

**SYNTHESE UND TESTUNG VON AZIRIDIN-2-CARBOXYLATEN ALS  
CYSTEIN-PROTEASE-INHIBITOREN**



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

VORGELEGT VON  
**DIPLOM-CHEMIKERIN FRANZISKA SCHULZ**  
AUS HAMBURG

**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: .....



---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Tanja Schirmeister danken für die Möglichkeit, in einem sehr interessanten und medizinisch-chemischen Themengebiet meine Doktorarbeit anzufertigen. Ihr reges Interesse, die vielen hilfreichen Diskussionen und die Chance, einen Teil der Forschungsarbeit im Ausland durchführen zu können, haben sehr zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Unterstützung danken:

Prof. Dr. Philip Rosenthal University of California, San Francisco, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis in der Zeit von Juli bis September 2005 sowie für die Möglichkeit, die Studien an Falcipain 2 und 3 sowie an *Plasmodium falciparum* am Department of Medicine, Division of Infectious Diseases am General Hospital, San Francisco, durchführen zu können; Dr. Jiri Gut für die Einweisung in die experimentellen Techniken und seine Unterstützung bei den Studien,

Dr. Björn Degel, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Messungen an SAP2 und für die Testung einiger Aziridine (Verb. 4.5a/c, 4.8b, 4.9a/b, 4.10a/b, 9.1b, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7) an Falcipain 2 und 3 und *Plasmodium falciparum* während seines Aufenthaltes in San Francisco im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Rosenthal im August 2006,

Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck, für die Expression von Falcipain 2 aus *Plasmodium falciparum*,

Prof. Dr. J. Ziebuhr, School of Biomedical Sciences, Queen's University Belfast, UK, für die Überlassung der SARS-CoV M<sup>pro</sup>,

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,

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* und Macrophagen,

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

Dipl.-Pharm. Erika Martina, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Messungen an verschiedenen Cystein-Proteasen,

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

Dipl.-Chem. Markus Schiller, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Synthese des Substrates für den Enzym-Assay an der SARS-CoV M<sup>pro</sup>,

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

Meinen Kollegen im Labor Dr. Birgit Vedder, Dr. Gemma Bruno, Dipl.-Chem. Markus Schiller und Monika Herb danke ich besonders für die nette Atmosphäre und die immerwährende Unterstützung in fachlichen wie in sonstigen Fragen.

Meinen Kollegen im AK Schirmeister Erika Martina, Dr. Radim Vičík, Dr. Ulrich Käßler, Thomas Pfeuffer, Alexander Breuning und Christian Büchold danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft.

Dipl.-Chem. Yvonne Martin danke ich für die lange Freundschaft, die immer offene Tür und die vielen lebenswichtigen Diskussionen.

Dr. Birgit Vedder danke ich für die konstruktiven Auseinandersetzungen, die heiteren Gespräche danach und die vielen aufmunternden Worte.

Der Werkstatt, Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche.

Meinen Kollegen im 4.Semester, PD Dr. Darius Zlotos, Dr. Eberhard Heller, Dipl.-Chem. Florian Diwischek und Apotheker Benjamin Waibel, gilt mein Dank für das nette Klima bei der Studentenbetreuung.

Meinem Ehemann Mirko danke ich für seine große Geduld und die immerwährende Unterstützung.

Für finanzielle Unterstützung wird folgenden Institutionen gedankt:

Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG, SFB 630

BaCaTec (Bavaria California Technology Center, [www.bacatec.de](http://www.bacatec.de))





*Meiner lieben Familie*



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.:	absolut	RPMI 1640 Medium:	Bicarbonat-Puffer-System
AMC:	7-Amino-4-methylcumarin	RT:	Raumtemperatur
Äq.:	Äquivalent	s:	Singulett
Bn:	Benzyl	<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
Boc:	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	<i>S. epidermidis</i> :	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
CB:	Cathepsin B	SAP:	Sekretorische Aspartat-Protease
CL:	Cathepsin L	SARS:	Severe Acute Respiratory Syndrom
C <sub>q</sub> :	quartäres Kohlenstoffatom	SARS-CoV M <sup>pro</sup> :	SARS-Coronavirus Hauptprotease
d:	Dublett	SC:	Säulenchromatographie
dc:	dünnschichtchromatographisch	sext:	Sextett
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimid	t:	Triplett
DMSO:	Dimethylsulfoxid	<i>T. b. brucei</i> :	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
DPPA:	Diphenylphosphorylazid	TEA:	<i>N,N,N</i> ,-Triethylamin
DTT:	Dithioerythritol	THF:	Tetrahydrofuran
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure	TMS:	Tetramethylsilan
EEDQ:	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin	Tris:	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
eV:	Elektronenvolt	wfr.:	wasserfrei
FP2:	Falcipain 2	LM:	Laufmittel
FP3:	Falcipain 3	m:	Multiplett
ges.:	gesättigt	min:	Minuten
h:	Stunden	M <sup>pro</sup> :	main protease
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
Hz:	Hertz	ppm:	parts per million
<i>L. major</i> :	<i>Leishmania major</i>	q:	Quartett
LC-MS:	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie	YOYO-1:	Quinolinium-1,1'-[1,3-propandiy]bis[(dimethyliminio)-3,1-propandiy]]bis[4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolyliden)methyl]]-tetraiodide
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Z-:	Benzyloxycarbonyl-
<i>P. falc.</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i>		
quin:	Quintett		
RD:	Rhodesain		
R <sub>f</sub> :	Retentionsfaktor		



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen .....	1
1.2.	Strukturen von Cystein-Proteasen des Clans CA .....	5
1.3.	Katalytischer Mechanismus .....	7
1.4.	Inhibitoren von Cystein-Proteasen .....	9
1.4.1.	<i>Epoxysuccinyl-Derivate</i> .....	9
1.4.2.	<i>Aziridinyl-Derivate</i> .....	12
1.4.3.	<i>Weitere Klassen von Inhibitoren</i> .....	14
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>Synthesen.....</b>	<b>16</b>
3.1.	Synthese-Möglichkeiten zur Darstellung von Aziridin-2-carboxylaten .....	16
3.1.1.	<i>Cromwell-Synthese</i> .....	16
3.1.2.	<i>Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Triazolone</i> .....	18
3.1.3.	<i>Diastereoselektive Synthese von Aziridin-2-carboxylaten</i> .....	18
3.1.4.	<i>Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Vinyltriflate</i> .....	19
3.1.5.	<i>Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über L-Serin</i> .....	20
3.1.6.	<i>Synthese von Aziridin-2-carboxylaten via Ugi-Reaktion</i> .....	21
3.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	22
3.2.1.	<i>Synthese der Aziridin-2-carboxylat-Bausteine über Cromwell-Synthese</i> .....	22
3.2.2.	<i>Versuche zur Hydrolyse der Aziridin-2-carboxylat-Bausteine</i> .....	25
3.2.3.	<i>Neuer Zugang zu substituierten Aziridin-2-carboxylaten</i> .....	26
3.3.	Struktur-Aufklärung mittels NMR-Spektroskopie.....	30
<b>4.</b>	<b>Biochemische und biologische Untersuchungen.....</b>	<b>37</b>
4.1.	Enzym-Assays .....	37
4.1.1.	<i>Charakterisierung irreversibler, zeitabhängiger Hemmung</i> .....	38
4.1.4.	<i>Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung</i> .....	45
4.2.	Durchführung der fluorimetrischen Enzym-Assays .....	46
4.3.	Ermittelte Hemmkonstanten der Inhibitoren an Rhodesain, Falcipain 2 und 3, Cathepsin L und B .....	47
4.4.	Enzym-Assay zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit von Rhodesain .....	50
4.4.1.	<i>Ermittlung des pH-Optimums von Rhodesain und der Hemmkonstanten bei verschiedenen pH-Werten durch 9.1b</i> .....	50
4.5.	Enzym-Assay an SARS-CoV M <sup>pro</sup> .....	54
4.5.1.	<i>FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmkonstanten an der SARS-CoV M<sup>pro</sup></i> .....	55
4.5.2.	<i>Screening und Bestimmung der Hemmkonstanten</i> .....	56
4.6.	Enzym-Assays an SAP2 .....	57
4.6.1.	<i>FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmkonstanten an SAP2</i> .....	58
4.6.2.	<i>Screening</i> .....	59
4.7.	Infektionsbiologische Testungen .....	60
4.7.1.	<i>Aktivität gegen Plasmodium falciparum</i> .....	60
4.7.2.	<i>Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte an Plasmodium falciparum</i> .....	62
4.7.3.	<i>Ergebnisse der Aziridin-2-carboxylate an Plasmodium falciparum</i> .....	62
4.7.4.	<i>Screening verschiedener Klassen von Inhibitoren an Plasmodium falciparum</i> .....	63
4.7.5.	<i>Ergebnisse der Aziridin-2,3-dicarboxylate an Plasmodium falciparum</i> .....	64

4.7.6.	<i>Ergebnisse der Epoxide und an Position 3 substituierten Aziridin-2-carboxylate an Plasmodium falciparum</i> .....	67
4.7.7.	<i>Ergebnisse der Michael-Systeme und Ethacrynsäure-Derivate an Plasmodium falciparum</i> .....	69
4.7.8.	<i>Aktivität gegen Trypanosoma brucei brucei und Leishmania major</i> .....	71
4.7.9.	<i>Aktivität gegen Bakterien</i> .....	72
4.7.10.	<i>Wachstumshemmung von Bakterien</i> .....	73
4.7.11.	<i>Biofilmhemmung von Bakterien</i> .....	73
4.7.12.	<i>Aktivität gegen Candida albicans</i> .....	74
4.7.13.	<i>Wachstumshemmung von Candida albicans</i> .....	74
<b>5.</b>	<b>Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen</b> .....	<b>75</b>
5.1.	<b>Selektivität bezüglich der Enzyme</b> .....	<b>75</b>
5.1.1.	<i>Aspartat-Protease SAP2 versus Cystein-Proteasen</i> .....	75
5.1.2.	<i>Cathepsin B versus Cathepsin L</i> .....	75
5.1.3.	<i>Hemmung von Rhodesain</i> .....	77
5.1.4.	<i>Hemmung von Falcipain 2 und 3</i> .....	79
5.2.	<b>Selektivität der Ester und eingesetzten Aminosäuren</b> .....	<b>80</b>
5.2.1.	<i>Einfluss der Ester</i> .....	80
5.2.2.	<i>Einfluss der Aminosäuren</i> .....	81
5.3.	<b>Bewertung der infektiologischen Testungen</b> .....	<b>83</b>
5.4.	<b>Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen und Ausblick</b> .....	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>93</b>
8.5.	<b>Allgemeine Angaben</b> .....	<b>93</b>
8.5.1.	<i>Analytische und chromatographische Methoden und verwendete Messgeräte</i> .....	93
8.6.	<b>Verwendete Reagenzien</b> .....	<b>95</b>
8.6.1.	<i>Enzyme, Substrate, Zell-Kulturen und Syntheschemikalien</i> .....	95
8.7.	<b>Enzym-Assays</b> .....	<b>95</b>
8.7.1.	<i>Screening</i> .....	96
8.7.2.	<i>Cathepsin B</i> .....	96
8.7.3.	<i>Cathepsin L</i> .....	96
8.7.4.	<i>Rhodesain-Assay</i> .....	97
8.7.5.	<i>Sap2-Assay</i> .....	98
8.7.6.	<i>SARS-CoV M<sup>pro</sup>-Assay</i> .....	98
8.7.7.	<i>Falcipain-2-Assay</i> .....	99
8.7.8.	<i>Falcipain-3-Assay</i> .....	99
8.7.9.	<i>Plasmodium-falciparum-Assay</i> .....	100
8.7.10.	<i>Verwendete Puffer</i> .....	100
8.8.	<b>Arbeitsmethoden</b> .....	<b>101</b>
8.9.	<b>Darstellung der Edukte</b> .....	<b>101</b>
8.9.1.	<i>Methyl-2,3-dibromopropanoat (2)</i> .....	102
8.9.2.	<i>Methyl-2-bromoacrylat (3)</i> .....	103
8.9.3.	<i>(S)-Methyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat (6.1a)</i> .....	103
8.9.4.	<i>(S)-Benzyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat (6.1b)</i> .....	104
8.9.5.	<i>(S)-Methyl-2-(acryloylamino)-3-methylbutanoat (6.2a)</i> .....	104
8.9.6.	<i>(S)-Dibenzyl-2-(acryloylamino)succinat (6.3b)</i> .....	105
8.9.7.	<i>(S)-Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat (7.1a)</i> .....	106
8.9.8.	<i>(S)-Benzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat (7.1b)</i> .....	106

8.9.9.	(S)-Methyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-methylbutanoat (7.2a) .....	107
8.9.10.	(S)-Dibenzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]succinat (7.3b) .....	107
8.9.11.	(S)-Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat (8.1a) .....	108
8.9.12.	(S)-Benzyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat (8.1b) .....	109
8.9.13.	(S)-Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-methylbutanoat (8.2a) .....	109
8.9.14.	(S)-Dibenzyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]succinat (8.3b) .....	110
8.10.	<b>Darstellung der Aziridine .....</b>	<b>111</b>
8.10.1.	1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.1a) .....	112
8.10.2.	1-Benzoyloxycarbonylmethyl-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.1b) .....	113
8.10.3.	1-((S)-Methoxycarbonyl-2-methyl-propyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.2a) .....	114
8.10.4.	1-((S)-Benzoyloxycarbonyl-2-methyl-propyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.2b) .....	116
8.10.5.	1-((S)-1-Methoxycarbonyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.3a) .....	118
8.10.6.	1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.3b) .....	120
8.10.7.	1-((S)-1-Methoxycarbonyl-3-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.4a) .....	122
8.10.8.	1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-3-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.4b) .....	124
8.10.9.	(S)-2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredimethylester (4.5a) .....	126
8.10.10.	2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredibenzylester (4.5b) .....	128
8.10.11.	(S)-2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredi-tert-butylester (4.5c) ..	130
8.10.12.	1-((S)-Methoxycarbonyl-3-methylsulfanyl-propyl)-aziridin-2- carboxylsäuremethylester (4.6a) .....	132
8.10.13.	1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.7b) .....	134
8.10.14.	1-((S)-5-Benzoyloxycarbonylamino-5-methoxycarbonyl-pentyl)-aziridin-2- carboxylsäuremethylester (4.8a) .....	136
8.10.15.	1-[5-Benzoyloxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,4-dienyloxycarbonylamino)- pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.8b) .....	138
8.10.16.	1-[(S)-Methoxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,3-dienyloxycarbonylamino)- pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.9a) .....	140
8.10.17.	1-[(S)-Benzoyloxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,3-dienyloxycarbonylamino)- pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.9b) .....	142
8.10.18.	1-((S)-1-Methoxycarbonyl-2-phenyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.10a) .....	144
8.10.19.	1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.10b) .....	146
8.10.20.	(R)-2-[(1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenyl- propionsäuremethylester (9.1a) .....	148
8.10.21.	(R)-2-[(1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenyl- propionsäurebenzylester (9.1b) .....	150
8.10.22.	(S)-2-[2-((R)-1-Methoxycarbonyl-2-phenyl-ethylcarbamoyl)-aziridin-1-yl]- bernsteinsäuredibenzylester (9.2) .....	152
8.10.23.	(S)-2-({1-[(S)-1-Methoxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,4-dienyloxycar- bonylamino)-pentyl]-aziridin-2-carbonyl}-amino)-bernsteinsäuredibenzylester (9.3) .....	154
8.10.24.	(S)-6-Benzoyloxycarbonylamino-2-[2-(1-methoxycarbonyl-2-phenyl- ethylcarbamoyl)-aziridin-1-yl]-hexansäuremethylester (9.4) .....	156
8.10.25.	(R)-2-({1-[(Methoxycarbonylmethyl-carbamoyl)-methyl]-aziridin-2-carbo-nyl}- amino)-3-phenyl-propionsäuremethylester (9.5) .....	158
8.10.26.	(S)-2-[(1-Benzyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester (9.6) .....	160
8.10.27.	(S)-2-[(1-Benzyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-methyl-butylsäuremethylester (9.7) .....	162

---

9.	Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen.....	165
10.	Literaturverzeichnis.....	167
11.	Lebenslauf.....	171
12.	Veröffentlichungen.....	172



## 1. Einleitung

Enzyme sind hochspezifische Katalysatoren verschiedenster biochemischer Reaktionen. Als Proteasen bezeichnet man die Enzyme, die durch die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen den Abbau von Proteinen und Peptiden katalysieren.<sup>1</sup> Sie gehören nach dem IUBMB- oder EC-System (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Enzyme Commission) zu der Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4). Diese Proteasen werden unterteilt nach der Position der Spaltstelle des zu hydrolisierenden Substrats in Endo- (EC 3.4.11-19) und Exopeptidasen (EC 3.4.21-99). Die weitere Unterteilung erfolgt auf Grund der in den katalytischen Prozess eingebundenen Aminosäuren der Proteasen. Dabei sind fünf verschiedene Proteasen-Klassen zu unterscheiden: Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metallo-Proteasen.

Die Enzyme werden weiterhin über die Aminosäure-Sequenz nach dem MEROPS-System unterteilt.\* Ähnliche Aminosäure-Sequenzen werden als homolog eingestuft und in Familien zusammengefasst. Sie ähneln sich in Tertiär- bzw. Quartärstruktur. Diese Familien werden außerdem, wenn sie sich aus einem Ur-Protein entwickelt haben, in einen Clan eingebunden, der nach dem Prototyp-Enzym benannt ist. Die 69 Subfamilien (C1-C69) der Cystein-Proteasen werden dabei in 7 Clans (Superfamilien) unterteilt: Papain-Clan (Clan CA), Caspase-Clan (Clan CD), Adenain-Clan (Clan CE), Clan der Pyroglutamyl-Peptidase I (Clan CF), Clan des hedgehog Proteins (Clan CH), Sortase-Clan (Clan CL) und C-Clan (Clan C-). Dem Papain-Clan (Clan CA) gehören die meisten bisher entdeckten Cystein-Proteasen an.<sup>2,3</sup>

### 1.1. Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen

Cystein-Proteasen sind in Säugetieren, im menschlichen Organismus, aber auch bei Pflanzen, Viren, Protozoen und Würmern weit verbreitet und spielen dort lebenswichtige Rollen. In Tab. 1.1 ist eine Auswahl an Cystein-Proteasen dargestellt, die aus pharmazeutischer Sicht als potentielle wichtige Targets zur Entwicklung von neuen Medikamenten dienen können.

