran-2,3-carbonsäuremonoethylesters **E-07a** (vgl. Abb. 3-32) mit dem Dipeptid Phe-LeuOBn liefert das Oxiran **E-22** als Diastereomerenmischung.

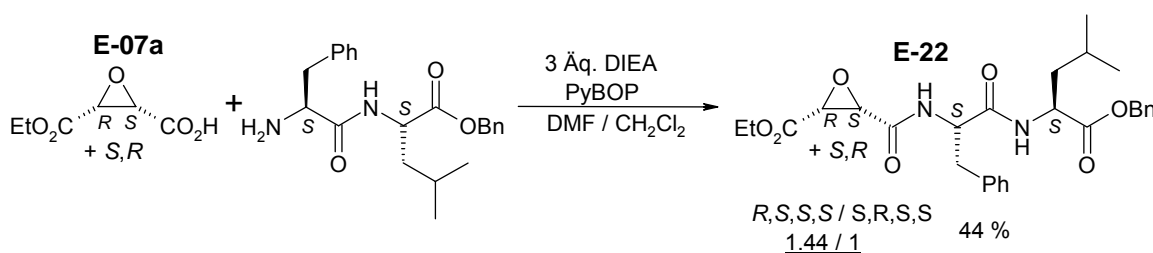


Abb. 3-35: PyBOP-Kupplung des PLE-hydrolysierten Epoxids **E-07a**

Anhand des NMR-Spektrums wird ein Verhältnis von 1.44 / 1 ermittelt. Wegen der für die PLE-Hydrolyse des *cis*-Dimethyloxirandicarboxylats aufgeklärten bevorzugten Verseifung des (*S*)-konfigurierten Esters,^[153] die auch für das *cis*-Diethylepoxysuccinat **E-02** angenommen wird (vgl. Abb. 3-32), sollte bei der Reaktion bevorzugt das *R,S,S,S*-Enantiomer gebildet worden sein.

Eine Aufklärung der Konfiguration der Diastereomere erfolgte letztendlich nicht, da das Gemisch keine Hemmung an der SAP2 zeigte (vgl. Kapitel 4.6.2.2).

3.4.3.1.2 Kupplung der Oxiran-2-carboxylate

Die milde, basenkatalysierte Monohydrolyse mittels ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung ist auch die Methode der Wahl zur Darstellung des Kaliumsalzes des durch Darzens-Glycid-estersynthese erhaltenen (vgl. Abb. 3-2) 3-Methyl-3-phenyloxiran-2-carboxylats **E-21**.

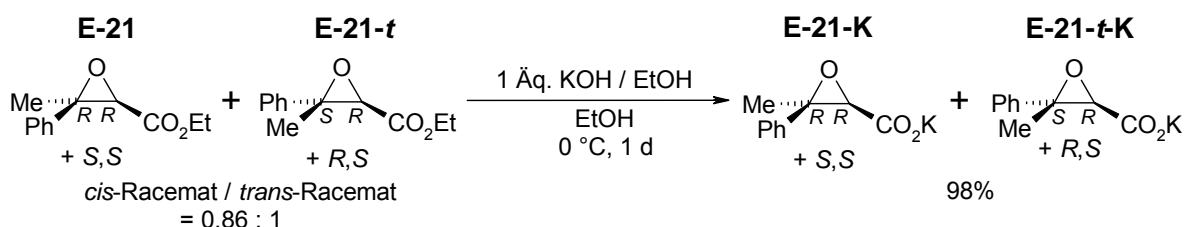


Abb. 3-36: Monohydrolyse der Epoxide **E-21** / **E-21-t** mittels ethanolischer KOH

Da die verschiedenen Kupplungsmethoden zur Darstellung des Phenylalaninyl-Epoxids **E-09** zeigten, dass die DPPA-Methode eine einfache, gute Ergebnisse liefernde Methode ist, wird das durch alkalische Hydrolyse erhaltene Gemisch der Kaliumsalze **E-21-K** und **E-21-t-K** direkt mittels DPPA-Methode mit PheOBn umgesetzt (Abb. 3-37).

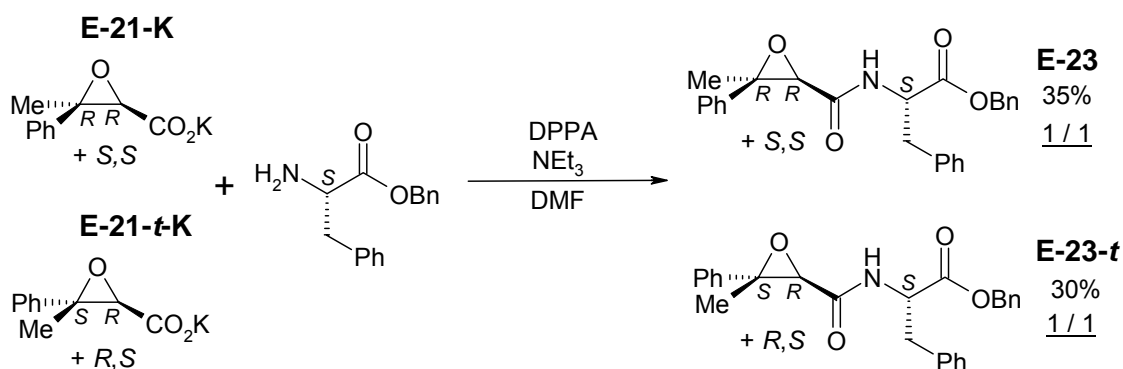


Abb. 3-37: DPPA-Kupplung zum racemischen *cis* / *trans*-Gemisch

Das bei der Reaktion entstehende Gemisch aus den vier diastereomeren Produkten kann mittels Säulenchromatographie in die *cis*- und *trans*-Verbindungen **E-23** und **E-23-t** getrennt

werden. Die NMR-Spektren zeigen, dass die Verhältnisse der Diastereomere innerhalb der dadurch erhaltenen Fraktionen bei 1 / 1 liegen. Die *cis*- / *trans*-Zuordnung der Verbindungen **E-23** und **E-23-t** erfolgt durch Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten mit den literaturbekannten Daten der Edukte **E-21** und **E-21-t**.^[100,101]

Obwohl die *cis*-Epoxybutansäure **E-05** aus ihrem Alkyloxirankaliumcarboxylat **E-03** leicht zugänglich ist (vgl. Abb. 3-1, Kapitel 3.1.1), wird auch hier zur Aminosäurekupplung das DPPA-Verfahren ausgehend vom Kaliumcarboxylat eingesetzt.

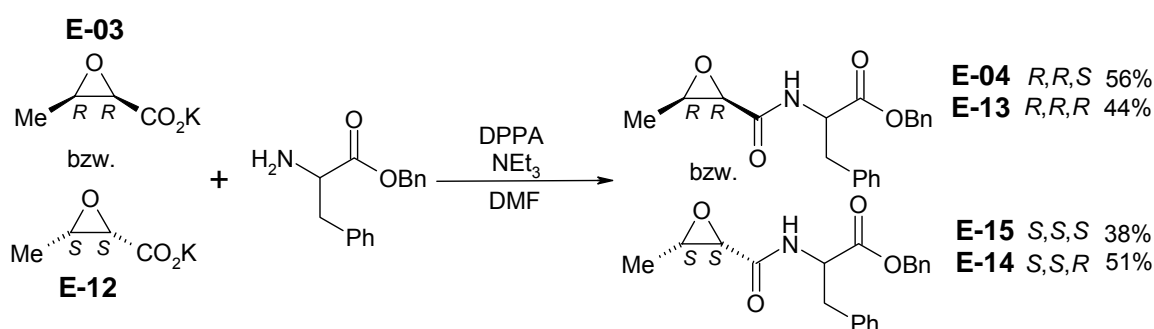


Abb. 3-38: DPPA-Kupplung der Epoxide **E-03** und **E-12** mit *L*- / *D*-Phenylalanin

Das aus *L*-Threonin erhaltene Alkyloxirankaliumcarboxylat **E-03** wird mit den jeweils enantiomerenreinen Aminosäureestern *L*- bzw. *D*-PheOBn umgesetzt. Dadurch werden die beiden Diastereomere **E-04** bzw. **E-13** mit *R,R,S*- bzw. *R,R,R*-Konfiguration erhalten.

Die Reaktion des Alkyloxirankaliumcarboxylats **E-12**, synthetisiert aus *D*-Threonin, mit den Aminosäureestern liefert die Diastereomere **E-15** bzw. **E-14** mit *S,S,S*- bzw. *S,S,R*-Konfiguration.

Mit Hilfe dieser vier unterschiedlich konfigurierten Derivate sollte der Einfluss der Stereochemie auf die Hemmung untersucht werden.

Das Derivat **E-08**, das durch Umsetzung des Alkyloxirankaliumcarboxylats **E-03** mit ValOBn erhalten wird, sollte außerdem die Frage beantworten, ob auch andere hydrophobe AS anstelle des aromatischen Phe in P1-Position geeignet sind.

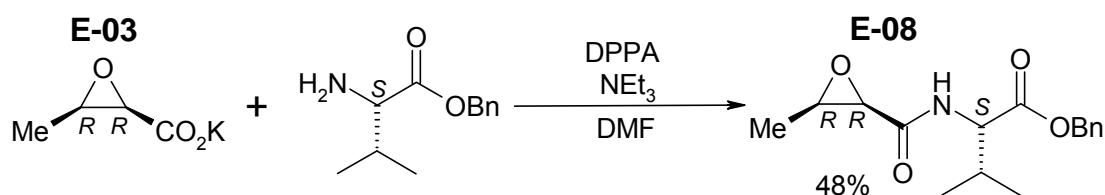


Abb. 3-39: DPPA-Kupplung zum Epoxid **E-08**

Die nachfolgende Tabelle zeigt noch einmal die aus den Alkyloxirankaliumcarboxylaten **E-03** und **E-12** über die DPPA-Kupplungsmethode dargestellten Verbindungen.

Tab. 3-4: Verbindungen aus den DPPA-Kupplungen von **E-03** und **E-12**

| Edukt | | AS | Produkt | | Ausbeute |
|-------------|------------|------------------|-------------|--------------|----------|
| Bez. | Konfig. | | Bez. | Konfig. | |
| E-03 | <i>R,R</i> | <i>L</i> -PheOBn | E-04 | <i>R,R,S</i> | 56% |
| E-03 | <i>R,R</i> | <i>D</i> -PheOBn | E-13 | <i>R,R,R</i> | 44% |
| E-12 | <i>S,S</i> | <i>L</i> -PheOBn | E-15 | <i>S,S,S</i> | 38% |
| E-12 | <i>S,S</i> | <i>D</i> -PheOBn | E-14 | <i>S,S,R</i> | 51% |
| E-03 | <i>R,R</i> | <i>L</i> -ValOBn | E-08 | <i>R,R,S</i> | 48% |

Zur Untersuchung der Wichtigkeit einer freien Säurekomponente für die Hemmwirkung der Epoxide wurden die vier unterschiedlich konfigurierten PheOBn-substituierten Epoxide mittels katalytischer Hydrogenolyse über Pd-C in die freien Säuren überführt (Abb. 3-40).

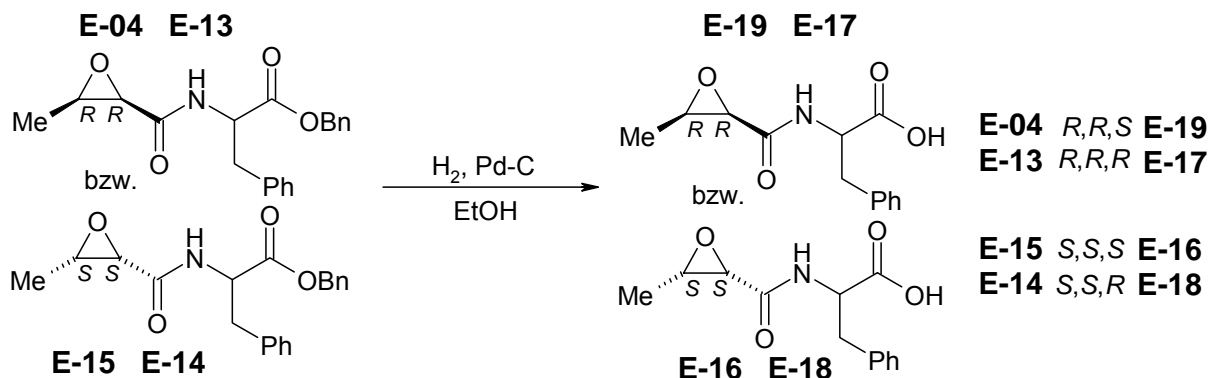


Abb. 3-40: Katalytische Hydrogenolyse zu den Epoxiden **E-16** – **E-19**

Die vier Verbindungen, die als farblose Feststoffe in quantitativer Ausbeute erhalten werden und in Tabelle 3-5 noch einmal zusammengefasst sind, können über ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert werden.

Tab. 3-5: Edukte und Produkte der Hydrogenolyse zu den Epoxiden **E-16-19**

| Edukt | | Verbindung | Produkt | | Konfig. |
|-------------|-----|------------------|-------------|----|--------------|
| Bez. | R | | Bez. | R | |
| E-04 | OBn | Epox-Me-CO-PheOR | E-19 | OH | <i>R,R,S</i> |
| E-13 | OBn | Epox-Me-CO-PheOR | E-17 | OH | <i>R,R,R</i> |
| E-15 | OBn | Epox-Me-CO-PheOR | E-16 | OH | <i>S,S,S</i> |
| E-14 | OBn | Epox-Me-CO-PheOR | E-18 | OH | <i>R,R,S</i> |

In den ^1H - und ^{13}C -Spektren fehlen die charakteristischen Peaks für die Methylengruppe des Benzylesters und im aromatischen Bereich erscheinen weniger Signale. Außerdem zeigen die ^1H -Spektren breite, tieffeld verschobene Signale für die OH-Gruppe der freien Säure und in den ^{13}C -Spektren findet sich eine Tieffeldverschiebung der O-C=O-Signale.

Die Hemmwirkung der freien Säurekomponente blieb jedoch ungeklärt, da sich die bei der Reaktion erhalten freien Säuren vermutlich durch selbstinduzierte säurekatalysierte Ringöffnung der Epoxide innerhalb weniger Tage zersetzen.

3.4.3.2 Epoxidierung von Amino-substituierten Z-Olefinen

Einen ganz anderen Weg zu *cis*-konfigurierten Amino-substituierten Epoxiden bieten Epoxidierungen von Amino-substituierten Z-Olefinen.

In Analogie zu einem *cis*-konfigurierten Tripeptidyl-Epoxid (vgl. Abb. 1-17a), einem moderaten irreversiblen HIV-1-Protease-Inhibitor,^[62] wird ein Teilfragment des Inhibitors durch direkte Epoxidierung des über Wittig-Kupplung dargestellten Olefins **Z-OI-02** (vgl. Abb. 3-55) mittels *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) synthetisiert.

Das dabei erhaltene *cis*-Epoxid **E-11** trägt neben dem Phenylalaninrest einen der Valin-Seitenkette analogen Alkylrest.

Durch den Austausch des Alkylrestes gegen einen Ethylester wird die Elektrophilie des Epoxids erhöht. Ein solches Epoxid wird durch *m*-CPBA-Epoxidierung der durch Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion dargestellten Verbindung **Z-OI-01** (vgl. Abb. 3-56) erhalten.

Die Ausbeute der in Abbildung 3-41 dargestellten Reaktionen liegt für den Epoxyester **E-10** trotz wesentlich längerer Reaktionsdauer mit nur 13% deutlich unter der für das Epoxid **E-11** (57%).

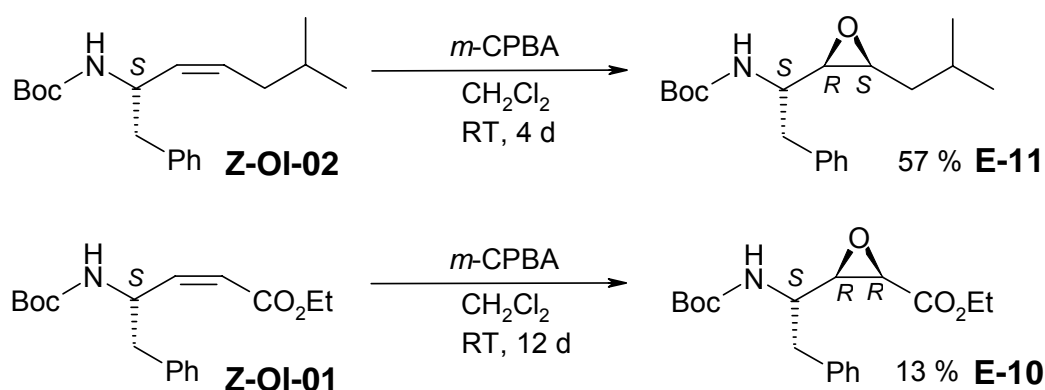


Abb. 3-41: *m*-CPBA-Epoxidierungen zu den Epoxiden **E-10** und **E-11**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren beider Epoxide zeigen von den zwei möglichen *syn*- bzw. *anti*-konfigurierten Verbindungen nur je eine.

Der Grund hierfür ist, dass der Angriff primär von der sterisch weniger beanspruchten, also dem Benzyl-Rest abgewandten Seite erfolgt. Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe des Urethans und dem Wasserstoffatom der Persäure wird zusätzlich der Angriff von der zur Aminosäureseitenkette *anti*-ständigen Seite begünstigt (Abb. 3-42).^[156,157]

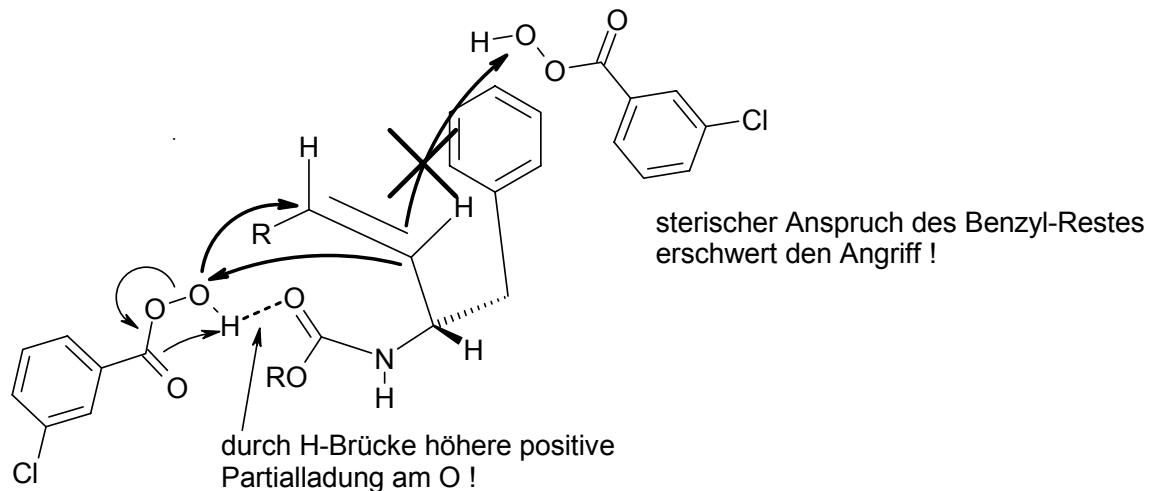


Abb. 3-42: Bevorzugter Angriff bei der *m*-CPBA-Epoxidierung

Dieses Angriffsmuster zeigt sich auch bei der *m*-CPBA-Epoxidierung des zum Epoxyester **E-10** analogen *E*-Olefins. In hohem Überschuss wird dabei das Epoxid erhalten, bei dem eine *syn*-Stellung zwischen den beiden Heteroatomen (O des Epoxidrings und *N* der Boc-geschützten Aminogruppe) vorliegt.^[156,157] Passend zum bevorzugten Angriff von der dem sterisch anspruchsvollen Substituenten abgewandten Seite ist auch die Konfiguration des *cis*-konfigurierten Tripeptidyl-Epoxids (vgl. Abb. 1-17a) in der Literatur mit (2*S*,3*R*,4*S*) angegeben.^[158]

3.4.4 Aminosäure- und Peptid-verknüpfte Aziridine

3.4.4.1 AS- / Peptid-Kupplung an Aziridinbausteine

Auch die elektrophilen Aziridinbausteine müssen zum Aufbau einer Erkennungssequenz für das Enzym mit Aminosäuren bzw. Peptiden verknüpft werden.

Wie bei den Epoxiden bieten sich für die Aziridine mehreren Möglichkeiten der AS- / Peptid-kupplungen an. Für die Kupplungen diene letztlich die DPPA-Methode (vgl. Abb. 3-25) als Methode der Wahl.

3.4.4.1.1 Hydrolysen der Aziridinbausteine

Analog zu der für *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate bekannten Methode^[149] ist unter milden Bedingungen mit Alkalihydroxiden eine Monohydrolyse von nur einer Esterfunktion bei niedrigen Temperaturen möglich. Anders als zur Hydrolyse der Epoxide hat sich bei der Aziridinhydrolyse Lithiumhydroxid-Monohydrat im entsprechenden Alkohol als sehr gut geeignetes System herausgestellt.^[148]

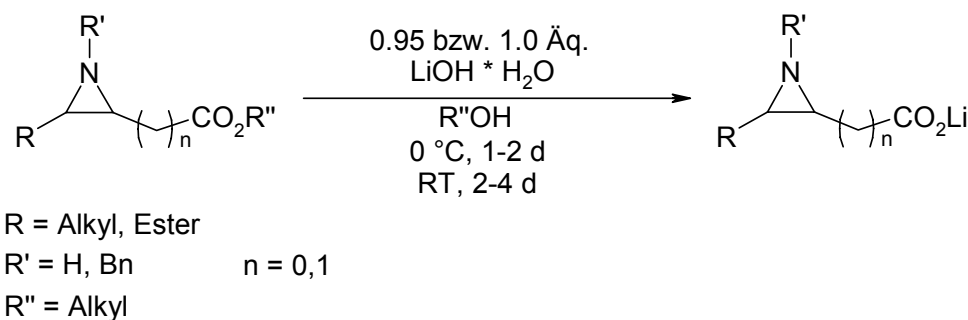
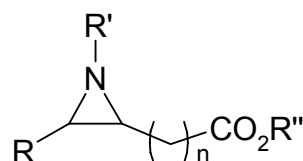


Abb. 3-43: Hydrolyse der Aziridinbausteine mittels Lithiumhydroxid-Monohydrat

Tab. 3-6: Alkalische Hydrolyse der Aziridinbausteine



| Bez. Ester | Konfig. Ring | R | R' | R'' | n | Bez. Salz | Konfig. Ring | Ausbeute |
|--------------|------------------|--------------------|--------------------|-----|---|-----------------|--------------|----------|
| A-02 | <i>meso</i> | CO ₂ Et | H | Et | 0 | A-02-Li | <i>rac</i> | 93% |
| A-03 | <i>S,S / R,R</i> | Me | CH ₂ Ph | Et | 0 | A-03-Li | <i>rac</i> | 97% |
| A-03a | <i>S,S</i> | Me | CH ₂ Ph | Et | 0 | A-03a-Li | <i>S,S</i> | 99% |
| A-05 | <i>S,S / R,R</i> | Ph | CH ₂ Ph | Me | 0 | A-05-Li | <i>rac</i> | 95% |
| A-09 | <i>meso</i> | CO ₂ Et | CH ₂ Ph | Et | 0 | A-09-Li | <i>rac</i> | 62%* |
| A-10 | <i>2R,3S</i> | PhCH ₂ | CH ₂ Ph | Et | 1 | A-10-Li | <i>2R,3S</i> | 96% |

* + 30% nicht umgesetztes Edukt

Aus Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat **A-02** wird durch Reaktion mit einem leichten stöchiometrischen Unterschuss an Lithiumhydroxid-Monohydrat (0.95 Äq.) das Monolithiumsalz dargestellt. Das *N*-benzylierte Aziridin-2,3-dicarboxylat **A-09** wird auf dem gleichen Weg in sein Monolithiumsalz überführt. Bei der alkalischen Hydrolyse der beiden Verbindungen entstehen die Lithiumsalze als Racemate, da kein Ester bevorzugt angegriffen wird.

Auch die Aziridin-2-carboxylate **A-03**, **A-03a** und **A-05** sowie das methylenverbrückte Aziridinmonocarboxylat **A-10** werden mittels milder alkalischer Hydrolyse mit Lithium-

hydroxid-Monohydrat im entsprechenden Alkohol in die Lithiumsalze umgewandelt. Im Unterschied zu den Dicarboxylaten wird bei den Monocarboxylaten aber ein Äquivalent Lithiumhydroxid-Monohydrat verwendet, da hier nicht die Gefahr der Dihydrolyse besteht.

Bei den Hydrolysen der Aziridin-2-carboxylate bleibt die Stereochemie erhalten. Die enantiomerenreinen Aziridine **A-03a** und **A-10** liefern enantiomerenreine Lithiumsalze, wohingegen bei den racemischen *cis*-Aziridin-2-carboxylaten **A-03** und **A-05** auch die Lithiumsalze als Racemate erhalten werden.

Die Monolithiumsalze der Dicarboxylate werden vor der weiteren Umsetzung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie identifiziert, wohingegen die Lithiumsalze der Aziridin-2-carboxylate direkt der DPPA-vermittelten Kupplung zugeführt werden.

Die versuchte enzymatische Hydrolyse des *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylats **A-02** mittels Schweineleberesterase analog zur literaturbeschriebenen stereoselektiven PLE-Hydrolyse des *cis*-Dimethylaziridin-2,3-dicarboxylates^[135] liefert nach Protonierung über einen stark sauren Anionenaustauscher nur ein komplexes Produktgemisch, das laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keine Spuren von Aziridin mehr enthält.

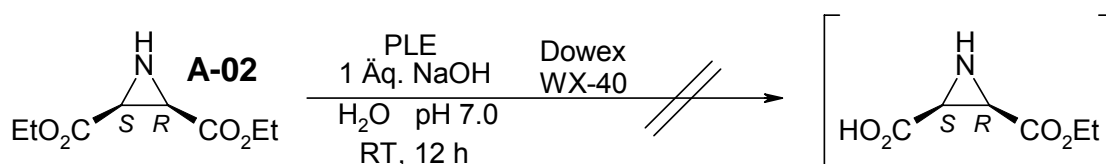


Abb. 3-44: Versuchte PLE-Hydrolyse des *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylats **A-02**

Auch der Versuch durch PLE-Hydrolyse aus dem racemischen *cis*-Aziridin-2-carboxylat **A-05** nur das (*R,R*)-Isomer, das durch die Esterase nicht umgesetzt werden sollte, zu isolieren, scheiterte.

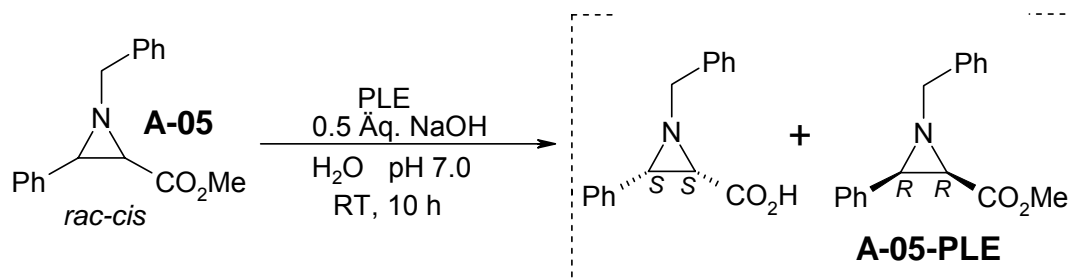


Abb. 3-45: Versuchte Isolierung des (*R,R*)-Isomers von **A-05** durch PLE-Hydrolyse des (*S,S*)-Isomers

Da nur die Esterfunktion des (S,S)-Isomers von **A-05** vom Enzym gespalten werden sollte, wurde die Reaktion anders als für die in Kapitel 3.4.3.1.1.1 beschriebene PLE-Hydrolyse des prochiralen Epoxids **E-02** schon nach der Zugabe von 0.5 Äquivalenten Natriumhydroxid abgebrochen. Durch Ausschütteln der wässrigen Reaktionslösung mit Ethylacetat wurde die ¹H-NMR-spektroskopisch reine Verbindung **A-05-PLE** in einer Ausbeute von 58% erhalten.

Nach Hydrolyse mit Lithiumhydroxid-Monohydrat wurde die Verbindung über die DPPA-Methode mit Peptiden gekuppelt. Das Auftreten von Diastereomeregemischen mit ähnlichen Verhältnissen wie bei den Kupplungen ausgehend von **A-05-Li** zeigt, dass bei der PLE-Hydrolyse keiner der beiden Ester bevorzugt umgesetzt wurde. Der Grund hierfür liegt sehr wahrscheinlich an den großen lipophilen Phenylresten, die eine Bindung in die S1-Tasche der Serinesterase und somit eine bevorzugte Spaltung des (S)-konfigurierten Esters verhindern (vgl. Abb. 3-31).

3.4.4.1.2 DPPA-Kupplungen der Aziridinbausteine

Durch die DPPA-katalysierte Peptidkupplung verschiedener Aminosäuren und Peptide an die Lithiumsalze der Aziridinbausteine werden die gewünschten Aziridinylpeptide in unterschiedlich guten Ausbeuten erhalten.

Die in Tabelle 3-7 aufgelisteten Versuche DPPA-vermittelter Kupplungen verschiedener Aminosäuren und Peptide an die Lithiumsalze der Aziridinbausteine zeigen, dass die Lithiumsalze der über Cromwell-Synthese hergestellten racemischen Aziridine **A-03** und **A-05** (vgl. Abb. 3-5) bei den Kupplungen immer Diastereomeregemische ergeben. Die Verhältnisse, die von 1.2 / 1 (**A-04**) bis 5.33 / 1 (**A-14**) reichen, sind dabei stark von den Peptiden abhängig, mit denen die Aziridinbausteine verknüpft werden. So liefert die Kupplung des Lithiumsalzes **A-05-Li** mit dem Tetrapeptid Phe-Leu-Ala-ProOMe (**Tetpep-01**) zu **A-14** vermutlich wegen des sterisch größten Anspruchs auch das höchste Diastereomerenverhältnis.

Bei den Aziridinen **A-07/A-07'**, **A-12/A-12'** und **A-13/A-13'** konnten die Diastereomeregemische mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 angetrennt werden. Für die beiden dabei erhaltenen, mit jeweils einem Diastereomer angereicherten Fraktionen, sind die Ausbeuten und die Verhältnisse separat angegeben (Tab. 3-7).

Die Diastereomerenverhältnisse sind, sofern die LC-MS-Chromatogramme eine Grundlinientrennung aufwiesen, anhand der erhaltenen Peakflächen ermittelt. Lag keine Grundlinientrennung vor, erfolgte die Bestimmung der Diastereomerenverhältnisse aus den ¹H-NMR-Spektren.

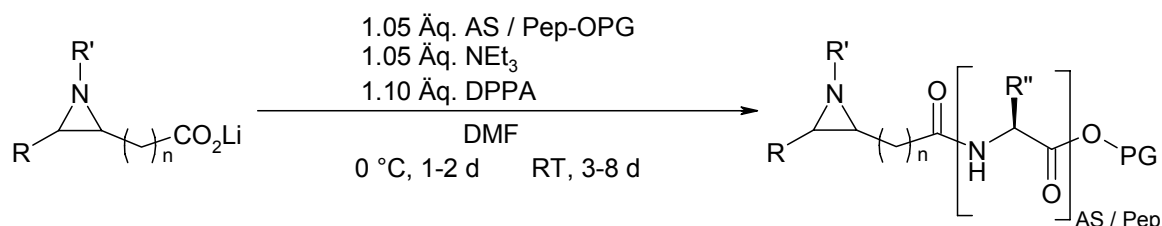


Abb. 3-46: DPPA-Kupplung der Aziridinbausteine

Tab. 3-7: Aziridinylpeptide durch DPPA-Kupplung

| Produkt | R | R' | n | AS / Pep ^a | Stereochemie | | Ausbeute |
|------------------------------|--------------------|--------------------|---|-----------------------|------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|
| | | | | | Ring | Diast.-Verh. | |
| | CO ₂ Et | H | 0 | PheOBn | | | < 3% ^b |
| | CO ₂ Et | H | 0 | ValOBn | | | < 2% ^b |
| A-04 | Me | CH ₂ Ph | 0 | PheOBn | <i>R,R</i> / <i>S,S</i> | 1.2 : 1 ^e | 52% |
| A-04a | Me | CH ₂ Ph | 0 | PheOBn | <i>S,S</i> | | 63% |
| A-07/07' | Ph | CH ₂ Ph | 0 | PheOBn | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 3.4 : 1 ^f / 1 : 2.4 ^f | 24% / 23% ^c |
| A-08 | Ph | CH ₂ Ph | 0 | ValOBn | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 1.4 : 1 ^e | 41% |
| A-11 | Ph | CH ₂ Ph | 0 | Pro-LeuOBn | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 2.7 : 1 ^f | 54% |
| A-12/12' | Ph | CH ₂ Ph | 0 | Phe- <i>o</i> TBDMS | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 6.7 : 1 ^f / 1 : 3.1 ^f | 18% / 31% ^c |
| ^d A-13/13' | Ph | CH ₂ Ph | 0 | Phe-Ala-LeuOBn | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 3.3 : 1 ^f / 1 : 10.4 ^f | 13% / 9% ^c |
| ^d A-14 | Ph | CH ₂ Ph | 0 | Phe-Leu-Ala-ProOMe | <i>R,R</i> + <i>S,S</i> * | 5.3 : 1 ^f | 44% |
| A-15 | CO ₂ Et | CH ₂ Ph | 0 | PheOBn | <i>S,R</i> + <i>R,S</i> * | 1.7 : 1 ^f | 54% |
| ^g A-16 | Ph | CH ₂ Ph | 0 | Phe- <i>ol</i> | <i>R,R</i> oder <i>S,S</i> * | | 93% |
| ^h A-17 | PhCH ₂ | CH ₂ Ph | 1 | PheOBn | 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> | | < 20% ^h |

^a nur *L*-AS; ^b verunreinigtes Produkt; ^c durch Säulenchromatographie angetrennte Diastereome;

^d Edukt: Li-Salz von **Azi-05-PLE**; ^e Verhältnis aus LC-MS; ^f Verhältnis aus ¹H-NMR; ^g Edukt: **A-12**;

^h verunreinigtes Produkt, Reinigung mittels präp. HPLC steht noch aus.

* Die absolute Konfiguration der einzelnen Diastereomere am Aziridin wurde nicht bestimmt.

Die Zuordnung der einzelnen Diastereomere ist auf schnellem und einfachem Weg nur für das Aziridinylpeptid **A-04** möglich, da es neben der Kupplung aus dem Lithiumsalz des racemischen Aziridins **A-03** auch mittels DPPA-Kupplung des Lithiumsalzes des analogen enantiomerenreinen (*S,S*)-Aziridins **A-03a** dargestellt wurde. Durch Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten des enantiomerenreinen Phenylalaninyl-Aziridins **A-04a** mit (*S,S,S*)-Konfiguration und denen des Diastereomeregemisches von **A-04** zeigt sich, dass das (*S,S,S*)-konfigurierte Enantiomer im leichten Unterschuss gebildet wurde.

Das mit in Tabelle 3-7 aufgelistete **A-16** wird, wie in Abbildung 3-47 gezeigt, durch Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe von dem über DPPA-Kupplung erhaltenen **A-12** mittels Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) erhalten.

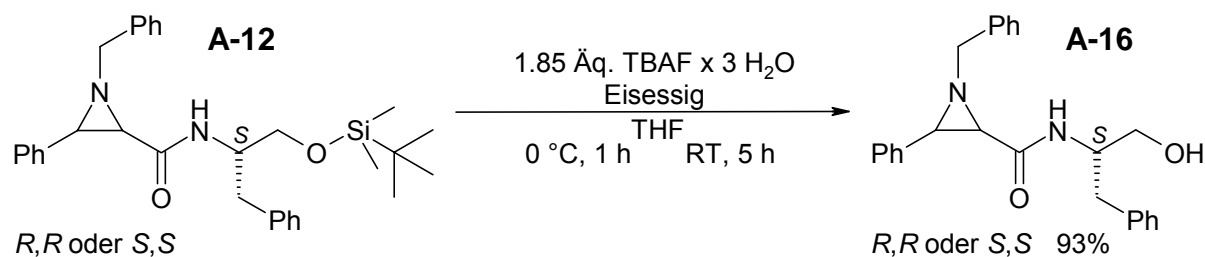


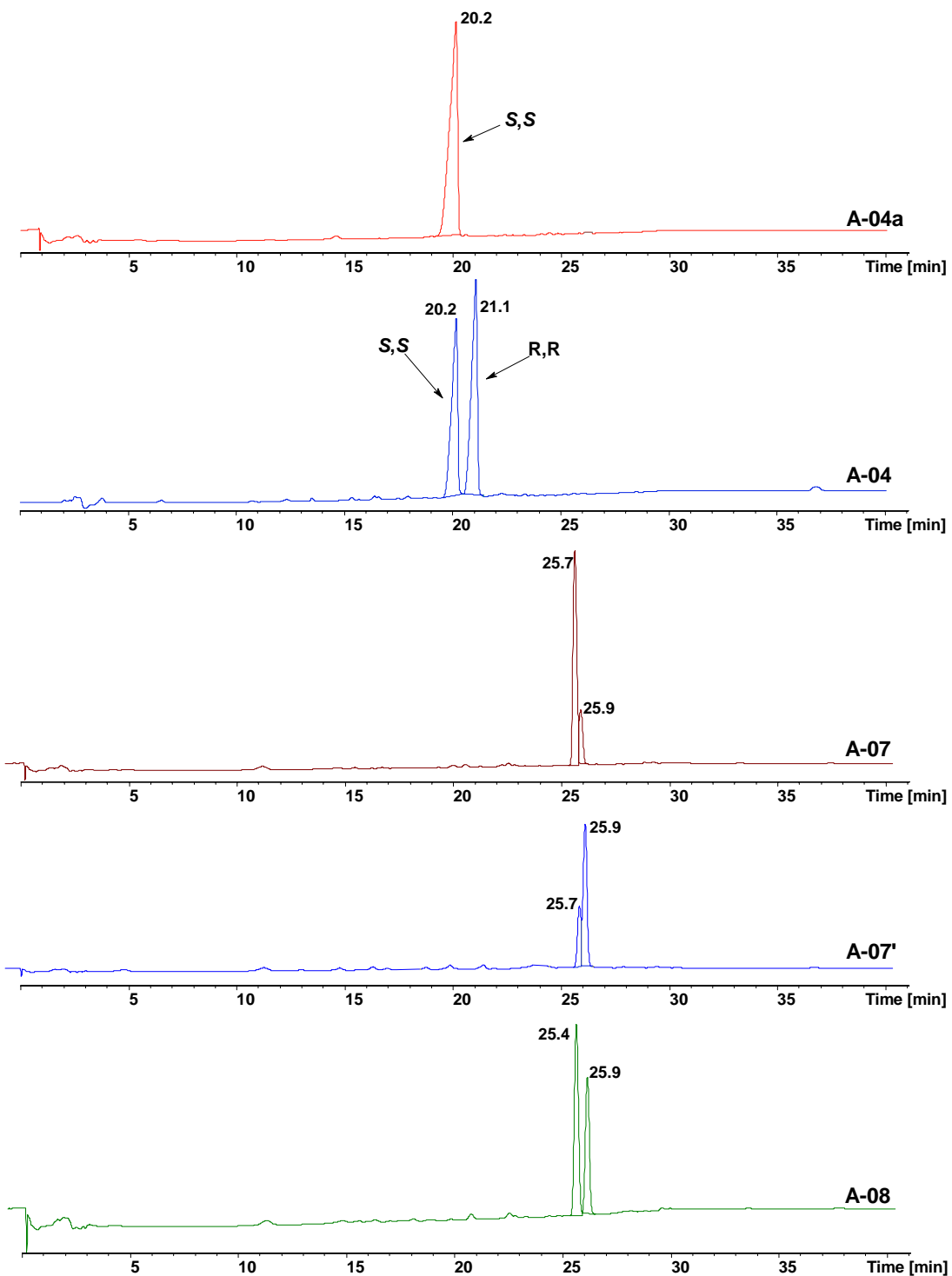
Abb. 3-47: TBDMS-Entschützung zum Aziridin A-16

Die letzte Verbindung in der Tabelle 3-7, das Aziridin **A-17**, stellt den ersten Ansatz zur Steigerung der Affinität der aus den Enzymtestungen als beste Inhibitoren hervorgegangenen Aziridine **A-07** und **A-08** (vgl. Tab. 4-3) dar. Laut Docking begünstigt der Einbau von Methylenbrücken zwischen dem Aziridinring und den beiden Substituenten Phenyl- und Amid die Anpassung an die Bindungstaschen. Neben der S1- und S2-Tasche, in die auch **A-07** und **A-08** gut binden, liefert das Docking den Hinweis auf eine gute Lage der Benzylreste des Rings und des Stickstoffs in der S1'-Tasche des Enzyms (vgl. Kapitel 6). Die Kupplung der AS PheOBn an den beidseitig methylenverbrückten Aziridinbaustein **A-10** (vgl. Abb. 3-8) lieferte nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel 60 das Aziridin **A-17**. Laut NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie ist das Aziridin aber noch verunreinigt und muss erst noch mittels präparativer HPLC rein isoliert werden.

Tabelle 3-7 zeigt desweiteren, dass aus dem Lithiumsalz des *N*-benzylierten Diethylaziridin-2,3-dicarboxylats **A-09** (vgl. Abb. 3-17) mittels DPPA das gewünschte Phenylalaninyl-Aziridin **A-15** erhalten wird, wohingegen die Reaktionen der Monolithiumsalze von Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat **A-02** (vgl. Abb. 3-11) mit PheOBn bzw. ValOBn scheitern. Die NMR-Spektren der Rohprodukte zeigen zwar Spuren der gewünschten Aziridine, aber nach säulenchromatographischer Aufreinigung wird nur je eine Fraktion gefunden, die laut NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie die Produkte enthält. Die Ausbeuten der noch sehr verunreinigten Produktfraktionen liegen dabei unter 3 bzw. 2%. Anschließende Versuche zur Reinigung mittels HPLC gelangen nicht. Da DPPA-Kupplungen aus den Monolithiumsalzen der analogen *trans*-Aziridine bekannt sind^[82,159] und auch die Kupplung der *N*-benzylierten Verbindung erfolgreich verläuft, wird angenommen, dass die *cis*-Stellung der beiden Carboxylatgruppen in Kombination mit der freien NH-Funktion des Aziridins das Lithiumsalz stabilisieren und so die Kupplungsreaktionen verhindern.

In Diagramm 3-1 sind beispielhaft LC-MS-Chromatogramme einiger Aziridine aufgeführt. Die mittels einer *Agilent 1100 LC / MSD-Trap* auf einer *Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18* Säule (4,6 x 150 mm) durchgeführten LC-MS-Analysen von **A-04** und **A-04a** unter-

stützen das Ergebnis der NMR-Zuordnung, und die Chromatogramme von **A-07** und **A-07'** zeigen sehr gut die Anreicherung jeweils eines Diastereomeren.



Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18 Säule (4,6 x 150 mm);
Fluß: 600 μ L / min; UV-Detektion bei 254 nm;
Mobile Phase: H₂O / ACN + 0.1% Ameisensäure;
Gradient: 40% ACN, 0-5 min; 40 auf 95% ACN, 5-25 min; 95% ACN, 15 min.

Diagramm 3-1: LC-MS-Chromatogramme verschiedener Peptidyl-Aziridine

Eine Trennung der an der SAP2 aktiven Diastereomergemische mittels semipräparativer HPLC oder im präparativen Maßstab wurde bisher noch nicht vorgenommen.

3.4.4.2 Direkte Aziridinierung zu Aziridinylpeptiden

Zum Aufbau von Carboxamid-substituierten Aziridinen wurde die direkte Aziridinierung von Aminosäure-substituierten *E*-Olefinen versucht.

Mit Hilfe von 1,2-Diazaspiro[2.3]octan **A**, das durch Deprotonierung mit Butyllithium aktiviert wird, können laut Literatur bei tiefen Temperaturen ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) aus *trans*-konfigurierten Vinylamiden selektiv *cis*-Aziridincarboxamide dargestellt werden.^[160] Die Anwendung dieser Methode auf die Aminosäure-substituierten *E*-Olefine **E-OI-02** und **E-OI-04** (vgl. Abb. 3-58) erbringt jedoch neben einer Vielzahl von nicht identifizierbaren Substanzen nur Spuren der Edukte. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen keine Signale für Aziridine.

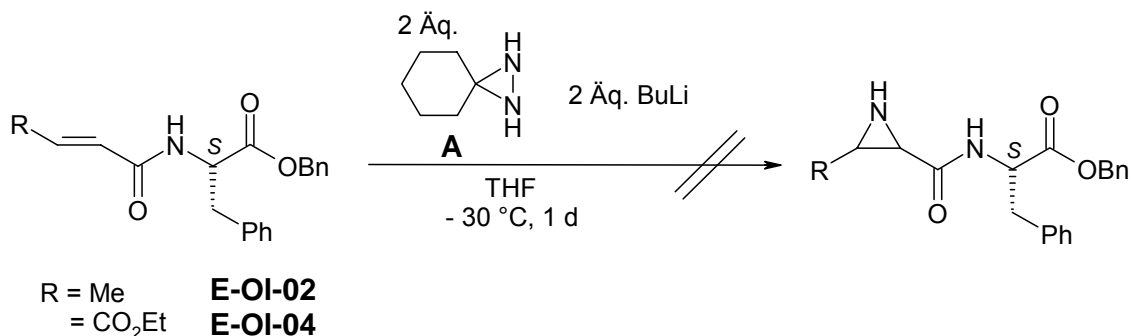


Abb. 3-48: Versuch der direkten Aziridinierung von Aminosäure-substituierten *E*-Olefinen

3.4.4.3 Cromwell-Synthese zu Aminosäure-substituierten Aziridinen

Cis-Aziridine, bei denen die Richtung der daran verknüpften Peptidkette in umgekehrter Richtung verläuft, sollten durch Cromwell-Synthese (vgl. Abb. 3-5) der Crotonsäurederivate **E-OI-01** und **E-OI-03** (vgl. Abb. 3-60) zugänglich sein (Abb. 3-49).

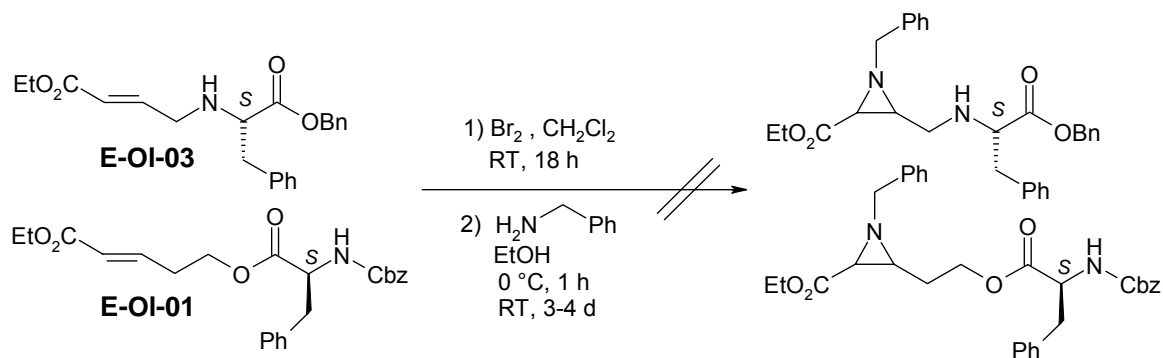


Abb. 3-49: Versuch der Cromwell-Synthese von Aminosäure-substituierten *E*-Olefinen

Laut NMR-Spektroskopie gelingt die Dibromierung der Olefine. Die anschließende Substitution der beiden Bromatome unter Ausbildung des Aziridinrings liefert jedoch nicht die Aziridine, sondern neben Spuren des Monosubstitutionsprodukts vor allem das durch HBr-Eliminierung resultierende Enamin.

Bei der Reaktion des *E*-Olefins mit Allylaminospacer (**E-OI-03**) werden noch weitere Produkte erhalten. Das noch komplexere Produktgemisch dürfte auf die NH-Funktion des Allylamins zurückzuführen sein, dass unter den basischen Bedingungen ebenfalls in der Lage ist Brom zu substituieren.

3.4.5 Aminosäure- und Peptid-verknüpfte *Z*-Olefine

3.4.5.1 Kupplung von Aminosäuren und Peptiden an Maleate

Einen synthetisch sehr einfachen Zugang zu *Z*-konfigurierten Aminoyl- bzw. Peptidyl-Olefinen bietet die Kupplung an die Monoalkylmaleate (vgl. Abb. 3-18) über die Methode der unsymmetrischen Anhydride.

Reaktion von Monoethylmaleat **Mal-02** (vgl. Kapitel 3.3.1) mit PheOBn und ValOBn liefert auf diese Weise die Aminoyl-Olefine **Z-OI-03** und **Z-OI-04**.

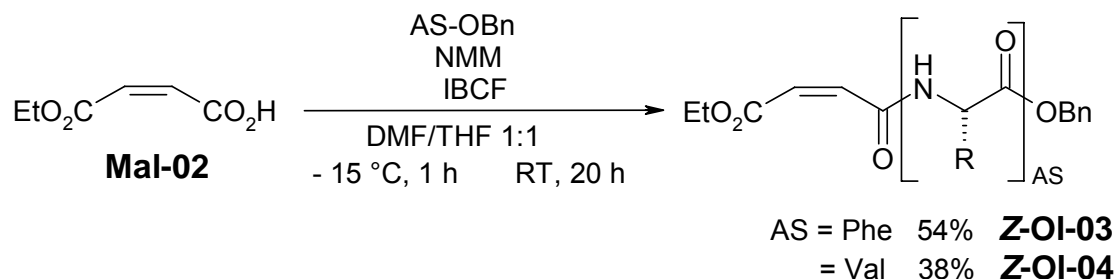


Abb. 3-50: Aminosäurekupplung an Monoethylmaleat über unsymmetrische Anhydride

Für *Z*-Olefine, die mit Peptiden über Segmentkupplung verknüpft werden sollen (Abb. 3-51), bietet sich die Methode der PyBOP-vermittelten Kupplung (vgl. Abb. 3-24) an.

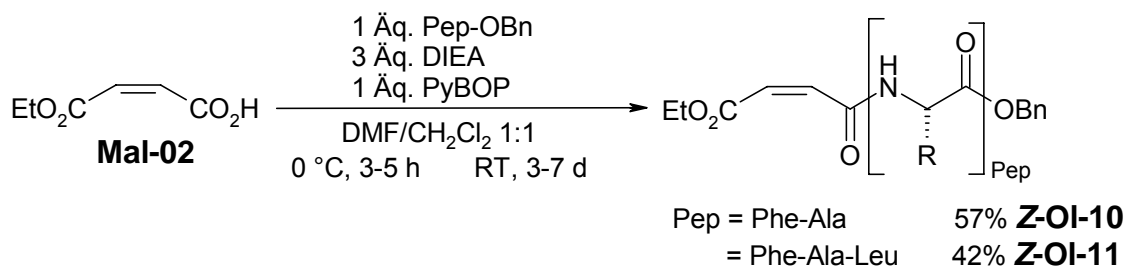


Abb. 3-51: PyBOP-vermittelte Segmentkupplungen an Monoethylmaleat

Eine andere Möglichkeit der Verknüpfung von Monoalkylmaleaten mit Aminosäuren ist die Steglich-Veresterung mit Aminoalkoholen. Dabei wird keine Amid- sondern eine Esterbindung zwischen dem Maleat und dem Aminosäurealkohol ausgebildet. Durch diese Art der Verknüpfung, bei der die Aminosäurekomponente in umgekehrter Richtung an die elektrophilen Bausteine angeknüpft wird, soll eine Aussage über die Relevanz der Richtung der Peptidkette in Bezug auf die Hemmwirkung erhalten werden.

Durch eine Steglich-Veresterung zwischen Monoethylmaleat **Mal-02** und *N*-Boc-geschütztem Phenylalaninol **Phe-ol-02** (vgl. Abb. 3-28) wird der Vinylester **Z-OI-07** aufgebaut (Abb. 3-52).

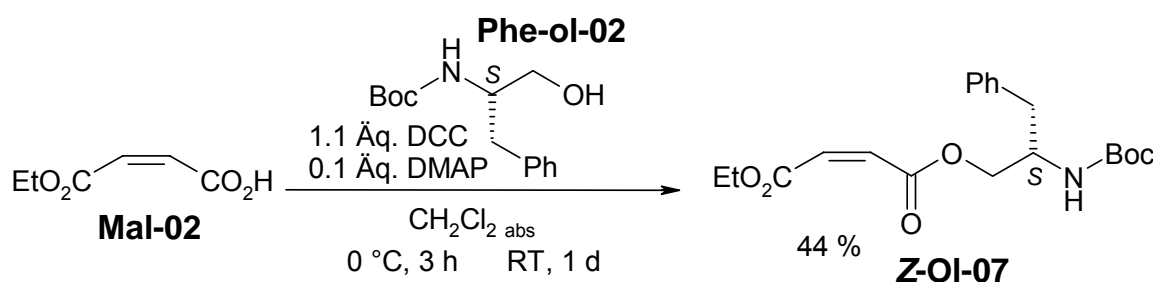


Abb. 3-52: Steglich-Veresterung zum „invers“ gekoppelten Vinylester

Eine zu **Z-OI-03** ähnliche Verbindung stellt das Maleinsäure-Derivat **Z-OI-05** dar, das durch Triethylamin-induzierte nucleophile Addition von Phenylalaninbenzylester an Maleinsäureanhydrid erhalten wird.

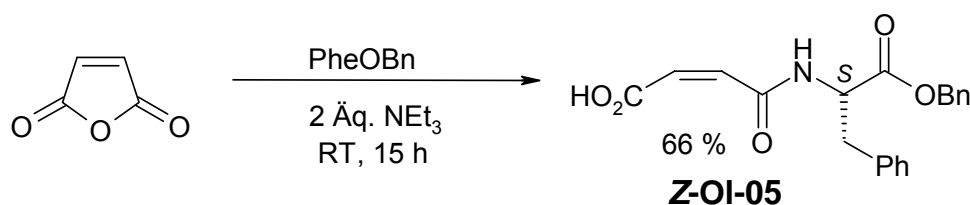


Abb. 3-53: Öffnung von Maleinsäureanhydrid zum Vinylamid **Z-OI-05**

Der Unterschied der Verbindungen **Z-OI-03** und **Z-OI-05** besteht im Austausch des Ethylesters gegen eine Säurefunktion. Dadurch stellt **Z-OI-05** eine interessante Startverbindung für die weitere PyBOP-vermittelte Kupplung von Aminosäuren und Peptiden dar. Interessant deshalb, weil so an der einen Seite des Michael-Systems die P1-spezifische hydrophobe Aminosäure Phenylalanin sitzt und durch Variation der Aminosäuren bzw. Peptidsequenzen an der zweiten Seite die Affinität zum Enzym untersucht werden kann.

PyBOP-Kupplung von verschiedenen AS und Peptiden an **Z-OI-05** erbrachte die in Abbildung 3-54 dargestellten Maleinsäurediamide.

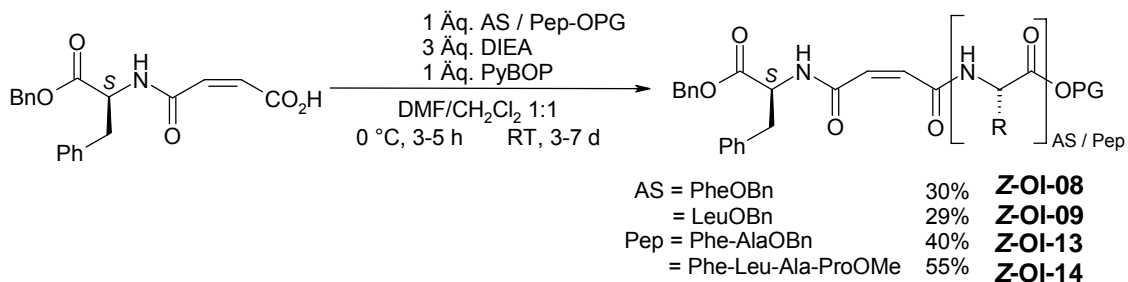


Abb. 3-54: PyBOP-katalysierte AS- / Peptidkupplungen an Z-OI-05

3.4.5.2 Wittig- / HWE-Reaktionen

Neben den Peptidkupplungen an Maleate, durch die Vinylamide entstehen, stellen auch die Wittig- und die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen (HWE-Reaktionen) einen Syntheseweg zu Z-konfigurierten Peptidyl-Olefinen dar.

Durch die Reaktion eines Aminosäurealdehyds mit einem Wittig- bzw. HWE-Reagenz werden Doppelbindungssysteme mit Allylaminstruktur aufgebaut. Zwei der drei dabei erhaltenen Olefine dienen auch als Vorstufen für Epoxide (vgl. Abb. 3-41).

In Analogie zur Wittig-Reaktion des *N*-Boc-Cyclohexylalaninal^[161] wird das durch DIBALH-Reduktion aus seinem Methylester dargestellte *N*-Boc-Phenylalaninal^[111] mit dem Wittig-Reagenz Isoamyltriphenylphosphoniumbromid unter Basenkatalyse mit Kalium*tert*butanolat umgesetzt. Durch die Reaktionsführung bei niedrigen Temperaturen (-10 °C) wird die Reaktion in Richtung des Z-Olefins gesteuert und ein *Z*/*E*-Verhältnis von 17 / 1 erreicht. Nach Säulenchromatographie wird das Z-konfigurierte Alkyl-Olefin **Z-OI-02** in einer Ausbeute von 31% erhalten.

Z-OI-02, dessen Synthese in Abbildung 3-55 dargestellt ist, trägt neben dem Benzyl-Rest eine dem Valin analoge Isopropyl-Seitenkette und somit auf beiden Seiten hydrophobe Substituenten. Allerdings weist die Verbindung nur eine isolierte Doppelbindung und kein elektronenarmes Michael-System auf.

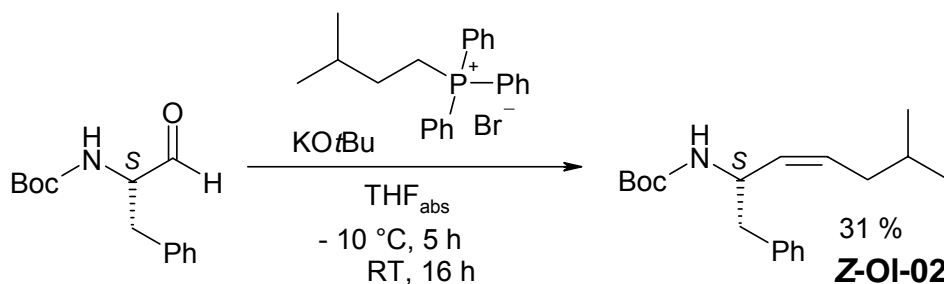


Abb. 3-55: Wittig-Kupplung zu Z-OI-02

Durch Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung^[162,163] nach der Ando-Methode mit Ethyl(diphenylphosphono)acetat^[164] erhält man aus *N*-Boc-Phenylalaninal^[111] mit hoher *Z*-Selektivität (13 / 1) den vinylogenen Phenylalaninylester **Z-OI-01**. Als Base bei dieser Tieftemperatur-Reaktion (-78 °C) dient 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und zur Aktivierung wird Natriumiodid eingesetzt (Abb. 3-56).

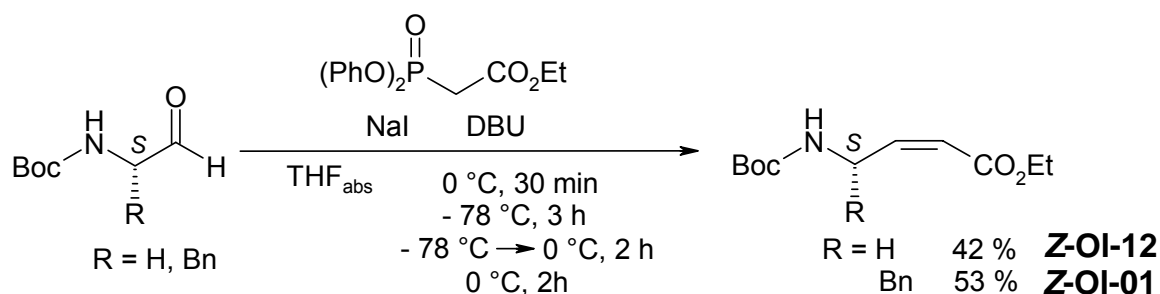


Abb. 3-56: Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung

Die analoge Reaktion mit *N*-Boc-Glycinal^[165] liefert nach anschließender säulenchromatographischer Trennung den Boc-geschützten Aminobut-2-ensäureethylester **Z-OI-12** in 42% Ausbeute (vgl. Abb. 3-56). Das *Z*/*E*-Verhältnis beträgt dabei durch den viel geringeren sterischen Anspruch des beteiligten Aminoaldehyds nur noch 2.5 / 1.

Abbildung 3-57 zeigt die TFA-Entschützung und anschließende PyBOP-Kupplung des vinylogenen Allylaminolesters **Z-OI-12** mit Boc-*L*-PheOH zu dem mit Phenylalanin verknüpften *Z*-Allylaminolester **Z-OI-15**.

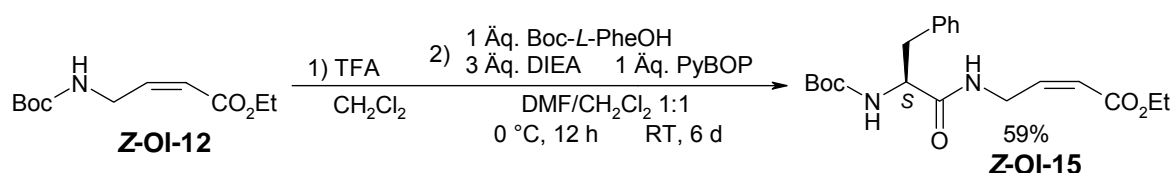


Abb. 3-57: PyBOP-Kupplung von Boc-*L*-PheOH an den vinylogenen Allylaminolester **Z-OI-12**

3.4.6 Aminosäure-verknüpfte *E*-Olefine

Wegen der höheren Triebkraft zur Bildung der thermodynamisch günstigeren *E*-Konfiguration sind *E*-Olefine mit elektrophilen Michael-Systemen noch besser zugänglich.

3.4.6.1 *E*-Olefine mit Vinylamidstruktur

E-Olefine mit Vinylamidstruktur sind in einfacher Weise aus Crotonsäure-, Fumarsäure- und Zimtsäureestern darstellbar. Laut Literatur^[160] bieten *E*-konfigurierte Vinylamide den Vorteil, dass aus ihnen durch direkte Aziridinierung mittels Diaziridinen selektiv *cis*-Aziridine darstellbar sind.

Die in der nachfolgenden Abbildung gezeigten *E*-konfigurierten Vinylamide **E-OI-02** und **E-OI-04** sollten daher auch als Vorstufen zur Darstellung von *cis*-Aziridinen dienen (vgl. Abb. 3-48).

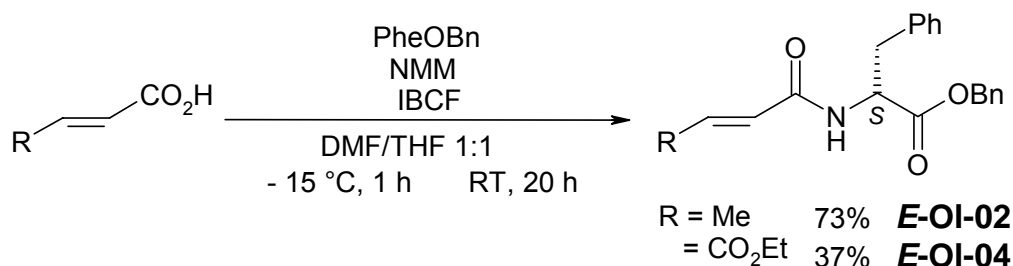


Abb. 3-58: Synthese von E-OI-02 und E-OI-04 über unsymmetrische Anhydride

E-OI-04 stellt außerdem das *E*-Analogon zu **Z-OI-03** dar, so dass damit der Einfluss der *Z/E*-Konfiguration auf die Hemmung der SAP2 untersucht werden kann.

Ein weiteres *E*-konfiguriertes Olefin ist das symmetrische Fumarsäurediamid **E-OI-05**. Mit dem *E*-Analogon zu **Z-OI-08** sollte ebenfalls geklärt werden, ob, wie angenommen, die *Z*-Konfiguration der Olefine für die Hemmwirkung an der SAP2 entscheidend ist.

Ausgehend von Fumarsäure schlagen die Kupplung über die unsymmetrischen Anhydride (vgl. Abb. 3-22) sowie die hochreaktive PyPOB-Kupplungsmethode (vgl. Abb. 3-24), die für die Darstellung von **Z-OI-08** genutzt wurde, fehl. Erst die Reaktion von Fumaryldichlorid mit zwei Äquivalenten PheOBn liefert das gewünschte Diamid **E-OI-05**.

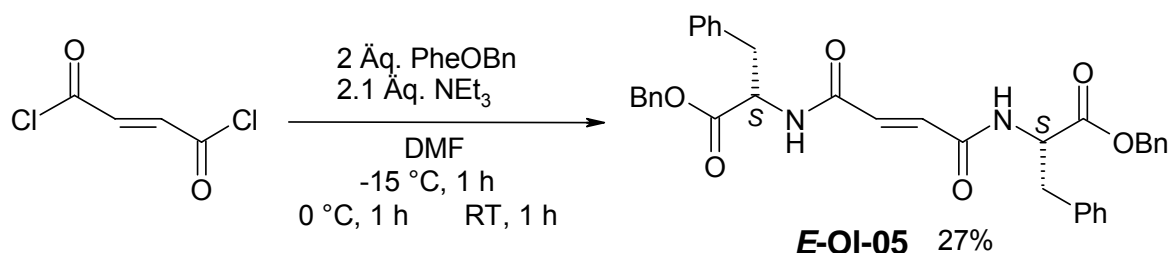


Abb. 3-59: Synthese des Diamids E-OI-05 aus Fumaryldichlorid

3.4.6.2 *E*-Olefine mit Vinylethoxycarbonyl- und Allylaminstruktur

Da über Cromwell-Synthese (vgl. Abb. 3-5) aus *E*-konfigurierten Olefinen im Überschuss *cis*-Aziridine darstellbar sind, sollten aus den hier angeführten *E*-Olefinen mit Vinylethoxycarbonyl- (**E-OI-01**) und Allylaminstruktur (**E-OI-03**) *cis*-Aziridine mit veränderter Grundstruktur aufgebaut werden (vgl. Abb. 3-49).

Durch Reaktion des nach Literaturangaben^[166] aus Acrolein, Schwefelsäure und Wittigsalz dargestellten Alkohols (*E*)-5-Hydroxypent-2-ensäureethylester mit dem aus Phosphorpentachlorid und *Z*-*L*-PheOH dargestellten Säurechlorid^[167] erhält man in einer Ausbeute von 36% das Phenylalanin-verknüpfte **E-OI-01** mit Vinylethyloxycarbonylstruktur.

Durch Reaktion von kommerziell erhältlichem 4-Bromcrotonsäureethylester mit der AS PheOBn unter Basenkatalyse mittels Kaliumcarbonat wird **E-OI-03**, ein AS-verknüpftes *E*-Olefin mit Allylaminstruktur, erhalten.

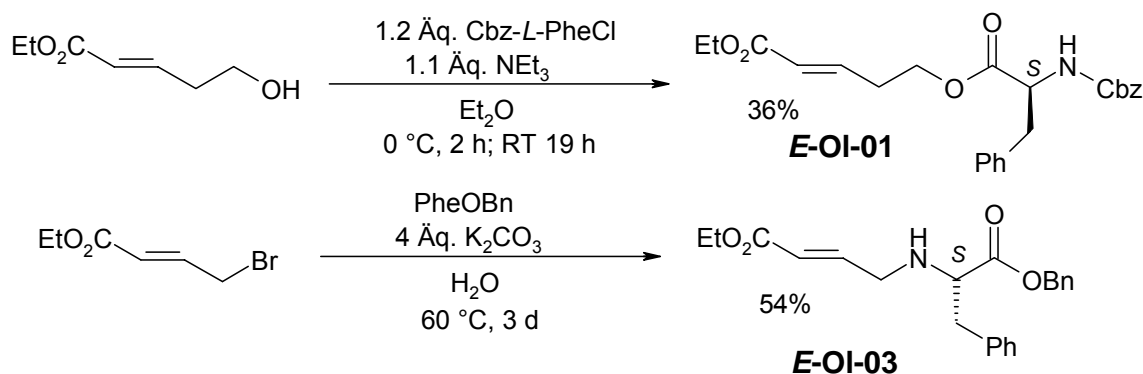


Abb. 3-60: *E*-Olefine **E-OI-01** und **E-OI-03** mit Strukturvariation

3.4.7 Aminosäure-verknüpftes Bernsteinsäurederivat

Um neben dem Einfluss der *Z*/*E*-Konfiguration auf die Hemmung der SAP2 auch zu beweisen, dass die Doppelbindung essentiell für die Hemmung ist, wurde das zu **E-OI-04** und zu **Z-OI-03** analoge Bernsteinsäurederivat **BSS-01** dargestellt.

Ausgehend von Bernsteinsäurediethylester wird zuerst das Monokaliumsalz durch milde, basenkatalysierte Monohydrolyse mittels ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung dargestellt. Dessen anschließende DPPA-Kupplung mit PheOBn führt in einer Ausbeute von 41% zum Phe-verknüpften Bernsteinsäurederivat **BSS-01** (Abb. 3-61).

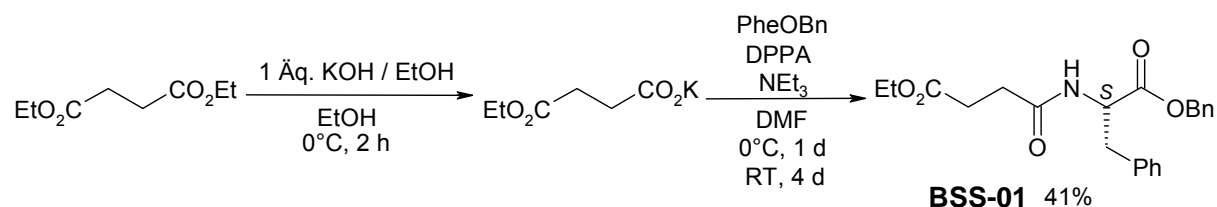


Abb. 3-61: DPPA-Kupplung zum Phe-verknüpften Bernsteinsäurederivat **BSS-01**

3.5 Biotin-Markierung von Flavophospholipol

Mit Biotin markierte Substanzen finden in der biologischen und biochemischen Diagnostik sehr häufig Anwendung als „affinity labels“.^[168]

Zur Untersuchung der Bindung von Flavophospholipol (FPL), Synonym Moenomycin A oder Bambermycin, an die Penicillin-Bindeproteine von *Enterococcus faecium* sollte die Substanz mit Biotin markiert werden.

Das Phosphoglycolipidantibiotikum Flavophospholipol (FPL), das in der Tiermast als Leistungsförderer für die Aufzucht von Schweinen, Kälbern und Geflügel eingesetzt wird und aus *Streptomyces bambergiensis* isoliert wurde,^[169] besteht aus einer Oligosaccharidkette, die über eine Phosphorsäure-Diester-Bindung an den C₂₅-Alkohol Moenicol gebunden ist (Abb. 3-62).^[170]

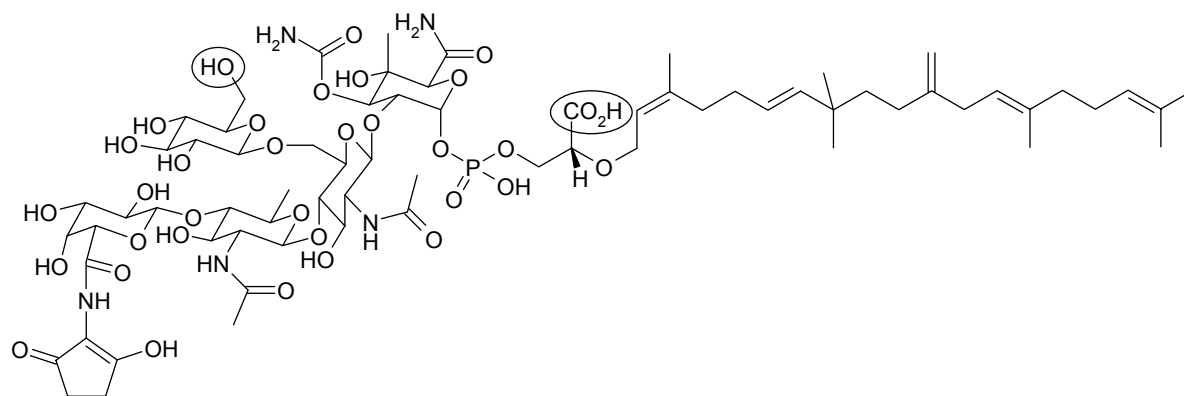


Abb. 3-62: Struktur von Flavophospholipol

Die zwischen dem Alkohol und dem Phosphorsäure-Diester liegende Säurefunktion (vgl. Abb. 3-62) bietet die Möglichkeit, Biotin mittels Spacer an das FPL zu knüpfen.

Auf dem Weg zum Biotin-markierten FPL wurde zuerst Boc-monogeschütztes 1,6-Hexandiamin an *D*-Biotin gekuppelt.^[171,172] Als Kupplungsreagenz diente, anders als in der Literatur angegeben, das Uronium-Reagenz PyBOP (vgl. Abb. 3-24). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde die Verbindung Bio-(Boc-HDA) (**A**) erhalten. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure und anschließende PyBOP-Kupplung mit FPL sollte die Biotin-markierte Substanz FPL-HDA-Bio (**B**) liefern. Die Auswertung des Reaktionsgemisches mittels Massenspektrometrie zeigte aber nur die $[M+H]^+$ -Peaks der beiden Edukte.

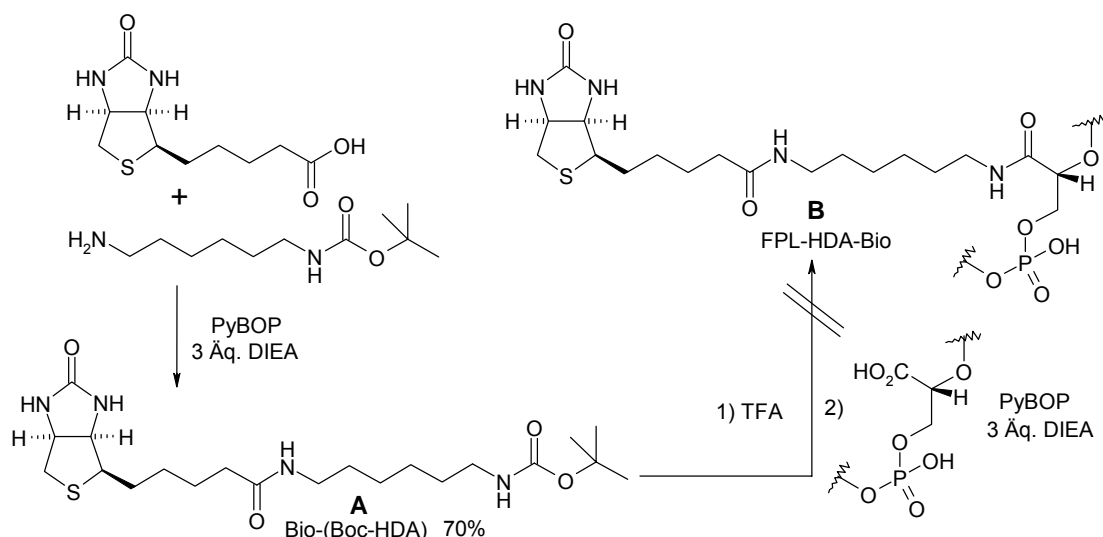


Abb. 3-63: Versuch zur Biotin-Markierung von FPL mittels Biotin-Hexandiamin

Der zweite eingeschlagene Weg (Abb. 3-64), der letztendlich auch zum Erfolg führte, verlief über das aus *D*-Biotin und Thionylchlorid dargestellte Bio-Cl (**C**).^[173] Mittels der sterisch anspruchsvollen Stickstoffbase Collidin, die laut Literatur^[174] selektiv die Acylierung primärer Alkohole in Gegenwart sekundärer Alkohole ermöglicht, sollte nun der einzige in der Oligosaccharidkette vorkommende primäre Alkohol (vgl. Abb. 3-62) mit dem Säurechlorid Bio-Cl zum Biotin-markierten FPL umgesetzt werden. Diesmal lieferte die Massenspektrometrie neben dem $[M+H]^+$ -Peak von FPL auch den für das Biotin-gekuppelte FPL (**D**). Die Trennung mittels präparativer HPLC (*Phenomenex* Synergi 4 μ Hydro RP 80A Säule (10 x 250 mm), isokratischer Lauf mit einem Puffergemisch aus 60% 10 mM Phosphatpuffer pH 8,0, 36% Acetonitril und 4% Methanol über 25 min, Fluß von 11 mL / min und UV-Detektion bei 215 nm) lieferte das gewünschte Bio-FPL (**D**) in einer Ausbeute von 15%

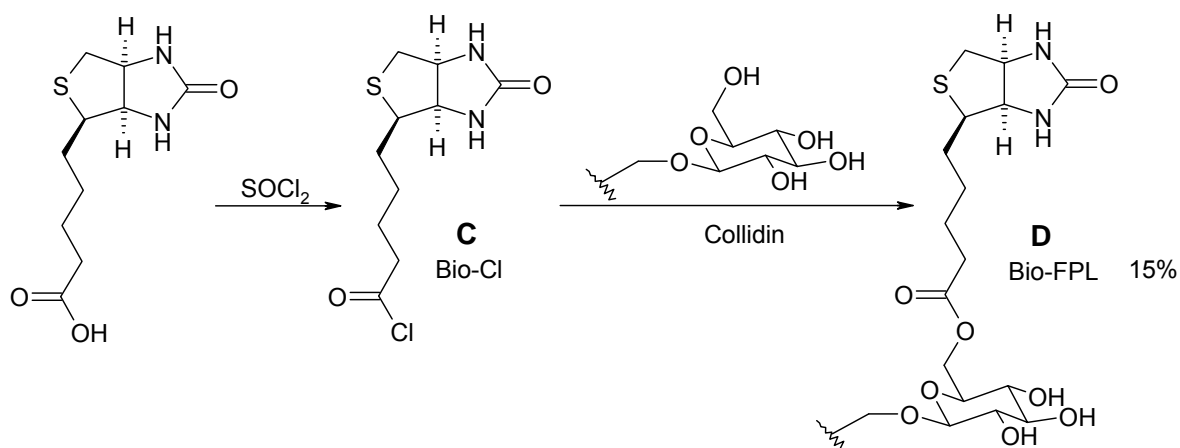


Abb. 3-64: Biotin-Markierung von FPL über das Säurechlorid Bio-Cl

4. Enzymassays

4.1 Einführung

Die *cis*-Aziridinyl- und -Oxiranyl-Peptide sollten aufgrund der elektrophilen Eigenschaften des Dreirings und ihrer Konfiguration in der Lage sein, mit einem Aspartat-Rest in aktivem Zentrum des Enzyms eine kovalente Bindung einzugehen und dadurch das Enzym irreversibel zu hemmen. Für die beiden Substanzklassen wird wegen ihrer Ähnlichkeit ein vergleichbarer Inaktivierungsmechanismus angenommen. Auch *Z*-Peptidylolefine sollten durch ihr α,β -ungesättigtes System Hemmstoffe für die Protease darstellen, da das Michael-System ein elektrophiles System ist, welches von einem der beiden Aspartat-Reste des aktiven Zentrums nucleophil angegriffen werden kann.

Durch den nucleophilen Angriff am Inhibitor wird das aktive Zentrum des Enzyms blockiert und das Enzym kann seine katalytische Funktion nicht mehr ausüben.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der Inhibitor zwar in das aktive Zentrum bindet, aber die Alkylierung aufgrund einer sterisch ungünstigen räumlichen Anordnung nicht möglich ist.

Methoden, um zwischen reversibler und irreversibler Hemmung unterscheiden zu können, sind die Dialyse, die Ultrafiltration oder die Gelfiltration. Ein reversibler Inhibitor wird bei Verringerung der Inhibitor-Konzentration wieder aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex abdissoziieren und das Enzym gewinnt seine Aktivität zurück. Allerdings haben diese Trennverfahren den Nachteil von Aktivitätsverlusten durch die Instabilität des Enzyms, weshalb immer ein Kontrollversuch ohne Inhibitor durchgeführt werden muss.

Der tryptische Verdau eines durch einen Inhibitor inaktivierten Enzyms und die anschließende LC-MS-Analyse der dabei entstehenden Enzymfragmente ist eine weitere Methode, um eine irreversible kovalente Bindung nachzuweisen. Hierbei kann außerdem genau festgestellt werden, welches Verdau-Bruchstück und somit welche katalytisch aktive AS durch den Inhibitor alkyliert wurde.

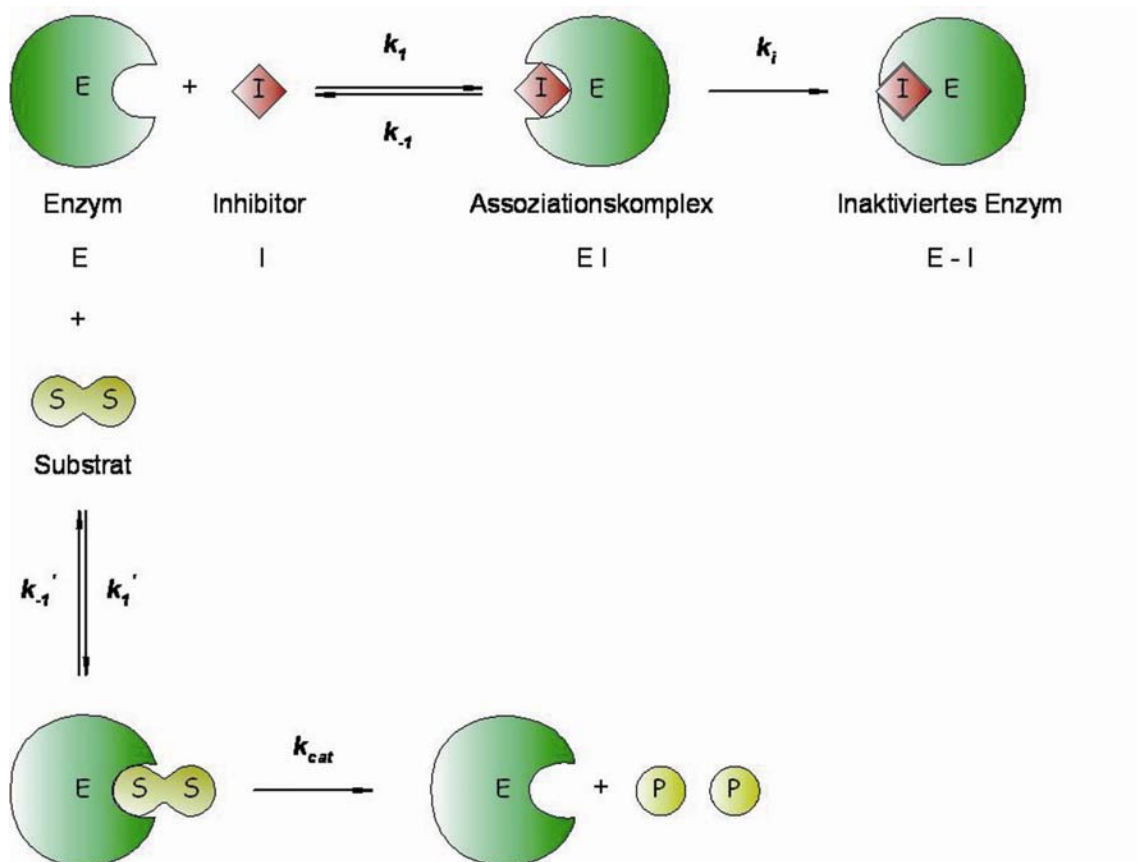
Einen Hinweis auf reversible oder irreversible Hemmung liefert auch die Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Hemmung. Bei reversibler, zeitunabhängiger Hemmung sinkt die Enzymaktivität durch Gleichgewichtseinstellung auf einen bestimmten Wert, der sich im Laufe der Messung dann nicht mehr ändert, vorausgesetzt es liegen steady-state-Bedingungen vor ($[S] \gg [E]$, d.h. eine Sättigung des Enzyms mit Substrat). Bei irreversiblen Inhibitoren sinkt die Enzymaktivität im Laufe der Zeit immer weiter ab, was bei einer Reaktion pseudo-erster Ordnung zu einem exponentiellen Verlauf führt. Ist jedoch der zweite

Reaktionsschritt, die Bildung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Addukts sehr langsam kann auch bei irreversiblen Inhibitoren eine nicht-zeitabhängige Hemmung beobachtet werden.

Um mit Sicherheit zwischen reversibler und irreversibler Hemmung unterscheiden zu können muss die „Art“ der Hemmung mit einer der oben genannten Methoden nachgewiesen werden.

4.2 Charakterisierung irreversibler Hemmung

Die irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats kann mit folgendem Reaktionsschema beschrieben werden:



Schema 4-1: Irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats

Der Inhibitor bildet mit dem Enzym einen Assoziationskomplex, der entweder wieder dissoziieren oder weiter zu einem inaktivierten Enzym reagieren kann. In Gegenwart eines Substrats kommt es gleichzeitig zur Konkurrenz des Substrats mit dem Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms.

Ein Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym ist die Michaelis-Konstante K_m , diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Bei definierten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) ist sie für ein Enzym-Substrat-Paar unabhängig von der Enzymkonzentration.^[175]

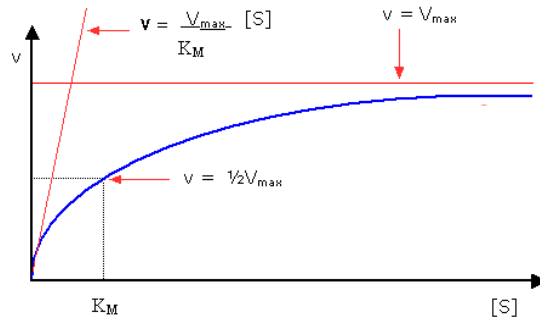


Diagramm 4-1 : Michaelis-Menten-Kinetik

Zusammen mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} , die etwas über die Geschwindigkeit der Umwandlung des Substrats in das Produkt aussagt, dient K_m zur Charakterisierung einer enzymatischen Reaktion.^[176]

Bei einem irreversiblen Inhibitor wird die Inaktivierung durch die Hemmkonstanten K_i , k_i , k_{2nd} beschrieben.^[176]

- K_i [M] = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt, als $K_i = [E][I] / [EI]$ oder $K_i = (k_{-1} + k_i) / k_1$ definiert ist, und ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor darstellt. Da der 2. Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist und k_i das Gleichgewicht zwischen Enzym-Inhibitor-Komplex [E-I] auf der einen Seite und freiem Enzym [E] und Inhibitor [I] auf der anderen Seite nicht beeinflusst, vereinfacht sich die Gleichung weiter zu $K_i = k_{-1} / k_1$.
- k_i [min^{-1}] = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms [E-I].
- k_{2nd} [$\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung des Enzyms. Sie berechnet sich zu $k_{2nd} = k_i / K_i$ und fasst die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor und die Inaktivierung zum Enzym-Komplex [E-I] zusammen. Je schneller die Inaktivierung, desto größer k_i und je besser die Affinität zum Enzym, desto kleiner ist die Dissoziationskonstante K_i , was zur Folge hat, dass ein großer k_{2nd} -Wert resultiert.

Aus dem Reaktionsschema für die irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats (Schema 4-1) ergibt sich die Gesamtkonzentration (Gl. I) an eingesetztem Enzym $[E_0]$ zu:

$$[E_0] = [E] + [EI] + [E-I] \quad \text{I}$$

$[E]$ → Konzentration an freiem Enzym, $[EI]$ → Konzentration an reversiblen Enzym-Inhibitor Komplex (noch potentiell aktives Enzym), $[E-I]$ → Konzentration an inaktiviertem Enzym.

Unter der Bedingung $[I] \gg [E_0]$ (Bedingungen pseudo-erster Ordnung) ist die Bildung der inaktiven Enzymform $[E-I]$ proportional zur Konzentration des reversiblen Komplexes $[EI]$ (Gl. II).

$$\frac{d[E-I]}{dt} = k_i [EI] \quad \text{II}$$

Im Assoziationskomplex $[EI]$ ist das Enzym noch nicht vollständig inaktiviert, so dass der Inhibitor durch einen Überschuss an Substrat wieder aus der Bindung mit dem Enzym verdrängt werden kann.

Das Enzym ist im Assoziationskomplex $[EI]$ also noch potentiell aktiv und kann zusammen mit dem freien Enzym $[E]$ zum aktiven Enzym $[E_a] = [EI] + [E]$ zusammengefasst werden.^[177]

Da die Gesamtkonzentration an Enzym $[E_0]$ aber konstant bleibt, entspricht die Bildung des inaktiven Komplexes $[E-I]$ der Abnahme an aktivem Enzym $[E_a]$. Durch Einsetzen in Gl. II folgt:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_i [EI] \quad \text{III}$$

Für die Gleichung der Dissoziationskonstanten $K_i = [E][I] / [EI]$ erhält man durch Einsetzen von $[E_a] = [EI] + [E]$ und Umformen die Gleichung für die Konzentration des Assoziationskomplexes $[EI] = [E_a] / (1 + K_i / [I])$.

Durch Einsetzen in Gl. III ergibt sich für die Abnahme der Enzymaktivität die Gleichung IV:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = \frac{k_i [E_a]}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{IV}$$

Integration über die Zeit t liefert (Gl. V):

$$\ln\left(\frac{[E_a]}{[E_0]}\right) = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{V}$$

Unter Steady-state-Bedingungen folgt die Abnahme der Enzymaktivität einer Kinetik pseudo-erster Ordnung ($\ln([E_a] / [E_0]) = -k_{obs} t$) mit k_{obs} als Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung, und es ergibt sich Gleichung VI und eine hyperbolische Funktion (Diagramm 4-2).

$$-k_{obs} t = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{VI}$$

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i + [I]}$$

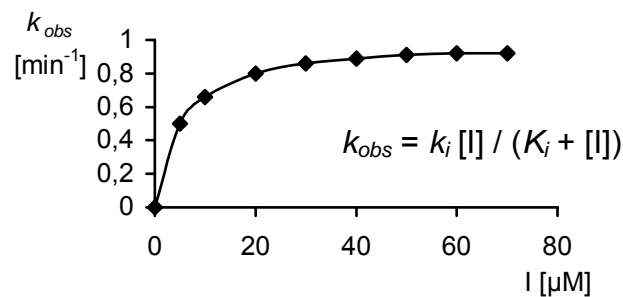


Diagramm 4-2 : k_{obs} gegen $[I]$ bei zeitabhängiger Hemmung unter Sättigungsbedingungen

Aus Gleichung VI ergibt sich, dass die Hemmkonstanten K_i und k_i unabhängig von der verwendeten Enzymkonzentration sind. Nach Ermittlung von k_{obs} -Werten für unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen können K_i und k_i durch nichtlineare Regression bestimmt werden.

Hemmkonstanten schlecht löslicher oder schnell reagierender Inhibitoren können nicht unter Sättigungsbedingungen $[I] \gg K_i$, sondern nur bei relativ niedrigen Inhibitorkonzentrationen unterhalb der Dissoziationskonstanten $[I] \ll K_i$ bestimmt werden. Gleichung VI vereinfacht sich dann zu Gleichung VII:

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i}$$

⇕

VII

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]}$$

Die Hemmkonstanten k_i und K_i können damit nicht mehr einzeln bestimmt werden, sondern es wird näherungsweise nur die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_{2nd} berechnet, die sich beim Auftragen von k_{obs} gegen $[I]$ aus der Steigung der erhaltenen Geraden ergibt.

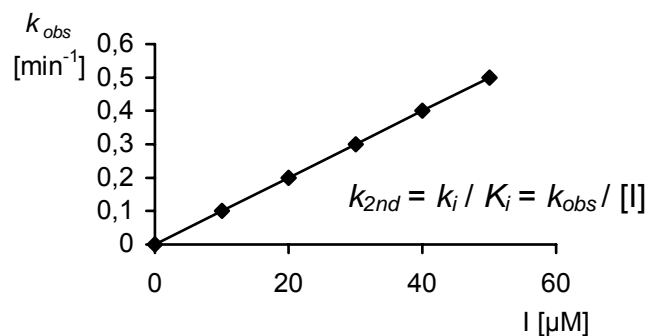


Diagramm 4-3 : k_{obs} gegen $[I]$ bei $[I] \ll K_i$; Bestimmung von k_{2nd}

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird -wenn kompetitive Hemmung vorliegt- jedoch nicht der wahre K_i -Wert, sondern nur die apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} bestimmt. Grund hierfür ist die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms, wodurch die Substratkonzentration $[S]$ und die Affinität des Substrats zum Enzym berücksichtigt werden müssen. Um den von diesen Faktoren unabhängigen K_i zu berechnen muss deshalb der Wert von K_{iapp} durch den Term $(1 + [S] / K_m)$ dividiert werden (Gl. VIII).

$$K_{iapp} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

VIII

Durch zwei verschiedene Methoden, einem kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou^[178] oder einem Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson^[177] können für unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen die k_{obs} -Werte ermittelt und so die Hemmkonstanten K_i , k_i und k_{2nd} bestimmt werden.

4.3 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou

Wird bei einer Mischung aus Inhibitor, Enzym und Substrat die zeitabhängige Produktzunahme gemessen, so nimmt die Zunahme des Produktes in Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors exponentiell ab und nähert sich so einer Produktkonzentration $[P_\infty]$ (Gl. IX).

$$[P_t] = [P_\infty] (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad \text{IX}$$

Voraussetzung dafür sind steady-state-Bedingungen. Um diese über die ganze Zeit der Messung (30 min) zu gewährleisten, müssen Inhibitor und Substrat in ausreichendem Überschuss vorliegen ($[I] \gg [E_0]$, $[S] \gg [E_0]$), damit die Abnahme der Aktivität auch tatsächlich auf die Reaktion mit dem Inhibitor zurückzuführen ist. Die Umsatz-Zeit-Kurve des Enzyms mit dem Substrat muss über die gesamte Messzeit linear verlaufen. Es wird maximal 10% Abweichung von der Linearität toleriert.

Durch nichtlineare Regressionsanalyse mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit^{®[179]} werden für jede Inhibitorkonzentration die k_{obs} -Werte ermittelt. Trägt man diese gegen die Inhibitorkonzentration auf, so lassen sich gemäß Gl. VI, VII und VIII die Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} bestimmen.

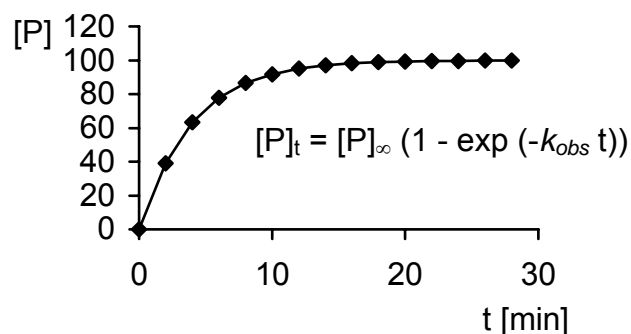


Diagramm 4-4 : Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays bei zeitabhängiger, irreversibler Hemmung; Bestimmung von k_{obs}

4.4 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson

Eine definierte Konzentration an Enzym wird mit einem 10-50-fachen Überschuss an Inhibitor ($[I] \gg [E_0] \Rightarrow$ Bedingungen pseudo-erster Ordnung) inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen (t_1-t_5) wird ein Aliquot aus der Inkubationslösung entnommen und nach Zugabe von Substrat die Restaktivität des Enzyms $[E_a]$ ($[E_1] - [E_5]$) bestimmt. Dieses Aliquot wird dabei vor Substratzugabe mindestens um den Faktor 4-5 verdünnt, um einer Hemmung durch nicht-kovalente Assoziation vorzubeugen.

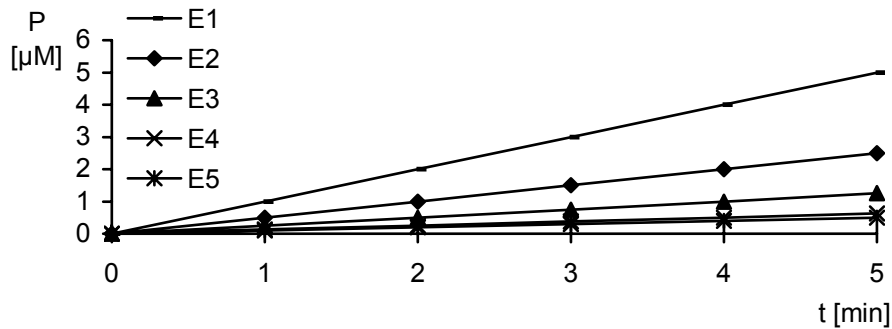


Diagramm 4-5 : Umsatz-Zeit-Diagramm bei irreversibler Hemmung, Rest-Enzymaktivität von zu verschiedenen Zeiten entnommen Aliquots

Durch Auftragung der Steigungen der erhaltenen Geraden gegen die gewählten Zeitabstände, wird eine abfallende Exponentialkurve ($[E_a] = [E_0] e^{-k_{obs} t}$) erhalten, aus der durch nicht-lineare Regression der k_{obs} -Wert für die eingesetzte Inhibitorkonzentration ermittelt werden kann.

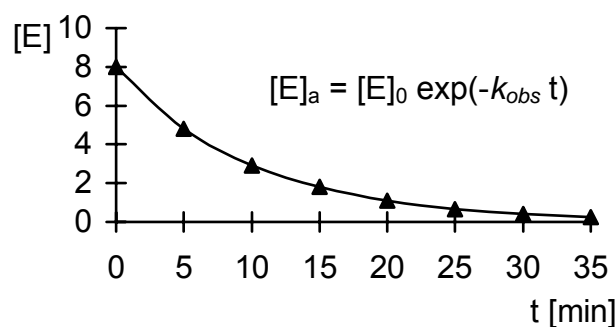


Diagramm 4-6 : Abfallende Exponentialkurve zur Ermittlung von k_{obs}

Der große Nachteil dieser Methode liegt im großen Zeitaufwand, da dieses Verfahren für mehrere Inhibitorkonzentrationen wiederholt werden muss, um k_{obs} gegen $[I]$ auftragen zu können.

4.5 Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Bei sehr langsamer Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor verläuft die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu linear, so dass es unmöglich ist, die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung zu bestimmen.

In diesem Fall wird, genauso wie bei reversibler Hemmung, für die Auswertung der Assays die Dixon-Gleichung **X** benutzt. ^[180]

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \mathbf{X}$$

v_i und v_0 sind die Enzymaktivitäten mit bzw. ohne Inhibitor, die durch Ermittlung der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurven in den ersten 10 min mit bzw. ohne Inhibitor bestimmt werden.

Durch Auftragung von v_0/v_i gegen $[I]$ wird der Dixon-Plot linearisiert und man kann aus der Steigung der erhaltenen Geraden den reziproken K_i -Wert erhalten.

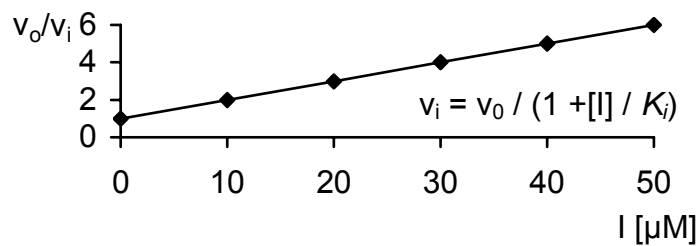


Diagramm 4-7 : Linearisierter Dixon-Plot bei zeitabhängiger Hemmung; Ermittlung von K_i

Der K_i -Wert kann auch durch nichtlineare Regression der v_i gegen $[I]$ -Kurve des Dixon-Plots ermittelt werden.

Auch bei der nicht-zeitabhängigen Hemmung kommt es bei kompetitiver Hemmung zu einer Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat, so dass die ermittelte apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} ebenfalls durch Division durch den Term $(1 + [S] / K_m)$ korrigiert werden muss. Der so erhaltene K_i -Wert ist im Gegensatz zum K_{iapp} -Wert, der bei kompetitiver Hemmung dem IC_{50} -Wert entspricht, unabhängig vom Substrat, dessen Konzentration und dem K_m -Wert.

4.6 Enzymatische Testungen an SAP2

4.6.1 Photometrischer Assay

Wie in Kapitel 2 erwähnt, waren für die Testungen an den SAPs zwar photometrische, jedoch sehr aufwändige Assays bekannt.^[34,36,97] Deshalb wurde versucht, zwei einfachere photometrische Assays, die zur Bestimmung von Hemmdaten an der zu den SAPs verwandten Aspartat-Protease Pepsin bekannt waren,^[83,181,182] auf SAP2 zu übertragen.

Zur Testung an SAP2 wurden Verdünnungsassays nach Kitz und Wilson (vgl. Kapitel 4.4) durchgeführt. Das Enzym wurde dabei als Lösung eines sterilfiltrierten *Candida albicans*-Zellkultur-Überstandes aus der Infektionsbiologie erhalten, der laut Elektropherogramm nur SAP2 und sonst keine anderen Proteine enthält. Der *Candida albicans*-Zellkultur-Überstand wurde für den photometrischen Assay mit dem jeweils verwendeten Puffer so verdünnt, dass mit einem 100 μ L Aliquot für die Umsatz-Zeit-Kurve des Enzyms mit dem Substrat über die Messzeit eine maximale lineare Zunahme der Absorption ($\Delta A / \text{min} = 0.035$) erhalten wurde. Die Endkonzentration der Inhibitoren lag bei 100 μ M. Die Endkonzentrationen der Substrate sind in Tabelle 4-1 wiedergegeben. Der DMSO-Gehalt eines Ansatzes (Substrat und Inhibitoren sind in DMSO gelöst) lag bei maximal 13%.

Zur Kontrolle wurde jeweils zu Beginn und Ende der Messungen ein Ansatz ohne Inhibitor vermessen, um zu überprüfen, ob die Enzymaktivität am Ende der Messreihe noch erhalten war. Es wurden maximal 10% Aktivitätsunterschied toleriert.

Die beim Assay verwendeten Substrate, Puffer und Bedingungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 4-1: Substrate; Puffer und Bedingungen beim photometrischen SAP2-Assay

| Substrat (Endkonzentration) | Puffer | Bedingungen | Ref. |
|------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------|----------|
| Cbz-His-Phe(p NO ₂)-PheOMe (555 μ M) | CITRAT 4.0 | Temp: 37 °C λ : 310 nm | [83,181] |
| Leu-Ser-Phe(p NO ₂)-Nle-Ala-LeuOMe*TFA (350 μ M) | ACETAT 4.7 | Temp: 30 °C λ : 310 nm | [182] |

Puffer: CITRAT pH 4.0, 40 mM, NaCl 200 mM, Brij 35 0.005%;
ACETAT pH 4.7, 100 mM, Brij 35 0.005%.

Für jede Messreihe wurden 600 μ L des entsprechend verdünnten Zellkultur-Überstandes von *Candida albicans* und 120 μ L Inhibitor inkubiert und im Abstand von jeweils 15 min Aliquots von 120 μ L entnommen. Nach Verdünnen der Aliquots mit 680 μ L Puffer, 50 μ L DMSO und Zugabe von 50 μ L Substrat wurde die Absorptionzunahme durch das bei der Substratspaltung entstehende, einen p Nitro-Aromaten enthaltende Produkt 3 min lang photometrisch verfolgt. Diese Prozedur wurde für jeden Inhibitor fünfmal wiederholt.

Die Absorptionsunterschiede zwischen dem Substrat und den Spaltprodukten waren für beide Assays jedoch sehr gering. Sie lagen für das Tripeptid Cbz-His-Phe(pNO_2)-PheOMe, bei dem Cbz-His-Phe(pNO_2) frei wird, bei $\Delta\epsilon \approx 800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für das Hexapeptid Leu-Ser-Phe(pNO_2)-Nle-Ala-LeuOMe und sein Fragment Leu-Ser-Phe(pNO_2) bei $\Delta\epsilon \approx 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Durch diese geringen Absorptionsunterschiede konnte mit diesen Assays nur für den hochpotenten, als Standard eingesetzten Aspartat-Protease-Inhibitor Pepstatin A (vgl. Abb. 1-7) eine Hemmung festgestellt werden. Der dabei für die reversible Hemmung der SAP2 durch Pepstatin A festgestellte IC_{50} -Wert lag mit 41.4 nM in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten ($IC_{50}(\text{SAP2}) = 17 \text{ nM}$).^[36]

4.6.2 Fluorimetrischer Assay

4.6.2.1 Entwicklung

Da die photometrischen Assays wegen ihrer Unempfindlichkeit nicht geeignet waren, sollte nun ein fluorimetrischer Assay zur Testung auf die inhibitorische Aktivität der peptidischen Verbindungen an dem von *Candida albicans* am besten exprimierten Isoenzym SAP2 entwickelt werden. Ein für die SAP2 bereits bekannter, jedoch sehr kostspieliger fluorimetrischer Assay^[98] diente dabei als Vorlage für die Entwicklung eines einfach durchführbaren und relativ kostengünstigen fluorimetrischen Assays.

Beim eingesetzten FRET-Assay (FRET = fluorescence resonance energy transfer) wird ein Substrat verwendet, das am einen Ende einen Fluoreszenz-Donor und am anderen Ende einen Fluoreszenz-Akzeptor trägt. Der Akzeptor absorbiert bei derselben Wellenlänge, bei der der Donor fluoresziert. Im intakten Substrat befinden sich beide Gruppen in einem bestimmten Abstand zueinander, wodurch es zum „inneren“ Quenching kommt. Spaltung des Substrats durch das Enzym führt zur Aufhebung des „Quenchingabstandes“ und so zur Fluoreszenz durch den Fluoreszenz-Donor (vgl. Abb. 4-1). Je mehr Substrat gespalten wird, desto höher steigt die messbare Fluoreszenz.

Für den Assay wurden zwei verschiedene FRET-Substrate, die mit dem Akzeptor-Donor-Paar Dabcyl / EDANS versehen waren, getestet. Eines davon ist das markierte Undecapeptid Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH, das vom besten bisher bekannten SAP2-UV-Substrat^[97] abgeleitet wurde. Beim zweiten FRET-Substrat handelt es sich um ein vom Substrat des kostspieligen fluorimetrischen Assays^[23,98] abgeleitetes und mit Dabcyl / EDANS versehenes 13 AS umfassendes Peptid mit der Sequenz Dabcyl-Arg-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Leu-Val-Ile-His-Thr-Glu(EDANS)-ArgOH.

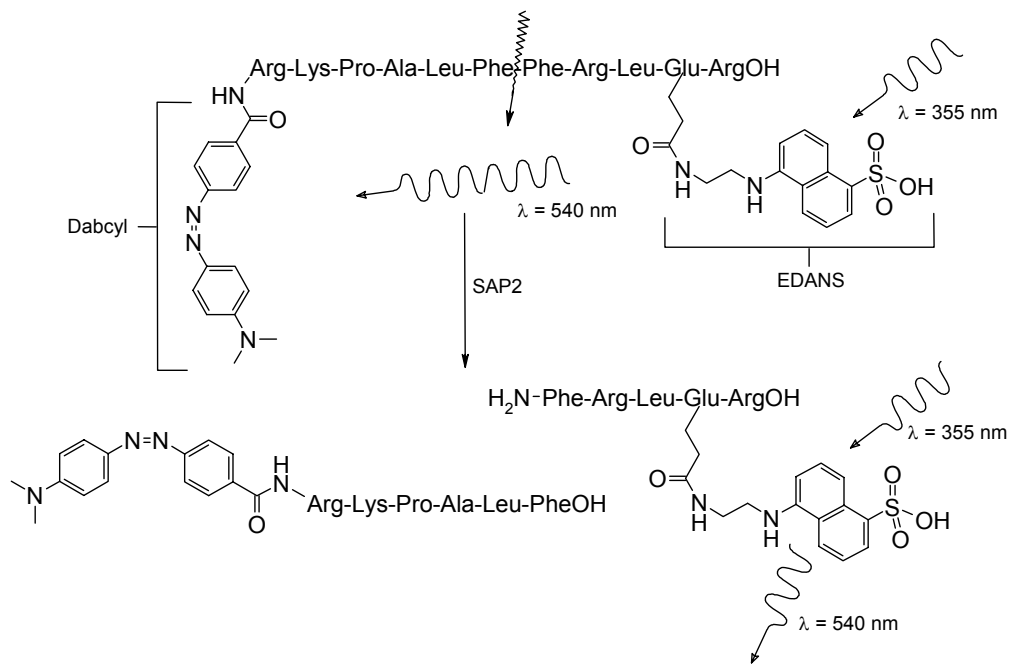


Abb. 4-1: Prinzip des FRET-Assays am Beispiel des verwendeten SAP2-Substrats

Für den Assay wurde analog zum photometrischen Assay die Lösung eines sterilfiltrierten *Candida albicans*-Zellkultur-Überstandes verwendet.

Zur Ermittlung der besten Assaybedingungen wurden am Fluorimeter Messungen mit unterschiedlichsten Konzentrationen der beiden Substrate und unterschiedlichsten Verdünnungen des SAP2 enthaltenden *Candida albicans*-Zellkultur-Überstandes durchgeführt. Da die Enzymaktivität temperaturabhängig ist, wurde auch bei verschiedenen Temperaturen (25, 30, 33 und 37 °C) gemessen.

Bei den Ermittlungen der besten Assaybedingungen waren Substrat und Inhibitoren immer in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und die maximale DMSO-Konzentration betrug pro Ansatz 10%. Um einer Denaturierung und somit einem Aktivitätsverlust des Enzyms vorzubeugen wurden die DMSO-Lösungen immer zuletzt zugegeben. Das Endvolumen der Assays betrug 200 µL (190 µL 50 mM Natriumcitrat-Puffer pH 3.2 und 10 µL DMSO).

Aus einer Vielzahl von Messungen wurden schließlich die nachfolgend angeführten besten Assaybedingungen ermittelt.

Tab. 4-2: Beste Assaybedingung für FRET-Assay an SAP2

| | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Substrat | Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 μ M K_m (SAP2): 28.7 μ M |
| Enzym | *SAP2 (10 μ L verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand) |
| Bedingungen | CITRAT 3.2 Ex: 355 nm / Em: 540 nm Temp.: 30 °C Inkubation E + I verschied. min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe |

* Verdünnung eines *C. albicans*-Zellkultur-Überstandes, so dass mit 10 μ L im Assay eine Steigung von $\sim 20 \Delta F / \text{min}$ erhalten wird;
Puffer: CITRAT pH 3.2, 50 mM, NaCl 50 mM; | | markiert die Spaltstelle.

Neben den günstigsten Assaybedingungen wurde auch die Spaltstelle im FRET-Substrat durch die SAP2 ermittelt. Dazu wurden 5 μ L Substrat und 20 μ L SAP2 enthaltender *Candida albicans*-Zellkultur-Überstand in 500 μ L Puffer für 20 min inkubiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die MS-Analysen zeigten, dass das Substrat von der SAP2 zwischen den beiden hydrophoben aromatischen AS Phe gespalten wird. In ganz geringen Spuren lässt sich auch eine Spaltung zwischen Leu und Phe erkennen.

Desweiteren wurde für den neuentwickelten Assay die Michaelis-Konstante K_m für das SAP2-Substrat bestimmt.

Bei gleicher Enzymkonzentration wurden dafür je drei Messungen bei 7 unterschiedlichen Substratkonzentrationen (7.5 bis 112.5 μ M) durchgeführt und daraus die Mittelwerte der initialen Umsatzgeschwindigkeiten über die ersten 10 min ermittelt. Aufgrund des sogenannten inneren Filtereffektes beim FRET-Assay, unter dem man das Phänomen versteht, dass schon bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen die Fluoreszenz des gespaltenen Produkts durch das noch intakte Substrat deutlich reduziert wird, mussten die erhaltenen Werte korrigiert werden. Zur Korrektur wurde der Fluoreszenzdonor EDANS (100 μ M) alleine und mit den vorher verwendeten Substratkonzentrationen unter analogen Assaybedingungen ohne Enzym für 10 min inkubiert und die Fluoreszenz bestimmt.^[183] Die aus den wiederum 3-mal durchgeführten Messungen erhaltenen Mittelwerte bei den verschiedenen Substratkonzentrationen wurden auf die Referenz bezogen und so ein Korrekturfaktor bestimmt. Nach Korrektur der vorher erhaltenen Werte der Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Substratkonzentrationen mit dem ermittelten Faktor konnte der K_m -Wert des FRET-Substrats für SAP2 durch nichtlineare Regression mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit[®] bestimmt werden (Diagramm 4-8). Der berechnete K_m -Wert beträgt $28.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$.

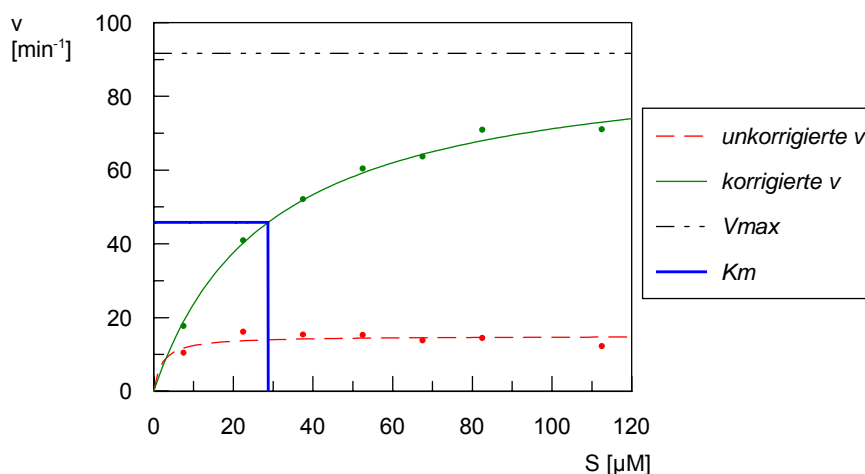


Diagramm 4-8: Korrektur des inneren Filtereffekts zur Ermittlung der Michaelis-Konstante K_m des FRET-Substrates von SAP2

4.6.2.2 Screening

Zur Ermittlung der Aktivität der peptidischen Verbindungen an der SAP2 wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen (vgl. Tab. 4-2) durchgeführt.

Bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz durch selbstgebaute Heizeinheit, bestehend aus Aluminiumplatte, Heizfolie mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) wurde in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc®) die Zunahme der Fluoreszenz durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrates mit Hilfe eines Fluorimeters bei 540 nm detektiert (Anregung 355 nm). Pro Ansatz wurden 10 μ L eines soweit verdünnten *C. albicans*-Zellkultur-Überstandes eingesetzt, dass im Assay über 20 min eine lineare Zunahme der Fluoreszenz von $\sim 20 \Delta F / \text{min}$ erhalten wird. Die Endkonzentration des Substrats lag bei 37.5 μ M und die der Inhibitoren bei 100 μ M. Der Assay wurde in 190 μ L 50 mM Natriumcitrat-Puffer pH 3.2 mit 10 μ L DMSO durchgeführt. Zuerst wurde die Enzymlösung (10 μ L) mit Puffer (35 μ L) vermischt und nach Zugabe der DMSO / Inhibitor-Lösungen (5 μ L) und kräftigem Durchmischen 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit Puffer (145 μ L) verdünnt, Substrat (5 μ L) zugegeben, erneut gemischt und die Fluoreszenzänderung über 20 min gemessen. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz durchgeführten vier Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden (Diagramme 4-9).

Neben den eigenen Verbindungen wurden der als Standard eingesetzte, reversible Aspartat-Protease-Inhibitor Pepstatin A und der relativ schwache, jedoch irreversible Inhibitor EPNP (vgl. Abb. 1-14) vermessen.

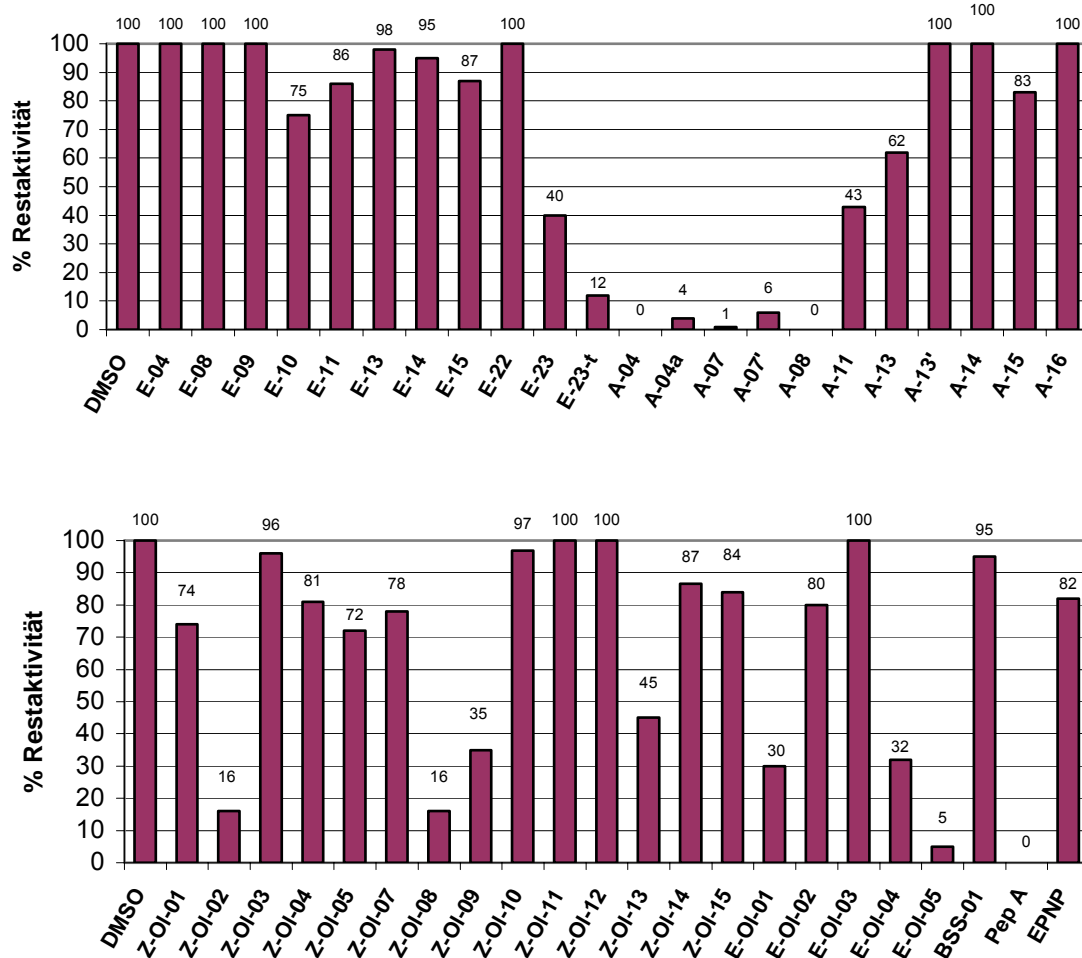


Diagramme 4-9: Hemmung der SAP2 im Screening ([I] = 100 μ M; 5 min Inkubation E + I)

Das Screening zeigt für einige der Verbindungen, vor allem für eine Reihe von Aziridinen, eine vollständige Hemmung der SAP2 bei der verwendeten Inhibitorkonzentration von 100 μ M. Auch zwei der getesteten Epoxide sowie mehrere *Z*- und auch *E*-konfigurierte Olefine weisen eine gute Hemmung der Aspartat-Protease SAP2 auf.

Wegen der kurzen Messdauer von nur 20 min konnte für keine der Substanzen eine zeitabhängige Hemmung anhand des Messkurvenverlaufs festgestellt werden.

4.6.2.3 Ermittlung der Hemmkonstanten mittels FRET-Assay

Von den Verbindungen, die im Screening eine Hemmung > 50% aufwiesen, wurde zum einen eine analoge Messung nach einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt und zum anderen wurden genaue Hemmkonstanten bestimmt:

IC₅₀-Werte nach verschiedenen Inkubationszeiten

k_i , K_i und k_{2nd} -Werte

Unter zum Screening analogen Bedingungen (Temperatur, Puffer, Volumina, Detektion, Substrat- und Enzymkonzentration; vgl. Kapitel 4.6.2.2) wurde ein Verdünnungsassay durchgeführt. Diese aufwändigere Assay-Methode wurde gewählt, da die Enzym-Substrat-Kurve nur über 20 min linear verlief und so mit einem kontinuierlichen Assay keine Möglichkeit gegeben war, die für die Inhibitoren erwartete irreversible und damit zeitabhängige Hemmung nachzuweisen.

Der Test bei gleicher Inhibitorkonzentration ($[I] = 100 \mu\text{M}$) und längerer Inkubationszeit sollte einen ersten Hinweis auf die Zeitabhängigkeit der Hemmung geben. Bei irreversibler Hemmung sollte eine längere Inkubationszeit eine größere prozentuale Hemmung liefern.

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten wurde die Enzymaktivität bei sieben verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 und 100 μM bzw. 1 und 20 μM (für stärker hemmende Verbindungen) und bei drei verschiedenen Inkubationszeiten (5, 20 und 35 min) über 10 min gemessen. Als Nullkontrolle diente eine Lösung, die nur DMSO enthielt. Für jede Substanz wurden zwei Messungen durchgeführt.

Tabelle 4-3 fasst die IC₅₀-Werte zu verschiedenen Zeiten, sowie die k_{2nd} -Werte der Inhibitoren an der SAP2 (vgl. Kapitel 4.6.2.4), die mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit[®] ermittelt wurden, zusammen.

Bis auf die zwei Inhibitoren **Z-OI-08** und **Z-OI-09**, für die keine sichere Aussage über die „Art“ der Hemmung möglich ist, zeigen die höhere prozentuale Hemmung bei 30 min Inkubation und die mit längerer Inkubationszeit niedriger werdenden IC₅₀-Werte deutlich die Zeitabhängigkeit der Hemmung der Inhibitoren. Die Substanzen stellen somit irreversible Inhibitoren der SAP2 dar.

Für die irreversiblen Inhibitoren wurde neben den IC₅₀-Werten auch der k_{2nd} -Wert ermittelt, da er für die Beschreibung der Hemmstärke von Inhibitoren besser geeignet ist. Grund hierfür ist, dass er, anders als der IC₅₀-Wert, nicht von der Inkubationszeit, dem Substrat, der Substratkonzentration und dem K_m -Wert abhängig ist.

Für zwei der getesteten Verbindungen (**A-08** und **E-OI-01**) stellten die verwendeten Inhibitorkonzentrationen Sättigungsbedingungen ($[I] \gg K_i$) dar, so dass es möglich war, die

einzelnen Hemmparameter der zeitabhängigen Hemmung k_i (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung) und K_i (Dissoziationskonstante) zu bestimmen. Dies ermöglicht eine Aussage, ob die Hemmung aufgrund schneller Reaktion (großer k_i) oder hoher Affinität (kleine K_i) zustande kommt.

Tab. 4-3: IC_{50} - und k_{2nd} -Werte SAP2-aktiver Verbindungen

| Verb. | Hemmung [%] | | IC_{50} [μ M] | IC_{50} [μ M] | IC_{50} [μ M] | k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$] | k_i / K_i [min^{-1}] / [μ M] |
|-------------------------|-----------------------|------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| | bei [I] = 100 μ M | | | | | | |
| | 5 min* | 30 min* | 5 min* | 20 min* | 35 min* | | |
| E-23 | 60 \pm 5 | 88 \pm 5 | 82 \pm 6 | 88 \pm 7 | 40 \pm 7 | 1610 \pm 230 | |
| E-23-t | 88 \pm 4 | 100 | 58 \pm 5 | 31 \pm 2 | 30 \pm 4 | 9890 \pm 760 | |
| A-04 | 100 | 100 | 69 \pm 2 | 51 \pm 1 | 58 \pm 5 | 14030 \pm 3520 | |
| A-04a | 96 \pm 3 | 100 | 44 \pm 1 | 41 \pm 2 | 22 \pm 2 | 15180 \pm 2070 | |
| A-07 | 99 | 100 | 16 \pm 1 | 15 \pm 1 | 12 \pm 3 | 47955 \pm 529 | |
| A-08 | 100 | 100 | 16 \pm 1 | 17 \pm 3 | 11 \pm 1 | 56756 \pm 1150 | 0.021 / 0.37 |
| A-11 | 57 \pm 4 | 90 \pm 4 | 82 \pm 5 | 70 \pm 9 | 55 \pm 3 | 3320 \pm 425 | |
| Z-OI-02 | 84 \pm 5 | 95 \pm 4 | 83 \pm 2 | 33 \pm 5 | 37 \pm 4 | 6900 \pm 1840 | |
| Z-OI-08 | 84 \pm 3 | 88 \pm 3 | \S 102 \pm 4 | n.b. | n.b. | | |
| Z-OI-09 | 56 \pm 4 | 65 \pm 4 | \S 144 \pm 10 | n.b. | n.b. | | |
| Z-OI-13 | 55 \pm 3 | 64 \pm 3 | 129 \pm 14 | 37 \pm 5 | 10 \pm 1 | 2070 \pm 360 | |
| E-OI-01 | 70 \pm 2 | 100 | 68 \pm 4 | n.b. | 57 \pm 3 | 1285 \pm 230 | 0.023 / 17.9 |
| E-OI-04 | 68 \pm 3 | 93 \pm 3 | 67 \pm 10 | 54 \pm 5 | 18 \pm 2 | 6900 \pm 1610 | |
| E-OI-05 | 95 \pm 2 | 100 | 27 \pm 3 | 19 \pm 3 | 18 \pm 2 | 15870 \pm 1210 | |
| Pepstatin | 100 | n.b. | 0.042 \pm 0.006 ^a | | | | - / 0.0183 ^b |
| EPNP^c | 18 \pm 2 | 67 \pm 3 | > 100 | n.b. | n.b. | 1083 \pm 44 | |

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe;

\S keine zeitabhängige Hemmung beobachtet;

^a IC_{50} (SAP2) = 17.0 nM;^[36] ^b K_i (SAP2) = 6.0 nM;^[97] ^c k_{2nd} (Pepsin) = 2.22 $M^{-1} min^{-1}$.^[83]

4.6.2.4 Bestimmung der Hemmkonstanten

Im folgenden Kapitel sind exemplarisch verschiedene Diagramme dargestellt, anhand derer die Ermittlung der Hemmkonstanten veranschaulicht werden soll. Die Auswertung erfolgte mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit[®].

Das Umsatz-Zeit-Diagramm (Diagramm 4-10), bei dem auf der Y-Achse die Fluoreszenz-Intensität F und auf der X-Achse die Zeit t in min aufgetragen sind, zeigt noch einmal für einige Substanzen die Hemmwirkung im Screening ([I] = 100 μ M).

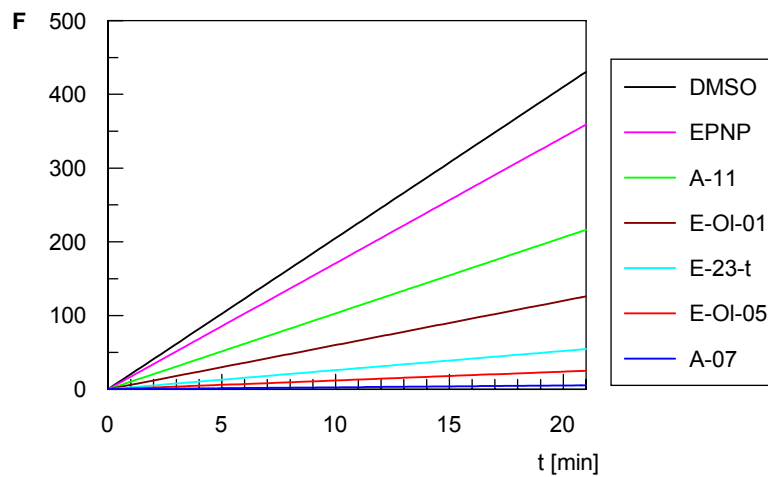


Diagramm 4-10: Umsatz-Zeit-Diagramme des SAP2-Screenings

Die in Tabelle 4-3 mit längerer Inkubationszeit sinkenden IC_{50} -Werte zeigen, wie schon erwähnt, die Irreversibilität der Hemmung. Diese Zeitabhängigkeit zeigt sich auch bei dem schwachen irreversiblen Inhibitor EPNP (Diagramm 4-11) am Absinken der Restaktivität im Laufe der Messzeit.

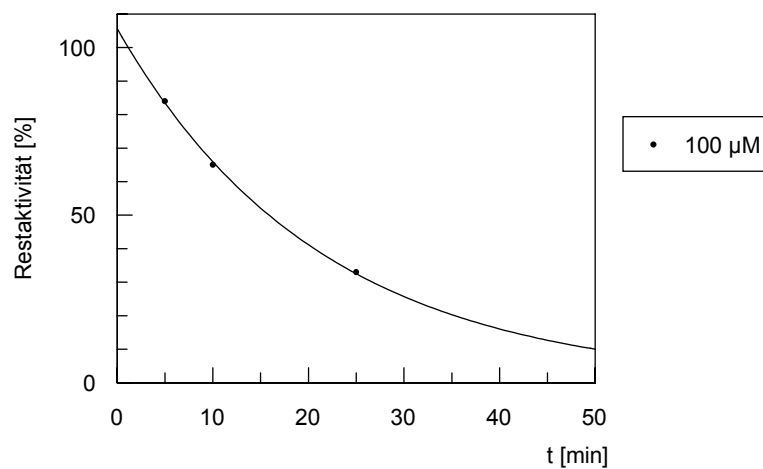


Diagramm 4-11: Zeitabhängige Hemmung der SAP2 durch EPNP ($[I] = 100 \mu\text{M}$)
(Vedünnungsassay)

Das folgende Diagramm zeigt neben der Zeitabhängigkeit auch den Einfluss der Inhibitorkonzentration auf die Hemmung der Aspartat-Protease SAP2.

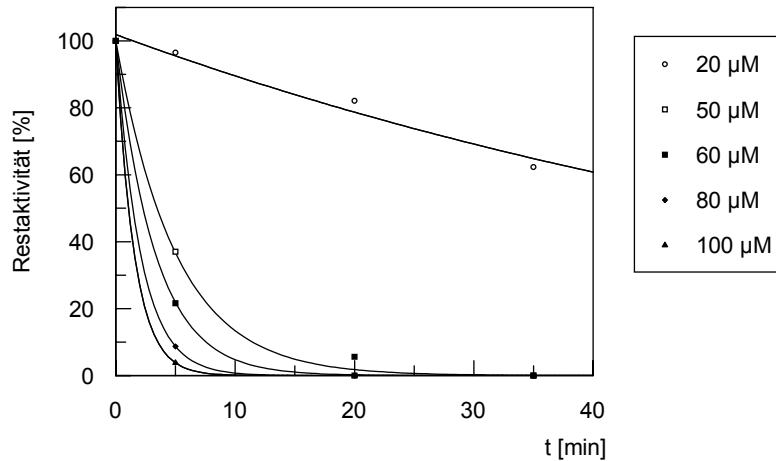


Diagramm 4-12: Zeitabhängige Hemmung der SAP2 durch A-04a bei unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen (Verdünnungsassay)

Durch Auftragung der Restaktivität (Y-Achse) gegen die Inhibitor-Konzentration (X-Achse) für die Messungen zu einer bestimmten Inkubationszeit (5, 20 oder 35 min) kann der IC_{50} -Wert bestimmt werden.

Da der IC_{50} -Wert neben anderen Faktoren (Substrat, Substratkonzentration, K_m -Wert) auch von der Inkubationszeit abhängig ist, muss diese immer angegeben werden.

Diagramm 4-13 zeigt die IC_{50} -Kurve des Aziridins **A-04a** nach einer Inkubationszeit von 5 min.

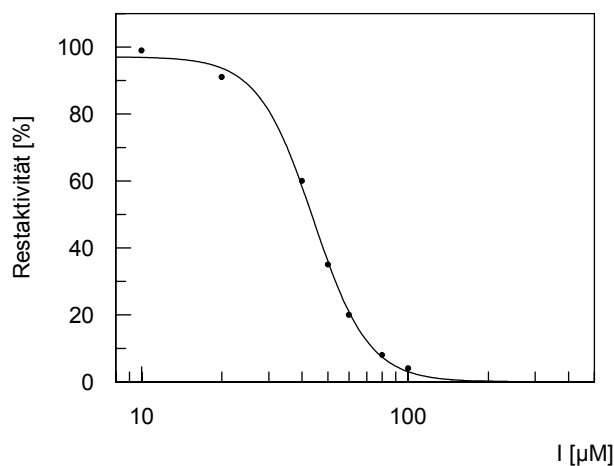


Diagramm 4-13: IC_{50} -Kurve von A-04a nach 5 min Inkubation; $IC_{50}(5) = 44 \pm 1 \mu M$

Einen besseren Vergleich der Hemmstärke bietet der k_{2nd} -Wert, der im Gegensatz zum IC_{50} -Wert unabhängig von der Inkubationszeit, vom Substrat, dessen Konzentration und dem K_m -Wert ist.

Bei der Ermittlung des k_{2nd} -Wertes unterscheidet man zwei Situationen.

Zum einen die Auswertung bei schlecht löslichen Inhibitoren, bei denen keine Sättigung erreicht wird ($[I] \ll K_i$). Hier kann k_{2nd} bei der Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ nur näherungsweise aus der Steigung der Geraden ermittelt werden.

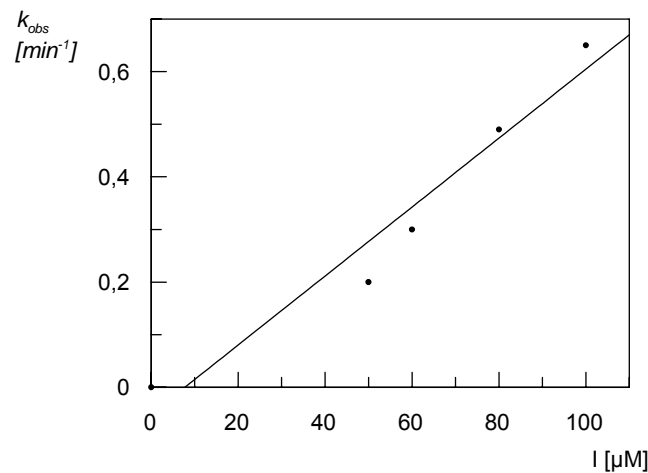


Diagramm 4-14: $k_{obs} / [I]$ -Diagramm von A-04a zur Ermittlung von k_{2nd}

$$k_{2nd} = 15180 \pm 2070 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

Anders gestaltet sich die Auswertung, wenn der Sättigungsbereich ($[I] \gg K_i$) schnell erreicht wird. In diesem Fall können die einzelnen Parameter der zeitabhängigen Hemmung k_i (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung) und K_i (Dissoziationskonstante) bestimmt werden. Dies ermöglicht eine Aussage, ob die Hemmung aufgrund schneller Reaktion (großer k_i) oder hoher Affinität (kleine K_i) zustande kommt.

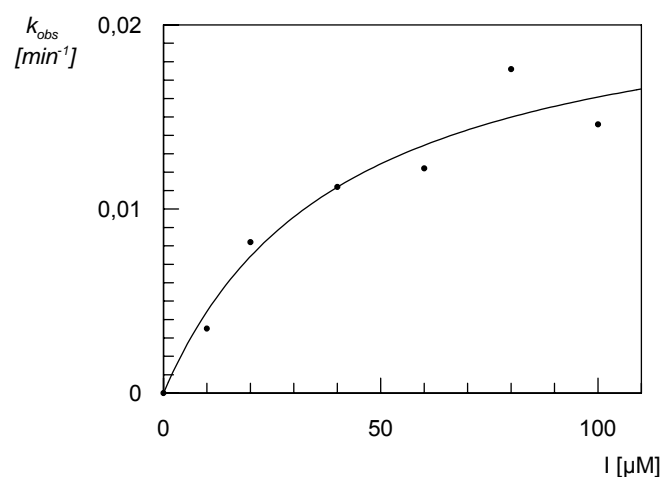


Diagramm 4-15: $k_{obs} / [I]$ -Diagramm von E-OI-01 zur Ermittlung von k_{2nd}

$$k_i = 0.023 \text{ min}^{-1}; K_i = 17.9 \text{ μM}; k_{2nd} = 1285 \pm 230 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

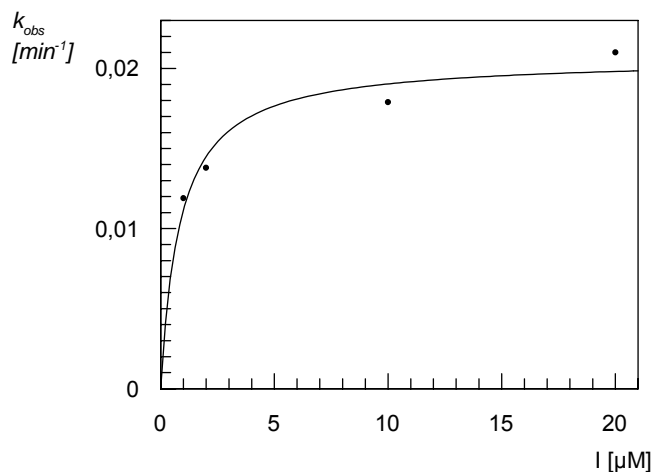


Diagramm 4-16: $k_{obs} / [I]$ -Diagramm von A-08 zur Ermittlung von k_{2nd}

$$k_i = 0.021 \text{ min}^{-1}; K_i = 0.37 \text{ µM}; k_{2nd} = 56756 \pm 1150 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

Die aus den beiden letzten Diagrammen ermittelten Werte zeigen, dass die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung für das *E*-konfigurierte Olefin **E-OI-01** und das Aziridin **A-08** fast identisch sind. Die Affinität der beiden Verbindungen zu SAP2 ist aber deutlich unterschiedlich. Das Aziridin **A-08**, der potenteste getestete SAP2-Inhibitor, besitzt eine wesentlich höhere Affinität (kleiner K_i -Wert) zum Enzym als das Olefin. Nach $k_{2nd} = k_i / K_i$ (vgl. Gleichung VI in Kapitel 4.2) ergibt sich deshalb für das Aziridin mit $56756 \pm 1150 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ein wesentlich höherer k_{2nd} -Wert.

4.6.3 Nachweis der Irreversibilität der Hemmung

Für die Mehrheit der an SAP2 aktiven Verbindungen zeigten sich im Verdünnungsassay eine höhere prozentuale Hemmung bei längerer Inkubation und auch mit längerer Inkubationszeit niedriger werdende IC_{50} -Werte. Dies spricht deutlich für eine irreversible Hemmung. Nur bei den beiden *Z*-konfigurierten Olefinen **Z-OI-08** und **Z-OI-09** war anhand der ermittelten Werte keine sichere Aussage über die „Art“ der Hemmung möglich.

Um mit Sicherheit nachzuweisen, dass die Hemmung, wie die Werte vermuten lassen, irreversibel ist, wurden Untersuchungen durchgeführt, um eine eventuelle Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes im Falle einer doch nur reversiblen Hemmung nachzuweisen.

4.6.3.1 Dialyse

Bei diesem Verfahren wird das Enzym mit Inhibitor 30 min inkubiert, ein Aliquot entnommen und von diesem die Restaktivität des Enzyms bestimmt und der restliche Ansatz der Dialyse mit großem Überschuss an Puffer unterworfen.

Da die Aktivität des Enzyms allein schon durch die lange Dauer der Dialyse sinkt, muss auch immer ein Kontrollversuch ohne Inhibitor durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem der Dialyse stellen die vergrößerten Ansätze dar, da die Enzymlösungen in einen großen Dialyseschlauch überführt werden müssen. Dies wird vor allem dann problematisch, wenn die Inhibitoren stark hydrophob und somit im großen Überschuss an Puffer schlecht löslich sind. Außerdem muss für die Dialyse eine so hohe Inhibitorkonzentration gewählt werden, dass bei der Messung der Restenzymaktivität vor Beginn der Dialyse das Enzym nahezu vollständig gehemmt ist.

Die an der SAP2 aktiven Verbindungen weisen alle viele aromatische Reste auf. Durch die damit verbundene starke Hydrophobie gelang es nicht, die bei der Dialyse benötigten hohen Inhibitorkonzentrationen in Lösung zu bringen. Wurde die Inhibitorkonzentration gesenkt, so dass die Verbindungen in Lösung blieben, war die Hemmung des Enzyms vor Beginn der Dialyse nicht hoch genug. Auch die Versuche, durch höhere DMSO-Anteile die Inhibitoren in Lösung zu bringen bzw. bei 30 °C zu dialysieren, schlugen fehl, da das Enzym dadurch seine Aktivität verlor.

Der Nachweis der Irreversibilität der Hemmung der SAP2 durch die Inhibitoren konnte mittels Dialyse somit nicht erbracht werden.

4.6.3.2 Tryptischer Verdau

Ein elegantes Verfahren, um die kovalente Bindung eines Inhibitors nachzuweisen, stellt der Verdau des inaktivierten Enzyms mittels Trypsin und die anschließende Analyse der Hydrolysefragmente mit Hilfe von LC-MS dar. Trypsin ist für seine selektive und zuverlässige Spaltung (nach Xxx-Arg) bekannt und wird deshalb häufig in der Protein-Analyse verwendet.

Bisher konnte der gewünschte Nachweis der Irreversibilität auch nicht durch dieses Verfahren erbracht werden, da es noch nicht gelungen ist, die Masse des Enzyms SAP2 selbst nachzuweisen. Grund hierfür ist, dass für die Messung sehr saubere Proben benötigt werden, die Aufreinigung der SAP2 sich aber als recht schwer erweist (Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Werner Schmitz, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Physiologie II, Universität Würzburg, durchgeführt).

Bisher konnte somit kein abschließender Beweis für die irreversible Hemmung der SAP2 durch die Inhibitoren erbracht werden. Die in den Assays beobachtete Zeitabhängigkeit der Hemmung ist jedoch ein eindeutiges Indiz dafür.

4.7 Untersuchungen zur Hemmung von Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Um die Selektivität der Hemmung zu überprüfen, wurden die Verbindungen einem Screening an den humanen Cystein-Proteasen Cathepsin B und Cathepsin L sowie an der parasitären Cystein-Protease Rhodessain unterzogen.

4.7.1 Screening

Zur Ermittlung der Hemmung wurden bei 25 °C kontinuierliche Assays durchgeführt. Die bei der Spaltung des Substrats Cbz-Phe-Arg-AMC durch das Spaltprodukt AMC (7-Amino-4-methylcumarin) zunehmende Fluoreszenz wurde bei 460 nm über 20 min detektiert (Anregung 380 nm). Als Inhibitorkonzentration wurde beim Screening an Rhodessain 100 µM und an den Cathepsinen B und L 200 µM verwendet. Im Gegensatz zum Screening an der SAP2 wurden Enzym und Inhibitor vor der Messung nicht inkubiert.

In der folgenden Tabelle sind die bei den Assays verwendeten Enzyme, ihre Konzentrationen, die Substratkonzentrationen, die K_m -Werte und die Puffer aufgelistet.

Tab. 4-4: Enzym- und Substratkonzentrationen, Puffer und K_m -Werte

| Enzym | [E] | Puffer | K_m -Wert | [S] | Ref. |
|----------------------------------------------|-------------|------------|-------------|---------|-------|
| Cathepsin L <i>Paramecium tetraurelia</i> | 14.5 ng/mL | TRIS 6.0 | 6.5 µM | 40.5 µM | [184] |
| Cathepsin B humane Leber | 14.5 ng/mL | TRIS 6.0 | 150.0 µM | 40.5 µM | [148] |
| Rhodessain <i>Trypanosoma rhodesiense</i> | 832.5 ng/mL | ACETAT 5.5 | 826.5 nM | 40.5 µM | [185] |

Puffer: TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;
ACETAT pH 5.5, 50 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%.

Um eine Denaturierung der Enzyme durch eventuell vorhandene Schwermetalle zu verhindern, enthalten die Puffer EDTA. Daneben dient ein niedermolekulares Thiol (DTT = Dithiothreitol) dazu, eine falsche Disulfid-Brücke am Cystein-Rest im aktiven Zentrum zu reduzieren und damit die Cystein-Proteasen zu aktivieren. Das nichtionische Tensid Brij 35 ist zur Verbesserung der Löslichkeit von Inhibitoren und Substrat zugesetzt und nur im Assay-, nicht jedoch im Enzym-Puffer enthalten.

Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 200 µL enthält Enzym, Puffer, Inhibitoren und Substrat. Zur Verbesserung der Löslichkeit ist auch immer etwas DMSO zugesetzt, wobei die maximale DMSO-Konzentration (Substrat und Inhibitoren sind auch in DMSO gelöst) 10% beträgt, um die Aktivität und Stabilität der Enzyme nicht zu beeinträchtigen. Die exakten Volumina der verwendeten Komponenten und die Reihenfolge ihres Zusammenfügens (1-6) sind in Tabelle 4-5 wiedergegeben.