Im Menschen sind Cystein-Proteasen an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, wie z. B. der Metastasenbildung, Wachstum maligner Tumore, Alzheimer und weiteren Erkrankungen.<sup>4-7</sup>

---

\*) URL: <http://www.merops.sanger.ac.uk>

**Tab. 1.1:** Aufzählung pharmazeutisch wichtiger Cystein-Proteasen

Clan	Fam.	Protease	aktives Zentrum	Spezifität des Enzyms	Herkunft
CA	C1	Papain		S2: lipophil	<i>Carica papaya</i>
		Cathepsin B		S1: Arg S2': Pro	<i>Homo sapiens</i>
		Cathepsin L, S, K, P...		S1: Arg S2: lipophil	<i>Homo sapiens</i>
		Falcipain 1, 2a/b, 3		S2: lipophil	<i>Plasmodium falciparum</i>
		Rhodesain		S2: lipophil	<i>T. b. rhodesiense</i>
		Cruzain	Cys <sup>-</sup> , HisH <sup>+</sup>	S2: lipophil	<i>T. cruzi</i>
	C2	Calpain 2		S2: Tyr, Met, Leu, Val, Arg	<i>Homo sapiens</i>
C10	Streptopain		S2: lipophil	<i>Strept. pyogenes</i>	
C47	Staphopain A + B		S2: lipophil	<i>S. aureus</i>	
CD	C11	Clostripain	Cys <sup>-</sup> , HisH <sup>+</sup>	S1: Arg	<i>Clostridium histolyticum</i>
	C14	Caspase 1 (ICE)		S1: Asp	<i>Homo sapiens</i>
CL	C60	Sortase	Cys, His, Arg	LPXT    G	<i>S. aureus</i>
PA	C3A-G	Picornain 3C (Chymotrypsin- ähnliche Faltung)	Cys, His	Gln    Gly	Hepatitis A-Virus, humanes Poliovirus Typ 1
	C30	TGEV M <sup>pro</sup>  SARS-CoV M <sup>pro</sup>	Cys, His	LQ    A  LQ    A	Schwein: TGEV  humanes SARS- Coronavirus

SARS-CoV M<sup>pro</sup>: Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus Hauptprotease; ||: Spaltstelle im Peptide;  
TGEV M<sup>pro</sup>: Transmissible Gastroenteritis Virus Hauptprotease; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *T. b.*:  
*Trypanosoma brucei*

Zu den humanen Cystein-Proteasen gehören die 11 Cathepsine: Cathepsin B, C, O, X, L, V, K, S, W, F und H.<sup>8</sup> Sie werden als 30-50 kDa schwere Präproenzyme synthetisiert, ins Lysosom transportiert, in dem sie dann die Proteinhydrolyse katalysieren. Nach der Abspaltung des Signalpeptids sinkt die Molekularmasse der Cathepsine auf 20 - 35 kDa. Die

Aktivität der Cathepsine ist unter anderem reguliert durch das pH-Optimum der Proteasen (pH 4.5-6.5) und durch endogene Inhibitoren (Cystatine, Kininogene).<sup>9</sup>

Es hat sich gezeigt, dass sich in vielen humanen Tumoren wie Brust-, Lungen-, Prostata-Krebs eine erhöhte Konzentration von Cathepsinen finden lässt (Tab. 1.2). Wahrscheinlich fördern die Cathepsine den Abbau der extrazellulären Matrix (EMC) und ermöglichen so die Proliferation und die Invasion der Tumorzellen in das umgebende Gewebe als auch in das Gefäßsystem. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die Cathepsine B und L verschiedene Komponenten extrazellulärer Strukturen (wie z. B. Kollagen IV, Fibronectin, Laminin) hydrolysieren können.<sup>10-13</sup>

**Tab. 1.2:** Erhöhung der Cathepsin-Konzentration bei verschiedenen Krankheiten

<b>Cystein-Protease</b>	<b>Krankheit</b>	<b>Erhöhung der Enzym-Konzentration</b>	<b>Material</b>
Cathepsin B, L	Brust-Krebs	+	Krebsgewebe und Zelllinien
Cathepsin B, L, H	Prostata-Krebs	+	Krebszellkulturen
Cathepsin B, L	Lungen-Krebs	+	Krebsgewebe
Cathepsin H		+	Serum
Cathepsin B, L, H, S	Alzheimer, Demenz	+	pathologisch veränderte Gehirnregionen
Cathepsin B, L, H, S	Rheumatoide Arthritis	+	Plasma

Weitere bekannte Funktionen der Cathepsine sind der Knochenauf- und abbau oder die Prozessierung vieler Proteine.<sup>14-16</sup> Außerdem scheinen sie auch in Entzündungsprozessen wie der Rheumatoiden Arthritis oder entzündlichen Erkrankungen von Muskelzellen eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>17</sup> Es wird daher versucht, für die medizinische Diagnostik Cathepsine als klinische Marker für verschiedene Krankheiten zu etablieren.

Neben den humanen Cathepsinen sind Cystein-Proteasen in vielen weiteren Organismen identifiziert worden. In Tab. 1.3 ist eine Auswahl an verschiedenen parasitären, bakteriellen und viralen Cystein-Proteasen und deren Vorkommen dargestellt.

**Tab. 1.3:** Nicht-humane Cystein-Proteasen

Erreger	Enzym	Funktion	Erkrankung
<b>Parasit</b>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falcipain 1	Oocysten-Produktion (sexueller Zyklus)	Malaria
	Falcipain 2a/b	Hydrolyse von Hämoglobin in den Trophozoiten	
	Falcipain 3	(asexueller Zyklus)	
<i>T. b. rhodesiense</i>	Rhodesain	Replikation des Parasiten	Schlafkrankheit
<i>T. cruzi</i>	Cruzipain	Ernährung des Parasiten <sup>18</sup>	Chagas-Krankheit
<b>Virus</b>			
TGEV	TGEV M <sup>pro</sup>	virale Replikation und Transkription	Durchfallerkrankung (bei Schweinen)
humanes SARS-Coronavirus	SARS-CoV M <sup>pro</sup>	virale Replikation und Transkription	SARS
<b>Bakterium</b>			
<i>S. aureus</i>	Sortase	Transpeptidase-Aktivität bei Zellwandaufbau, Virulenzfaktor <sup>19</sup>	bakterielle Infektion

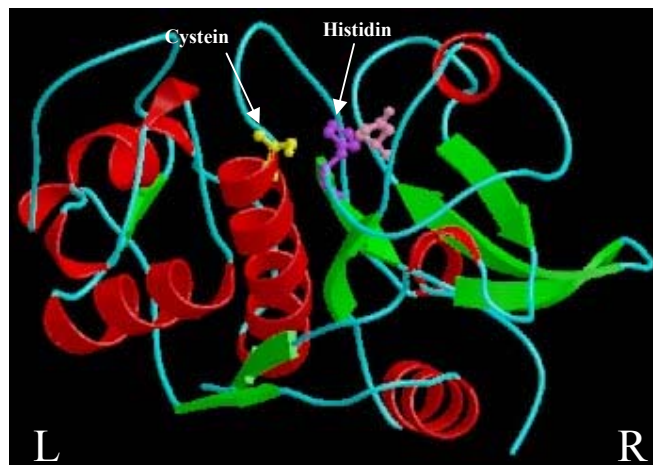
SARS-CoV M<sup>pro</sup>: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Hauptprotease; TGEV M<sup>pro</sup>: Transmissible Gastroenteritis Virus Hauptprotease; *T. b.*: *Trypanosoma brucei*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

Zu den parasitären Cystein-Proteasen gehören z.B. die Falcipaine. Sie werden von dem Erreger *Plasmodium falciparum* exprimiert, der eine der gefährlichsten Arten von Malaria auslöst. Die Falcipaine nehmen dabei unterschiedliche Aufgaben wahr. So wurde festgestellt, dass das Falcipain 1 im sexuellen Zyklus des Parasiten in der die Krankheit übertragenden *Anopheles*-Mücke bei der Produktion der Oocysten eine wichtige Rolle einnimmt.<sup>20</sup> Im Gegensatz dazu sind die Falcipaine 2a/b und 3 im asexuellen Zyklus, der sich in menschlichen Erythrocyten abspielt, z.B. an der Hydrolyse von Hämoglobin im Trophozoiten beteiligt.<sup>21, 22</sup>

## 1.2. Strukturen von Cystein-Proteasen des Clans CA

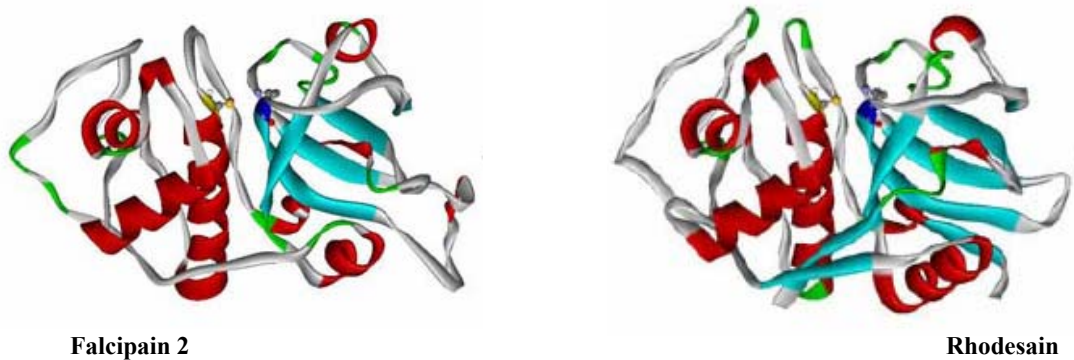
Alle Cystein-Proteasen werden zunächst als Präproenzyme aus dem genetischen Code translatiert. Die Signal-Peptide in diesem Präproenzym, die für den Transport ins endoplasmatische Retikulum (ER) verantwortlich sind, haben je nach Cystein-Protease eine Länge zwischen 10 und 20 Aminosäuren. Das Signal-Peptid wird erst nach der Lokalisation im ER abgespalten. Für die Stabilisierung im neutralen pH des ER, die richtige Faltung des aktiven Zentrums und den Transport in das endosomale-lysosomale Kompartiment ist die Prodomäne verantwortlich. Sie hat eine relativ variable Größe, liegt aber bei den meisten Cystein-Proteasen zwischen 95 und 110 Aminosäuren. Eine weitere wichtige Funktion der Prodomäne stellt die Inhibition der katalytischen Domäne dar. Somit wird verhindert, dass das Enzym schon vor Erreichen der Zielregion aktiviert wird. Die Propeptidkette bindet dafür entgegengesetzt zur Bindung des Substrats in den Bindungsspalt. Nach Abspaltung der Prodomäne bleibt dann die katalytische Domäne übrig, die eine Größe zwischen 220 und 260 Aminosäuren hat.

Cystein-Proteasen des Clans CA sind 2-Domänen-Proteine bestehend aus einer L- und R-Domäne (Abb. 1.1), die durch eine V-förmige Spalte getrennt sind. Dabei enthält die L-Domäne innerhalb einer  $\alpha$ -Helix das für die hydrolytische Spaltung benötigte Cystein, die R-Domäne das Histidin. Die Faltung der Proteasen ist dabei hochkonserviert. Die meisten Papain-ähnlichen Proteasen aus der Subfamilie C1A liegen als Monomere vor.



**Abb. 1.1:** Struktur von Cathepsin S

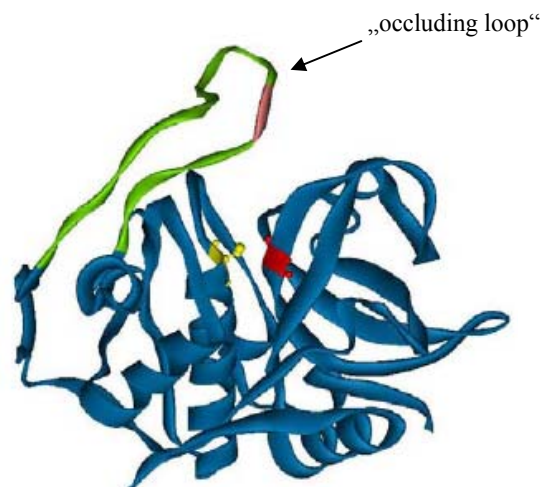
Die humanen und parasitären Cathepsinen werden innerhalb ihrer Gruppe unterteilt in Cathepsin-L-, Cathepsin-B- und Cathepsin-F-ähnliche Enzyme. Die Einteilung wird anhand von wiederkehrenden Aminosäure-Sequenzen / charakteristischen Motiven vorgenommen.<sup>23</sup>



**Abb. 1.2:** Cathepsin-L-like Cystein-Proteasen

Betrachtet man die Abb. 1.2, kann man am Beispiel von Falcipain 2 und Rhodesain die hohe Homologie der Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Proteasen feststellen.

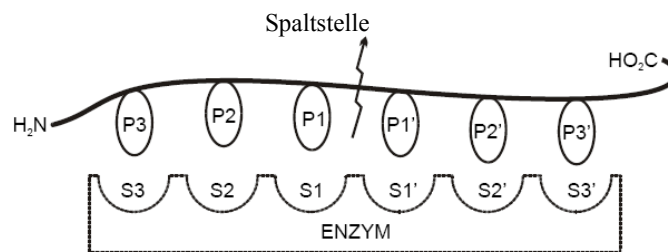
Eine Sonderstellung nehmen die Cathepsin-B-ähnlichen Cystein-Proteasen ein. Sie besitzen nicht nur die Funktion einer Endopeptidase, sondern haben auch eine Exopeptidase-Aktivität, für die der sog. „occluding loop“ verantwortlich ist (Abb. 1.3).<sup>9</sup>



**Abb. 1.3:** Struktur von Cathepsin B

Dieser enthält zwei Histidin-Reste (His110 und His111). Bindet nun ein Substrat mit seinem C-terminalen Carboxylat daran, wird die Abspaltung eines Dipeptids ermöglicht. Diese Fähigkeit des Enzyms nennt man auch Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität.

Die Nomenklatur der Enzym-Bindungstaschen wird nach Berger und Schechter vorgenommen. Ausgehend von der Spaltstelle im Enzym in Richtung N-Terminus des Substrats / Inhibitors werden diese mit S1-Sn bezeichnet, in Richtung C-Terminus mit S1'-Sn'. Die Aminosäuren des Substrats / Inhibitors werden dementsprechend mit P1-Pn bzw. P1'-Pn' deklariert (Abb. 1.4).<sup>24</sup>

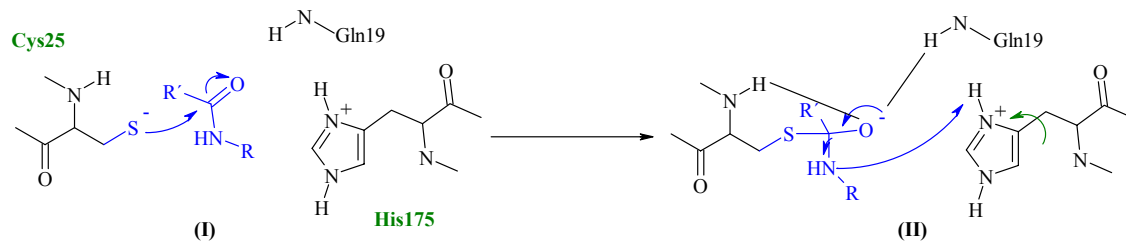


**Abb. 1.4:** Nomenklatur nach Berger und Schechter

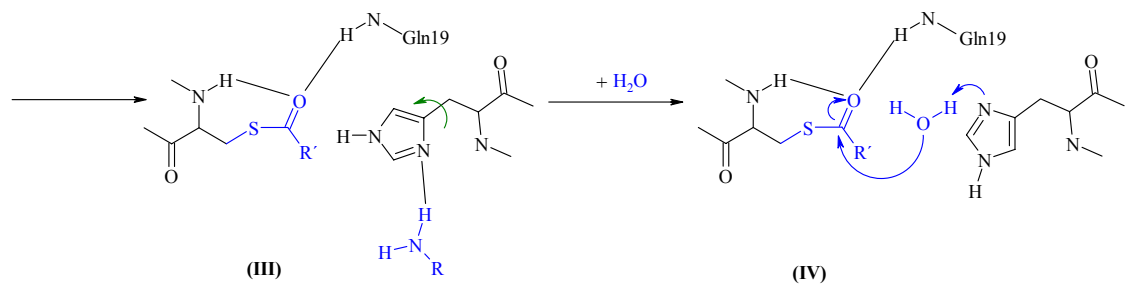
### 1.3. Katalytischer Mechanismus

Alle Cystein-Proteasen haben das katalytische Zentrum gemeinsam. Dieses besteht aus Cystein (Cys25) und Histidin (His159) (Papain-Nummerierung). Außerdem ist indirekt an dem Mechanismus ein Asparagin (Asn175) beteiligt.<sup>23</sup> Das Cystein und das Histidin liegen präkatalytisch als Ionenpaar vor, anders als z.B. bei den Serin-Proteasen. Zusätzlich wird diese Diade durch eine Wasserstoffbrücke zu Asn175 stabilisiert. Die Thiolgruppe eines Cysteins hat normalerweise einen pKs-Wert von etwa 8, im aktiven Zentrum einer Cystein-Protease sinkt dieser allerdings auf etwa 3 bis 4. Die Ursache dafür scheint die Wechselwirkung mit der  $\alpha$ -Helix, in der das katalytische Zentrum sitzt, zu sein.

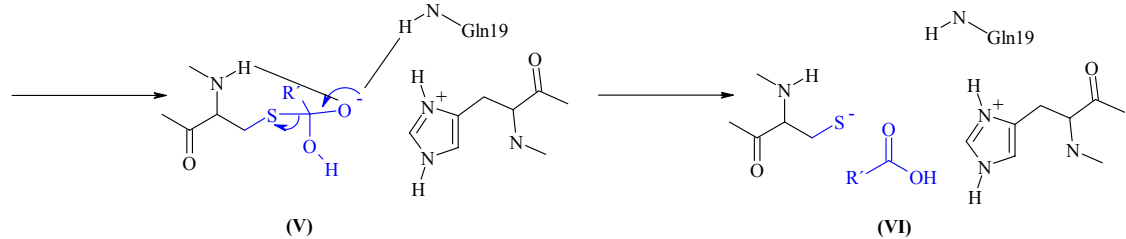
Der katalytische Mechanismus ist im Folgenden aufgeführt:



Der erste Schritt in der Hydrolyse von Peptiden durch Cystein-Proteasen erfolgt durch den nucleophilen Angriff des Thiolats im katalytischen Zentrum der Protease am Carboxyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptid-Bindung **(I)**. Es entsteht ein negativ geladenes tetraedrales Intermediat **(II)**, das durch eine Art Tasche aus verschiedenen Wasserstoffbrückendonatoren des Proteinrückgrats (im Falle von Papain durch die Seitenkette von Gln19 und benachbarter Aminosäuren) stabilisiert wird. Diese Tasche wird auch „oxyanion hole“ genannt.



Aus dem tetraedraren Intermediat entsteht weiter ein acyliertes Enzym (Thioester) **(III)**. Dabei wird gleichzeitig die Peptid-Bindung des Substrates gespalten. Die acylierte Thiol-Gruppe der Cystein-Protease wird dann durch Wasser hydrolysiert, wobei das Histidin die Rolle einer Base übernimmt **(IV)**.



Durch Abspaltung der Carboxyl-Funktion von der Thiolgruppe des Enzyms wird die regenerierte, freie Cystein-Protease wiedergewonnen **(V + VI)**.<sup>25</sup>



## 1.4. Inhibitoren von Cystein-Proteasen

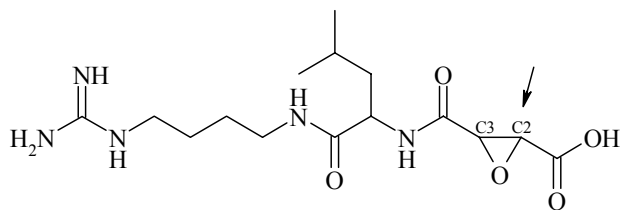
Die meisten bisher bekannten Inhibitoren von Cystein-Proteasen wurden über den klassischen Substrat-basierten Weg entwickelt. Dieser passt den Aufbau des Inhibitors einem bekannten Substrat an, um eine möglichst gute Affinität zum Enzym zu gewährleisten, und benötigt außerdem noch eine reaktive Kopfgruppe, die auch als „warhead“ bezeichnet wird. Der auf dem Substrat basierende Teil des Inhibitors besteht oft aus einer Peptidkette, die als Erkennungssequenz dient, um die reaktive Kopfgruppe ins katalytische Zentrum des Enzyms zu bringen. Der Nachteil dieses Entwicklungs-Konzeptes ist allerdings, dass die dem Substrat ähnlichen Peptidketten leicht hydrolytischer Spaltung unterworfen sind und damit nur eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen. Daher versucht man diese Peptidketten durch Abwandlung des Peptidrückgrats, der Aminosäuresequenz oder durch Einbau unnatürlicher Aminosäuren zu verändern, und so zu Peptidomimetika umzuwandeln. Die elektrophile Kopfgruppe, der „warhead“, soll dann die Thiol-Funktion des katalytischen Zentrums blockieren, und somit eine Hemmung des Enzyms bewirken.