Tab. 4-5: Volumina und Reihenfolge des Zusammenfügens der Komponenten

| Enzym | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------|----------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|
| | Puffer [μ L] | Enzym [μ L] | Puffer [μ L] | DMSO [μ L] | Inhibitor [μ L] | Substrat [μ L] |
| Cathepsin B | 85 | 10 | 85 | 5 | 10 | 5 |
| Cathepsin L | 85 | 10 | 85 | 5 | 10 | 5 |
| Rhodesain | 90 | 5 | 85 | 10 | 5 | 5 |

Die Hemmung an den verschiedenen Cystein-Proteasen durch die Verbindungen ist in Diagramm 4-17 wiedergegeben. Ermittelt wird sie aus dem Verhältnis der in Anwesenheit von potentiellen Inhibitoren gemessenen Steigung der Fluoreszenzzunahme pro Zeit zur Steigung einer DMSO-Kontrolle (Mittelwert aus 3 Messungen; Standardabweichung < 10%).

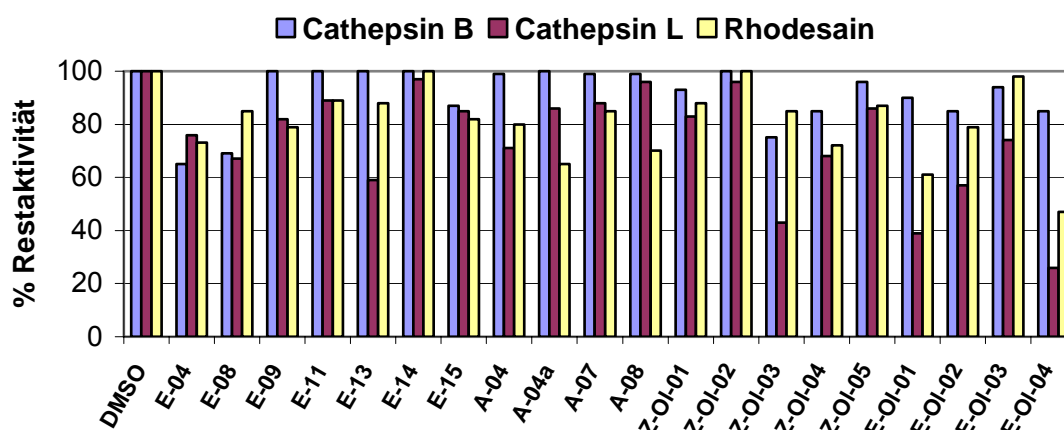


Diagramm 4-17: Hemmung an Cathepsin B, Cathepsin L und Rhodesain

Nur wenige Verbindungen zeigen eine Hemmung der Cystein-Proteasen, wobei eine leichte Selektivität bezüglich Cathepsin L und der Cathepsin L-like Protease Rhodesain zu beobachten ist.

Die einzigen Verbindungen, die an Cathepsin B eine schwache Hemmung zeigen, sind die beiden Epoxide **E-04** (35%) und **E-08** (31%).

Die aktivsten Verbindungen beim Screening an Cystein-Proteasen sind die als Vorstufe für Aziridine synthetisierten Phenylalanin-verknüpften E-Olefine **E-OI-01** und **E-OI-04**, mit Hemmungen von 61 bzw. 73% an Cathepsin L und 39 bzw. 53% an Rhodesain.

Nur eine einzige als Aspartat-Protease-Inhibitor vorgesehene Verbindung zeigt eine moderate Hemmung an einer der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen. Das Z-konfigurierte Analogon von **E-OI-04**, Olefin **Z-OI-03** weist eine 57%ige Hemmung von Cathepsin L auf.

4.7.2 Diskussion

Die bei den Testungen an den Cystein-Proteasen erhaltenen Ergebnisse beweisen, dass die *trans*-Konfiguration elektrophiler Inhibitoren für die Hemmung von Cystein-Proteasen essentiell ist. Nur die als Vorstufe für *cis*-konfigurierte Aziridine vorgesehenen *E*-konfigurierten Verbindungen **E-OI-01** und **E-OI-04** weisen eine schwache Hemmung von Cathepsin L auf (**E-OI-01**: $IC_{50} = 181 \pm 14 \mu\text{M}$; **E-OI-04**: $IC_{50} = 123 \pm 7 \mu\text{M}$).

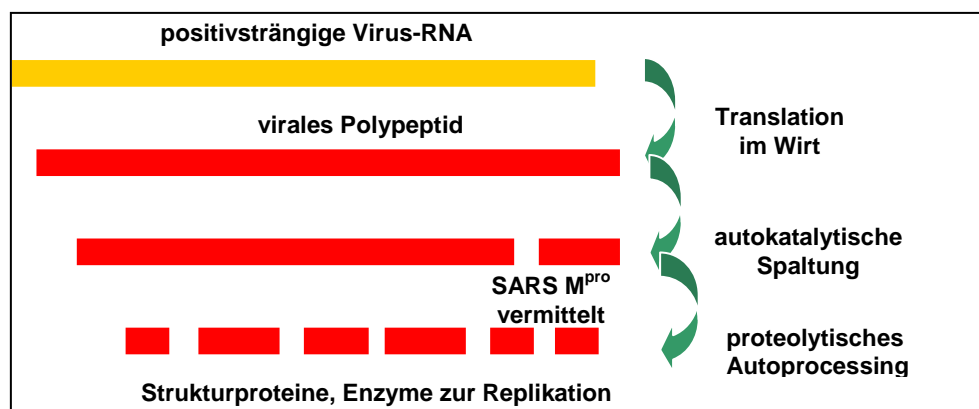
Auch die Wichtigkeit eines aromatischen Restes in Nachbarschaft zum α,β -ungesättigten Michael-System zeigt sich an den beiden aktivsten Verbindungen. Beide sind wie das moderat aktive **Z-OI-03** auch an Phenylalanin gekuppelt und sprechen so die hydrophobe S2-Tasche der Enzyme an.

Die Inaktivität der ebenfalls mit Phenylalanin substituierten *cis*-Aziridine **A-04**, **A-04a** und **A-07**, sowie der *cis*-Epoxide **E-04**, **E-13**, **E-14** und **E-15** zeigt noch einmal deutlich, dass der wichtigste Faktor zur Hemmung von Cystein-Proteasen jedoch die *trans*-Konfiguration ist.

4.8 Untersuchung an coronaviralen Cystein-Proteasen

Bei den Coronaviren (CoV) finden sich eine Vielzahl tier- und humanpathogener Spezies, wie z. B. das „transmissible gastroenteritis virus“ (TGEV) beim Schwein. Mit 20-30% gehören Coronaviren bei Menschen zu den häufigsten Erregern akuter Atemwegserkrankungen. Auch das schwere akute Atemwegssyndrom (SARS = severe acute respiratory syndrom), eine schwere atypische Lungenentzündung, wird durch ein bisher unbekanntes Coronavirus (SARS-CoV) verursacht. Das hochvirulente und hochkontagiöse Virus, das vermutlich durch Übertragung von der südchinesischen Zibetkatze auf den Menschen eine weltweite Epidemie (Februar bis Juni 2003) auslöste, hat, auch bei intensiv-medizinischer Behandlung, eine Mortalitätsrate von etwa 10%. Grund hierfür ist die nicht aufhaltbare alveolare Zerstörung der Lunge.^[186-189]

Bei der Familie der *Coronaviridae* handelt es sich um umhüllte, positivsträngige RNA-Viren, d. h. die RNA kann unmittelbar in der Wirtszelle durch deren Enzymausstattung in mehrere große Polyproteine translatiert werden. Alle Coronaviren besitzen eine sog. Hauptprotease (main protease, M^{Pro}), die sich autokatalytisch von diesen Polyproteinen abspaltet (Schema 4-2).



Schema 4-2: Rolle der SARS-CoV M^{pro} bei der Replikation des Virus

Die chymotrypsinähnliche Tertiärstruktur aufweisende Cystein-Protease M^{pro} ist für einen Großteil der weiteren Prozessierungen der Proteine in Strukturproteine und Enzyme verantwortlich und somit essentiell für den gesamten Replikationszyklus des Virus.^[190] Im Vergleich zu anderen Cystein-Proteasen fehlt ihr, wie auch allen anderen coronaviralen M^{pro}s die dritte Aminosäure, so dass sich im aktiven Zentrum nur eine katalytische Diade aus einem Cystein-Histidin-Paar befindet und ein konserviertes Wassermolekül die Funktion des Wasserstoffbrücken-Akzeptors übernimmt.^[191,192] Die SARS-CoV M^{pro} weist eine ausgeprägte Substratspezifität für die Sequenz Val (Thr)-Leu-Gln | | Ser-Gly-Phe (Leu) auf (| | markiert die Spaltstelle).^[193-195] Für Enzyminhibitoren stellt die SARS-CoV M^{pro} ein interessantes Target dar, da sich im menschlichen Organismus kein entsprechend analoges Enzym findet.

Um die Aktivität der Verbindungen an der SARS-CoV M^{pro} zu untersuchen, wurde ein Screening mittels FRET-Assay durchgeführt.^[193]

4.8.1 Screening und Ermittlung der Hemmkonstanten

Zum Screening wurde ein kontinuierlicher Assay unter den in Tabelle 4-6 angegebenen Bedingungen und mit einer Inhibitorkonzentration von 100 µM durchgeführt. Jede Verbindung wurde 3-mal vermessen.

Tab. 4-6: Assaybedingungen zur Testung an der SARS-CoV M^{pro}

| Enzym | [E] | Puffer | Temp. | K _m -Wert | [S] |
|------------------------------------------------------|-----------|----------|-------|----------------------|--------|
| SARS-CoV M ^{pro} (3CL-M ^{pro}) | 8.5 µg/mL | TRIS 7.5 | 25 °C | 190 µM | 150 µM |

Puffer: TRIS pH 7.5, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;

Wie bei allen Assays lag die maximale DMSO-Konzentration bei 10% und die verschiedenen Partner wurden in der Reihenfolge Puffer, Enzym, Inhibitor und Substrat zugegeben. Analog

zum Screening an den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen (vgl. Kapitel 4.7) wurden Enzym und Inhibitor vor der Messung nicht inkubiert, sondern direkt nach dem Zusammenfügen aller Komponenten gemessen.

Als Substrat diente das den Fluoreszenz-Donor Anthranilsäure (Abz; 2-Aminobenzoessäure) und den Akzeptor 3'-Nitrotyrosin (Tyr(3'-NO₂)) tragende Nonapeptid mit der Sequenz Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln | | Ser-Gly-Tyr(3'-NO₂)-Arg(Mts)OH (| | markiert die Spaltstelle).^[194] Das von Markus Schiller im Arbeitskreis am Festphasen-Peptidsynthesizer dargestellte Nonapeptid hat bezüglich der SARS-CoV M^{pro} einen K_m -Wert von 190 μ M.^[196]

Die Fluoreszenzzunahme durch den Donor Anthranilsäure wurde mittels Fluorimeter bei 420 nm detektiert (Anregung 320 nm).

Nur das Aziridin **A-04** sowie das Z-Olefin **Z-OI-03** zeigten im Screening eine moderate Hemmung an der SARS-CoV M^{pro} (vgl. Tab. 4-7).

Die Messung von Konzentrationsreihen beider Verbindungen (Inhibitorkonzentrationen zwischen 12.5 und 100 μ M) ergab eine nicht-zeitabhängige Hemmung der Enzymaktivität und lieferte die in Tabelle 4-7 angegebenen IC₅₀-Werte.

Tab. 4-7: aktivste Verbindungen an der SARS-CoV M^{pro}

| Verb. | SARS-CoV M ^{pro} | |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | % Hemmung bei [I] =100 μ M | IC ₅₀ [μ M] |
| A-04 | 34 | 138 \pm 6 |
| Z-OI-03 | 37 | 465 \pm 20 |

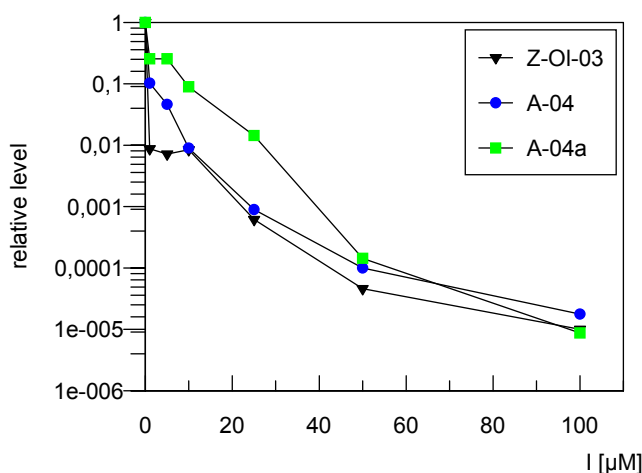
Das Aziridin **A-04** besitzt zwar eine höhere Affinität zur SARS-CoV M^{pro} als das Z-Olefin, ist aber deutlich schwächer als andere im Arbeitskreis an der SARS-CoV M^{pro} getestete Verbindungen.

4.8.2 Ermittlung der antiviralen Aktivität an Coronaviren

Die beiden an der SARS-CoV M^{pro} aktiven Verbindungen **A-04** und **Z-OI-03** wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. John Ziebuhr, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, auch auf ihre antivirale Aktivität an Coronaviren untersucht.

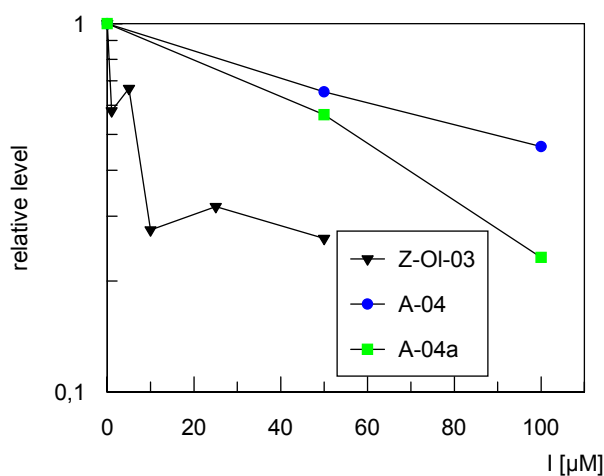
Um eine Aussage über einen möglichen Einfluss der Stereochemie auf die Hemmwirkung zu erhalten, wurde neben dem 1 / 1-Diastereomergemisch des Aziridins **A-04** (Aziridinring (S,S) / (R,R)-konfiguriert) auch das enantiomerenrein dargestellte Aziridin **A-04a** (Aziridinring (S,S)-konfiguriert) an den Viren getestet.

Bei den antiviralen Assays wurden die Hemmung der Verbindungen auf die Replikation des TGEV (=transmissible gastroenteritis virus) und des MHV-A59 (=mouse hepatitis virus) untersucht.^[197] Die Ergebnisse sind in Diagramm 4-18 und Diagramm 4-19 dargestellt.



relative level: TCID₅₀/mL in Anwesenheit von Inhibitor / TCID₅₀/mL in Abwesenheit von Inhibitor;
TCID₅₀/mL: tissue culture infectious dose 50% pro mL Zellkultur-Medium

Diagramm 4-18: Antivirale Aktivität am TGE-Virus



relative level: TCID₅₀/mL in Anwesenheit von Inhibitor / TCID₅₀/mL in Abwesenheit von Inhibitor;
TCID₅₀/mL: tissue culture infectious dose 50% pro mL Zellkultur-Medium

Diagramm 4-19: Antivirale Aktivität am MH-Virus

Alle drei getesteten Substanzen zeigten eine gute dosisabhängige antivirale Aktivität an beiden Coronaviren, wobei die Hemmung des TGE-Virus deutlich stärker war.

Das Z-konfigurierte Olefin **Z-OI-03** stellte sich dabei als die aktivere Verbindung heraus.

Der Vergleich der antiviralen Aktivität der beiden Aziridinen **A-04** und **A-04a** zeigte keine merklichen Unterschiede. Zwar war das Diastereomergemisch von **A-04** bis zu einer

Konzentration von 40 μM an dem TGE-Virus etwas aktiver, ein entscheidender Einfluss der Stereochemie ließ sich jedoch nicht erkennen.

4.8.3 Diskussion

Der Enzymassay an der SARS-CoV M^{pro} zeigt, dass beide Verbindungen an der Protease nur moderate Aktivität besitzen. Die antiviralen Testungen an dem TGEV und dem MHV-A59 liefern dagegen gute antivirale Aktivitäten für die beiden Verbindungen.

Bisher wurden Inhibitoren coronaviraler M^{pro}s nach dem Vorbild von AG-7088 (Rupintrivir),^[198] das als Inhibitor der strukturell verwandten picornaviralen Cystein-Proteasen (3C-Proteasen) entwickelt wurde^[199] und kurz vor der Markteinführung als neuer antirhinoviraler Arzneistoff steht,^[200] entwickelt und weisen somit ein *trans*-konfiguriertes Michael-System auf.

Ein Grund für die Hemmung von **Z-OI-03** am Enzym könnte die an den elektrophilen Baustein gekuppelte AS sein. **Z-OI-03** stellt ein mit Phenylalanin verknüpftes *Z*-konfiguriertes α,β -ungesättigtes Michael-System. Von Phe-enhaltenden *E*-konfigurierten Michael-Systemen ist bekannt, dass die Aminosäure Phe in die S2-Tasche bindet und es so zu einer reversiblen Hemmung der Coronaviren kommt.^[201] Auch bei dem Aziridin **A-04** handelt es sich um ein Phenylalanin-substituiertes *cis*-Aziridin, das am Stickstoff zusätzlich benzyliert ist. Möglicherweise hängt die Hemmung der SARS-CoV M^{pro} auch hier mit einer Interaktion mit der S2-Tasche zusammen.

Die gute antivirale Aktivität der Verbindungen an den Coronaviren ist dagegen unklar. Ein Grund für das hohe Potential von **Z-OI-03** ist vermutlich dessen akute Toxizität. Tests zeigten, dass die Verbindung unter anderem gegenüber Makrophagen (vgl. Tab. 5-4) und Nierenepithelzellen (IC_{50} -Wert: $2.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$) toxisch ist.

5. Biologische Testungen

5.1 Hemmung von *Candida albicans* in Zellkulturen

5.1.1 Testung an der SAP2

Neben der fluorimetrischen Testung auf die Hemmung der isolierten sekretorischen Aspartat-Protease SAP2 wurden die Verbindungen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Joachim Morschhäuser und Dr. Peter Staib, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, in zwei voneinander unabhängigen Tests auf ihre antifungale Aktivität und Cytotoxizität in *Candida albicans*-Zellkulturen untersucht.

In einem ersten SAP2-abhängigen Test wurde untersucht, ob die Verbindungen in der Lage sind, das Wachstum der *C. albicans*-Zellen zu inhibieren.

Dazu wurde zu 5 mL einer Natriumcitrat-Pufferlösung pH 3.2, die Zellen des Hefepilzes *Candida albicans* enthält, als einzige Stickstoffquelle Rinderserumalbumin (BSA) gegeben. Unter diesen Bedingungen muss die SAP2 exprimiert werden, um das BSA in kleinere Peptidbruchstücke zu zerteilen, die für die Ernährung des Pilzes nötig sind. Zu dieser Lösung wurden 25 µL der in DMSO gelösten Verbindungen gegeben. Die Endkonzentration der Verbindungen betrug bei diesem Test 500 µM und der DMSO-Anteil lag bei 0.5%. Nach Inkubation der Kulturen für 60 h bei 30 °C wurde mittels optischer Dichtemessung der Hefepilz-Zellkulturen und durch Vergleich gegen eine Kontroll-Referenz, die nur DMSO enthielt, die Hemmung der einzelnen Substanzen bestimmt.

Antifungale Aktivität lag für die Verbindungen vor, die in der Lage waren das Wachstum der *C. albicans*-Zellen zu hemmen.

In einem zweiten, Protease-unabhängigen Test musste dann geklärt werden, ob die antifungale Aktivität durch die Hemmung der sekretorischen Aspartat-Protease oder durch Cytotoxizität hervorgerufen wurde.

Der zweite Test wurde unter analogen Bedingungen wie der erste Test durchgeführt. Allerdings diente als Stickstoffquelle nicht BSA, sondern ein Extrakt der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. In diesem Medium haben die *C. albicans*-Zellen schon ausreichend kleinere Peptidbruchstücke zur Verfügung, so dass sie ohne die SAP wachsen können. In diesem Medium wird die SAP2 zwar ebenfalls exprimiert, eine Hemmung hat aber keinen Effekt auf das Wachstum der *C. albicans*-Zellen. Nach analoger Inkubationszeit wurde wiederum die optische Dichte der Kulturen bestimmt.

Beeinflussen die im ersten Test antifungal aktiven Verbindungen in diesem zweiten Test das Wachstum der *C. albicans*-Zellkulturen, wirken sie unspezifisch cytotoxisch. Bleibt dagegen das *C. albicans*-Zellkultur-Wachstum im zweiten Test unbeeinträchtigt und die optische Dichte der Kulturen ist analog zur DMSO-Kontrolle, so beruht ihre wachstumshemmende Aktivität im 1. Test vornehmlich auf der Hemmung der SAP.

Erste Tests mit den *cis*-konfigurierten Aziridin- und Epoxidbausteinen (**A-01/02/03/05** sowie **E-01/02**) und ihren *trans*-Analoga zeigten nur sehr schwache antifungale Aktivitäten. Die Ergebnisse des zweiten Tests lieferten aber das Ergebnis, dass im Gegensatz zu den *cis*-konfigurierten Verbindungen alle *trans*-konfigurierten Bausteine toxisch auf die *C. albicans*-Zellen wirken.

Die Testungen der Peptid-substituierten Verbindungen brachten letztendlich drei sehr aktive antifungale Verbindungen hervor, die im zweiten Test nicht toxisch auf die *C. albicans*-Zellen wirkten. Zum einen die beiden Aziridine **A-07** und **A-08**, die auch am isolierten Enzym SAP2 (vgl. Tab. 4-3) am aktivsten sind, und zum andern das *Z*-konfigurierte Olefin **Z-OI-03** aus der Gruppe der Maleate, das im FRET-Assay an der isolierten SAP2 nur eine sehr geringe Aktivität von 4% zeigt.

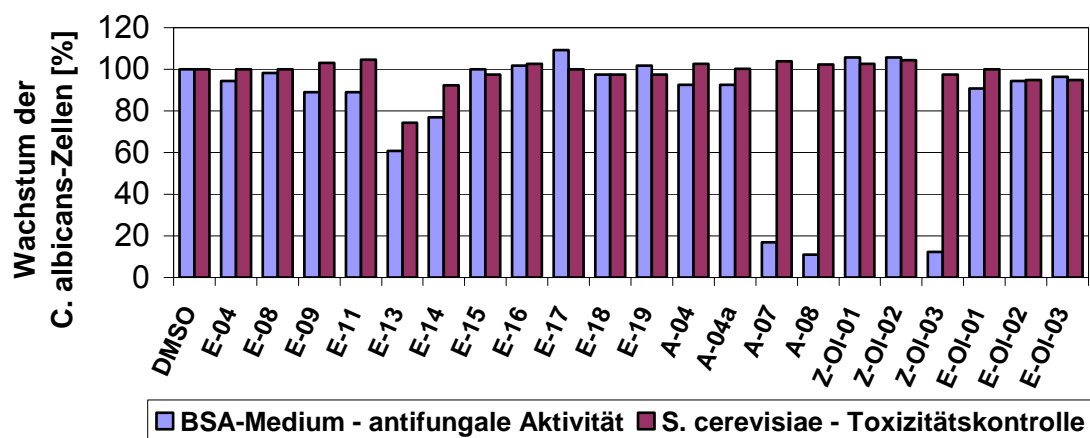


Diagramm 5-1: Hemmung auf das Wachstum der *Candida albicans*-Zellkulturen

Eine weitere Erkenntnis aus dem Test an den *C. albicans*-Zellkulturen ist die Tatsache, dass die *Z*- bzw. *E*-Konfiguration der Olefine einen nicht so drastischen Einfluss hat, wie die *cis* / *trans*-Konfiguration der dreigliedrigen Heterocyclen (siehe oben). Die drei getesteten *E*-Olefine **E-OI-01/02/03** zeigen zwar keinerlei antifungale Aktivität, wirken aber auch nicht toxisch auf die *C. albicans*-Zellen (Diagramm 5-1).

5.1.2 Aufklärung der wachstumshemmenden Wirkung von Z-OI-03

Um die unterschiedlichen Aktivitäten von **Z-OI-03** im FRET-Assay und im Zellkulturtest aufzuklären, wurden die Überstände der *C. albicans*-Zellkulturen, die mit den Inhibitoren inkubiert worden waren, auf ihre SAP2-Aktivität untersucht. Dazu wurden die beiden oben erwähnten unabhängigen Tests im BSA-Medium bzw. *S. cerevisiae*-Medium mit den drei Verbindungen **A-07**, **A-08** und **Z-OI-03** nochmals analog zu vorher durchgeführt. Als Referenz diente eine *C. albicans*-Kultur mit reinem DMSO und als Positivkontrolle wurde eine Probe, die den als Standard eingesetzten Aspartat-Protease-Inhibitor Pepstatin A enthielt, verwendet. Die Endkonzentration lag dabei für Pepstatin A bei 7.3 μM , wohingegen die Verbindungen **A-07**, **A-08** und **Z-OI-03** mit je 500 μM , entsprechend ihrer geringeren Hemmstärke, höher konzentriert waren. Während der Inkubationsphase wurden zu unterschiedlichen Zeiten Aliquots aus den *C. albicans*-Zellkulturen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Messung der SAP2-Aktivität der schockgefrorenen Überstände erfolgte mittels FRET-Assays unter den in Tabelle 5-1 angegebenen Bedingungen.

Tab. 5-1: Assaybedingungen zur Testung der *C. albicans*-Zellkultur-Überstände

| | |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Substrat | Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 μM K_m (SAP2): 28.7 μM |
| Bedingungen | 50 mM Na-Citrat Puffer pH 3.2; 50 mM NaCl Ex: 355 nm / Em: 540 nm Temp.: 30 °C |
| Volumina | 193 μL Puffer, 2 μL Überstand, 5 μL Substrat |

Puffer, aufgetauter Überstand und FRET-Substrat wurden zusammengegeben, gemischt und die Fluoreszenzzunahme für jeweils eine Minute detektiert.

Im Diagramm 5-2 ist das Ergebnis der Messung für das BSA-Medium gezeigt. Die im FRET-Assay ermittelte Steigung ist dabei gegen die Zeit der Probeentnahme aus den Zellkulturen aufgetragen. Je höher die Steigung, desto mehr aktive, nicht inhibierte SAP2 befindet sich im gemessenen Überstand und desto schwächer antifugal wirksam ist die Verbindung.

Der Test zeigt, dass die SAP2-Produktion bzw. -Aktivität erst zwischen der 16. und 20. Stunde einsetzt. In der DMSO-Kontrolle steigt sie dann bis zum Ende kontinuierlich an. Zwischen **Z-OI-03** und den beiden Aziridinen **A-07** und **A-08** sowie Pepstatin A zeigt sich kein merklicher Unterschied. Bei allen vier Verbindungen ist nach 20 Stunden eine mässige SAP2-Aktivität zu beobachten. Diese wird jedoch im weiteren Verlauf nicht nur niedrig gehalten, sondern sogar noch abgeschwächt, bis am Ende keine SAP2-Aktivität in den Proben zu finden ist.

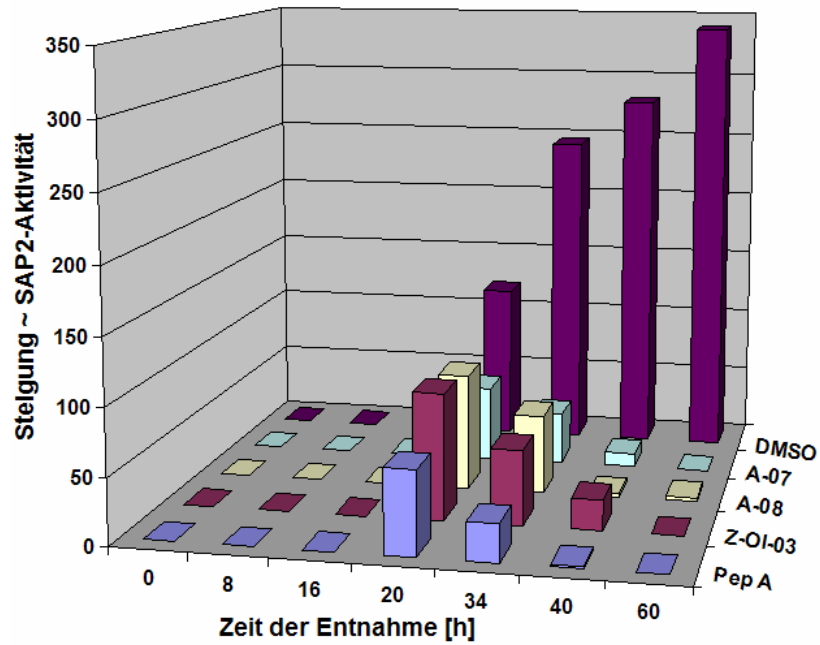


Diagramm 5-2: SAP2-Aktivität im Überstand der *Candida albicans*-Zellkulturen bei Wachstum im BSA-Medium

Die SAP2-Aktivität in den Überständen des *S. cerevisiae*-Mediums gestaltet sich etwas anders (Diagramm 5-3).

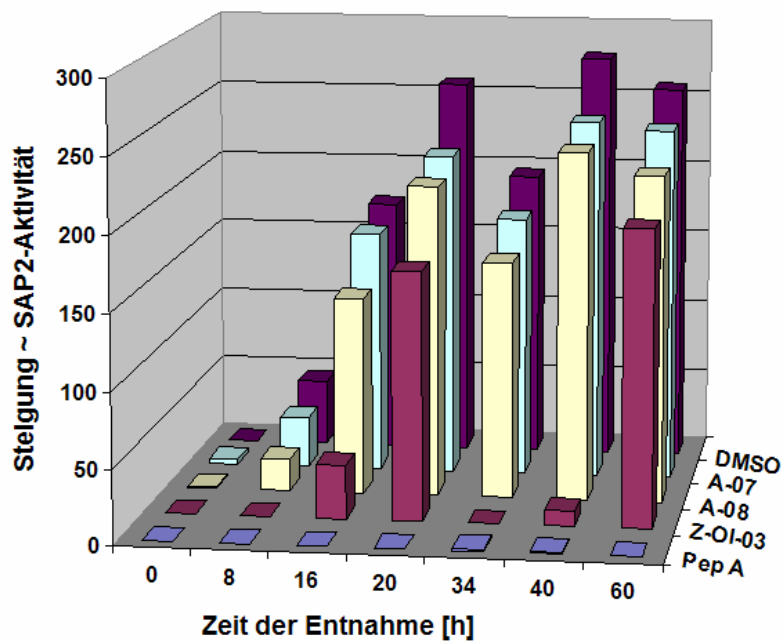


Diagramm 5-3: SAP2-Aktivität im Überstand der *Candida albicans*-Zellkulturen bei Wachstum im *S. cerevisiae*-Medium

Im Überstand der DMSO-Kontrolle des *S. cerevisiae*-Mediums ist die SAP2 bereits nach acht Stunden nachweisbar und hat nach zwanzig Stunden eine Art Plateau erreicht. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich für die beiden Aziridine. Die SAP2-Aktivität liegt dabei auch nur etwas unter der DMSO-Kontrolle. Pepstatin A gelingt es in diesem Medium von Beginn an die Aktivität der SAP2 vollständig zu unterdrücken. In den Überständen des *S. cerevisiae*-Mediums von **Z-OI-03** zeigt sich ein völlig anderer, sehr schwankender Verlauf der SAP2-Aktivität. Für die Zeitbereiche von 34 und 40 Stunden findet sich eine vollständige Unterdrückung der SAP2, wohingegen nach 60 Stunden die gemessene SAP2-Aktivität wieder im Bereich der beiden Aziridine und der DMSO-Kontrolle liegt.

Die Testung der Überstände der *C. albicans*-Zellkulturen konnte somit nicht wie erhofft zur Aufklärung des Wirk- bzw. Hemmmechanismus des Olefins **Z-OI-03** beitragen.

Auch eine andere mögliche Erklärung der antifungalen Aktivität gegenüber *C. albicans*-Zellkulturen, die Isomerisierung der Doppelbindung von **Z-OI-03** im sauren Medium während der langen Inkubation, konnte ausgeschlossen werden. NMR-Studien zeigten, dass innerhalb der 60 h Inkubation im sauren Medium weder eine Isomerisierung der Doppelbindung von **Z-OI-03** zum am isolierten SAP2 aktiven *E*-Analogon **E-OI-04** noch eine Zersetzung der Verbindung stattfindet.

Andere mögliche Ursachen, die erklären könnten, warum **Z-OI-03** *C. albicans*-Zellkulturen hemmt, am isolierten Enzym aber nahezu inaktiv ist, sind beispielsweise der Eingriff der Verbindung in den SAP-Transport oder eine durch die Verbindung verursachte Fehlregulation von für den Hefepilz wichtigen Genen. Versuche dies zu klären laufen zur Zeit.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Hemmung der *C. albicans*-Zellkulturen ist allerdings eine völlig unspezifische Hemmung der *C. albicans*-Zellkultur durch die Toxizität von **Z-OI-03**. Die Verbindung zeigt nämlich gegen nahezu alle Zelllinien, vor allem aber gegenüber Makrophagen (vgl. Tab. 5-4) und Nierenepithelzellen (IC₅₀-Wert: 2.9 ± 0.6 µM) akute Toxizität. Der einzige Toxizitätstest, bei dem **Z-OI-03** jedoch nicht toxisch wirkt, ist der Test zur Prüfung auf Toxizität gegenüber den *C. albicans*-Zellkulturen im *S. cerevisiae*-Medium.

5.1.3 Testung an den SAP-Isoenzymen SAP1/3/6 und 8

Die Hemmung mehrerer SAP-Isoenzyme wird für die Hemmung einer *Candida albicans*-Infektion als großer Vorteil angesehen, da so ein Einfluss auf mehrere Infektionsstadien des Erregers ausgeübt werden kann.

Erste, analog zum BSA-Test durchgeführte Tests an anderen *C. albicans*-Mutanten, die einzelne andere SAP-Isoenzyme exprimieren, zeigen, dass **Z-OI-03**, wenn auch 70-fach höher konzentriert, analog zu Pepstatin A in der Lage ist, diese zu hemmen (Diagramm 5-4).

Die Hemmung der einzelnen SAP-Isoenzyme SAP1/3/6 und 8 liegt für **Z-OI-03** dabei bei mindestens 81%.

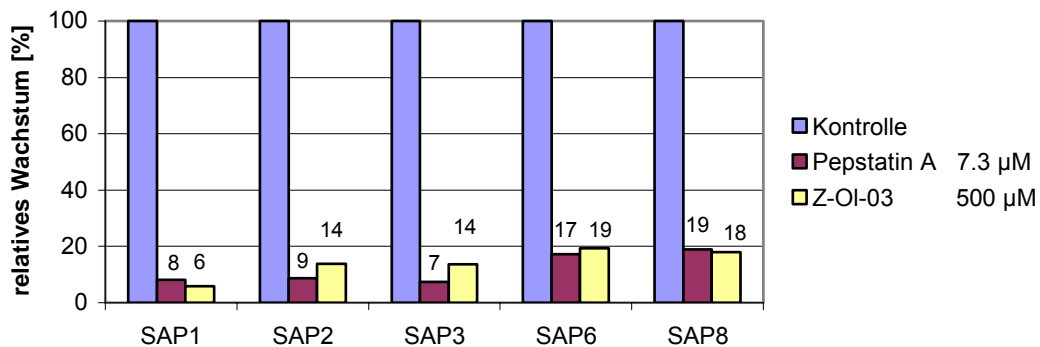


Diagramm 5-4: Hemmung der SAP-Isoenzyme SAP1/2/3/6/8 durch Pepstatin A und Z-OI-03

Sollte die noch unklare antifungale Aktivität von **Z-OI-03** nicht auf die akute Toxizität zurückzuführen sein, macht das erhaltene Ergebnis die Aufklärung des Wirk- bzw. Hemmmechanismus für das Olefin noch interessanter.

Die Tests an den SAP-Isoenzymen mit den beiden Aziridinen **A-07** und **A-08** wurden bisher noch nicht durchgeführt.

5.2 Antiplasmodiale Aktivität

5.2.1 Testung an *Plasmodium falciparum*

Neben der Wirkung auf die sekretorische Aspartat-Protease SAP2 sollte auch die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen untersucht werden.

Beim Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* ist bekannt, dass zu den SAPs strukturell verwandte Aspartat-Proteasen, die Plasmepsine, und Papain-ähnliche Cystein-Proteasen, die Falcipaine, eine essentielle Rolle bei der Ernährung des Parasiten spielen.

Die Testung von Verbindungen an dem Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* zeigte, dass einige Substanzen in der Lage sind, den Parasiten zu töten (Diagramm 5-5).

Vor allem die beiden Aziridine **A-07** und **A-08**, die an der SAP2 die aktivsten Verbindungen sind (vgl. Tab. 4-3), weisen eine gute antiplasmodiale Aktivität mit IC_{50} -Werten im unteren mikromolaren Bereich auf.

Die Ermittlung der exakten IC_{50} -Werte liefert für **A-07** einen Wert von $10.8 \mu\text{M}$. Das Aziridin **A-08**, für das in Diagramm 5-6 exemplarisch die IC_{50} -Kurve der Hemmung des Parasiten gezeigt ist, ist noch etwas aktiver und weist einen IC_{50} -Wert von $3.2 \mu\text{M}$ auf.

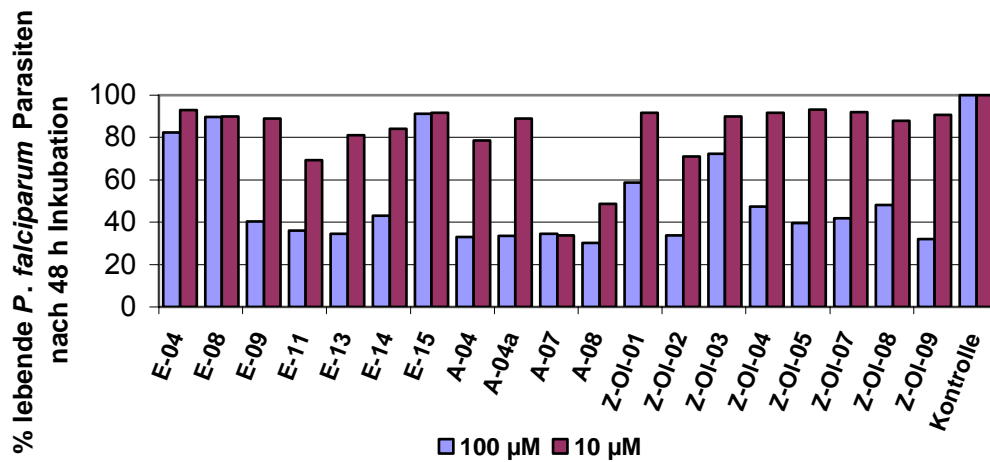


Diagramm 5-5: Antiplasmodiale Aktivität

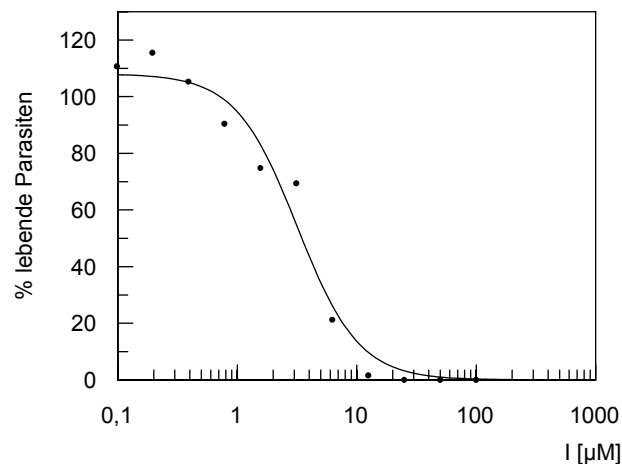


Diagramm 5-6: IC_{50} -Kurve der Hemmung von *P. falciparum* durch A-08

Aufgrund dessen, dass die beiden Aziridine auch die SAP2 hemmen und an den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen Cathepsin L, Cathepsin B und Rhodesain inaktiv sind (vgl. Diagramm 4-17), konnte vermutet werden, dass die antiplasmodiale Aktivität auf die Hemmung der Plasmeptine zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 5.2.3).

5.2.2 Testung an Falcipain 2 und 3

Ein Test an den isolierten Cystein-Proteasen Falcipain 2 und 3 des Malaria-Erregers bestärkt diese Vermutung.

Tabelle 5-2 zeigt, dass die Hälfte der getesteten Verbindungen an Falcipain 2 nur eine sehr schwache Hemmung ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$) aufweist und auch die anderen Verbindungen nur moderate Hemmungen mit IC_{50} -Werten zwischen 30 und 100 μM liefern.

Tab. 5-2: IC_{50} -Werte an den Cystein-Proteasen Falcipain 2 und 3

| Verb. | FP2 ^a | FP3 ^a | Verb. | FP2 ^a | FP3 ^a |
|-----------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| IC_{50} [μM] | | | IC_{50} [μM] | | |
| E-04 | k.H. | 1637 | Z-OI-01 | 67 | 267 |
| E-08 | k.H. | k.H. | Z-OI-02 | 69 | 6690 |
| E-09 | 443 | k.H. | Z-OI-03 | 104 | k.H. |
| E-11 | 373 | k.H. | Z-OI-04 | 1090 | k.H. |
| E-13 | 471 | 1759 | Z-OI-05 | 30 | 58 |
| E-14 | 741 | k.H. | Z-OI-07 | 216 | k.H. |
| E-15 | 455 | 371 | Z-OI-08 | 40 | k.H. |
| A-04 | 93 | k.H. | Z-OI-09 | 60 | k.H. |
| A-04a | 62 | k.H. | ^a 30 min Inkubation E & I k.H. = keine Hemmung | | |
| A-07 | 85 | k.H. | | | |
| A-08 | 51 | k.H. | | | |

An Falcipain 3 sind nahezu alle Verbindungen sogar völlig inaktiv.

Nur die schon an Falcipain 2 aktivste Substanz, das mit Phe-verknüpfte Maleinsäure-Derivat **Z-OI-05** zeigt einen IC_{50} -Wert $< 100 \mu\text{M}$.

5.2.3 Testung an Plasmepsin II

Um die Vermutung, dass tatsächlich die Aspartat-Proteasen des Malaria-Erregers, die Plasmepsine gehemmt werden, zu überprüfen, sollten die beiden Aziridine **A-07** und **A-08** mittels FRET-Assay auf ihre Aktivität an Plasmepsin II (erhalten aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Klebe, Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg) getestet werden.

Dazu wurde zuerst überprüft, ob das Substrat auch für Plasmepsin II geeignet ist. Die Testungen ergaben, dass das Substrat hervorragend durch Plasmepsin II gespalten wird. Massenspektrometrische Untersuchungen lieferten für Plasmepsin II analog zu SAP2 die Spaltung des Substrats zwischen den beiden hydrophoben Phe-Resten.

Die Testung der beiden Inhibitoren erfolgte unter zum Screening an der SAP2 analogen Bedingungen (Volumina, Pipettierreihenfolge Temperatur, Substratkonzentration; vgl. Kapitel 4.6.2.2). Die Endkonzentration des Substrats lag bei 37.5 μM und die der Inhibitoren bei 100 μM . Für das Enzym wurde die Endkonzentration variiert. Einmal betrug sie pro Ansatz

1.5 µg/mL und bei der zweiten Messreihe lag sie bei 2.5 µg/mL. Die Inkubationszeit von Enzym und Substrat lag bei 5 min. Für jede Enzymkonzentration wurden für **A-07** und **A-08** jeweils zwei Messungen durchgeführt. Das Verhältnis der Mittelwerte der aus den Messungen erhaltenen Steigungen zur Steigung einer DMSO-Kontrolle lieferte die prozentuale Hemmung von Plasmeypsin II durch die beiden Aziridine (Diagramm 5-7). Die Standardabweichung liegt dabei unter 10%.

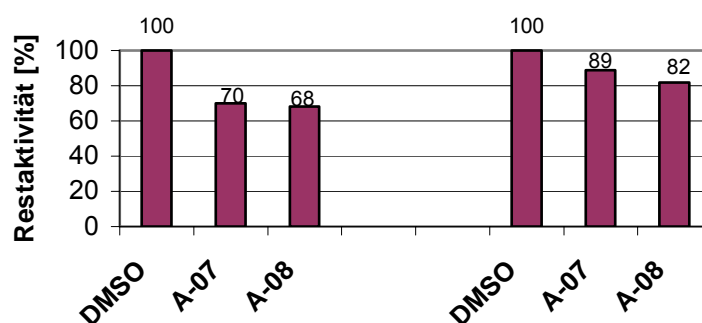


Diagramm 5-7: Hemmung von Plasmeypsin II durch A-07 und A-08

Der Test zeigt, dass die beiden Aziridine im Gegensatz zur vollständigen Hemmung der SAP2 bei 100 µM (vgl. Diagramme 4-9) Plasmeypsin II in dieser Konzentration nur moderat hemmen. Die antiplasmodiale Aktivität kann also nicht ausschließlich auf die Hemmung von Plasmeypsin II zurückgeführt werden.

5.2.4 Diskussion

Am Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* zeigen nur die beiden Aziridine **A-07** und **A-08** eine gute Wirksamkeit. Alle getesteten Z-konfigurierten Olefine und *cis*-Epoxyde sowie andere *cis*-Aziridine sind am Erreger inaktiv.

Die in Tabelle 5-3 noch einmal zusammengefassten Aktivitäten zeigen, dass die beiden antiplasmodial gut wirksamen Aziridine **A-07** und **A-08** an Falcipain 2 nur moderat wirksam, an Falcipain 3 unwirksam und auch an Plasmeypsin II nur schwach aktiv sind.

Tab. 5-3: Aktivität von A-07 und A-08 an *P. falciparum*, Falcipainen 2 und 3 und Plasmeypsin II

| Verb. | <i>P. falciparum</i> IC ₅₀ [µM] | FP2 ^a IC ₅₀ [µM] | FP3 ^a IC ₅₀ [µM] | Plasmeypsin II Hemmung [%] bei 100 µM |
|-------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| A-07 | 10.8 ^b | 84.7 | k.H. | 11 - 30 |
| A-08 | 3.2 ^c | 51.1 | k.H. | 18 - 32 |

k. H. = keine Hemmung; ^a 30 min Inkubation E & I; ^b 48 h Inkubation;
^c 24 h Inkubation

Somit ist der Grund für die gute antiplasmodiale Wirksamkeit der beiden Aziridine **A-07** und **A-08** noch unklar. In Frage kommt eventuell eine Hemmung anderer Plasmepepsine (I und IV).

5.3 Aktivität gegen *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei brucei*

Durch den SFB 630 (Sonderforschungsbereich 630 - Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) ergab sich die Möglichkeit, dass viele der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Substanzen gegen verschiedene Krankheitserreger getestet werden konnten.

Zum einen wurde dabei die Hemmung auf *Trypanosoma brucei brucei*, dem Erreger der Nagana-Seuche bei Rindern untersucht. Ergebnisse, die an *Trypanosoma brucei brucei* erhalten werden, sind übertragbar auf *Trypanosoma brucei gambiense* und *rhodesiense*, den Erregern der afrikanischen Schlafkrankheit, die durch den Stich weiblicher Tsetsefliegen übertragen wird. Desweiteren wurde die Aktivität der Verbindungen auf *Leishmania major*, dem von Sandmücken übertragenen Erreger der Leishmaniose, getestet. Bei den *Leishmanien* handelt es sich um intrazellulär parasitierende Protozoen, die v. a. Leber, Milz, Lymphknoten und das Knochenmark befallen. Die Protozoen von *Trypanosoma brucei* befallen ebenfalls Lymphe und Knochenmark, kommen aber auch im Blut, der Rückenmarksflüssigkeit und dem Gehirn vor. Bekannt ist auch, dass für beide Erreger Papain-ähnliche Cystein-Proteasen eine wichtige Rolle spielen und beide als Wirtszelle die Makrophagen nutzen. Über die Beteiligung von Aspartat-Proteasen bei den Erregern ist bisher nichts bekannt.

Die in Tabelle 5-4 dargestellten Testergebnisse zeigen, dass die Verbindungen eine wesentlich höhere Aktivität an den *Trypanosomen* aufweisen.

Einige Verbindungen sind in der Lage *Trypanosoma brucei TC221* mit IC_{50} -Werten im unteren einstelligen mikromolaren Bereich zu hemmen. Die mit einem IC_{50} -Wert von 0.2 μM beiden aktivsten Verbindungen, das Epoxid **E-09** bzw. das *E*-konfigurierte Olefin **E-OI-04**, wirken jedoch toxisch auf die Makrophagen. Verbindungen, die gegen *Trypanosoma brucei TC221* gut aktiv sind, ohne auf Makrophagen toxisch zu wirken ($IC_{50} > 100 \mu M$), sind die beiden Epoxide **E-04** und **E-08** sowie die beiden Aziridine **A-04** und **A-08**. Die aktivste dieser Verbindungen, die auch mit > 83.3 den höchsten Selektivitätsindex aufweist, ist dabei das mit Phenylalanin verknüpfte Epoxid **E-04** mit einem IC_{50} -Wert von 1.2 μM . Auffallend bei den Testungen an den *Trypanosomen* ist auch, dass das zu **E-04** enantiomere Epoxid **E-14** keinerlei Aktivität zeigt ($IC_{50} > 100 \mu M$) und das diastereomere Epoxid **E-15** zwar an *Trypanosoma brucei TC221* ebenfalls gut aktiv ($IC_{50} = 0.8 \mu M$), aber an Makrophagen

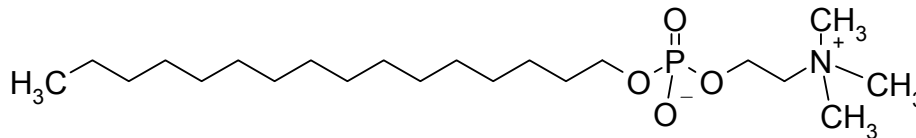
toxisch ist ($IC_{50} = 39.4 \mu\text{M}$). Im Gegensatz zu dem an Makrophagen nicht toxischen Diastereomergemisch des Aziridins **A-04** mit (*R,R*)/(*S,S*)-konfiguriertem Aziridinring ist das enantiomerenreine Pendant **A-04a** mit (*S,S*)-konfiguriertem Aziridinring an den Makrophagen toxisch ($IC_{50} = 39.9 \mu\text{M}$). An *Trypanosomen* sind beide Verbindungen ähnlich aktiv.

Tab. 5-4: IC_{50} -Werte an *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei brucei* und Makrophagen

| Verb. | <i>Leishmania major</i> | Selektivitätsindex | Makrophagen | <i>Trypanosoma brucei TC221</i> | Selektivitätsindex |
|----------------|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | IC_{50} 48 h [μM] | SI* | IC_{50} 48 h [μM] | IC_{50} 48 h [μM] | SI* |
| E-04 | >100 | | >100 | 1.2 | > 83.3 |
| E-08 | >100 | | >100 | 1.7 | > 58.8 |
| E-09 | >100 | < 0.2 | 21.9 | 0.2 | 109.5 |
| E-13 | > 100 | | > 100 | 52.4 | > 1.9 |
| E-14 | > 100 | | > 100 | >100 | |
| E-15 | > 100 | < 0.4 | 39.4 | 0.8 | 49.2 |
| A-04 | >100 | | >100 | 1.8 | > 55.6 |
| A-04a | 35.3 | 1.1 | 39.9 | 2.2 | 18.1 |
| A-07 | >100 | < 0.4 | 40.1 | 5 | 8.0 |
| A-08 | 51.8 | > 1.9 | >100 | 3.9 | > 25.6 |
| A-11 | 33.5 | 1.0 | 32.0 | 2.9 | 11.0 |
| Z-OI-01 | > 100 | | > 100 | >100 | |
| Z-OI-03 | 4.5 | 0.7 | 3.3 | 6.5 | 0.5 |
| Z-OI-04 | 29.9 | 1.1 | 33.9 | 0.6 | 56.5 |
| Z-OI-05 | > 100 | | > 100 | >100 | |
| Z-OI-07 | 52.0 | 0.6 | 31.4 | 12.5 | 2.5 |
| Z-OI-08 | 72.0 | 0.4 | 31.0 | 2.9 | 10.6 |
| Z-OI-09 | 36.8 | 1.1 | 41.0 | 2.4 | 16.8 |
| Z-OI-10 | 3.6 | 0.8 | 3.0 | 2.5 | 1.2 |
| Z-OI-12 | > 100 | | > 100 | 56.3 | > 1.8 |
| Z-OI-13 | > 100 | < 0.3 | 32.0 | 2.2 | 14.9 |
| Z-OI-14 | > 100 | | > 100 | 19.9 | > 5.0 |
| E-OI-01 | > 100 | | > 100 | 15.0 | > 6.7 |
| E-OI-02 | n.b. | | 45.2 | 2.6 | 17.7 |
| E-OI-03 | n.b. | | 36.1 | 23.8 | 1.5 |
| E-OI-04 | n.b. | | 3.5 | 0.2 | 17.5 |

* SI = IC_{50} (Makrophagen) / IC_{50} (Parasiten)

Mit dem Aziridin **A-08** zeigt nur eine Substanz Aktivität an *Leishmania major* ohne dabei die Makrophagen zu schädigen. Mit einem IC_{50} -Wert von $51.8 \mu\text{M}$ ist **A-08** an den *Leishmanien* weniger aktiv als der als Standardtherapeutikum eingesetzte Arzneistoff Miltefosin (Abb. 5-1),^[202] zeigt aber an Makrophagen auch keine so hohe Toxizität. Vergleicht man den Selektivitätsindex schneidet das Aziridin **A-08** sogar besser ab.



$$IC_{50}\text{-Wert}_{Leishmania\ major} = 33\ \mu\text{M} \quad IC_{50}\text{-Wert}_{Makrophagen} = 39\ \mu\text{M} \quad SI = 1.2$$

Abb. 5-1: Struktur von Miltefosin: Standardarzneistoff bei *Leishmania major*

Beim Vergleich der an *Leishmania major* und an Makrophagen ermittelten IC_{50} -Werte der Verbindungen mit denen des Miltefosins zeigen sich für das Aziridin **A-04a** und die beiden Z-konfigurierten Olefine **Z-OI-04** und **Z-OI-09** fast identische Werte.

Die annähernd gleichen IC_{50} -Werte an Makrophagen für **Z-OI-03** und das E-Analogon **E-OI-04** lassen erkennen, dass die Konfiguration der Olefine keinen Einfluss auf die Toxizität hat.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Werte, auch zwischen sehr ähnlichen Verbindungen, lässt sich keine allgemeingültige Aussage bezüglich der Hemmung auf *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei* TC221 treffen. Auch der Grund für die Hemmungswirkung von **A-08** auf *Leishmania major* bleibt unklar, da **A-07**, das sich von **A-08** nur durch den Austausch der Aminosäure Phe gegen Val unterscheidet, an *Leishmania major* inaktiv und sogar an Makrophagen toxisch ist. Die einzige erkennbare Tendenz, die sich zeigt, ist, dass die Olefine, egal ob Z- oder E-konfiguriert, entweder nahezu inaktiv an *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei* TC221 oder aber relativ bis extrem toxisch gegenüber Makrophagen sind.

5.4 Aktivität gegen Bakterien

5.4.1 Wachstumshemmung

In einem weiteren Projekt innerhalb des SFB 630 wurden im Arbeitskreis von PD Dr. Wilma Ziebuhr, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, sog. Problemkeime, zu denen die gramnegativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, sowie die grampositiven *Staphylococcus*-Arten *S. aureus* (Linie 325 und 8325) und *S. epidermidis* (Linie RP-62) gehören, untersucht. Bei diesen „Krankenhaus-Erregern“ wird zum einen die Wachstumshemmung von Bakterien untersucht. Das Hemmvermögen der Substanzen wird dabei in der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) ausgedrückt, derjenigen minimalen

Inhibitorkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum mehr auftritt. Liegt die MHK einer Verbindung über 160 μM gilt diese als inaktiv. Keine einzige der getesteten Verbindungen hemmt nach dieser Definition das Wachstum der beiden gramnegativen Keime, wohingegen grampositive Keime teilweise gehemmt werden (vgl. Tab. 5-5).

5.4.2 Biofilmbildungshemmung

Neben der Hemmung des Bakterienwachstums ist auch die Hemmung der Biofilmbildung, die nach einem bekannten Verfahren durch Messung der optischen Dichte des Biofilms bei 490 nm im Vergleich zu einer Referenz ermittelt wird,^[203] ein Ziel. Die grampositiven Keime *Staphylococcus aureus* und *S. epidermidis* sind in der Lage Biofilme auszubilden. Grund dafür ist das Polysaccharid PIA (*Polysaccharid interzellulärer Adhäsion*), das den Kontakt der Bakterienzellen untereinander vermittelt.^[203,204]

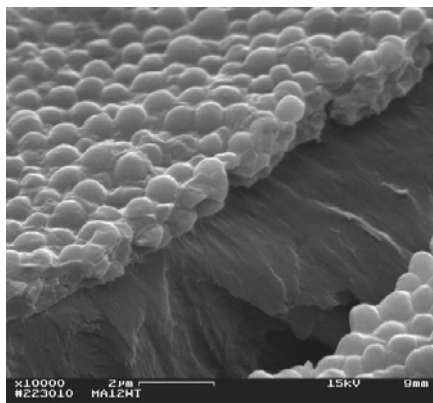


Bild 5-1: Biofilm auf einer Wunde (Bild zur Verfügung gestellt von PD Dr. Wilma Ziebuhr, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg)

Biofilme ermöglichen es den Bakterien, sich an Beatmungsschläuchen, Kathetern und Implantaten oder auf Wundoberflächen festzusetzen, und erhöhen zudem die Resistenz gegenüber Antibiotika um bis zu 500-fach, da der Biofilm ein Diffusionshindernis darstellt.

5.4.3 Diskussion

Die meisten der getesteten Verbindungen zeigen keinerlei Hemmung des Bakterienwachstums bzw. der Biofilmbildung. Alle getesteten Aziridine und Epoxide sind völlig inaktiv und nur drei Z-Olefine **Z-OI-03**, **Z-OI-04** und **Z-OI-10** aus der Gruppe der Maleate waren in der Lage, das Wachstum und die Biofilmbildung zu hemmen. Auffallend ist, dass die Verbindungen selektiv gegenüber grampositiven Bakterien sind. Keine der Verbindungen zeigte eine Hemmung der gramnegativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Für die aktivste Verbindung, den Phenylalanin-substituierten Maleinsäurester **Z-OI-03** lag die MHK für alle drei grampositiven Erreger bei 10 μM . Bei den Olefinen **Z-OI-03** und **Z-OI-10** war noch eine Hemmung der Biofilmbildung zu beobachten,

als die Substanzen bereits keine Wachstumshemmung mehr zeigten. Am aktivsten war wiederum **Z-OI-03** mit einer Biofilmbildungshemmung von 90% bei einer Konzentration von 2.5 μM (vgl. Tab. 5-5).

Da das Target noch nicht bekannt ist, kann über die strukturellen Anforderungen an die Inhibitoren nur spekuliert werden. Die Testergebnisse der drei relativ ähnlichen Verbindungen, die sich nur in der AS- bzw. Peptidseitenkette unterscheiden, zeigen, dass Phe (**Z-OI-03**) besser ist als Phe-Ala (**Z-OI-10**) und dieses wiederum besser als Val (**Z-OI-04**), was für eine Bevorzugung lipophiler Reste spricht. Da im Gegensatz dazu aber Aziridine und Epoxide mit analogen AS- bzw. Peptidseitenkette völlig inaktiv sind, stellt sich die Frage wie wichtig das Michael-System der drei aktiven Verbindungen für die Hemmung ist. Ist das Target der Biofilmbildung, wie spekuliert wurde,^[205] die Sortase, eine Cystein-Transpeptidase, könnte ein solches α,β -ungesättigtes System essentiell für die Hemmung sein. Offen bleibt aber in diesem Fall, warum die aktiven Olefine Z-konfiguriert sind, wohingegen das E-Analogon **E-OI-04** des aktivsten Olefins **Z-OI-03** keinerlei Hemmung zeigt, obwohl für die Hemmung von Cystein-Proteasen eigentlich die *trans*-Konfiguration essentiell ist.

Eine Erklärung, warum die Z-konfigurierten Olefine das Wachstum und die Biofilmbildung grampositiver Bakterien hemmen, liefert eventuell der Test der aktiven Z-Olefine an Nierenepithelzellen. Alle drei Verbindungen zeigten eine hohe Toxizität mit IC_{50} -Werten im unteren mikromolaren Bereich (**Z-OI-03**: $2.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$; **Z-OI-04**: $5.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$; **Z-OI-10**: $1.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$). Desweiteren wirken sie auch gegenüber Makrophagen sehr toxisch (vgl. Tab. 5-4).

Die Wachstums- und Biofilmbildungshemmung der Verbindungen könnte also auf deren akute Toxizität zurückzuführen sein.

Tab. 5-5: Wachstums- und Biofilmhemmung an verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien

| Verb. | Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest) | | | | | Biofilm-Test | |
|---------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a | | | | | % Hemmung (μM) | |
| | <i>S. aur.</i> 325 | <i>S. aur.</i> 8325 | <i>S. epiderm.</i> RP 62 | <i>E. coli</i> 536 | <i>P. aerugin.</i> Nr. 3 | <i>S. aur.</i> 325 | <i>S. epiderm.</i> RP 62 |
| E-04 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 70 (160) | 0 (160) |
| E-08 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| E-09 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 90 (160) | 0 (160) |
| E-13 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| E-14 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| E-15 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| A-04 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 95 (160) | 0 (160) |
| A-07 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 85 (160) | 0 (160) |
| A-08 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 95 (160) | 0 (160) |
| A-11 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 95 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-01 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 40 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-03 | 10 | 10 | 10 | > 160 | > 160 | 100 (160, 10) 90 (2.5) | 100 (160, 10) 0 (5) |
| Z-OI-04 | 20 | 40 | 40 | > 160 | > 160 | 100 (160) 95 (20, 10) | 100 (160); 95 (80) 0 (40) |

Fortsetzung Tab. 5-5: Wachstums- und Biofilmmhemmung an verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien

| Verb. | Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest) | | | | | Biofilm-Test | |
|---------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a | | | | | % Hemmung (μM) | |
| | <i>S. aur.</i> 325 | <i>S. aur.</i> 8325 | <i>S. epiderm.</i> RP 62 | <i>E. coli</i> 536 | <i>P. aerugin.</i> Nr. 3 | <i>S. aur.</i> 325 | <i>S. epiderm.</i> RP 62 |
| Z-OI-05 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 40 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-07 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 50 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-08 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-09 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-10 | 40 | 40 | 40 | > 160 | > 160 | 100 (40); 90 (20) 0 (10) | 100 (40); 80 (20) 0 (10) |
| Z-OI-12 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 0 (160) | 0 (160) |
| Z-OI-13 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 25 (160) | 50 (160) |
| Z-OI-14 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 50 (160) | 20 (160) |
| E-OI-01 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 50 (160) | 50 (160) |
| E-OI-02 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 50 (160) | 0 (160) |
| E-OI-03 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 30 (160) | 0 (160) |
| E-OI-04 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | > 160 | 70 (160) | 0 (160) |

n.g. = noch nicht getestet, ^a MHK > 160 μM = nicht wachstumshemmend

6. Docking

Um die Ergebnisse aus den Assays an der SAP2 und die relevanten Wechselwirkungen zwischen einem potentiellen Inhibitor und dem Enzym besser verstehen zu können, wurden von Josef Scheiber aus dem Arbeitskreis PD Dr. Knut Baumann Docking-Experimente einiger Verbindungen an das aktive Zentrum der SAP2 mit Hilfe des Dockingprogramms FlexX[®][206] sowie der OpenEye Scientific Software FRED[®] (Fast Rigid Exhaustive Docking)^[207] durchgeführt. FlexX[®] zerschneidet die Inhibitoren in Bruchstücke und setzt diese in der Konformation wieder zusammen, in der der Energiegewinn bei der Bindung an das Enzym (scoring function) am größten ist.^[208] FRED[®] dagegen passt den kompletten Inhibitor auf einmal in die Bindungstasche ein. Für die Konformationssuche als Eingabe für FRED wurde die OpenEye Scientific Software Omega[®][207] verwendet. Als Vorlage für das Docking diente die Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes von SAP2 mit dem Inhibitor A-70450 (PDB: 1ZAP).^[46,209] Als Bindungstasche wurde bei dem Docking mit FlexX[®] ein Bereich im Radius von 8 Å um die beiden katalytisch aktiven Aspartat-Reste Asp32 und Asp218 sowie den Aspartat-Rest Asp86 am Zugang zum aktiven Zentrum definiert. Beim Docking mit FRED[®] wurde als Bindungstasche die Region, die sich innerhalb eines Radius von 8 Å um den co-kristallierten Liganden A-70450 befand, definiert.

Die vermuteten Bindungsmodi einiger Verbindungen sind nachfolgend dargestellt. Mit dem Programm VIDA[®][207] ist dabei das nach der scoring function am besten in die Bindungstaschen passende Molekül gezeigt. Besonderes Augenmerk wurde vor allem auf den Abstand des elektrophilen Bausteins zu den drei Aspartat-Resten gelegt. Wichtig dabei war, dass der elektrophile Baustein näher an den beiden katalytisch aktiven Resten Asp32 bzw. Asp218 lag, da zwischen diesen Gruppen ja die kovalente Bindung ausgebildet werden soll. Desweiteren wurde die Lage der Moleküle in den relevanten Substratbindungstaschen S2, S1 und S1' betrachtet.

6.1 Epoxide

Die Docking-Studien der Epoxide zeigen, dass bei fast allen Epoxiden die Phenylreste des Benzylesters und / oder der AS in der großen S3b-Tasche liegen. Dies führt dazu, dass der elektrophile Ring zu weit von den katalytisch aktiven Aspartat-Resten Asp32 und Asp218 entfernt ist, um zu interagieren.

Nur die beiden Epoxide, die am Ring zusätzlich einen Phenylrest tragen, weisen eine andere Lage in den Bindungstaschen auf (Abb. 6-1).

Der Phenylrest am Epoxidring bewirkt durch seinen größeren räumlichen Anspruch im Vergleich zur einzelnen Methylgruppe in den anderen Epoxiden eine Drehung des gesamten Moleküls. Dies führt dazu, dass der Phenylrest der AS Phe in die S1-Tasche ragt

und der Phenylrest des Benzylesters mit der S1'-Tasche interagiert. Der Abstand des Epoxidrings zum katalytisch aktiven Asp218 beträgt 4.81 Å.

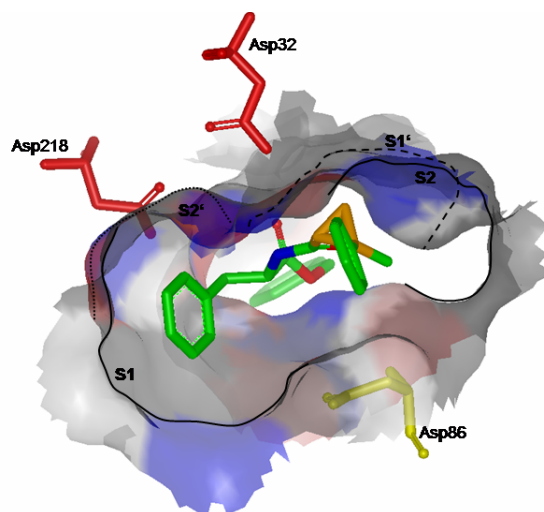


Abb. 6-1: Bindungsmodus von E-23-*t* an der SAP2

6.2 Olefine

Die Lage der Olefine in den Bindungstaschen gestaltet sich sehr variabel.

Beim *Z*-konfigurierten Olefin **Z-OI-08** liegt der Phenylrest des einen Benzylesters zwar gut in der S2-Tasche, der zweite AS-Rest auf der anderen Seite des Vinyldiamids ist aber zu groß und passt nicht mehr in die S1-Tasche.

Das monosubstituierte Olefin **Z-OI-03**, bei dem der Phenylrest der AS Phe in der S1-Tasche lokalisiert ist, ist dagegen zu klein, um auch in andere Taschen gut hineinzupassen (Abb. 6-2). Aufgrund dieser zu geringen Wechselwirkungen ist auch die Doppelbindung des elektrophilen Michael-Systems von den Aspartat-Resten relativ weit entfernt. Die Entfernung zum Asp86 beträgt 5.05 Å und der Abstand zum Asp218 liegt bei 6.15 Å.

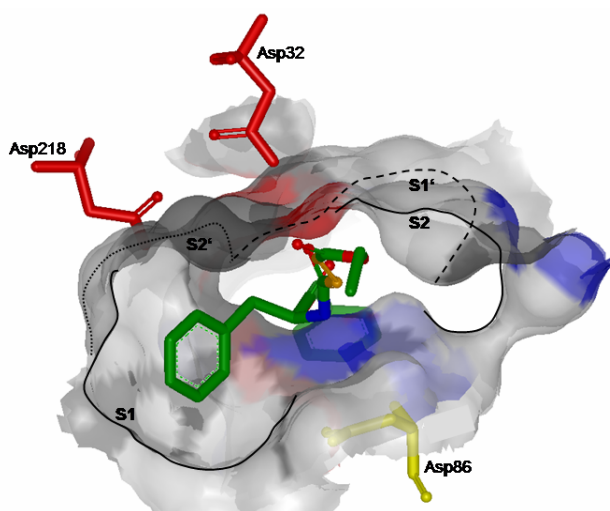


Abb. 6-2: Bindungsmodus von Z-OI-03 an der SAP2

In Abbildung 6-3 ist die Lage des *E*-Analogon zu **Z-OI-03** zu sehen. Nahezu identisch zu seinem Analogon liegt **E-OI-04** in den Bindungstaschen. Auch der Abstand der Doppelbindung ist mit 6.59 Å zu Asp218 und 5.65 Å zu Asp86 ziemlich ähnlich. Das Docking zeigt also keine großen Unterschiede zwischen der *Z*- und *E*-Konfiguration der Olefine, während der Enzymassay an der SAP2 für den *E*-konfigurierten Inhibitor eine wesentlich bessere Hemmung liefert als für das nahezu inaktive *Z*-konfigurierte Olefin (vgl. Kapitel 4.6.2).

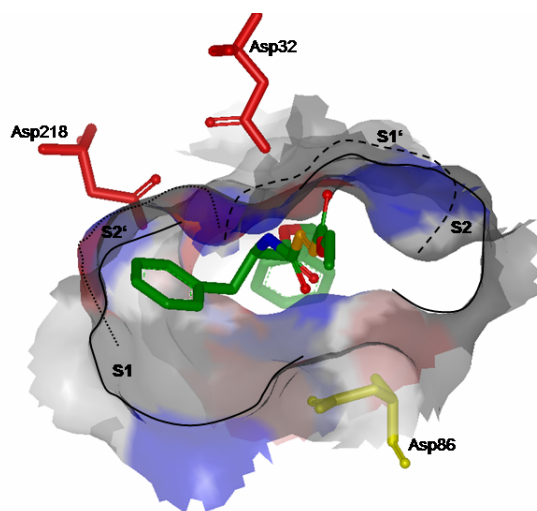


Abb. 6-3: Bindungsmodus von *E*-OI-04 an der SAP2

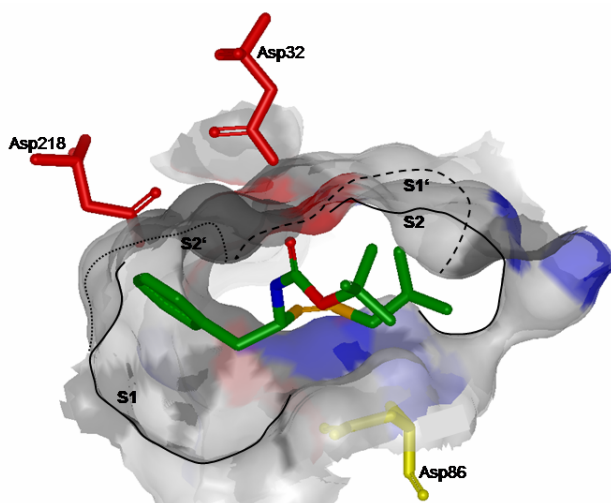


Abb. 6-4: Bindungsmodus von *Z*-OI-02 an der SAP2

Für das an SAP2 aktivste *Z*-Olefin **Z-OI-02** liefert das Docking den in Abbildung 6-4 gezeigten Bindungsmodus. Der hydrophobe Phenylrest der AS liegt wie bei vielen Olefinen in der S1-Tasche. Die nur in dieser Verbindung vorliegende Alkylseitenkette auf der anderen Seite der Doppelbindung sowie die Boc-Schutzgruppe der AS bewirken eine

Interaktion mit der S2-Tasche. Dadurch wird die Affinität zum Enzym zwar erhöht, die Doppelbindung jedoch näher an den Aspartat-Rest Asp86 am Zugang zum aktiven Zentrum gebracht. Der Abstand ist aber mit über 6 Å zu groß für die Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die bessere Hemmung der SAP2 im Vergleich zu anderen *Z*-Olefinen ist somit eher auf die erhöhte Affinität zum Enzym zurückzuführen.

6.3 Aziridine

In Analogie zu den Ergebnissen des fluorimetrischen Assays an der SAP2 zeigt auch das Docking für die Aziridine die besten Positionen in den Bindungstaschen. Allerdings sind den Aziridinen dabei Grenzen in Bezug auf ihre Größe gesetzt. Da bei den Aziridinen immer Diastereomergemische erhalten wurden, wurden auch jeweils beide Diastereomere (Aziridinring (*R,R*)- bzw. (*S,S*)-konfiguriert) gedockt. Die für die Diastereomere kaum unterschiedlichen Docking-Ergebnisse stehen in Analogie zu den im FRET-Assay an der SAP2 erhaltenen nahezu identischen Aktivitäten für das Paar **A-04** und **A-04a** bzw. für das durch SC angetrennte Diastereomerenpaar **A-07** und **A-07'** (vgl. Diagramme 4-9).

Das Docking liefert einen Hinweis, warum die eigentlich zur Steigerung der Affinität zum Enzym mit den Peptidsequenzen Phe-Ala-Leu (P1'-P3') und Phe-Leu-Ala-Pro (P1-P4) versehenen Aziridinen **A-13** und **A-14** eine schlechtere Aktivität als erwartet aufweisen. Der rigide Aziridinring bewirkt eine andere Anordnung der Peptidkette als im Substrat und führt dazu, dass die zu unflexible Peptidseitenkette nicht mehr in die Bindungstaschen passt. Am Beispiel von **A-13** ist dies deutlich zu sehen (Abb. 6-5). Der Phenylrest der 1. AS Phe und der Phenylrest am Aziridinring reichen zwar in die S2-Tasche des Enzyms, die Seitenkette der AS Leu ist jedoch deutlich zu groß für die S1-Tasche und auch die Phenylgruppe des Benzylesters passt nicht in die S1-Tasche, sondern dreht sich in die große S3b-Tasche. Durch die schlechte Lage in den Bindungstaschen liegt der elektrophile Aziridinring sozusagen im „Niemandland“ zwischen den drei Aspartat-Resten.

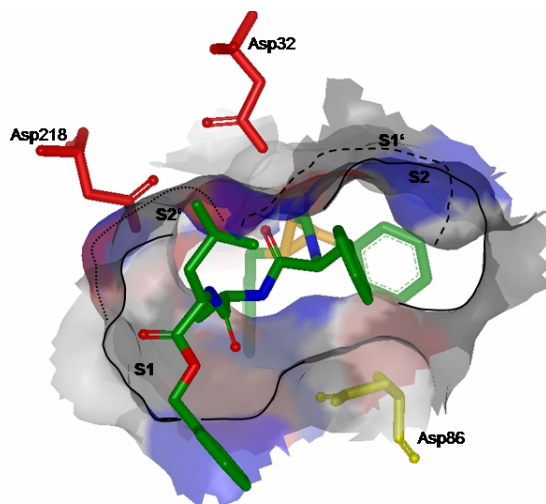


Abb. 6-5: Bindungsmodus von A-13 an der SAP2

Am besten passen die *N*-benzylierten und nur mit einer einzelnen AS substituierten Aziridine in das Enzym. Das Aziridin **A-04** (Abb. 6-6), das eine Methylgruppe am Ring trägt, zeigt dabei jedoch eine andere Anordnung als das einen Phenylrest am Ring aufweisende **A-08** (Abb. 6-7).

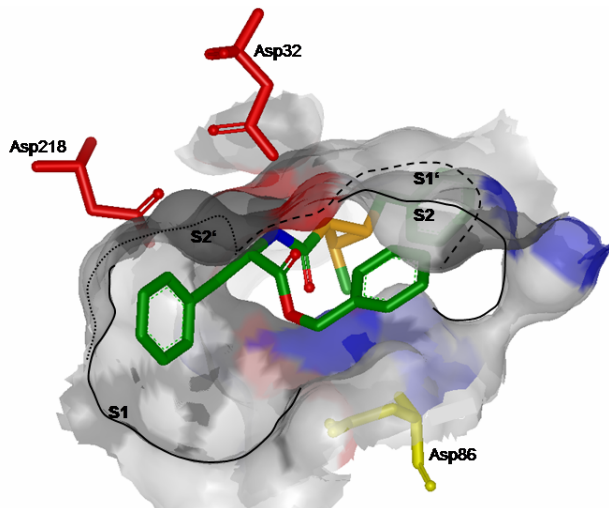


Abb. 6-6: Bindungsmodus von A-04 an der SAP2

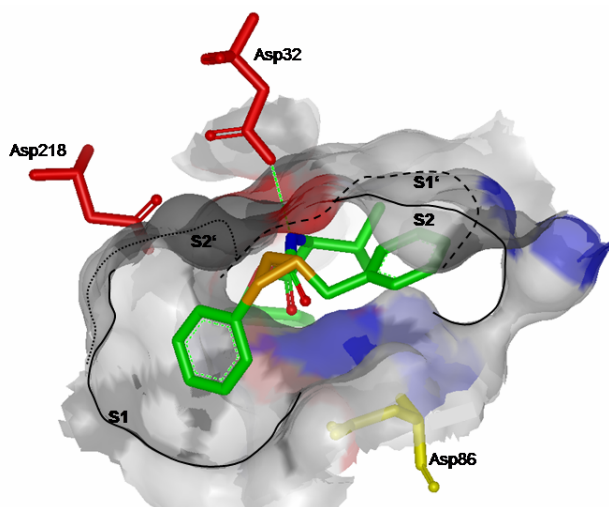


Abb. 6-7: Bindungsmodus von A-08 an der SAP2

Bei **A-04** liegt der Phenylrest der AS Phe in der S1-Tasche, die Phenylgruppe des Benzylesters in der S2-Tasche und der Benzylrest am Stickstoff in der S1'-Tasche. Die Verbindung liegt also gut in den drei entscheidenden Bindungstaschen. In dieser Anordnung befindet sich der elektrophile Aziridinring im Abstand von 4.1 Å zum katalytisch aktiven Aspartat-Rest Asp32.

Für **A-08** ändert sich durch den Phenylrest am Aziridinring, der in die S1-Tasche bindet, die Anordnung in den Bindungstaschen. Der Benzylrest am Stickstoff liegt dadurch nicht mehr

wie bei **A-04** in der S1'-, sondern in der S2-Tasche. Bei dieser Anordnung passen nicht nur die hydrophoben Reste besser in die hydrophoben Bindungstaschen, sondern der Aziridinring wird auch zu den katalytisch aktiven Aspartat-Resten dirigiert. Durch die ebenfalls stärkere Annäherung der in die S1'-Tasche ragende AS an die Aspartat-Reste kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Asp32 und der NH-Funktion des Amids. Durch die verstärkten Wechselwirkungen und die bessere Lage im Enzym verringert sich der Abstand zwischen dem elektrophilen Aziridinring und dem katalytisch aktiven Aspartat-Rest Asp218 auf 3.6 Å.

Die bessere Lage von **A-08** in den Bindungstaschen, die nachfolgend noch einmal schematisch dargestellt ist (Abb. 6-8), erklärt eindeutig, warum die Verbindung an der SAP2 am aktivsten ist (vgl. Tab. 4-3).

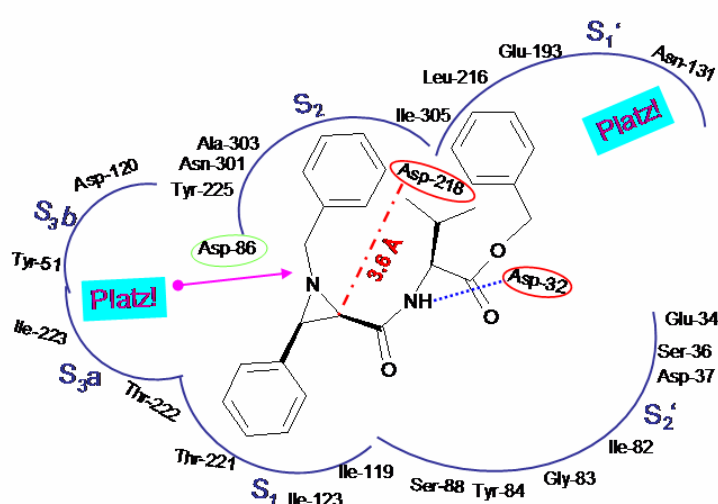


Abb. 6-8: Schematische Darstellung des R,R-konfigurierten A-08 in den SAP2-Bindungstaschen

Anhand des Dockings zeigt sich, dass vor allem eine große Anzahl hydrophober Reste die Affinität zum Enzym erhöht. Allerdings müssen die Moleküle flexibel genug sein um sich den Bindungstaschen anpassen zu können.

Andererseits liefert das Docking aber auch die Aussage, dass noch reichlich Möglichkeit zur Verbesserung der Affinität zwischen Inhibitor und Enzym vorhanden ist. So bieten, wie die schematische Darstellung sehr augenscheinlich macht, die S1'- sowie die S3-Taschen noch großen Raum für neue, besser passende Inhibitoren.

Ein erster, schon in Angriff genommener Ansatz, ist der Einbau von Methylenebrücken zwischen dem Aziridinring und den beiden Substituenten Phenyl und Amid (vgl. Kapitel

3.4.4.1.2). Das Docking liefert für diese Veränderung am Aziridin eine bessere Anpassung an die Bindungstaschen. Neben der S1- und S2-Tasche, in die auch **A-07** und **A-08** gut binden, wird durch die Benzylreste des Rings und des Stickstoffs die S1'-Tasche des Enzyms besser genutzt.

Weitere Ansätze zur möglichen Verbesserung der Affinität zur S1'-Tasche sind die Verknüpfung des gut in die S1- und S2-Tasche passenden Aziridinbausteines **A-05** mit hydrophoben *D*-AS (*D*-Val bzw. *D*-Phe), deren Seitenketten tiefer in die Tasche reichen sollten. Die großen S3-Taschen könnten durch längere oder verzweigte hydrophobe Reste am Stickstoff besser mit einbezogen werden.

Momentan laufen Docking-Studien sowie Synthesen um diese Hypothesen zu unterstützen.

7. Diskussion der Ergebnisse und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Im folgenden Kapitel wird versucht, die Hemmdaten systematisch nach bestimmten Kriterien zu analysieren. Dafür wird der Einfluss der Stereochemie, der Substituenten am elektrophilen System sowie der Einfluss der AS- / Peptidseitenketten auf die Hemmung der SAP2 untersucht. Auch die Selektivität zwischen Aspartat-Proteasen und Cystein-Proteasen wird verglichen. Desweiteren werden die Hemmeigenschaften der verschiedenen elektrophilen Systeme (Aziridine, Epoxide, Olefine) in Augenschein genommen.

7.1 Selektivität bezüglich der Enzyme

7.1.1 Aspartat-Proteasen vs. Cystein-Proteasen

Die *cis*-Aziridine, *cis*-Epoxide und *Z*-Olefine, die alle als potentielle Inhibitoren der sekretorischen Aspartat-Protease SAP2 des Hefepilzes *Candida albicans* synthetisiert wurden, weisen erfreulicherweise eine Selektivität gegenüber Aspartat-Proteasen auf.

Nur eine einzige, an der SAP2 aktive Verbindung (vgl. Tab. 4-3), nämlich das *E*-Olefin **E-OI-04**, das eigentlich nur als Vorstufe für die Synthese *cis*-konfigurierter Aziridine vorgesehen war, zeigt eine Hemmung an den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen. Die Verbindung weist dabei eine leichte Bevorzugung von Cathepsin L auf. Von den als Aspartat-Protease-Inhibitoren synthetisierten Verbindungen zeigt nur das *Z*-Analogon zu **E-OI-04**, **Z-OI-03** eine moderate Hemmung der Cystein-Protease Cathepsin L. Der Grund für die Hemmung beider Substanzen ist das mit dem α,β -ungesättigten Michael-System verknüpfte Phenylalanin, das mit der hydrophoben S2-Tasche des Enzyms interagieren kann (vgl. Kapitel 4.7).

Die an der SAP2 aktivsten Verbindungen, die Aziridine **A-07** und **A-08**, sind an den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen völlig unwirksam.

7.2 Einfluss der Stereochemie

7.2.1 Einfluss der Konfiguration am Dreiring

Der Vergleich des Einflusses der Konfiguration am Ring ist nur bei einigen Epoxiden und bei den Aziridinen, bei denen die Diastereomere durch SC angereichert werden konnten bzw. die diastereomerenrein synthetisiert wurden, möglich. Der Vergleich der Epoxide mit unterschiedlicher Konfiguration am Dreiring lässt nur eine vage Aussage zu, da die beiden Epoxide **E-14** und **E-15** mit (*S,S*)-Konfiguration im Gegensatz zu den völlig inaktiven (*R,R*)-konfigurierten Epoxiden **E-04** und **E-13** im Screening an der SAP2 auch nur eine Hemmung von 5 bzw. 13% zeigen (vgl. Diagramme 4-9). Bei den Aziridinen **A-04** (ca. 1 / 1-Gemisch) und **A-04a** (Isomer mit (*S,S*)-Konfiguration am Ring) und auch bei den angereicherten

Diastereomeren **A-07** (Verhältnis der Diastereomere 3.4 / 1) und **A-07'** (1 / 2.4) findet man kaum Unterschiede in der Hemmstärke, so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide Diastereomere ähnlich gut wirksam sind. Bestätigt wird dies durch die Docking-Studien, die für alle diese Diastereomere ähnliche Bindungsmodi postulieren. Im Gegensatz dazu findet man bei den angereicherten Diastereomeren **A-13** (Verhältnis der Diastereomere 3.3 / 1) und **A-13'** (1 / 10.4) eine bessere Hemmung (40% bei 100 μ M) durch das 3.3 / 1-Gemisch **A-13**. Dies deutet darauf hin, dass hier tatsächlich eines der beiden Diastereomere eine deutlich bessere Hemmstärke aufweist.

7.2.2 Einfluss der Konfiguration der Aminosäure

Nur bei den vier enantiomeren- und diastereomerenrein dargestellten Epoxiden **E-04**, **E-13**, **E-14** und **E-15** wurde die Konfiguration der Aminosäure variiert. Die aus *D*- bzw. *L*-Threonin stereoselektiv erhaltenen (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-konfigurierten elektrophilen Bausteine wurden mit *D*-Phe bzw. *L*-Phe verknüpft. Vergleicht man die Hemmwerte der beiden aktiveren diastereomeren Epoxide **E-14** (*D*-AS) und **E-15** (*L*-AS), zeigt das letztere einen minimal besseren Wert. Da für beide Epoxide die Hemmung der SAP2 aber nur um die 10% liegt, kann nicht verallgemeinert werden, dass *L*-konfigurierte AS die Hemmung verbessern.

Für den Einfluss der Konfiguration der AS auf die Hemmung der SAP2 scheint außerdem entscheidend, mit welchem elektrophilen Baustein die AS verknüpft ist. Das Docking liefert für die beiden an der SAP2 aktivsten Verbindungen **A-07** und **A-08**, die mit *L*-Phe bzw. *L*-Val verknüpft sind, den Hinweis, dass *D*-konfigurierte AS eine bessere Lage der Verbindungen in der S1'-Tasche und somit eine bessere Affinität zum Enzym bewirken müssten.

7.2.3 Einfluss der *Z* / *E*-Konfiguration bei Olefinen

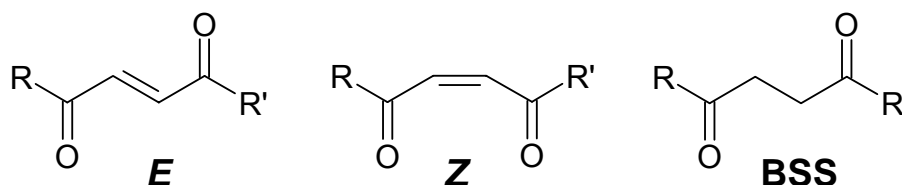
Der Vergleich der beiden *Z* / *E*-konfigurierten Olefin-Paare **Z-OI-03** und **E-OI-04** sowie **Z-OI-08** und **E-OI-05**, bei denen es sich jeweils um Phe-substituierte Olefine mit Michael-System handelt, liefert eine eindeutige Bevorzugung der *E*-Konfiguration für die Hemmung der SAP2.

Im Gegensatz zum Docking, das für die Olefin-Paare kaum Unterschiede bei der Lage in den Bindungstaschen und bei den Abständen zu den Aspartat-Resten zeigt, liefert der Enzymassay an der SAP2 wesentlich bessere Hemmwerte für die *E*-konfigurierten Analoga. Beim ersten Paar, **Z-OI-03** und **E-OI-04**, zeigt sich das *Z*-Olefin nahezu inaktiv im Screening an der SAP2, wohingegen **E-OI-04** eine gute zeitabhängige Hemmung aufweist (vgl. Tab. 7-1).

Beim zweiten Paar ist die Hemmung im Screening nahezu gleich (vgl. Tab. 7-1). Im Gegensatz zu **Z-OI-08**, für das keine eindeutige zeitabhängige Hemmung beobachtet

wurde, zeigen die sinkenden IC_{50} -Werte bei längerer Inkubation für **E-OI-05** eine klare Zeitabhängigkeit. Mit einem k_{2nd} -Wert von $15870 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ stellt **E-OI-05** nicht nur die aktivste Verbindung im Vergleich der beiden *Z*- / *E*-konfigurierten Olefin-Paare, sondern auch das aktivste Michael-System dar.

Tab. 7-1: Vergleich *Z*- / *E*-konfigurierter Olefine und der Wichtigkeit der Doppelbindung



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] | | | k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] |
|----------------|--------|--------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|
| | | | bei [I] = 100 μM 5 min* | IC_{50} [μM] 5 min* | IC_{50} [μM] 35 min* | |
| Z-OI-03 | EtO | PheOBn | 4 ± 1 | | | |
| Z-OI-08 | BnOPhe | PheOBn | 84 ± 3 | 102 ± 4 [§] | n.b. | |
| E-OI-04 | EtO | PheOBn | 68 ± 3 | 67 ± 10 | 18 ± 2 | 6900 ± 1610 |
| E-OI-05 | BnOPhe | PheOBn | 95 ± 2 | 27 ± 3 | 18 ± 2 | 15870 ± 1210 |
| BSS-01 | EtO | PheOBn | 5 ± 1 | | | |

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe;
[§] keine zeitabhängige Hemmung beobachtet.

Der Vergleich der *Z*- / *E*-Konfiguration zeigt deutlich, dass nicht wie angenommen, die *Z*-Konfiguration bei Michael-Systemen entscheidend für die Aktivität ist, sondern sogar die *E*-Konfiguration der Doppelbindungs-Systeme von Vorteil ist. Dies steht im Gegensatz zur *cis*-Konfiguration der Heterocyclen, die ein „Muss“ für die Hemmung von Aspartat-Proteasen ist.

Desweiteren zeigen die besseren Hemmwerte für die zweifach Phe-substituierten Olefine auch die Wichtigkeit des Einflusses einer zweiten hydrophoben AS am Michael-System (EtO \ll PheOBn, vgl. Tab. 7-1).

Die Inaktivität der Verbindung **BSS-01** zeigt, dass die Doppelbindung essentiell für die Hemmung ist.

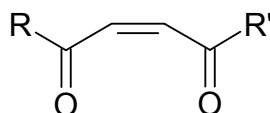
7.3 Einfluss der Substituenten

7.3.1 *Z*-Olefine

Die beiden Phe-substituierten *Z*-Olefine **Z-OI-03** und **Z-OI-05** boten die Möglichkeit den unterschiedlichen Einfluss von Ethylester und freier Säure zu vergleichen. Die Verbindung **Z-OI-05** mit der freien Säurefunktion zeigt eine um 24% höhere Aktivität an der SAP2 im Screening (vgl. Tab. 7-2). Da jedoch keine anderen Vergleiche in diese Richtung

durchgeführt wurden, ist unklar inwieweit eine freie Säuregruppe die Hemmwirkung auf die Aspartat-Protease SAP2 beeinflusst.

Tab. 7-2: Vergleich der Substituenten der *Z*-Olefine



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] | | IC ₅₀ [μM] | IC ₅₀ [μM] | k _{2nd} [M ⁻¹ min ⁻¹] |
|----------------|--------|-----------------|------------------|--------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| | | | bei [I] = 100 μM | 5 min* | | | |
| Z-OI-03 | EtO | PheOBn | | 4 ± 1 | | | |
| Z-OI-04 | EtO | ValOBn | | 19 ± 2 | | | |
| Z-OI-05 | HO | PheOBn | | 28 ± 2 | | | |
| Z-OI-08 | BnOPhe | PheOBn | | 84 ± 3 | §102 ± 4 | n.b. | |
| Z-OI-09 | BnOLeu | PheOBn | | 56 ± 4 | §144 ± 10 | n.b. | |
| Z-OI-10 | EtO | PheAlaOBn | | 3 ± 1 | | | |
| Z-OI-11 | EtO | PheAlaLeuOBn | | k.H. | | | |
| Z-OI-13 | BnOPhe | PheAlaOBn | | 55 ± 3 | 129 ± 14 | 10 ± 1 | 2070 ± 360 |
| Z-OI-14 | BnOPhe | PheLeuAlaProOMe | | 13 ± 1 | | | |

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe;
k.H. = keine Hemmung; § keine zeitabhängige Hemmung beobachtet.

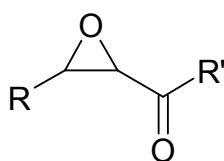
Der Austausch der bei Aspartat-Proteasen bevorzugten hydrophoben aromatischen Aminosäure Phe gegen die ebenfalls stark lipophile Aminosäure Val hat keinen merklichen Einfluss auf die Hemmstärke. **Z-OI-03** und **Z-OI-04** zeigen beide nur eine ganz geringe Hemmung der SAP2 im Screening (vgl. Tab. 7-2). Anhand der Hemmwerte für die beiden Olefine **Z-OI-10** und **Z-OI-11** zeigt sich, dass auch die Kupplung der Michael-Systeme mit Peptiden, die der für die SAPs charakteristischen Substratsequenz in P'-Richtung entsprechen, nicht wie erhofft die Affinität zum Enzym steigert.

Dagegen bewirkt die Einführung eines zweiten AS-Substituenten an der Doppelbindung eine merkliche Zunahme der Aktivität. Wie die ähnlichen IC₅₀-Werte nach 5 min für die Olefine **Z-OI-08**, **Z-OI-09** und **Z-OI-13** zeigen (vgl. Tab. 7-2) hat es dabei aber keinen besonderen Einfluss, welche hydrophobe AS bzw. welche kurze Peptidsequenz eingeführt wird. Eine zu lange und unflexible Peptidsequenz wie bei **Z-OI-14** ist jedoch nicht geeignet. Der Vergleich der beiden Olefine **Z-OI-13**, mit der für die P1'-P2'-Taschen charakteristischen Sequenz, und **Z-OI-14**, mit der für die P1-P4-Taschen charakteristischen Sequenz, zeigt, dass der Kupplung von Peptiden an die starren elektrophilen Bausteine Grenzen gesetzt sind. Große Peptide, wie das Tetrapeptid Phe-Leu-Ala-ProOMe bei **Z-OI-14**, werden dadurch zu unflexibel und können sich den Bindungstaschen des Enzyms nicht mehr anpassen.

7.3.2 Epoxide

Bei den Epoxiden zeigt der Vergleich der Substituenten am elektrophilen Ring deutlich den starken Einfluss großer hydrophober Reste. Während das Epoxid **E-09** (Ethylester) sowie die Epoxide **E-04**, **E-13**, **E-14** und **E-15**, die am Dreiring mit einer Methylgruppe substituiert sind, nahezu völlig inaktiv sind, zeigen die beiden an 3-Position Methyl(phenyl)-substituierten Epoxide **E-23** und **E-23-t** mit 60 bzw. 88% eine gute Hemmung der SAP2 im Screening (vgl. Tab. 7-3). Die *trans*-Stellung des hydrophoben Phenylrestes bewirkt dabei eine bessere Anpassung ans Enzym und somit eine höhere Aktivität. Dies zeigt sich deutlich am höheren k_{2nd} -Wert von 9890 M⁻¹min⁻¹.

Tab. 7-3: Vergleich der Substituenten der Epoxide



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] | | | |
|----------------------|--------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| | | | bei [I] = 100 μM 5 min* | IC ₅₀ [μM] 5 min* | IC ₅₀ [μM] 35 min* | k_{2nd} [M ⁻¹ min ⁻¹] |
| E-04/13/14/15 | Me | PheOBn | 0 - 13 | | | |
| E-08 | Me | ValOBn | k.H. | | | |
| E-09 | EtO ₂ C | PheOBn | k.H. | | | |
| E-22 | EtO ₂ C | PheLeuOBn | k.H. | | | |
| E-23 | Me/Ph | PheOBn | 60 ± 5 | 82 ± 6 | 40 ± 7 | 1610 ± 230 |
| E-23-t | Ph/Me | PheOBn | 88 ± 4 | 58 ± 5 | 30 ± 4 | 9890 ± 760 |

k.H. = keine Hemmung; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

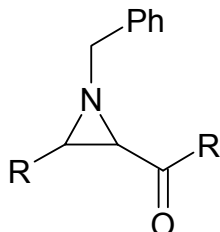
Der Austausch der AS bei den Methyl-substituierten Epoxiden **E-04** und **E-08** (Phe vs. Val) sowie die Verlängerung der Seitenkette bei den Ethylester-substituierten Epoxiden **E-09** und **E-22** (Phe vs. PheLeu) ändert dagegen nichts. Alle Verbindungen sind nahezu inaktiv an der SAP2.

7.3.3 Aziridine

Ein Vergleich der Phe-substituierten, *N*-benzylierten Aziridine **A-04**, **A-07** und **A-15** zeigt wie bei den Epoxiden den großen Einfluss des dritten Substituenten (vgl. Tab. 7-4). Das den Ethylester tragende Aziridin **A-15** zeigt nahezu keine Aktivität an der SAP2, wohingegen die beiden Aziridine mit Methylrest bzw. Phenylrest am Ring zu den aktivsten Verbindungen an der SAP2 zählen. Den Grund hierfür liefert das Docking. Die Methylgruppe sowie der Phenylrest am Ring, die zwar zu einer unterschiedlichen Anordnung des Aziridins in den Bindungstaschen führen (vgl. Kapitel 6.3), ermöglichen bei beiden Verbindungen eine relativ günstige Lage des Aziridinrings bezüglich der katalytisch aktiven

Aspartat-Reste. Der große hydrophobe Phenylrest übt dabei den wichtigeren Einfluss aus und macht aus **A-07** die zweitaktivste Verbindung an der SAP2 mit einem k_{2nd} -Wert von $47955 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Tab. 7-4: Vergleich der Substituenten der Aziridine



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] | | IC_{50} [μM] | k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] |
|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| | | | bei [I] = 100 μM | 5 min* | | |
| A-04 | Me | PheOBn | 100 | 69 \pm 2 | 58 \pm 5 | 14030 \pm 3520 |
| A-04a | Me | PheOBn | 96 \pm 3 | 44 \pm 1 | 22 \pm 2 | 15180 \pm 2070 |
| A-07 | Ph | PheOBn | 99 | 16 \pm 1 | 12 \pm 3 | 47955 \pm 529 |
| A-08 | Ph | ValOBn | 100 | 16 \pm 1 | 11 \pm 1 | 56756 \pm 1150 |
| A-11 | Ph | LeuProOBn | 57 \pm 4 | 82 \pm 5 | 55 \pm 3 | 3320 \pm 425 |
| A-13/13' | Ph | PheAlaLeuOBn | 38 \pm 2 / k.H. | | | |
| A-14 | Ph | PheLeuAlaProOMe | k.H. | | | |
| A-15 | EtO ₂ C | PheOBn | 17 \pm 2 | | | |
| A-16 | Ph | Phe-ol | k.H. | | | |

k.H. = keine Hemmung; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

Desweiteren zeigt Tabelle 7-4, dass der Austausch Phe gegen Val auch bei den Aziridinen keine große Veränderung bewirkt. Die kleinere Seitenkette der AS Val fügt sich etwas besser an den Rand der S1'-Tasche und führt dazu, dass das Val-substituierte Aziridin **A-08** mit einem k_{2nd} -Wert von $56756 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ leicht besser ist als das Phe-substituierte Aziridin **A-07** (k_{2nd} -Wert: $47955 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$) (vgl. Tab. 7-4).

Die Kupplung der Peptide Phe-Leu-Ala-Pro (P1-P4) und Phe-Ala-Leu (P1'-P3') an den Aziridinring zeigt nicht den gewünschten Effekt, nämlich eine Verbesserung der Affinität zum Enzym. Die beiden Peptid-verknüpften Aziridine **A-13** und **A-14** erweisen sich als deutlich schwächer aktiv als das nur die 1. AS der Sequenz tragende **A-07**. Das Docking liefert einen Hinweis für die Inaktivität. Der rigide Aziridinring führt zu einer anderen Anordnung der Peptidkette im Vergleich zum Substrat. Die großen und unflexiblen Moleküle passen somit nicht in die Bindungstaschen der SAP2 (vgl. Abb. 6-5) und sind somit auch nicht in der Lage zu hemmen.

Die unterschiedliche Aktivität der beiden jeweils mit einem Diastereomer angereicherten Fraktionen des Peptid-verknüpften Aziridins **A-13** und **A-13'** (vgl. Tab. 7-4) zeigt, dass die Konfiguration am Aziridinring durchaus einen Einfluss auf die Hemmung der SAP2 hat.

Auch liefert die moderate Aktivität von **A-13** im Vergleich zur völligen Inaktivität von **A-14** den Hinweis einer leichten Bevorzugung der Peptidketten-Verlängerung in P'-Richtung. Der leichte Vorteil für die P'-Seite liegt dabei sehr wahrscheinlich an der cyclischen AS Pro, die die Unflexibilität in der Sequenz der P-Richtung stark erhöht.

Die letzte in Tabelle 7-4 aufgeführte Verbindung, das Phenylalaninol-verknüpfte Aziridin **A-16**, dessen AS-Seitenkette eine Vereinfachung des Statin-Bausteins ist, zeigt keine Hemmung der SAP2 im Screening. Nur eine freie Hydroxy-Funktion in der AS-Seitenkette bedingt somit keine Verbesserung der Hemmwirkung. Für die starke Aspartat-Protease-hemmende Wirkung der AS Statin ist demnach das Vorhandensein der Hydroxy-Funktion und der freien Säuregruppe verantwortlich.

7.4 Einfluss des elektrophilen Systems

Mit den *cis*-Aziridinen, den *cis*-Epoxiden und den *Z*- bzw. *E*-konfigurierten Michael-Systemen wurden drei unterschiedliche elektrophile Systeme auf ihre Hemmung der Aspartat-Protease SAP2 untersucht.

Die Olefine liefern dabei die höchste Zahl SAP2-aktiver Verbindungen, wohingegen bei den Epoxiden nur die beiden am Epoxidring Methyl(phenyl)-substituierten Verbindungen **E-23** und **E-23-t** eine Hemmung der SAP2 aufweisen. Der Vergleich der k_{2nd} -Werte zeigt jedoch, dass nur je eine Verbindung innerhalb der beiden verschiedenen elektrophilen Systeme, nämlich das aktivste Olefine **E-OI-05** sowie das aktivste Epoxid **E-23-t** eine Hemmkonstante $\geq 10000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ und somit im Bereich der schwächer aktiven Aziridine **A-04** und **A-04a** aufweisen.

Der Vergleich der Aktivität zwischen ähnlich substituierten Olefinen und Epoxiden (vgl. Tab. 7-5) lässt den erwähnten Trend vieler schwach aktiver Olefine und vieler inaktiver Epoxide ebenfalls erkennen.

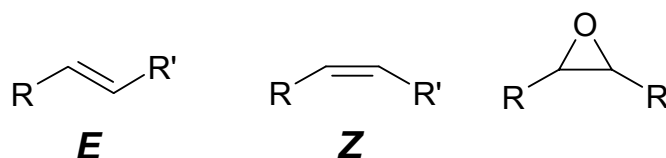
Während das Epoxid **E-09** genau wie das analog substituierte **Z-OI-03** an der SAP2 inaktiv ist, zeigt das *E*-konfigurierte Pendant **E-OI-04** eine Hemmung von 68% an der SAP2.

Ein Vergleich der Dipeptid-verknüpften und Ethylester-substituierten Verbindungen **Z-OI-10** und **E-22** sowie der Phe-verknüpften und Methyl-substituierten *cis*-Epoxide **E-04/13/14/15** mit dem analog substituierten *E*-Olefin **E-OI-02** zeigt für alle Verbindungen nahezu vollständige Inaktivität.

Bei den über Wittig- bzw. Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion aus Phenylalaninal dargestellten *Z*-konfigurierten Olefinen **Z-OI-02** und **Z-OI-01** und ihren durch *m*-CPBA-Epoxidierung daraus erhaltenen *cis*-Epoxiden **E-11** und **E-10** zeigt nur eine Verbindung eine Hemmung der SAP2 (vgl. Tab. 7-5). Die Aktivität von **Z-OI-02** zeigt deutlich die

Bevorzugung der aliphatischen Isopropylseitenkette im Vergleich zum Ethylester. Trotz isolierter Doppelbindung stellt **Z-OI-02** interessanterweise einen zeitabhängigen Inhibitor der SAP2 mit einem k_{2nd} -Wert von $6900 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ dar. Die Zeitabhängigkeit der Verbindung wird dabei durch die bei länger Inkubationszeit sinkenden IC_{50} -Werte verdeutlicht (vgl. Tab. 4-3).

Tab. 7-5: Vergleich Olefine vs. Epoxide



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] | |
|----------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|
| | | | bei [I] = 100 μM 5 min* | k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] |
| E-OI-04 | EtO_2C | C(O)PheOBn | 68 ± 3 | 6900 ± 1610 |
| Z-OI-03 | EtO_2C | C(O)PheOBn | 4 ± 1 | |
| E-09 | EtO_2C | C(O)PheOBn | k.H. | |
| Z-OI-02 | $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ | CH(Bn)NHBoc | 84 ± 5 | 6900 ± 1840 |
| E-11 | $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ | CH(Bn)NHBoc | 14 ± 2 | |
| Z-OI-01 | EtO_2C | CH(Bn)NHBoc | 26 ± 3 | |
| E-10 | EtO_2C | CH(Bn)NHBoc | k.H. | |
| Z-OI-10 | EtO_2C | C(O)PheAlaOBn | 3 ± 1 | |
| E-22 | EtO_2C | C(O)PheLeuOBn | k.H. | |
| E-OI-02 | Me | C(O)PheOBn | 20 ± 2 | |
| E-04/13/14/15 | Me | C(O)PheOBn | 0-13 | |

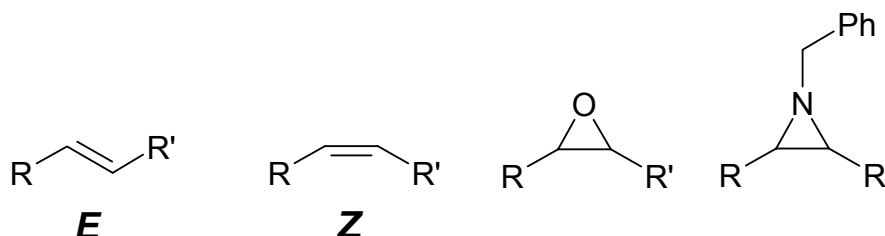
k.H. = keine Hemmung; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

Die Enzymtestungen an der SAP2 liefern für die Aziridine die besten Ergebnisse. Für die beiden aktivsten Verbindungen **A-07** und **A-08** werden k_{2nd} -Werte im Bereich von ca. $50000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ erhalten (vgl. Tab. 7-6).

Durch das Docking werden die Ergebnisse noch unterstützt. Für die Aziridine liefert es die beste Lage in den Bindungstaschen und die günstigsten Stellungen der elektrophilen Bausteine bezüglich der katalytisch aktiven Aspartat-Reste Asp32 und Asp218 (vgl. Kapitel 6). Auch der Grund, warum die am Aziridinring Phenyl-substituierten Verbindungen **A-07** und **A-08** am aktivsten an der SAP2 sind, zeigt sich im Docking deutlich. Der Benzylrest am Stickstoff liegt hervorragend in der S2-Tasche und der Phenylrest am Aziridinring in der S1-Tasche. Dies dirigiert den Aziridinring zu den katalytisch aktiven Aspartat-Resten (3.6 \AA) und es kommt außerdem zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Asp32 und der NH-Funktion des Amids (vgl. Kapitel 6.3).

Neben den Werten für die aktivsten Aziridine zeigt Tabelle 7-6 auch den Vergleich analog substituierter Bausteine sowie den Vergleich der aktivsten Olefine und Epoxide mit den Aziridinen.

Tab. 7-6: Vergleich Aziridine vs. Epoxide und Olefine



| Verb. | R | R' | Hemmung [%] bei [I] = 100 μM | | IC ₅₀ [μM] 5 min* | IC ₅₀ [μM] 35 min* | k_{2nd} [M ⁻¹ min ⁻¹] |
|----------------------|---------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------|---------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| | | | 5 min* | 5 min* | | | |
| E-OI-02 | Me | C(O)PheOBn | 20 ± 2 | | | | |
| E-04/13/14/15 | Me | C(O)PheOBn | 0 - 13 | | | | |
| A-04 | Me | C(O)PheOBn | 100 | 69 ± 2 | 58 ± 5 | 14030 ± 3520 | |
| A-04a | Me | C(O)PheOBn | 96 ± 3 | 44 ± 1 | 22 ± 2 | 15180 ± 2070 | |
| E-23 | Me/Ph | C(O)PheOBn | 60 ± 5 | 82 ± 6 | 40 ± 7 | 1610 ± 230 | |
| E-23-t | Ph/Me | C(O)PheOBn | 88 ± 4 | 58 ± 5 | 30 ± 4 | 9890 ± 760 | |
| A-07 | Ph | C(O)PheOBn | 99 | 16 ± 1 | 12 ± 3 | 47955 ± 529 | |
| Z-OI-03 | EtO ₂ C | C(O)PheOBn | 4 ± 1 | | | | |
| E-OI-04 | EtO ₂ C | C(O)PheOBn | 68 ± 3 | 67 ± 10 | 18 ± 2 | 6900 ± 1610 | |
| E-09 | EtO ₂ C | C(O)PheOBn | k.H. | | | | |
| A-15 | EtO ₂ C | C(O)PheOBn | 17 ± 2 | | | | |
| A-08 | Ph | C(O)ValOBn | 100 | 16 ± 1 | 11 ± 1 | 56756 ± 1150 | |
| E-OI-05 | BnOPhe | C(O)PheOBn | 95 ± 2 | 27 ± 3 | 18 ± 2 | 15870 ± 1210 | |
| Z-OI-02 | (CH ₃) ₂ CHCH ₂ | CH(Bn)NHBoc | 84 ± 5 | | | 6900 ± 1840 | |

k.H. = keine Hemmung; * Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

Im Gegensatz zu den Phe-verknüpften und Methyl-substituierten Epoxiden **E-04/13/14/15** und dem Olefin **E-OI-02**, die im Screening alle nahezu inaktiv sind, zeigen die analog substituierten Aziridine **A-04** und **A-04a** eine vollständige Hemmung der SAP2 im Screening.

Die einen zusätzlichen hydrophoben Phenylrest am Epoxidring tragenden Epoxide **E-23** und **E-23-t** sind die einzigen Epoxide, die eine Hemmung an der SAP2 zeigen. Die Hemmstärke des aktiveren Epoxids **E-23-t** liegt im Vergleich zum analog substituierten Aziridin **A-07** aber um den Faktor 5 niedriger.

Bei den Phe-verknüpften und Ethylester-substituierten Bausteinen hat nicht das Aziridin die beste Aktivität, sondern das *E*-konfigurierte Olefin **E-OI-04** ist die einzige Verbindung dieser Gruppe, die eine Hemmwirkung auf die SAP2 hat. Der k_{2nd} -Wert liegt mit knapp

7000 M⁻¹min⁻¹ jedoch um ca. Faktor 8 niedriger als der der SAP2-aktivsten Verbindung **A-08**.

Der Vergleich der aktivsten Verbindung aus jeder elektrophilen Gruppe zeigt noch einmal deutlich die Rangfolge der Hemmung. Während das Aziridin **A-08** einen k_{2nd} -Wert bezüglich der SAP2 von 56756 M⁻¹min⁻¹ hat, liegt der k_{2nd} -Wert des aktivsten *E*-Olefins **E-OI-05** bei 15870 M⁻¹min⁻¹ und der des aktivsten Epoxids **E-23-f** bei 9890 M⁻¹min⁻¹. Die am schwächsten aktive elektrophile Gruppe stellen die *Z*-konfigurierten Olefine dar. Mit einem k_{2nd} -Wert von nicht ganz 7000 M⁻¹min⁻¹ ist hier das die isolierte Doppelbindung und die aliphatische Isopropylseitenkette tragende **Z-OI-02** die beste Verbindung.

7.5 Zusammenfassung

Die oben herausgearbeiteten Trends werden nachfolgend noch einmal zusammengefasst.

1. Aziridine >> Olefine ≈ Epoxide
2. Phe ≈ Val >> Tri- und Tetapeptide
3. *cis*-Konfiguration bei Heterocyclen „Muss“ für Hemmung der Aspartat-Protease
4. *E* > *Z* ⇒ *Z*-Konfiguration bei Michael-Systemen nicht entscheidend
5. hydrophobe Substituenten für Hemmung wichtig:
Ph >> Me >> CO₂Et
2. hydrophobe AS >> CO₂Et

8. Bindungsstudien von Biotin-markiertem FPL an Penicillin-Bindeproteine von *Enterococcus faecium*

Das Antibiotikum Flavophospholipol (FPL) zeigt ein ähnliches Wirkspektrum wie das Penicillin und wirkt vorwiegend gegen gram-positive Bakterien, und da vor allem gegen Staphylokokken und Streptokokken. Gram-negative Bakterien sind resistent, da die Substanz die äußere Membran nicht durchdringen kann. Flavophospholipol hemmt wie Vancomycin die Transglycosylierungsreaktion der Zellwandsynthese, allerdings durch einen anderen Mechanismus. Während die β -Lactamantibiotika kovalent an einen essentiellen Serin-Rest der Transpeptidase-Untereinheit binden, inhibiert FPL die Zellwandsynthese durch Bindung an die Transglycosylase-Untereinheit.^[210,211] Von FPL ist bekannt, dass es reversibel an die Penicillin-Bindeproteine 1a und 1b von *E. coli* bindet^[212,213] und mit dem Penicillin-Bindeprotein 2a eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stammes interagiert.^[214] Dies lässt den Schluss zu, dass die Inhibition der Transglycosylierungsreaktion ein vielversprechender Ansatz für das Design neuer Therapeutika gegen Antibiotika-resistente Bakterien ist. Flavophospholipol-Derivate könnten vor allem bei der Bekämpfung von Infektionen, die durch multiresistente grampositive Keime hervorgerufen werden, eine wichtige Rolle spielen.

Der Enterokokken-Stamm *E. faecium*, der vor allem bei stark geschwächtem Immunsystem Infektionen auslösen kann, galt lange Zeit als intrinsisch resistent gegen das Antibiotikum FPL.^[215,216] Bei neueren Studien dieses Krankenhaus-Erregers konnten aber auch sensible Stämme isoliert werden.^[217]

Im Arbeitskreis von Dr. Knut Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, sollte mittels Biotin-markiertem Flavophospholipol (FPL) (vgl. Abb. 3-64) die FPL-Bindfähigkeit der Penicillin-Bindeproteine von *E. faecium* zwischen dem Wildtypstamm und der Mutante verglichen und dadurch Erkenntnisse zum Mechanismus der FPL-Resistenz bei *E. faecium* gewonnen werden. Dazu wurden Zellfraktionen mit Penicillin-Bindeproteinen zusammen mit Biotin-markiertem FPL inkubiert und nachfolgend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und die FPL-Penicillin-Bindeprotein-Bindung mit einem Streptavidin-gekoppelten Peroxidase-markierten Antikörper detektiert. Nach Zugabe des Substrates konnten in dem Wildtypstamm sechs Banden nachgewiesen werden. Das gleiche Bandenmuster erschien auch in der FPL-sensitiven Mutante.

Der Versuch ergab somit keine Hinweise auf einen Unterschied in der Bindung von FPL an die Penicillin-Bindeproteine beider Stämme.

9. Schwammprojekt

Naturstoffe aus marinen Schwämmen besitzen verschiedenste Aktivitäten und hohes pharmazeutisches Potential (vgl. Kapitel 1.5). Vor allem im Bereich der anti-Tumor-Wirkstoffe wurde vom National Cancer Institute (NCI) eine Vielzahl von Schwämmen gescreent. Nach wie vor stehen auf der Suche nach neuen Naturstoffen, die oft Leitstrukturen für verschiedenste Arzneistoffe darstellen, marine Organismen und dabei vor allem Schwämme im besonderen Interesse der Forschung. Der aus dem Schwamm *Theonella mirabilis* isolierte Naturstoff Miraziridin A zeigt, dass Schwämme auch durchaus ein Reservoir an Protease-hemmenden Substanzen bieten. Miraziridin A (vgl. Abb. 1-18) vereint drei verschiedene Protease-hemmende Strukturen in sich und hemmt unspezifisch Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen (vgl. Tab. 1-5).

Aufgrund dieses Wissens befasste sich eine zweite Aufgabenstellung der Arbeit mit der Suche nach Protease-hemmenden Substanzen aus Schwämmen.

Außerdem sollte überprüft werden, ob auch in anderen *Theonella*-Schwämmen als *Theonella mirabilis* der an mehreren Protease-Klassen aktive Naturstoff Miraziridin A zu finden ist.

9.1 Extraktion

Mehrere Schwämme aus den Bahamas und der Schwamm *Theonella swinhoie* aus Israel, die von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ute Hentschel, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt wurden, wurden zunächst extrahiert.

Die lyophilisierten Schwämme wurden dafür zerkleinert und anschließend nacheinander mit drei Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Cyclohexan, Dichlormethan und Methanol) je 24 h bei RT gerührt. Nach jedem Extraktionszyklus wurden die Schwammreste abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Auf diese Weise wurden für jeden Schwamm drei Extrakte erhalten.

Tabelle 9-1 zeigt die verschiedenen Schwämme, ihre Menge und die Mengen, die durch die Extraktion mit den verschiedenen Lösungsmitteln erhaltenen Extrakte.

Ein Vergleich der Extraktmengen der drei verwendeten Lösungsmittel zeigte, dass bei allen Schwämmen der Methanol-Extrakt die größte Fraktion darstellte. Bei der Extraktion mit dem polarsten Lösungsmittel werden die im Schwamm enthaltenen Salze mit herausgelöst. Zwischen den Cyclohexan- und den Dichlormethan-Extrakten war der Mengenunterschied geringer, wobei meist größere Mengen im unpolaren Cyclohexan-Extrakt zu finden waren.

Tab. 9-1: Extrahierte Schwämme

| Schwamm | Lyophilisat [g] | Cy [mg] | Extrakte | |
|-------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|--------------|
| | | | DCM [mg] | MeOH [mg] |
| <i>Xestospongia muta</i> | 5.7 | 236 | 63 | 982 |
| <i>Ircinia felix</i> | 8.7 | 60 | 108 | 1715 |
| <i>Dysidea etheria</i> | 6.8 | 77 | 136 | 1443 |
| <i>Cribochalina vasculum</i> | 8.5 | 345 | 91 | 1239 |
| <i>Callyspongia vaginalis</i> | 5.4 | 191 | 72 | 1081 |
| <i>Plakortis sp.</i> | 9.9 | 561 | 174 | 1246 |
| <i>Tedania ignis</i> | 4.3 | 114 | 80 | 1280 |
| <i>Niphates digitalis</i> | 5.6 | 168 | 60 | 1030 |
| <i>Ptilocaulis</i> | 13.6 | 44 | 55 | 800 |
| <i>Ecytoplasia ferox</i> | 22.5 | 169 | 89 | 1531 |
| <i>Aka. coralliphagum</i> | 20.6 | 95 | 67 | 1645 |
| <i>Aplysina aerophoba</i> | 14.5 | 418 | 205 | 1487 |
| <i>Verongula gigantea</i> | 9.4 | 61 | 84 | 1669 |
| <i>Chalinula molitba</i> | 7.7 | 230 | 53 | 1186 |
| <i>Aplysina cavernicola</i> | 17.6 | 328 | 184 | 1153 |
| <i>Pseudoceratina crassa</i> | 11.9 | 136 | 113 | 2231 |
| <i>Amphimedon compressa</i> | 6.1 | 131 | 57 | 1381 |
| <i>Theonella swinhoie (Miraziridin A)</i> | 7.3 | 87 | 98 | 470 |

9.2 Testung auf Protease-Aktivität

Die erhaltenen Schwammextrakte wurden anschließend mittels fluorimetrischer Enzymassays auf ihre Protease-hemmende Wirkung an der Cystein-Protease Cathepsin L und der Serin-Protease Trypsin gescreent.

9.2.1 Aktivität gegen die Cystein-Protease Cathepsin L

Zur Ermittlung der Hemmung wurde bei 25 °C ein kontinuierlicher Assay durchgeführt. Die bei der Spaltung des Substrats Cbz-Phe-Arg-AMC durch das Spaltprodukt AMC (7-Amino-4-methylcumarin) zunehmende Fluoreszenz wurde bei 460 nm über 30 min detektiert (Anregung 380 nm). Bei dem ohne vorherige Inkubation von Enzym und Inhibitor durchgeführten Assay lag die Endkonzentration der Schwammextrakte für die Cyclohexan- und Dichlormethan-Extrakte bei 100 µg / mL und die Methanol-Extrakte wurden, da diese, wie oben bereits erwähnt, eine größere Menge gelöster Salze enthalten, mit 200 µg / mL in der doppelten Konzentration eingesetzt.

Die beim Assay verwendete Enzym- und Substratkonzentrationen, sowie der Puffer sind in Tabelle 9-2 aufgelistet.

Tab. 9-2: Enzym- und Substratkonzentration, sowie Puffer

| Enzym | [E] | Puffer | [S] |
|----------------------------------------------|-----------|----------|-------------|
| Cathepsin L <i>Paramecium tetraurelia</i> | 100 ng/mL | TRIS 6.0 | 100 μ M |

Puffer: TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%.

Ein Ansatz, der ein Gesamtvolumen von 200 μ L hat, enthält Enzym, Puffer, Inhibitoren und Substrat. Die maximale DMSO-Konzentration (Substrat und Inhibitoren sind auch in DMSO gelöst) beträgt 10%. Die exakten Volumina der beim Assay verwendeten Komponenten und die Reihenfolge ihres Zusammenfügens (1-5) sind in Tabelle 9-3 wiedergegeben.

Tab. 9-3: Volumina und Reihenfolge des Zusammenfügens der Komponenten

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Puffer [μ L] | Enzym [μ L] | Puffer [μ L] | DMSO / Schwammextrakt [μ L] | Substrat [μ L] |
| 100 | 5 | 75 | 15 | 5 |

Die Hemmung der Cystein-Protease Cathepsin L durch die Schwammextrakte ist in Diagramm 9-1 wiedergegeben. Ermittelt wurde sie aus dem Verhältnis des Mittelwertes der mit den Extrakten 3-mal gemessenen Steigungen der Fluoreszenzzunahme pro Zeit zur Steigung einer DMSO-Kontrolle (Standardabweichung < 10%).

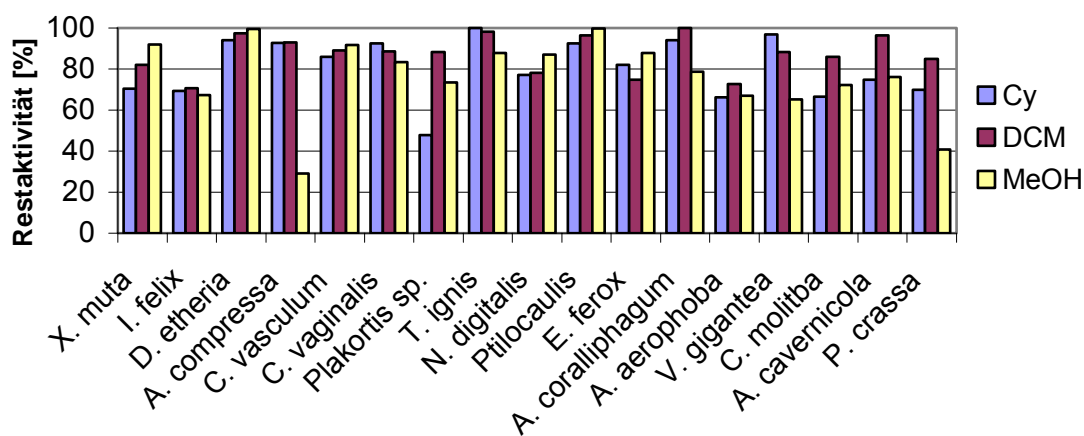


Diagramm 9-1: Hemmung der Cystein-Protease Cathepsin L durch die Schwammextrakte

Das Diagramm 9-1 zeigt, dass drei der getesteten Extrakte eine über 50% liegende Hemmung von Cathepsin L aufweisen. Bei den drei Extrakten handelt es sich um den

Cyclohexan-Extrakt von *Plakortis* sp. (52%), den Methanol-Extrakt von *Pseudoceratina crassa* (59%) und dem Methanol-Extrakt von *Amphimedon compressa* (71%).

9.2.2 Aktivität gegen die Serin-Protease Trypsin

Die Untersuchung der Aktivität an der Serin-Protease Trypsin wurde ebenfalls mittels kontinuierlichem fluorimetrischen Assay und analogen Endkonzentrationen der Schwamm-extrakte durchgeführt. Als Substrat diente wie vorher auch Cbz-Phe-Arg-AMC, nur in einer anderen Endkonzentration. Der Assay wurde in einem 50 mM TRIS-Puffer pH 8.0 mit den in Tabelle 9-4 angegebenen Enzym- und Substratkonzentrationen durchgeführt. Das Gesamtvolumen, die DMSO-Konzentration sowie die Reihenfolge des Zusammenfügens und die Volumina der verschiedenen Komponenten entsprachen dem Cathepsin L-Assay (vgl. Tab. 9-3).

Tab. 9-4: Bedingungen des Trypsin-Assays

| Enzym | [E] | Puffer | [S] |
|-------------------------------|-----------|----------|---------|
| Trypsin (boviner Pankreas) | 720 ng/mL | TRIS 8.0 | 57.5 µM |

Puffer: TRIS pH 8.0, 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM.

Das Diagramm 9-2 zeigt die analog zum Cathepsin L-Assay ermittelte Aktivität der Schwammextrakte gegen die Serin-Protease Trypsin.

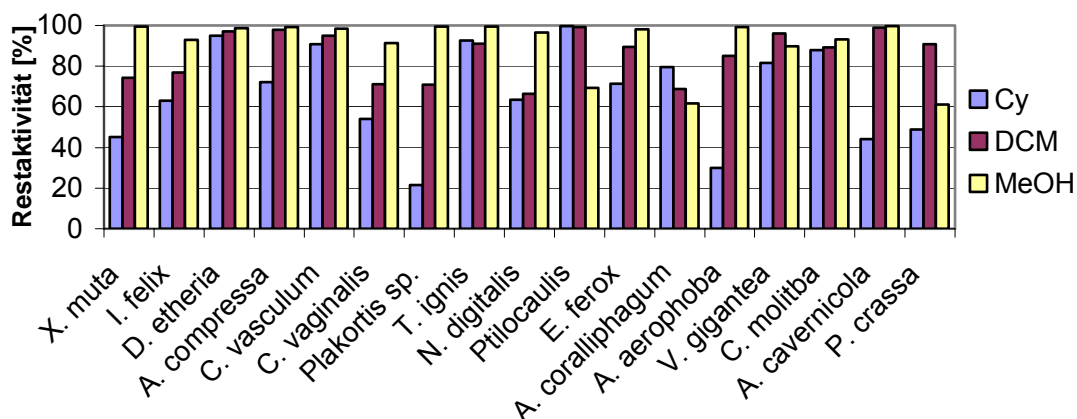


Diagramm 9-2: Hemmung der Serin-Protease Trypsin durch die Schwammextrakte

Gegenüber der Serin-Protease Trypsin zeigen sich die Schwammextrakte etwas aktiver. Fünf der getesteten Extrakte weisen eine über 50% liegende Hemmung von Trypsin auf. Auffallend hierbei ist, dass es sich bei den fünf Extrakten ausschließlich um Cyclohexan-

Extrakte handelt. Der aktivste Extrakt ist dabei der auch schon an Cathepsin L aktive Cyclohexan-Extrakt von *Plakortis sp.* (78%).

Desweiteren fällt auf, dass alle drei Extrakte von *Amphimedon compressa* gegenüber der Serin-Protease Trypsin keinerlei Hemmung aufweisen. Der Methanol-Extrakt dieses Schwammes zeigt somit eine Selektivität gegenüber Cystein-Proteasen.

Bei dem Schwamm *Pseudoceratina crassa* zeigt der an Cathepsin L aktive Methanol-Extrakt auch eine Hemmung von Trypsin. Mit 39% liegt diese jedoch niedriger als bei der Cystein-Protease. Mit 51% Hemmung ist der Cyclohexan-Extrakt des Schwammes dafür einer der fünf Extrakte, die an der Serin-Protease Trypsin eine über 50% liegende Hemmung aufweisen.

9.3 Eingrenzung der Cathepsin L-Aktivität der aktiven Schwammextrakte

Zur Eingrenzung bzw. der Isolierung und Strukturaufklärung der Protease-aktiven Metabolite wurden im weiteren Verlauf zunächst die beiden an Cathepsin L-aktiven Methanol-Extrakte der Schwämme *Amphimedon compressa* und *Pseudoceratina crassa* weiter bearbeitet.

Der Grund hierfür lag vor allem an der Tatsache, dass die Methanol-Extrakte der beiden Schwämme neben der Aktivität gegenüber der Cystein-Protease bei Testungen an Bakterien eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit aufwiesen.

9.3.1 *Pseudoceratina crassa*

Der Methanol-Extrakt des Schwammes wurde zunächst mittels HPLC an einer analytischen Säule untersucht. Das erhaltene Chromatogramm (Diagramm 9-3) zeigt vier Einzelpeaks (A-D) sowie zwei Peakanhäufungen (1, 2).

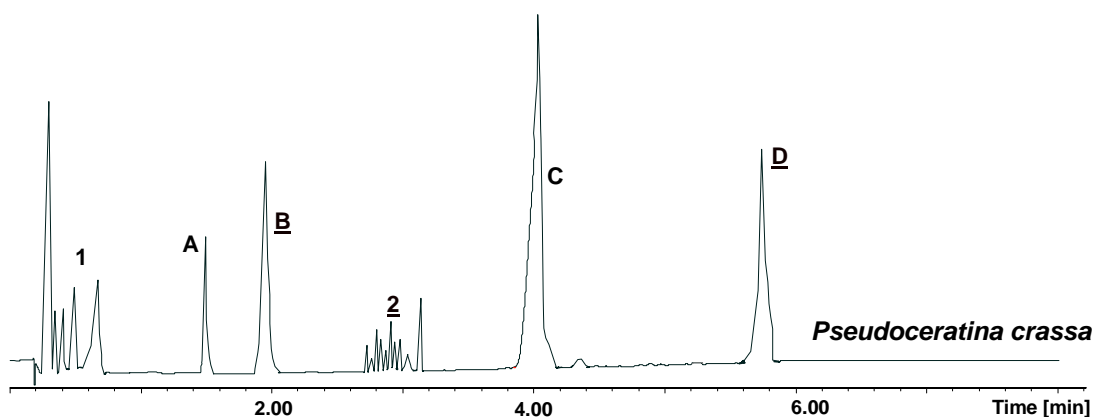


Diagramm 9-3: HPL-Chromatogramm des Methanol-Extrakts von *Pseudoceratina crassa*

Aufgrund dessen wurde entschieden, den Methanol-Extrakt von *Pseudoceratina crassa* zuerst einmal mittels präparativer HPLC aufzutrennen und so die Aktivität weiter einzugrenzen. Die präparative Auftrennung des Extraktes, die von Diplom-Chemiker Tobias Gulder, Arbeitskreis von Prof. Dr. Bringmann, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, durchgeführt wurde, lieferte die sechs Fraktionen (A-D, 1, 2) des Methanol-Extraktes von *Pseudoceratina crassa*.

9.3.2 *Amphimedon compressa*

Der für den Schwamm-Extrakt durchgeführte analytische HPLC-Lauf zeigte anders als beim Methanol-Extrakt von *Pseudoceratina crassa* nur eine eng beieinander liegende Peakansammlung. Zur Auftrennung dieses Extraktes wurde deshalb SephadexLH20 gewählt. Bei dieser Trennmethode werden Moleküle aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt. Große Moleküle zeigen eine schwächere Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial und werden somit früher eluiert. Bei dieser ebenfalls von Diplom-Chemiker Tobias Gulder durchgeführten Trennung wurden drei Fraktionen (A-C; je 10 min Sammelzeit) erhalten.

9.3.3 *Theonella swinhoie*

Da bei diesem Schwamm nach einem bestimmten Stoff, nämlich dem Miraziridin A gesucht wurde, wurden die drei erhaltenen Extrakte zuerst mittels LC-MS auf den Massenpeak des Naturstoffes untersucht.

Nachdem dieser, neben vielen anderen, im Dichlormethan-Extrakt gefunden wurde, erfolgte, da das HPL-Chromatogramm analog zu *Amphimedon compressa* nur eine eng beieinander liegende Peakansammlung zeigte, dessen Auftrennung mittels SephadexLH20. Die erneute LC-MS-Analytik der dabei erhaltenen drei Fraktionen lieferte den $[M+H]^+$ -Peak von Miraziridin A in der letzten Fraktion.

9.3.4 Testung der Fraktionen an Cathepsin L

Die bei der Auftrennung der Methanol-Extrakte der Schwämme *Amphimedon compressa* und *Pseudoceratina crassa* erhaltenen Fraktionen und die den $[M+H]^+$ -Peak von Miraziridin A aufweisende Fraktion von *Theonella swinhoie* wurden analog zu vorher (vgl. Kapitel 9.2.1) auf ihre Aktivität gegen die Cystein-Protease Cathepsin L getestet. Die Endkonzentration der Fraktionen betrug dabei 100 µg / mL.

Diagramm 9-4, das die prozentuale Hemmung der Cystein-Protease Cathepsin L durch die einzelnen Fraktionen wiedergibt, zeigt, dass einige Fraktionen starke Hemmung, andere aber kaum noch Hemmung aufweisen.

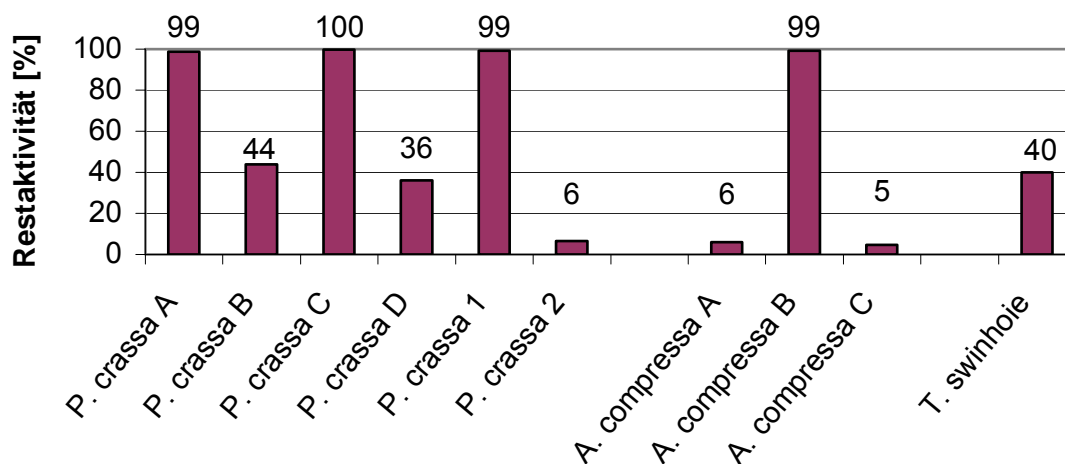


Diagramm 9-4: Hemmung von Cathepsin L durch die einzelnen Fraktionen

Von den vier isolierten Einzelpeaks des Methanol-Extraktes von *Pseudoceratina crassa* zeigen Peak B und D eine gute Hemmung von Cathepsin L mit 66 bzw. 74%. Die aktivste Fraktion stellt allerdings die Peakansammlung *P. crassa 2* (vgl. Diagramm 9-3) mit einer Hemmung von 93% dar. Bei den mittels SephadexLH20 getrennten Fraktionen des Methanol-Extraktes von *Amphimedon compressa* haben die Fraktionen A und C eine sehr hohe Aktivität gegenüber Cathepsin L, wohingegen Fraktion B völlig inaktiv ist.

Auch die den $[M+H]^+$ -Peak von Miraziridin A aufweisende Fraktion von *Theonalla swinhoie* zeigte eine gute Aktivität gegen die Cystein-Protease Cathepsin L (60%).

Da von Miraziridin A auch bekannt ist, dass es die Serin-Protease Trypsin hemmt, wurde die Fraktion auch auf ihre Hemmwirkung gegen Trypsin getestet. Der analog zum Screening der anderen Schwamm-Extrakte (vgl. Kapitel 9.2.2) mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ durchgeführte Test ergab eine Hemmung der Serin-Protease Trypsin von 20%. Die schwächere Hemmung spiegelt die höhere Aktivität des Miraziridin A gegenüber der Cystein-Protease Cathepsin L wieder (vgl. Tab. 1-5).

9.4 Diskussion

Das Schwammprojekt zeigt, dass Miraziridin A auch in anderen *Theonella*-Arten als dem Schwamm *Theonella mirabilis* enthalten ist, und dass auch in anderen Schwämmen Protease-hemmende Substanzen zu finden sind.

Die fluorimetrischen Assays, die eine relativ unkomplizierte Möglichkeit bieten Schwammextrakte auf ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Proteasen zu screenen, zeigten sogar höhere Aktivität in den Schwamm-Extrakten von *Pseudoceratina crassa* als bei dem aus *Theonella swinhoie* extrahierten, Miraziridin A enthaltenden Extrakt.

Desweiteren zeigte sich, dass mit Hilfe chromatographischer Verfahren die Auftrennung aktiver Extrakte und somit die Eingrenzung der Aktivität möglich ist.

Das eigentliche Ziel, die Strukturaufklärung Protease-hemmender Metabolite aus Schwämmen, konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Menge des zur Verfügung stehenden Schwammmaterials war zu gering, um ausreichende Mengen aktiver Fraktionen zu erhalten, um diese dann zur Aufklärung der Struktur mittels HPLC-NMR sowie HPLC-MS untersuchen zu können.

Maleinsäureanhydrid erhalten oder über Wittig- bzw. Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion dargestellt. Die Kupplung von AS bzw. Peptiden an die elektrophilen Bausteine erfolgte mit gängigen AS- / Peptidkupplungsmethoden.

Die als irreversible Inhibitoren der SAP2 konzipierten Verbindungen wurden in einem neu entwickelten fluorimetrischen FRET-Assay auf ihre SAP2-Hemmung getestet. Dazu wurde ein Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson durchgeführt und die zunehmende Fluoreszenz durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrats bei 540 nm detektiert (Anregung 355 nm). Als Substrat diente das Undecapeptid Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe || Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH (|| markiert die Spaltstelle). Von den Inhibitoren wurden IC_{50} -, k_{2nd} - und, falls möglich, k_r - und K_r -Werte ermittelt.

Von den 41 an der SAP2 getesteten AS- / Peptid-verknüpften Verbindungen stellen die beiden Aziridine **A-07** und **A-08** mit k_{2nd} -Werten im mittleren fünfstelligen Bereich [$M^{-1}min^{-1}$] die besten Inhibitoren dar (Abb. 10-1). Bis auf zwei Verbindungen zeigen alle aktiven Verbindungen an der SAP2 sinkende IC_{50} -Werte bei längerer Inkubationszeit und somit eine zeitabhängige und irreversible Hemmung.

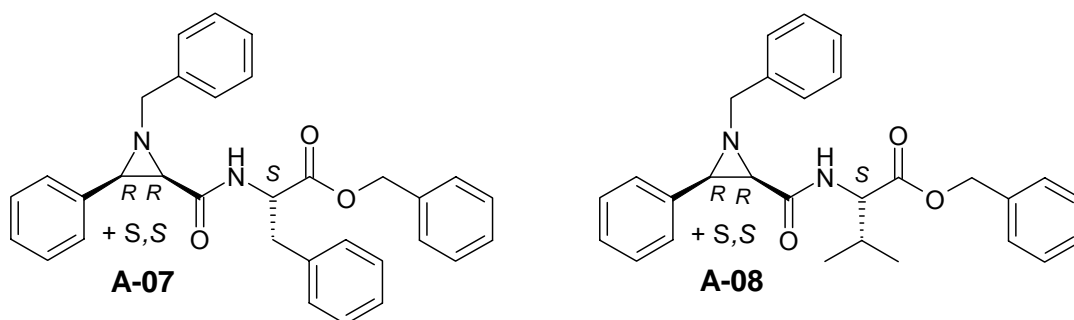


Abb. 10-1: SAP2-aktivste Verbindungen A-07 und A-08

Zur Untersuchung der Selektivität wurden die Verbindungen mittels kontinuierlicher Assays an den Cystein-Proteasen Cathepsin B (*human*), Cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*) und Rhodesain (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) getestet. Als Substrat wurde dabei Cbz-Phe-Arg-AMC verwendet. Erfreulicherweise waren bis auf das E-konfigurierte Olefin **E-OI-04** alle Verbindungen an den Cystein-Proteasen inaktiv.

Die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen und im Arbeitskreis PD Dr. Knut Baumann (Institut für Pharmazie und LMC) von Josef Scheiber durchgeführte Docking-Studien ergaben, dass abhängig von den Substituenten (Me, Ph, CO₂Et) und dem elektrophilen System (*cis*-Aziridin, *cis*-Epoxid und α,β -ungesättigtes Michael-System) unterschiedliche Bindungsmodi vorliegen. Als wichtig für die Hemmung der SAP2 zeigt sich vor allem eine Vielzahl hydrophober Reste. Durch die beste Lage in den Bindungstaschen weisen die

Aziridine die höchsten Hemmkonstanten auf. Es zeigt sich auch, dass der Erhöhung der Affinität zum Enzym durch längere Peptidketten Grenzen in Bezug auf Größe und Unflexibilität gesetzt sind. Möglichkeiten zur Verbesserung der Affinität zwischen Inhibitor und Enzym sind aber noch reichlich vorhanden: Die Lage des besten SAP2-Inhibitors **A-08** zeigt noch großen, ungenutzten Raum in der S1'- sowie den S3-Taschen (vgl. Abb. 6-8). Einen ersten Ansatz zur Verbesserung diesbezüglich bietet laut Docking das bisher noch nicht untersuchte Aziridin **A-17**. Die Kupplung hydrophober *D*-AS (*D*-Val bzw. *D*-Phe) an den gut in die S1- und S2-Tasche passenden Aziridinbaustein **A-05** könnte ebenfalls zu einer Verbesserung der Affinität zur S1'-Tasche führen, da deren Seitenketten tiefer in die Tasche reichen sollten. Möglichkeiten, die großen S3-Taschen anzusprechen, könnten längere oder verzweigte hydrophobe Reste am Stickstoff bieten.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben den HIV-Proteasen auch die sekretorische Aspartat-Protease SAP2 durch *cis*-konfigurierte Epoxide irreversibel hemmbar ist. Desweiteren zeigt sich, dass mit Aziridinen auch andere elektrophile Ringe als irreversible Aspartat-Protease-Inhibitoren fungieren können. An der SAP2 zeigen sich die Aziridine sogar aktiver. Auch elektronenarme Michael-Systeme sind in der Lage Aspartat-Proteasen zu hemmen, auch wenn ihre Hemmung deutlich schwächer ist als die der Aziridine. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass nicht, wie angenommen, die *Z*-Konfiguration der Olefine entscheidend ist, sondern dass *E*-Olefine sogar bessere Hemmungen aufweisen (vgl. Kapitel 7).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Morschhäuser und Dr. Peter Staib vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, konnte gezeigt werden, dass die Aziridine **A-07** und **A-08** neben dem isolierten Enzym auch die SAP2-Produktion in *Candida albicans*-Zellkulturen hemmen ohne auf die Pilzzellen toxisch zu wirken.