Man unterscheidet zwischen kovalent bindenden und nicht-kovalent bindenden Hemmstoffen. Es sind allerdings nur wenige Inhibitoren beschrieben, die ausschließlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Cystein-Proteasen binden, darunter sind Peptidsulfone und Sulfonsäure-Derivate.<sup>26, 27</sup>

Bei den kovalent bindenden Inhibitoren unterscheidet man nochmal zwischen reversibel und irreversibel hemmenden Substanzen. Setzt man Aldehyde, Ketone oder  $\alpha$ -Ketosäuren als reaktive Kopfgruppe ein, so findet durch Bildung eines Halbacetals bzw. -ketals eine reversible Hemmung statt. Im Falle von Fluormethyl- oder Diazomethylketonen, Epoxy-succinaten, Aziridinen, Acyloxymethylketonen oder *O*-Acylohydroxamaten wird die Cystein-Protease durch Alkylierung oder Acylierung irreversibel gehemmt.<sup>28</sup>

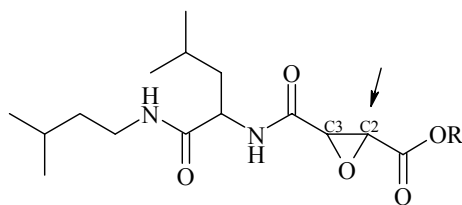
### 1.4.1. Epoxysuccinyl-Derivate

Eines der am besten untersuchten Epoxysuccinylpeptide ist E-64, das ein sehr aktiver, irreversibler Inhibitor von Cystein-Proteasen ist. Dieser Naturstoff wurde zum ersten Mal 1978 aus dem Pilz *Aspergillus japonicus* isoliert und ist ein wichtiges diagnostisches Reagenz für die Identifizierung von Cystein-Proteasen.<sup>29, 30</sup>

E-64 aus *Aspergillus japonicus*

Die für die Hemmung wichtige reaktive Kopfgruppe dieser Substanz ist die *trans*-L-(*S,S*)-Epoxybernsteinsäure. Bei der irreversiblen Hemmung wird die C2-Position des Epoxids vom katalytischen Zentrum der Protease angegriffen.

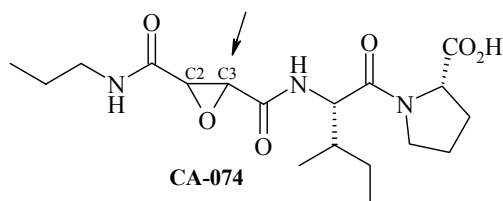
Von diesem Naturstoff ausgehend wurden verschiedene andere Epoxysuccinyl-Derivate synthetisiert. Das zellgängige Loxistatin (E-64d) ist ein Beispiel dafür. Es ist das Prodrug von E-64c und wird erst *in vivo* durch unspezifische Esterasen zur freien Säure hydrolysiert. Genau wie E-64 wird es an der C2-Position des Epoxid-Rings durch die Protease angegriffen.



R: Et, **Loxistatin (E-64d)**  
 R: H, **E-64c**

Die Substanz wurde in Japan in einer klinischen Studie gegen Muskeldystrophie getestet. Die Studie musste allerdings in der klinischen Phase III gestoppt werden, da das Loxistatin in Ratten Leberschäden verursachte.<sup>31</sup>

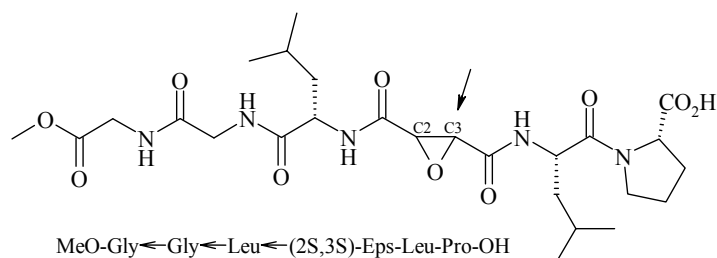
Eine weitere interessante Verbindung ist das CA-074, das selektiv Cathepsin B hemmt. Der Angriff des Enzyms erfolgt bei dieser Klasse von Substanzen allerdings nicht an C2- sondern an C3-Position der reaktiven Kopfgruppe. Das Ile-ProOH-Motiv ist dabei für die Cathepsin-B-Spezifität dringend notwendig, da es über ionische Wechselwirkungen an die beiden Histidin-Reste des „occluding loops“ der Protease bindet.



CA-074

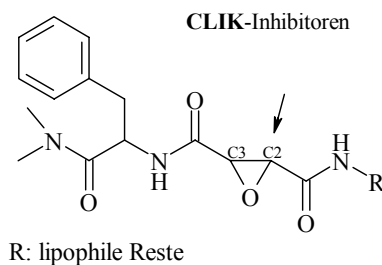
Durch Veränderung der Struktur von CA-074 wurde festgestellt, dass die freie Carbonsäure am Prolin für die Cathepsin-B-Selektivität und die Potenz des Inhibitors essentiell ist. Bei einer Studie an *Leishmania-major*-infizierten Mäusen zeigte sich, dass die mit diesem Wirkstoff behandelten Tiere eine Resistenz gegen den Erreger entwickelten und sich auch die Immun-Antwort der Tiere verändert wurde.<sup>32</sup>

Zu einer weiteren Klasse von Epoxysuccinyl-Derivaten gehört das MeO-Gly←Gly←Leu←-(2*S*,3*S*)-Eps-Leu-Pro-OH. Es besitzt sowohl an Position C2 als auch C3 eine Peptidkette.



Die Verbindung gehört ebenso zu den Cathepsin-B-selektiven Inhibitoren. Dies kommt durch das Tripeptid-Motiv MeO-Gly-Gly-Leu zustande, das die Aktivierungssequenz des Propeptides von Cathepsin B repräsentiert.<sup>33</sup>

Ein Beispiel für Cathepsin-L-selektive Inhibitoren stellt die von Katunuma entwickelte Serie von Epoxysuccinyl-Derivaten, die so genannte CLIK-Serie (= Cathepsin L Inhibitoren Katunuma), dar.



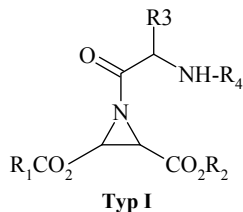
Diese Serie beinhaltet sieben Substanzen, die alle das Motiv *trans*-Eps-Phe-NMe<sub>2</sub> gemeinsam haben, das für die Selektivität an Cathepsin L verantwortlich ist, und in der P2'-Position einen großen lipophilen Rest besitzen.<sup>34</sup>

Es wurden noch weitere Cystein-Protease-Inhibitoren mit Epoxysuccinyl-Funktion als reaktive Kopfgruppe entwickelt, die alle die *trans*-Konfiguration am Epoxid-Ring gemeinsam haben, auf die hier im weiteren aber nicht eingegangen werden kann.<sup>35</sup>

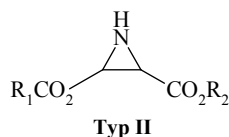
### 1.4.2. Aziridinyl-Derivate

Die Aziridinylpeptid-Derivate sind Aza-Analoga der Epoxysuccinyl-Derivate. Die Hemmwirkung dieser Klasse von Inhibitoren geht genauso wie bei den Epoxisuccinyl-Derivaten auf die nucleophile Ringöffnung durch das katalytische Zentrum zurück. Ein Unterschied zwischen Epoxysuccinyl- und Aziridinyl-Derivaten besteht in der Substituierbarkeit des Ringstickstoffes und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei Aziridine sowohl Donoren als auch Akzeptoren und Epoxide nur Akzeptoren sind. Außerdem wird bei der Hemmung der Cystein-Proteasen bei Aziridinyl-Derivaten, anders als bei den Epoxysuccinyl-Derivaten, die meist als (*S,S*)-Isomere am wirksamsten sind, weder die *S,S*- noch die *R,R*-Konfiguration am Aziridin-Ring bevorzugt. Die *trans*-Konfiguration ist für eine Hemmung von Cystein-Proteasen jedoch auch hier unerlässlich.

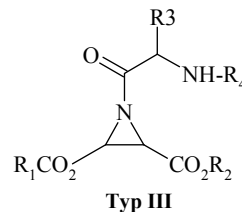
Es werden drei verschiedene Klassen von Aziridinylpeptiden unterschieden, die alle Aziridin-2,3-dicarboxylate darstellen: Typ I sind *N*-acylierte Aziridine mit dem Aziridin-Ring als *C*-Terminus der Peptidkette.; Typ II sind *N*-unsubstituierte Aziridine; Typ III sind *N*-acylierte Aziridine mit der Ring-Funktion in der Mitte der Peptidkette.



R<sub>1</sub>: Et, H; R<sub>2</sub>: Et, Bzl  
 R<sub>3</sub>: Aminosäureketten  
 R<sub>4</sub>: Schutzgruppen, Aminosäuren  
 oder Dipeptide



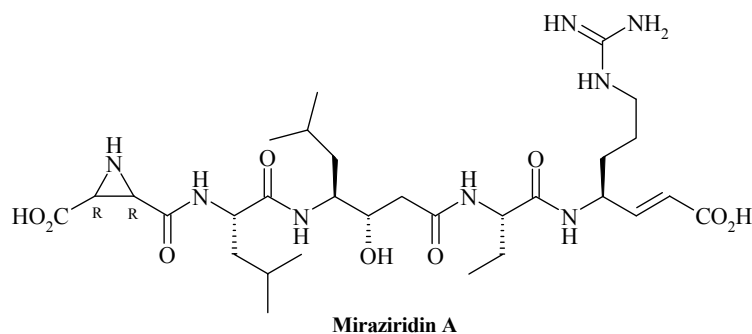
R<sub>1</sub>: Et, H;  
 R<sub>2</sub>: Aminosäuren, Peptide



R<sub>1</sub>: Aminosäuren, Peptide  
 R<sub>2</sub>: Aminosäuren  
 R<sub>3</sub>: Schutzgruppen

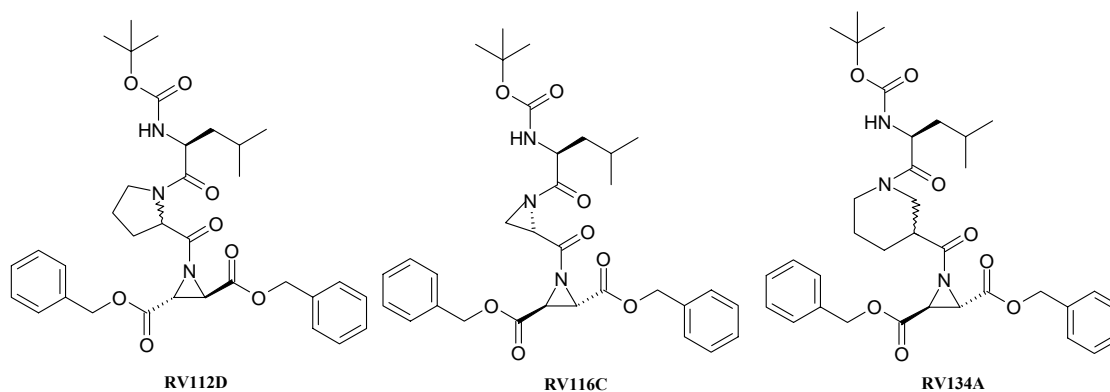
Auch bei dieser Klasse von Inhibitoren kann sowohl die C2- als auch die C3-Position je nach Substanz vom katalytischen Zentrum der jeweiligen Cystein-Protease angegriffen und somit das Enzym irreversibel gehemmt werden. Generell ist die Hemmwirkung der Aziridinyl-Analoga geringer als die der Epoxy-Derivate.

Das Miraziridin A stellt einen aus dem marinen Schwamm *Theonella mirabilis* isolierten Naturstoff dar.



Es beinhaltet in seiner Struktur sowohl eine *R,R*-Konfiguration am Aziridin-Ring als auch ein vinyloges Arginin, das bisher noch in keinem Naturstoff vorher entdeckt wurde, und eine Statin-Gruppe ((*3S,4S*)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure). Diese strukturellen Eigenschaften des Miraziridins A sind für die unspezifische Hemmung nicht nur von Cystein-Proteasen, sondern auch von Serin- und Aspartat-Proteasen verantwortlich. Der  $IC_{50}$ -Wert gegenüber Cathepsin B z.B. beträgt 1.4  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>36</sup>

In unserem Arbeitskreis wurde schon eine große Anzahl an verschiedensten substituierten und unsubstituierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten synthetisiert und an unterschiedlichen Cystein-Proteasen untersucht. Einige Ergebnisse dieser Arbeiten sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1.4) aufgelistet:



**Tab. 1.4:** Hemmdaten der Verbindungen **RV116C**, **RV112D** und **RV134A**

	CL	CB	FP2	RD
	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>RV 112D</b>	0.4	> 100	0.4	0.5
<b>RV 116C</b>	0.013	9.4	0.2	0.3
<b>RV 134A</b>	2.4	24	13.1	1

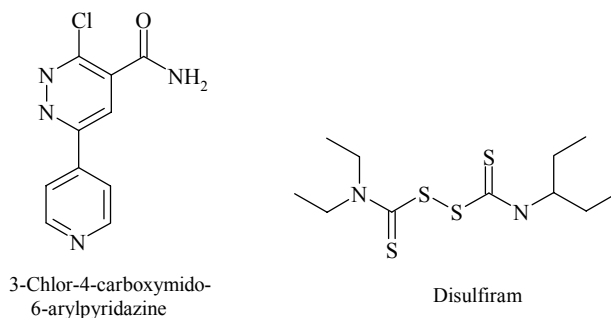
Eine Serie von *R,R*- und *S,S*-Aziridin-2,3-dicarboxylaten, die mit verschiedenen konfigurierten Aminosäuren Leucin und Prolin substituiert sind (z.B. RV 112D), zeigten sowohl eine gute

Hemmung an der humanen Cystein-Proteasen CL als auch an anderen parasitären Cystein-Proteasen wie RD und FP2.<sup>37, 38</sup>

### 1.4.3. Weitere Klassen von Inhibitoren

Da bisher vorwiegend peptidische und peptidomimetische Wirkstoffe entwickelt wurden, sind vergleichbar wenige nicht-peptidische Verbindungen bekannt.<sup>39</sup>

Die 3-Chlor-4-carboxamido-6-acryl-pyridazine gehören zu einer Gruppe von irreversiblen Inhibitoren, die als Wirkstoffe gegen das Interleukin Converting Enzyme (ICE, Caspase-1) dienen. Wahrscheinlich wird durch nucleophile Substitution des Chloratoms in Position 3 des Pyridazinrings durch das aktive Zentrum der Protease die Hemmung bewirkt.



Einen anderer Inhibitor der Caspasen 1 und 3 stellt das zum Alkoholentzug eingesetzte Disulfiram dar, das auch ein Hemmstoff der Alkoholdehydrogenase ist.

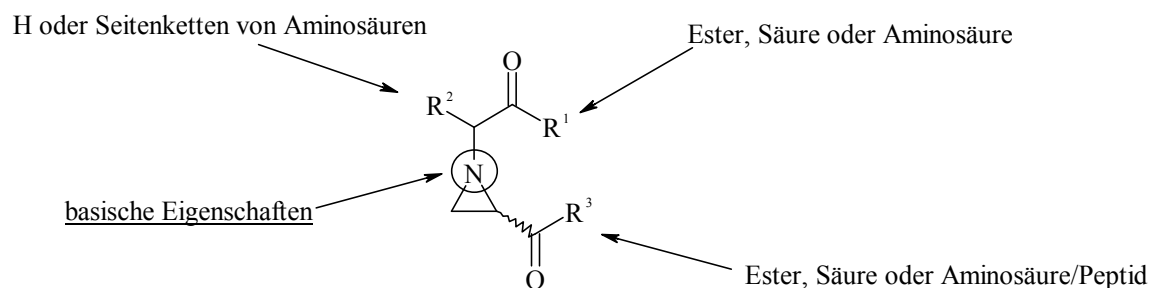
Organotellur-(IV)-Verbindungen hemmen irreversibel Papain und Cathepsin B. Sie sind selektive Inhibitoren von Cystein-Proteasen. Die Aktivität der Enzyme nach Hemmung durch diese Verbindungen kann durch Zusatz von Thiolen regeneriert werden. Das lässt darauf schließen, dass sich Disulfid-Brücken innerhalb der Enzyme durch Oxidation gebildet haben. Es wurden auch noch verschiedene weitere Inhibitor-Klassen, wie Michael-Systeme und Stickstoffmonoxid-Verbindungen, entwickelt, auf die hier im Näheren allerdings nicht weiter eingegangen werden kann.<sup>25, 28</sup>

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Testung von neuen Aziridinen als potentielle neue irreversible Inhibitoren von Cystein-Proteasen.

Die bisher bekannten irreversiblen Inhibitoren von Cystein-Proteasen aus der Gruppe der Aziridine gehören alle zu den Aziridin-2,3-dicarboxylaten. Diese sind entweder am Ring-Stickstoff unsubstituiert oder besitzen eine Carboxyl-Funktion, die mit verschiedenen Aminosäuren und Peptiden modifiziert ist.

Für die Entwicklung neuer Inhibitoren wurden Aziridin-2-carboxylate ausgewählt, die im Unterschied zu den bisher bekannten *N*-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten einen Aziridin-Stickstoff mit basischen Eigenschaften besitzen sollten (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Strukturmerkmale der zu synthetisierenden Aziridin-2-carboxylate

Bei diesen sollte die C3-Position am Stickstoff unsubstituiert bleiben und die C2-Position eine Carboxyl-Gruppe tragen, um die irreversible Hemmung durch eine Cystein-Protease zu begünstigen. Es sollten verschiedene Aminosäuren für den Aufbau der Aziridin-2-carboxylate verwendet werden und an der C2-Position sollte durch Kopplung von unterschiedlichen Aminosäuren eine Modifikation stattfinden. Die synthetisierten Bausteine sollten dann an verschiedenen Cystein-Proteasen getestet werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der Hemmstärke bzw. Selektivität gegenüber Cystein-Proteasen ableiten zu können, die dann für spätere Arbeiten genutzt werden können.

Zur Verwirklichung dieser Ziele sollte eine Synthese entwickelt werden, die die Darstellung einer Vielzahl der gewünschten Aziridin-2-carboxylate sowie deren Modifizierung ermöglicht.