Neben der Hemmung der SAP2 wirken die Aziridine **A-07** und **A-08** auch antiplasmodial. Bei Testungen am Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* zeigten beide Aziridine einen IC₅₀-Wert im unteren mikromolaren Bereich. Der Grund der Hemmung des Parasiten ist jedoch noch unklar, da **A-07** und **A-08** weder an den isolierten Cystein-Proteasen des Malaria-Erregers Falcipain 2 und 3 aktiv sind, noch dessen Aspartat-Protease Plasmeprin II hemmen.

Im Rahmen des SFB 630 (Sonderforschungsbereich 630 - Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) wurden viele der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen gegen verschiedene Krankheitserreger, wie *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major* und sog. Problemkeimen, zu denen die

gramnegativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, sowie die grampositiven *Staphylococcus*-Arten *S. aureus* (Linie 325 und 8325) und *S. epidermidis* (Linie RP-62) gehören, untersucht.

Die Testungen an *Trypanosoma brucei* TC221 lieferten einige Verbindungen, die gegen den Erreger gut aktiv sind, ohne auf Makrophagen toxisch zu wirken ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Die aktivste Verbindung, die auch mit > 83.3 den höchsten Selektivitätsindex (SI) aufweist, stellt dabei das Phe-verknüpfte Epoxid **E-04** mit einem IC_{50} -Wert von $1.2 \mu\text{M}$ dar.

An *Leishmania major* zeigt nur eine Substanz Aktivität ohne die Makrophagen zu schädigen. Mit einem IC_{50} -Wert von $51.8 \mu\text{M}$ ist das Aziridin **A-08** an den *Leishmanien* zwar weniger aktiv als der als Standardtherapeutikum eingesetzte Arzneistoff Miltefosin, zeigt aber an Makrophagen auch keine so hohe Toxizität, so dass der Selektivitätsindex für das Aziridin **A-08** mit > 1.9 sogar besser ist als beim Miltefosin (SI = 1.2).

Der Test an den Problemkeimen zeigte mit **Z-OI-03**, **Z-OI-04** und **Z-OI-10** drei Verbindungen, die in der Lage waren, das Wachstum und die Biofilmbildung zu hemmen. Die drei aktiven Verbindungen weisen dabei eine Selektivität für grampositive Bakterien auf. Keine der Verbindungen hemmt die gramnegativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Für die aktivste Verbindung, den Phenylalanin-substituierten Maleinsäurester **Z-OI-03** lag die MHK für alle drei grampositiven Erreger bei $10 \mu\text{M}$ und eine Biofilmbildungshemmung von 90% war an *S. aureus* noch bei einer Konzentration von $2.5 \mu\text{M}$ zu beobachten. Die Hemmwirkung der drei Z-Olefine dürfte jedoch auch auf ihre Toxizität zurückzuführen sein (siehe unten).

FRET-Assays an der coronaviralen SARS-CoV M^{pro}, bei denen als Substrat das Nonapeptid $\text{Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln} \mid \mid \text{Ser-Gly-Tyr}(3'\text{-NO}_2)\text{-Arg}(\text{Mts})\text{OH}$ diente ($\mid \mid$ markiert die Spaltstelle), lieferten eine moderate, nicht-zeitabhängige Hemmung durch das Aziridin **A-04** und das Olefin **Z-OI-03**. Der IC_{50} -Wert an der SARS-CoV M^{pro} liegt für die aktivere Verbindung **A-04** bei $138 \mu\text{M}$. Testungen beider Verbindungen auf die Hemmung der Replikation des TGEV (=transmissible gastroenteritis virus) und des MHV-A59 (=mouse hepatitis virus), die im Arbeitskreis von Prof. Dr. John Ziebuhr, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, durchgeführt wurden, zeigten für beide Verbindungen gute antivirale Aktivität an den Coronaviren. Die wesentlich bessere antivirale Aktivität im Vergleich zum Enzym-Assay liegt bei **Z-OI-03** vermutlich an dessen akuter Toxizität. Die Verbindung ist unter anderem gegenüber Makrophagen (vgl. Tab. 5-4) und Nierenepithelzellen (IC_{50} -Wert: $2.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$) extrem toxisch.

In einem weiteren Kooperationsprojekt wurden im Arbeitskreis von Dr. Knut Ohlsen, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, mit dem gezielt als „affinity label“ synthetisierten, Biotin-markierten Antibiotikum Flavophosphopolipol (FPL) Untersuchungen zur FPL-Bindefähigkeit an die Penicillin-Bindeproteine von *E. faecium* Wildtyp und einer Mutante durchgeführt.

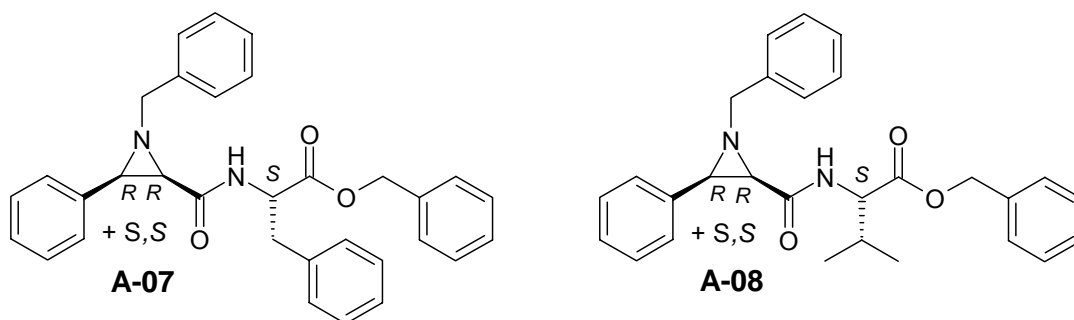
Das Schwammprojekt zeigte, dass das an Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen wirksame Aziridinylpeptid Miraziridin A auch in anderen *Theonella*-Arten als *Theonella mirabilis* enthalten ist, und dass auch in anderen Schwämmen Protease-hemmende Substanzen zu finden sind.

Bisher gelang es jedoch nicht, die Strukturen weiterer Protease-hemmender Metabolite aufzuklären, da die Mengen an Schwammmaterial zu gering waren.

with *tert*butylhydroperoxide / butyllithium. The *Z*-configured olefinic building blocks were synthesized by reactions of alcohols or amino acids with maleinic anhydride or by Wittig and Horner-Wadsworth-Emmons reactions. The electrophilic building blocks obtained by these pathways were coupled with amino acids and peptides using known methods of peptide chemistry.

The compounds which were designed as irreversible aspartic protease inhibitors were tested for SAP2 inhibition using a newly-developed FRET assay. The inhibition constants (IC_{50} , k_{2nd} , k_I and K_I -values) were determined in dilution assays measuring the increase of fluorescence at 540 nm. The undecapeptide Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe || Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH (|| designates the cleavage site) was used as substrate.

Within the series of 41 synthesized compounds the aziridines **A-07** and **A-08** exhibiting k_{2nd} -values of about $50000 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Scheme 11-2) were found to be the most active inhibitors. With the exception of two compounds all inhibitors showed time-dependent inhibition indicating irreversible inactivation of the target enzyme.



Scheme 11-2: Most active SAP2 inhibitors: A-07 and A-08

In order to elucidate the selectivity the compounds were tested against the cysteine proteases cathepsin B (*human*), cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*) und rhodesain (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) using a continuous fluorometric microplate assay. In all cases, the substrate Cbz-Phe-Arg-AMC was used. With the exception of the *E*-configured olefin **E-OI-04** all compounds were found to be inactive against cysteine proteases.

The analysis of the structure-activity-relationships in combination with docking studies (collaboration with the group of PD Dr. Baumann, Department of Pharmacy and Food Chemistry, University of Würzburg) revealed different binding modes dependent on the substituents (Me, Ph, CO₂Et) and the electrophilic building blocks (*cis*-aziridine, *cis*-epoxide and Michael acceptor). Hydrophobic residues were found to be important for the inhibition of SAP2. According to the docking studies the most active aziridines **A-07** and **A-08** show the best fit into the SAP2 binding pockets. Longer peptide chains are predicted to be too large

and unflexible and thus do not increase affinity to the enzyme, which is in agreement with the inhibition data. The binding mode of the most active SAP2 inhibitor **A-08** shows unused space in the S1'- and S3-pockets predicting several possibilities for improvement of affinity. A first step in this direction is the aziridine **A-17** which was synthesized but not tested yet. Coupling of hydrophobic *D*-configured amino acids (*D*-Val or *D*-Phe) to the aziridine building block **A-05** should improve the affinity to the S1'-pocket. Larger or branched hydrophobic residues attached to the aziridine nitrogen atom could improve binding into the S3-subsite.

In summary, the results prove that besides the HIV-proteases other aspartic proteases like SAP2 can also be inhibited irreversibly by *cis*-configured epoxides. Furthermore, it is shown that *cis*-configured aziridines can also be used as building blocks for irreversible inhibitors of aspartic proteases, being even more active against SAP2 than corresponding epoxides. Electron poor Michael acceptor systems can also be used, but they are obviously weaker than the three-membered heterocycles. The results obtained with the olefins show that the *E*-configured compounds are superior to *Z*-configured ones.

In collaboration with the group of Prof. Dr. Joachim Morschhäuser and Dr. Peter Staib (Department of Molecular Infection Biology, University of Würzburg) it was proven that the aziridines **A-07** and **A-08**, which are the most active inhibitors of the target enzyme, also inhibit SAP2 in *Candida albicans* cell cultures leading to growth inhibition without being cytotoxic against the fungi.

These aziridines (**A-07** and **A-08**) display antiplasmodial activity as well. Tests against the malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed for both aziridines IC₅₀-values in the low micromolar range. The reasons for the antiplasmodial activity are uncertain at the moment: **A-07** and **A-08** are only weakly active against the plasmodial cysteine proteases falcipain 2 and falcipain 3 and, furthermore, they do not inhibit the parasitic aspartic protease plasmepsin II.

Within the framework of the Collaborative Research Center SFB 630 most compounds were examined for their activity against various pathogens: *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major*, the gramnegative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, as well as the grampositive *Staphylococcus* strains *S. aureus* (line 325 and 8325) and *S. epidermidis* (line RP-62).

Tests on *Trypanosoma brucei* TC221 revealed some active compounds which are not cytotoxic against the host cells, the macrophages (IC₅₀ > 100 µM). The most active

compound which also showed the best selectivity index (> 83.3) was the Phe-substituted epoxide **E-04** displaying an IC_{50} -value of $1.2 \mu\text{M}$ against *T. brucei*.

Only one substance, the aziridine **A-08**, inactivated *Leishmania major* without affecting the macrophages. With an IC_{50} -value of $51.8 \mu\text{M}$ the compound is less active against *Leishmania* than the standard drug miltefosin, but it is also less cytotoxic against macrophages. Thus, the selectivity index (SI) of the aziridine **A-08** (> 1.9) is even better than the one of miltefosin (SI = 1.2).

The testings against the bacteria revealed three compounds **Z-OI-03**, **Z-OI-04** and **Z-OI-10** which inhibit growth and biofilm production of the grampositive pathogens. No effects were found against the gramnegative pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The most active compound, the Phe-substituted maleinic acid ester **Z-OI-03**, exhibited a minimal inhibition concentration (MHK) of $10 \mu\text{M}$ against all three grampositive pathogens, and the inhibition of biofilm production of *S. aureus* was 90% at $2.5 \mu\text{M}$. These effects of the three Z-configured olefines are probably connected to their toxicity (see the following paragraph).

FRET assays with the SARS coronavirus main protease (SARS-CoV M^{pro}) using the nonapeptide Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln || Ser-Gly-Tyr(3'-NO₂)-Arg(Mts)OH (|| designates the cleavage site) as substrate showed the aziridine **A-04** and the olefin **Z-OI-03** to be moderate time-independent inhibitors with the aziridine being the more active inhibitor. Testings for antiviral activity were done with the coronaviruses transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and mouse hepatitis virus (MHV-A59) (collaboration with the group of Prof. Dr. John Ziebuhr, Department of Virology and Immunology, Universität Würzburg, now School of Biomedical Sciences, Queen's University, Belfast). Both compounds exhibited high antiviral activity against both viruses. The much stronger antiviral activity of **Z-OI-03** compared to its moderate protease-inhibitory effect is probably due to its high toxicity. **Z-OI-03** is toxic against macrophages and kidney epithelium cells (IC_{50} -value: $2.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$).

Within the framework of another collaboration (group of Dr. Knut Ohlsen, Department of Molecular Infection Biology, University of Würzburg) the antibiotic flavophosphopholipol (FPL) was labelled with biotin in order to allow studies on binding properties with the penicillin binding proteins of *E. faecium* wild type and a mutant thereof.

The results of the sponge project showed that the aziridinylpeptide miraziridine A, which is active against cysteine, serine and aspartic proteases, can also be isolated from other

Theonella strains than *Theonella mirabilis*. Furthermore, it was shown that protease inhibiting compounds can be found in other sponge species. Unfortunately, the structure elucidation of the protease inhibiting metabolites was not successful up to now due to the low amounts of available sponge material.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

12. Allgemeine Angaben

12.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden

Schmelzpunkte (Smp.):

Alle Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare an einem Schmelzpunktgerät der Firma *Büchi*, Typ 510, Flavil, Schweiz bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Infrarotspektroskopie (IR):

Alle IR-Spektren wurden unverdünnt (neat) an einem *Merlin-Biotech*-FTIR-Spektrometer des Typs *PharmalyzIR* mittels ATR-Einheit aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm^{-1} . Die Kennzeichnung der Intensitäten erfolgt mit den Abkürzungen w (schwach), m (mittel), s (stark) und br (breit).

Spezifische Drehwerte:

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{Temp.}}$ wurden an einem *Perkin-Elmer* 241 Polarimeter ermittelt (Na_{D} -Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$).

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$):

Die Aufnahme der NMR-Spektren wurde an einem *Bruker Avance* 400 Spektrometer durchgeführt. Die Arbeitsfrequenz betrug für $^1\text{H-NMR}$ -Spektren 400.13 MHz und für $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren 100.61 MHz und die Messtemperatur lag bei 300 K. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm und die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Wurde als interner Standard bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren das Tetramethylsilan $\delta(\text{TMS}) = 0.0 \text{ ppm}$ verwendet, ist dies angegeben. Ansonsten dienen für $^1\text{H-NMR}$ -Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.25 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 2.50 \text{ ppm}$, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79 \text{ ppm}$], und bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren dessen ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 39.52 \text{ ppm}$] als Standard.

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sep = Septett, m = Multiplett, m_{c} = zentriertes Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, dq = Dublett vom Quartett und b = breit.

Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale erfolgte über 2D-Korrelationsspektren (COSY, HMQC und HMBC).

Konnten die Signale einzelnen Diastereomeren zugeordnet werden, so erfolgt dies mit den Bezeichnungen Dia1 und Dia2 bzw. unter Angabe der absoluten Konfiguration.

Massenspektrometrie (MS):

Die Aufnahmen der ESI-Massenspektren und die LC-MS-Analysen erfolgten an einer *Agilent 1100 LC / MSD-Trap* ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von *Agilent*.

Die LC-MS-Analysen wurden auf einer *Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18* Säule (4,6 x 150 mm), mit einem Gradient von 40% Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure über 5 min, 40% auf 95% Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure über 25 min und weitere 15 min bei 95% Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure (Tab. 12-1), Fluss von 600 μ L / min und UV-Detektion bei 254 nm durchgeführt. Die Kapillarensparnung betrug dabei standardmäßig 2,6 kV und als Trockengas diente N₂. Gemessen wurde im positiven Modus.

Tab. 12-1: Gradient für LC-MS

| Zeit [min] | Solvens B [%] | Fluss [mL/min] |
|------------|---------------|----------------|
| 5.0 | 40.0 | 0.600 |
| 25.0 | 95.0 | 0.600 |
| 40.0 | 95.0 | 0.600 |

Solvens A: Wasser + 0.1% Ameisensäure;
Solvens B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure

Die bei der LC-MS-Analyse erhaltenen Retentionszeiten (R_t) und die Kapazitätsfaktoren k' sowie die Reinheiten, ermittelt aus dem Verhältnis der Flächen aller auftretenden Peaks, werden für die Verbindungen angegeben.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F254 der Firma *Merck* verwendet.

Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber *Ehrlich's Reagenz* (Amine) oder Ioddampf.

Säulenchromatographie (SC):

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm mesh) der Firma *Merck* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt.

Die Laufmittelzusammensetzungen für DC und SC sind in Volumenteilen angegeben.

12.2 Enzym-Assays

Alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

Verwendete Abkürzungen: E = Enzym; S = Substrat; P = Puffer; I = Inhibitor.

Photometrie:

a) Gerät:

Lambda EZ 210 Photometer von *Perkin-Elmer* mit thermostatierbarem Küvettenhalter; Durchführung in 1 cm Quarzküvetten.

b) Assay-Bedingungen:

SAP2-Assay-A

| | |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Verdünnungsassay |
| Volumina | 100 μ L E, 20 μ L I + 680 μ L P, 50 μ L DMSO, 50 μ L S |
| Substrat | Cbz-His-Phe(p NO ₂) PheOMe [S]: 555 μ M |
| Enzym | *SAP2 (100 μ L verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand) |
| Puffer | CITRAT 4.0 |
| Temperatur | 37 °C |
| Detektion | λ : 310 nm, 3 min |
| Screening | [I]: 100 μ M Inkubation E + I: 15, 30, 45 u. 60 min, Verdünnung 1:6 vor Substratzugabe |

* Verdünnung eines *C. albicans*-Zellkultur-Überstandes, so dass mit 100 μ L im Assay eine Steigung von 0.035 Δ A / min erhalten wird;
Puffer: CITRAT pH 4.0, 40 mM, NaCl 200 mM, Brij 35 0.005%; || markiert die Spaltstelle.

SAP2-Assay-B

| | |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Verdünnungsassay |
| Volumina | 100 μ L E, 20 μ L I + 680 μ L P, 50 μ L DMSO, 50 μ L S |
| Substrat | Leu-Ser-Phe(p NO ₂) Nie-Ala-LeuOMe [S]: 350 μ M |
| Enzym | *SAP2 (100 μ L verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand) |
| Puffer | ACETAT 4.7 |
| Temperatur | 30 °C |
| Detektion | λ : 310 nm, 3 min |
| Screening | [I]: 100 μ M Inkubation E + I: 15, 30, 45 u. 60 min, Verdünnung 1:6 vor Substratzugabe |

* Verdünnung eines *C. albicans*-Zellkultur-Überstandes, so dass mit 100 μ L im Assay eine Steigung von 0.035 Δ A / min erhalten wird;
Puffer: ACETAT pH 4.7, 100 mM, Brij 35 0.005%; || markiert die Spaltstelle.

Fluorimetrie:

a) Gerät:

Cary Eclipse Fluorimeter von *Varian* mit microplate reader und Heizeinheit;

Durchführung der Assays in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc®).

b) Assay-Bedingungen:

SAP2-Assay

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Verdünnungsassay |
| Volumina | 35 µL P, 10 µL E, 5 µL I + 145 µL P, 5 µL S |
| Substrat | DabcyL-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 µM K_m (SAP2): 28.7 µM |
| Enzym | *SAP2 (10 µL verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand) |
| Puffer | CITRAT 3.2 |
| Temperatur | 30 °C |
| Detektion | Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 20 min (Screening), 10 min (Konz.-reihe) |
| Screening | [I]: 100 µM Inkubation E + I: 5 min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe |
| Konzentrationsreihen | [I]: 10 - 100 µM (1- 20 µM für stärkere Inhibitoren) Inkubation E + I: 5, 20 u. 35 min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe |

* Verdünnung eines *C. albicans*-Zellkultur-Überstandes, so dass mit 10 µL im Assay eine Steigung von ~ 20 ΔF / min erhalten wird;

Puffer: CITRAT pH 3.2, 50 mM, NaCl 50 mM; | | markiert die Spaltstelle.

Plasmeypsin-II-Assay

| | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Verdünnungsassay |
| Volumina | 40 µL P, 5 µL E, 5 µL I + 145 µL P, 5 µL S |
| Substrat | DabcyL-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 µM |
| Enzym | Plasmeypsin II: 1.5 bzw. 2.5 µg/mL |
| Puffer | CITRAT 3.2 |
| Temperatur | 30 °C |
| Detektion | Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 30 min |
| Screening | [I]: 100 µM Inkubation E + I: 5 min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe |

Puffer: CITRAT pH 3.2, 50 mM, NaCl 50 mM; | | markiert die Spaltstelle.

Cathepsin L

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Kontinuierlicher Assay |
| Volumina | 85 μ L P, 10 μ L E, 85 μ L P, 5 μ L DMSO, 10 μ L I, 5 μ L S |
| Substrat | Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 μ M K_m (CL): 6.5 μ M |
| Enzym | Cathepsin L (<i>Paramecium tetraurelia</i>): 14.5 ng/mL |
| Puffer | TRIS 6.0 |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min |
| Screening | [I]: 200 μ M |

Puffer: TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;
 || markiert die Spaltstelle.

Cathepsin B

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Kontinuierlicher Assay |
| Volumina | 85 μ L P, 10 μ L E, 85 μ L P, 5 μ L DMSO, 10 μ L I, 5 μ L S |
| Substrat | Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 μ M K_m (CB): 150 μ M |
| Enzym | Cathepsin B (humane Leber): 14.5 ng/mL |
| Puffer | TRIS 6.0 |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min |
| Screening | [I]: 200 μ M |

Puffer: TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;
 || markiert die Spaltstelle.

Rhodesain

| | |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Kontinuierlicher Assay |
| Volumina | 90 μ L P, 5 μ L E, 85 μ L P, 10 μ L DMSO, 5 μ L I, 5 μ L S |
| Substrat | Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 μ M K_m (RD): 826.5 nM |
| Enzym | Rhodesain (<i>Trypanosoma rhodesiense</i>): 832.5 ng/mL |
| Puffer | ACETAT 5.5 |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min |
| Screening | [I]: 100 μ M |

Puffer: ACETAT pH 5.5, 50 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%; || markiert die Spaltstelle.

SARS-CoV M^{pro}

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Assaymethode | Kontinuierlicher Assay |
| Volumina | 90 µL P, 5 µL E, 85 µL P, 5 µL I, 15 µL S |
| Substrat | Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln Ser-Gly-Tyr(3'-NO ₂)-Arg(Mts)OH [S]: 150 µM K_m (SARS-CoV M ^{pro}): 190 µM |
| Enzym | SARS-CoV M ^{pro} : 8.5 µg/mL |
| Puffer | TRIS 7.5 |
| Temperatur | 25 °C |
| Detektion | Ex: 320 nm / Em: 420 nm, 20 min |
| Screening | [I]: 100 µM |
| Konzentrationsreihen | [I]: 12.5 - 100 µM |

Puffer: TRIS pH 7.5, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;
| | markiert die Spaltstelle.

12.3 Enzyme, Substrate und Reagenzien

Enzyme:

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| SAP2 | Prof. Dr. J. Morschhäuser; Dr. P. Staib, Würzburg |
| Plasmeypsin II | Prof. Dr. G. Klebe, Marburg |
| Cathepsin L (<i>Paramecium tetraurelia</i>) | Calbiochem |
| Cathepsin B (humane Leber) | Calbiochem |
| Falcpain 2, 3 (<i>Plasmodium falciparum</i>) | Prof. Dr. P. Rosenthal, SF, USA |
| Rhodesain (<i>Trypanosoma rhodesiense</i>) | Prof. Dr. J. McKerrow, Dr. C. Caffrey, SF, USA |
| SARS-CoV M ^{pro} | Prof. Dr. J. Ziebuhr, Würzburg, jetzt Belfast |
| Trypsin (boviner Pankreas) | Merck |

Substrate:

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe- Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH | JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin; GenScript Corporation, New Jersey, USA |
| Dabcyl-Arg-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Leu- Val-Ile-His-Thr-Glu(EDANS)-ArgOH | JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin |
| Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- Tyr(3'-NO ₂)-Arg(Mts)OH | Dipl.-Chem. M. Schiller (AK Schirmeister), Würzburg |
| Cbz-Phe-Arg-AMC | Bachem |
| Cbz-His-Phe(<i>p</i> NO ₂)-PheOMe | Bachem |
| Leu-Ser-Phe(<i>p</i> NO ₂)-Nle-Ala-LeuOMe | Bachem |

Reagenzien:

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| LiOH•H ₂ O, NaN ₃ , Ph ₃ P, Tartrate, PLE-Suspension | Fluka |
| DMAP, DBU, TBAF•H ₂ O, Collidin Fumarylchlorid, Monoethylfumarat | Merck |
| DPPA, HOSuc, IBCF, TBDMSCI, Isoamyltriphenylphosphoniumbromid, 4-Bromcrotonsäureethylester | Aldrich |
| PyBOP, DCC | IRIS Biotech |
| Pd-C 10% typ E 10 N/D | Degussa |
| Aminosäuren, Dipeptide | Bachem, Novabiochem, IRIS Biotech |

Alle verwendeten AS / Peptide werden mit dem 3-Buchstaben-Code abgekürzt und besitzen *L*-Konfiguration. *D*-konfigurierte AS / Peptide werden explizit benannt. Als *N*-terminale Schutzgruppen dienten Boc bzw. Cbz und als *C*-terminale Schutzgruppen kamen OBn bzw. OMe zum Einsatz. Abspaltung der Schutzgruppen vor Kupplungen erfolgte durch die gängigen Methoden und die als Hydrochloride, *para*-Tosylate bzw. TFA-Salze eingesetzten AS / Peptide wurden vor den Kupplungen mittels Stickstoffbasen, wie TEA, NMM oder DIEA freigesetzt.

Die Ermittlung der Diastereomerenverhältnisse erfolgte, falls Grundlinientrennung vorlag, anhand der LC-MS-Chromatogramme, ansonsten wurde das Verhältnis anhand der NMR-Spektren bestimmt.

Ehrlich's Reagenz: Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 mL konz. Salzsäure / MeOH (3 / 7); Detektion durch Erhitzen auf ca. 150 °C.

12.4 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt und getrocknet (KOH, Molekularsieb 4Å, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂CO₃). Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängige Trockenmittel (Natrium, P₄O₁₀, K₂CO₃, KOH, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4 Å, KOH oder Natrium aufbewahrt.

Als Schutzgas wurde, sofern nötig, Stickstoff verwendet.

13. Allgemeine synthetische Methoden

13.1 Methode A: Epoxidsynthesen

13.1.1 Methode A1: Epoxidierungen

13.1.1.1 Methode A1a: Weitz-Schäffer-Epoxidierung

Unter Stickstoffatmosphäre werden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu 1.5 Äq. einer wasserfreien Lösung von *Tert*butylhydroperoxid in Toluol (3 M) 1.1 Äq. einer Lösung von *n*Butyllithium in Hexan (2.5 M) gegeben und die Lösung 5 min gerührt. Über ein Septum wird dann das Maleat (1 Äq.) langsam zugetropft. Nach anschließendem langsamem Erwärmen auf RT (10 h) wird die Reaktionsmischung noch 1 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von Na_2SO_3 -Lösung und anschließendem 30 minütigem Rühren wird die Mischung 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je 2-mal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das erhaltene Öl wird ohne weitere Aufreinigung mit 25 Äq. Alkohol und 10 mol% *para*-Toluol-sulfonsäure 3 d unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittel i. Vak. wird der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, je 2-mal mit NaHCO_3 - und NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.1.1.2 Methode A1b: *m*-CPBA-Epoxidierung

Zu 1 Äq. Olefin in Dichlormethan werden 2-3 Äq. *m*-CPBA gegeben und die Reaktionsmischung 4-12 d bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Na_2SO_3 -Lösung gequencht, die organische Phase abgetrennt und mit 1 M HCl-, NaHCO_3 - und NaCl-Lösung (je 2-mal) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.1.2 Methode A2: Epoxide aus Threonin

Unter Stickstoffatmosphäre werden zu einer Lösung von 1 Äq. *L*- bzw. *D*-Threonin in Wasser 2.1 Äq. einer 62%igen wässrigen Hydrogenbromid-Lösung und 3.5 Äq. Kaliumbromid gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und 1.1 Äq. Natriumnitrit langsam in kleineren Portion innerhalb von 2 h dazugegeben. Anschließend wird die gelbe Lösung 3 h bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann mit Diethylether extrahiert. Trocknen über Na_2SO_4 und entfernen des Lösungsmittels i. Vak. liefert ein gelbes Öl. Dieses wird ohne weitere Aufreinigung in Ethanol gelöst und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden 2 Äq. Kaliumhydroxid in Ethanol langsam zugetropft. Danach wird die Lösung 1 h bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und weitere 15 h bei RT

gerührt. Nach Abfiltrieren des Kaliumbromids wird das Solvens i. Vak. auf 1/5 eingengt und Diethylether zugegeben. Die entstehenden weißen Flocken werden abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

13.1.3 Methode A3: Darzens-Glycidester-Synthese

Zu einer Lösung aus 1 Äq. Acetophenon und 1 Äq. Chloressigsäureethylester in abs. *tert*-butanol wird bei 0 °C 1 Äq. Kalium*tert*butanolat in abs. *tert*-butanol langsam zugetropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt, das Solvens i. Vak entfernt und das verbleibende farblose Öl über eine Vigreux-Kolonnen destilliert.

13.1.4 Methode A4: Synthese der Oxiranmonocarbonsäuren

Zu einer Lösung aus 1 Äq. Kaliumcarboxylat der Epoxide in 7 Äq. 5%iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung wird bis zur Sättigung NaCl gegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wird die Lösung 4-mal mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt.

13.2 Methode B: Aziridinsynthesen

13.2.1 Methode B1: Aziridine aus *L*-Tartraten

13.2.1.1 Methode B1a: Bromalkohol aus *L*-Tartrat

L-Tartrat wird bei 0 °C mit 4 Äq. HBr/Eisessig (35%) versetzt und anschließend bei RT 10-14 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen und 3-mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden je 2-mal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in abs. Alkohol gelöst, katalytische Mengen Acetylchlorid hinzugefügt und 6 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak erhält man den (2*S*,3*S*)-Bromalkohol.

13.2.1.2 Methode B1b: Azidoalkohol aus Bromalkohol

Zu einer Suspension aus 1.1 Äq. Natriumazid und 10 mol% 18-Krone-6 in abs. DMF wird der (2*S*,3*S*)-Bromalkohol langsam zugetropft. Nach 1 d Rühren bei RT wird die gelbe Lösung mit Wasser versetzt und 5-mal mit Diethylether extrahiert. Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ und Entfernung des Solvens i. Vak. ($2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 55°C) liefert ein ca. 6-7 / 1-Gemisch der *syn* [(2*R*,3*R*)] / *anti* [(2*R*,3*S*)]-Azidoalkohole.

13.2.1.3 Methode B1c: Staudinger-Reaktion zum Aziridin

Die chromatographisch nicht gereinigten Azidoalkohole werden in abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der gelben Lösung werden innerhalb von 30 min 1.05 Äq. PPh₃ portionsweise zugesetzt. Danach wird die klare, gelbe Lösung 1.5 h bei RT, 4.5 h bei 90°C sowie weitere 13 h bei RT gerührt, wobei eine Braunfärbung und Stickstoffentwicklung beobachtet wird. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. ($2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 55°C) erfolgt eine Vorreinigung mittels SC. Aus dem erhaltenen Gemisch der *cis* [(2*R*,3*S*)] / *trans* [(2*S*,3*S*)]-Aziridine wird das *cis*-Aziridin durch fraktionierende Kristallisation abgetrennt.

13.2.1.4 Methode B1d: *N*-Benzylieerung von Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

Zu einer Lösung von 1 Äq. *cis*-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat **A-02** in DMF werden nacheinander 1 Äq. Na₂CO₃, 2 Äq. Benzylbromid und katalytische Mengen Kaliumiodid gegeben. Nach 2 d Rühren bei 60 °C wird die orange Lösung in Eis gegossen und 4-mal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit Wasser und NaCl-Lösung (je 2-mal), wird diese über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.2.2 Methode B2: Cromwell-Synthese zu Aziridinen

Eine Lösung von 1 Äq. 2,3-Dibromester in Alkohol wird bei 0 °C langsam zu einer Lösung von 3.6 Äq. Benzylamin in Alkohol zugetropft. Das Gemisch wird langsam auf RT (~ 3 h) erwärmt und 1-12 d gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in Diethylether aufgenommen, die organische Phase 3-mal mit Wasser gewaschen und die wässrigen Phasen 3-mal mit Diethylether reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch SC gereinigt.

13.2.3 Methode B3: Mukaiyama-Reaktion zu Aziridinen

2.98 Äq. PPh₃ werden in Acetonitril / Tetrachlorkohlenstoff (4 / 1) gelöst. Nach 30 min Rühren wird zur gelben Lösung eine Lösung aus 1 Äq. *N*-Benzyl-geschütztem Aminosäurealkohol und 3.25 Äq TEA in Acetonitril zugetropft und dann 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC aufgereinigt.

13.3 Methode C: Z-Olefinsynthesen

13.3.1 Methode C1: Maleinsäurehalbester oder -monoamide aus Maleinsäureanhydrid

Zu einer Lösung aus 1 Äq. Maleinsäureanhydrid und 1 Äq. Alkohol bzw. AS in Dichlormethan wird bei 0 °C 1.1 Äq. TEA gegeben und die Mischung 3 h bei 0 °C und 1 d bei RT gerührt. Die gelbe Lösung wird auf Wasser gegossen und 3-mal mit Dichlormethan gewaschen, um nicht umgesetztes Edukt abzutrennen. Anschließend wird die wässrige Phase mit 2 M HCl auf pH 2 gebracht und nochmals 3-mal mit Dichlormethan extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit NaCl-Lösung und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

13.3.2 Methode C2: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion

Unter Stickstoffatmosphäre werden bei 0 °C zu einer Lösung von 1 Äq. des nach Literaturangaben synthetisierten Ethyl(diphenylphosphono)acetats^[164] in abs. THF 1.2 Äq. Natriumiodid und 1 Äq. DBU gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei 0 °C gerührt, anschließend auf –78 °C gekühlt und 1 Äq. *N*-geschützter Aminoaldehyd, dargestellt durch DIBALH-Reduktion des entsprechenden Methylesters,^[111] in abs. THF langsam über ein Septum zugetropft. Nach Rühren der Mischung für 3 h bei –78 °C lässt man die Reaktionsmischung innerhalb von 2 h auf 0 °C erwärmen und nochmals 2 h bei 0 °C rühren. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von NH₄Cl gequencht und die Mischung 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je 2-mal mit ges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels SC.

13.3.3 Methode C3: Wittig-Reaktion

Unter Stickstoffatmosphäre werden bei –10 °C zu einer Lösung von 1.3 Äq. Isoamyl-triphenylphosphoniumbromid in abs. THF 1.5 Äq. Kalium*tert*butanolat gegeben. Nach 3 h Rühren bei –10 °C wird 1 Äq. *N*-Boc-geschütztes Phenylalaninal in abs. THF langsam über ein Septum zugetropft. Anschließend lässt man die Mischung 3 h bei –10 °C über Nacht (15 h) bei RT rühren. Nach Quenchen der Reaktion durch Eingießen in 20%ige wässrige Zitronensäure-Lösung und Abtrennen der THF-Phase wird 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je 2-mal mit Wasser, ges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.4 Methode D: Hydrolysen

13.4.1 Methode D1: Hydrolysen mit Lithiumhydroxid

13.4.1.1 Methode D1a: Monohydrolyse von Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

0.95 Äq. LiOH·H₂O werden bei 0 °C in einer Lösung aus 1 Äq. Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat **A-02** in abs. Ethanol suspendiert. Die Suspension wird unter allmählicher Gelbfärbung 1 d bei 0 °C sowie 2 d bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird nach ¹H-NMR-spektroskopischer Kontrolle der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

13.4.1.2 Methode D1b: Hydrolyse von Aziridin-2-carboxylaten

1 Äq. LiOH·H₂O wird bei 0 °C in einer Lösung aus 1 Äq. Aziridin-2-carboxylat in abs. Alkohol suspendiert. Die Suspension wird unter allmählicher Gelbfärbung 2 d bei 0 °C sowie 2-4 d bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

13.4.2 Methode D2: Hydrolysen mit Kaliumhydroxid

13.4.2.1 Methode D2a: Monohydrolyse von Diestern

Zu einer eisgekühlten (0 °C) Lösung von 1 Äq. Diester in abs. Ethanol werden 0.95 Äq. ethanolische Kaliumhydroxidlösung (0.5 M) langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wird durch Zugabe von Diethylether das Produkt (weiße Flocken) ausgefällt, abfiltriert und i. Vak. getrocknet. Das Rohprodukt wird nach ¹H-NMR-spektroskopischer Kontrolle der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

13.4.2.2 Methode D2b: Hydrolyse von 3-Methyl-3-phenyloxiran-2-carboxylat

Zu einer eisgekühlten (0 °C) Lösung von 1 Äq. 3-Methyl-3-phenyloxiran-2-carboxylat **E-21** / **E-21-t** in abs. Ethanol wird 1 Äq. ethanolische Kaliumhydroxidlösung (0.5 M) langsam zugetropft. Die Mischung wird 5 h bei 0 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

13.4.3 Methode D3: PLE-Hydrolysen

13.4.3.1 Methode D3a: PLE-Hydrolyse von *meso*-Diethylepoxysuccinat

Zu einer Lösung von 1 Äq. *meso*-Diethylepoxysuccinat **E-02** in 0.1 M KH_2PO_4 -Puffer pH 7 werden 240 U PLE-Suspension gegeben. Während des Rührens bei RT wird der pH mittels 1 M NaOH-Lösung auf pH 7 gehalten. Nach Zugabe von 1 Äq. NaOH (nach 5 h) wird die Reaktion beendet. Nachdem das nicht umgesetzte Edukt durch 5-maliges Waschen mit Diethylether entfernt wurde, wird die wässrige Phase mit 2 M HCl auf pH 2 gebracht und 4-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird 2-mal mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

13.4.3.2 Methode D3b: PLE-Hydrolyse von racemischem Aziridin-2-carboxylat

Zu einer Lösung von 1 Äq. Aziridin **A-05** in Wasser pH 7 werden 2-mal im Abstand von 5 h 240 U PLE-Suspension gegeben. Während des Rührens bei RT wird der pH mittels 0.1 M NaOH-Lösung auf pH 7 gehalten. Nach Zugabe von 0.5 Äq. NaOH (nach 12 h) wird die Reaktion beendet. Der nicht umgesetzte Anteil an Ester wird durch 4-maliges Extrahieren mit Diethylether isoliert. Die organische Phase wird anschließend 2-mal mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

13.5 Methode E: Synthese von Aminosäurederivaten und Peptiden

13.5.1 Methode E1: Synthese von Aminoalkoholen

Zu 1 Äq. *N*-geschützter AS in Dimethoxyethan werden bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 1 Äq. NMM und 2 min später 1 Äq. IBCF zugegeben und nach 5 min Rühren wird das entstandene Hydrochlorid abfiltriert. Das Filtrat wird auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt, 1.5 Äq. NaBH_4 in etwas Wasser in einer Portion und 1 min später noch einmal die 40-fache Menge Wasser zugegeben. Die entstandenen weißen Flocken werden abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

13.5.2 Methode E2: Synthese der Statinanaloge

Bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ werden zu einer Lösung von 1.5 Äq. Diisopropylamin in abs. THF 1.5 Äq. *n*-Butyllithium gegeben und die Lösung 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird anschließend auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und 1.5 Äq. Ethylacetat zugegeben. 30 min später erfolgt die Zugabe von 1 Äq. *N*-Boc-geschütztem Phenylalaninal, dargestellt durch DIBALH-Reduktion des entsprechenden Methylesters,^[111] in abs. THF. Die Mischung wird danach für weitere 30 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend wird die Reaktion bei dieser Temperatur durch 1 M HCl gequencht und das Kühlbad entfernt. Hat die

Reaktionsmischung RT erreicht, wird sie mit 1 M HCl auf pH 2 eingestellt und 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase mit NaCl-Lösung (2-mal), Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. werden die erhaltenen Diastereomere mittels SC getrennt.

13.5.3 Methode E3: Synthese der Peptide

Zu 1 Äq. *N*-geschützter/*m* AS bzw. Dipeptid in abs. DMF werden bei 0 °C nacheinander 1 Äq. *C*-geschützte/*s* AS bzw. Dipeptid, 1.1 Äq. DPPA und 2.1 Äq. TEA gegeben und das Gemisch 1-2 d bei 0 °C sowie 5-8 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung in Ethylacetat gegossen und nacheinander je 3-mal mit Wasser, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die NMR-spektroskopisch sauberen Peptide werden mittels TFA Boc-entschützt und danach der PyBOP- bzw. DPPA-vermittelten Peptidkupplung an die elektrophilen Bausteine zugeführt.

13.6 Methode F: Schutzgruppen

13.6.1 Methode F1: Hydrogenolyse der Benzylester (Cbz oder OBn)

Eine Lösung des Benzylesters in Ethylacetat, Methanol oder Ethanol wird mit 10 mol% Pd-C (10%) versetzt. Der Kolben wird mehrmals evakuiert und mit N₂ gespült und anschließend mit H₂ begast. Das Gemisch wird unter kräftigem Rühren mehrere Stunden (8-16 h) unter Normaldruck bei RT hydrogenolysiert. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite[®] wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Produkt aus Ethylacetat / Petrolether 40-60 umkristallisiert.

13.6.2 Methode F2: TFA-Entschützung von *N*-Boc-geschützten AS / Peptiden

1 Äq. *N*-Boc-geschützte/*s* AS bzw. Peptid wird in einem Dichlormethan / TFA-Gemisch (5 / 1) bei 0 °C gelöst und 1-2 h bei 0 °C sowie 1-2 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Um die restliche TFA zu entfernen wird der Rückstand mehrmals erneut in Dichlormethan aufgenommen und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Boc-entschützten AS bzw. Peptide werden ohne weitere Reinigung sofort an die elektrophilen Bausteine gekuppelt.

13.6.3 Methode F3: *N*-Benzylisierung von AS

Zu 1 Äq. Aminosäureester in Alkohol wird bei 0 °C 1 Äq. Benzaldehyd zugegeben und 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend erfolgt die portionsweise Zugabe von 2 Äq. NaBH₄. Die weiße Suspension wird in eine Lösung aus 20% HCl und Diethylether (1 / 1) gegossen, die Phasen getrennt und die organische Phase 3-mal mit 20% HCl extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden 2-mal mit Diethylether gewaschen, anschließend mit Na₂CO₃ neutralisiert und 3-mal mit Diethylether extrahiert. Nach Waschen mit NaCl-Lösung (2-mal) wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.6.4 Methode F4: TBDMS-Schätzung von Alkoholen

Zu einer Mischung aus 1 Äq. *N*-geschütztem Aminosäurealkohol und 0.2 Äq. DMAP in Dichlormethan werden bei 0 °C unter kräftigem Rühren 2.05 Äq. TEA zugegeben. 10 min später erfolgt die Zugabe von 1.05 Äq. TBDMSCl in Dichlormethan. Nach Rühren für 1 h bei 0 °C und über Nacht (17 h) bei RT wird die Reaktionsmischung 2-mal mit Wasser gewaschen und das Waschwasser 3-mal mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend 2-mal mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC aufgereinigt.

13.6.5 Methode F5: TBDMS-Entschätzung

Zu einer Lösung von 1 Äq. der TBDMS-geschützten Verbindung in THF werden bei 0 °C unter kräftigem Rühren 1.85 Äq. TBAF·3H₂O und etwas Eisessig gegeben. Nach Rühren für 1 h bei 0 °C und 5 h bei RT wird zur Reaktionsmischung Wasser gegeben und dann 6-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird 2-mal mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt durch SC.

13.7 Methode G: Aminosäure- / Peptidkupplungen

13.7.1 Methode G1: Kupplung über IBCF (unsymmetrisches Anhydrid)

Zu einer Lösung von 1 Äq. Säure in abs. THF werden bei – 15 °C 1 Äq. NMM und 5 min später 1 Äq. IBCF gegeben. Nach weiteren 5 min erfolgt die Zugabe von 1 Äq. C-geschützter AS in abs. DMF. Die sofort trüb werdende Reaktionsmischung wird anschließend 1 h bei

– 15 °C, 1-2 h bei 0 °C und 10-18 h bei RT gerührt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, nacheinander je 2-mal mit NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethylacetats i. Vak. wird das Rohprodukt mittels SC gereinigt.

13.7.2 Methode G2: Kupplung mit DPPA

Zu einer Suspension aus 1 Äq. Kalium- bzw. Lithiumcarboxylat der Epoxide bzw. Aziridine in abs. DMF werden bei 0 °C nacheinander 1.05 Äq. C-geschützte AS, 1.1 Äq. DPPA und 1.05 Äq. TEA gegeben. Das Gemisch wird 1-2 d bei 0 °C sowie 4-8 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung in Ethylacetat gegossen und nacheinander je 3-mal mit Wasser, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC aufgereinigt.

13.7.3 Methode G3: Kupplung mit PyBOP

Ein equimolares Gemisch aus Säure, C-geschützter/m AS bzw. Peptid und PyBOP in Dichlormethan / DMF (1 / 1) wird bei 0 °C mit 3 Äq. DIEA versetzt und dann 3-5 h bei 0 °C sowie 3-7 d bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in Ethylacetat gegossen, nacheinander je 2-mal mit NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

13.7.4 Methode G4: Kupplung mit DCC und DMAP (Steglich)

Zu einer Lösung aus 1 Äq. Maleinsäurehalbester, 1 Äq. N-geschütztem Aminosäurealkohol und 0.1 Äq. DMAP in abs. Dichlormethan werden bei 0 °C 1.1 Äq. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in kleinen Portionen nach und nach zugegeben (ca. 30 min). Die Reaktionsmischung wird über Nacht (16 h) bei RT gerührt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, nacheinander je 2-mal mit NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC gereinigt.

13.7.5 Methode G5: Kupplung über Säuredichlorid

Zu einer Lösung aus 2 Äq. C-geschützter AS und 2.1 Äq. TEA in DMF wird bei – 15 °C 1 Äq. Fumarylchlorid langsam zugetropft. Nach Rühren für 1 h bei – 15 °C, 1 h bei 0 °C

und 1 h bei RT wird ein Gemisch aus Ethylacetat und Wasser (1 / 1) zugegeben. Anschließend werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dann mit NaCl-Lösung (2-mal) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird aus Dichlormethan / Hexan umkristallisiert.

13.7.6 Methode G6: Kupplung an Vinylbromid

Eine Mischung aus 1 Äq. kommerziell erhältlichem 4-Bromcrotonsäureethylester, 1 Äq. PheOBn und 4 Äq. Kaliumcarbonat in Wasser wird 3 d bei 60 °C gerührt. Die orange Reaktionsmischung wird anschließend 4-mal mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC gereinigt.

13.7.7 Methode G7: Kupplung an Vinylethylalkohol

Zu einer Lösung aus 1 Äq. des nach Literaturangaben^[166] synthetisierten Vinylethylalkohols (*E*)-5-Hydroxypent-2-ensäureethylester und 1.1 Äq. TEA in Diethylether werden bei 0 °C 1.2 Äq. des aus PCI₅ und Cbz-PheOH dargestellten Säurechlorids Cbz-Phe-Cl^[167] langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei 0 °C und 19 h bei RT gerührt, auf Eis gegossen, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander je 3-mal mit 2 M HCl, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels SC.

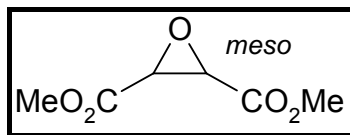
13.8 Methode H: Biotin-Markierung von FPL

Unter Stickstoffstrom werden 1 Äq. *D*-Biotin und 30 Äq. Thionylchlorid in Dichlormethan 1 h bei RT gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid wird anschließend i. Vak. entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wird in Collidin gelöst. Bei –40 °C werden 0.85 Äq. Flavophospholipol (FPL) zugegeben und die Reaktionsmischung 3 h bei –40 °C und weitere 20 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Mischung 3-mal mit NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, um das Produkt in die wässrige Phase zu extrahieren und vom Collidin abzutrennen. Die NaHCO₃-Phase wird mit 2 M HCl auf pH 2 gebracht und die wässrige Phase 5-mal mit *n*Butanol extrahiert. Entfernen des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum bei 55 °C liefert einen farblosen Feststoff. Die weitere Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC und die Charakterisierung mit MS.

14. Synthetisierte Verbindungen

14.1 Epoxid-Bausteine

14.1.1 *Meso*-Oxiran-2,3-dicarbonsäuredimethylester (E-01)



Methode: A1a

Ansatz: 27.5 mL (82.5 mmol) *Tert*butylhydroperoxid in Toluol (3 M), 24.2 mL (60.5 mmol) *n*Butyllithium in Hexan (2.5 M), 6.89 mL (55.0 mmol) Maleinsäuredimethylester; 100 mL Methanol, 1.00 g (10 mol%) *para*-Toluolsulfonsäure.

Reaktionsdauer: 10 h – 78 °C bis RT, 1 d RT; 3 d Rückfluss.

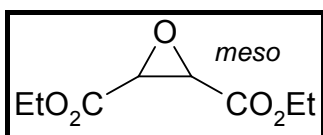
SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.23$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 3.57 g (22.3 mmol, 40%). – Gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 3.72$ (s, 2 H, 2 x Epox- CH), 3.81 (s, 6 H, 2 x OCH_3) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[105,106]

14.1.2 *Meso*-Oxiran-2,3-dicarbonsäurediethylester (E-02)



Methode: A1a

Ansatz: 35.0 mL (105 mmol) *Tert*butylhydroperoxid in Toluol (3 M), 30.8 mL (77.0 mmol) *n*Butyllithium in Hexan (2.5 M), 11.4 mL (70.0 mmol) Maleinsäurediethylester; 150 mL Ethanol, 1.30 g (10 mol%) *para*-Toluolsulfonsäure.

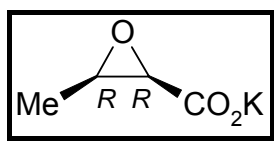
Reaktionsdauer: 10 h – 78 °C bis RT, 1 d RT; 3 d Rückfluss.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.20$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 7.64 g (40.6 mmol, 58%). – Gelbes, hochviskoses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.30$ (t, 6 H, 2 x CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 3.69 (s, 2 H, 2 x Epox- CH), 4.27 (q, 4 H, 2 x OCH_2 , $J = 7.1$ Hz) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[107]

14.1.3 (2R,3R)-3-Methyloxiran-2-kaliumcarboxylat (E-03)

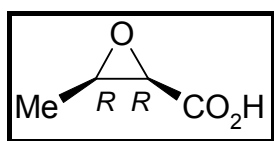
Methode: A2

Ansatz: 6.00 g (50.4 mmol) *L*-Threonin in 60 mL Wasser, 8.00 mL (105 mmol) HBr-Lösung (62%), 21.0 g (176 mmol) KBr, 3.82 g (55.4 mmol) NaNO₂; 100 mL Ethanol, 5.09 g (90.7 mmol) KOH in 50 mL Ethanol.

Reaktionsdauer: 2 h – 15 °C, 3 h – 10 °C; 1 h – 30 °C, 15 h RT.

Ausbeute: 5.86 g (41.8 mmol, 83%). – Farbloser Feststoff.

¹H-NMR (D₂O, 400.13 MHz): δ = 1.27 (d, 3 H, CH₃, *J* = 5.3 Hz), 3.34 (dd, 1 H, Epox-CH-CH₃, *J* = 5.0, 5.3 Hz), 3.51 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂K, *J* = 5.0 Hz) ppm.

14.1.4 (2R,3R)-3-Methyloxirancarbonsäure (E-05)

Methode: A4

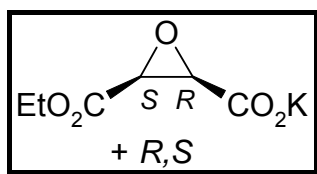
Ansatz: 530 mg (3.78 mmol) **E-03** in 70 mL 5%iger KHSO₄-Lösung, 5.00 g NaCl.

Reaktionsdauer: 3 h RT.

Ausbeute: 298 mg (2.92 mmol, 77%). – Gelblicher Feststoff.

¹H-NMR (DMSO, 400.13 MHz): δ = 1.46 (d, 3 H, CH₃, *J* = 6.6 Hz), 4.15 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂H, *J* = 2.6 Hz), 4.50 (dq, 1 H, Epox-CH-CH₃, *J* = 2.6, 6.6 Hz), 6.89 (br s, 1 H, OH) ppm.

Die ¹H-NMR-spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[218]

14.1.5 (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-3-Ethyloxiran-2-kaliumcarboxylat (E-06)

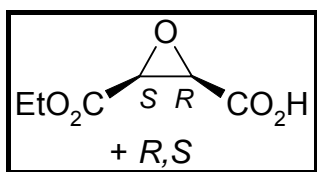
Methode: D2a

Ansatz: 1.26 g (6.70 mmol) **E-02** in 10 mL Ethanol, 12.7 mL (6.36 mmol) ethanolische KOH-Lösung (0.5 M).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C.

Ausbeute: 1.05 g (5.30 mmol, 79%). – Farbloser Feststoff.

¹H-NMR (D₂O, 400.13 MHz): δ = 1.26 (t, 3 H, CH₃, J = 7.1 Hz), 3.71 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂K, J = 5.1 Hz), 3.83 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂Et, J = 5.1 Hz), 4.23 (q, 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz) ppm.

14.1.6 (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Oxiran-2,3-carbonsäuremonoethylester (E-07)

Methode: A4

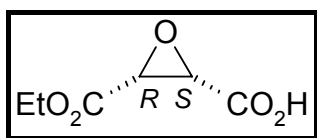
Ansatz: 1.00 g (5.10 mmol) **E-06** in 100 mL 5%iger KHSO₄-Lösung, 8.70 g NaCl.

Reaktionsdauer: 3 h RT.

Ausbeute: 547 mg (3.42 mmol, 67%). – Hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.30 (t, 3 H, CH₃, J = 7.1 Hz), 3.73 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂Et, J = 4.8 Hz), 3.76 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂H, J = 4.8 Hz), 4.28 (q, 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz), 7.87 (br s, 1 H, OH) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[107]

14.1.7 (2*R*,3*S*)-Oxiran-2,3-carbonsäuremonoethylester (E-07a) (ee = 18%)

Methode: D3a

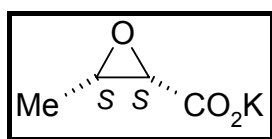
Ansatz: 564 mg (3.00 mmol) **E-02** in 40 mL 0.1 M KH₂PO₄-Puffer pH 7.0, 0.30 mL PLE-Suspension (240 U/mmol), 3.00 mL (3.00 mmol) 1 M NaOH.

Reaktionsdauer: 5 h RT.

Ausbeute: 238 mg (1.49 mmol, 50%). – Gelber Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.30 (t, 3 H, CH₃, J = 7.1 Hz), 3.73 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂Et, J = 4.8 Hz), 3.76 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂H, J = 4.8 Hz), 4.28 (q, 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz), 7.97 (br s, 1 H, OH) ppm.

¹H-NMR-spektroskopische Daten identisch mit **E-07** (vgl. Kapitel 14.1.6).

14.1.8 (2*S*,3*S*)-3-Methyloxiran-2-kaliumcarboxylat (E-12)

Methode: A2

Ansatz: 4.85 g (40.7 mmol) *D*-Threonin in 50 mL Wasser, 6.50 mL (85.5 mmol) HBr-Lösung (62%), 17.0 g (143 mmol) KBr, 3.10 g (44.8 mmol) NaNO₂; 60 mL Ethanol, 4.03 g (71.9 mmol) KOH in 40 mL Ethanol.

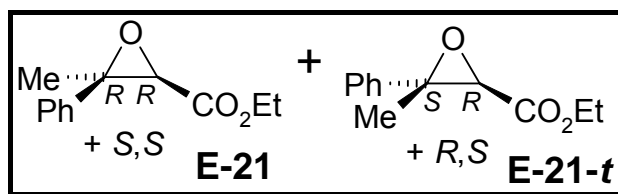
Reaktionsdauer: 2 h – 15 °C, 3 h – 10 °C; 1 h – 30 °C, 15 h RT.

Ausbeute: 3.17 g (22.6 mmol, 56%). – Farbloser Feststoff.

¹H-NMR (D₂O, 400.13 MHz): δ = 1.27 (d, 3 H, CH₃, J = 5.3 Hz), 3.34 (dd, 1 H, Epox-CH-CH₃, J = 5.0, 5.3 Hz), 3.51 (d, 1 H, Epox-CH-CO₂K, J = 5.0 Hz) ppm.

¹H-NMR-spektroskopische Daten identisch mit **E-03** (vgl. Kapitel 14.1.3).

14.1.9 3-Methyl-3-phenyloxiran-2-carbonsäureethylester (E-21 / E-21-t)



Methode: A3

Ansatz: 12.0 g (100 mmol) Acetophenon in 20 mL abs. *Tert*butanol, 10.8 mL (100 mmol) Chloressigsäureethylester, 11.3 g (100 mmol) Kalium*tert*butanolat in 80 mL abs. *Tert*butanol.

Reaktionsdauer: 2 h RT.

Destillation: 108-117 °C / 1 mbar [Lit.^[100] 83-104 °C / 0.3 mbar].

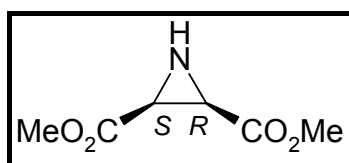
Ausbeute: 11.3 g (55.0 mmol, 55%). – Farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.82 (t, 3 H, OCH₂CH₃, *J* = 7.1 Hz), 1.66 (s, 3 H, CH₃), 3.59 (s, 1 H, Epox-CH), 3.78-3.88 (m, 2 H, OCH₂), 7.16-7.28 (m, 5 H, Ar-H) ppm [E-23].

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.25 (t, 3 H, OCH₂CH₃, *J* = 7.1 Hz), 1.69 (s, 3 H, CH₃), 3.37 (s, 1 H, Epox-CH), 4.17-4.27 (m, 2 H, OCH₂), 7.22-7.34 (m, 5 H, Ar-H) ppm [E-23-t].

Die ¹H-NMR-spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[100,101]

14.2 Aziridin-Bausteine

14.2.1 (2*R*,3*S*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäuredimethylester (A-01)

Methode: B1c.

Ansatz: 3.50 g (17.2 mmol) chromatographisch nicht gereinigtes (2*R*,3*R*)-Dimethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat **Azialk-01** in 50 ml abs. DMF, 4.91 g (18.1 mmol) PPh₃.

Reaktionsdauer: 30 min 0 °C, 1.5 h RT, 4.5 h 90°C, 13 h bei RT.

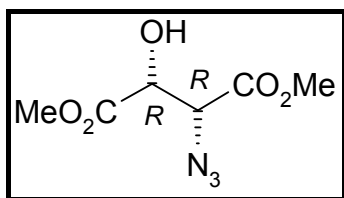
SC (Kieselgel 60, *R_f* = 0.12, Cyclohexan/EtOAc 1:1), fraktionierende Kristallisation mit EtOAc/PE.

Ausbeute: 520 mg (3.27 mmol, 19%). – Orange Nadeln.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.85$ (br s, 1 H, NH), 2.78 (br s, 2 H, 2 x Azi- CH), 3.70 (s, 6 H, 2 x OCH_3) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[89]

Azialk-01



Methode: B1b.

Ansatz: 5.28 g (81.2 mmol) Natriumazid in 30 mL abs. DMF, 1.96 g (10 mol%) 18-Krone-6, 17.8 g (73.8 mmol) (2*S*,3*S*)-Dimethyl-3-bromo-2-hydroxysuccinat **Bromalk-01**.

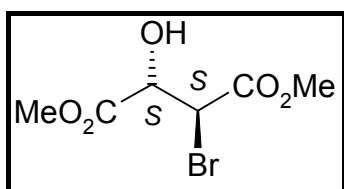
Reaktionsdauer: 1 d RT.

Ausbeute: 11.3 g (55.6 mmol, 75%) [(*R,R*) / (*R,S*)-Isomer: 5.7 / 1] – Gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 3.80$ (s, 3 H, $(\text{CH})\text{N}_3\text{-CO}_2\text{CH}_3$), 3.82 (s, 3 H, $(\text{CH})\text{OH-CO}_2\text{CH}_3$), 3.98 (br s, 1 H, OH), 4.17 (d, 1 H, CH-N_3 , $J = 5.0$ Hz), 4.72 (d, 1 H, CH-OH , $J = 5.0$ Hz) ppm [(*R,R*)-Isomer].

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[129,219]

Bromalk-01



Methode: B1a.

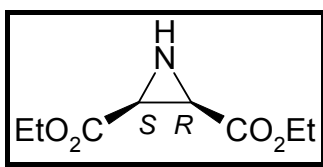
Ansatz: 20.1 g (113 mmol) (*R,R*)-Dimethyltartrat, 95 mL HBr/Eisessig; 100 mL abs. Methanol, 5.00 mL Acetylchlorid.

Reaktionsdauer: 14 h RT; 6 h Rückfluss.

Ausbeute: 18.0 g (74.6 mmol, 66%) – Gelbbraunes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 3.74$ (s, 3 H, $(\text{CH})\text{Br-CO}_2\text{CH}_3$), 3.76 (s, 3 H, $(\text{CH})\text{OH-CO}_2\text{CH}_3$), 4.02 (br s, 1 H, OH), 4.62 (d, 1 H, CH-Br , $J = 5.0$ Hz), 4.64 (d, 1 H, CH-OH , $J = 5.0$ Hz) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[130]

14.2.2 (2*R*,3*S*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäurediethylester (A-02)

Methode: B1c.

Ansatz: 2.50 g (10.8 mmol) chromatographisch nicht gereinigtes (2*R*,3*R*)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat **Azialk-02** in 50 ml abs. DMF, 3.00 g (11.4 mmol) PPh₃.

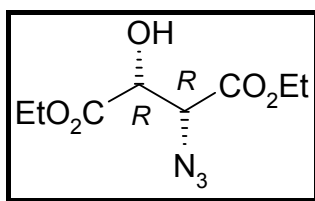
Reaktionsdauer: 30 min 0 °C, 1.5 h RT, 4.5 h 90°C, 13 h bei RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.10$, Cyclohexan/EtOAc 2:1), fraktionierende Kristallisation mit EtOAc/PE.

Ausbeute: 808 mg (4.32 mmol, 40 %). – Farblose Nadeln.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.27$ (t, 6 H, 2 x CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.85 (br s, 1 H, NH), 2.79 (br s, 2 H, 2 x Azi- CH), 4.15 (q, 4 H, 2 x OCH_2 , $J = 7.1$ Hz) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[89]

Azialk-02

Methode: B1b.

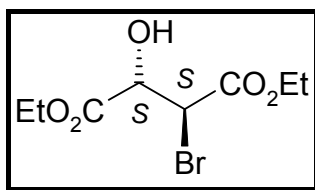
Ansatz: 5.30 g (81.5 mmol) Natriumazid in 30 mL abs. DMF, 1.97 g (10 mol%) 18-Krone-6, 21.1 g (74.1 mmol) (2*S*,3*S*)-Diethyl-3-bromo-2-hydroxysuccinat **Bromalk-02**.

Reaktionsdauer: 1 d RT.

Ausbeute: 14.56 g (63.0 mmol, 85%) [(*R,R*) / (*R,S*)-Isomer: 7.3 / 1] – Farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.26$, 1.30 (2 x t, je 3 H, 2 x CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 3.52 (d, 1 H, OH , $J = 2.2$ Hz), 4.13 (d, 1 H, CH-N_3 , $J = 5.4$ Hz), 4.26, 4.30 (2 x q, 4 H, 2 x OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 4.70 (dd, 1 H, CH-OH , $J = 2.2$, 5.4 Hz) ppm [(*R,R*)-Isomer].

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[129,219]

Bromalk-02

Methode: B1a.

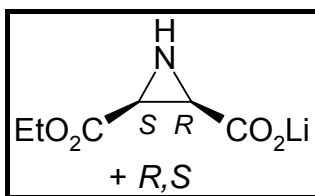
Ansatz: 22.0 g (107 mmol) (*R,R*)-Diethyltartrat, 90 mL HBr/Eisessig; 100 mL abs. Ethanol, 4.70 mL Acetylchlorid.

Reaktionsdauer: 10 h RT; 6 h Rückfluss.

Ausbeute: 21.3 g (74.7 mmol, 70%) – Gelbbraunes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.26, 1.28$ (2 x t, je 3 H, 2 x CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 3.62 (br s, 1 H, OH), 4.20, 4.24 (2 x q, 4 H, 2 x OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 4.62 (d, 1 H, CH-Br , $J = 4.6$ Hz), 4.65 (d, 1 H, CH-OH , $J = 4.6$ Hz) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[130]

14.2.3 (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Lithiumaziridin-2,3-dicarbonsäuremonoethylester (A-02-Li)

Methode: D1a.

Ansatz: 977 mg (5.22 mmol) **A-02** in 40 mL abs. Ethanol, 208 mg (4.96 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

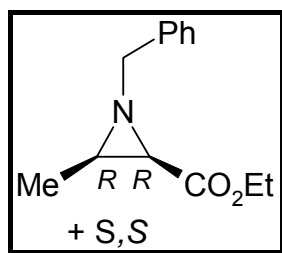
Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 801 mg (4.85 mmol, 93%) [*cis*-Racemat]. - Gelbbrauner Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400.13 MHz): $\delta = 1.15$ (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.36 (br t, 1 H, NH , $J = 8.5$ Hz), 2.27, 2.43 (2 x br t, je 1 H, 2 x Azi- CH , $J = 7.6$ Hz), 4.03 (q, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$ Hz) ppm.

Das Lithiumsalz **A-02-Li** wird ohne weitere Reinigung der DPPA-vermittelten Kupplung zugeführt.

14.2.4 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonsäureethylester (A-03)



Methode: B2.

Ansatz: 4.55 g (16.6 mmol) Ethyl-2,3-dibrombutanoat^[109] in 40 mL Ethanol, 6.66 mL (60.9 mmol) Benzylamin in 60 mL Ethanol.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 1 d RT.

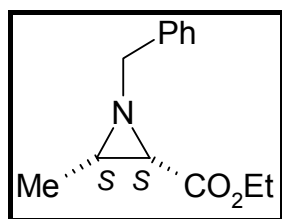
SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.24$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 2.19 g (9.96 mmol, 60%) [*cis*-Racemat]. – Gelboranges Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.20$ (t, 3 H, OCH₂CH₃, $J = 7.1$ Hz), 1.23 (d, 3 H, CH₃, $J = 5.8$ Hz), 1.93 (dq, 1 H, Azi-CH-CH₃, $J = 5.8, 6.6$ Hz), 2.14 (d, 1 H, Azi-CH-CO₂Et, $J = 6.6$ Hz), 3.48, 3.54 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, $J = 13.9$ Hz), 4.13 (q, 2 H, OCH₂, $J = 7.1$ Hz), 7.17-7.28 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[109]

14.2.5 (2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonsäureethylester (A-03a)



Methode: B3.

Ansatz: 3.11 g (11.8 mmol) PPh₃ in 60 mL Acetonitril / Tetrachlorkohlenstoff (4 / 1), 950 mg (3.99 mmol) *N*-Benzyl-*L*-Threoninethylester **Bn-ThrOEt** und 1.80 mL (13.0 mmol) TEA in 15 mL Acetonitril.

Reaktionsdauer: 30 min RT, 20 h RT.

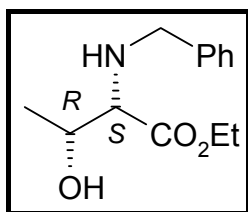
SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.35$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 503 mg (2.29 mmol, 57%). – Oranges Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.20$ (t, 3 H, OCH_2CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.23 (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.9$ Hz), 1.93 (dq, 1 H, Azi- CH-CH_3 , $J = 5.9, 6.8$ Hz), 2.14 (d, 1 H, Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Et}$, $J = 6.8$ Hz), 3.51, 3.54 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.6$ Hz), 4.13 (q, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 7.15-7.30 (m, 5 H, Ar- H) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten sind identisch mit denen des *cis*-Racemats **A-03** (vgl. Kapitel 14.2.4) und vergleichbar mit denen des analogen Methylesters.^[110]

Bn-ThrOEt



Methode: F3.

Ansatz: 2.98 g (16.2 mmol) ThrOEt·HCl in 30 mL Ethanol, 2.30 mL (16.2 mmol) TEA, 1.72 g (16.2 mmol) Benzaldehyd, 1.23 g (32.5 mmol) NaBH_4 .

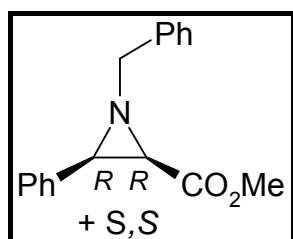
Reaktionsdauer: 2 h 0 °C.

Ausbeute: 2.06 g (8.66 mmol, 53%). – Gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.12$ (d, 3 H, $\gamma\text{-CH}_3$, $J = 6.2$ Hz), 1.20 (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 2.67 (br s, 1 H, OH), 2.93 (d, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 7.5$ Hz), 3.58-3.62 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}$, $J = 6.2, 7.5$ Hz), 3.64, 3.75 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.0$ Hz), 4.10 (q, 2 H, CH_2 , $J = 7.1$ Hz), 7.15-7.33 (m, 6 H, 1 x NH, 5 x Ar- H) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[220]

14.2.6 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-05)



Methode: B2.

Ansatz: 3.10 g (9.63 mmol) Methyl-2,3-dibrom-3-phenylpropanoat^[108] in 40 mL Methanol, 3.70 mL (33.7 mmol) Benzylamin in 60 mL Methanol.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 12 d RT.

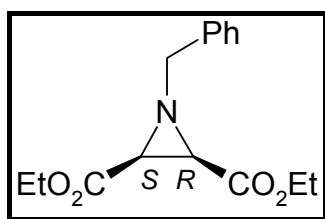
SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.20$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 1.68 g (6.25 mmol, 65%) [*cis*-Racemat]. – Farblose Nadeln.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 2.69$ (d, 1 H, Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-Ph}$, $J = 6.8$ Hz), 3.10 (d, 1 H, Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Me}$, $J = 6.8$ Hz), 3.52 (s, 3 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 3.69, 3.96 (2 x d, je 1 H, $\text{N}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, $J = 13.7$ Hz), 7.23-7.47 (m, 10 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

Die spektroskopischen und übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[108]

14.2.7 (2*R*,3*S*)-1-Benzylaziridin-2,3-dicarbonsäurediethylester (A-09)



Methode: B1d.

Ansatz: 615 mg (3.29 mmol) **A-02** in 25 mL abs. DMF, 348 mg (3.29 mmol) Na_2CO_3 , 0.79 mL (6.58 mmol) Benzylbromid, eine Spatelspitze KI.

Reaktionsdauer: 2 d 60 °C.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.11$, Cyclohexan/EtOAc 6:1).

Ausbeute: 803 mg (2.90 mmol, 88%). – Farblose Nadeln.

Schmelzpunkt: 56-57 °C.

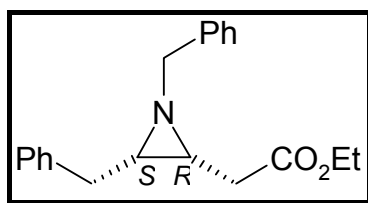
$[\alpha]_D^{22} = +0.66^\circ$ ($c = 1.21$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, 277.32; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 300.3.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.28$ (t, 6 H, 2 x $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$, $J = 7.1$ Hz), 2.56 (s, 2 H, 2 x Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 3.76 (s, 2 H, $\text{N}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 4.20 (q, 4 H, 2 x $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J = 7.1$ Hz), 7.26-7.42 (m, 5 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 14.06$ ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 43.09 (Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 61.43 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 62.53 ($\text{N}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 127.48, 128.06, 128.39 (Ar- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 136.23 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 167.29 ($\text{EtO-}\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2989, 2872$ (w, =C-H, C-H); 1722 (s, O- $\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1452, 1371 (m, arom. C=C, C-H); 1290, 1206, 1192, 1091, 1076 (s, C-O-C); 758, 708 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.2.8 ((2*R*,3*S*)-1,3-Dibenzylaziridin-2-yl)essigsäureethylester (A-10)

Methode: B3.

Ansatz: 1.58 g (6.03 mmol) PPh₃ in 40 mL Acetonitril / Tetrachlorkohlenstoff (4 / 1), 659 mg (2.01 mmol) **Bn-Stat-01** und 0.95 mL (6.53 mmol) TEA in 10 mL Acetonitril.

Reaktionsdauer: 30 min RT, 20 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.16, Cyclohexan/EtOAc 6:1).

Ausbeute: 163 mg (0.53 mmol, 26%). – Gelboranges Öl.