### 3. Synthesen

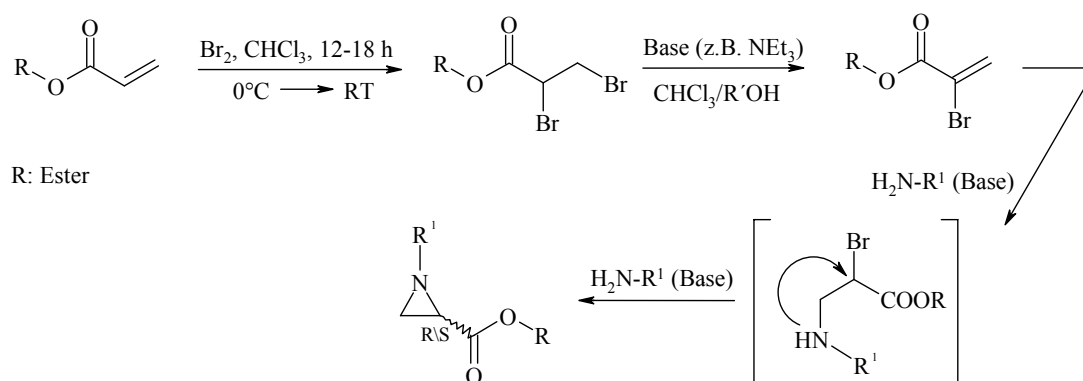
#### 3.1. Synthese-Möglichkeiten zur Darstellung von Aziridin-2-carboxylaten

Aziridin-2-carboxylate können über unterschiedliche Verfahren synthetisiert werden. Diese werden im Folgenden vorgestellt:

##### 3.1.1. Cromwell-Synthese

Ein Weg, um zu Aziridin-2-carboxylaten zu gelangen, verläuft über die Cromwell-Synthese (Abb. 3.1).

Dabei werden  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Acrylsäureester in die jeweilige Dibromverbindung überführt. Anschließend wird mittels einer Base, meist Triethylamin, Bromwasserstoff abgespalten und man erhält ein  $\alpha$ -substituiertes Michael-System. Durch Zugabe eines Amins erhält man das gewünschte Produkt.



**Abb. 3.1:** Cromwell-Synthese

Dabei kann man entweder mit einem Überschuss des eingesetzten Amins arbeiten, das dann gleichzeitig die Funktion einer Base übernimmt, oder man setzt ein Äquivalent des Amins und mindestens zwei Äquivalente einer weiteren Base ein. Der Ringschluss erfolgt über eine zuerst intermolekulare Addition und dann intramolekulare nucleophile Substitution. Die so erhaltenen Aziridin-2-carboxylate liegen dann als Racemate bzw. bei Zugabe eines chiralen Amins, z.B. einer Aminosäure, als Diastereomeren-Gemische vor. Die Ausbeuten liegen zwischen 30-95 %.<sup>40-43</sup> Die  $\alpha$ -substituierten Michael-Systeme können auch mit Ammoniak in



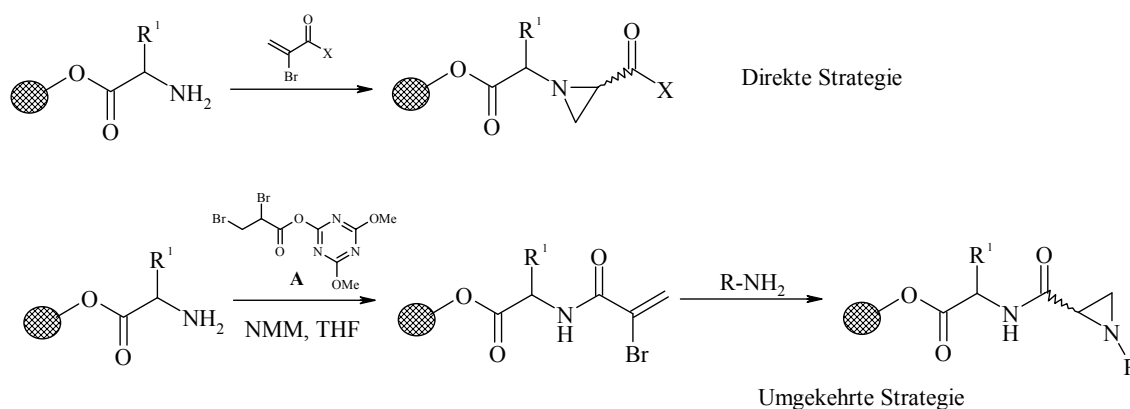
DMSO zum unsubstituierten Aziridin-2-carboxylat in Ausbeuten um die 80 % umgesetzt werden.<sup>44</sup>

Setzt man statt des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Acrylsäureesters eine Amidverbindung ein, muss man durch die dadurch bedingte sterische Hinderung die Reaktionsbedingungen verändern, um das gewünschte Aziridin-2-carboxylat als Produkt zu erhalten. Das Gleiche gilt, wenn man statt eines einfachen Aminosäureesters ein Di- oder Polypeptid einsetzt. Dann funktioniert die Cromwell-Synthese nur unter drastischeren Bedingungen, indem man die Reaktionsmischung über mehrere Stunden refluxieren lässt.<sup>45</sup>

1999 wurde erstmals die Cromwell-Synthese auch an der Festphase durchgeführt (Abb. 3.2).<sup>46</sup> Dabei sind zwei verschiedene Synthese-Strategien zu unterscheiden:

- die direkte und
- die umgekehrte („reversed“)

Die direkte Strategie geht von der an der Festphase gebundenen Aminosäure-Verbindung aus und setzt diese mit dem Michael-Akzeptor in Lösung um. Man beginnt mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure an der Festphase. Nach Entschützung des Stickstoffs mittels DMF und Piperidin folgt das Waschen der Festphase mit DMF. Die Festphase wird dann mit THF gespült und mit einer Lösung aus einem entsprechenden Bromoacrylat und Triethylamin über Nacht umgesetzt. Nach Reaktionskontrolle mittels des Kaiser-Tests wird das Aziridin unter Standard-Konditionen (TFA/H<sub>2</sub>O 95:5) abgespalten.<sup>47</sup>



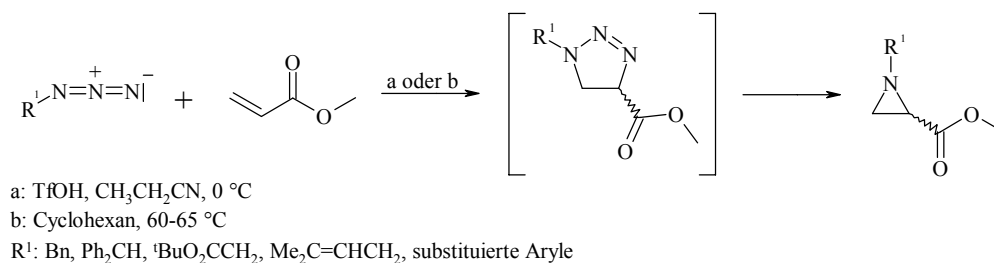
**Abb. 3.2:** Cromwell-Synthese an der Festphase

Die umgekehrte Strategie der Festphasen-Synthese geht ebenfalls vom gleichen Edukt aus und lässt dieses mit aktivierter 2,3-Dibromopropansäure (Verbdg. A) zum Michael-Akzeptor reagieren. Die aktivierte Verbindung A wird benötigt, da zwar die Substitution des Acrylsäurechlorids erfolgreich verläuft, die anschließende Bromierung und Eliminierung aber einen

hohen Anteil an Nebenprodukten liefert. Je nach Lösungsmittel unterscheiden sich die Ausbeuten stark, dabei werden die besten Ergebnisse mit THF oder  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  erreicht.<sup>46</sup>

### 3.1.2. Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Triazoline

Bei dieser Variante zur Synthese von Aziridin-2-carboxylaten werden ein Acrylsäuremethylester und ein substituiertes Azid eingesetzt. Man kann die Reaktion mittels einer Brønsted-Säure unter sehr milden, nicht reduktiven Bedingungen katalysieren. Dabei muss aber die Auswahl des Acrylsäure-Derivats beachten werden, da Verbindungen, die einen Lewis-basischen Sauerstoff besitzen, über eine Tandem-Reaktion verschieden substituierte Oxazolidine bilden (Abb. 3.3: Weg a).<sup>48</sup>



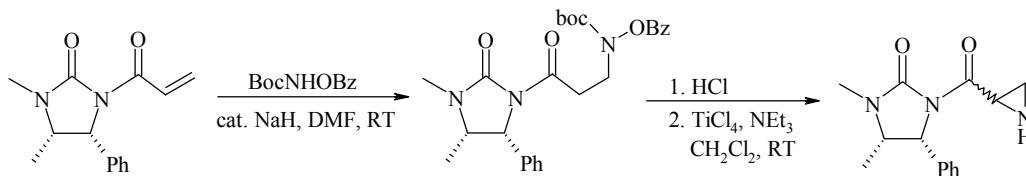
**Abb. 3.3:** Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Triazoline

Man kann auch die Reaktionspartner in Cyclohexan erhitzen und erhält dann die *R*- und *S*-konfigurierten Aziridin-2-carboxylate (Abb. 3.3: Weg b). Diese Reaktion wurde allerdings bisher nur mit Aryl-substituierten Aziden durchgeführt. Die Produkte erhält man dabei in Ausbeuten von 7-99 % je nach verwendetem Azid.<sup>49</sup> Bei beiden Reaktionbedingungen läuft die Produktbildung über eine 1,3-dipolare Cycloaddition, wobei als Intermediat mittels Kristallstruktur das Triazolidin nachgewiesen wurde.

### 3.1.3. Diastereoselektive Synthese von Aziridin-2-carboxylaten

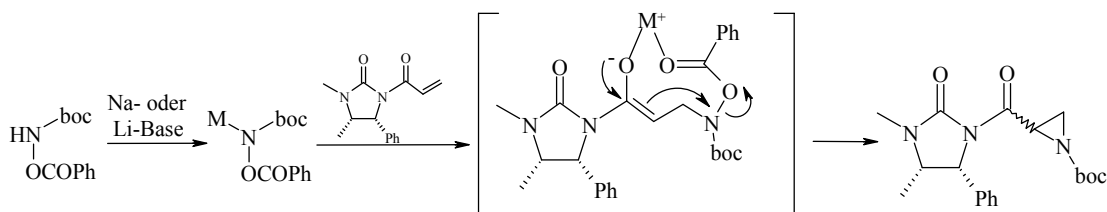
Das Aziridin-2-carboxylat wird in dieser Synthese über eine intramolekulare Cyclisierungsreaktion eines intermediären Enolats gebildet. Das eingesetzte Olefin wird zunächst durch Michael-Addition mit dem *Boc*-geschützten Hydroxylamin umgesetzt. Die Schutzgruppe am Stickstoff wird dann mit  $\text{HCl}$  abgespalten. Die erhaltene Verbindung wird mit Titan(IV)-chlorid und Triethylamin als Base zum gewünschten Aziridin-2-carboxylat umgesetzt (Abb.

3.4). Durch die eingesetzte Base bildet sich das Enolat, das dann intramolekular unter Abspaltung von Benzylalkohol zum Aziridinring cyclisiert. Dabei dient die Lewis-Säure als Katalysator der Reaktion.<sup>50</sup>



**Abb. 3.4:** Diastereoselektive Synthese von Aziridin-2-carboxylaten

Will man als Produkt ein am Stickstoff substituiertes Aziridin-2-carboxylat erhalten, dann verändern sich die Bedingungen der Aziridinierung, da bei Einsatz von Titan-(IV)-chlorid und Triethylamin die Cyclisierung zum Aziridin bei substituierten Aminen nicht erfolgt. Es wurden deswegen als neue Basen LiHMDS, NaH oder BuLi eingesetzt. Bei Verwendung von diesen bildet sich das intermediäre Lithium- bzw. Natrium-Salz des Enolates (Abb. 3.5), das dann zum Aziridin cyclisieren kann.<sup>51</sup>



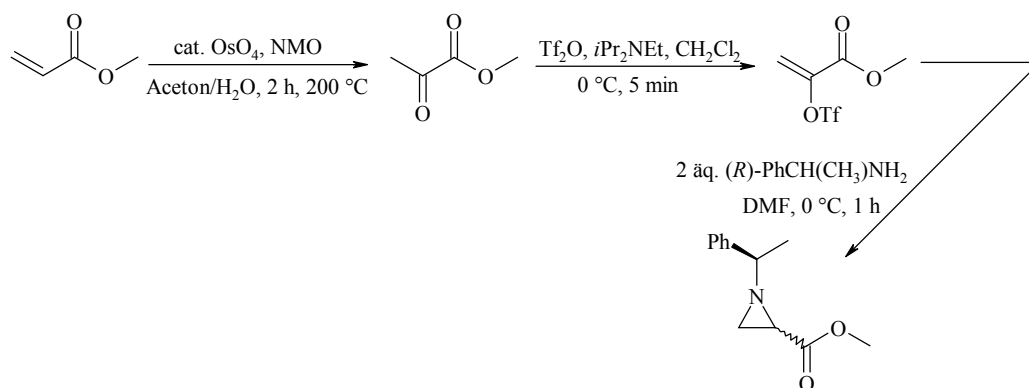
**Abb. 3.5:** Synthese eines am Stickstoff substituierten Aziridin-2-carboxylats

Je nach eingesetztem Lösungsmittel und Temperatur schwanken die Ausbeuten, wobei das (*R*)-Isomer des Aziridins in einem hohen Überschuss (~ 80/20) erhalten wird, da durch die Komplexbildung der beiden Carbonylfunktionen mit dem Metallion im Übergangszustand bevorzugt ein *Re*-Angriff stattfindet.

### 3.1.4. Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Vinyltriflate

Die Synthese des  $\alpha$ -Ketoesters findet über eine Oxidation des Methylacrylats mit katalytisch eingesetztem Osmium-(IV)-oxid statt. Dieses wird dann mittels eines Triflatethers und einer

Base zum Vinyltriflat umgesetzt.<sup>52</sup> Das erhaltene Produkt wird in guten Ausbeuten erhalten, ist allerdings nur eine geringe Zeitspanne stabil und muss deswegen sofort umgesetzt werden.

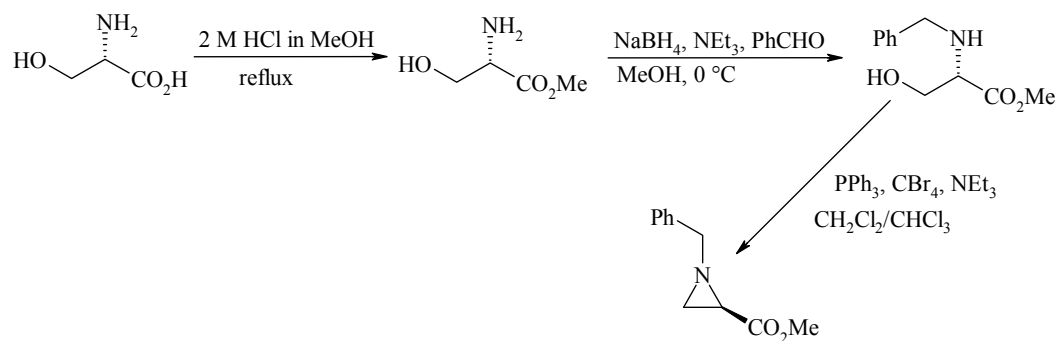


**Abb. 3.6:** Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über Vinyltriflate

Das Aziridin-2-carboxylat erhält man dann über eine Michael-Addition eines entsprechenden chiralen Amins und anschließende intramolekulare Substitution/Cyclisierung, wobei der Triflatether als Abgangsgruppe dient (Abb. 3.6). Die Reaktionszeit beträgt dabei nur 1 Stunde. Das Produkt liegt als Diastereomeren-Gemisch in einem Verhältnis 1:1 vor.<sup>53</sup>

### 3.1.5. Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über *L*-Serin

*L*-Serin wird zuerst säurekatalytisch in sein Methylesterhydrochlorid überführt. Es kann aber auch zu jedem anderen Ester derivatisiert werden. Es folgt eine reduktive Aminierung unter basischen Konditionen mittels Triethylamin und Benzaldehyd zum (*S*)-*N*-Benzylserinmethylester.<sup>54</sup>



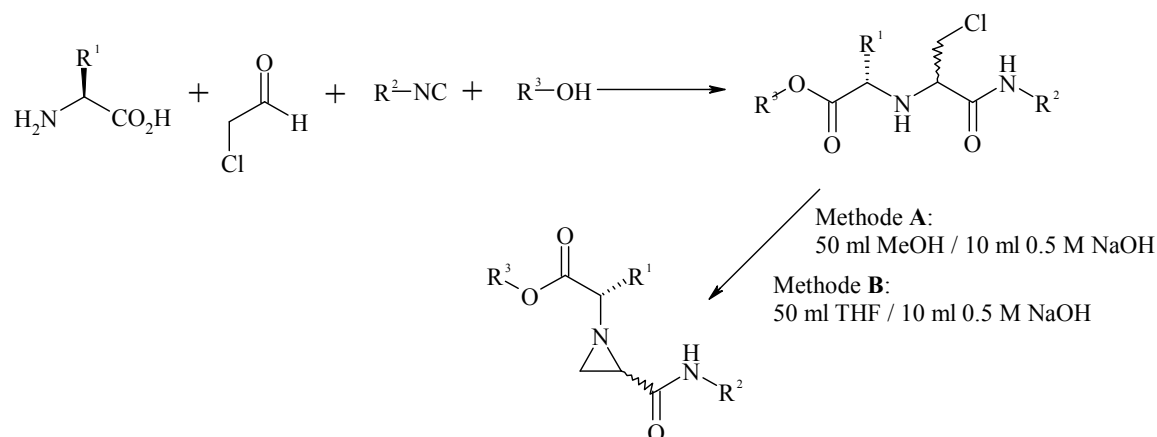
**Abb. 3.7:** Synthese von Aziridin-2-carboxylaten über *L*-Serin

Durch Reaktion mit Triphenylphosphin wird dann der Alkohol zum entsprechenden Triphenylether derivatisiert. Durch Zugabe der Base findet eine intramolekulare Cyclisierung zum enantiomerreinen (*R*)-Aziridin-2-carboxylat unter Abspaltung des Triphenylalkohols statt (Abb. 3.7).<sup>55</sup> Die Synthese kann auch ausgehend von *L*-Serin bzw. *L*-Serinmethylester über einen Trityl-geschützten Stickstoff ablaufen. Dabei wird dann der Alkohol mittels Methansulfonsäurechlorid in das entsprechende Methansulfonat umgewandelt.<sup>56</sup> Intramolekular findet dann durch nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares der Aminogruppe eine Cyclisierung zum Aziridin-2-carboxylat unter Abspaltung des Methansulfonats statt.<sup>57</sup>

### 3.1.6. Synthese von Aziridin-2-carboxylaten *via* Ugi-Reaktion

Die Ugi-Reaktion ist eine Vielkomponenten-Synthese, bei der ausgehend von drei oder mehr Substanzen mittels einer „Eintopf“-Reaktion das gewünschte Produkt dargestellt wird. Der letzte Schritt in dieser Reaktion muss *de facto* irreversibel sein, damit das Produkt nicht wieder zu seinen Edukten reagiert.<sup>58</sup>

Die Synthese der Aziridin-2-carboxylate läuft in diesem Fall über zwei Schritte: erstens die Ugi-Reaktion mittels einer chiralen Aminosäure, einem Aldehyd, einem Isonitril und einem Nucleophil, meist einem Alkohol, der gleichzeitig auch als Lösungsmittel dient. Es wird alles zusammen bei RT gerührt und nach etwa 16 h aufgearbeitet. Man erhält das 1,1'-Imino-dicarbonsäure-Derivat, das dann weiter umgesetzt wird, in dem es mit 5:1 Methanol/Natriumhydroxid (0.5 M; Methode A) refluxiert wird. Statt des Methanols kann auch THF (Methode B) verwendet werden (Abb. 3.8).



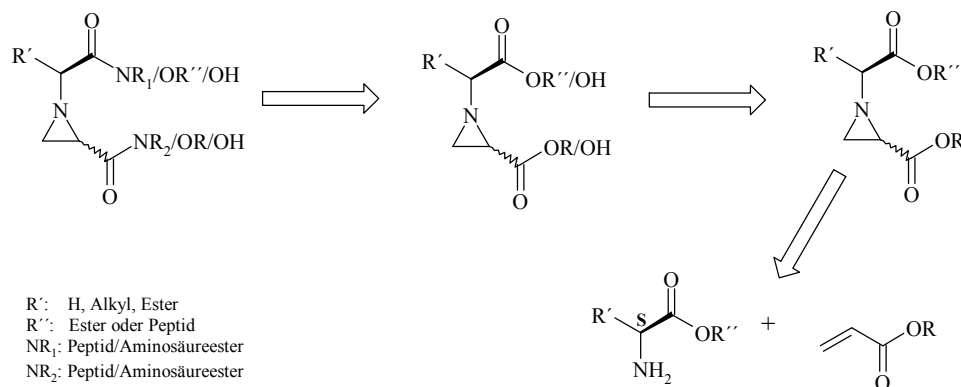
**Abb. 3.8:** Synthese von Aziridin-2-carboxylaten *via* Ugi-Reaktion

Die Bildung des Aziridin-2-carboxylats findet durch eine intramolekulare Cyclisierung statt, wobei das Chlor als Abgangsgruppe fungiert. Die so synthetisierten Aziridin-2-carboxylate liegen als Diastereomeren-Gemische vor, wobei der Diastereomeren-Überschuss (de %) je nach eingesetzten Edukten zwischen 48 und 57 % liegt. Die Ausbeuten betragen zwischen 30 und 65 %.

### 3.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde entschieden, die Aziridin-2-carboxylate über die Cromwell-Synthese (Abb. 3.1) darzustellen, da diese einen einfachen und kostengünstigen Zugang zu den gewünschten Derivaten der Aziridin-2-carboxylate bietet.

Für die erste Serie der Aziridin-2-carboxylate sollten als Edukte verschiedene *S*-konfigurierte Aminosäureester und Acrylsäuremethylester verwendet werden. Nach der Cyclisierung zum Aziridinring sollte dann einer der beiden Ester zur Säure-Funktion hydrolysiert werden, um eine Kopplung von unterschiedlichen *S*-Aminosäuren zu ermöglichen (Abb. 3.9).



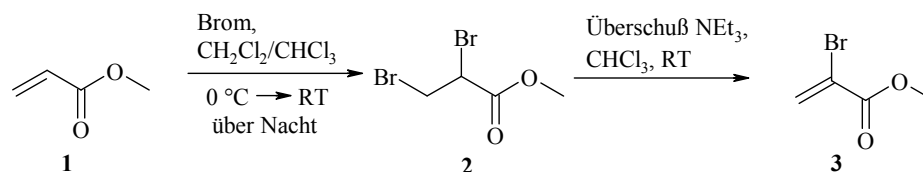
**Abb. 3.9:** Syntheseplanung von Aziridin-2-carboxylaten

Sowohl die Bausteine der Aziridin-2-carboxylate als auch die Derivate sollten dann an verschiedenen Cystein-Proteasen getestet werden.

#### 3.2.1. Synthese der Aziridin-2-carboxylat-Bausteine über Cromwell-Synthese

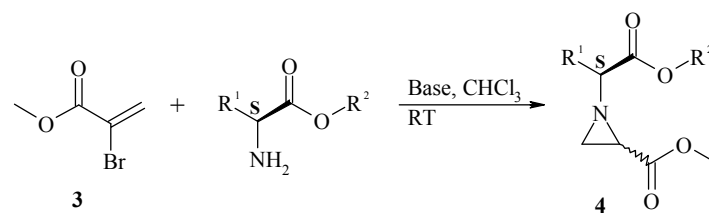
Bei der Cromwell-Synthese findet zuerst eine Bromierung des Acrylsäuremethylesters (**1**) in Dichlormethan statt. Die Reaktionsmischung wird unter langsamen Zutropfen eines

Überschusses an Brom in Dichlormethan im Eisbad bei 0 °C gekühlt. Über Nacht erwärmt sich dann die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur.<sup>59</sup>



Das überschüssige Brom wird mit Natriumthiosulfat-Lösung deaktiviert und die restliche organische Phase dann mit ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt und mit Natriumsulfat getrocknet. Beim Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. muss darauf geachtet werden, dass die Temperatur des Wasserbades 40 °C nicht übersteigt, da sich das Methyl-2,3-dibromopropanoat (2) ansonsten zersetzt. Die Ausbeuten liegen etwa bei 98 %. In der Literatur sind Ausbeuten um die 95 % angegeben.<sup>60</sup> Durch Zugabe eines Überschusses an Base, in diesem Fall Triethylamin, zum in Chloroform gelösten Methyl-2,3-dibromopropanoat wird HBr abgespalten, und es entsteht das Methyl-2-bromoacrylat (3). Nach 2 Std. Rühren und Aufarbeitung der Reaktionsmischung wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, wobei man auch hier auf Grund der Zersetzungsgefahr der synthetisierten Verbindung auf die richtige Temperatur (40 °C) des Wasserbades achten muss. Die Ausbeuten lagen im Unterschied zur Literatur (92 %), in der ausgehend vom Methylacrylat *in situ* das Methyl-2-bromoacrylat (3) hergestellt wird, nur um die 70 %.<sup>59</sup>

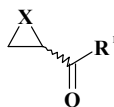
Das Methyl-2-bromoacrylat (3) wird dann bei RT mit einem Salz eines S-Aminosäureesters und mindestens einem zweifachen Überschuss an Base umgesetzt.



Base: NEt<sub>3</sub>, NMM

Bei einigen Synthesen wurde anstatt des Methyl-2-bromoacrylats (3) das Methyl-2,3-dibromoacrylat (2) eingesetzt, was auch zu guten Ausbeuten und einer Verkürzung des Reaktionsweges führte. Als Base wurde für die Synthese entweder Triethylamin oder *N*-Methylmorpholin verwendet.

Die eingesetzten Aminosäureester waren alle *S*- bzw. *L*-konfiguriert. Je nach verwendetem *S*-Aminosäureester liegen die Ausbeuten zwischen 9 und 94 %. Dabei werden die Aziridin-2-carboxylate (**4**) in unterschiedlichen diastereomeren Verhältnissen erhalten (s. Tab. 3.1), die mittels NMR-Spektroskopie anhand der Integrale der Protonen am Aziridinring ermittelt werden konnten (s. Kapitel 3.3).



**Tab. 3.1:** Synthetisierte Aziridin-2-carboxylate mit Ester an 2-Position

Nr.	R <sup>1</sup>	X	R	Diastereomeren-Überschuss <sup>+</sup> (de in %)	Reaktionszeit (h)	Ausbeute (%)
<b>4.1a</b>			Me		24	50
<b>4.1b</b>	OMe	RO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N	Bn	Enantiomere	32	46
<b>4.2a</b>			Me	9	2.5	10
<b>4.2b</b>	OMe		Bn	33	28	41
<b>4.3a</b>			Me	17	8	15 + 21*
<b>4.3b</b>	OMe		Bn	23	16	88
<b>4.4a</b>			Me	~	6	78
<b>4.4b</b>	OMe		Bn	~	6	48
<b>4.5a</b>			Me	9	4	17
<b>4.5b</b>	OMe		Bn	9	6	12 + 9*
<b>4.5c</b>			<i>t</i> -Bu	29	96	31
<b>4.6a</b>	OMe		Me	17	15	24
<b>4.7b</b>	OMe		Bn	57	6	56
<b>4.8a</b>			Me	~	12	94
<b>4.8b</b>	OMe		Bn	~	16	40
<b>4.9a</b>			Me	~	24	23
<b>4.9b</b>	OMe		Bn	~	24	40
<b>4.10a</b>			Me	41	4	85
<b>4.10b</b>	OMe		Bn	9	10	29

\*Diastereomere getrennt bzw. angetrennt, ~: Diastereomerenverhältnis konnte nicht bestimmt werden; <sup>+</sup> bezogen auf das Diastereomergemisch.

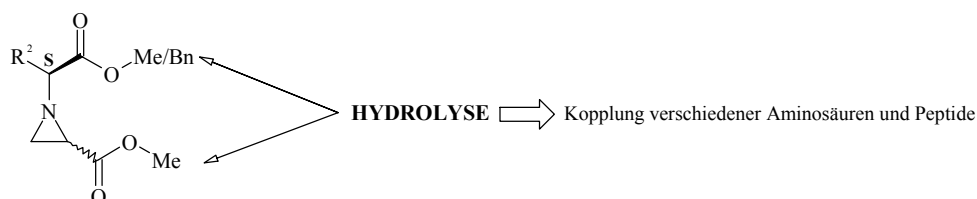


Die diastereomeren Aziridin-2-carboxylate (**4.3a**, **4.5b**), die aus *S*-Alaninmethyl- oder *S*-Asparaginsäurebenzylester synthetisiert wurden, konnten bei der säulenchromatographischen Aufreinigung mittels Kieselgel getrennt oder angetrennt werden. Bei Verwendung von Glycinestern liegt das Produkt (**4.1a/b**) als Racemat vor. Die absolute Konfiguration der Diastereomere wurde nicht bestimmt.

Syntheseversuche mit den Aminosäureestern *S*-Histidin- und *R*-Cysteinmethylester blieben leider trotz Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Base, Lösungsmittel) erfolglos. Es konnten nach Reaktionsaufarbeitung nur die Edukte wieder zurückgewonnen werden. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der ungeschützten Amin- bzw. Thiol-Funktion, die verhindert, dass das gewünschte Aziridin-2-carboxylat entsteht.

### 3.2.2. Versuche zur Hydrolyse der Aziridin-2-carboxylat-Bausteine

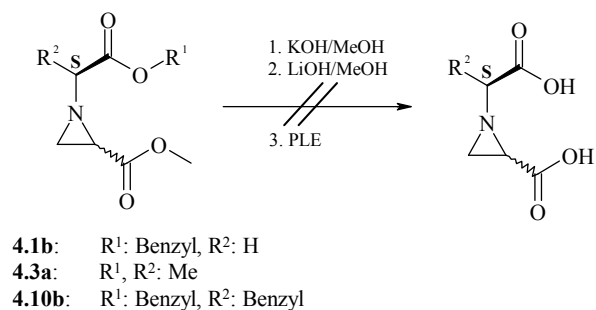
Die in Tab. 3.1 zusammengefassten Aziridin-2-carboxylate sollten durch Kopplung mittels Standard-Methoden um verschiedene Aminosäuren oder Peptide entweder an 2-Position des Aziridin-Ringes oder aber an der am Ring-Stickstoff positionierten Aminosäure erweitert werden.



Dazu sollten zuerst die Ester hydrolysiert werden, um dann Kopplungen von Aminosäuren und Peptiden mittels DPPA oder EEDQ durchführen zu können.

Für den ersten Versuch der Hydrolyse wurde ein Diastereomer des Aziridins **4.3a** mit einem Äquivalent 0.25 M Kaliumhydroxid-Lösung in Methanol bei Raumtemperatur versetzt. Mittels DC wurde die Reaktion kontrolliert und nach 2 Std. das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsgemisches konnten allerdings keine für den Aziridinring charakteristischen Peaks mehr identifiziert werden. Auch durch Veränderung der Reaktionsparameter wie Temperatur (-15 - 25 °C), Konzentration und Äquivalente der Kaliumhydroxid-Lösung (0.05 - 1 M, 0.5 - 2 Äq), Verwendung von Lithiumhydroxid in Methanol konnten keine Erfolge erzielt werden. Versuche, den Benzylester von **4.2b** und

**4.10b** hydrogenolytisch abzuspalten, blieben leider ebenfalls erfolglos. Auch hier konnten weder Edukte oder andere Produkte identifiziert werden.

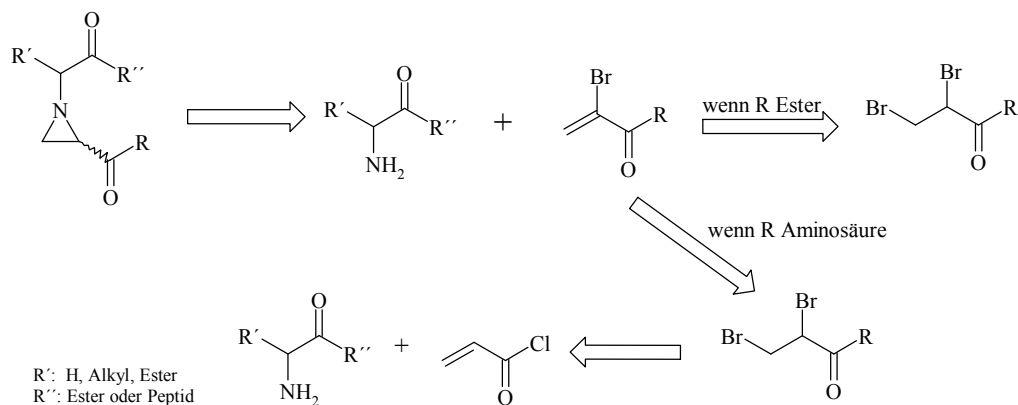


Es wurde auch Schweineleberesterase (pig liver esterase = PLE) eingesetzt, um eine milde Abspaltung eines Esters zu erreichen. Nach vorheriger Prüfung der Aktivität der PLE wurde **4.1b** bzw. **4.10b** in Methanol und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7) gelöst. Dann wurde die PLE dazugegeben, und es zeigte sich ein langsamer Anstieg des pH-Wertes, der durch die kontinuierliche Zugabe von NaOH so eingestellt wurde, dass er konstant auf pH 7 blieb. Nach Zugabe eines Äquivalentes an Base wurde die Reaktionsmischung aufgearbeitet. Sowohl in der organischen als auch in der wässrigen Phase ließen sich leider keinerlei Produkte identifizieren und auch die Edukte konnten nicht wiedergewonnen werden.

### 3.2.3. Neuer Zugang zu substituierten Aziridin-2-carboxylaten

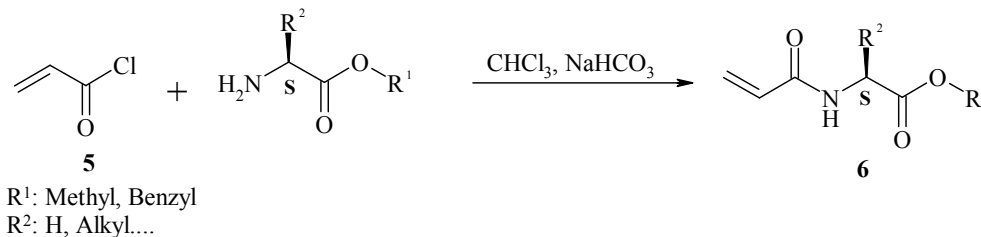
Um doch noch zu den gewünschten substituierten Aziridin-2-carboxylaten zu gelangen, musste ein neuer synthetischer Zugang gefunden werden.

Betrachtet man die substituierten Aziridin-2-carboxylate *retro*-synthetisch, so wird deutlich, dass die Kopplung auch vor der Cyclisierung des Aziridin-Ringes mittels eines Aminosäureesters oder Peptides stattfinden kann (s. Abb. 3.10). Dies erwies sich als ein neuer vielversprechender Weg zu den gewünschten Produkten.

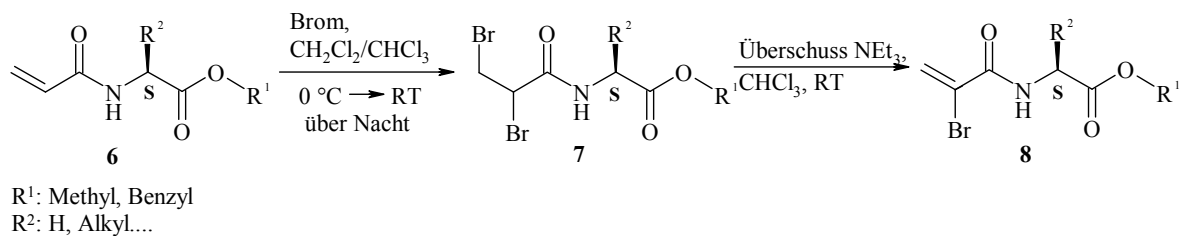


**Abb. 3.10:** Retro-Synthese der Aziridin-2-carboxylate

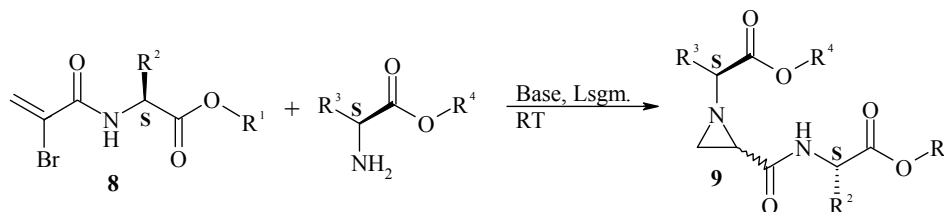
Zum in Chloroform gelösten *S*-Aminosäureester wird langsam Acryloylchlorid (**5**) im Überschuss (1.1 Äq) hinzutropft. Dabei wird mittels gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung der pH-Wert dieser Suspension zwischen sechs und acht gehalten. Wichtig dabei ist, dass die Reaktionsmischung ständig gut gerührt wird. Nach Beendigung der Zugabe wird die organische Phase abgetrennt und weiter aufgearbeitet.



Man erhält je nach verwendetem *S*-Aminosäureester die Produkte (**6**) in unterschiedlichen Ausbeuten (72 - 87 %). Diese werden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, bromiert (**7**) und danach wird mittels einer Base HBr eliminiert (**8**). Dabei liegen die Ausbeuten über beide Schritte zwischen 50 - 70 %.



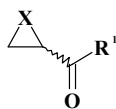
Die so erhaltenen Bromacrylate (**8**) werden im Lösungsmittel gelöst und zusammen mit einem Überschuss an Base (2 Äq) und dem entsprechenden *S*-Aminosäureester refluxiert. Statt des Esters wurde auch in zwei Umsetzungen Benzylamin eingesetzt. Über DC-Kontrolle wurde die Reaktion verfolgt und falls notwendig noch ein weiterer Anteil an Base dazugegeben. Als Lösungsmittel wurden Chloroform, Dichlormethan, Methanol oder Benzol gewählt, als Base Triethylamin und *N*-Methylmorpholin.



R<sup>1</sup>: Methyl, Benzyl    Base: NEt<sub>3</sub>, NMM  
 R<sup>2</sup>: H, Alkyl....    Lsgm.: CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, Benzol

Bei der Synthese von **9.6** wurden ursprünglich die Benzylester der beiden Edukte eingesetzt. Durch die basischen Bedingungen in Methanol kam es allerdings zu einer Umesterung beider Ester zu Methylestern.

Die erhaltenen Aziridin-2-carboxylate (**9**) liegen auch bei dieser Synthese als Diastereomeren-Gemische vor. Die Ausbeuten und Diastereomeren-Überschüsse der Produkte, die mittels NMR-Spektroskopie anhand der Integrale der Protonen am Aziridinring bestimmt werden konnten (s. Kap. 3.3), sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.



Tab. 3.2: Ausbeuten der substituierten Aziridin-2-carboxylate

Nr.	R <sup>1</sup>	X	Diastereomeren- Überschuss <sup>+</sup> (de in %)	Lösungsmittel/ Reaktionszeit h	Ausbeute %
9.1a		MeO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N	9	Methanol/ 11.5	52
9.1b		MeO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N	0	Methanol/ 4	26
9.2			23	Benzol/ 13	11
9.3			~	Benzol/ 8	17
9.4			~	Methanol/ 16	21
9.5			~	Methanol/ 5	9
9.6		N-CH <sub>2</sub> -Ph	9	Chloroform/ 2	16
9.7		N-CH <sub>2</sub> -Ph	44	Dichlormethan/ 5	23

~: Diastereomerenverhältnis konnte nicht bestimmt werden; <sup>+</sup> bezogen auf das Diastereomergemisch.