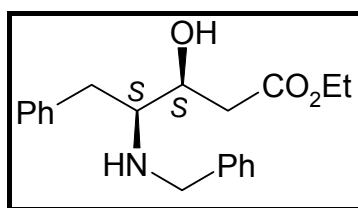
[α]_D²² = - 1.79 ° (c = 0.28, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₃NO₂, 309.41; gef.: [M+Na]⁺ 332.4.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.23 (t, 3 H, CH₃, J = 7.1 Hz), 1.90 (dt; 1 H, Azi-CH-CH₂Ph, J = 6.3, 6.6 Hz), 2.02 (dt; 1 H, Azi-CH-CH₂CO₂Et, J = 5.8, 6.6 Hz), 2.56 (t, 2 H, CH₂CO₂Et, J = 5.8 Hz), 2.71, 2.81 (2 x dd, je 1 H, CH₂Ph, J = 6.3, 6.9 Hz), 3.46, 3.63 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 13.1 Hz), 4.08 (q, 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz), 7.14-7.31 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 14.13 (CH₃), 34.15 (CH₂CO₂Et), 34.76 (CH₂Ph), 39.46 (Azi-CH-CH₂CO₂Et), 44.23 (Azi-CH-CH₂Ph), 60.53 (OCH₂), 64.49 (NCH₂Ph), 126.11, 126.94, 127.85, 128.20, 128.36, 128.52 (Ar-CH), 138.89, 139.42 (Ar-C), 171.89 (EtO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3029, 2982, 2831 (w, =C-H, C-H); 1733 (s, O-C=O); 1496, 1450 (m, arom. C=C, C-H); 1258, 1175, 1029 (s, C-O-C); 733, 697 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

Bn-Stat-01

Methode: F2.

Ansatz: 906 mg (2.69 mmol) **Stat-01** in 30 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 1 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Stat-01(-Boc)•TFA** wird sofort weiter nach Methode F3 umgesetzt.

Methode: F3.

Ansatz: 945 mg (2.69 mmol) **Stat-01(-Boc)•TFA** in 40 mL Ethanol, 0.40 mL (2.69 mmol) TEA, 0.30 mL (2.69 mmol) Benzaldehyd, 204 mg (5.38 mmol) NaBH₄.

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C

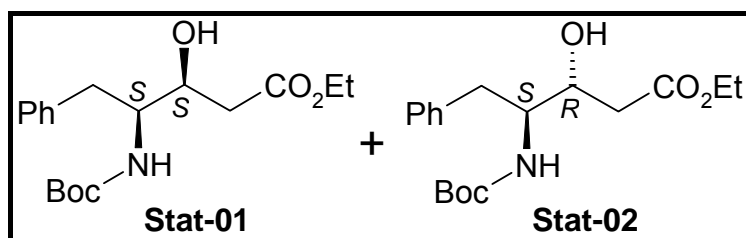
SC (Kieselgel 60, R_f = 0.38, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 735 mg (2.24 mmol, 83%). – Braun oranges Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.26 (t, 3 H, CH₃, J = 7.1 Hz), 2.52, 2.61 (2 x dd, je 1 H, CH₂CO₂Et, J = 3.8, 8.6 Hz), 2.73-3.03 (m, 5 H, CHCH₂Ph, CHCH₂Ph, NH, OH), 3.70, 3.72 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 12.9 Hz), 3.92-3.96 (m, 1 H, CHOH, J = 3.8, 8.6 Hz), 4.14 (q, 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz), 7.15-7.40 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 14.13 (CH₃), 37.18 (CH₂Ph), 39.14 (CH₂CO₂Et), 52.14 (NCH₂Ph), 60.56 (OCH₂), 61.89 (NCHCH₂Ph), 68.51 (CHOH), 126.38, 126.92, 127.03, 127.53, 128.12, 128.58 (Ar-CH), 138.64, 139.92 (Ar-C), 172.77 (EtO-C=O) ppm.

Stat-01/02



Methode: E2.

Ansatz: 2.16 mL (15.4 mmol) Diisopropylamin in 20 mL abs. THF, 6.16 mL (15.4 mmol) *n*Butyllithium in Hexan (2.5 M), 1.51 mL (15.4 mmol) Ethylacetat, 2.56 g (10.3 mmol) Boc-Phe-CHO in 10 mL abs. THF.

Reaktionsdauer: 1 h – 30 °C, 30 min – 78 °C, 30 min – 78 °C.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.17 (**Stat-01**) / 0.13 (**Stat-02**), Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 949 mg (2.81 mmol, 27%) (**Stat-01**). – Farbloser Feststoff;

949 mg (2.81 mmol, 27%) (**Stat-02**). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 86 °C [Lit.^[112] 88-89 °C] (**Stat-01**);

137 °C [Lit.^[112] 140-141 °C] (**Stat-02**).

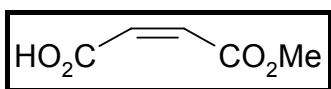
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.25$ (t, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, $J = 7.1$ Hz), 1.42 (s, 9 H, $\text{C}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.40, 2.58 (2 x dd, je 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}_2\text{Et}$, $J = 2.5, 10.3$ Hz), 2.93 (d, 2 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, $J = 7.5$ Hz), 3.53 (br s, 1 H, $\text{O}\underline{\text{H}}$), 3.69-3.79 (m, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{CH}_2\text{Ph}$), 3.98 (d, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{OH}$, $J = 10.1$ Hz), 4.15 (q, 2 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J = 7.1$ Hz), 4.96 (br d, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$, $J = 9.6$ Hz), 7.20-7.33 (m, 5 H, $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$) ppm (**Stat-01**).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.28$ (t, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, $J = 7.1$ Hz), 1.36 (s, 9 H, $\text{C}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.54, 2.58 (2 x dd, je 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}_2\text{Et}$, $J = 4.5, 8.8$ Hz), 2.86, 2.99 (2x br dd, je 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, $J = 4.1, 8.8$ Hz), 3.65 (br s, 1 H, $\text{O}\underline{\text{H}}$), 3.87 (br m, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.01 (br s, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4.18 (q, 2 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, $J = 7.1$ Hz), 4.59 (br d, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$, $J = 8.8$ Hz), 7.20-7.34 (m, 5 H, $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$) ppm (**Stat-02**).

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen sowie die übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[112]

14.3 Z-Olefin-Bausteine

14.3.1 Monomethylmaleat (Mal-01)



Methode: C1.

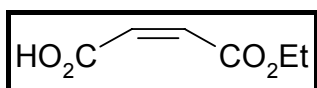
Ansatz: 9.81 g (100 mmol) Maleinsäureanhydrid in 50 mL Dichlormethan; 4.04 mL (100 mmol) MeOH, 15.4 mL (110 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 1 d RT.

Ausbeute: 6.11 g (47.0 mmol, 47%). – Blassgelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 3.81$ (s, 3 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 6.32, 6.34 (2 x d, je 1 H, $=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{H}$, $=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Me}$, $J = 12.4$ Hz), 11.78 (br s, 1 H, $\text{O}\underline{\text{H}}$) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[138]

14.3.2 Monoethylmaleat (Mal-02)

Methode: C1.

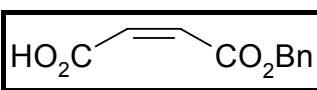
Ansatz: 9.81 g (100 mmol) Maleinsäureanhydrid in 50 mL Dichlormethan; 5.83 mL (100 mmol) EtOH, 15.4 mL (110 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 1 d RT.

Ausbeute: 10.1 g (70.0 mmol, 70%). – Hellgelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.31 (t, 3 H, CH_3 , J = 7.1 Hz), 4.27 (q, 2 H, OCH_2 , J = 7.1 Hz), 6.33, 6.35 (2 x d, je 1 H, $=\text{CH-CO}_2\text{H}$, $=\text{CH-CO}_2\text{Et}$, J = 12.6 Hz), 12.18 (br s, 1 H, OH) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[138]

14.3.3 Monobenzylmaleat (Mal-03)

Methode: C1.

Ansatz: 9.81 g (100 mmol) Maleinsäureanhydrid in 50 mL Dichlormethan; 10.4 mL (100 mmol) BnOH, 15.4 mL (110 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 1 d RT.

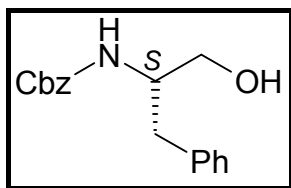
Ausbeute: 13.4 g (65.0 mmol, 65%). – Hellgelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 5.25 (s, 2 H, OCH_2Ph), 6.30, 6.37 (2 x d, je 1 H, $=\text{CH-CO}_2\text{H}$, $=\text{CH-CO}_2\text{Bn}$, J = 12.4 Hz), 7.30-7.40 (m, 5 H, Ar-H), 11.75 (br s, 1 H, OH) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[138]

14.4 Aminosäurederivate

14.4.1 Cbz-Phe-ol (Phe-ol-01)



Methode: E1.

Ansatz: 3.12 g (10.4 mmol) Cbz-PheOH in 10 mL 1,2-Dimethoxyethan, 1.14 mL (10.4 mmol) NMM, 1.35 mL (10.4 mmol) IBCF, 592 mg (15.6 mmol) NaBH₄ in 5 mL Wasser.

Reaktionsdauer: 10 min – 15 °C.

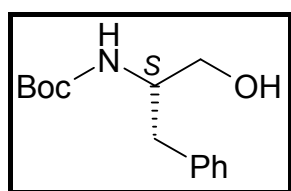
Ausbeute: 2.01 g (7.09 mmol, 68%). – Farbloser, pulveriger Feststoff.

Schmelzpunkt: 92-93 °C [Lit.^[144] 93-94 °C].

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 2.20 (br s, 1 H, OH), 2.77 (d, 2 H, β-CH₂, J = 7.1 Hz), 3.50, 3.58 (2 x br d, je 1 H, CH₂OH), 3.87 (br s, 1 H, α-CH), 4.94 (br s, 1 H, NH), 4.99 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.09-7.30 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

Die ¹H-NMR-spektroskopischen sowie die übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[144,221]

14.4.2 Boc-Phe-ol (Phe-ol-02)



Methode: E1.

Ansatz: 2.91 g (11.0 mmol) Boc-PheOH in 15 mL 1,2-Dimethoxyethan, 1.21 mL (11.0 mmol) NMM, 1.43 mL (11.0 mmol) IBCF, 622 mg (16.5 mmol) NaBH₄ in 5 mL Wasser.

Reaktionsdauer: 10 min – 15 °C.

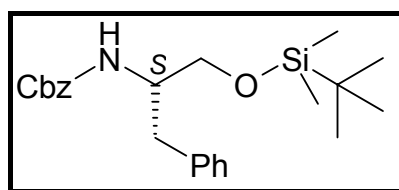
Ausbeute: 1.81 g (7.22 mmol, 66%). – Farbloser, pulveriger Feststoff.

Schmelzpunkt: 94 °C [Lit.^[144] 93-95 °C].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.42$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.50 (br s, 1 H, OH), 2.84 (d, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 7.0$ Hz), 3.58, 3.66 (2 x br d, je 1 H, CH_2OH , $J = 5.0, 10.6$ Hz), 3.87 (br s, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.82 (br s, 1 H, NH), 7.20-7.34 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen sowie die übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[144,222]

14.4.3 Cbz-Phe-oTBDMS (Phe-ol-03)



Methode: F4.

Ansatz: 888 mg (3.13 mmol) Cbz-Phe-ol (**Phe-ol-01**) in 20 mL Dichlormethan, 77 mg (0.63 mmol) DMAP, 0.90 mL (6.30 mmol) TEA, 472 mg (3.13 mmol) TBDMSCl in 10 mL Dichlormethan.

Reaktionsdauer: 1 h 0 °C, 17 h RT.

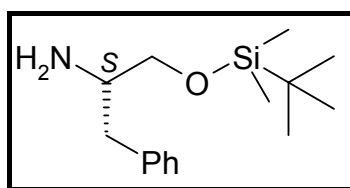
SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.63$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 466 mg (1.17 mmol, 37%). – Farbloses Harz.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.04$ (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.92 (s, 9 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 2.88 (d, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 7.0$ Hz), 3.51-3.57 (m, 2 H, CH_2OSi), 3.93 (br s, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 5.00 (br d, 1 H, NH , $J = 8.0$ Hz), 7.19-7.39 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten sind vergleichbar zu denen der *N*-Boc-geschützten Verbindung.^[146]

14.4.4 Phe-oTBDMS (Phe-ol-04)



Methode: F1.

Ansatz: 426 mg (1.07 mmol) Cbz-Phe-oTBDMS (**Phe-ol-03**) in 20 mL Ethylacetat, 117 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H_2 .

Reaktionsdauer: 12 h RT.

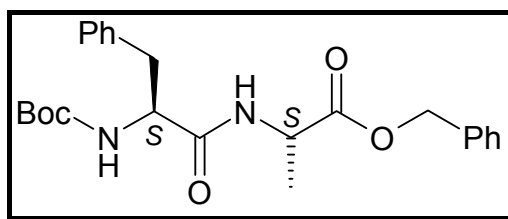
Ausbeute: 208 mg (0.78 mmol, 73%). – Gelbes Harz.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.01$ (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.84 (s, 9 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (br s, 2 H, NH_2), 2.45, 2.73 (2 x dd, je 1 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.3, 8.1$ Hz), 3.02 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.3, 6.6$ Hz), 3.38, 3.50 (2 x dd, je 1 H, CH_2OSi , $J = 4.6, 6.6$ Hz), 7.10-7.26 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[147]

14.5 Peptide

14.5.1 Boc-Phe-AlaOBn (Dipep-01)



Methode: E3.

Ansatz: 1.05 g (3.96 mmol) Boc-PheOH und 1.39 g (3.96 mmol) AlaOBn•pTos in 30 mL abs. DMF, 0.94 mL (4.35 mmol) DPPA, 1.15 mL (8.32 mmol) TEA.

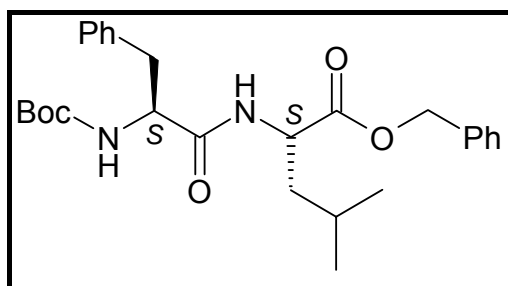
Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 6 d RT.

Ausbeute: 1.60 g (3.76 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.35$ (d, 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], $J = 7.3$ Hz), 1.40 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.06 (d, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], $J = 6.5$ Hz), 4.32-4.43 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 4.56 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 6.5, 7.8$ Hz), 5.05 (br s, 1 H, NH [Phe]), 5.15 (s, 2 H, OCH_2Ph), 6.52 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 6.6$ Hz), 7.17-7.42 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 18.28$ ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 28.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.34 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 48.16 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 55.49 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 67.06 (OCH_2Ph), 80.16 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 126.07, 126.88, 128.09, 128.57, 129.31, 130.01 (Ar-CH), 135.27, 136.49 (Ar-C), 155.29 ($\text{C}=\text{O}$ [Boc]), 170.76 ($\text{N-C}=\text{O}$ [Phe-Ala]), 172.22 (BnO-C=O) ppm.

14.5.2 Boc-Phe-LeuOBn (Dipep-02)



Methode: E3.

Ansatz: 2.24 g (8.44 mmol) Boc-PheOH und 3.32 g (8.44 mmol) LeuOBn•pTos in 40 mL abs. DMF, 2.01 mL (9.29 mmol) DPPA, 2.46 mL (17.7 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 6 d RT.

Ausbeute: 3.59 g (7.66 mmol, 91%). – Farbloser, kristalliner Feststoff.

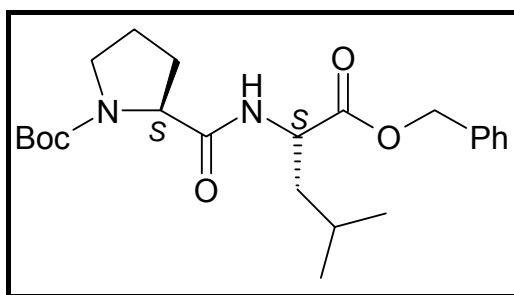
Schmelzpunkt: 85 °C [Lit:^[223] 85-86 °C].

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.87, 0.90 (2 x d, je 3 H, δ-CH₃ [Leu], J = 6.6 Hz), 1.41 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.47-1.64 (m, 3 H, γ-CH [Leu], β-CH₂ [Leu]), 3.07 (d, 2 H, β-CH₂ [Phe], J = 6.5 Hz), 4.36 (m, 1 H, α-CH [Phe], J = 6.5 Hz), 4.63 (m, 1 H, α-CH [Leu], J = 8.1 Hz), 5.07 (br s, 1 H, NH [Phe]), 5.13, 5.14 (2 x dd, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.4 Hz), 6.39 (d, 1 H, NH [Leu], J = 8.1 Hz), 7.17-7.41 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 21.82, 22.68 (δ-CH₃ [Leu]), 24.59 (γ-CH [Leu]), 28.17 (C(CH₃)₃), 38.03 (β-CH₂ [Phe]), 41.44 (β-CH₂ [Leu]), 50.82 (α-CH [Leu]), 55.59 (α-CH [Phe]), 66.91 (OCH₂Ph), 80.10 (C(CH₃)₃), 126.07, 126.81, 128.14, 128.52, 129.31, 129.99 (Ar-CH), 135.32, 136.56 (Ar-C), 155.33 (C=O [Boc]), 170.92 (N-C=O [Phe-Leu]), 172.18 (BzIO-C=O) ppm.

Die ¹H-NMR-spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[224]

14.5.3 Boc-Pro-LeuOBn (Dipep-03)



Methode: E3.

Ansatz: 1.77 g (8.22 mmol) Boc-ProOH und 3.23 g (8.22 mmol) LeuOBn•pTos in 40 mL abs. DMF, 1.95 mL (9.04 mmol) DPPA, 2.39 mL (17.3 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 8 d RT.

Ausbeute: 3.30 g (7.89 mmol, 96%). – Farbloser Feststoff.

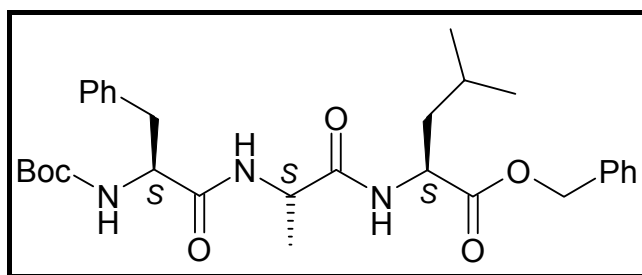
Schmelzpunkt: 64 °C [Lit.^[225] 65 °C].

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.89 (br s, 6 H, δ-CH₃ [Leu]), 1.46 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.54-1.67 (m, 3 H, γ-CH [Leu], β-CH₂ [Leu]), 1.87 (br m, 2 H, γ-CH₂ [Pro]), 2.09-2.26 (br m, 2 H, β-CH₂ [Pro]), 3.24-3.50 (br m, 2 H, δ- CH₂ [Pro]), 4.31 (br s, 1 H, α-CH [Pro]), 4.63 (br s, 1 H, α-CH [Leu]), 5.16 (s, 2 H, OCH₂Ph), 6.48 (br s, 1 H, NH [Leu], J = 8.1 Hz), 7.23-7.46 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 21.74, 22.76 (δ-CH₃ [Leu]), 24.76 (γ-CH [Leu]), 24.95 (γ-CH₂ [Pro]), 28.20 (C(CH₃)₃), 30.81 (β-CH₂ [Pro]), 41.14 (β-CH₂ [Leu]), 46.93 (δ-CH₂ [Pro]), 50.90 (α-CH [Leu]), 60.29 (α-CH [Pro]), 66.78 (OCH₂Ph), 80.28 (C(CH₃)₃), 126.84, 128.09, 128.45 (Ar-CH), 135.44 (Ar-C), 154.61 (C=O [Boc]), 171.04 (N-C=O [Pro-Leu]), 172.43 (BnO-C=O) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[225]

14.5.4 Boc-Phe-Ala-LeuOBn (Tripep-01)



Methode: F1.

Ansatz: 417 mg (0.98 mmol) Boc-Phe-AlaOBn (**Dipep-01**) in 25 mL Ethylacetat, 104 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H₂.

Reaktionsdauer: 16 h RT.

Die C-entschützte Verbindung **Boc-Phe-AlaOH** wird sofort weiter nach Methode E3 umgesetzt.

Methode: E3.

Ansatz: 330 mg (0.98 mmol) **Boc-Phe-AlaOH** und 386 mg (0.98 mmol) LeuOBn•pTos in 20 mL abs. DMF, 0.24 mL (1.08 mmol) DPPA, 0.30 mL (2.06 mmol) TEA.

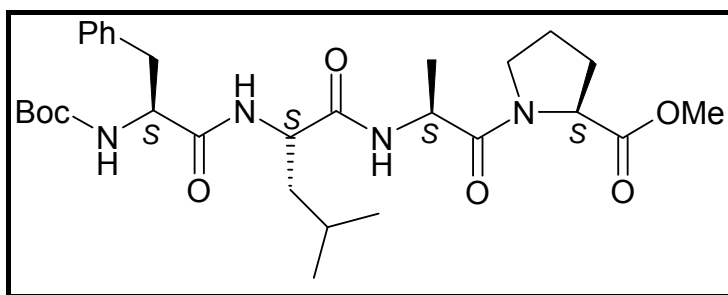
Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 5 d RT.

Ausbeute: 480 mg (0.89 mmol, 91%). – Gelbliches Harz.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.90, 0.93 (2 x d, je 3 H, δ-CH₃ [Leu], J = 6.0 Hz), 1.32 (d, 3 H, β-CH₃ [Ala], J = 7.1 Hz), 1.39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.51-1.65 (m, 3 H, γ-CH [Leu], β-CH₂ [Leu]), 3.06 (dt, 2 H, β-CH₂ [Phe], J = 6.3, 7.6 Hz), 4.32-4.42 (m, 1 H, α-CH [Phe]), 4.48 (dt, 1 H, α-CH [Ala], J = 6.8, 7.1 Hz), 4.60 (m, 1 H, α-CH [Leu]), 5.04 (br d, 1 H, NH [Phe], J = 7.9 Hz), 5.15, 5.17 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.4 Hz), 6.72 (d, 1 H, NH [Ala], J = 6.8 Hz), 6.76 (d, 1 H, NH [Leu], J = 7.3 Hz), 7.16-7.41 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 18.13 (β-CH₃ [Ala]), 21.80, 22.72 (δ-CH₃ [Leu]), 24.73 (γ-CH [Leu]), 28.17 (C(CH₃)₃), 38.15 (β-CH₂ [Phe]), 41.09 (β-CH₂ [Leu]), 48.79 (α-CH [Ala]), 50.91 (α-CH [Leu]), 55.62 (α-CH [Phe]), 66.97 (OCH₂Ph), 80.25 (C(CH₃)₃), 126.93, 128.17, 128.31, 128.51, 129.24, 130.01 (Ar-CH), 135.35, 136.39 (Ar-C), 155.33 (C=O [Boc]), 171.09 (N-C=O [Phe-Ala]), 171.55 (N-C=O [Ala-Leu]), 172.36 (BnO-C=O) ppm.

14.5.5 Boc-Phe-Leu-Ala-ProOMe (Tetpep-01)



Methode: F1.

Ansatz: 780 mg (1.42 mmol) Boc-Phe-LeuOBn (**Dipep-02**) in 30 mL Ethylacetat, 152 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H₂.

Reaktionsdauer: 16 h RT.

Die C-entschützte Verbindung **Boc-Phe-LeuOH** wird sofort weiter nach Methode E3 umgesetzt.

Methode: E3.

Ansatz: 537 mg (1.42 mmol) **Boc-Phe-LeuOH** und 336 mg (1.42 mmol) Ala-ProOMe·HCl in 20 mL abs. DMF, 0.34 mL (1.56 mmol) DPPA, 0.42 mL (2.98 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

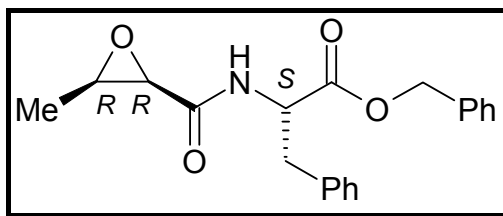
Ausbeute: 659 mg (1.18 mmol, 83%). – Farbloser Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.86, 0.89 (2 x d, je 3 H, δ-CH₃ [Leu], J = 6.0 Hz), 1.36 (d, 3 H, β-CH₃ [Ala], J = 6.8 Hz), 1.39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.49-1.58 (m, 3 H, γ-CH [Leu], β-CH₂ [Leu]), 1.94-2.05 (m, 2 H, γ-CH₂ [Pro]), 2.12-2.26 (m, 2 H, β-CH₂ [Pro]), 3.01-3.12 (m, 2 H, β-CH₂ [Phe], J = 6.3, 7.1 Hz), 3.58-3.62, 3.66-3.70 (2 x m, je 1 H, δ-CH₂ [Pro]), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 4.34-4.40 (m, 1 H, α-CH [Phe]), 4.41-4.49 (m, 1 H, α-CH [Leu]), 4.54 (t, 1 H, α-CH [Pro], J = 4.8 Hz), 4.68 (m, 1 H, α-CH [Ala], J = 6.8, 7.3 Hz), 5.06 (br d, 1 H, NH [Phe], J = 6.8 Hz), 6.54 (d, 1 H, NH [Leu], J = 8.1 Hz), 6.92 (d, 1 H, NH [Ala], J = 7.6 Hz), 7.16-7.36 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 17.81 (β-CH₃ [Ala]), 21.83, 22.92 (δ-CH₃ [Leu]), 24.51 (γ-CH [Leu]), 24.89 (γ-CH₂ [Pro]), 28.19 (C(CH₃)₃), 28.87 (β-CH₂ [Pro]), 37.93 (β-CH₂ [Phe]), 41.59 (β-CH₂ [Leu]), 46.77 (δ-CH₂ [Pro]), 46.82 (α-CH [Ala]), 51.65 (α-CH [Leu]), 52.21 (OCH₃), 55.57 (α-CH [Phe]), 58.74 (α-CH [Pro]), 80.07 (C(CH₃)₃), 126.81, 128.54, 129.31 (Ar-CH), 136.58 (Ar-C), 155.38 (C=O [Boc]), 170.77 (N-C=O [Phe-Leu]), 170.90 (N-C=O [Leu-Ala]), 171.07 (N-C=O [Ala-Pro]), 172.27 (MeO-C=O) ppm.

14.6 AS- / Peptid-verknüpfte Epoxide

14.6.1 (S)-2-(((2R,3R)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-04)



Methode: G2.

Ansatz: 960 mg (6.85 mmol) **E-03** in 30 mL abs. DMF, 2.10 g (7.19 mmol) PheOBn•HCl, 1.63 mL (7.54 mmol) DPPA, 1.00 mL (7.19 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 6 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.28$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 1.30 g (3.84 mmol, 56%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 93-94 °C.

$[\alpha]_D^{23} = -7.70^\circ$ ($c = 0.91$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, 339.39; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 362.4.

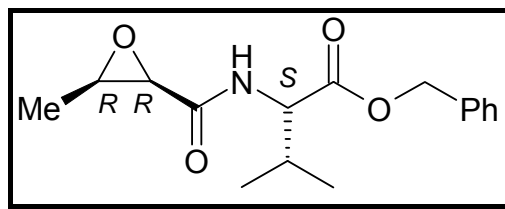
LC-MS: $R_t = 19.4$ min, $k' = 20.56$ (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.16$ (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.6$ Hz), 3.03 (mc, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 6.1, 7.6$ Hz), 3.13 (dq, 1 H, Epox- CH-CH_3 , $J = 4.8, 5.6$ Hz), 3.33 (d, 1 H, Epox- CH-CO , $J = 4.8$ Hz), 4.89 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 6.1, 8.5$ Hz), 5.00, 5.05 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.43 (d, 1 H, NH , $J = 8.5$ Hz), 7.14-7.25 (m, 10 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 12.77$ (CH_3), 37.81 ($\beta\text{-CH}_2$), 52.32 ($\alpha\text{-CH}$), 54.65 (Epox- CH-CH_3), 55.11 (Epox- CH-CO), 67.32 (OCH_2Ph), 127.21, 128.52, 128.56, 128.60, 128.66, 129.10 (Ar- CH), 134.88, 135.25 (Ar- C), 167.04 (N- C=O), 170.75 (BnO- C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3285$ (w, br, OCN- H); 3040, 2970 (w, =C-H, C-H); 1731 (s, O- C=O); 1663 (s, N- C=O); 1538 (m, OCN- H); 1445, 1393 (m, aromat. C=C, C-H), 1277, 1226, 1180 (s, C-O-C); 964, 829 (m, Epox C-O-C); 748, 694 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.6.2 3-Methyl-(S)-2-(((2R,3R)-3-methyloxirancarboxyl)amino)buttersäurebenzylester (E-08)



Methode: G2.

Ansatz: 557 mg (3.97 mmol) **E-03** in 30 mL abs. DMF, 864 mg (4.17 mmol) ValOBn, 0.94 mL (4.37 mmol) DPPA, 0.58 mL (4.17 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 6 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.30$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 555 mg (1.91 mmol, 48%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 49-50 °C.

$[\alpha]_D^{23} = -4.00^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, 291.35; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 314.4.

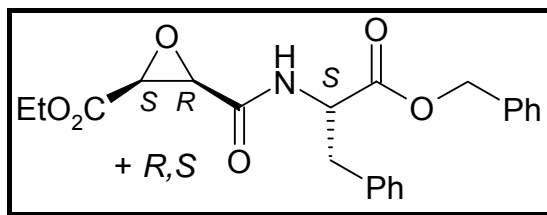
LC-MS: $R_t = 17.8$ min, $k' = 18.78$ (96%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.85, 0.93$ (2 x d, je 3 H, $\gamma\text{-CH}_3$, $J = 6.8$ Hz), 1.30 (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.6$ Hz), 2.23 (dq, 1 H, $\beta\text{-CH}$, $J = 4.8, 6.8$ Hz), 3.26 (dq, 1 H, Epox- CH-CH_3 , $J = 4.6, 5.6$ Hz), 3.49 (d, 1 H, Epox- CH-CO , $J = 4.6$ Hz), 4.61 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 4.8, 8.9$ Hz), 5.10, 5.17 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.54 (d, 1 H, NH , $J = 8.9$ Hz), 7.25-7.34 (m, 5 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 12.81$ (CH_3), 17.32, 19.00 ($\gamma\text{-CH}_3$), 30.92 ($\beta\text{-CH}$), 54.78 ($\alpha\text{-CH}$), 55.22 (Epox- CH-CH_3), 56.40 (Epox- CH-CO), 67.09 (OCH_2Ph), 128.43, 128.47, 128.55 (Ar- CH), 135.12 (Ar- C), 167.34 (N- C=O), 171.16 (BnO- C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3252$ (w, br, OCN- H); 3069, 2965, 2930 (w, =C-H, C-H); 1735 (s, O- C=O); 1659, 1645 (s, N- C=O); 1550 (m, OCN- H); 1454, 1385 (w, arom. C=C, C-H); 1193, 1153 (m, C-O-C); 960, 840 (m, Epox C-O-C); 757, 699 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.6.3 (S)-2-[(2S,3R)+(2R,3S)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-oxirancarbonsäureethylester (E-09)



Methode: G2.

Ansatz: 756 mg (3.81 mmol) **E-06** in 25 mL abs. DMF, 1.17 g (4.00 mmol) PheOBn•HCl, 0.91 mL (4.19 mmol) DPPA, 0.55 mL (4.00 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.27$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 358 mg (0.90 mmol, 24%; Dia1 : Dia2 = 1 : 1.17). – Blassgelbes, viskoses Öl.

Methode: G1.

Ansatz: 515 mg (3.22 mmol) **E-07** in 30 mL abs. THF, 0.35 mL (3.22 mmol) NMM, 0.42 mL (3.22 mmol) IBCF; 940 mg (3.22 mmol) PheOBn•HCl und 0.45 mL (3.22 mmol) TEA in 10 mL abs. DMF.

Reaktionsdauer: 10 min – 15 °C; 1 h – 15 °C, 1 h 0 °C, 13 h RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.27$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 526 mg (1.32 mmol, 41%; Dia1 : Dia2 = 1 : 1.17). – Blassgelbes, viskoses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = + 1.21^\circ$ (c = 0.91, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₃NO₆, 397.44; gef.: [M+Na]⁺ 420.5.

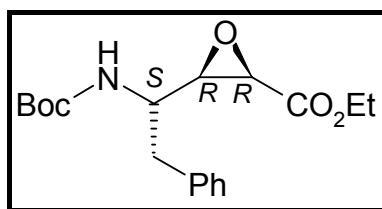
LC-MS: $R_t = 20.7$ min, $k' = 22.00$ (91%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.21$ (t, CH₃, $J = 7.1$ Hz, Dia1) u. 1.26 (t, CH₃, $J = 7.1$ Hz, Dia2) (zus. 3 H), 3.02-3.11 (m, β -CH₂, $J = 6.3, 6.6$ Hz, Dia1) u. 3.13-3.20 (m, β -CH₂, $J = 6.3, 6.6$ Hz, Dia2) (zus. 2 H), 3.67-3.70 (2 x d, zus. 2 H, Epox-CH, $J = 5.0$ Hz), 4.09-4.19 (m, zus. 2 H, OCH₂, $J = 7.1$ Hz), 4.77-4.84 (m, α -CH, $J = 6.3, 7.9$ Hz, Dia1) u. 4.86-4.92 (m, α -CH, $J = 6.3, 7.3$ Hz, Dia2) (zus. 1 H), 5.06-5.17 (m, zus. 2 H, OCH₂Ph, $J = 12.4$ Hz), 6.92 (br d, zus. 2 H, NH, $J = 7.9$ Hz), 7.10-7.38 (m, zus. 10 H, Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 13.89, 14.01 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 37.76, 38.09 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 53.03, 53.13 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 53.30, 53.50 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -C(O)N), 54.42, 54.52 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO₂Et), 62.16, 62.27 (O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 67.14, 67.30 (O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Ph), 127.03, 127.11, 128.41, 128.48, 128.57, 128.60, 128.66, 129.21, 129.33 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 134.97, 135.11, 135.44, 135.47 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 164.45, 164.77 (N- $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 165.71, 165.83 (EtO- $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 170.18, 170.57 (BnO- $\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3399 (w, br, CON-H); 3064, 3031, 2982 (w, =C-H, C-H); 1740 (s, O- $\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1680 (s, N- $\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1527 (s, OCN-H); 1454, 1395 (w, aromat. C=C, C-H); 1206, 1147 (m, C-O-C); 932, 873 (m, Epoxy C-O-C); 742, 698 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.6.4 (*R*)-2-[(3*R*)-((*S*)-1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylethyl)oxiran]-carbonsäureethylester (**E-10**)



Methode: A1b.

Ansatz: 137 mg (0.43 mmol) **Z-OI-01** in 10 mL Dichlormethan, 350 mg (1.42 mmol) *m*-CPBA.

Reaktionsdauer: 12 d RT.

SC (Kieselgel 60, Cyclohexan/EtOAc 10:1; R_f = 0.49, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 19 mg (0.06 mmol, 13%). – Gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 112-113 °C.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 3.40 ° (c = 1.00, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, 335.40; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 358.4.

LC-MS: R_t = 21.1 min, k' = 22.44 (100%).

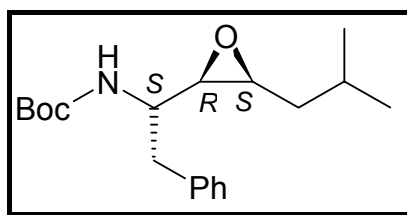
^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.20 (t, 3 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $J=7.1$ Hz), 1.34 (s, 9 H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 2.73-2.99 (m_c , 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Ph, $J=6.8, 7.9$ Hz), 3.30 (m, 1 H, Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CH), 3.40 (d, 1 H, Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO, $J=4.3$ Hz), 3.98 (m, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}$ CH₂Ph, $J=6.8$ Hz), 4.03 (q, 2 H, O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J=7.1$ Hz), 4.63 (br s, 1 H, N $\underline{\text{H}}$), 7.07-7.24 (m, 5 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 14.05 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.31 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 41.27 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Ph), 52.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ CH₂Ph), 55.78 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO), 58.29 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CH), 61.74 (O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 79.69 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$),

126.67, 128.53, 129.40 (Ar-CH), 136.76 (Ar-C), 154.96 (C=O [Boc]), 167.33 (EtO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3358 (m, CONH); 3026, 2954, 2924, 2854 (m, =C-H, C-H); 1743 (s, O-C=O); 1684 (s, N-C=O); 1527 (s, OCN-H); 1414, 1382 (w, arom. C=C, C-H); 1250, 1201, 1177 (C-O-C); 912, 863 (m, Epox C-O-C); 752, 701, 639 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.6.5 (S)-1-[(2R,3S)-3-Isobutyloxiranyl-2-phenylethyl]carbaminsäuretertbutylester (E-11)



Methode: A1b.

Ansatz: 85 mg (0.28 mmol) **Z-OI-02** in 10 mL Dichlormethan, 97 mg (0.56 mmol) *m*-CPBA.

Reaktionsdauer: 4 d RT.

SC (Kieselgel 60, Cyclohexan/EtOAc 10:1; R_f = 0.30, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 50 mg (0.16 mmol, 57%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 75-76 °C.

$[\alpha]_D^{23}$ = - 6.20 ° (c = 1.00, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_3$, 319.45; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 342.5.

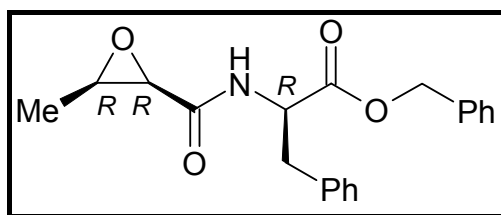
LC-MS: R_t = 24.5 min, k' = 26.22 (90%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.81, 0.83 (2 x d, je 3 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, J = 6.7 Hz), 0.92-1.08 (m_c , 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, J = 6.0, 7.6 Hz), 1.36 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.58 (m_c , 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, J = 6.0, 6.7 Hz), 2.77, 2.96 (2 x dd, je 1 H, CH_2Ph , J = 6.3, 7.8 Hz), 2.82-2.88 (m, 2 H, Epox- $\text{CH-CH}_2\text{Ph}$, Epox- $\text{CH-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, J = 3.8, 7.4, 7.6 Hz), 3.55-3.62 (m, 1 H, CHCH_2Ph , J = 6.3, 7.4 Hz), 4.66 (br s, 1 H, NH), 7.11-7.24 (m, 5 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 22.48, 22.61 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26.74 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 28.37 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.61 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 39.67 (CH_2Ph), 51.22 (CHCH_2Ph), 56.77 (Epox- $\text{CH-CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 57.52 (Epox- $\text{CH-CH}_2\text{Ph}$), 79.48 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 126.59, 128.41, 129.61 (Ar- CH), 137.07 (Ar- C), 155.20 (N- $\text{C}=\text{O}$ [Boc]) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3348 (m, CON-H); 3028, 2953, 2923, 2854 (m, =C-H, C-H); 1682 (s, N-C=O); 1526 (s, OCN-H); 1413, 1379 (w, aromat. C=C, C-H); 1247, 1165, 1024 (C-O-C); 917, 869 (m, Epox C-O-C); 750, 702, 615 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.6.6 (*R*)-2-(((2*R*,3*R*)-3-Methyloxirancarboxyl)amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (**E-13**)



Methode: G2.

Ansatz: 563 mg (4.02 mmol) **E-03** in 20 mL abs. DMF, 1.80 g (4.22 mmol) *D*-PheOBn•*p*Tos, 0.96 mL (4.42 mmol) DPPA, 0.59 mL (4.22 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.24, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 602 mg (1.77 mmol, 44%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 101-103 °C.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 18.00 ° (c = 1.00, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, 339.39; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 362.4.

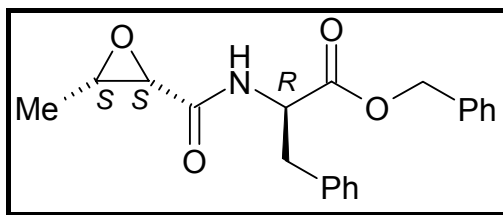
LC-MS: R_t = 19.2 min, k' = 20.33 (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.89 (d, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, J = 5.6 Hz), 2.92–2.97 (dd, 1 H, β - $\text{C}\underline{\text{H}}_2$, J = 5.8, 8.1 Hz), 3.09-3.15 (m, 2 H, β - $\text{C}\underline{\text{H}}_2$, Epox- $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_3$, J = 4.8, 5.6 Hz), 3.35 (d, 1 H, Epox- $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}$, J = 4.8 Hz), 4.84 (dt, 1 H, α - $\text{C}\underline{\text{H}}$, J = 5.8, 7.8 Hz), 5.09, 5.10 (2 x d, je 1 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, J = 12.1 Hz), 6.43 (d, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$, J = 7.8 Hz), 7.14-7.25 (m, 10 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 12.62 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 37.86 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 52.78 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 54.31 (Epox- $\underline{\text{C}}\text{H}\text{-CH}_3$), 55.25 (Epox- $\underline{\text{C}}\text{H}\text{-CO}$), 67.32 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 127.21, 128.52, 128.54, 128.60, 128.67, 129.07 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 134.89, 135.32 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 167.29 (N- $\underline{\text{C}}\text{=O}$), 170.91 (BnO- $\underline{\text{C}}\text{=O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3314 (w, br, OCN-H); 2925, 2854 (w, =C-H, C-H); 1748 (s, O-C=O); 1658 (s, N-C=O); 1525 (m, OCN-H); 1456, 1395 (m, aromat. C=C, C-H); 1210, 1179, 1134 (s, C-O-C); 946, 849 (m, Epox C-O-C); 826, 736, 693 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.6.7 (R)-2-(((2S,3S)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-14)



Methode: G2.

Ansatz: 620 mg (4.42 mmol) **E-12** in 20 mL abs. DMF, 1.99 g (4.64 mmol) *D*-PheOBn•*p*Tos, 1.05 mL (4.86 mmol) DPPA, 0.64 mL (4.64 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.28$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 773 mg (2.27 mmol, 51%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 93-94 °C.

$[\alpha]_D^{23} = + 8.70^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, 339.39; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 362.4.

LC-MS: $R_t = 19.4$ min; $k' = 20.56$ (100%).

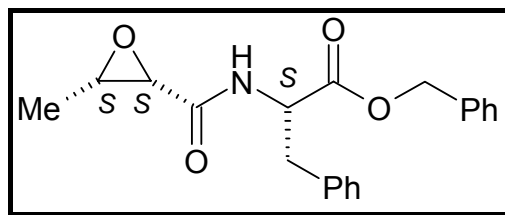
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.16$ (d, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, $J = 5.6$ Hz), 3.03 (m, 2 H, $\beta\text{-C}\underline{\text{H}}_2$, $J = 6.1, 7.6$ Hz), 3.13 (dq, 1 H, Epox- $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_3$, $J = 4.8, 5.6$ Hz), 3.33 (d, 1 H, Epox- $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}$, $J = 4.8$ Hz), 4.89 (dt, 1 H, $\alpha\text{-C}\underline{\text{H}}$, $J = 6.1, 8.5$ Hz), 5.00, 5.05 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.43 (d, 1 H, NH , $J = 8.5$ Hz), 7.14-7.25 (m, 10 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 12.77$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 37.81 ($\beta\text{-C}\underline{\text{H}}_2$), 52.32 ($\alpha\text{-C}\underline{\text{H}}$), 54.65 (Epox- $\underline{\text{C}}\text{H-CH}_3$), 55.11 (Epox- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 67.32 (OCH_2Ph), 127.21, 128.52, 128.56, 128.60, 128.66, 129.10 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 134.88, 135.25 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 167.04 (N- $\underline{\text{C}}\text{=O}$), 170.75 (BnO- $\underline{\text{C}}\text{=O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3285$ (w, br, $\text{OCN-}\underline{\text{H}}$); 3040, 2970 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1731 (s, $\text{O-}\underline{\text{C}}\text{=O}$); 1663 (s, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{=O}$); 1538 (m, $\text{OCN-}\underline{\text{H}}$); 1445, 1393 (m, arom. C=C , C-H); 1277, 1226, 1180 (s, C-O-C); 964, 829 (m, Epox C-O-C); 748, 694 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

Die spektroskopischen Daten sind identisch zu **E-04** (Enantiomer) (vgl. Kapitel 14.6.1).

14.6.8 (S)-2-(((2S,3S)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-15)



Methode: G2.

Ansatz: 567 mg (4.04 mmol) **E-12** in 20 mL abs. DMF, 1.24 g (4.25 mmol) PheOBn•HCl, 0.96 mL (4.45 mmol) DPPA, 0.59 mL (4.25 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 4 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.24$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 519 mg (1.53 mmol, 38%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt.: 102-103 °C.

$[\alpha]_D^{23} = -17.10^\circ$ ($c = 0.91$, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₁NO₄, 339.39; gef.: [M+Na]⁺ 362.4.

LC-MS: $R_t = 19.2$ min, $k' = 20.33$ (100%).

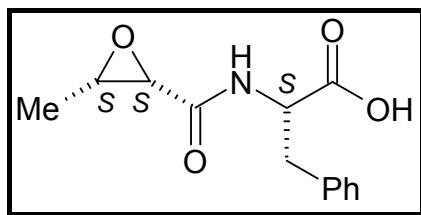
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 0.89$ (d, 3 H, CH₃, $J = 5.6$ Hz), 2.92–2.97 (dd, 1 H, β -CH₂, $J = 5.8, 8.1$ Hz), 3.09–3.15 (m, 2 H, β -CH₂, Epox-CH-CH₃, $J = 4.8, 5.6$ Hz), 3.35 (d, 1 H, Epox-CH-CO, $J = 4.8$ Hz), 4.84 (dt, 1 H, α -CH, $J = 5.8, 7.8$ Hz), 5.09, 5.10 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, $J = 12.1$ Hz), 6.43 (d, 1 H, NH, $J = 7.8$ Hz), 7.14–7.25 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): $\delta = 12.62$ (CH₃), 37.86 (β -CH₂), 52.78 (α -CH), 54.31 (Epox-CH-CH₃), 55.25 (Epox-CH-CO), 67.32 (OCH₂Ph), 127.21, 128.52, 128.54, 128.60, 128.67, 129.07 (Ar-CH), 134.89, 135.32 (Ar-C), 167.29 (N-C=O), 170.91 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3314$ (w, br, OCN-H); 2925, 2854 (w, =C-H, C-H); 1748 (s, O-C=O); 1658 (s, N-C=O); 1525 (m, OCN-H); 1456, 1395 (m, arom. C=C, C-H); 1210, 1179, 1134 (s, C-O-C); 946, 849 (m, Epox C-O-C); 826, 736, 693 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

Die spektroskopischen Daten sind identisch zu **E-13** (Enantiomer) (vgl. Kapitel 14.6.6).

14.6.9 (S)-2-(((2S,3S)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäure (E-16)



Methode: F1.

Ansatz: 252 mg (0.74 mmol) **E-15** in 20 mL Ethanol, 140 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H₂.

Reaktionsdauer: 10 h RT.

Ausbeute: 184 mg (0.74 mmol, 100%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 210-213 °C (Zersetzung).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₃H₁₅NO₄, 249.27; gef.: [M+H]⁺ 250.3.

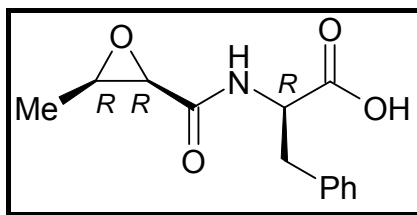
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.71 (d, 3 H, CH₃, J = 5.5 Hz), 2.95, 3.24 (2 x br dd, je 1 H, β-CH₂), 3.06 (m, 1 H, Epox-CH-CH₃, J = 4.6, 5.5 Hz), 3.35 (d, 1 H, Epox-CH-CO, J = 4.6 Hz), 4.73 (br s, 1 H, α-CH), 6.62 (d, 1 H, NH, J = 7.6 Hz), 7.12-7.22 (m, 5 H, Ar-H), 8.13 (br s, 1 H, CO₂H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 12.22 (CH₃), 37.33 (β-CH₂), 54.46 (α-CH), 55.13 (Epox-CH-CH₃), 55.31 (Epox-CH-CO), 127.32, 128.61, 129.21 (Ar-CH), 135.77 (Ar-C), 167.20 (N-C=O), 173.91 (HO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3397, 3290 (w, br, CON-H, COO-H); 3028, 2924, 2853 (w, =C-H, C-H); 1733 (s, O-C=O); 1657 (s, N-C=O); 1526 (m, OCN-H); 1446, 1390 (w, arom. C=C, C-H); 966, 829 (w, Epox C-O-C); 743, 698 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

Substanz zersetzt sich innerhalb kurzer Zeit!

14.6.10 (R)-2-(((2R,3R)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäure (E-17)



Methode: F1.

Ansatz: 183 mg (0.54 mmol) **E-13** werden in 20 mL Ethanol, 120 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H₂.

Reaktionsdauer: 8 h RT.

Ausbeute: 134 mg (0.54 mmol, 100%). – Farbloser Feststoff.

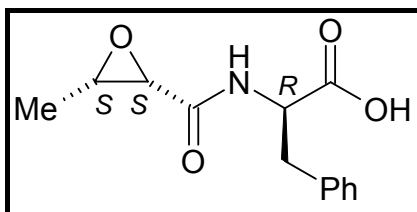
Schmelzpunkt: 209-213 °C (Zersetzung).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.71 (d, 3 H, CH₃, J = 5.5 Hz), 2.95, 3.24 (2 x br dd, je 1 H, β-CH₂), 3.06 (m, 1 H, Epox-CH-CH₃, J = 4.6, 5.5 Hz), 3.35 (d, 1 H, Epox-CH-CO, J = 4.6 Hz), 4.73 (br s, 1 H, α-CH), 6.62 (d, 1 H, NH, J = 7.6 Hz), 7.12-7.22 (m, 5 H, Ar-H), 8.13 (br s, 1 H, CO₂H) ppm.

Die ¹H-NMR-spektroskopischen Daten sind identisch zu **E-16** (Enantiomer) (vgl. Kapitel 14.6.9).

Substanz zersetzt sich innerhalb kurzer Zeit!

14.6.11 (R)-2-(((2S,3S)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäure (E-18)



Methode: F1.

Ansatz: 207 mg (0.61 mmol) **E-14** in 20 mL Ethanol, 140 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H₂.

Reaktionsdauer: 14 h RT.

Ausbeute: 151 mg (0.61 mmol, 100%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 220-223 °C (Zersetzung).

$[\alpha]_D^{26} = -34.70^\circ$ (c = 0.88, MeOH).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{13}H_{15}NO_4$, 249.27; gef.: $[M+Na]^+$ 272.2.

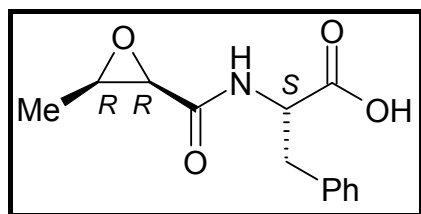
1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): $\delta = 1.24$ (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.3$ Hz), 3.03-3.08 (dd, 1 H, $\beta-CH_2$, $J = 5.3, 7.6$ Hz), 3.18-3.23 (m, 2 H, $\beta-CH_2$, Epox- $CH-CH_3$, $J = 4.8, 5.3$ Hz), 3.39 (d, 1 H, Epox- $CH-CO$, $J = 4.8$ Hz), 4.82 (dt, 1 H, $\alpha-CH$, $J = 5.3, 7.6$ Hz), 6.68 (d, 1 H, NH , $J = 7.6$ Hz), 7.12-7.22 (m, 5 H, Ar- H), 7.47 (br s, 1 H, CO_2H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): $\delta = 12.74$ (CH_3), 37.40 ($\beta-CH_2$), 53.06 ($\alpha-CH$), 54.79 (Epox- $CH-CH_3$), 55.03 (Epox- $CH-CO$), 127.22, 128.72, 129.14 (Ar- CH), 135.70 (Ar- C), 167.92 (N- $C=O$), 174.97 (HO- $C=O$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3362, 3295$ (w, br, CON- H , COO- H); 3029, 2953 (w, =C- H , C- H); 1733 (s, O- $C=O$); 1655 (s, N- $C=O$); 1527 (m, OCN- H); 1426, 1378 (w, aromat. C=C, C- H); 976, 819 (w, Epox C-O-C); 743, 699 (s, aromat. C- H) cm^{-1} .

Substanz zersetzt sich innerhalb kurzer Zeit!

14.6.12 (S)-2-(((2R,3R)-3-Methyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäure (E-19)



Methode: F1.

Ansatz: 224 mg (0.66 mmol) **E-04** in 20 mL Ethanol, 160 mg (10 mol%) Pd-C (10%), H_2 .

Reaktionsdauer: 13 h RT.

Ausbeute: 164 mg (0.66 mmol, 100%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 219-224 $^\circ C$ (Zersetzung).

$[\alpha]_D^{26} = +37.15^\circ$ (c = 1.14, MeOH).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{13}H_{15}NO_4$, 249.27; gef.: $[M+H]^+$ 250.1.

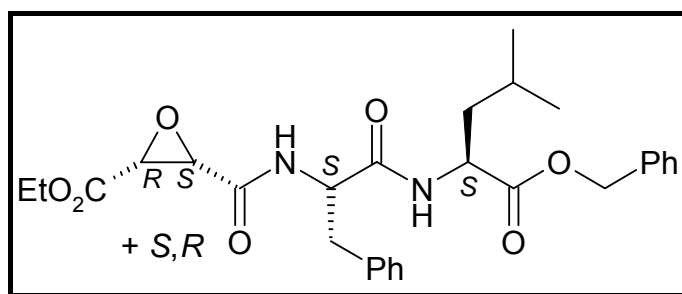
1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): $\delta = 1.24$ (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.3$ Hz), 3.03-3.08 (dd, 1 H, $\beta-CH_2$, $J = 5.3, 7.6$ Hz), 3.18-3.23 (m, 2 H, $\beta-CH_2$, Epox- $CH-CH_3$, $J = 4.8, 5.3$ Hz), 3.39 (d, 1 H, Epox- $CH-CO$, $J = 4.8$ Hz), 4.82 (dt, 1 H, $\alpha-CH$, $J = 5.3, 7.6$ Hz), 6.68 (d, 1 H, NH , $J = 7.6$ Hz), 7.12-7.22 (m, 5 H, Ar- H), 7.47 (br s, 1 H, CO_2H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 12.74 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 37.40 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 53.06 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 54.79 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 55.03 (Epoxy- $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}$), 127.22, 128.72, 129.14 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.70 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 167.92 (N- $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 174.97 (HO- $\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind identisch zu **E-18** (Enantiomer) (vgl. Kapitel 14.6.11).

Substanz zersetzt sich innerhalb kurzer Zeit!

14.6.13 (2R,3S)+(2S,3R)-3-[(S)-1-((S)-1-Benzyloxycarbonyl-3-methylbutylcarbamoyl)-2-phenylethylcarbamoyl]oxiran-2-carbonsäureethylester (**E-22**)



Methode: F2.

Ansatz: 359 mg (0.77 mmol) **Boc-Phe-LeuOBn (Dipep-02)** in 30 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 1 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-LeuOBn•TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 372 mg (0.77 mmol) **Phe-LeuOBn•TFA**, 123 mg (0.77 mmol) **E-07a** und 401 mg (0.77 mmol) PyBOP in 20 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.40 mL (2.31 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C, 6 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.15, Cyclohexan/EtOAc 2:1)

Ausbeute: 172 mg (0.34 mmol, 44%; $RSSS$: $SRSS$ = 1.44 : 1). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22}$ = - 20.08 ° (c = 1.21, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$, 510.59; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 533.7.

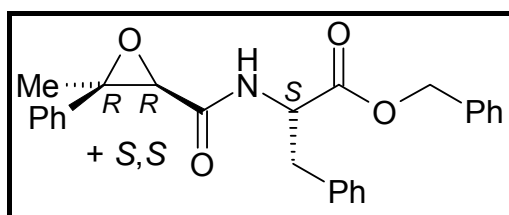
^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.84-0.88 (2 x d, zus. 6 H, δ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ [Leu], J = 6.6 Hz), 1.24-1.33 (2 x t, zus. 3 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, J = 7.1 Hz), 1.46-1.61 (m, zus. 3 H, γ - $\underline{\text{C}}\text{H}$ [Leu], β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ [Leu]), 2.99-3.05 (dd, β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ [Phe], J = 6.6, 8.3 Hz, $RSSS$) u. 3.10-3.16 (m, β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ [Phe], J = 6.6, 8.1 Hz, $SRSS$) u. 3.24-3.30 (dd, β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ [Phe], J = 6.6, 7.9 Hz, $RSSS$) (zus. 2 H), 3.66-3.72

(2 x d, zus. 2 H, Epox- $\underline{C}H$, $J = 4.8, 5.3$ Hz), 4.09-4.24 (m, zus. 2 H, $\underline{O}CH_2$, $J = 7.1$ Hz), 4.53-4.64 (m, α - $\underline{C}H$ [Phe], $RSSS$, α - $\underline{C}H$ [Leu]) u. 4.84-4.93 (m, α - $\underline{C}H$ [Phe], $SRSS$) (zus. 2 H), 5.06-5.16 (m, zus. 2 H, $\underline{O}CH_2Ph$, $J = 12.4$ Hz), 6.05 (d, $\underline{N}H$ [Phe], $J = 8.1$ Hz, $RSSS$) u. 6.59 (br d, $\underline{N}H$ [Phe], $J = 9.6$ Hz, $SRSS$) (zus. 1 H), 7.05 (br d, zus. 1 H, $\underline{N}H$ [Leu], $J = 7.9$ Hz), 7.18-7.36 (m, zus. 10 H, Ar - \underline{H}) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.61 MHz): $\delta = 14.02$ ($\underline{C}H_3$), 21.94, 22.59 (2 x δ - $\underline{C}H_3$ [Leu]), 24.60 (γ - $\underline{C}H$ [Leu]), 37.56 (β - $\underline{C}H_2$ [Phe]), 41.45 (β - $\underline{C}H_2$ [Leu]), 50.98 (α - $\underline{C}H$ [Leu]), 52.95 (Epox- $\underline{C}H$ - $C(O)N$), 53.49 (α - $\underline{C}H$ [Phe]), 54.43 (Epox- $\underline{C}H$ - CO_2Et), 62.26 ($\underline{O}CH_2$), 66.96 ($\underline{O}CH_2Ph$), 126.97, 127.92, 128.20, 128.46, 128.63, 129.36 (Ar - $\underline{C}H$), 135.28, 136.29 (Ar - \underline{C}), 164.81 ($\underline{N}-\underline{C}=\underline{O}$ [Epox]), 165.89 ($EtO-\underline{C}=\underline{O}$), 169.44 ($\underline{N}-\underline{C}=\underline{O}$ [Phe-Leu]), 171.91 ($BnO-\underline{C}=\underline{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3369, 3308$ (w, br, $\underline{CON}-H$); 3065, 3031, 2957, 2928 (w, $=C-H$, $C-H$); 1740 (s, $\underline{O}-\underline{C}=\underline{O}$); 1656 (s, $\underline{N}-\underline{C}=\underline{O}$); 1532 (s, $\underline{OCN}-H$); 1452, 1381 (w, aromat. $C=C$, $C-H$); 1209, 1150 (s, $C-O-C$); 957, 858 (m, Epox $C-O-C$); 745, 698 (s, aromat. $C-H$) cm^{-1} .

14.6.14 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-3-Methyl-3-phenyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-23)



Methode: D2b.

Ansatz: 2.06 g (10.0 mmol) **E-21** / **E-21-t** in 20 mL Ethanol, 20.0 mL (10.0 mmol) ethanolische KOH-Lösung (0.5 M).

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C.

Ausbeute: 1.45 g (9.80 mmol, 98%). – Farbloser Feststoff.

Das Gemisch der Kaliumsalze **E-21-K** / **E-21-t-K** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 480 mg (2.22 mmol) **E-21-K** / **E-21-t-K** in 20 mL abs. DMF, 679 mg (2.33 mmol) PheOBn•HCl, 0.55 mL (2.44 mmol) DPPA, 0.35 mL (2.33 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 7 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.16$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 323 mg (0.78 mmol, 35%; *RRS* : *SSS* = 1 : 1). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = -6.64^\circ$ ($c = 1.22$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4$, 415.49; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 438.6.

LC-MS: $R_t = 23.6$ min, $k' = 25.22$ u. $R_t = 23.9$ min, $k' = 25.56$ (zus. 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.61$ (s, 3 H, CH_3), 2.87 (m_c, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.5, 7.3$ Hz), 3.57 (s, 1 H, Epox- CH), 4.37 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.5, 7.8$ Hz), 4.77, 4.78 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.22 (br d, 1 H, NH , $J = 7.8$ Hz), 7.00-7.25 (m, 15 H, Ar- H) ppm [(*R,R,S*)-Isomer].

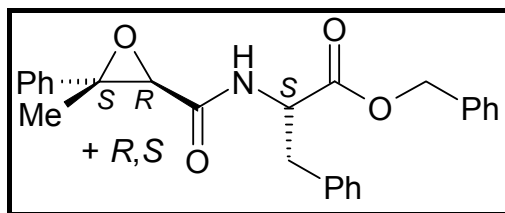
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.62$ (s, 3 H, CH_3), 1.97-2.02, 2.35-2.40 (2 x dd, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.3, 7.9$ Hz), 3.58 (s, 1 H, Epox- CH), 4.40 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.3, 8.4$ Hz), 4.88, 4.89 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.22 (br d, 1 H, NH , $J = 8.4$ Hz), 7.10-7.34 (m, 15 H, Ar- H) ppm [(*S,S,S*)-Isomer].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 25.67$ (CH_3), 38.28 ($\beta\text{-CH}_2$), 52.43 ($\alpha\text{-CH}$), 61.95 (Epox- CH-CO), 65.17 (Epox- C), 66.76 (OCH_2Ph), 126.10, 126.87, 127.79, 128.25, 128.34, 128.44, 128.60, 128.87, 129.24 (Ar- CH), 134.87, 135.30, 136.95 (Ar- C), 166.30 (N- C=O), 170.68 (BnO- C=O) ppm [(*R,R,S*)-Isomer].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 25.35$ (CH_3), 38.00 ($\beta\text{-CH}_2$), 52.43 ($\alpha\text{-CH}$), 61.80 (Epox- CH-CO), 65.23 (Epox- C), 66.97 (OCH_2Ph), 126.40, 126.97, 127.79, 128.30, 128.39, 128.49, 128.60, 128.87, 129.24 (Ar- CH), 134.98, 135.33, 137.64 (Ar- C), 166.48 (N- C=O), 169.76 (BnO- C=O) ppm [(*S,S,S*)-Isomer].

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3410$ (w, br, OCN-H); 3063, 2982 (w, =C-H, C-H); 1738 (s, O- C=O); 1673 (s, N- C=O); 1518 (m, OCN-H); 1445, 1383 (w, arom. C=C, C-H); 1190, 1124 (s, C-O-C); 957, 888 (m, Epox C-O-C); 742, 697 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.6.15 (S)-2-(((2S,3R)+(2R,3S)-3-Methyl-3-phenyloxirancarboxyl)amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-23-t)



Methode: G2.

Ansatz: 480 mg (2.22 mmol) **E-21-K** / **E-21-t-K** in 20 mL abs. DMF, 679 mg (2.33 mmol) PheOBn•HCl, 0.55 mL (2.44 mmol) DPPA, 0.35 mL (2.33 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 7 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.21$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 278 mg (0.67 mmol, 30%; SRS : RSS = 1 : 1). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 93-94 °C.

$[\alpha]_D^{22} = + 2.68^\circ$ ($c = 1.12$, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₆H₂₅NO₄, 415.49; gef.: [M+Na]⁺ 438.5.

LC-MS: $R_t = 24.1$ min, $k' = 25.78$ (99%).

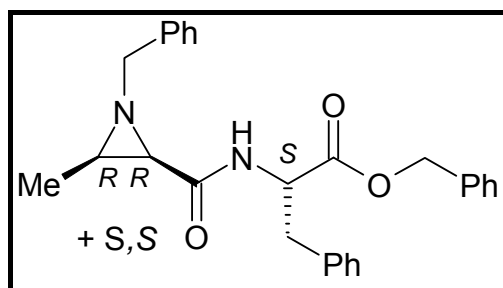
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.35$ (s, CH₃, Dia1) u. 1.65 (s, CH₃, Dia2) (zus. 3 H), 3.06-3.11 (dd, β -CH₂, $J = 5.8, 8.1$ Hz, Dia1) u. 3.12-3.22 (m_c, β -CH₂, $J = 6.3, 7.5$ Hz, Dia2) u. 3.23-3.30 (dd, β -CH₂, $J = 5.8, 8.3$ Hz, Dia1) (zus. 2 H), 3.40 (s, Epox-CH, Dia1) u. 3.42 (s, Epox-CH, Dia2) (zus. 1 H), 4.95-5.06 (m, zus. 1 H, α -CH, $J = 5.8, 8.4$ Hz), 5.14-5.22 (m, zus. 2 H, OCH₂Ph, $J = 12.1$ Hz), 6.66 (br d, zus. 1 H, NH, $J = 8.4$ Hz), 7.06-7.37 (m, 15 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): $\delta = 16.97, 17.19$ (CH₃), 37.83, 37.91 (β -CH₂), 52.35, 52.79 (α -CH), 62.89 (Epox-CH-CO), 63.33, 63.53 (Epox-C), 67.37 (OCH₂Ph), 125.12, 125.16, 127.21, 127.25, 128.03, 128.39, 128.44, 128.60, 128.65, 128.74, 129.03, 129.13 (Ar-CH), 134.90, 135.03, 135.27, 135.59 (Ar-C), 166.48, 166.74 (N-C=O), 170.82, 170.93 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3258$ (w, br, OCN-H); 3063, 3033 (w, =C-H, C-H); 1730 (s, O-C=O); 1653 (s, N-C=O); 1545 (s, OCN-H); 1445, 1383 (w, arom. C=C, C-H); 1275, 1225, 1180 (s, C-O-C); 911, 856 (m, Epox C-O-C); 751, 695 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

14.7 AS / Peptid-verknüpfte Aziridine

14.7.1 (S)-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonylamino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-04)



Methode: D1b.

Ansatz: 640 mg (2.92 mmol) **A-03** in 20 mL Ethanol, 123 mg (2.92 mmol) LiOH•H₂O.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 4 d RT.

Ausbeute: 558 mg (2.83 mmol, 97%). – Gelber Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-03-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 558 mg (2.83 mmol) **A-03-Li** in 25 mL abs. DMF, 867 mg (2.97 mmol) PheOBn•HCl, 0.67 mL (3.11 mmol) DPPA, 0.41 mL (2.97 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 4 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.25, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 631 mg (1.47 mmol, 52%; *RRS* : *SSS* = 1.2 : 1). – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 54-55 °C.

$[\alpha]_D^{23} = -10.46^\circ$ (c = 1.36, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₇H₂₈N₂O₃, 428.63; gef.: [M+H]⁺ 429.4.

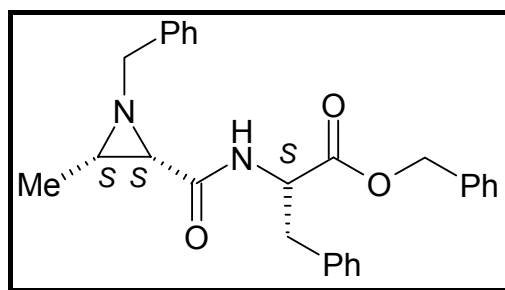
LC-MS: R_t = 20.2 min, k' = 21.44 (46%) (*S,S,S*) u. R_t = 21.1 min, k' = 22.44 (54%) (*R,R,S*).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.89 (d, CH₃, J = 5.6 Hz, (*S,S,S*)) u. 1.13 (d, CH₃, J = 5.6 Hz, (*R,R,S*)) (zus. 3 H), 1.88 (dq, Azi-CH-CH₃, J = 5.6, 6.6 Hz, (*S,S,S*)) u. 1.92 (dq, Azi-CH-CH₃, J = 5.6, 6.6 Hz, (*R,R,S*)) (zus. 1 H), 2.18 (d, Azi-CH-CO, J = 6.8 Hz, (*R,R,S*)) u. 2.22 (d, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz, (*S,S,S*)) (zus. 1 H), 2.99-3.15 (m, zus. 2 H, β-CH₂, J = 6.0, 7.9 Hz), 3.35, 3.37, 3.55, 3.58 (4 x d, zus. 2 H, NCH₂Ph, J = 13.4 Hz), 4.84-4.94 (m, zus. 1 H, α-CH, J = 6.0, 7.8 Hz), 5.02-5.14 (m, zus. 2 H, OCH₂Ph, J = 12.1 Hz), 6.91 (br d, zus. 1 H, NH, J = 7.9 Hz), 7.06-7.30 (m, zus. 15 H, Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 12.85, 12.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 37.79 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 41.48, 41.75 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 44.17, 44.27 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}$), 52.15, 52.63 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 62.64, 62.91 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 66.77, 66.81 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 126.78, 126.90, 127.08, 127.45, 127.75, 128.07, 128.15, 128.22, 128.28, 128.35, 128.89, 128.92 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}$), 134.92, 135.08, 135.44, 135.66, 137.99, 138.03 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}$), 168.29, 168.55 ($\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 170.75, 170.92 ($\text{BnO}-\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3260 (w, br, $\text{CON}-\text{H}$); 3066, 3030, 2926 (w, $=\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$); 1728 (s, $\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1668 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1519, 1497 (m, $\text{OCN}-\text{H}$); 1451, 1356 (m, arom. $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$); 1271, 1207, 1177 (s, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 734, 692 (s, arom. $\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

14.7.2 (S)-2-[(2S,3S)-1-Benzyl-3-methylaziridin-2-carbonylamino]-3-phenylpropion-säurebenzylester (A-04a)



Methode: D1b.

Ansatz: 372 mg (1.70 mmol) **A-03a** in 15 mL Ethanol, 71.3 mg (1.70 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 3 d RT.

Ausbeute: 332 mg (1.68 mmol, 99%). - Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-03a-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 332 mg (1.68 mmol) **A-03a-Li** in 30 mL abs. DMF, 514 mg (1.76 mmol) $\text{PheOBn}\cdot\text{HCl}$, 0.41 mL (1.85 mmol) DPPA, 0.30 mL (1.76 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 6 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.25, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 453 mg (1.06 mmol, 63%). – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 63-64 °C.

$[\alpha]_D^{23}$ = - 66.54 ° (c = 1.31, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$, 428.63; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 429.4.

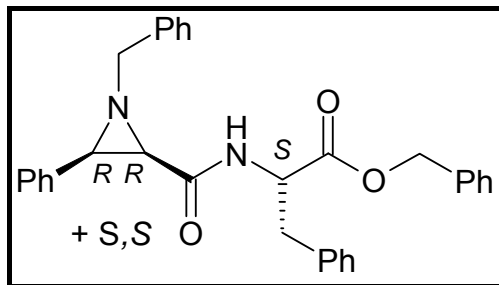
LC-MS: $R_t = 20.2$ min, $k' = 21.44$ (96%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.89$ (d, 3 H, CH_3 , $J = 5.6$ Hz), 1.88 (dq, 1 H, Azi- CH-CH_3 , $J = 5.6, 7.0$ Hz), 2.22 (d, 1 H, Azi- CH-CO , $J = 7.0$ Hz), 3.05, 3.14 (2 x dd, je 1 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 6.0, 7.9$ Hz), 3.40, 3.63 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.6$ Hz), 4.89 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 6.0, 8.1$ Hz), 5.12, 5.14 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 7.02 (d, 1 H, NH , $J = 8.1$ Hz), 7.07-7.38 (m, 15 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 12.87$ (CH_3), 37.83 ($\beta\text{-CH}_2$), 41.76 (Azi- CH-CH_3), 44.29 (Azi- CH-CO), 52.84 ($\alpha\text{-CH}$), 62.91 (NCH_2Ph), 66.91 (OCH_2Ph), 127.02, 127.13, 127.64, 128.30, 128.33, 128.37, 128.52, 128.58, 129.11 (Ar- CH), 135.24, 135.84, 138.23 (Ar- C), 168.55 (N-C=O), 171.20 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3258$ (w, br, CON-H); 3066, 3030, 2953 (w, =C-H, C-H); 1728 (s, O-C=O); 1671 (s, N-C=O); 1530, 1496 (m, OCN-H); 1451, 1368 (w, aromat. C=C, C-H); 1273, 1207, 1177 (s, C-O-C); 748, 734, 692 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.7.3 (S)-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonylamino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-07/07')



Methode: D1b.

Ansatz: 421 mg (1.58 mmol) **A-05** in 20 mL Methanol, 66.7 mg (1.58 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 4 d RT.

Ausbeute: 388 mg (1.50 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 388 mg (1.50 mmol) **A-05-Li** in 20 mL abs. DMF, 460 mg (1.58 mmol) $\text{PheOBn}\cdot\text{HCl}$, 0.36 mL (1.65 mmol) DPPA, 0.22 mL (1.58 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.22 / 0.24$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 177 mg (0.36 mmol, 24%) [**A-07**, 3.3 : 1]. – Blassgelber Feststoff;

169 mg (0.35 mmol, 23%) [**A-07'**, 1 : 2.4]. – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 79-81 °C (**A-07**); 83-84 °C (**A-07'**).