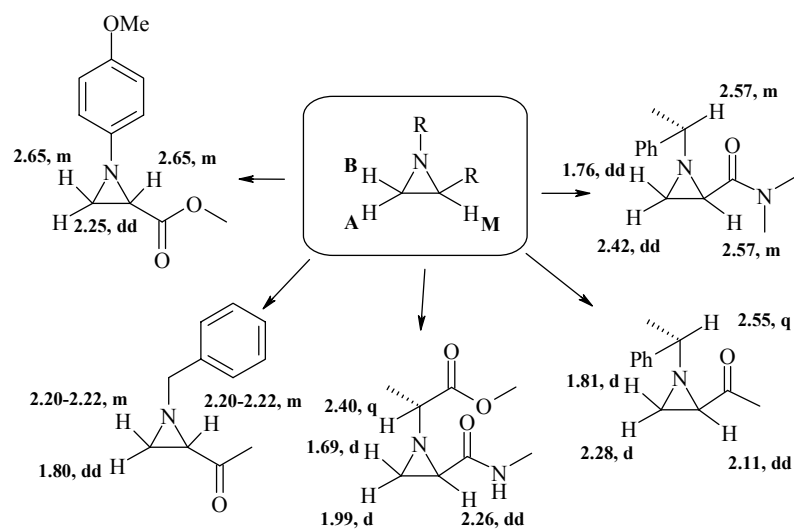
Die schlechten Ausbeuten bei dieser Synthese lassen sich vermutlich auf den räumlichen Anspruch der eingesetzten Edukte zurückführen, da immer wieder auch Edukt zurückgewonnen wurde trotz Einsatzes eines mehrfachen Überschusses an Base.

### 3.3. Struktur-Aufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Im folgenden Kapitel wird die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung der synthetisierten Aziridin-2-carboxylate diskutiert, da die Spektren ein sehr charakteristisches Muster aufweisen.

Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Aziridin-2-carboxylaten unterscheiden sich die Verschiebungen der Ringprotonen je nach Substituent am Aziridin-Stickstoff (s. Abb. 3.11).<sup>42</sup>

61



**Abb. 3.11:** Beispiele von Verschiebungen der Ring-Protonen verschiedener Aziridin-2-carboxylate im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum

Charakteristisch ist das Auftreten eines ABM-Systems im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, das nicht nach den Regeln der ersten Ordnung für <sup>1</sup>H-NMR-Spektren ausgewertet werden kann. Ein ABM-System besteht aus je vier Linien für A, B und M. Im Idealfall müssten daher alle 12 Linien die gleiche Intensität besitzen, was man allerdings im Experiment nur selten beobachtet.

Bei den hier synthetisierten Aziridin-2-carboxylaten ist die sehr kleine geminale Kopplung der Protonen am C3-Kohlenstoff nicht sichtbar; es ist jeweils nur die vicinale Kopplung zu dem Proton am C2-Kohlenstoff zu beobachten (s. Abb. 3.12).

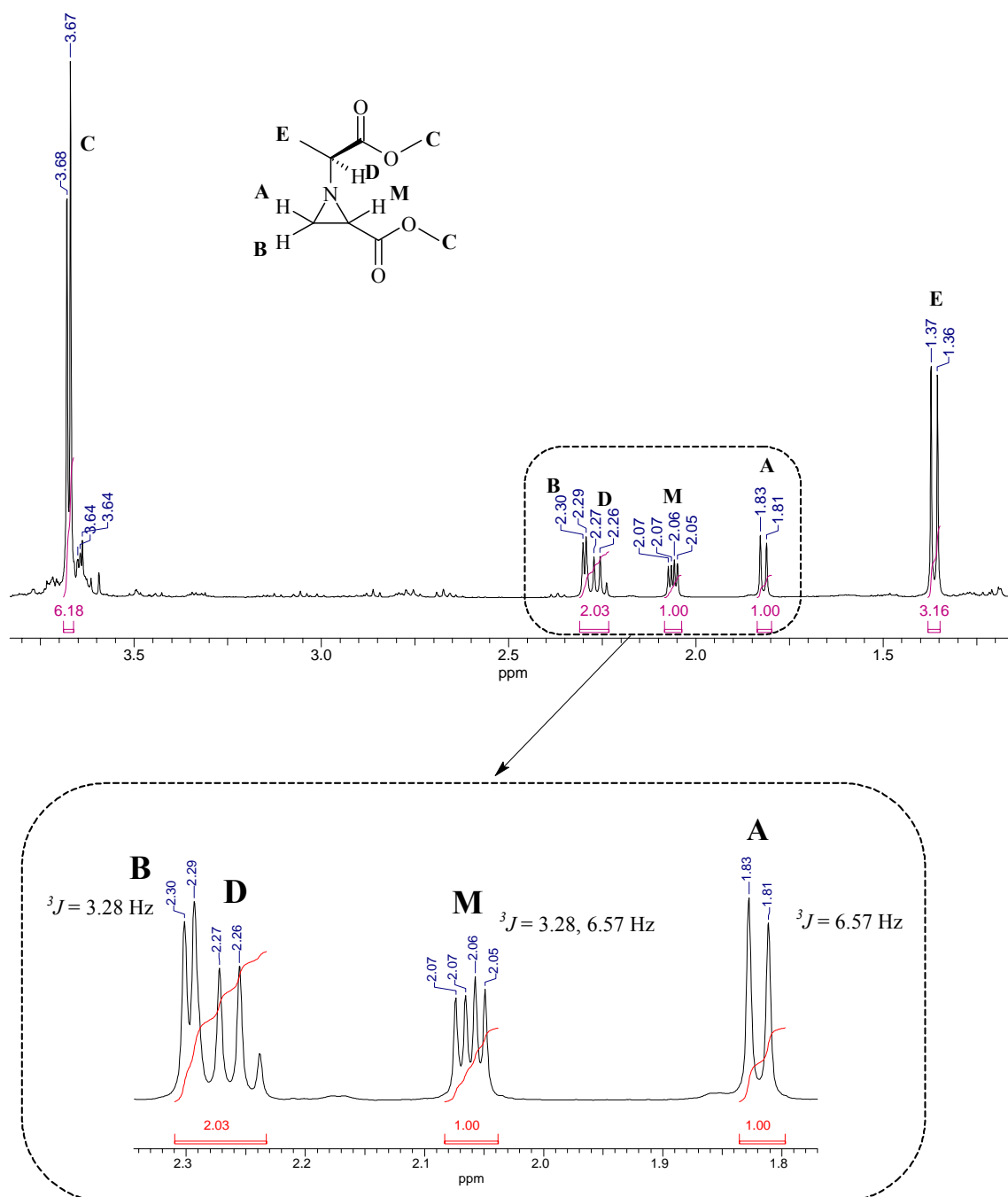
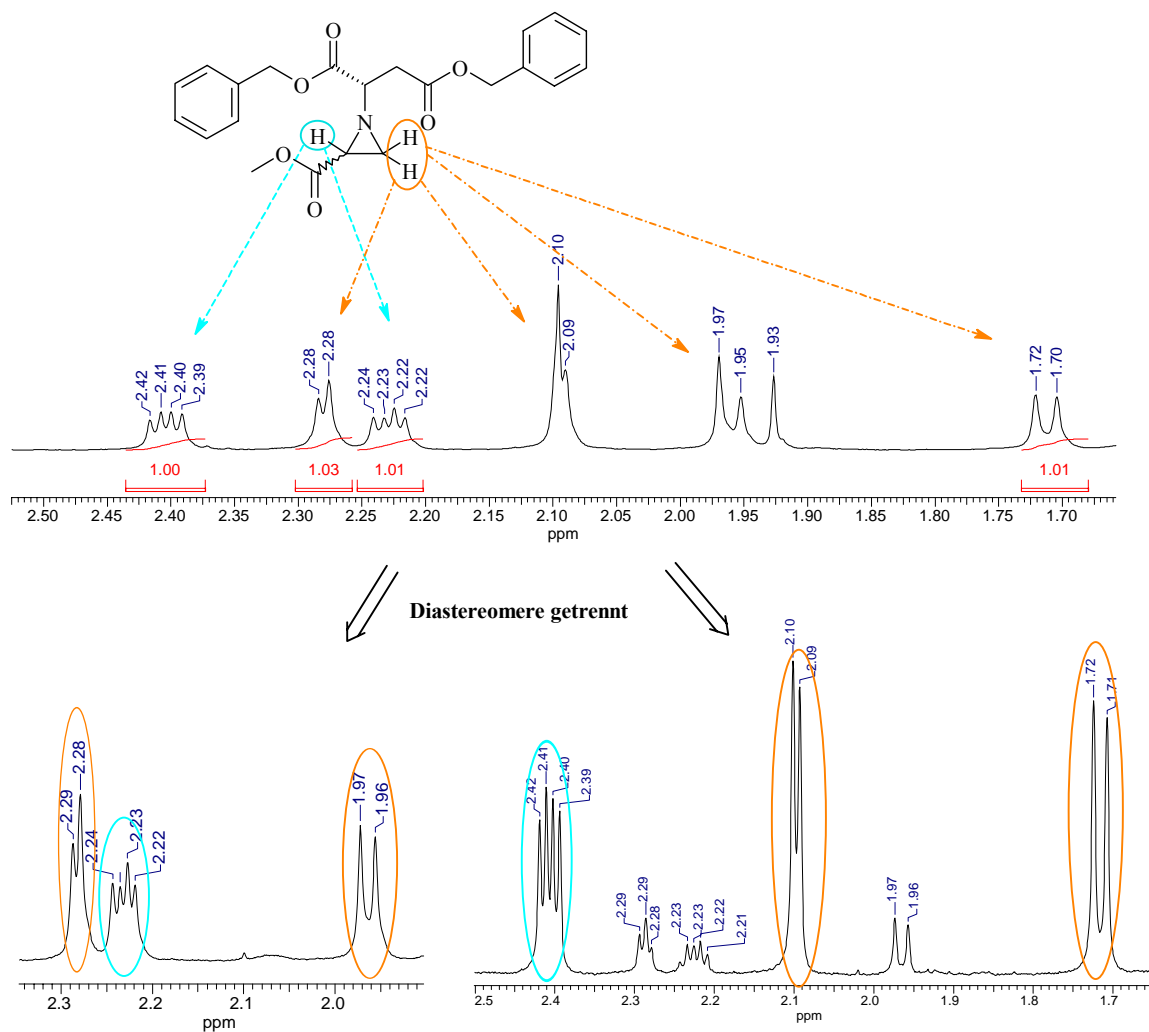


Abb. 3.12:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Diastereomers von **4.3a**

Wie im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Diastereomers **4.3a** (Abb. 3.12) ersichtlich, koppeln die zwei Protonen des C2-Kohlenstoffs jeweils mit dem Proton des C3-Kohlenstoffs. Aufgrund der Kopplungskonstanten kann das *cis*- und das *trans*-stehende Proton des C3-Kohlenstoffs genau zugeordnet werden, da bei Dreiringen die Kopplungskonstanten von zueinander *cis*-stehenden Protonen immer größer ist als von zueinander *trans*-stehenden.<sup>62</sup>

Die Abbildung 3.13 zeigt einen Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Diastereomergemisches von **4.5b** und den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der getrennten bzw. angetrennten

Diastereomere. Aus dem Vergleich der Integrale von jeweils einem Proton eines Diastereomers kann das Diastereomeren-Verhältnis der vorliegenden Aziridin-2-carboxylate festgestellt werden. Im Falle von **4.5b** liegen die Diastereomere in einem Verhältnis von 1:1 vor (0 % de).



**Abb. 3.13:** <sup>1</sup>H-NMR- Spektren von **4.5b** als Gemisch und getrennt als Diastereomere

Die Zuordnung der Protonen zu den einzelnen Kohlenstoffatomen erfolgte mittels eines zweidimensionalen <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Korrelationspektrums (s. Abb. 3.14).



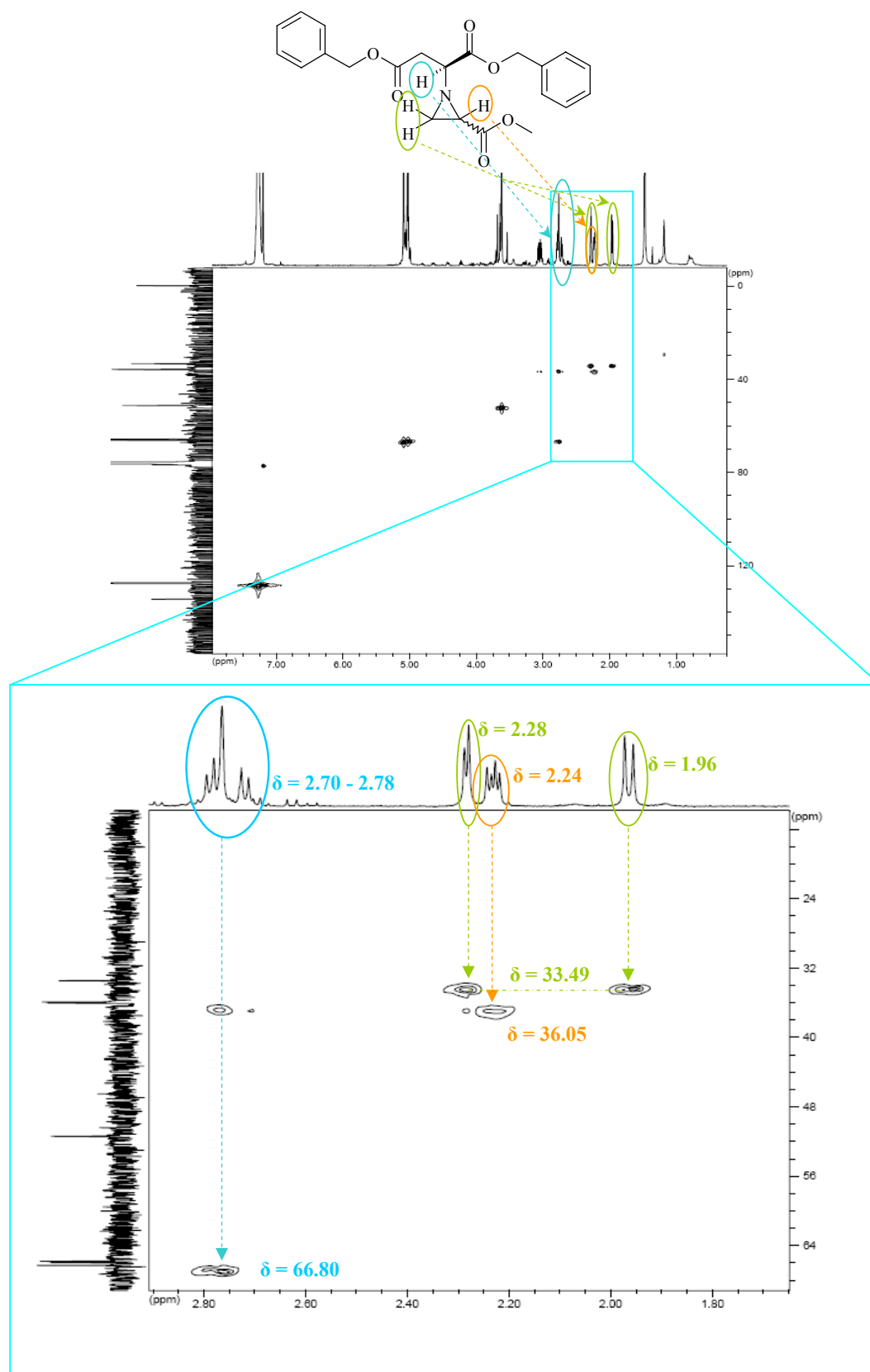


Abb. 3.14:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum eines Diastereomers von 4.5b

Dabei ist auffällig, dass das  $\alpha$ -Proton der eingesetzten Aminosäure am Ring-Stickstoff des Aziridin-2-carboxylats im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sehr weit hochfeldverschoben auftritt. Die Verschiebungen des  $\alpha$ -Protons bzw. Kohlenstoffatoms von Asparaginsäure-Derivaten liegen normalerweise im Bereich von  $\delta$  ca. 4.9 ppm und im  $^{13}\text{C-NMR}$  bei  $\delta$  ca. 53 ppm.<sup>†</sup> Ist die Asparaginsäure aber mit ihrem Stickstoff Teil des Aziridin-Rings, so wird im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum das Proton hochfeldverschoben zu  $\delta = 2.70\text{-}2.78$  ppm und das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum tieffeldverschoben zu  $\delta = 66.95$  ppm (s. Abb. 3.14).

Das gleiche Phänomen tritt auch bei allen anderen Aziridin-2-carboxylaten auf, wie z.B. dem aus Phenylalanin und Bromacrylat synthetisiertem Aziridin-2-carboxylat **4.10b**. Bei dem  $\alpha$ -Proton von Phenylalanin-Derivaten tritt eine Verschiebung im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei  $\delta$  ca. 4 ppm und beim  $\alpha$ -Kohlenstoff im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum bei  $\delta$  ca. 57 ppm. Das Signal für das  $\alpha$ -Proton der Verbindung **4.10b** ist im Gegensatz dazu im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum hochfeldverschoben in den Bereich  $\delta = 2.45\text{-}2.49$  ppm und das Signal für das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom tieffeldverschoben nach  $\delta = 72.94$  bzw. 73.31 ppm (Abb. 3.15).