$[\alpha]_D^{23} = -27.54^\circ$ ($c = 1.32$, CHCl_3) (**A-07**).

LOOP-ESI-MS: ber. f.. $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$, 490.61; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 513.6 (**A-07/07'**).

LC-MS:

A-07: $R_t = 25.7$ min, $k' = 27.56$ (Dia1) u. $R_t = 25.9$ min, $k' = 27.78$ (Dia2) (zus. 100%).

A-07': $R_t = 25.7$ min, $k' = 27.56$ (Dia1) u. $R_t = 25.9$ min, $k' = 27.78$ (Dia2) (zus. 98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 2.63$ (d, 1 H, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz), 2.89-2.98 (m_c , 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.8, 7.6$ Hz), 3.12 (d, 1 H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 3.72, 3.74 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.2$ Hz), 4.47-4.52 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.8, 8.0$ Hz), 4.89, 4.90 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.6$ Hz), 6.84 (d, 1 H, NH , $J = 8.0$ Hz), 7.11-7.36 (m, 20 H, Ar- H) ppm [**A-07**, Dia1].

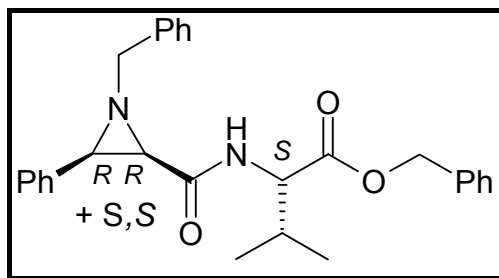
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 2.21$ -2.26, 2.50-2.54 (2 x dd, je 1 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.8, 7.6$ Hz), 2.66 (d, 1 H, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz), 3.16 (d, 1 H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 3.56, 3.92 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.2$ Hz), 4.53-4.57 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.8, 8.0$ Hz), 4.99, 5.00 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.6$ Hz), 6.88 (d, 1 H, NH , $J = 8.0$ Hz), 7.15-7.38 (m, 20 H, Ar- H) ppm [**A-07'**, Dia2].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 38.38$ ($\beta\text{-CH}_2$), 46.60 (Azi- CH-CO), 47.91 (Azi- CH-Ph), 52.56 ($\alpha\text{-CH}$), 63.30 (NCH_2Ph), 66.66 (OCH_2Ph), 126.84, 127.28, 127.58, 127.63, 127.99, 128.21, 128.28, 128.35, 128.44, 128.59, 128.97, 129.27 (Ar- CH), 134.47, 135.14, 135.67, 137.65 (Ar- C), 166.98 (N- $\text{C}=\text{O}$), 170.19 (BnO- $\text{C}=\text{O}$) ppm [**A-07**, Dia1].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 38.18$ ($\beta\text{-CH}_2$), 45.96 (Azi- CH-CO), 47.67 (Azi- CH-Ph), 52.68 ($\alpha\text{-CH}$), 63.12 (NCH_2Ph), 66.82 (OCH_2Ph), 126.79, 127.27, 127.56, 127.61, 127.91, 128.20, 128.27, 128.31, 128.41, 128.54, 128.97, 129.26 (Ar- CH), 134.47, 135.08, 135.70, 137.67 (Ar- C), 167.33 (N- $\text{C}=\text{O}$), 171.04 (BnO- $\text{C}=\text{O}$) ppm [**A-07'**, Dia2].

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3388$ (w, br, CON- H); 3062, 3030, 2930 (w, =C-H, C-H); 1739 (s, O- $\text{C}=\text{O}$); 1673 (s, N- $\text{C}=\text{O}$); 1510, 1497 (s, OCN- H); 1452, 1354 (w, arom. C=C, C-H); 1254, 1173 (m, C-O-C); 738, 696 (s, arom. C-H) cm^{-1} (**A-07**).

14.7.4 3-Methyl-(S)-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonylamino]-buttersäurebenzylester (A-08)



Methode: D1b.

Ansatz: 474 mg (1.78 mmol) **A-05** in 20 mL Methanol, 75.1 mg (1.78 mmol) LiOH·H₂O.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 4 d RT.

Ausbeute: 437 mg (1.69 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 437 mg (1.69 mmol) **A-05-Li** in 20 mL abs. DMF, 368 mg (1.77 mmol) ValOBn, 0.40 mL (1.86 mmol) DPPA, 0.25 mL (1.77 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.28, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 307 mg (0.69 mmol, 41%; Dia1 : Dia2 = 1 : 1.4). – Blassgelbes, viskoses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = -15.90^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₀N₂O₃, 442.56; gef.: [M+Na]⁺ 465.6.

LC-MS: R_t = 25.4 min, k' = 27.22 (59%) (Dia2) u. R_t = 25.9 min, k' = 27.78 (41%) (Dia1).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.23, 0.37 (2 x d, je 3 H, γ-CH₃, J = 6.8 Hz), 1.68-1.78 (dq, 1 H, β-CH, J = 5.3, 6.8 Hz) 2.62 (d, 1 H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 3.18 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.67, 3.90 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 13.1 Hz), 4.31-4.38 (dd, 1 H, α-CH, J = 5.3, 9.4 Hz), 5.13, 5.14 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.4 Hz), 6.78 (d, 1 H, NH, J = 9.4 Hz), 7.11-7.47 (m, 15 H, Ar-H) ppm (Dia1).

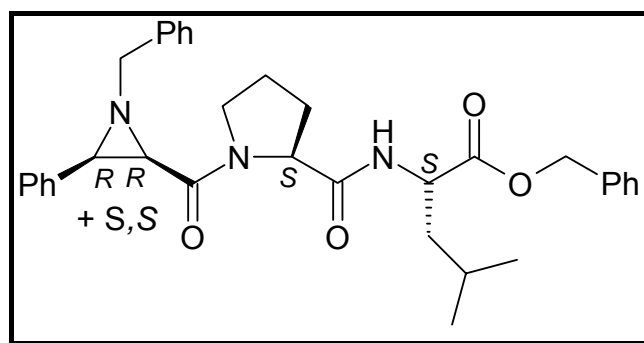
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.72, 0.73 (2 x d, je 3 H, γ-CH₃, J = 6.8 Hz), 1.91-2.01 (dq, 1 H, β-CH, J = 5.4, 6.8 Hz), 2.64 (d, 1 H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 3.16 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.59, 3.95 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 13.1 Hz), 4.16-4.22 (dd, 1 H, α-CH, J = 5.4, 9.1 Hz), 4.96, 4.97 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.4 Hz), 6.88 (d, 1 H, NH, J = 9.1 Hz), 7.11-7.47 (m, 15 H, Ar-H) ppm (Dia2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 17.50, 18.54 (γ - CH_3), 31.68 (β - CH_2), 46.79 (Azi- CH -CO), 47.99 (Azi- CH -Ph), 56.30 (α - CH), 63.22 (NCH_2Ph), 66.44 (OCH_2Ph), 127.32, 127.52, 127.65, 127.89, 128.05, 128.10, 128.28, 128.36, 128.47 (Ar- CH), 134.60, 135.41, 137.80 (Ar- C), 167.09 (N- $\text{C}=\text{O}$), 170.60 (BnO- $\text{C}=\text{O}$) ppm (Dia1).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 16.90, 18.10 (γ - CH_3), 31.10 (β - CH_2), 46.47 (Azi- CH -CO), 47.84 (Azi- CH -Ph), 56.57 (α - CH), 63.22 (NCH_2Ph), 66.77 (OCH_2Ph), 127.33, 127.58, 127.62, 127.91, 128.08, 128.17, 128.25, 128.52, 128.59 (Ar- CH), 134.60, 135.11, 137.64 (Ar- C), 167.53 (N- $\text{C}=\text{O}$), 171.42 (BnO- $\text{C}=\text{O}$) ppm (Dia2).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3393 (w, br, CON-H); 3063, 3031, 2963, 2930 (w, =C-H, C-H); 1736 (s, O-C=O); 1676 (s, N-C=O); 1511 (m, OCN-H); 1452, 1389 (m, aromat. C=C, C-H); 1185, 1147 (s, C-O-C); 738, 697 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.7.5 (S)-2-[[[(S)-1-((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)pyrrolidin-2-carbonyl]amino]-4-methylpentansäurebenzylester (A-11)



Methode: D1b.

Ansatz: 543 mg (2.03 mmol) **A-05** in 25 mL Methanol, 85.6 mg (2.03 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 4 d RT.

Ausbeute: 501 mg (1.93 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: F2.

Ansatz: 850 mg (2.03 mmol) **Boc-Pro-LeuOBn (Dipep-03)** in 30 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Pro-LeuOBn·TFA** wird sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 501 mg (1.93 mmol) **A-05-Li** in 25 mL abs. DMF, 878 mg (2.03 mmol) **Pro-LeuOBn•TFA**, 0.48 mL (2.23 mmol) DPPA, 0.28 mL (2.03 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.23$, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 575 mg (1.04 mmol, 54%; Dia1 : Dia2 = 1 : 2.7). – Blassgelbes, viskoses Öl.

$[\alpha]_D^{22} = -76.01^\circ$ ($c = 1.38$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_4$, 553.71; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554.4

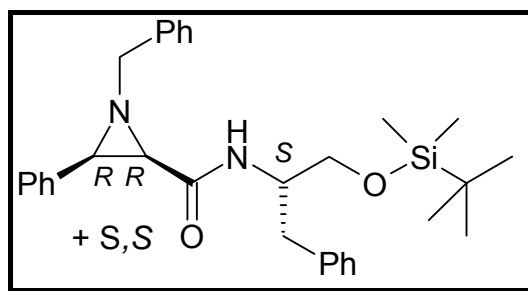
LC-MS: $R_t = 23.5$ min, $k' = 25.11$ (Dia2) u. $R_t = 23.9$ min, $k' = 25.56$ (Dia1) (zus. 96%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.85$ (d, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], $J = 5.8$ Hz, Dia1) u. 0.88 (d, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], $J = 5.8$ Hz, Dia2) (zus. 6 H), $1.38\text{-}1.67$ (m, zus. 3 H, $\gamma\text{-CH}$ [Leu], $\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), $1.84\text{-}1.95$ (br m, zus. 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$ [Pro]), $2.09\text{-}2.30$ (br m, zus. 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 2.67 (d, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz, Dia2) u. 2.70 (d, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz, Dia1) (zus. 1 H), 3.01 (d, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz, Dia2) u. 3.03 (d, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz, Dia1) (zus. 1 H), $3.25\text{-}3.33$, $3.45\text{-}3.57$ (2 x br m, zus. 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), 3.68 , 4.03 (2 x d, NCH_2Ph , $J = 13.1$ Hz, Dia2) u. 3.72 , 3.99 (2 x d, NCH_2Ph , $J = 13.1$ Hz, Dia1) (zus. 2 H), $4.25\text{-}4.31$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Pro]), $4.38\text{-}4.45$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Leu]), $5.09\text{-}5.19$ (m, zus. 2 H, OCH_2Ph , $J = 12.4$ Hz), 6.20 (br d, NH [Leu], $J = 8.4$ Hz, Dia1) u. 7.11 (br d, NH [Leu], $J = 8.0$ Hz, Dia2) (zus. 1 H), $7.17\text{-}7.48$ (m, zus. 15 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 22.04$, 22.12 , 22.40 , 22.56 ($\delta\text{-CH}_3$ [Leu]), 24.75 , 24.81 ($\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 24.87 , 24.95 ($\gamma\text{-CH}_2$ [Pro]), 26.28 , 26.76 ($\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 40.58 , 40.75 ($\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 46.49 , 46.55 ($\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), 46.84 , 46.89 (Azi- CH-CO), 48.15 , 48.20 (Azi- CH-Ph), 51.30 , 51.36 ($\alpha\text{-CH}$ [Leu]), 59.29 , 59.97 ($\alpha\text{-CH}$ [Pro]), 63.55 , 63.77 (NCH_2Ph), 66.70 , 67.09 (OCH_2Ph), 126.39 , 126.90 , 127.02 , 128.13 , 128.24 , 128.31 , 128.47 , 128.49 , 128.52 , 128.55 , 129.27 , 129.67 (Ar- CH), 135.54 , 135.61 , 135.66 , 137.62 , 137.67 , 138.07 (Ar- C), 166.72 , 166.97 (N-C=O [Azi-Pro]), 170.43 , 170.60 (N-C=O [Pro-Leu]), 172.13 , 172.34 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3276$ (w, br, CON-H); 3062 , 2958 , 2872 (w, =C-H, C-H); 1740 (s, O-C=O); 1682 , 1646 , 1617 (s, N-C=O); 1541 , 1497 (w, OCN-H); 1451 (m, aromat. C=C, C-H); 1242 , 1187 , 1151 (s, C-O-C); 735 , 697 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.7.6 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-[(*S*)-1-benzyl-2-(*tert*butyldimethylsilyloxy)ethyl]amid (A-12/12'**)**



Methode: D1b.

Ansatz: 208 mg (0.78 mmol) **A-05** in 15 mL Methanol, 32.9 mg (0.78 mmol) LiOH·H₂O.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 193 mg (0.74 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 193 mg (0.74 mmol) **A-05-Li** in 20 mL abs. DMF, 208 mg (0.78 mmol) **Phe-oTBDMS (Phe-ol-04)**, 0.20 mL (0.81 mmol) DPPA, 0.11 mL (0.78 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.18 / 0.20, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 67.1 mg (0.13 mmol, 18%) [**A-12**, 6.7 : 1]. – Gelbes Harz;

115 mg (0.23 mmol, 31%) [**A-12'**, 1 : 3.1]. – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = -10.83^\circ$ (c = 0.12, CHCl₃) (**A-12'**).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₄₀N₂O₂Si, 500.76; gef.: [M+Na]⁺ 524.0 (**A-12/12'**).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.00, 0.01 (2 x s, je 3 H, Si(CH₃)₂), 0.95 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 2.42-2.48, 2.87-2.93 (2 x dd, je 1 H, CH₂OSi, J = 6.1, 6.9 Hz), 2.61 (d, 1 H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.73 (d, 2 H, β-CH₂, J = 6.6 Hz), 3.12 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.72, 3.73 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 13.4 Hz), 3.75-3.82 (m, 1 H, α-CH, J = 6.1, 6.6, 6.9, 9.1 Hz), 6.56 (d, 1 H, NH, J = 9.1 Hz), 7.07-7.44 (m, 15 H, Ar-H) ppm [**A-12**, Dia1].

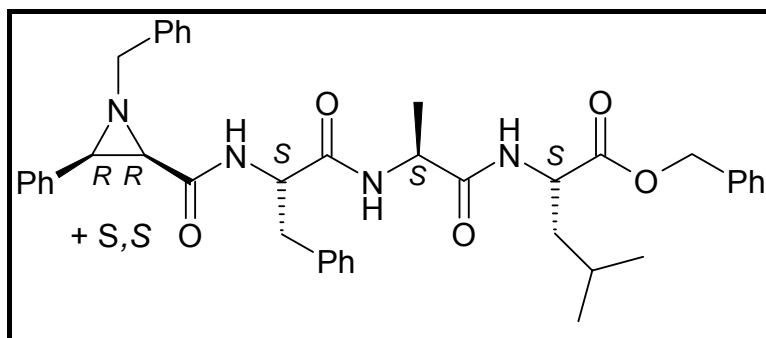
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 0.02, 0.05 (2 x s, je 3 H, Si(CH₃)₂), 0.99 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.78-1.98 (m, 2 H, β-CH₂, J = 6.6, 7.8 Hz), 2.67 (d, 1 H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 3.17 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.24-3.33 (m_c, 2 H, CH₂OSi, J = 4.5, 6.5, 7.9 Hz), 3.62, 3.87 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, J = 13.1 Hz), 3.74-3.82 (m, 1 H, α-CH, J = 6.6, 7.9, 9.1 Hz), 6.78 (d, 1 H, NH, J = 9.1 Hz), 7.03-7.43 (m, 15 H, Ar-H) ppm [**A-12'**, Dia2].

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = -5.56$ $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, 25.83 $\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$, 36.47 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.43 ($\text{Azi-}\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 47.46 ($\text{Azi-}\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 50.37 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 61.33 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OSi}$), 63.20 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 126.84, 127.28, 127.63, 127.95, 128.10, 128.35, 128.52, 129.29, 129.51 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.12, 137.77, 137.88 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}$), 166.65 ($\text{N-}\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm [**A-12**, Dia1].

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = -5.64$ $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, 25.81 $\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$, 35.66 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.18 ($\text{Azi-}\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 47.54 ($\text{Azi-}\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 50.79 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 61.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OSi}$), 63.20 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 126.84, 127.12, 127.65, 127.95, 128.07, 128.46, 128.52, 129.26, 129.47 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.11, 137.86, 138.36 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}$), 166.69 ($\text{N-}\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm [**A-12'**, Dia2].

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3393$ (w, br, CON-H); 3061, 3029, 2928 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1670 (s, $\text{N-}\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1513 (s, OCN-H); 1464, 1454, 1360 (w, aromat. $\text{C}=\text{C}$, C-H); 1252, 1115, 1050 (m, $\underline{\text{C-O-Si}}$); 834, 777 (s, O-Si); 740, 698 (s, aromat. C-H) cm^{-1} (**A-12'**).

14.7.7 (S)-2-((S)-2-((S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenylpropionylamino}propionylamino)-4-methylpentansäurebenzylester (A-13/13')



Methode: D1b.

Ansatz: 96.3 mg (0.36 mmol) **A-05** in 10 mL Methanol, 15.2 mg (0.36 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 90.0 mg (0.34 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: F2.

Ansatz: 194 mg (0.36 mmol) **Boc-Phe-Ala-LeuOBn (Tripep-01)** in 24 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-Ala-LeuOBn**·TFA wird sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 90.0 mg (0.34 mmol) **A-05-Li** in 15 mL abs. DMF, 199 mg (0.36 mmol) **Phe-Ala-LeuOBn•TFA**, 0.11 mL (0.38 mmol) DPPA, 0.10 mL (0.36 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 7 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.17 / 0.30$, Cyclohexan/EtOAc 1:2).

Ausbeute: 30.1 mg (0.04 mmol, 13%) [**A-13**, 3.3 : 1]. – Gelber Feststoff;

20.9 mg (0.03 mmol, 9%) [**A-13'**, 1 : 10.4]. – Gelbes Harz.

Schmelzpunkt: 135-138 °C (**A-13**).

$[\alpha]_D^{22} = -18.42^\circ$ (c = 0.38, CHCl₃) (**A-13**); $[\alpha]_D^{22} = -13.93^\circ$ (c = 0.28, CHCl₃) (**A-13'**).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₄₁H₄₆N₄O₅, 674.85; gef.: [M+Na]⁺ 697.8 (**A-13/13'**).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 0.88, 0.90$ (2 x d, je 3 H, δ -CH₃ [Leu], $J = 6.1$ Hz), 0.95 (d, 3 H, β -CH₃ [Ala], $J = 7.3$ Hz), 1.49-1.66 (m, zus. 3 H, γ -CH [Leu], β -CH₂ [Leu]), 2.60 (d, 1 H, Azi-CH-CO, $J = 7.1$ Hz), 2.86-3.02 (m_c, 2 H, β -CH₂, $J = 5.8, 7.1$ Hz), 3.14 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, $J = 7.1$ Hz), 3.68, 3.69 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, $J = 13.1$ Hz), 4.13-4.26 (m, zus. 2 H, α -CH [Phe], α -CH [Ala], $J = 5.8, 7.3, 8.1$ Hz), 4.39-4.46 (dt, 1 H, α -CH [Leu], $J = 6.5, 7.8$ Hz), 4.96 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 8.1$ Hz), 5.12, 5.13 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, $J = 12.4$ Hz), 6.63 (d, 1 H, NH [Leu], $J = 7.8$ Hz), 6.69 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 5.8$ Hz), 7.03-7.40 (m, 20 H, Ar-H) ppm [**A-13**, Dia1].

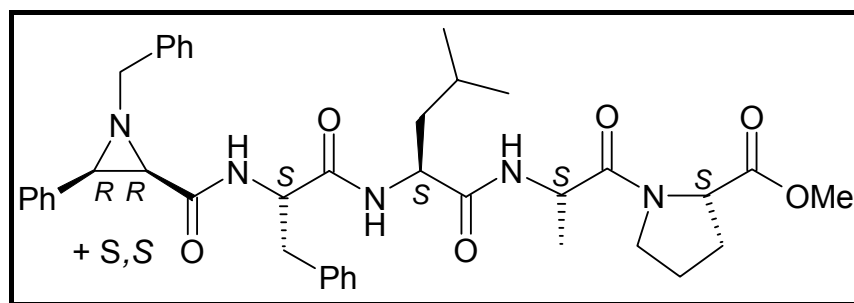
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 0.89, 0.92$ (2 x d, je 3 H, δ -CH₃ [Leu], $J = 6.3$ Hz), 1.16 (d, 3 H, β -CH₃ [Ala], $J = 7.1$ Hz), 1.42-1.61 (m, zus. 3 H, γ -CH [Leu], β -CH₂ [Leu]), 2.21-2.29, 2.44-2.50 (2 x dd, je 1 H, β -CH₂, $J = 5.8, 8.0$ Hz), 2.61 (d, 1 H, Azi-CH-CO, $J = 7.1$ Hz), 3.19 (d, 1 H, Azi-CH-Ph, $J = 7.1$ Hz), 3.65, 3.84 (2 x d, je 1 H, NCH₂Ph, $J = 13.1$ Hz), 4.02-4.10 (m, 1 H, α -CH [Phe], $J = 5.8, 7.3$ Hz), 4.22-4.33 (dt, 1 H, α -CH [Ala], $J = 7.1, 7.6$ Hz), 4.48-4.56 (dt, 1 H, α -CH [Leu], $J = 6.5, 8.0$ Hz), 5.14, 5.15 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, $J = 12.1$ Hz), 5.89 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 7.6$ Hz), 6.37 (d, 1 H, NH [Leu], $J = 8.0$ Hz), 6.78 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 7.3$ Hz), 7.03-7.41 (m, 20 H, Ar-H) ppm [**A-13'**, Dia2].

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): $\delta = 16.81$ (β -CH₃ [Ala]), 21.79, 22.87 (δ -CH₃ [Leu]), 24.74 (γ -CH [Leu]), 36.98 (β -CH₂ [Phe]), 40.61 (β -CH₂ [Leu]), 46.65 (Azi-CH-CO), 48.17 (Azi-CH-Ph), 48.34 (α -CH [Ala]), 51.08 (α -CH [Leu]), 54.44 (α -CH [Phe]), 63.07 (NCH₂Ph), 66.74 (OCH₂Ph), 126.84, 127.28, 127.58, 127.63, 127.99, 128.21, 128.28, 128.35, 128.44, 128.59, 128.97, 129.27 (Ar-CH), 134.30, 135.65, 135.86, 137.28 (Ar-C), 168.86 (N-C=O [Azi-Phe]), 169.73 (N-C=O [Phe-Ala]), 171.39 (N-C=O [Ala-Leu]), 172.23 (BnO-C=O) ppm [**A-13**, Dia1].

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 17.54 (β - CH_3 [Ala]), 21.82, 22.81 (δ - CH_3 [Leu]), 24.78 (γ - CH [Leu]), 37.08 (β - CH_2 [Phe]), 40.98 (β - CH_2 [Leu]), 45.67 (Azi- CH -CO), 47.71 (Azi- CH -Ph), 48.79 (α - CH [Ala]), 50.90 (α - CH [Leu]), 54.07 (α - CH [Phe]), 62.99 (NCH_2Ph), 66.94 (OCH_2Ph), 127.01, 127.29, 127.73, 127.85, 128.07, 128.16, 128.30, 128.53, 128.62, 128.76, 129.16, 129.54 (Ar- CH), 134.92, 135.43, 136.12, 137.56 (Ar- C), 168.14 ($\text{N}-\text{C}=\text{O}$ [Azi-Phe]), 170.04 ($\text{N}-\text{C}=\text{O}$ [Phe-Ala]), 171.15 ($\text{N}-\text{C}=\text{O}$ [Ala-Leu]), 172.30 ($\text{BnO}-\text{C}=\text{O}$) ppm [**A-13'**, Dia2].

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3271 (w, br, CONH); 3065, 2926 (w, =C-H, C-H); 1744 (m, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 1637 (s, $\text{N}-\text{C}=\text{O}$); 1519, 1493 (w, OCNH); 1451 (m, aromat. C=C, C-H); 1252, 1215, 1160 (s, C-O-C); 737, 694 (s, aromat. C-H) cm^{-1} (**A-13**).

14.7.8 (S)-1-[(S)-2-((S)-2-((S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonylamino)-3-phenylpropionylamino)-4-methylpentanoylamino)propionyl]pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (A-14**)**



Methode: D1b.

Ansatz: 110 mg (0.41 mmol) **A-05** in 25 mL Methanol, 17.3 mg (0.41 mmol) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 101 mg (0.39 mmol, 95%). – Farbloser Feststoff.

Das Lithiumsalz **A-05-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: F2.

Ansatz: 230 mg (0.41 mmol) **Boc-Phe-Leu-Ala-ProOMe** (**Tetpep-01**) in 24 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-Leu-Ala-ProOMe**•TFA wird sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 101 mg (0.39 mmol) **A-05-Li** in 20 mL abs. DMF, 236 mg (0.41 mmol) **Phe-Leu-Ala-ProOMe•TFA**, 0.12 mL (0.43 mmol) DPPA, 0.11 mL (0.41 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 2 d 0 °C, 8 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.09$, Cyclohexan/EtOAc 1:5).

Ausbeute: 118 mg (0.17 mmol, 44%; Dia1 : Dia2 = 5.3 : 1). – Gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 141-143 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -49.68^\circ$ ($c = 0.62$, CHCl_3).

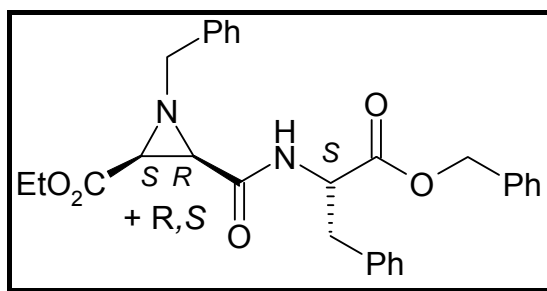
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_6$, 695.87; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 718.9.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.77\text{-}0.85$ (m, zus. 6 H, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], $J = 6.4, 6.8$ Hz), $0.97\text{-}1.07$, $1.17\text{-}1.25$, $1.40\text{-}1.48$ (3 x m, zus. 3 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Leu], $\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 1.33 (d, zus. 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], $J = 6.9$ Hz), $1.88\text{-}2.03$, $2.12\text{-}2.23$ (2 x br m, zus. 4 H, $\gamma\text{-CH}_2$ [Pro], $\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 2.61 (d, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz, Dia1) u. 2.63 (d, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz, Dia2) (zus. 1 H), $2.86\text{-}2.94$ (m, zus. 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], $J = 6.3, 7.1$ Hz), 3.13 (d, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz, Dia1) u. 3.16 (d, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz, Dia2) (zus. 1 H), $3.50\text{-}3.58$, $3.70\text{-}3.77$ (2 x m, zus. 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), $3.60\text{-}3.68$ (m, zus. 2 H, NCH_2Ph , $J = 12.9$ Hz), 3.69 (s, zus. 3 H, OCH_3), $4.11\text{-}4.18$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Leu], $J = 5.3, 8.6$ Hz), $4.20\text{-}4.26$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 5.8$ Hz), $4.47\text{-}4.57$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Pro], $J = 4.0, 8.5$ Hz), $4.57\text{-}4.66$ (m, zus. 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Ala], $J = 6.8, 7.5$ Hz), 5.08 ((br d, zus. 1 H, NH [Leu], $J = 8.6$ Hz), 6.72 (br d, zus. 1 H, NH [Phe], $J = 5.8$ Hz), 6.81 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 7.5$ Hz), $7.04\text{-}7.38$ (m, zus. 15 H, Ar- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 17.53$ ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 21.58 , 22.86 ($\delta\text{-CH}_3$ [Leu]), 24.36 ($\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 24.87 ($\gamma\text{-CH}_2$ [Pro]), 28.89 ($\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 37.53 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 40.01 ($\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 46.55 (Azi- CH-CO), 46.58 ($\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), 46.73 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 48.11 (Azi- CH-Ph), 51.32 ($\alpha\text{-CH}$ [Leu]), 52.14 (OCH_3), 54.50 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 58.77 ($\alpha\text{-CH}$ [Pro]), 63.11 (NCH_2Ph), 126.91 , 127.13 , 127.47 , 127.85 , 128.13 , 128.47 , 128.74 , 129.12 , 129.26 (Ar- CH), 135.54 , 136.01 , 137.39 (Ar- C), 168.44 (N-C=O [Azi-Pro]), 169.81 (N-C=O [Phe-Leu]), 170.59 (N-C=O [Ala-Pro]), 170.67 (N-C=O [Leu-Ala]), 172.48 (MeO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3285$ (w, br, CON-H); 3061 , 2925 , 2853 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1744 (s, O-C=O); 1631 (s, N-C=O); 1512 (w, OCN-H); 1452 (m, aromat. C=C , C-H); 1197 , 1173 (s, C-O-C); 739 , 698 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.7.9 (2S,3R)+(2R,3S)-1-Benzyl-3-((S)-1-benzyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)aziridin-2-carbonsäureethylester (A-15)



Methode: D1a.

Ansatz: 371 mg (1.34 mmol) **A-09** in 25 mL Ethanol, 53.4 mg (1.27 mmol) LiOH·H₂O.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 212 mg (0.83 mmol, 62%). – Gelbliches Harz.

Das mit seinem Edukt (**A-09**) verunreinigte Lithiumsalz **A-09-Li** wird ohne Reinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 212 mg (0.83 mmol) **A-09-Li** in 20 mL abs. DMF, 254 mg (0.87 mmol) PheOBn·HCl, 0.20 mL (0.92 mmol) DPPA, 0.15 mL (0.87 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 6 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.21, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 219 mg (0.45 mmol, 54%; Dia1 : Dia2 = 1 : 1.7). – Blassgelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = + 4.27^\circ$ (c = 1.03, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₀N₂O₅, 486.57; gef.: [M+H]⁺ 487.6.

LC-MS: R_t = 24.6 min, k' = 26.33 (94%).

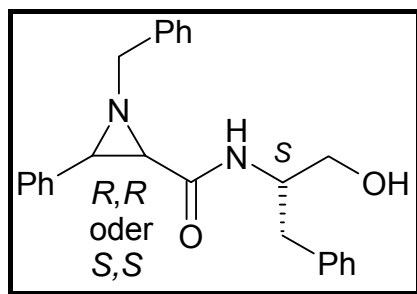
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.21 (t, CH₃, J = 7.1 Hz, Dia1) u. 1.25 (t, CH₃, J = 7.1 Hz, Dia2) (zus. 3 H), 2.55-2.63 (m, zus. 2 H, Azi-CH, J = 7.0 Hz), 2.95-3.04, 3.08-3.18 (2 x m, zus. 2 H, β-CH₂, J = 5.6, 6.3, 7.4 Hz), 3.47, 3.82 (2 x d, NCH₂Ph, J = 13.4 Hz, Dia1) u. 3.65, 3.69 (2 x d, NCH₂Ph, J = 13.6 Hz, Dia2) (zus. 2 H), 4.03-4.16 (m, zus. 2 H, OCH₂, J = 7.1 Hz), 4.76 (dt, α-CH, J = 6.3, 7.6 Hz, Dia1) u. 4.85 (dt, α-CH, J = 5.6, 7.1 Hz, Dia2) (zus. 1 H), 5.05, 5.06 (2 x d, OCH₂Ph, J = 12.1 Hz, Dia2) u. 5.11, 5.12 (2 x d, OCH₂Ph, J = 12.4 Hz, Dia1) (zus. 2 H), 6.97-7.36 (m, zus. 16 H, NH, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 13.94, 14.06 (CH₃), 38.00, 38.12 (β-CH₂), 43.85, 44.18 (Azi-CH-C(O)N), 45.13, 45.22 (Azi-CH-CO₂Et), 52.92, 53.32 (α-CH), 61.44, 61.54 (OCH₂),

62.12, 62.43 (NCH_2Ph), 66.84, 66.91 (OCH_2Ph), 126.84, 126.89, 127.57, 127.99, 128.21, 128.26, 128.34, 128.48, 128.54, 128.59, 129.20, 129.33 (Ar-CH), 135.21, 135.28, 135.85, 135.88, 136.51 (Ar-C), 165.98, 166.37 (N-C=O), 167.18, 167.28 (EtO-C=O), 170.43, 170.81 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3379 (w, br, CON-H); 3063, 3031, 2927 (w, =C-H, C-H); 1740 (s, O-C=O); 1678 (s, N-C=O); 1518, 1497 (m, OCN-H); 1452, 1381 (m, aromat. C=C, C-H); 1191, 1024 (s, C-O-C); 738, 697 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.7.10 (2*R*,3*R*) oder (2*S*,3*S*)-(1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-((*S*)-1-benzyl-2-hydroxyethyl)amid (A-16)



Methode: F5.

Ansatz: 60.5 mg (0.12 mmol) **A-12** in 10 mL THF, 70.0 mg (0.22 mmol) TBAF•3 H₂O, 2 Tropfen Eisessig.

Reaktionsdauer: 1 h 0 °C, 5 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.23, Cyclohexan/EtOAc 1:2).

Ausbeute: 43.1 mg (0.11 mmol, 93%). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = -8.70^\circ$ ($c = 0.23$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$, 386.50; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 409.7.

LC-MS: $R_t = 19.8$ min, $k' = 21.00$ (100%).

¹H-NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 2.30$ (br s, 1H, OH), 2.49-2.56, 2.67-2.73 (2 x dd, je 1 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 6.3, 6.8, 7.3$ Hz), 2.61 (d, 1 H, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz), 2.83-2.93 (m, 2 H, CH_2OH , $J = 3.8, 4.5, 7.1$ Hz), 3.17 (d, 1 H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 3.71, 3.73 (2 x d, je 1 H, NCH_2Ph , $J = 13.2$ Hz), 3.82-3.92 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 4.5, 7.3, 7.8$ Hz), 6.31 (d, 1 H, NH , $J = 7.8$ Hz), 7.05-7.42 (m, 15 H, Ar- H) ppm.

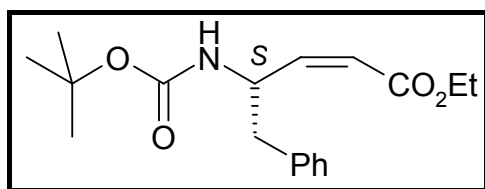
¹³C-NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 36.61$ ($\beta\text{-CH}_2$), 45.88 (Azi- CH-CO), 47.36 (Azi- CH-Ph), 51.91 ($\alpha\text{-CH}$), 63.01 (NCH_2Ph), 63.50 (CH_2OH), 126.55, 127.67, 127.86, 128.23, 128.27,

128.50, 128.62, 128.68, 129.16 (Ar-CH), 135.29, 137.22, 137.56 (Ar-C), 167.76 (N-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3571 (w, br, O-H), 3331 (w, br, CON-H); 3032, 2920, 2851 (m, =C-H, C-H); 1632 (s, N-C=O); 1531 (s, OCN-H); 1452, 1352 (w, arom. C=C, C-H); 749, 696 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.8 AS- / Peptid-verknüpfte Z-Olefine

14.8.1 (Z)-(S)-4-*tert*Butoxycarbonylamino-5-phenylpent-2-ensäureethylester (Z-OI-01)



Methode: C2.

Ansatz: 470 mg (1.47 mmol) Ethyl(diphenylphosphono)acetat^[164] in 10 mL abs. THF, 264 mg (1.76 mmol) NaI, 0.22 mL (1.47 mmol) DBU, 366 mg (1.47 mmol) Boc-Phe-CHO^[111] in 3 mL abs. THF.

Reaktionsdauer: 30 min 0 °C, 3 h – 78 °C, 2 h – 78 °C auf 0 °C, 2 h 0 °C.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.49, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 249 mg (0.78 mmol, 53%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 118-120 °C.

$[\alpha]_D^{23} = +68.73^\circ$ (c = 1.02, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4$, 319.40; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 342.4.

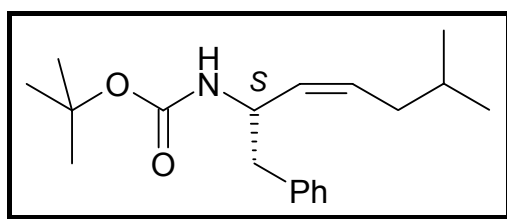
LC-MS: R_t = 22.8 min, k' = 24.33 (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.28 (t, 3 H, CH_3 , J = 7.1 Hz), 1.36 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.88-2.97 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$), 4.16 (q, 2 H, OCH_2 , J = 7.1 Hz), 4.76 (br s, 1 H, NH), 5.32 (br t, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 5.79 (d, 1 H, $=\text{CH-CO}_2\text{Et}$, J = 11.6 Hz), 6.16 (m, 1 H, $=\text{CH-CH}$), 7.10-7.32 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 14.22 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.28 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 40.19 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 50.58 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 60.23 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 79.42 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 119.75 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2\text{Et}$), 126.63, 128.44, 129.49 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.80 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}$), 150.01 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}$), 155.22 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$ [Boc]), 165.69 ($\text{EtO}-\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3353 (m, $\text{CON}-\underline{\text{H}}$); 3061, 3031, 2978, 2928 (w, $=\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$); 1713 (s, $\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1686 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1622 (s, $\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}-\text{C}=\text{O}$); 1528 (s, $\text{OCN}-\underline{\text{H}}$); 1452, 1352 (w, arom. $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$); 1231, 1166, 1010 (s, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 702, 649 (s, arom. $\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

14.8.2 ((*Z*)-(*S*)-1-Benzyl-5-methylhex-2-enyl)carbaminsäure *tert*butylester (*Z*-OI-02)



Methode: C3.

Ansatz: 590 mg (1.42 mmol) Isoamyltriphenylphosphoniumbromid in 15 mL abs. THF, 185 mg (1.65 mmol) KO^tBu , 273 mg (1.10 mmol) Boc-Phe-CHO^[111] in 3 mL abs. THF.

Reaktionsdauer: 3 h – 10 °C; 3 h – 10 °C, 15 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.46, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 104 mg (0.34 mmol, 31%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 58-59 °C.

$[\alpha]_D^{23}$ = - 2.00 ° (c = 1.00, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_2$, 303.45; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.5.

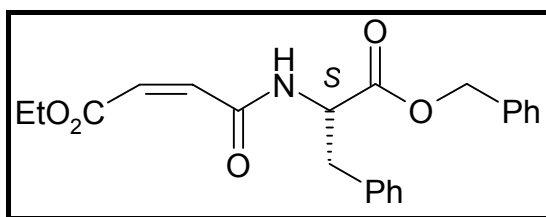
LC-MS: R_t = 28.2 min, k' = 30.33 (97%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.79, 0.83 (2 x d, je 3 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, J = 6.6 Hz), 1.43 (s, 9 H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 1.44-1.52 (m, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$, J = 6.0, 6.6 Hz), 1.82, 1.90 (2 x dd, je 1 H, $=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, J = 6.0, 7.6 Hz), 2.72-2.92 (m_c , 2 H, β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, J = 7.8 Hz), 4.44 (br s, 1 H, $\underline{\text{N}}\text{H}$), 4.60 (br s, 1 H, α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 5.24 (m_c , 1 H, $=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}$, J = 10.8 Hz), 5.44 (m_c , 1 H, $=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$, J = 7.6, 10.8 Hz), 7.17-7.30 (m, 5 H, $\text{Ar}-\underline{\text{H}}$) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 22.18, 22.27 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 28.32 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 28.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_3$), 36.61 ($=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 42.10 (β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 49.22 (α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 79.17 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 126.24, 128.14, 129.69 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}\text{H}$), 129.59 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}$), 131.54 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 137.72 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}$), 154.95 ($\text{C}=\text{O}$ [Boc]) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3371 (m, CON-H); 3059, 3025, 2955, 2927 (w, =C-H, C-H); 1686 (s, N-C=O); 1528 (s, OCN-H); 1452, 1352 (w, aromat. C=C, C-H); 1231, 1166, 1010 (s, C-O-C); 700, 649 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.3 (Z)-3-((S)-1-Benzylloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acrylsäure-ethylester (Z-OI-03)



Methode: G1.

Ansatz: 1.44 g (10.0 mmol) **Mal-02** in 30 mL abs. THF, 1.01 mL (10.0 mmol) NMM, 1.30 mL (10.0 mmol) IBCF, 2.92 g (10.0 mmol) PheOBn•HCl u. 1.39 mL (10.0 mmol) TEA in 20 mL DMF.

Reaktionsdauer: 1 h – 15 °C; 2 h 0 °C, 15 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.31, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 2.06 g (5.39 mmol, 54%). – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 69-71 °C.

$[\alpha]_D^{23} = + 11.07^\circ$ (c = 1.50, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, 381.43; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 404.4.

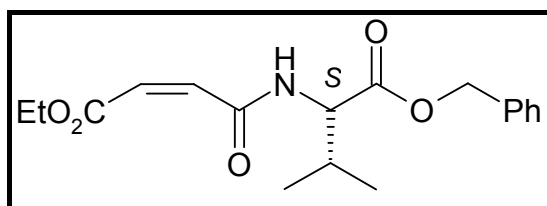
LC-MS: R_t = 21.0 min, k' = 22.33 (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.28 (t, 3 H, CH_3 , J = 7.1 Hz), 3.11-3.22 (m_c, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, J = 6.3 Hz), 4.19 (q, 2 H, OCH_2 , J = 7.1 Hz), 4.91-4.96 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, J = 6.3, 7.3 Hz), 5.12, 5.13 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , J = 12.1 Hz), 6.14 (d, 1 H, = CH-C(O)N , J = 12.9 Hz), 6.24 (d, 1 H, = $\text{CH-CO}_2\text{Et}$, J = 12.9 Hz), 7.09-7.33 (m, 10 H, Ar- H), 8.61 (d, 1 H, NH , J = 7.3 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 13.96 (CH_3), 37.83 ($\beta\text{-CH}_2$), 53.98 ($\alpha\text{-CH}$), 61.60 (OCH_2), 67.10 (OCH_2Ph), 126.33 (=CH-C(O)N), 126.90, 127.11, 128.35, 128.39, 128.50, 129.34 (Ar- CH), 135.16, 135.91 (Ar- C), 137.12 (=CH-CO₂Et), 163.51 (N- C=O), 165.85 (EtO- C=O), 171.07 (BnO- C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3378 (m, CON-H); 3056, 3030, 2973 (w, =C-H, C-H); 1730 (s, O-C=O); 1658 (s, N-C=O); 1632 (s, C=C-C=O); 1518 (s, OCN-H); 1451, 1347 (w, aromat. C=C, C-H); 1241, 1178, 1032 (s, C-O-C); 751, 700 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.4 (Z)-3-((S)-1-Benzylloxycarbonyl-2-methylpropylcarbamoyl)acrylsäure-ethylester (Z-OI-04)



Methode: G1.

Ansatz: 1.44 g (10.0 mmol) **Mal-02** in 30 mL abs. THF, 1.01 mL (10.0 mmol) NMM, 1.30 mL (10.0 mmol) IBCF, 2.07 g (10.0 mmol) ValOBn in 10 mL DMF.

Reaktionsdauer: 1 h – 15 °C; 2 h 0 °C, 18 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.31, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 1.26 g (3.78 mmol, 38%). – Blassgelbes Harz.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 23.33 ° (c = 1.50, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, 333.39; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 356.3.

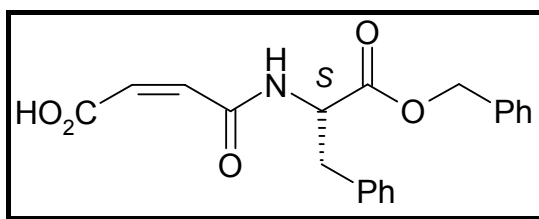
LC-MS: R_t = 19.0 min, k' = 20.11 (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.94, 0.95 (2 x d, je 3 H, $\gamma\text{-CH}_3$, J = 7.1 Hz), 1.29 (t, 3 H, CH_3 , J = 7.3 Hz), 2.26 (dq, 1 H, $\beta\text{-CH}$, J = 4.8, 7.1 Hz), 4.22 (q, 2 H, OCH_2 , J = 7.3 Hz), 4.61 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, J = 4.8, 8.1 Hz), 5.16, 5.18 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , J = 12.1 Hz), 6.16 (d, 1 H, = CH-C(O)N , J = 13.1 Hz), 6.30 (d, 1 H, = $\text{CH-CO}_2\text{Et}$, J = 13.1 Hz), 7.30-7.35 (m, 5 H, Ar- H), 8.88 (d, 1 H, NH , J = 8.1 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 13.95 (CH_3), 17.72, 18.98 ($\gamma\text{-CH}_3$), 31.06 ($\beta\text{-CH}$), 57.81 ($\alpha\text{-CH}$), 61.65 (OCH_2), 66.84 (OCH_2Ph), 125.92 (=CH-C(O)N), 128.24, 128.31, 128.49 (Ar- CH), 135.48 (Ar- C), 137.93 (=CH-CO₂Et), 163.78 (N-C=O), 166.07 (EtO-C=O), 171.39 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3291 (m, br, CON-H); 3065, 3036, 2967 (w, =C-H, C-H); 1731 (s, O-C=O); 1665 (s, N-C=O); 1622 (s, C=C-C=O); 1536 (s, OCN-H); 1456, 1387 (w, aromat. C=C, C-H); 1207, 1180, 1145, 1026 (s, C-O-C); 748, 698 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.5 (Z)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acrylsäure (Z-OI-05)



Methode: C1.

Ansatz: 600 mg (6.12 mmol) Maleinsäureanhydrid u. 1.78 g (6.12 mmol) PheOBn•HCl in 30 mL Dichlormethan, 1.70 mL (12.4 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 1 d RT.

Ausbeute: 1.41 g (4.01 mmol, 66%). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{23} = +78.40^\circ$ (c = 1.50, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₀H₁₉NO₅, 353.38; gef.: [M+Na]⁺ 376.2

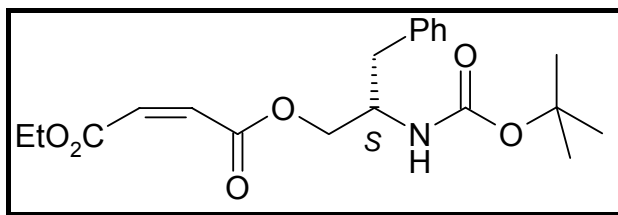
LC-MS: R_t = 19.0 min, k' = 20.11 (98%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 3.15-3.27 (m_c, 2 H, β-CH₂, J = 6.0 Hz), 4.92-4.97 (dt, 1 H, α-CH, J = 6.0, 7.6 Hz), 5.19, 5.20 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.1 Hz), 6.25 (d, 1 H, =CH-C(O)N, J = 12.9 Hz), 6.28 (d, 1 H, =CH-CO₂H, J = 12.9 Hz), 7.00-7.31 (m, 11 H, Ar-H, CO₂H), 7.50 (d, 1 H, NH, J = 7.6 Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 37.19 (β-CH₂), 54.26 (α-CH), 67.86 (OCH₂Ph), 127.44, 128.63, 128.70, 128.74, 128.79, 129.16 (Ar-CH), 130.32 (=CH-C(O)N), 134.55, 134.80 (Ar-C), 137.01 (=CH-CO₂H), 164.77 (N-C=O), 165.59 (HO-C=O), 170.11 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3450 (w, br, O-H); 3252 (m, CON-H); 3063, 3033, 2956 (w, =C-H, C-H); 1742 (s, O-C=O); 1709 (s, N-C=O); 1632 (s, C=C-C=O); 1546, 1495 (s, OCN-H); 1454, 1349 (w, arom. C=C, C-H); 1214, 1178, 1107 (s, C-O-C); 850 (m, C-OH); 742, 697 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

14.8.6 (Z)-But-2-endisäure-[(S)-2-tertbutoxycarbonylamino-3-phenylpropylester]-ethylester (Z-OI-07)



Methode: G4.

Ansatz: 494 mg (3.43 mmol) **Mal-02** u. 861 mg (3.43 mmol) **Phe-ol-02** in 30 mL abs. Dichlormethan, 42 mg (0.34 mmol) DMAP, 778 mg (3.77 mmol) DCC.

Reaktionsdauer: 30 min 0 °C, 16 h RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.15$, Cyclohexan/EtOAc 6:1).

Ausbeute: 571 mg (1.51 mmol, 44%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 69-71 °C.

$[\alpha]_D^{23} = -9.93^\circ$ ($c = 1.50$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_6$, 377.44; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 400.5.

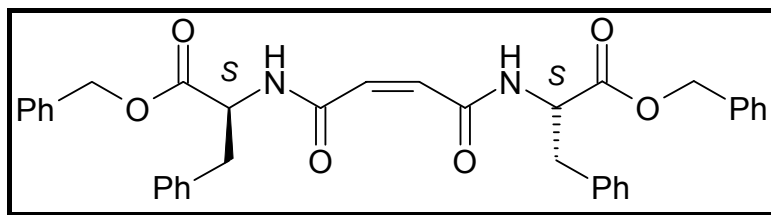
LC-MS: $R_t = 22.0$ min, $k' = 23.44$ (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.32$ (t, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, $J = 7.0$ Hz), 1.43 (s, 9 H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.79-2.94 (m, 2 H, $\beta\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 4.10-4.15 (m, 2 H, $\alpha\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}$), 4.26-4.31 (br q, 3 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$, $J = 7.0$ Hz, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}$), 5.03 (br s, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$), 6.28 (d, 1 H, $=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $J = 12.1$ Hz), 6.29 (d, 1 H, $=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$, $J = 12.1$ Hz), 7.21-7.33 (m, 5 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 14.01$ ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 28.30 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 37.80 ($\beta\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 50.93 ($\alpha\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 61.39 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$), 65.51 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}$), 79.37 ($\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 126.56, 128.51, 129.28 (Ar- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 129.42 ($=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 130.17 ($=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$), 137.37 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 155.22 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$ [Boc]), 165.06 ($\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 165.10 ($\text{EtO}-\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3370$ (m, $\text{CON-}\underline{\text{H}}$); 2980, 2932 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1724 (s, $\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1688 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1628 (s, $\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}\text{-C=O}$); 1515 (s, $\text{OCN-}\underline{\text{H}}$); 1446, 1366 (w, aromat. $\text{C}=\text{C}$, C-H); 1249, 1217, 1163, 1026 (s, C-O-C); 752, 700 (w, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.7 (S)-2-[(Z)-3-((S)-1-Benzyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acryloyl-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (Z-OI-08)



Methode: G3.

Ansatz: 354 mg (1.00 mmol) **Z-OI-05**, 292 mg (1.00 mmol) PheOBn•HCl u. 521 mg (1.00 mmol) PyBOP in 10 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.52 mL (3.00 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.25$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 175 mg (0.30 mmol, 30%). – Blassgelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = +57.53^\circ$ ($c = 0.73$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$, 590.68; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 613.7.

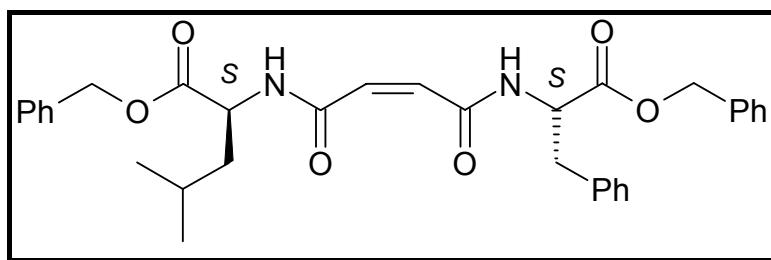
LC-MS: $R_t = 25.6$ min, $k' = 27.44$ (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 3.10\text{-}3.21$ (m_c , 4 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 6.3$ Hz), 4.88-4.93 (dt, 2 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 6.3, 7.0$ Hz), 5.15, 5.16 (2 x d, 4 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.06 (s, 2 H, $=\text{CH-C(O)N}$), 7.08-7.34 (m, 20 H, Ar-H), 8.51 (d, 2 H, NH, $J = 7.0$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 37.61$ ($\beta\text{-CH}_2$), 54.02 ($\alpha\text{-CH}$), 67.22 (OCH_2Ph), 127.00, 128.44, 128.54, 129.29 (Ar-CH), 132.43 ($=\text{CH-C(O)N}$), 135.07, 135.78 (Ar-C), 164.00 (N-C=O), 170.96 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3250$ (m, CON-H); 3031, 2955 (w, =C-H, C-H); 1740 (s, O-C=O); 1671 (s, N-C=O); 1616 (s, C=C-C=O); 1537 (s, OCN-H); 1454, 1347 (w, arom. C=C, C-H); 1260, 1173 (s, C-O-C); 740, 696 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.8.8 (S)-2-[(Z)-3-((S)-1-Benzyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acryloyl-amino]-4-methylpentansäurebenzylester (Z-OI-09)



Methode: G3.

Ansatz: 375 mg (1.06 mmol) **Z-OI-05**, 417 mg (1.06 mmol) LeuOBn•pTos u. 552 mg (1.06 mmol) PyBOP in 10 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.55 mL (3.18 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 3 h 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.24$, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 169 mg (0.30 mmol, 29%). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = + 27.80^\circ$ ($c = 0.50$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$, 556.66; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 579.7.

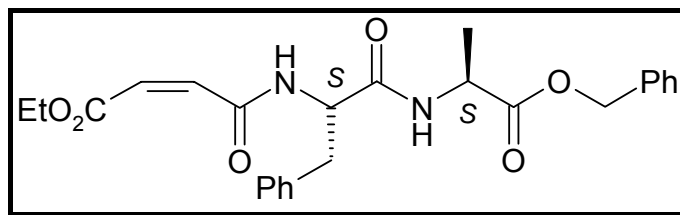
LC-MS: $R_t = 26.2$ min, $k' = 28.11$ (97%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.94, 0.96$ (2 x d, je 3 H, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], $J = 5.8$ Hz), 1.64-1.73 (m, 3 H, $\gamma\text{-CH}$ [Leu], $\beta\text{-CH}_2$ [Leu], $J = 5.8, 7.4$ Hz), 3.09-3.21 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], $J = 6.5$ Hz), 4.65-4.70 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Leu], $J = 7.4, 7.6$ Hz), 4.89-4.94 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 6.5, 7.4$ Hz), 5.15, 5.17 (2 x d, 4 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.08 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Phe], $J = 13.4$ Hz), 6.11 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Leu], $J = 13.4$ Hz), 7.06-7.35 (m, 15 H, Ar-H), 8.19 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 7.4$ Hz), 8.84 (d, 1 H, NH [Leu], $J = 7.6$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 21.92, 22.78$ ($\delta\text{-CH}_3$ [Leu]), 24.87 ($\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 37.62 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 41.03 ($\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 51.43 ($\alpha\text{-CH}$ [Leu]), 53.98 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 66.97 (OCH_2Ph [Phe]), 67.27 (OCH_2Ph [Leu]), 127.02, 128.13, 128.24, 128.31, 128.47, 128.49, 128.52, 128.55, 129.27 (Ar-CH), 131.46 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Phe]), 133.43 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Leu]), 135.03, 135.45, 135.70 (Ar-C), 164.09 (N-C=O [Leu]), 164.21 (N-C=O [Phe]), 170.93 (BnO-C=O [Phe]), 172.39 (BnO-C=O [Leu]) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3258$ (m, CON-H); 3033, 2958 (w, =C-H, C-H); 1741 (s, O-C=O); 1671 (s, N-C=O); 1616 (s, C=C-C=O); 1539 (s, OCN-H); 1452, 1347 (w, aromat. C=C, C-H); 1267, 1175, 1152 (s, C-O-C); 740, 696 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.9 (Z)-3-[(S)-1-((S)-1-Benzoyloxyethylcarbamoyl)-2-phenylethylcarbamoyl]acrylsäureethylester (Z-OI-10)



Methode: F2.

Ansatz: 495 mg (1.16 mmol) **Boc-Phe-AlaOBn (Dipep-01)** in 36 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-AlaOBn•TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 167 mg (1.16 mmol) **Mal-02**, 513 mg (1.16 mmol) **Phe-AlaOBn•TFA** u. 604 mg (1.16 mmol) PyBOP in 20 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.60 mL (3.49 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 4 h 0 °C, 7 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.21$, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 298 mg (0.66 mmol, 57%). – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 73-75 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -41.73^\circ$ ($c = 1.04$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$, 452.51; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 475.4.

LC-MS: $R_t = 19.3$ min, $k' = 20.44$ (94%).

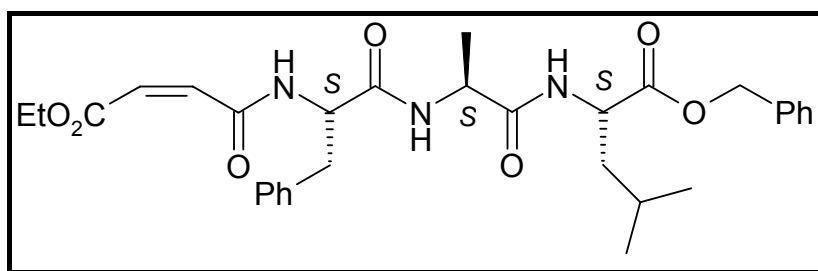
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.27$ (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.37 (d, 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], $J = 7.1$ Hz), 3.13-3.22 (m_c , 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], $J = 7.1$ Hz), 4.18 (q, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 4.53-4.60 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Ala], $J = 7.1, 7.3$ Hz), 4.75-4.80 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 7.1, 8.1$ Hz), 5.14, 5.15 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.11 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$, $J = 12.7$ Hz), 6.28 (d, 1 H, $=\text{CH-CO}_2\text{Et}$, $J = 12.7$ Hz), 6.96 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 7.3$ Hz), 7.19-7.39 (m, 10 H, Ar-H), 7.94 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 8.1$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 13.90$ (CH_3), 17.82 ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 37.45 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 48.31 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 54.67 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 61.57 (OCH_2), 66.90 (OCH_2Ph), 125.59 ($=\text{CH-C(O)N}$), 126.83, 127.11, 128.04, 128.26, 128.49, 129.27 (Ar-CH), 135.43, 136.61 (Ar-C),

137.41 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2\text{Et}$), 164.21 ($\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$ [OI-Phe]), 165.68 ($\text{EtO}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 170.13 ($\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$ [Phe-Ala]), 172.09 ($\text{BnO}-\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3251 (m, $\text{CON}-\text{H}$); 3066, 2983 (w, $=\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{H}$); 1733 (s, $\text{O}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1647 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1630 (s, $\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}-\text{C}=\text{O}$); 1555 (s, $\text{OCN}-\text{H}$); 1455, 1385 (w, arom. $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$); 1229, 1186, 1153 (s, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 731, 696 (s, arom. $\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

14.8.10 (S)-2-((S)-2-[(S)-2-((Z)-3-Ethoxycarbonylacryloylamino)-3-phenylpropionylamino]propionylamino)-4-methylpentansäurebenzylester (Z-OI-11)



Methode: F2.

Ansatz: 275 mg (0.51 mmol) **Boc-Phe-Ala-LeuOBn (Tripep-01)** in 30 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-Ala-LeuOBn•TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 74.0 mg (0.51 mmol) **Mal-02**, 282 mg (0.51 mmol) **Phe-Ala-LeuOBn•TFA** u. 265 mg (0.51 mmol) PyBOP in 20 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.26 mL (1.53 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C, 4 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.27, Cyclohexan/EtOAc 1:2).

Ausbeute: 117 mg (0.21 mmol, 42%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 145-147 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -39.14^\circ$ (c = 0.35, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7$, 565.67; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 588.7.

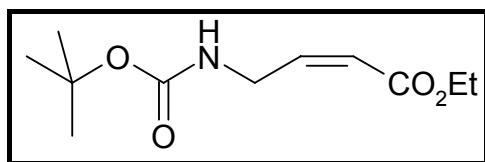
LC-MS: R_t = 21.6 min, k' = 23.00 (95%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 0.83, 0.85 (2 x d, je 3 H, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], J = 6.3 Hz), 1.27 (t, 3 H, CH_3 , J = 7.1 Hz), 1.36 (d, 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], J = 7.3 Hz), 1.52-1.66 (m, 3 H, $\gamma\text{-CH}$ [Leu], $\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 3.11-3.29 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], J = 7.1 Hz), 4.15 (q, 2 H, OCH_2 , J = 7.1 Hz), 4.51-4.61 (m, 2 H, $\alpha\text{-CH}$ [Ala], $\alpha\text{-CH}$ [Leu], J = 7.3, 7.8, 8.1 Hz), 4.62-4.67 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], J = 6.3, 7.1 Hz), 5.15, 5.16 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , J = 12.4 Hz), 6.08 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$, J = 12.4 Hz), 6.36 (d, 1 H, $=\text{CH-CO}_2\text{Et}$, J = 12.4 Hz), 6.92 (d, 1 H, NH [Leu], J = 8.1 Hz), 6.97 (d, 1 H, NH [Phe], J = 6.3 Hz), 7.19-7.40 (m, 10 H, Ar-H), 7.57 (d, 1 H, NH [Ala], J = 7.8 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 13.87 (CH_3), 17.08 ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 21.53, 22.83 ($\delta\text{-CH}_3$ [Leu]), 24.67 ($\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 36.84 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 40.60 ($\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 49.06 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 50.97 ($\alpha\text{-CH}$ [Leu]), 55.31 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 61.76 (OCH_2), 66.82 (OCH_2Ph), 124.54 ($=\text{CH-C(O)N}$), 127.18, 128.05, 128.12, 128.21, 128.46, 129.05 (Ar-CH), 135.59, 136.10 (Ar-C), 138.17 ($=\text{CH-CO}_2\text{Et}$), 165.59 (EtO-C=O), 165.97 (N-C=O [Ol-Phe]), 170.49 (N-C=O [Phe-Ala]), 172.03 (N-C=O [Ala-Leu]), 172.49 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3281 (m, CON-H); 3068, 2924 (w, =C-H, C-H); 1727 (s, O-C=O); 1688 (m, N-C=O); 1628 (s, C=C-C=O); 1550, 1519 (m, OCN-H); 1451, 1382 (w, arom. C=C, C-H); 1237, 1161 (s, C-O-C); 723, 694 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.8.11 (Z)-4-tertButoxycarbonylaminobut-2-ensäureethylester (Z-OI-12)



Methode: C2.

Ansatz: 1.15 g (3.59 mmol) Ethyl(diphenylphosphono)acetat^[164] in 25 mL abs. THF, 647 mg (4.32 mmol) NaI, 0.60 mL (3.95 mmol) DBU, 629 mg (3.95 mmol) Boc-Gly-CHO^[111] in 3 mL abs. THF.

Reaktionsdauer: 30 min 0 °C, 3 h – 78 °C, 2 h – 78 °C auf 0 °C, 2 h 0 °C.

SC (Kieselgel 60, Cyclohexan/EtOAc 10:1; R_f = 0.34, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 381 mg (1.66 mmol, 42%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 48-50 °C.

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, 229.28; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 252.2.

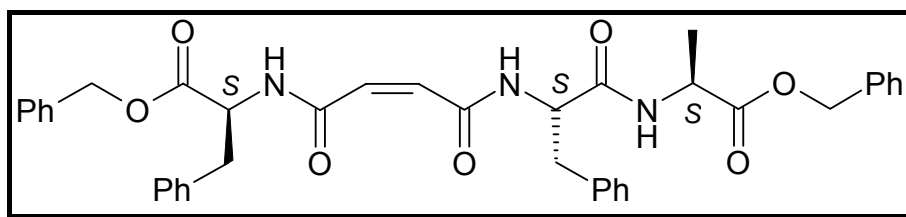
LC-MS: R_t = 18.2 min, k' = 19.22 (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.26 (t, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, J = 7.1 Hz), 1.42 (s, 9 H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 4.14 (q, 2 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$, J = 7.1 Hz), 4.22 (br t, 2 H, $=\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{N}$, J = 5.8 Hz), 4.98 (br s, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$), 5.79 (d, 1 H, $=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$, J = 11.6 Hz), 6.22-6.28 (m, 1 H, $=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2\text{N}$, J = 5.8, 11.6 Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 14.19 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.35 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 30.39 ($=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2\text{N}$), 60.22 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 79.55 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 115.31 ($=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$), 147.11 ($=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2\text{N}$), 155.91 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$ [Boc]), 166.00 ($\text{EtO-}\underline{\text{C}}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3325 (m, $\text{CON-}\underline{\text{H}}$); 2980, 2927 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1712 (s, $\text{O-}\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1680 (s, $\text{N-}\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1645 (m, $\underline{\text{C}}=\text{C-}\underline{\text{C}}=\text{O}$); 1538 (s, $\text{OCN-}\underline{\text{H}}$); 1232, 1163, 1030 (s, C-O-C); 809, 666 cm^{-1} .

14.8.12 (S)-2-((Z)-3-[(S)-1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl)ethylcarbamoyl]-2-phenylethylcarbamoyl)acryloylamino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (Z-OI-13)



Methode: F2.

Ansatz: 235 mg (0.55 mmol) **Boc-Phe-AlaOBn (Dipep-01)** in 24 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 1 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-AlaOBn·TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 211 mg (0.55 mmol) **Z-OI-05**, 242 mg (0.55 mmol) **Phe-AlaOBn·TFA** u. 286 mg (0.55 mmol) PyBOP in 20 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.28 mL (1.65 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.09, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 147 mg (0.22 mmol, 40%). – Gelbes Harz.

$[\alpha]_D^{22} = + 1.28^\circ$ (c = 0.47, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7$, 661.76; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 684.7.

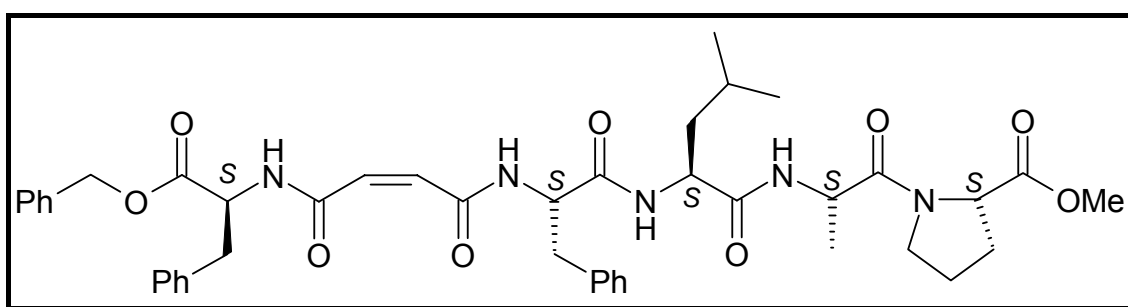
LC-MS: $R_t = 23.7$ min, $k' = 25.33$ (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.35$ (d, 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], $J = 7.3$ Hz), 3.08-3.18 (m_c , 4 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe], $J = 6.0, 6.8$ Hz), 4.51-4.58 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Ala], $J = 7.1, 7.3$ Hz), 4.67-4.74 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 6.8, 7.8$ Hz), 4.84-4.91 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe] (Phe-Ala), $J = 6.0, 7.3$ Hz), 5.13, 5.15 (2 x d, 4 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.03 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Phe-Ala], $J = 13.2$ Hz), 6.08 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Phe], $J = 13.2$ Hz), 6.81 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 7.3$ Hz), 7.16-7.40 (m, 20 H, Ar-H), 7.94 (d, 1 H, NH [Phe] (Phe-Ala), $J = 7.3$ Hz), 8.41 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 7.8$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 17.98$ ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 37.59, 37.64 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 48.37 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 53.90 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 54.88 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe] (Phe-Ala)), 67.01, 67.37 (OCH_2Ph), 126.83, 126.90, 127.09, 127.11, 128.04, 128.07, 128.11, 128.34, 128.53, 128.56, 128.60, 129.30 (Ar-CH), 130.68 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Phe-Ala]), 133.61 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Phe]), 134.95, 135.38, 135.59, 136.63 (Ar-C), 163.90 (N-C=O [OI-Phe]), 164.38 (N-C=O [OI-Phe-Ala]), 170.11 (N-C=O [Phe-Ala]), 170.96 (BnO-C=O [Phe]), 172.15 (BnO-C=O [Ala]) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3273$ (m, CON-H); 3063, 3032, 2929 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1741 (s, O-C=O); 1658 (s, N-C=O); 1621 (s, C=C-C=O); 1536, 1497 (s, OCN-H); 1452, 1385 (w, aromat. C=C , C-H); 1260, 1191, 1155 (s, C-O-C); 740, 696 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.13 (S)-1-[(S)-2-((S)-2-((S)-2-[(Z)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethyl-carbamoyl)acryloylamino]-3-phenylpropionylamino)-4-methylpentanoylamino)propionyl]pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (Z-OI-14)



Methode: F2.

Ansatz: 224 mg (0.40 mmol) **Boc-Phe-Leu-Ala-ProOMe (Tetpep-01)** in 24 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 2 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Phe-Leu-Ala-ProOMe•TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 153 mg (0.40 mmol) **Z-OI-05**, 230 mg (0.40 mmol) **Phe-Leu-Ala-ProOMe-TFA** u. 209 mg (0.40 mmol) PyBOP in 20 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.21 mL (1.20 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C, 7 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.09$, EtOAc).

Ausbeute: 178 mg (0.22 mmol, 55%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 165-167 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -36.44^\circ$ ($c = 0.45$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_9$, 795.94; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 819.0.

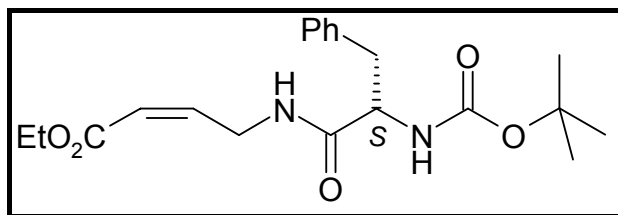
LC-MS: $R_t = 21.3$ min, $k' = 22.67$ (94%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 0.83, 0.85$ (2 x d, je 3 H, $\delta\text{-CH}_3$ [Leu], $J = 6.1$ Hz), 1.29 (d, 3 H, $\beta\text{-CH}_3$ [Ala], $J = 7.1$ Hz), 1.46-1.63 (m, 3 H, $\gamma\text{-CH}$ [Leu], $\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 1.93-2.04, 2.16-2.28 (2 x m, 4 H, $\gamma\text{-CH}_2$ [Pro], $\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 3.03-3.19 (m, 4 H, $\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 3.58-3.62 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), 3.66 (s, 3 H, OCH_3), 4.47-4.52 (dd, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Pro], $J = 4.5, 8.3$ Hz), 4.55-4.64 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Leu], $J = 6.6, 8.3$ Hz), 4.69-4.79 (m, 2 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe] (Phe-Leu), $\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 4.81-4.88 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$ [Phe], $J = 6.6, 7.3$ Hz), 5.11, 5.13 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.4$ Hz), 6.07 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Phe-Leu], $J = 13.1$ Hz), 6.23 (d, 1 H, $=\text{CH-C(O)N}$ [Phe], $J = 13.1$ Hz), 7.11 (d, 1 H, NH [Leu], $J = 8.3$ Hz), 7.16-7.37 (m, 15 H, Ar-H), 7.58 (d, 1 H, NH [Ala], $J = 7.9$ Hz), 8.24 (d, 1 H, NH [Phe] (Phe-Leu), $J = 7.6$ Hz), 8.95 (d, 1 H, NH [Phe], $J = 7.3$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 17.69$ ($\beta\text{-CH}_3$ [Ala]), 21.94, 22.79 ($\delta\text{-CH}_3$ [Leu]), 24.64 ($\gamma\text{-CH}$ [Leu]), 24.84 ($\gamma\text{-CH}_2$ [Pro]), 28.92 ($\beta\text{-CH}_2$ [Pro]), 37.71, 37.76 ($\beta\text{-CH}_2$ [Phe]), 41.08 ($\beta\text{-CH}_2$ [Leu]), 46.52 ($\alpha\text{-CH}$ [Ala]), 46.91 ($\delta\text{-CH}_2$ [Pro]), 51.86 ($\alpha\text{-CH}$ [Leu]), 52.18 (OCH_3), 54.06 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe]), 54.90 ($\alpha\text{-CH}$ [Phe] (Phe-Leu)), 58.81 ($\alpha\text{-CH}$ [Pro]), 67.16 (OCH_2Ph), 126.89, 126.92, 127.11, 128.31, 128.36, 128.40, 128.50, 129.23, 129.29 (Ar-CH), 131.61 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Phe-Leu]), 132.49 ($=\text{CH-C(O)N}$ [Phe]), 135.06, 135.87, 136.35 (Ar-C), 163.94 (N-C=O [OI-Phe]), 165.13 (N-C=O [OI-Phe-Leu]), 170.44 (N-C=O [Phe-Leu]), 171.02 (BnO-C=O), 171.05 (N-C=O [Leu-Ala]), 171.33 (N-C=O [Ala-Pro]), 172.26 (MeO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3277$ (m, CON-H); 3030, 2954, 2928 (w, =C-H, C-H); 1745 (s, O-C=O); 1658 (s, N-C=O); 1618 (s, C=C-C=O); 1536 (s, br, OCN-H); 1455 (w, aromat. C=C, C-H); 1257, 1171 (s, C-O-C); 741, 696 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.8.14 (Z)-4-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-phenylpropionylamino)but-2-ensäureethylester (Z-OI-15)



Methode: F2.