Generell gilt, je größer der Wert für  $\delta$  wird, desto geringer ist die Abschirmung des Protons bzw. des Kohlenstoffs. Die Abschirmungskonstante  $\sigma$  teilt sich dabei in drei verschiedene Teile auf:

$$\sigma = \sigma_{dis} + \sigma_{para} + \sigma'$$

Der diamagnetische Anteil  $\sigma_{dia}$  bezieht sich auf das in der Elektronenhülle des betreffenden Kernes durch das äußere Magnetfeld induzierte Gegenfeld. Kernnahe Elektronen schirmen dabei stärker ab als kernferne. Der paramagnetische Anteil  $\sigma_{para}$  bezieht sich auf die Anregung von p-Elektronen im Magnetfeld und wirkt der diamagnetischen Abschirmung entgegen. Der Term  $\sigma'$  gibt den Einfluss von Nachbargruppen wieder, die das Feld am Kernort schwächen bzw. verstärken können.<sup>62</sup>

<sup>†</sup> [http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi?lang=eng](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/direct_frame_top.cgi?lang=eng)

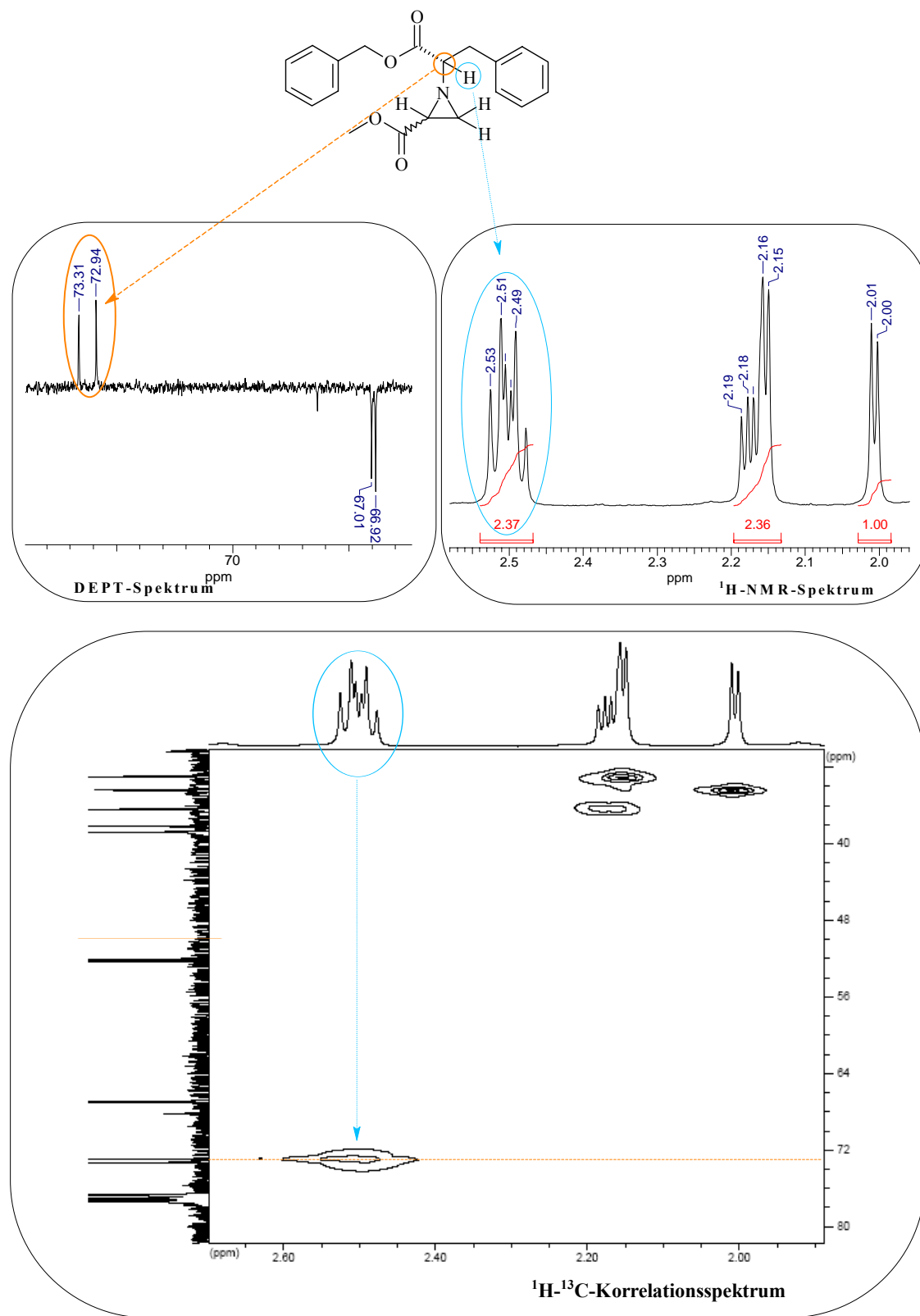
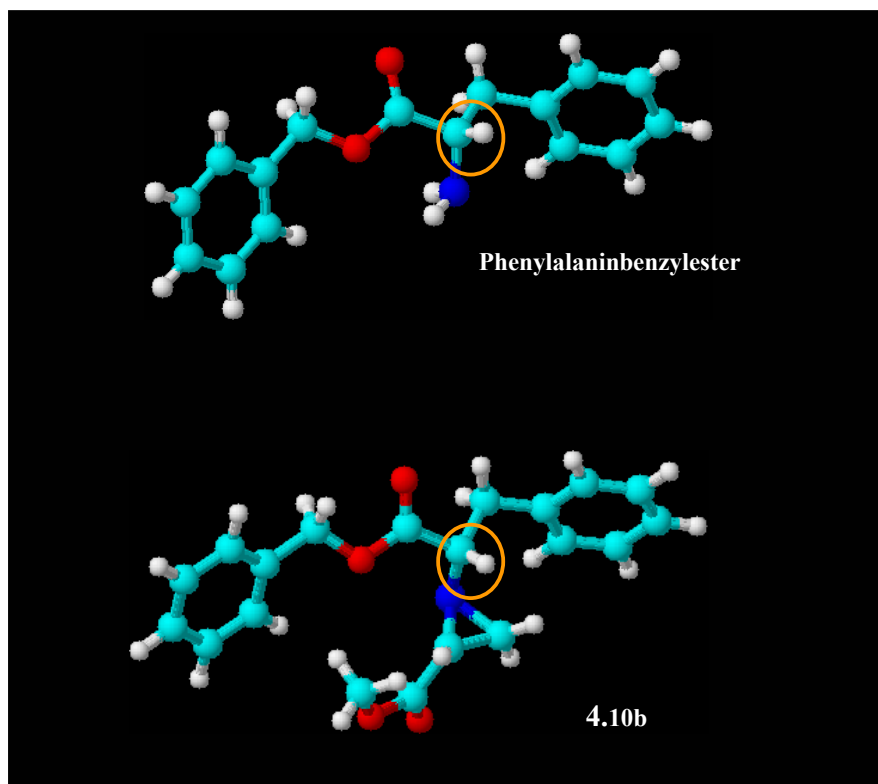


Abb. 3.15: Ausschnitte aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -, DEPT- und  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -Korrelations-Spektrum des Diastereomeren-Gemisches von 4.10b

Vergleicht man nun die Struktur von **4.10b** mit Phenylalanin in Bezug auf das  $\alpha$ -Proton, wird deutlich, dass die Hochfeldverschiebung des  $\alpha$ -Protons von **4.10b** im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum durch die Nähe zur Ringebene des Aziridinringes zustande kommt. Der starre Aziridinring und die dadurch bedingte Nähe vom  $\alpha$ -Proton zu den weiteren Substituenten am Aziridinring bedingen im Gegensatz zum frei beweglichen Amin in Phenylalanin-Derivaten eine wesentlich höhere Abschirmung und somit eine Hochfeldverschiebung. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum dagegen erfährt das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom eine etwas geringere Abschirmung vom Magnetfeld, so dass das Signal für den  $\alpha$ -Kohlenstoff tieffeldverschoben bei höherem  $\delta$ -Wert erscheint. Abb. 3.16 veranschaulicht die strukturelle Änderung des Phenylalanins bei Bildung des Aziridinringes und die daraus entstehende Abschirmung des  $\alpha$ -Protons bzw. die leichte Entschirmung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs am Phenylalaninbenzylester (orangener Kreis).



**Abb. 3.16:** 3D-Struktur von Phenylalaninbenzylester und **4.10b**

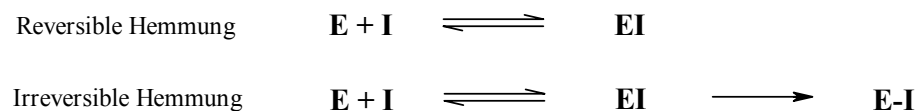
## 4. Biochemische und biologische Untersuchungen

### 4.1. Enzym-Assays

Schon früher wurde gezeigt, dass Aziridinyl-Peptide und Epoxysuccinate aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften imstande sind, Cystein-Proteasen zu hemmen. Die Inaktivierung der Enzyme beruht dabei auf der Alkylierung der Thiolgruppe des aktiven Zentrums als Konsequenz der nucleophilen Öffnung des Aziridin-/Epoxid-Ringes.<sup>63,64</sup>

Für die Aziridin-2-carboxylate wird ebenfalls angenommen, dass der Cystein-Rest im aktiven Zentrum der Enzyme eine kovalente Bindung mit dem Inhibitor eingeht und dadurch das Enzym irreversibel gehemmt wird.

Generell sind zwei unterschiedliche Arten von Hemmungen zu unterscheiden: die irreversible und reversible (Abb. 4.1). Bei der irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor immer kovalent. Somit ist das Enzym unwiderruflich gehemmt. Reversible Hemmung kann sowohl bei kovalenter Bindung als auch bei nicht-kovalenter Bindung eines Inhibitors an ein Enzym zustande kommen.



**Abb. 4.1:** Reversible und irreversible Hemmung eines Enzyms

Um irreversible und reversible Hemmung unterscheiden zu können, kann man die Inhibitor-Konzentration verringern und eine Dialyse, Ultrafiltration oder Gelfiltration einsetzen. Ein Inhibitor, der reversibel agiert, würde in diesem Fall erneut aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex abdissoziieren und das Enzym gewänne seine Aktivität zurück. Der Nachteil dieser Trennverfahren liegt allerdings in dem Verlust der Aktivität des Enzyms durch den Dialyse- bzw. Ultrafiltrationsprozess, weswegen ein Kontrollversuch ohne Inhibitor unabdinglich ist.

Eine weitere Methode ist die Analyse eines tryptischen Verdaus des durch einen Inhibitor inaktivierten Enzyms. Dabei werden die entstandenen Enzymfragmente mittels LC/MS vermessen. Damit werden nicht nur die einzelnen Bruchstücke des Enzyms erkannt, sondern es kann gleichzeitig der Teil des Enzyms identifiziert werden, der vom Inhibitor alkyliert wurde.

Auch die Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Hemmung bietet einen Aufschluss darüber, ob das Enzym reversibel oder irreversibel gehemmt wurde. Ist die Hemmung reversibel, so reduziert sich die Aktivität des Enzyms nur abhängig von der Konzentration des Inhibitors und ist unabhängig von der Zeitspanne. Dabei wird vorausgesetzt, dass steady-state-Bedingungen vorliegen, d.h., dass eine Sättigung des Enzyms mit Substrat garantiert ist und sich eine Änderung der Substratkonzentration im Verlauf des Versuches nicht bemerkbar macht. Ist die Hemmung dagegen irreversibel, reduziert sich die Aktivität des Enzyms sowohl abhängig von der Konzentration des Inhibitors als auch von der Messzeit oder Inkubationszeit vor Substratzugabe. Dieser Abfall der Enzymaktivität verläuft im Falle einer Reaktion pseudo-erster Ordnung exponentiell.

#### 4.1.1. Charakterisierung irreversibler, zeitabhängiger Hemmung

Die enzymatische Katalyse läuft nach der Michaelis-Menten-Kinetik ab. Experimentell beobachtet man, dass die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion eines Substrats S zu einem Produkt P von der Enzymkonzentration abhängt, obwohl das Enzym E bei dieser Reaktion nicht verändert wird. Dabei gibt die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  als Dissoziationskonstante des ES-Komplexes die Affinität des Substrats zum Enzym an. Diese ist für jedes Enzym-Substrat-Paar charakteristisch und unabhängig von der Substratkonzentration (bei definierten Bedingungen). Die Geschwindigkeitskonstante/Wechselzahl  $k_{cat}$  gibt eine Aussage darüber, wie schnell die Substratspaltung von statten geht.<sup>65</sup>

Setzt man nun einen irreversiblen Inhibitor hinzu, so konkurriert dieser mit dem Substrat um die Bindungsstelle des Enzyms. Dabei reagiert der Inhibitor mit dem Enzym in einer zuerst reversiblen Reaktion zu einem Assoziationskomplex EI. Dieser reagiert dann irreversibel zur inaktiven Form E-I (s. Abb. 4.2).

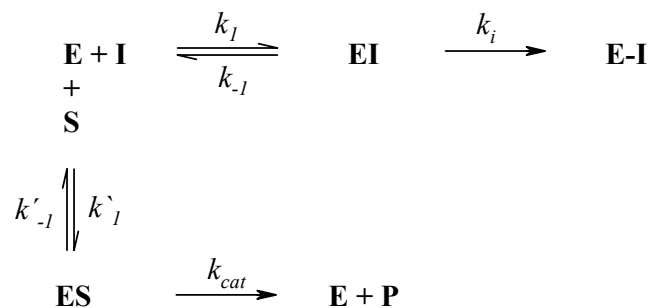


Abb. 4.2: Reaktionsschema einer enzymkatalysierten Reaktion mit Zusatz von Inhibitor

Charakteristische Hemmkonstanten für die Reaktion des Enzyms mit einem irreversiblen Inhibitor sind:

- $k_i$  [ $\text{min}^{-1}$ ]: Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I
- $K_i$  [M]: ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die sich aufgrund des Massenwirkungsgesetzes ergibt (I):

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

bzw.

$$K_i = \frac{k_{-1} + k_i}{k_1} \quad (\text{I})$$

Da der zweite Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, vereinfacht sich die Gleichung zu (II):

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (\text{II})$$

- $k_{2nd}$  [ $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]: ist die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung. Sie berechnet sich folgendermaßen (III):

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} \quad (\text{III})$$

- $K_{iapp}$ : die apparente Dissoziationskonstante lässt sich beschreiben als (IV):

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

Betrachtet man die Abb. 4.2, so ergibt sich für die Gesamtkonzentration des Enzyms  $[E_0]$ :

$$[E_0] = [E] + [EI] + [E-I] \quad (1)$$

Das sich im Enzym-Inhibitor-Komplex EI befindliche Enzym ist allerdings noch nicht inaktiviert und kann daher durch einen Überschuss an Substrat wieder aus der Bindungstasche des Enzyms verdrängt werden. Das Enzym in diesem Komplex ist also potentiell aktiv und kann so mit dem freien Enzym E zusammengefasst werden zu  $E_a$ .<sup>66</sup>

$$[E_0] = [E_a] + [E-I] \quad (2)$$

Da man eine viel größere Konzentration des Inhibitors als des Enzyms einsetzt ( $[I] \gg [E_0]$ ), arbeitet man unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung. Die zeitliche Bildung des inaktivierten Enzym-Komplexes E-I ist somit proportional zur Konzentration des reversiblen Enzym-Komplexes EI. Mathematisch bedeutet das:

$$\frac{d[E-I]}{dt} = -\frac{d([E_0] - [E_a])}{dt} = k_i \cdot [EI] \quad (3)$$

Da die Gesamtkonzentration des Enzyms  $[E_0]$  allerdings konstant bleibt, lässt sich die Gleichung vereinfachen zu:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_i \cdot [EI] \quad (4)$$

Die Konzentration des reversiblen Enzym-Komplexes  $[EI]$  lässt sich gegeben durch die Gleichungen (1) + (2) ersetzen durch:

$$[E-I] = [E_0] - [E_a] \quad (5)$$

Mit der Dissoziationskonstanten  $K_i$  (I) des Enzym-Inhibitor-Komplexes als  $K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$

ergibt sich daraus:

$$[EI] = \frac{[E_a]}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$

Setzt man dies nun in die Gleichung (4) ein, erhält man:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = \frac{k_i [E_a]}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (6)$$

Integriert man diese Gleichung über die Zeit, folgt daraus:

$$\ln\left(\frac{[E_a]}{[E_0]}\right) = -\frac{k_i \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (7)$$

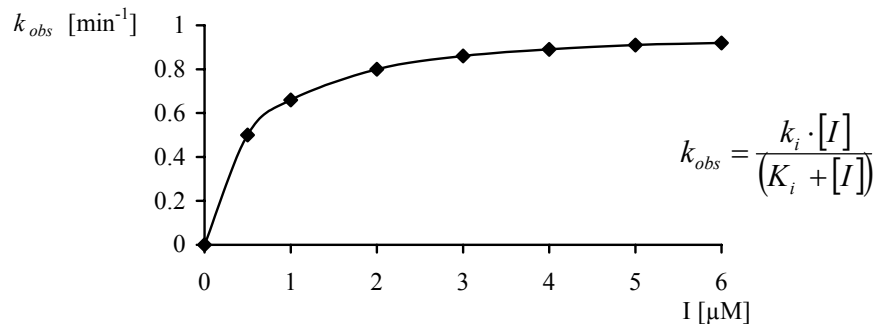
Unter steady-state-Bedingungen ( $[S] \gg [E_0]$ ) nimmt die Enzymaktivität pro Zeiteinheit nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung ab (Gl. 8).  $k_{obs}$  ist dabei die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung:



$$\ln\left(\frac{[E_a]}{[E_0]}\right) = -k_{obs} \cdot t \quad (8)$$

Setzt man nun Gleichung (8) in Gleichung (7) ein, so folgt daraus die hyperbolische Funktion (Gl. 9/Abb. 4.3):<sup>66</sup>

$$-k_{obs} \cdot t = -\frac{k_i \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \Leftrightarrow k_{obs} = \frac{k_i \cdot [I]}{(K_i + [I])} \quad (9)$$



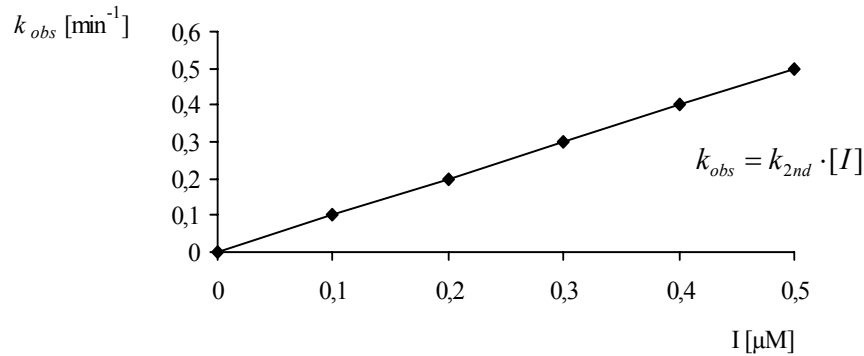
**Abb. 4.3:** Hyperbolische Funktion unter steady-state-Bedingungen

Betrachtet man sich die Gleichung (9) und die Abb. 4.3, ist gut ersichtlich, dass die Funktion unabhängig von der eingesetzten Enzym-Konzentration ist. Der  $k_{obs}$ -Wert kann nun für unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen mittels verschiedener experimenteller Verfahren ermittelt werden. Allerdings bleibt das Problem bestehen, dass in der einen Gleichung (9) noch zwei Variablen,  $k_i$  und  $K_i$ , unbekannt sind. Diese können nur über nicht-lineare Regression ermittelt werden.

Die Reaktionen von Inhibitoren, die sich schlecht lösen oder sehr schnell mit dem Enzym reagieren, können nicht mehr durch eine Kinetik pseudo-erster Ordnung beschrieben werden, da die Hemmkonstanten nur bei relativ niedrigen Inhibitor-Konzentrationen unterhalb der Dissoziationskonstanten ( $[I] \ll K_i$ ) bestimmt werden können. Für diese vereinfacht sich die Gleichung (9) zu:

$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i} \Leftrightarrow k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad (10)$$

Somit können die Hemmkonstante  $k_i$  und  $K_i$  nicht mehr einzeln bestimmt werden, sondern es wird nur noch näherungsweise die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  $k_{2nd}$  berechnet. Diese kann graphisch aus der Steigung der Geraden ermittelt werden, die man erhält, wenn man  $k_{obs}$  gegen die Inhibitor-Konzentration aufträgt (Abb. 4.4):



**Abb. 4.4:** Vereinfachter Graph von  $k_{obs}$  gegen  $[I]$  bei schlecht löslichen Inhibitoren oder  $[I] \ll K_i$

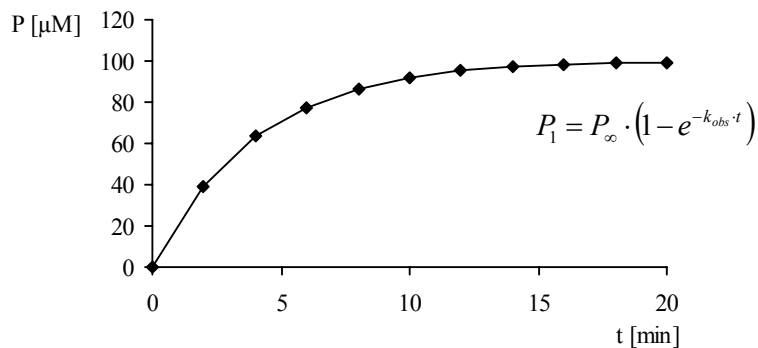
Da der Inhibitor allerdings, wie aus Abb. 4.2 ersichtlich, mit dem Substrat um die Bindungsstelle des aktiven Zentrums im Enzym konkurriert, müssen sowohl die Substratkonzentration als auch die Affinität des Substrats zum Enzym, d.h. der  $K_m$ -Wert, berücksichtigt werden. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  wird für jedes Substrat-Enzym-Paar gesondert bestimmt. Die  $K_i$ -Werte, die man experimentell ermittelt, sind somit die apparenten  $K_i$ -Werte,  $K_{iapp}$ , die erst zu den „wahren“  $K_i$ -Werten korrigiert werden müssen (Gl. 11):

$$K_{iapp} = K_i \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \Leftrightarrow K_i = \frac{K_{iapp}}{\left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right)} \quad (11)$$

Die  $k_{obs}$ -Werte für unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen können durch zwei unterschiedliche Verfahren experimentell ermittelt werden: den kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou<sup>67</sup> oder den Verdünnungs-Assay nach Kitz und Wilson<sup>66</sup>. Beide werden im nachfolgenden beschrieben. Aus den Ergebnissen für  $k_{obs}$  kann man dann die Hemmkonstanten  $K_i$ ,  $k_i$  und  $k_{2nd}$  bestimmen.