Ansatz: 170 mg (0.74 mmol) **Z-OI-12** in 24 mL Dichlormethan / TFA (5 / 1).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 1 h RT.

Die Boc-entschützte Verbindung **Z-OI-12(-Boc)•TFA** wird sofort weiter nach Methode G3 umgesetzt.

Methode: G3.

Ansatz: 179 mg (0.74 mmol) **Z-OI-12(-Boc)•TFA**, 196 mg (0.74 mmol) Boc-PheOH u. 385 mg (0.74 mmol) PyBOP in 22 mL Dichlormethan / DMF (1 / 1), 0.38 mL (2.22 mmol) DIEA.

Reaktionsdauer: 5 h 0 °C, 3 d RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.10$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 167 mg (0.44 mmol, 59%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 115-116 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -0.53^\circ$ (c = 0.75, CHCl₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₈N₂O₅, 376.46; gef.: [M+Na]⁺ 399.4.

LC-MS: $R_t = 19.5$ min, $k' = 20.67$ (99%).

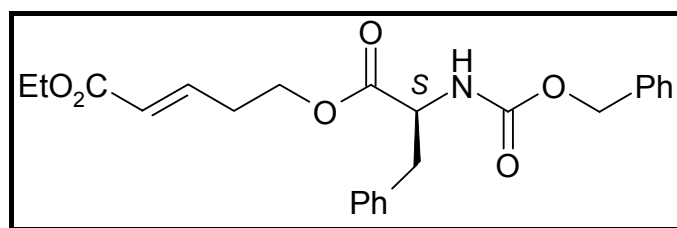
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 1.29$ (t, 3 H, CH₃, $J = 7.1$ Hz), 1.41 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.01-3.12 (m, 2 H, β -CH₂, $J = 6.6, 8.4$ Hz), 4.15 (q, 2 H, OCH₂, $J = 7.1$ Hz), 4.26-4.38 (m, 3 H, α -CH, =CH-CH₂N), 5.13 (br s, 1 H, NH [Boc]), 5.79 (d, 1 H, =CH-CO₂Et, $J = 11.3$ Hz), 6.02-6.11 (m, 1 H, =CH-CH₂N, $J = 5.3, 11.3$ Hz), 6.42 (br s, 1 H, NH), 7.17-7.33 (m, 5 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 14.14$ (CH₃), 28.23 (C(CH₃)₃), 37.75 (=CH-CH₂N), 38.77 (β -CH₂), 55.86 (α -CH), 60.26 (OCH₂), 80.10 (C(CH₃)₃), 121.40 (=CH-CO₂Et), 126.87, 128.57, 129.28 (Ar-CH), 136.64 (Ar-C), 145.46 (=CH-CH₂N), 155.29 (C=O [Boc]), 165.84 (EtO-C=O), 171.20 (N-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3337 (m, CON-H); 2985, 2926 (w, =C-H, C-H); 1715 (s, O-C=O); 1683 (s, N-C=O); 1651 (m, C=C-C=O); 1523 (s, OCN-H); 1416, 1369 (w, aromat. C=C, C-H); 1224, 1169, 1032 (s, C-O-C); 754, 647 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.9 AS-verknüpfte *E*-Olefine

14.9.1 (*E*)-5-((*S*)-2-Benzoyloxycarbonylamino-3-phenylpropionyloxy)pent-2-ensäureethylester (*E*-OI-01)



Methode: G7.

Ansatz: 1.05 g (7.30 mmol) (*E*)-5-Hydroxypent-2-ensäureethylester^[166] u. 1.11 mL (8.03 mmol) TEA in 70 mL Diethylether, 2.78 g (8.75 mmol) Cbz-PheCl.^[167]

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C, 19 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.29, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 1.11 g (2.61 mmol, 36%). – Gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = +17.27^\circ$ (c = 1.50, CHCl_3).

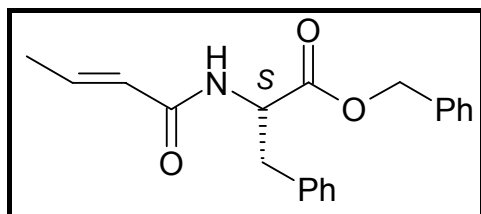
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_6$, 425.49; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 448.3.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.27 (t, 3 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$, J = 7.0 Hz), 2.46-2.50 (m, 2 H, = $\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 3.05-3.13 (m, 2 H, β - $\text{C}\underline{\text{H}}_2$, J = 6.6 Hz), 4.10-4.23 (m, 4 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2$, J = 7.0 Hz), 4.63-4.68 (dt, 1 H, α - $\text{C}\underline{\text{H}}$, J = 6.6, 7.3 Hz,), 5.10, 5.11 (2 x d, je 1 H, $\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, J = 12.6 Hz), 5.21 (d, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}$, J = 7.3 Hz), 5.85 (d, 1 H, = $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$, J = 15.9 Hz), 6.81-6.89 (m, 1 H, = $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2$, J = 6.3, 15.9 Hz), 7.10-7.42 (m, 10 H, Ar- $\underline{\text{H}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 14.20 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 31.14 (= $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 38.26 (β - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 54.79 (α - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 60.36 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$), 63.20 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2$), 66.96 ($\text{O}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 123.88 (= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{Et}$), 127.15, 128.06, 128.34, 128.52, 128.68, 129.20 (Ar- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 135.57, 137.45 (Ar- $\underline{\text{C}}$), 143.25 (= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2$), 155.56 ($\underline{\text{C}}\underline{=}\text{O}$ [Cbz]), 165.96 ($\text{EtO-}\underline{\text{C}}\underline{=}\text{O}$), 171.39 ($\text{CH}_2\text{O-}\underline{\text{C}}\underline{=}\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3343 (m, CON-H); 3032, 2938 (w, =C-H, C-H); 1714 (s, O-C=O); 1656 (s, N-C=O, C=C-C=O); 1515, 1497 (m, OCN-H); 1452, 1343 (w, aromat. C=C, C-H); 1261, 1177, 1043 (s, C-O-C); 745, 698 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

14.9.2 (S)-2-((E)-But-2-enoylamino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-OI-02)



Methode: G1.

Ansatz: 562 mg (6.53 mmol) Crotonsäure in 20 mL abs. THF, 0.72 mL (6.53 mmol) NMM, 0.85 mL (6.53 mmol) IBCF, 1.91 g (6.53 mmol) PheOBn•HCl u. 0.91 mL (6.53 mmol) TEA in 12 mL DMF.

Reaktionsdauer: 1 h – 15 °C; 2 h 0 °C, 10 h RT.

SC (Kieselgel 60, R_f = 0.42, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 1.54 g (4.76 mmol, 73%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 104-105 °C.

$[\alpha]_D^{23} = +56.27^\circ$ (c = 1.50, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_3$, 323.40; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 346.3.

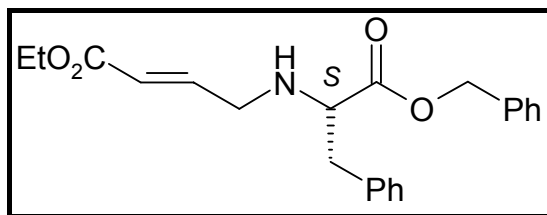
LC-MS: R_t = 19.9 min, k' = 21.11 (98%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.80 (d, 3 H, =CH-CH₃, J = 6.7 Hz), 3.07-3.16 (m_c , 2 H, β -CH₂, J = 5.8 Hz), 4.95-5.00 (dt, 1 H, α -CH, J = 5.8, 7.8 Hz), 5.10, 5.13 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, J = 12.1 Hz), 5.75 (d, 1 H, =CH-C(O)N, J = 15.2 Hz), 5.91 (d, 1 H, NH, J = 7.8 Hz), 6.78-6.86 (dq, 1 H, =CH-CH₃, J = 6.7, 15.2 Hz), 7.00-7.35 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): δ = 17.68 (=CH-CH₃), 37.81 (β -CH₂), 53.01 (α -CH), 67.20 (OCH₂Ph), 124.49 (=CH-C(O)N), 126.96, 127.11, 128.35, 128.45, 128.54, 129.30 (Ar-CH), 135.02, 135.70 (Ar-C), 140.74 (=CH-CH₃), 165.22 (N-C=O), 171.44 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3304 (m, CON-H); 3031, 2963 (w, =C-H, C-H); 1730 (s, O-C=O); 1672 (m, N-C=O); 1624 (s, C=C-C=O); 1533 (s, OCN-H); 1442, 1353 (w, aromat. C=C, C-H); 1213, 1200 (s, C-O-C); 752, 696 (s, aromat. C-H) cm^{-1} .

**14.9.3 (E)-4-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylamino)but-2-ensäureethylester
(E-OI-03)**



Methode: G6.

Ansatz: 1.93 g (10.0 mmol) 4-Bromcrotonsäureethylester, 2.92 g (10.0 mmol) PheOBn·HCl u. 5.52 g (40.0 mmol) K_2CO_3 in 60 mL H_2O .

Reaktionsdauer: 3 d 60 °C.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.28$, Cyclohexan/EtOAc 4:1).

Ausbeute: 1.91 g (5.40 mmol, 54%). – Hellgelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = -12.40^\circ$ (c = 1.50, $CHCl_3$).

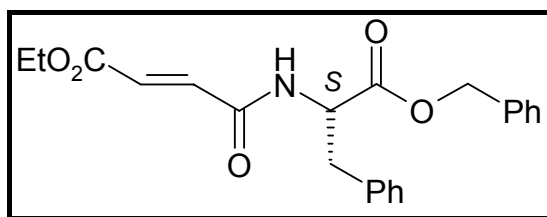
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{22}H_{25}NO_4$, 367.45; gef.: $[M+Na]^+$ 390.4.

1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): $\delta = 1.20$ (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.75 (br s, 1 H, NH), 2.88 (d, 2 H, $\beta-CH_2$, $J = 6.8$ Hz), 3.12-3.17, 3.31-3.35 (2 x dd, je 1 H, $=CH-CH_2N$, $J = 1.7$, 5.3 Hz), 3.48 (t, 1 H, $\alpha-CH$, $J = 6.8$ Hz), 4.10 (q, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 5.00, 5.01 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 5.78 (dd, 1 H, $=CH-CO_2Et$, $J = 1.7$, 15.7 Hz), 6.77 (dt, 1 H, $=CH-CH_2N$, $J = 5.3$, 15.7 Hz), 7.03-7.31 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.61 MHz): $\delta = 14.08$ (CH_3), 39.64 ($\beta-CH_2$), 48.37 ($=CH-CH_2N$), 60.24 (OCH_2), 62.14 ($\alpha-CH$), 66.57 (OCH_2Ph), 121.77 ($=CH-CO_2Et$), 126.74, 126.89, 127.51, 128.31, 128.49, 129.19 (Ar-CH), 135.38, 136.74 (Ar-C), 145.79 ($=CH-CH_2N$), 166.24 (EtO-C=O), 174.03 (BnO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3063, 3031, 2981$ (w, br, =C-H, C-H); 1717 (s, O-C=O); 1605 (w, C=C-C=O); 1495, 1452, 1369 (w, arom. C=C, C-H, N-H); 1277, 1165, 1036 (s, C-O-C); 739, 697 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

**14.9.4 (E)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acrylsäure-
ethylester (E-OI-04)**



Methode: G1.

Ansatz: 1.05 g (7.29 mmol) Monoethylfumarat in 30 mL abs. THF, 0.80 mL (7.29 mmol) NMM, 0.95 mL (7.29 mmol) IBCF, 2.13 g (7.29 mmol) PheOBn•HCl u. 1.01 mL (7.29 mmol) TEA in 20 mL DMF.

Reaktionsdauer: 1 h – 15 °C; 2 h 0 °C, 15 h RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.44$, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 1.04 g (2.73 mmol, 37%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 97-99 °C.

$[\alpha]_D^{23} = +64.07^\circ$ ($c = 1.50$, CHCl_3).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, 381.43; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 404.3.

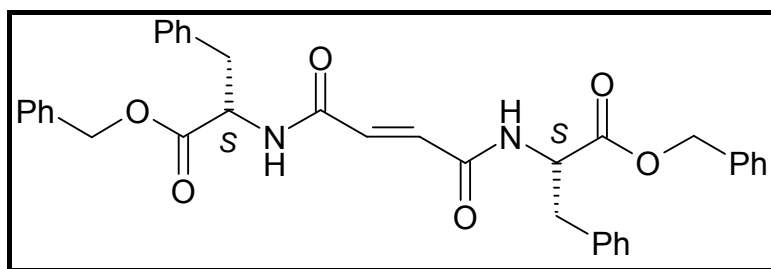
LC-MS: $R_t = 21.8$ min, $k' = 23.22$ (99%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.29$ (t, 3 H, CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 3.11-3.20 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$, $J = 5.5$ Hz), 4.21 (q, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$ Hz), 4.99-5.03 (dt, 1 H, $\alpha\text{-CH}$, $J = 5.5, 7.8$ Hz), 5.13, 5.16 (2 x d, je 1 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.44 (d, 1 H, NH , $J = 7.8$ Hz), 6.81 (d, 1 H, $=\text{CH}-\text{C}(\text{O})\text{N}$, $J = 15.4$ Hz), 6.89 (d, 1 H, $=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$, $J = 15.4$ Hz), 7.21-7.38 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.61 MHz): $\delta = 14.08$ (CH_3), 37.64 ($\beta\text{-CH}_2$), 53.42 ($\alpha\text{-CH}$), 61.21 (OCH_2CH_3), 67.46 (OCH_2Ph), 126.90, 127.16, 128.35, 128.58, 128.62, 129.27 (Ar-CH), 131.03 ($=\text{CH}-\text{C}(\text{O})\text{N}$), 134.84, 135.28 (Ar-C), 135.54 ($=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$), 163.04 ($\text{N}-\text{C}=\text{O}$), 165.38 ($\text{EtO}-\text{C}=\text{O}$), 170.93 ($\text{BnO}-\text{C}=\text{O}$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3331$ (m, CON-H); 3031, 2982 (w, $=\text{C-H}$, C-H); 1729 (s, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 1710 (s, $\text{N}-\text{C}=\text{O}$); 1633 (s, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 1524 (s, OCN-H); 1353, 1306 (w, arom. $\text{C}=\text{C}$, C-H); 1192, 1177 (s, C-O-C); 748, 699 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.9.5 (S)-2-[(E)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)acryloyl-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (E-OI-05)



Methode: G5.

Ansatz: 584 mg (2.00 mmol) PheOBn•HCl u. 0.29 mL (2.10 mmol) TEA in 20 mL DMF, 0.11 mL (1.00 mmol) Fumarylchlorid.

Reaktionsdauer: 1 h – 15 °C, 1 h 0 °C, 1 h RT.

SC (Kieselgel 60, $R_f = 0.36$, Cyclohexan/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 161 mg (0.27 mmol, 27%). – Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 215 °C.

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{36}H_{34}N_2O_6$, 590.68; gef.: $[M+Na]^+$ 613.7.

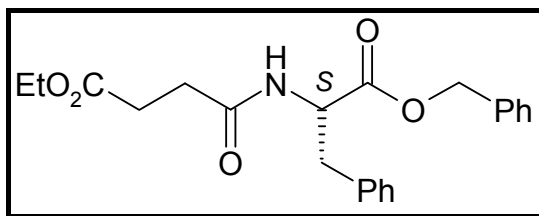
LC-MS: $R_t = 24.2$ min, $k' = 25.89$ (100%).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): $\delta = 3.10$ - 3.21 (m_c , 4 H, β - CH_2 , $J = 5.8, 8.4$ Hz), 4.88 - 4.93 (dt, 2 H, α - CH , $J = 5.8, 7.9$ Hz), $5.14, 5.16$ (2 x d, 4 H, OCH_2Ph , $J = 12.1$ Hz), 6.29 (d, 2 H, NH , $J = 7.9$ Hz), 6.83 (s, 2 H, $=CH-C(O)N$), 7.18 - 7.39 (m, 20 H, Ar- H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.61 MHz): $\delta = 37.68$ (β - CH_2), 53.43 (α - CH), 67.49 (OCH_2Ph), 127.24 , 128.65 , 129.29 (Ar- CH), 132.99 ($=CH-C(O)N$), 134.88 , 135.27 (Ar- C), 163.29 (N- $C=O$), 170.86 (BnO- $C=O$) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3296$ (m, CON- H); $3031, 2941$ (w, =C-H, C-H); 1728 (s, O- $C=O$); 1677 (w, N- $C=O$); 1627 (s, $C=C-C=O$); 1535 (s, OCN- H); $1443, 1352$ (w, arom. C=C, C-H); $1221, 1200$ (s, C-O-C); $750, 697$ (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.10 AS-verknüpfte Bernsteinsäurederivate

14.10.1 *N*-((*S*)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethyl)succinsäureethylester
(BSS-01)

Methode: D2a

Ansatz: 1.00 g (5.74 mmol) Bernsteinsäurediethylester in 10 mL Ethanol, 11.5 mL (5.74 mmol) ethanolische KOH-Lösung (0.5 M).

Reaktionsdauer: 2 h 0 °C.

Ausbeute: 0.94 g (5.10 mmol, 89%). – Farbloser Feststoff.

¹H-NMR (d₆-DMSO, 400.13 MHz): δ = 1.14 (t, 3 H, CH₃, *J* = 7.1 Hz), 2.06 (t, 2 H, CH₂-CO₂K, *J* = 7.2 Hz), 2.33 (t, 2 H, CH₂-CO₂Et, *J* = 7.2 Hz), 4.03 (q, 2 H, OCH₂, *J* = 7.1 Hz) ppm.

Das Monokaliumsalz **BSS-K** wird ohne weitere Aufreinigung sofort weiter nach Methode G2 umgesetzt.

Methode: G2.

Ansatz: 0.94 g (5.10 mmol) **BSS-K** in 30 mL abs. DMF, 1.56 g (5.36 mmol) PheOBn•HCl, 1.21 mL (5.61 mmol) DPPA, 0.75 mL (5.36 mmol) TEA.

Reaktionsdauer: 1 d 0 °C, 5 d RT.

SC (Kieselgel 60, *R_f* = 0.33, Cyclohexan/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 793 mg (2.07 mmol, 41%). – Blassgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 77-79 °C.

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₅NO₅, 383.45; gef.: [M+Na]⁺ 406.4.

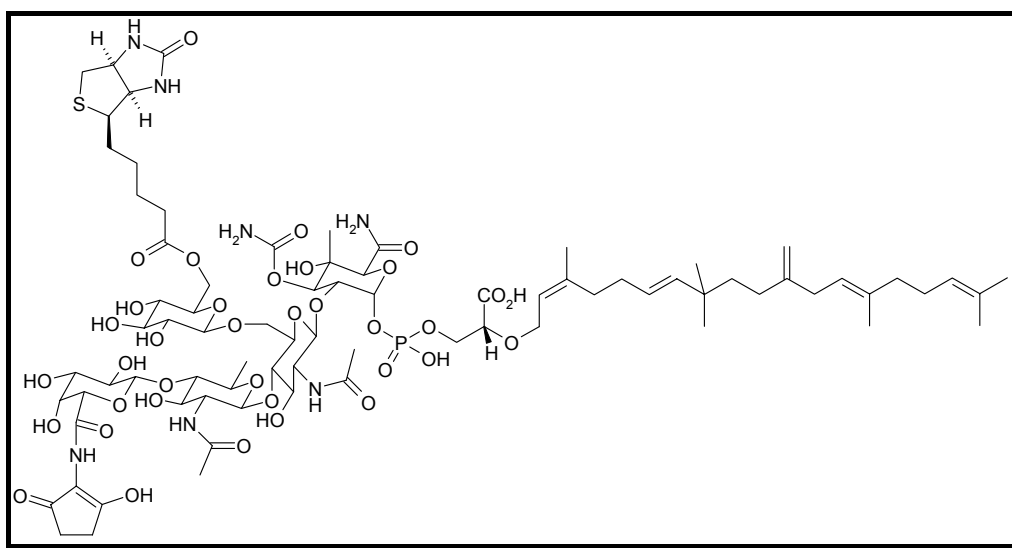
¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.16 (t, 3 H, CH₃, *J* = 7.1 Hz), 2.40 (t, 2 H, CH₂-C(O)N, *J* = 6.8 Hz), 2.54 (t, 2 H, CH₂-CO₂Et, *J* = 6.8 Hz), 3.01-3.10 (m_c, 2 H, β-CH₂, *J* = 5.8, 8.1 Hz), 4.04 (q, 2 H, OCH₂, *J* = 7.1 Hz), 4.81-4.87 (dt, 1 H, α-CH, *J* = 5.8, 7.8 Hz), 5.05, 5.07 (2 x d, je 1 H, OCH₂Ph, *J* = 12.1 Hz), 6.05 (d, 1 H, NH, *J* = 7.8 Hz), 7.12-7.31 (m, 10 H, Ar-H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.61 MHz): δ = 14.12 (CH₃), 29.34 (CH₂-CO₂Et), 30.81 (CH₂-C(O)N), 37.80 (β-CH₂), 53.14 (α-CH), 60.66 (OCH₂), 67.20 (OCH₂Ph), 126.99, 127.85, 128.39,

128.47, 128.54, 129.29 (Ar-CH), 135.01, 135.64 (Ar-C), 170.91 (BnO-C=O), 171.29 (N-C=O), 172.67 (EtO-C=O) ppm.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3356 (m, CON-H); 3056, 2973 (w, =C-H, C-H); 1716 (s, O-C=O); 1638 (m, N-C=O); 1512 (s, OCN-H); 1437, 1367 (w, arom. C=C, C-H); 1243, 1187, 1032 (s, C-O-C); 732, 698 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

14.11 Biotin-markiertes Flavophospholipol (FPL)



Methode: H.

Ansatz 1: 25.0 mg (102 μmol) *D*-Biotin in 5 mL Dichlormethan, 0.22 mL (3.07 mmol) SOCl_2 .

Reaktionsdauer: 1 h RT

Ausbeute: 26.5 mg (101 μmol , 99%). – Gelber Feststoff.

Das Biotinchlorid **Bio-Cl** wird sofort weiter zur Biotin-Markierung von FPL eingesetzt.

Ansatz 2: 6.10 mg (23.1 μmol) **Bio-Cl** in 10 mL Collidin, 31.0 mg (19.6 μmol) FPL.

Reaktionsdauer: 3 h – 40 °C, 20 h RT.

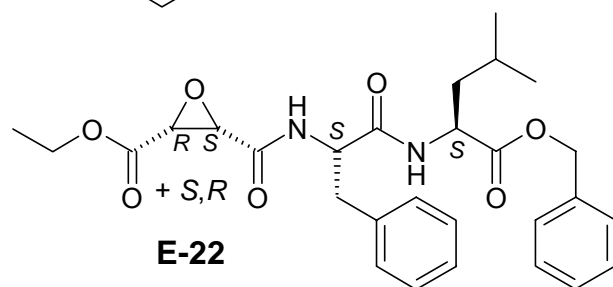
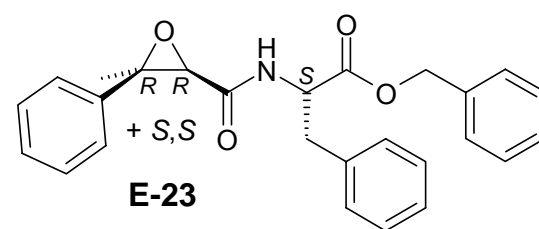
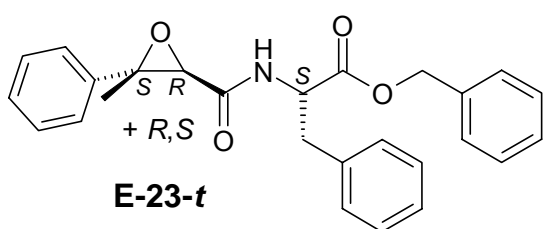
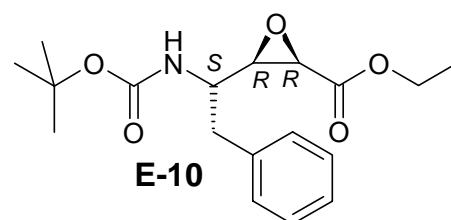
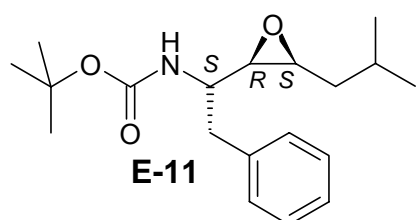
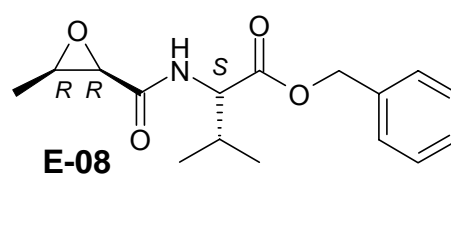
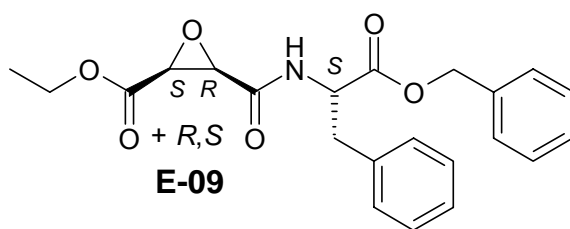
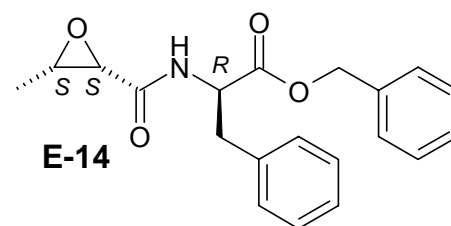
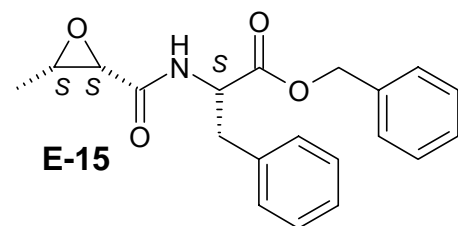
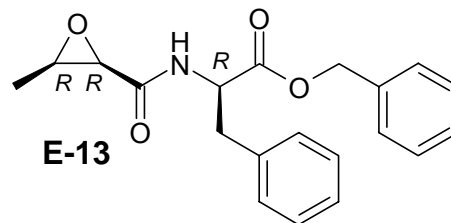
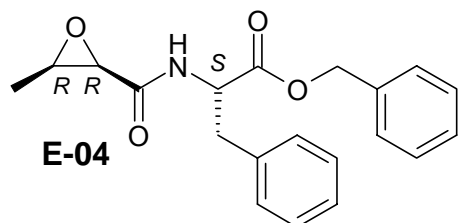
Präparative HPLC: R_t = 3.2-4.0 min.

Ausbeute: 5.3 mg (2.94 μmol , 15%). – Farbloser Feststoff.

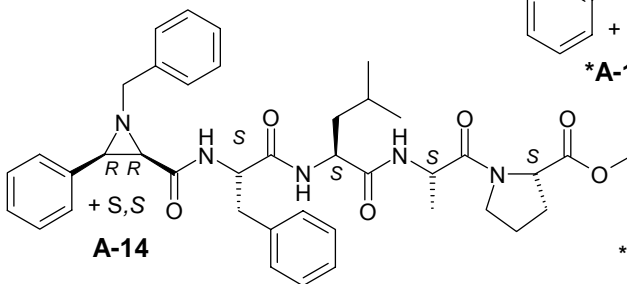
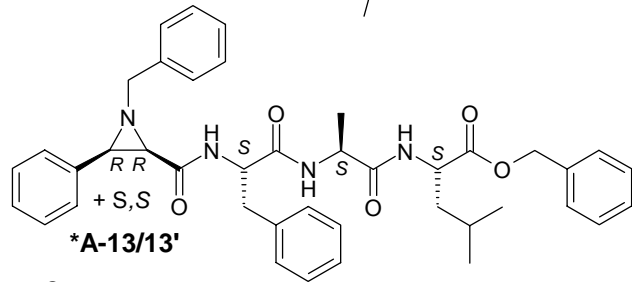
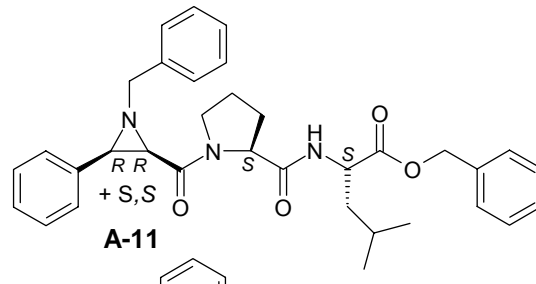
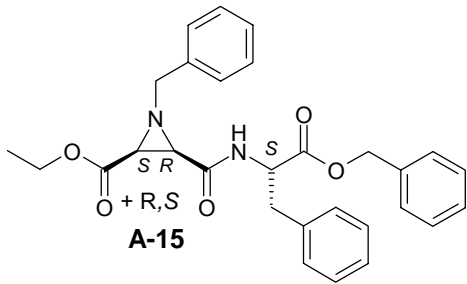
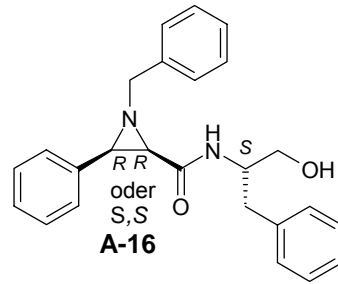
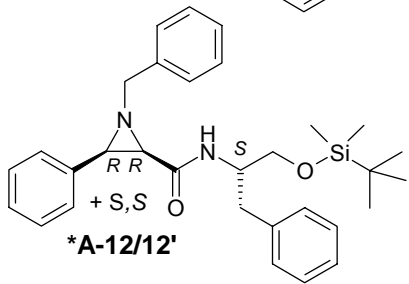
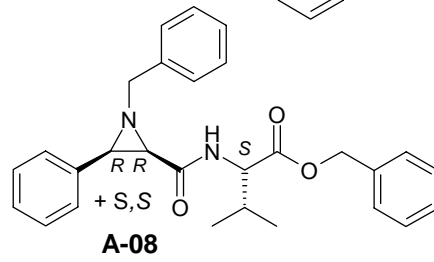
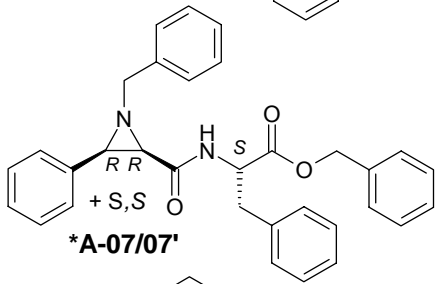
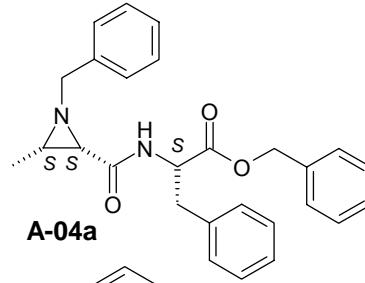
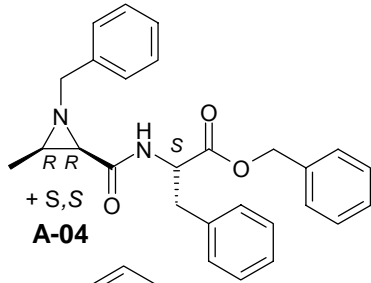
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{79}\text{H}_{122}\text{N}_7\text{O}_{36}\text{PS}$, 1808.92; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1809.2.

15. Übersicht der synthetisierten und getesteten Verbindungen

Epoxide

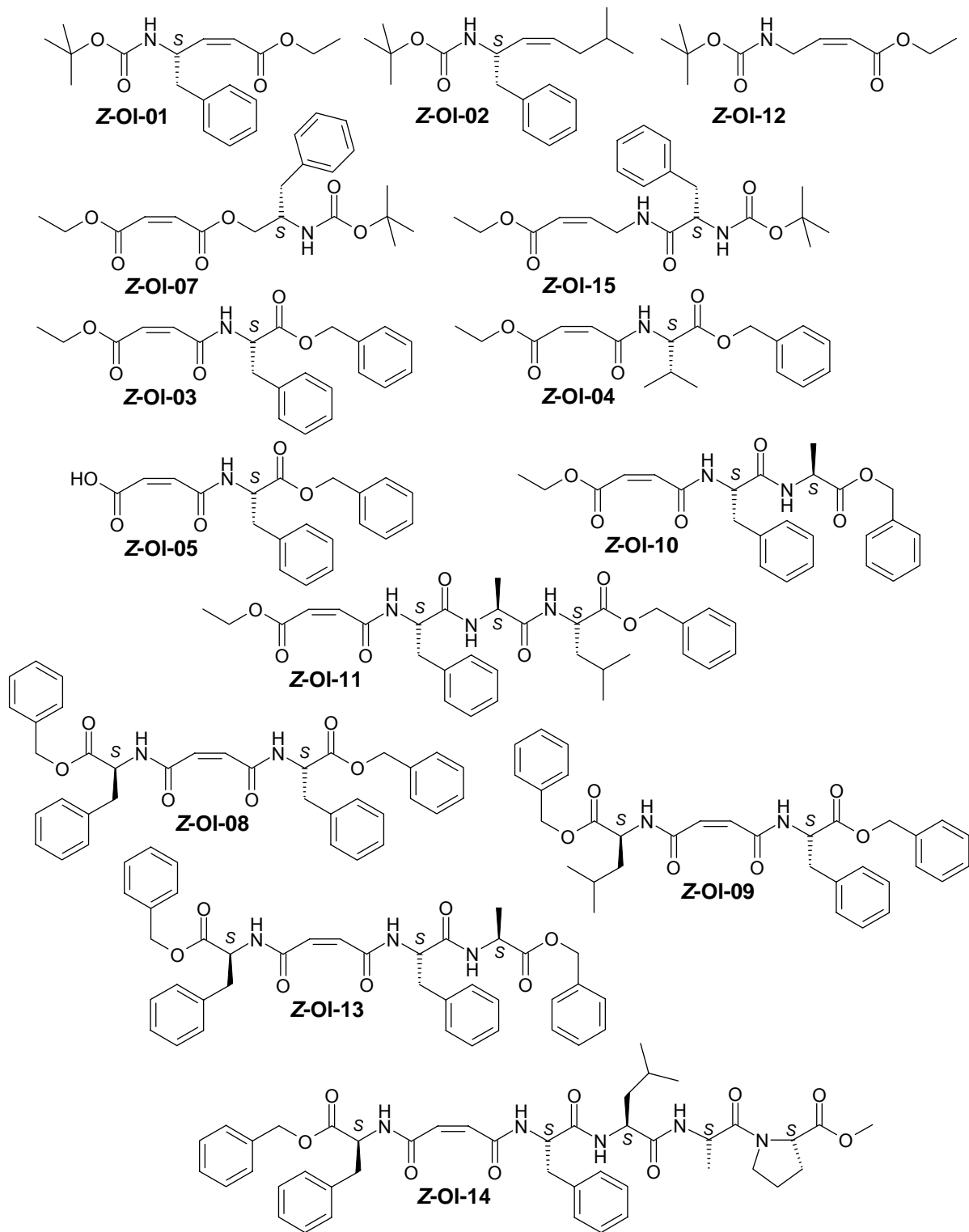


Aziridine

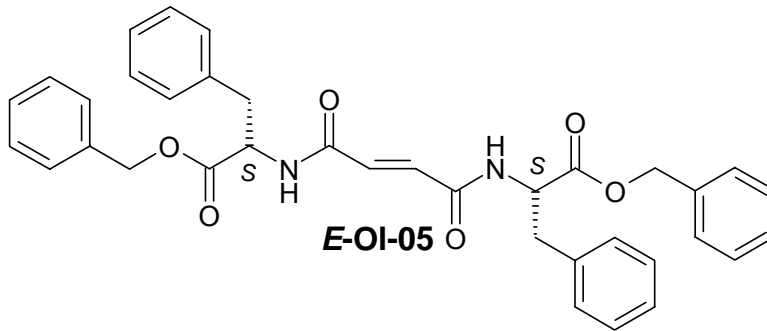
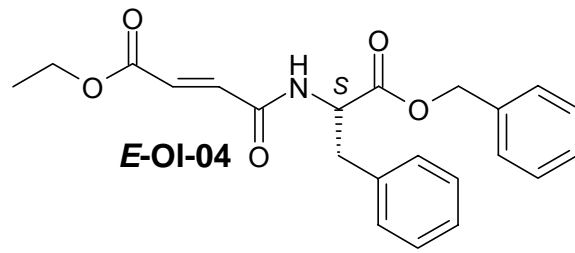
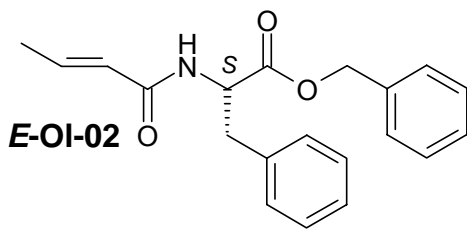
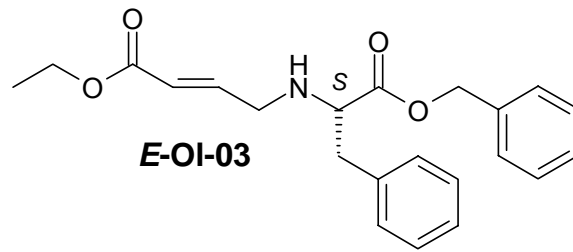
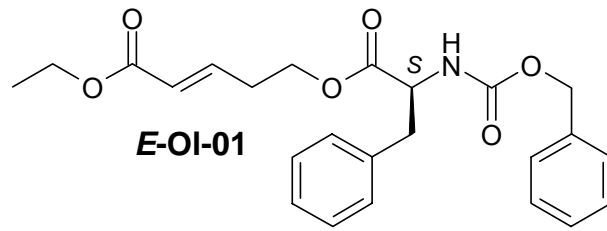


* durch SC angereicherte Diastereomere

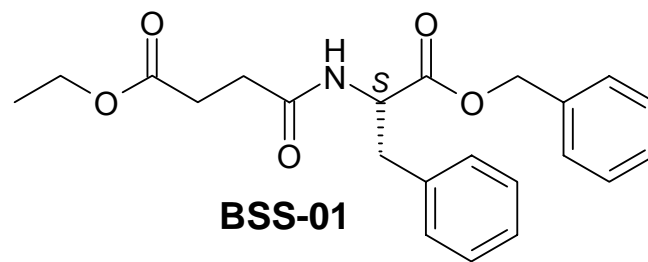
Z-Olefine



E-Olefine



Bernsteinsäurederivat



16. Literaturverzeichnis

- [1] NC-IUBMB *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 610-650.
- [2] MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).
- [3] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. *Biochem. J.* **1993**, 290, 205-218.
- [4] Otto, H. H.; Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133-171.
- [5] Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, 3, 707-715.
- [6] Szesci, P. B. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1992**, 210, 5-22.
- [7] Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 305-341.
- [8] Rochefort, H.; Liaudet-Coopman, E. *Apmis* **1999**, 107, 86-95.
- [9] Rochefort, H.; E., L.; Garcia, M. *Enzyme Protein* **1996**, 49, 106-116.
- [10] Westley, B. R.; May, F. E. B. *Eur. J. Cancer* **1996**, 32A, 15-24.
- [11] Bakshi, P.; Campbell, W. A.; Xia, W. M.; Wolfe, M. S. *Neurobiol. Aging* **2002**, 23, 208-208.
- [12] Campbell, W. A.; Iskandar, M. K.; Wolfe, M. S.; Xia, W. *Neurobiol. Aging* **2002**, 23, 212-212.
- [13] Esler, W. P.; Das, C.; Campbell, W. A.; Kimberly, W. T.; Kornilova, A. Y.; Diehl, T. S.; Ye, W. J.; Ostaszewski, B. L.; Xia, W. M.; Selkoe, D. J.; Wolfe, M. S. *Nat. Cell Biol.* **2002**, 4, 110-111.
- [14] Tsai, J. Y.; Wolfe, M. S.; Xia, W. M. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1087-1106.
- [15] Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y. *et. al. Science* **1999**, 286, 735-741.
- [16] Xia, W.; Iskandar, M. K.; Reed, M. L. O.; Wolfe, M. S.; Campbell, W. A. *Neurobiol. Aging* **2002**, 23, S212-S212.
- [17] Mural, R. J.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Smith, H. O.; Miklos, G. L. G.; Wides, R.; Halpern, A.; Li, P. W.; Sutton, G. G.; Nadeau, J.; Salzberg, S. L. *et. al. Science* **2002**, 296, 1661-1671.
- [18] Caldera, P. S.; Yu, Z. H.; Knegtel, R. M. A.; McPhee, F.; Burlingame, A. L.; Craik, C. S.; Kuntz, I. D.; de Montellano, P. R. O. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 2019-2027.
- [19] Pichova, I.; Pavlickova, L.; Dostal, J.; Dolejsi, E.; Hruskova-Heidingsfeldova, O.; Weber, J.; Ruml, T.; Soucek, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2669-2677.
- [20] Staib, P.; Kretschmar, M.; Nichterlein, T.; Hof, H.; Morschhäuser, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 6102-6107.
- [21] Naglik, J. R.; Challacombe, S. J.; Hube, B. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, 67, 400-428.
- [22] Garber, G. *Drugs* **2001**, 61, 1-12.
- [23] Skrbec, D.; Romeo, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 297, 1350-1353.
- [24] Kumar, S. K. P.; Kulkarni, V. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1153-1170.
- [25] Ferra, C.; Doebbeling, B. N.; Hollis, R. J.; Pfaller, M. A.; Lee, C. K.; Gingrich, R. D. *Clin. Infect. Dis.* **1994**, 19, 697-703.
- [26] Pfaller, M. A. *Clin. Infect. Dis.* **1994**, 19, 8-13.
- [27] Wenzel, R. P. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, 20, 1531-1534.
- [28] Staib, F. *Sabouraudia* **1965**, 4, 187-193.
- [29] Hube, B.; Monod, M.; Schofield, D. A.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. *Mol. Microbiol.* **1994**, 14, 87-99.
- [30] Monod, M.; Hube, B.; Hess, D.; Sanglard, D. *Microbiol.* **1998**, 144, 2731-2737.
- [31] Monod, M.; Togni, G.; Hube, B.; Sanglard, D. *Mol. Microbiol.* **1994**, 13, 357-368.
- [32] Morschhäuser, J.; Virkola, R.; Korhonen, T. K.; Hacker, J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, 153, 349-355.
- [33] Kaminishi, H.; Miyaguchi, H.; Tamaki, T.; Suenaga, N.; Hisamatsu, M.; Mihashi, I.; Matsumoto, H.; Maeda, H.; Hagihara, Y. *Infect. Immun.* **1995**, 63, 984-988.
- [34] Koelsch, G.; Tang, J.; Loy, J. A.; Monod, M.; Jackson, K.; Foundling, S. I.; Lin, X. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1480, 117-131.

- [35] Odds, F. C. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1994**, *31*, 2-5.
- [36] Backman, D.; Danielson, U. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1646*, 184-195.
- [37] Schaller, M.; Korting, H. C.; Schafer, W.; Bastert, J.; Chen, W. C.; Hube, B. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 169-180.
- [38] Schaller, M.; Schackert, C.; Korting, H. C.; Januschke, E.; Hube, B. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*, 712-717.
- [39] Naglik, J. R.; Newport, G.; White, T. C.; Fernandes-Naglik, L. L.; Greenspan, J. S.; Greenspan, D.; Sweet, S. P.; Challacombe, S. J.; Agabian, N. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 2482-2490.
- [40] Schaller, M.; Januschke, E.; Schackert, C.; Woerle, B.; Korting, H. C. *J. Med. Microbiol.* **2001**, *50*, 743-747.
- [41] Hube, B.; Turver, C. J.; Odds, F. C.; Eiffert, H.; Boulnois, G. J.; Kochel, H.; Ruchel, R. *J. Med. Vet. Mycol.* **1991**, *29*, 129-132.
- [42] Dunn, B. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4431-4458.
- [43] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. *Methods Enzymol.* **1995**, *248*, 105-120.
- [44] Davies, D. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.* **1990**, *19*, 189-215.
- [45] Brinkworth, R. I.; Prociv, P.; Loukas, A.; Brindley, P. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38844-38851.
- [46] Cutfield, S. M.; Dodson, E. J.; Anderson, B. F.; Moody, P. C. E.; Marshall, C. J.; Sullivan, P. A.; Cutfield, J. F. *Structure* **1995**, *3*, 1261-1271.
- [47] Stewart, K.; Abad-Zapatero, C. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 941-948.
- [48] Cutler, J. E. *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, *45*, 187-218.
- [49] Ray, T. L.; Payne, C. D. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 508-514.
- [50] Ruchel, R.; De Bernardis, F.; Ray, T. L.; Sullivan, P. A.; Cole, G. T. *J. Med. Vet. Mycol.* **1992**, *30*, 123-132.
- [51] White, T. C.; Agabian, N. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5215-5221.
- [52] Ruchel, R.; Boning, B. *J. Immunol. Methods* **1983**, *61*, 107-116.
- [53] Hube, B.; Ruchel, R.; Monod, M.; Sanglard, D.; Odds, F. C. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *436*, 339-344.
- [54] Hube, B.; Sanglard, D.; Schaller, M.; Ibrahim, A.; Odds, F. C.; Gow, N. A. R. *Mycoses* **1998**, *41*, 47-50.
- [55] Schaller, M.; Schafer, W.; Korting, H. C.; Hube, B. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 605-615.
- [56] Ibrahim, A. S.; Filler, S. G.; Sanglard, D.; Edwards, J. E.; Hube, B. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 3003-3005.
- [57] Ishima, R.; Louis, J. M.; Torchia, D. A. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 515-521.
- [58] Chatfield, D. C.; Brooks, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5561-5572.
- [59] Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.
- [60] De Voss, J. J.; Sui, Z. H.; Decamp, D. L.; Salto, R.; Babe, L. M.; Craik, C. S.; Demontellano, P. R. O. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 665-673.
- [61] Salto, R.; Babe, L. M.; Li, J.; Rose, J. R.; Yu, Z. H.; Burlingame, A.; De Voss, J. J.; Sui, Z. H.; De Montellano, P. O.; Craik, C. S. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10691-10698.
- [62] Grant, S. K.; Moore, M. L.; Fakhoury, S. A.; Tomaszek, T. A.; Meek, T. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1441-1445.
- [63] Jiang, S. P.; Prigge, S. T.; Wei, L.; Gao, Y. E.; Hudson, T. H.; Gerena, L.; Dame, J. B.; Kyle, D. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2577-2584.
- [64] Vieira, E.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Fischli, W.; Guller, R.; Hirth, G.; Marki, H. P.; Muller, M.; Oefner, C.; Scalone, M. *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1397-1402.
- [65] Guller, R.; Binggeli, A.; Breu, V.; Bur, D.; Fischli, W.; Hirth, G.; Jenny, C.; Kansy, M.; Montavon, F.; Muller, M.; Oefner, C. *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1403-1408.
- [66] Hodge, C. N.; Lam, P. Y. S.; Eyermann, C. J.; Jadhav, P. K.; Ru, Y.; Fernandez, C. H.; De Lucca, G. V.; Chang, C. H.; Kaltenbach, R. F.; Holler, E. R.; Woerner, F. *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4570-4581.

- [67] Rodgers, J. D.; Johnson, B. L.; Wang, H.; Greenberg, R. A.; Erickson-Viitanen, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *24*, 2919-2924.
- [68] Whitesitt, C. A.; Simon, R. L.; Reel, J. K.; Sigmund, S. K.; Phillips, M. L.; Shadle, J. K.; Heinz, L. J.; Koppel, G. A.; Hunden, D. C.; Lifer, S. L.; Berry, D. *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2157-2162.
- [69] Lee, C. E.; Kick, E. K.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9735-9747.
- [70] Pakyz, A.; Israel, D. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1997**, 543-551.
- [71] Patick, A. K.; Potts, K. E. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 614-627.
- [72] Kempf, D. J.; Sham, H. L. *Curr. Pharm. Design* **1996**, *2*, 225-246.
- [73] Francis, S. E.; Gluzman, I. Y.; Oksman, A.; Knickerbocker, A.; Mueller, R.; Bryant, M. L.; Sherman, D. R.; Russell, D. G.; Goldberg, D. E. *Embo J.* **1994**, *13*, 306-317.
- [74] Silva, A. M.; Lee, A. Y.; Gulnik, S. V.; Majer, P.; Collins, J.; Bhat, T. N.; Collins, P. J.; Cachau, R. E.; Luker, K. E.; Gluzman, I. Y.; Francis, S. E. *et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10034-10039.
- [75] Carroll, C. D.; Patel, H.; Johnson, T. O.; Guo, T.; Orłowski, M.; He, Z. M.; Cavallaro, C. L.; Guo, J.; Oksman, A.; Gluzman, I. Y.; Connelly, J. *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2315-2320.
- [76] Nezami, A.; Luque, I.; Kimura, T.; Kiso, Y.; Freire, E. *Biochemistry* **2002**, *41*, 2273-2280.
- [77] Romeo, S.; Dell'Agli, M.; Parapini, S.; Rizzi, L.; Galli, G.; Mondani, M.; Sparatore, A.; Taramelli, D.; Bosisio, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2931-2934.
- [78] De Gasparo, M.; Cumin, F.; Nussberger, J.; Guyenne, T. T.; Wood, J. M.; Menard, J. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *27*, 587-596.
- [79] Tossi, A.; Benedetti, F.; Norbedo, S.; Skrbec, D.; Berti, F.; Romeo, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4719-4727.
- [80] Yu, Z. H.; Caldera, P.; McPhee, F.; DeVoss, J. J.; Jones, P. R.; Burlingame, A. L.; Kuntz, I. D.; Craik, C. S.; de Montellano, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5846-5856.
- [81] Schirmeister, T.; Klockow, A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585-596.
- [82] Schirmeister, T. *Habilitationsschrift*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **1999**.
- [83] Tang, J. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 4510-&.
- [84] Meek, T. D.; Dayton, B. D.; Metcalf, B. W.; Dreyer, G. B.; Strickler, J. E.; Gorniak, J. G.; Rosenberg, M.; Moore, M. L.; Magaard, V. W.; Debouck, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1841-1845.
- [85] Ro, S.; Baek, S. G.; Lee, B.; Ok, J. H. *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 242-248.
- [86] Ro, S.; Baek, S. G.; Lee, B.; Park, C.; Choy, N.; Lee, C. S.; Son, Y. C.; Choi, H.; Koh, J. S.; Yoon, H.; Kim, S. C. *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2423-2426.
- [87] Rose, R. B.; Rose, J. R.; Salto, R.; Craik, C. S.; Stroud, R. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12498-12507.
- [88] Lee, C. S.; Choy, N.; Park, C.; Choi, H.; Son, Y. C.; Kim, S.; Ok, J. H.; Yoon, H.; Kim, S. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 589-594.
- [89] Legters, J.; Thijs, L.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5287-5294.
- [90] Nakao, Y.; Fujita, M.; Warabi, K.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462-10463.
- [91] Schaschke, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 855-857.
- [92] Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.
- [93] El Sayed, K. A.; Dunbar, D. C.; Goins, D. K.; Cordova, C. R.; Perry, T. L.; Wesson, K. J.; Sanders, S. C.; Janus, S. A.; Hamann, M. T. *J. Nat. Toxins* **1996**, *5*, 261-285.
- [94] Patil, A. D.; Kokke, W. C.; Cochran, S.; Francis, T. A.; Tomszek, T.; Westley, J. W. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1170-1177.
- [95] Sarin, P. S.; Sun, D.; Thornton, A.; Muller, W. E. G. *J. Natl. Cancer Institute* **1987**, *78*, 663-666.
- [96] Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2797-2800.
- [97] Fusek, M.; Smith, E. A.; Monod, M.; Dunn, B. M.; Foundling, S. I. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9791-9799.

- [98] Capobianco, J. O.; Lerner, C. G.; Goldman, R. C. *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 96-102.
- [99] Petit, Y.; Sanner, C.; Larcheveque, M. *Synthesis* **1988**, 538-540.
- [100] Domagala, J. M.; Bach, R. D. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3168-3174.
- [101] Kimata, K.; Kobayashi, M.; Hosoya, K.; Araki, T.; Tanaka, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 759-762.
- [102] Vicik, R. *Promotionsschrift*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2004**.
- [103] Rozen, S.; Kol, M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5155-5159.
- [104] Payne, G. B.; Williams, P. H. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 54-55.
- [105] Clark, C.; Hermans, P.; Methcohn, O.; Moore, C.; Taljaard, H. C.; Vanvuuren, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1378-1380.
- [106] Methcohn, O.; Moore, C.; Taljaard, H. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 2663-2674.
- [107] Crout, D. H. G.; Gaudet, V. S. B.; Hallinan, K. O. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 805-812.
- [108] Davoli, P.; Forni, A.; Moretti, I.; Prati, F.; Torre, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1801-1812.
- [109] Davoli, P.; Moretti, I.; Prati, F.; Alper, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 518-521.
- [110] Andersson, P. G.; Guijarro, D.; Tanner, D. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7364-7375.
- [111] Cook, G. R.; Shanker, P. S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6818-6822.
- [112] Rich, D. H.; Sun, E. T. O.; Ulm, E. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 27-33.
- [113] Gennari, C.; Moresca, D.; Vulpetti, A.; Pain, G. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5593-5608.
- [114] Reetz, M. T.; Drewes, M. W.; Schmitz, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 1141-1143.
- [115] Mikami, K.; Kaneko, M.; Loh, T. P.; Terada, M.; Nakai, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3909-3912.
- [116] Takemoto, Y.; Matsumoto, T.; Ito, Y.; Terashima, S. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 217-218.
- [117] Devant, R. M.; Radunz, H. E. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2307-2310.
- [118] Furukawa, N.; Yoshimura, T.; Ohtsu, M.; Akasaka, T.; Oae, S. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 73-80.
- [119] Furukawa, N.; Oae, S.; Yoshimura, T. *Synthesis* **1976**, 30-32.
- [120] Berlin, K. D.; Williams, L. G.; Dermer, O. C. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 873-890.
- [121] Bucciarelli, M.; Forni, A.; Moretti, I.; Prati, F.; Torre, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 3041-3045.
- [122] Markow, V. I.; Prosyani, A. V.; Bondarenko, S. V.; Mishchenko, A. I.; Loban, S. V.; Zdesenko, V. A. *Zh. Org. Khim.* **1981**, *17*, 1180-1183.
- [123] Pochlauer, P.; Muller, E. P.; Peringer, P. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1238-1247.
- [124] Gao, Y.; Zepp, C. M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3155-3158.
- [125] He, L. L.; Byun, H. S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2071-2074.
- [126] Metz, K.; Honda, M.; Komori, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 55-60.
- [127] Shustov, G. V.; Kachanov, A. V.; Korneev, V. A.; Kostyanovsky, R. G.; Rauk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10267-10274.
- [128] Lohray, B. B.; Ahuja, J. R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 95-97.
- [129] Saito, S.; Komada, K.; Moriwake, T. *Organic Synthesis*, **1995**.
- [130] Mori, K.; Iwasawa, H. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 87-90.
- [131] Charvillon, F. B.; Amouroux, R. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 395-403.
- [132] Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T. *Tetrahedron Asym.* **2003**, *14*, 3301-3312.
- [133] Martichonok, V.; Plouffe, C.; Storer, A. C.; Menard, R.; Jones, J. B. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3078-3085.
- [134] Rudolph, J.; Sennhenn, P. C.; Vlaar, C. P.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2810-2813.
- [135] Renold, P.; Tamm, C. *Tetrahedron Asym.* **1993**, *4*, 2295-2298.
- [136] Williams, A. L.; Johnston, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1612-1613.
- [137] Backes, J.; In Houben-Weyl: *Methoden der Organischen Chemie*, Vol. Bd. E16c, Thieme Verlag, Stuttgart.

- [138] Niwayama, S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5834-5836.
- [139] Schoenecker, J. W.; Takemori, A. E.; Portoghese, P. S. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1868-1871.
- [140] Clarke, P. A.; Davie, R. L.; Peace, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2753-2756.
- [141] Bodansky, M. *Principles of Peptid Synthesis*; 2nd Edition; Springer Verlag, Berlin, **1993**.
- [142] Bodansky, M.; Bodansky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*; 2nd Edition; Springer Verlag, Berlin, **1994**.
- [143] Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Wiley Interscience, New York, **1984**.
- [144] Rodriguez, M.; Llinares, M.; Doulut, S.; Heitz, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 923-926.
- [145] Ihara, M.; Katsumata, A.; Setsu, F.; Tokunaga, Y.; Fukumoto, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 677-684.
- [146] Medina, E.; Moyano, A.; Pericas, M. A.; Riera, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8574-8578.
- [147] Isobe, T.; Fukuda, K.; Yamaguchi, K.; Seki, H.; Tokunaga, T.; Ishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7779-7785.
- [148] Schirmeister, T.; Peric, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1281-1291.
- [149] Kocienski, P. *Protecting Groups*; Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.
- [150] Korn, A.; Rudolph-Böhner, S.; Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8381-8392.
- [151] Ohno, M.; Otsuka, M. *Organic Reactions*; Wiley & Sons, New York, **1989**.
- [152] Gour-Salin, B. J.; Lachance, P.; Bonneau, P. R.; Storer, A. C.; Kirschke, H.; Broemme, D. *Bioorg. Chem.* **1994**, *22*, 227-241.
- [153] Häbich, D.; Hartwig, W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 781-784.
- [154] Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4565-4570.
- [155] Jencks, W. P. *Adv. Enzymol. Areas Mol. Biol.* **1975**, *43*, 219-229.
- [156] Jenmalm, A.; Berts, W.; Li, Y. L.; Luthman, K.; Csoregh, I.; Hacksell, U. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1139-1148.
- [157] Scholz, D.; Billich, A.; Charpiot, B.; Etmayer, P.; Lehr, P.; Rosenwirth, B.; Schreiner, E.; Gstach, H. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3079-3089.
- [158] Moore, M. L.; Fakhoury, S. A.; Bryan, W. M.; Bryan, H. G.; Tomaszek, T. A.; Grant, S. K.; Meek, T. D.; Huffman, W. F. *Peptides, Chemistry and Biology, Proceedings of the 12th American Peptide Symposium*; ASCOM, Leiden, **1992**.
- [159] Breuning, A. *Diplomarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2002**.
- [160] Hori, K.; Sugihara, H.; Ito, Y. N.; Katsuki, T. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5207-5210.
- [161] Krysan, D. J.; Rockway, T. W.; Haight, A. R. *Tetrahedron Asym.* **1994**, *5*, 625-632.
- [162] Ando, K.; Oishi, T.; Hiramata, M.; Ohno, H.; Ibuka, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4745-4749.
- [163] Pihko, P. M.; Salo, T. M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4361-4364.
- [164] Ando, K. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1934-1939.
- [165] Evidente, A.; Piccialli, G.; Sisto, A.; Ohba, M.; Honda, K.; Fujii, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1937-1939.
- [166] Jones, R. C. F.; Howard, K. J.; Snaith, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1647-1650.
- [167] Paradisi, M. P.; Zecchini, G. P.; Torrini, I.; Lucente, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 1661-1664.
- [168] Wilchek, M.; Bayer, E. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- [169] Huber, G. *Antibiotics* **1979**, *5*, 135-153.
- [170] Fehlhaber, H. W.; Girg, M.; Seibert, G.; Hobert, K.; Welzel, P.; van Heijenoort, Y.; van Heijenoort, J. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1557-1568.
- [171] Konoki, K.; Sugiyama, N.; Murata, M.; Tachibana, K.; Hatanaka, Y. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9003-9014.
- [172] Sabatino, G.; Chinol, M.; Paganelli, G.; Papi, S.; Chelli, M.; Leone, G.; Papini, A. M.; De Luca, A.; Ginanneschi, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3170-3173.
- [173] Butterworth, J. F.; Moran, J. R.; Whitesides, G. M.; Strichartz, G. R. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1295-1302.

- [174] Ishikara, K.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3791-3793.
- [175] Michaelis, L.; Menten, M. L. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.
- [176] Bisswanger, H.; *Enzymkinetik*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**.
- [177] Kitz, R.; Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- [178] Tian, W. X.; Tsou, C. L. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [179] Grafit V3.03, Erithacus Software Ltd., London, **1994**.
- [180] Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [181] Inouye, K.; Fruton, J. S. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1765-1777.
- [182] Martin, P.; Raymond, M. N.; Bricas, E.; Ribadeaudumas, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *612*, 410-420.
- [183] Liu, Y. Y.; Kati, W.; Chen, C.; Tripathi, R.; Molla, A.; Kohlbrenner, W. *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 331-335.
- [184] Volkel, H.; Kurz, U.; Linder, J.; Klumpp, S.; Gnau, V.; Jung, G.; Schultz, J. E. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 198-206.
- [185] Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Lucas, K. D.; Brinen, L. S.; Hernandez, A. A.; Cheng, J. N.; Gwaltney, S. L.; Roush, W. R.; Stierhof, Y. D.; Bogoyo, M.; Steverding, D. *et. al. Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *118*, 61-73.
- [186] Drost, C.; Gunther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H. R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A. M.; Berger, A. *et. al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1967-1976.
- [187] Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S. X.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E. *et. al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953-1966.
- [188] Lee, N.; Hui, D.; Wu, A.; Chan, P.; Cameron, P.; Joynt, G. M.; Ahuja, A.; Yung, M. Y.; Leung, C. B.; To, K. F.; Lui, S. F. *et. al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1986-1994.
- [189] Enserink, M. *Science* **2003**, *300*, 1351-1351.
- [190] Ziebuhr, J.; Snijder, E. J.; Gorbalenya, A. E. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 853-879.
- [191] Anand, K.; Palm, G. J.; Mesters, J. R.; Siddell, S. G.; Ziebuhr, J.; Hilgenfeld, R. *Embo J.* **2002**, *21*, 3213-3224.
- [192] Ziebuhr, J.; Heusipp, G.; Siddell, S. G. *J. Virol.* **1997**, *71*, 3992-3997.
- [193] Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. *Science* **2003**, *300*, 1763-1767.
- [194] Blanchard, J. E.; Elowe, N. H.; Huitema, C.; Fortin, P. D.; Cechetto, J. D.; Eltis, L. D.; Brown, E. D. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1445-1453.
- [195] Hegyi, A.; Ziebuhr, J. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 595-599.
- [196] Käppler, U.; Stiefl, N.; Schiller, M.; Vicik, R.; Breuning, A.; Schmitz, W.; Rupprecht, D.; Schmuck, C.; Baumann, K.; Ziebuhr, J.; Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6832-6842.
- [197] Yang, H. T.; Xie, W. Q.; Xue, X. Y.; Yang, K. L.; Ma, J.; Liang, W. X.; Zhao, Q.; Zhou, Z.; Pei, D. Q.; Ziebuhr, J.; Hilgenfeld, R. *et. al. Plos. Biol.* **2005**, *3*, 2044-2044.
- [198] Yang, H.; Yang, M.; Ding, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mo, L.; Ye, S.; Pang, H.; Gao, G. F. *et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13190-13199.
- [199] Wang, Q. M. *Drugs Fut.* **2000**, *25*, 279-284.
- [200] Graul, A.; Castaner, J. *Drugs Fut.* **2000**, *25*, 9-12.
- [201] Shie, J. J.; Fang, J. M.; Kuo, T. H.; Kuo, C. J.; Liang, P. H.; Huang, H. J.; Wu, Y. T.; Jan, J. T.; Cheng, Y. S. E.; Wong, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5240-5252.
- [202] Escobar, P.; Matu, S.; Marques, C.; Croft, S. L. *Acta Trop.* **2002**, *81*, 151-157.
- [203] Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3357-3363.
- [204] Mack, D.; Fischer, W.; Krokotsch, A.; Leopold, K.; Hartmann, R.; Egge, H.; Laufs, R. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 175-183.
- [205] Levesque, C. M.; Voronejskaia, E.; Huang, Y. C. C.; Mair, R. W.; Ellen, R. P.; Cvitkovitch, D. G. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 3773-3777.
- [206] FlexX V1.12, BioSolveIT, An der Ziegelei 75, 53757 St. Augustin, Deutschland, **2003**.

- [207] FRED 2.12 / VIDA 2.1.1 / Omega 2.0, OpenEye Scientific Software, 3600 Cerrillos Rd Suite 1107, 87507 Santa Fe, New Mexiko.
- [208] Wolf, K.; Dormeyer, M. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 91-96.
- [209] Abad-Zapatero, C.; Golman, R.; Muchmore, S. W.; Hutchins, C.; Stewart, K.; Navaza, J.; Payne, C. D.; Ray, T. L. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 640-652.
- [210] Goldman, R. C.; Gange, D. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 801-820.
- [211] Van Heijenoort, J. *J. Gen. Microbiol.* **2001**, *132*, 1929-1937.
- [212] Terrak, M.; Ghosh, T. K.; van Heijenoort, J.; Van Beeumen, J.; Lampilas, M.; Aszodi, J.; Ayala, J. A.; Ghuysen, J. M.; Nguyen-Disteche, M. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 350-364.
- [213] Stembera, K.; Buchynskyy, A.; Vogel, S.; Knoll, D.; Osman, A. A.; Ayala, J. A.; Welzel, P. *Chem. Biochem.* **2002**, *3*, 332-340.
- [214] Graves-Woodward, K.; Pratt, R. F. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10533-10542.
- [215] Dutta, G. N.; Devriese, L. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 832-837.
- [216] Dutta, G. N.; Devriese, L. A. *J. Appl. Bacteriol.* **1984**, *56*, 117-123.
- [217] Aarestrup, F. M.; Bager, F.; Jensen, N. E.; Madsen, M.; Meyling, A.; Wegener, H. C. *Apmis* **1998**, *106*, 745-770.
- [218] Grosjean, F.; Huche, M.; Larcheveque, M.; Legendre, J. J.; Petit, Y. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9325-9334.
- [219] Saito, S.; Ishikawa, T.; Kuroda, A.; Koga, K.; Moriwake, T. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4067-4086.
- [220] Thompson, C. M.; Frick, J. A.; Green, D. L. C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 111-116.
- [221] Dominguez, A.; Cabezas, N.; Sanchezmontero, J. M.; Sinisterra, J. V. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1827-1844.
- [222] Barfoot, C. W.; Harvey, J. E.; Kenworthy, M. N.; Kilburn, J. P.; Ahmed, M.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 3403-3417.
- [223] Sarasua, M. M.; Scott, M. E.; Helpern, J. A.; Tenkortenaar, P. B. W.; Boggs, N. T.; Pedersen, L. G.; Koehler, K. A.; Hiskey, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3404-3412.
- [224] Clausen, K.; Thorsen, M.; Lawesson, S. O.; Spatola, A. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 785-798.
- [225] Bossler, H. G.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1124-1165.

17. Lebenslauf, Veröffentlichungen und Erklärung

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Björn Degel
Geburtsdatum: 22.05.1975
Geburtsort: Amberg
Familienstatus: ledig, 1 Kind
Nationalität: deutsch

SCHULAUSSBILDUNG:

9/1981 - 7/1986 Regiomontanus-Grund/Teilhauptschule in Königsberg
9/1986 - 5/1995 Regiomontanus-Gymnasium in Hassfurt am Main

HOCHSCHULAUSSBILDUNG:

10/1996 – 9/2002 Diplom-Chemiestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/1998 Vordiplom
10/2001 Diplom
12/2001 - 9/2002 Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. W. Malisch mit dem
Thema: „Symmetrische Bis(chlorosilyl)eisen-Komplexe sowie Eisen-Titan-substituierte Heterosiloxane“
seit 01/2003 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. T. Schirmeister

VERÖFFENTLICHUNGEN:

Posterpräsentationen:

Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors, Schiller M., Breuning A., Degel B., Rohrer S., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T., International Workshop on Discovery of Antiviral Compounds, **2006**, Lübeck.

Electrophiles and guanidinocarbonyl pyrroles: new binding motives for inhibitors of aspartic proteases, Büchold C., Degel B., Martina E., Scheiber J., Baumann K., Staib P., Morschhäuser J., Gelhaus C., Leippe M., Machon U., Schmuck C., Schirmeister T., Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry" of the GDCh-Division "Medizinische Chemie" and the DPhG-Division "Pharmazeutische/Medizinische Chemie", **2006**, Frankfurt am Main.

Syntheses and testing of electrophilic compounds as inhibitors of secreted aspartic proteases (SAPs) from *Candida albicans*, Degel B., Martina E., Scheiber J., Baumann K., Staib P., Morschhäuser J., Gelhaus C., Leippe M., Schirmeister T., 1st International Symposium Novel Agents against Infectious Diseases - An interdisciplinary approach, **2006**, Würzburg.

Inhibitors for aspartate proteases with customised binding motives, Büchold C., Degel B., Scheiber J., Baumann K., Staib P., Morschhäuser J., Machon U., Schmuck C., Schirmeister T., 1st International Symposium Novel Agents against Infectious Diseases - An interdisciplinary approach, **2006**, Würzburg.

Secreted aspartyl proteases as potential targets of drugs against *Candida albicans*, Staib P., Blaß-Warmuth J., Degel B., Schirmeister T., Morschhäuser J., 1st International Symposium Novel Agents against Infectious Diseases - An interdisciplinary approach, **2006**, Würzburg.

Effect of Aziridine-based protease inhibitors on *Plasmodium falciparum*, Gelhaus C., Vicik R., Jenke F., Degel B., Fritsch J., Schirmeister T., Leippe M., 1st International Symposium Novel Agents against Infectious Diseases - An interdisciplinary approach, **2006**, Würzburg.

Separation of the enantiomers and diastereomers of aziridine derivatives in aqueous and non-aqueous chiral CE, Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrave U., 20th International Symposium on Micro-Scale Bioseparations, **2006**, Amsterdam, Niederlande.

Synthesis and testing of electrophilic compounds as inhibitors of secreted aspartic proteases (SAPs) from *Candida albicans*, Degel B., Martina E., Staib P., Morschhäuser J., Gelhaus C., Leippe M., Schirmeister T., DPhG-Jahrestagung **2005**, Mainz.

Development and comparison of chiral separation methods of aziridines by negatively charged β -CDs in aqueous and non-aqueous CE, Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrabe U., DPhG-Jahrestagung **2005**, Mainz.

In vitro leishmanicidal activity of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic protease inhibitors, Ponte-Sucre A., Gronauer T., Neumann S., Faber J. H., Degel B., Schirmeister T., Bringmann G., Moll H., 3rd World Congress on Leishmaniosis, **2005**, Palermo, Italien.

Cis-configured peptidyl epoxides and aziridines as inhibitors of SAP 2 from *Candida albicans*, Degel B., Staib P., Morschhäuser J., Schirmeister T., PhD students symposium SFB 630, **2004**, Würzburg.

Cis-configured peptidyl epoxides and aziridines as inhibitors of SAP 2 from *Candida albicans*, Degel B., Staib P., Morschhäuser J., Schirmeister T., DPhG-Jahrestagung **2004**, Regensburg.

Screening of electrophilic compounds as potential irreversible inhibitors of coronaviral M^{pro}s, Schiller M., Breuning A., Käßler U., Jenke F., Degel B., Vicik R., Stiefl N., Baumann K., Schmuck C., Ziebuhr J., Schirmeister T., DPhG-Jahrestagung **2004**, Regensburg.

Publikationen:

Martina E., Stiefl N., Degel B., Schulz F., Breuning A., Schiller M., Vicik R., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T. Screening of electrophilic compounds yields an aziridinyl peptide as new active-site directed SARS-CoV main protease inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15 (24), 5365-5369.

Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrabe U. Comparison of the separation of aziridine isomers applying heptakis(2,3-di-O-methyl-6-sulfato) β -CD and heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato) β -CD in aqueous and nonaqueous systems. *Electrophoresis* **2005**, 26 (20), 3897-3903.

Bitar Y., Degel B., Schirmeister T., Holzgrabe U. Development and validation of a separation method for the diastereomers and enantiomers of aziridine-type protease inhibitors. *Electrophoresis* **2005**, 26 (12), 2313-2319.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**SYNTHESE UND TESTUNG ELEKTROPHILER VERBINDUNGEN ALS INHIBITOREN DER
SEKRETORISCHEN ASPARTAT-PROTEASEN (SAPs) VON *CANDIDA ALBICANS***

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Björn Degel