#### 4.1.2. Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou<sup>67</sup>

Beim kontinuierlichen Assay misst man die Produktzunahme einer Mischung aus Enzym, Substrat und einer bestimmten Inhibitor-Konzentration über die Zeit (30 Min). Dabei muss darauf geachtet werden, dass man unter steady-state-Bedingungen arbeitet, also jeweils ein Überschuss an Inhibitor und Substrat gegenüber Enzym vorhanden ist ( $[I] \gg [E]$  und  $[S] \gg [E]$ ). Bei einem irreversiblen Inhibitor kann man dabei eine exponentielle Abnahme der Produktzunahme erkennen (Abb. 4.5), wobei sich die Produktkonzentration einem Wert  $P_\infty$  annähert.



**Abb. 4.5:** Bestimmung von  $k_{obs}$ , Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays nach Tian und Tsou für eine bestimmte Inhibitor-Konzentration

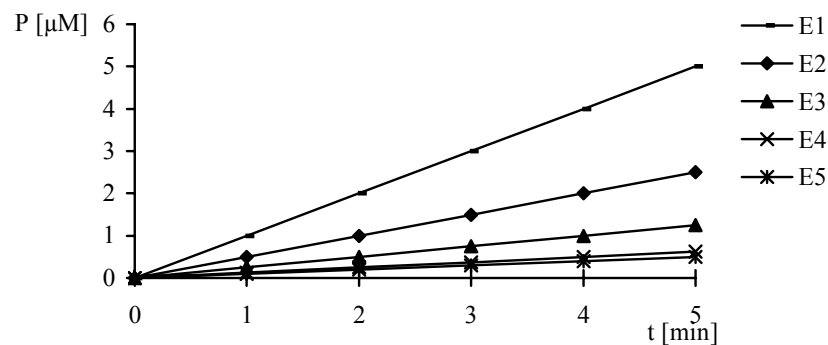
Zur Kontrolle dieses Experimentes führt man auch eine Messung ohne Inhibitor durch, wobei die Umsatz-Zeit-Kurve von Enzym und Substrat über die gesamte Messzeit eine Gerade beschreiben muss. Dabei wird eine 10%ige Abweichung toleriert.

Die  $k_{obs}$ -Werte werden durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Enzymkinetik-Programms Grafit<sup>®‡</sup> für jede Inhibitor-Konzentration einzeln berechnet. Werden diese  $k_{obs}$ -Werte dann gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen, so lassen sich gemäß Gleichung 9 und 10 die Hemmkonstanten  $K_i$ ,  $k_i$  und  $k_{2nd}$  ermitteln.

<sup>‡</sup> Grafit<sup>®</sup> V3.03 Erithacus Software Ltd., London, 1994

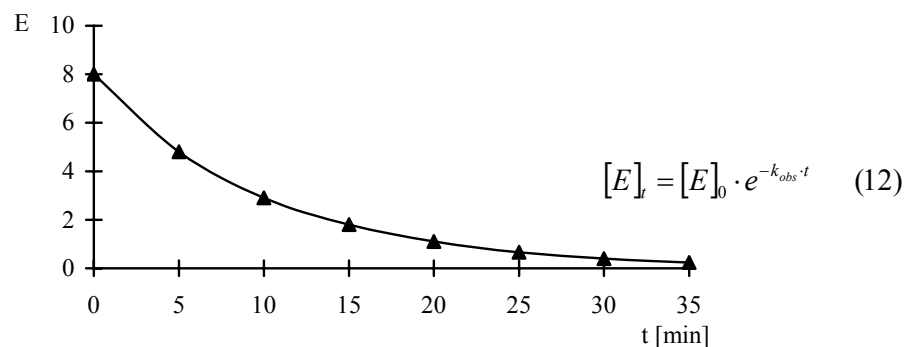
### 4.1.3. Verdünnungs-Assay nach Kitz und Wilson<sup>66</sup>

Beim Verdünnungs-Assay nach Kitz und Wilson wird eine definierte Menge an Enzym mit einem 10-50-fachen Überschuss an Inhibitor inkubiert. Um Bedingungen pseudo-erster Ordnung zu erhalten, muss auch hier gelten  $[I] \gg [E]$  und  $[S] \gg [E]$ . In bestimmten Zeitintervallen wird dann je ein Aliquot aus der Inkubationslösung entnommen, um den Faktor 4-5 verdünnt und nach Zugabe von Substrat die Enzym-Rest-Aktivität über die Zeit bestimmt (Abb. 4.6). Die Verdünnung der Inkubationslösung ist dabei notwendig, um auszuschließen, dass eine Hemmung des Enzyms durch nicht-kovalente Assoziation eintritt.



**Abb. 4.6:** Umsatz-Zeit-Diagramme von Enzym-Inhibitor-Inkubationslösungen verschiedener Zeitintervalle (E1-5)

Wenn man die Steigungen dieser experimentell erhaltenen Geraden, die Enzym-Rest-Aktivität, gegen die dazugehörigen gewählten Zeitintervalle aufträgt, erhält man eine abfallende Exponential-Kurve (Gl. 12/Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Exponential-Kurve aus Verdünnungs-Assay nach Kitz und Wilson

Aus der nicht-linearen Regression dieser Exponential-Kurve erhält man den  $k_{obs}$ -Wert für die eingesetzte Inhibitor-Konzentration. Der große Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass man für alle Konzentrationen so verfahren muss, um dann die  $k_{obs}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentrationen auftragen zu können, und das macht diese Methode sehr zeitaufwändig.

#### 4.1.4. Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Wenn die Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor sehr langsam vor sich geht, dann stellt sich die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu als eine Gerade dar. Es kann dann keine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung mehr bestimmt werden. Die Auswertung der Daten muss dann über die Dixon-Gleichung (Gl. 13) erfolgen<sup>68</sup>, die man auch bei reversiblen Inhibitoren benutzt:

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (13)$$

Durch Bestimmung der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurven der ersten 10 Min. für verschiedene Inhibitor-Konzentrationen gelangt man zu den Geschwindigkeiten  $v_0$  und  $v_i$ . Dabei ist  $v_0$  die Enzymaktivität ohne Inhibitor,  $v_i$  die mit Inhibitor bei der jeweiligen Konzentration. Trägt man  $v_0/v_i$  gegen die Inhibitor-Konzentration auf, dann erhält man den linearisierten Dixon-Plot (Abb. 4.8).

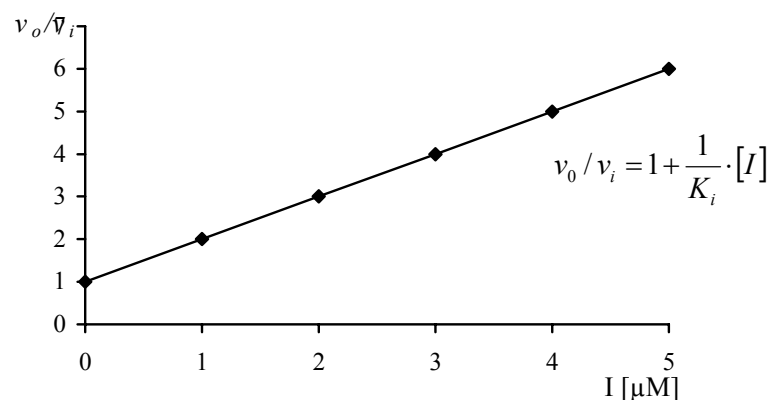


Abb. 4.8: Linearisierter Dixon-Plot bei nicht-zeitabhängiger Hemmung

Man kann dann entweder aus der Steigung  $K_i$  bestimmen, oder man erhält diesen durch nicht-lineare Regression gemäß:

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Weder bei zeitabhängiger noch bei nicht-zeitabhängiger Hemmung darf man die Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor vernachlässigen, wenn kompetitive Hemmung vorliegt. Deshalb ist der erhaltene  $K_i$ -Wert eigentlich die apparente Dissoziationskonstante  $K_{iapp}$ . Sie entspricht bei kompetitiven Inhibitoren dem  $IC_{50}$ -Wert und muss wie bei Gl. 11 durch Division durch den Term  $\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$  korrigiert werden, um unabhängig von der Konzentration des Substrats und dessen Affinität zum Enzym zu werden.

## 4.2. Durchführung der fluorimetrischen Enzym-Assays

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren wurde der kontinuierliche Assay nach Tian und Tsou verwendet (s. 4.1.2).<sup>67</sup> Die Versuche wurden in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten bei 25 °C durchgeführt. Dabei wurde das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse fluorimetrisch erfasst. Jeder Inhibitor wurde bei 7 verschiedenen Konzentrationen mindestens 2-mal vermessen. Als Substrat diente Z-Phe-Arg-AMC (*N*-Benzyloxycarbonyl-(*L*)-phenylalanin-(*L*)-arginyl-7-amino-4-methylcumarin). Es wurde die Zunahme der Fluoreszenz durch die hydrolytische Spaltung des Substrats durch das Enzym zum entstehenden 7-Amino-4-methylcumarin verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug 365 nm, die Emissionswellenlänge 460 nm. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4.1) sind die Enzyme, Substratkonzentrationen, die verwendeten Puffer und die Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$  der Enzyme angegeben. Alle weiteren Angaben finden sich im Experimental-Teil (s. Kap. 8.10).

**Tab. 4.1:** Bedingungen für Enzym-Assays

Enzym	Puffer	[S]	Inkubationszeit	$K_m$
Rhodesain	Acetat-Puffer (pH 5.5)	20 $\mu\text{M}$	0 min	826.5 nM
Cathepsin B	Tris-Puffer (pH 6.6)	80 $\mu\text{M}$	0 min	150 $\mu\text{M}$
Cathepsin L	Tris-Puffer (pH 6.6)	40.5 $\mu\text{M}$	0 min	6.5 $\mu\text{M}$
Falcipain 2	Acetat-Puffer (pH 5.5)	40 $\mu\text{M}$	30 min	21.5 $\mu\text{M}$
Falcipain 3	Acetat-Puffer (pH 5.5)	25 $\mu\text{M}$	30 min	71.3 $\mu\text{M}$

Es wurden jeweils zwei verschiedene Puffer hergestellt, einer für die Enzyme und einer für den Assay. Zu den Enzym-Puffern wurde jeweils Dithioerythriol (DTT) zugesetzt, um reduktive Bedingungen sicher zu stellen, damit der Cystein-Rest im aktiven Zentrum nicht durch eine falsche Disulfidbrücke blockiert wird. Den Assay-Puffern für Rhodesain und Cathepsin B wurde Brij 35, ein nichtionisches Tensid, zugesetzt, um die Löslichkeit von Inhibitoren und Substrat zu verbessern. Außerdem enthalten alle Puffer EDTA, um eine durch eventuell vorhandene Schwermetalle verursachte Denaturierung der Enzyme zu verhindern. Substrat und Inhibitoren wurden jeweils in DMSO gelöst. Dabei betrug die maximal verwendete DMSO-Konzentration 10 %. Beim Zusammenfügen der einzelnen Komponenten wurde zuerst das Enzym mit einem Anteil an Assay-Puffer vermischt und anschließend mit Inhibitor-Lösung versetzt. Dann folgte der restliche Anteil an Enzym-Puffer und zum Schluss das Substrat, wobei gleich nach Zugabe des Substrates gut durchmischt und vermessen wurde. Für die Enzyme Falcipain 2 und 3 wurde jeweils der  $IC_{50}$ -Wert<sup>§69</sup> nach einer Inkubationszeit von 30 min von Enzym und Inhibitor bestimmt, für die anderen Enzyme wurden die Dissoziationskonstanten  $K_i$  oder  $k_i$  und  $k_{2nd}$  ermittelt.

### 4.3. Ermittelte Hemmkonstanten der Inhibitoren an Rhodesain, Falcipain 2 und 3, Cathepsin L und B

Im folgenden Kapitel werden die ermittelten Hemmkonstanten für die synthetisierten Aziridin-2-carboxylate in Tabellen (Tab. 4.2 und Tab. 4.3) zusammengefasst.

§ Diese Messungen wurden im Labor von Prof. Dr. Philip Rosenthal, General Hospital, San Francisco, entsprechen den dort üblichen Verfahren durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Hemmkonstanten zu gewährleisten, wurden die in Würzburg an FP 2 bestimmten  $K_i$ -Werte in  $IC_{50}$ -Werte, und die in San Francisco bestimmten  $IC_{50}$ -Werte entsprechend Gleichung 11 in  $K_i$ -Werte umgerechnet.

**Tab. 4.2:** Ermittelte Hemmkonstanten für Aziridin-2-carboxylate

	<b>Rhodesain</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_i$ [ $\mu\text{M}$ ] / $k_{2nd}$ [ $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ]	<b>Falcipain 2</b> $IC_{50} / K_i^+$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Falcipain 3</b> $IC_{50} / K_i^+$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Cathepsin L</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Cathepsin B</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>4.1a</b>	> 400		> 400	> 400	$78.8 \pm 6.3$	> 400
<b>4.1b</b>	> 400		> 400	> 400	$38.7 \pm 0.5$	> 400
<b>4.2a</b>	> 400		> 400	> 400	$39.9 \pm 2.0$	> 400
<b>4.2b</b>	> 400		> 400	> 400	$18.6 \pm 37.2$	> 400
<b>4.3a</b>	> 400		> 400	> 400	$40.0 \pm 10.5$	> 400
<b>4.3b</b>	> 400		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>4.4a</b>	> 400		> 400	> 400	n. I.	> 400
<b>4.4b</b>	> 400		$39.5 \pm 3.5 / 13.8$	$57.9 \pm 2.6 / 42.89$	n. b.	n. b.
<b>4.5a</b>	$23.2 \pm 1.1$		n. I.	> 400	n. b.	n. b.
<b>4.5b</b>	$29.2 \pm 4.7$		> 400	> 400	$47.5 \pm 5.8$	> 400
<b>4.5c</b>	> 400		n. I.	> 400	n. b.	n. b.
<b>4.6a</b>	> 400		> 400	> 400	n. I.	> 400
<b>4.7b</b>	> 400		> 400	> 400	$54.9 \pm 20.8$	> 400
<b>4.8a</b>	$9.5 \pm 2.3$	n. b. / $2,519^*$	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

n. b.: nicht bestimmt; n. I.: keine Hemmung; \* eine Messung; +  $K_i$  wurde aus  $IC_{50}$ -Wert berechnet



**Tab. 4.3:** Ermittelte Hemmkonstanten für Aziridin-2-carboxylate

	<b>Rhodesain</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_i$ [ $\mu\text{M}$ ] / $k_{2nd}$ [ $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ]	<b>Falcipain 2</b> $IC_{50} / K_i^+$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Falcipain 3</b> $IC_{50} / K_i^+$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Cathepsin L</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	<b>Cathepsin B</b> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>4.8b</b>	$14.6 \pm 0.7$		$31.2 \pm 3.0 / 10.9$	$67.9 \pm 20.4 / 50.29$	n. b.	n. b.
<b>4.9a</b>	> 400		> 400	> 400	n. I.	> 400
<b>4.9b</b>	$5.8 \pm 0.1$	$0.033 \pm 0.0064 /$ $5.135 \pm 1.859$	> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>4.10a</b>	> 400		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>4.10b</b>	> 400		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>9.1a</b>	$15.4 \pm 4.5$		> 400	> 400	$16.7 \pm 1.2$	> 400
<b>9.1b</b>	$17.03 \pm 7.9$	$0.044 \pm 0.006 /$ $72,912 \pm 7,722$	$2.2 \pm 0.1 / 0.77$	$3.8 \pm 0.14 / 2.81$	n. b.	n. b.
<b>9.2</b>	$24.5 \pm 5.5$		$31.7 \pm 4.0 / 11.08$	$64.2 \pm 11.1 / 47.56$	n. b.	n. b.
<b>9.3</b>	$33.0 \pm 7.8$		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>9.4</b>	$23.5 \pm 5.8$		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>9.5</b>	> 400		n. I.	n. I.	n. b.	n. b.
<b>9.6</b>	> 400		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>9.7</b>	> 400		> 400	> 400	n. b.	n. b.
<b>6.1a/b,</b> <b>6.2a, 6.3b</b>	> 400		n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

n. b.: nicht bestimmt; n. I.: keine Hemmung; \* eine Messung; +  $K_i$  wurde aus  $IC_{50}$ -Wert berechnet

#### 4.4. Enzym-Assay zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit von Rhodesain

Die afrikanische Trypanosomiasis wird von Parasiten sowohl auf Menschen als auch auf Tiere übertragen. Dabei sind die Protozoen *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *gambiense* Erreger der humanen afrikanischen Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei brucei*, *congolense* und *vivax* der „Nagana“-Krankheit bei Rindern. Der Parasit lebt extrazellulär im Blut und in der Gewebeflüssigkeit seines Wirtes und wird über den Biss der Tsetse-Fliege übertragen. Jedes Jahr werden auf der ganzen Welt 25000 - 50000 neue Fälle der humanen afrikanischen Trypanosomiasis verzeichnet. Die „Nagana“-Krankheit betrifft etwa 46 Mio. Rinder und verursacht Kosten von ca. 1349 Mio. Dollar pro Jahr. Unbehandelt führt die Erkrankung der afrikanischen Trypanosomiasis zum Tode.<sup>70</sup>

Der Erreger *Trypanosoma brucei brucei*, der für den Menschen ungefährlich ist, dient als ein Modellsystem zur Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen die afrikanische Trypanosomiasis. An ihm wurde gezeigt, dass kleine Moleküle den Parasiten hemmen und diese Hemmung auf die Inhibition der Cystein-Protease Brucipain zurückzuführen sein kann.<sup>71, 72</sup> Dabei ähneln alle bisher bekannten Cystein-Proteasen der verschiedenen Protozoen der afrikanischen Trypanosomiasis in der Primär-Sequenz und den biochemische Eigenschaften der humanen Cystein-Protease Cathepsin L.<sup>73, 74</sup>

Rhodesain, das als Hauptprotease des Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* identifiziert wurde, ist ein weiteres interessantes Target zur Entwicklung neuer Inhibitoren, da es eine leicht verfügbare Cystein-Protease darstellt und für den Erreger essentiell ist.

##### 4.4.1. Ermittlung des pH-Optimums von Rhodesain und der Hemmkonstanten bei verschiedenen pH-Werten durch 9.1b

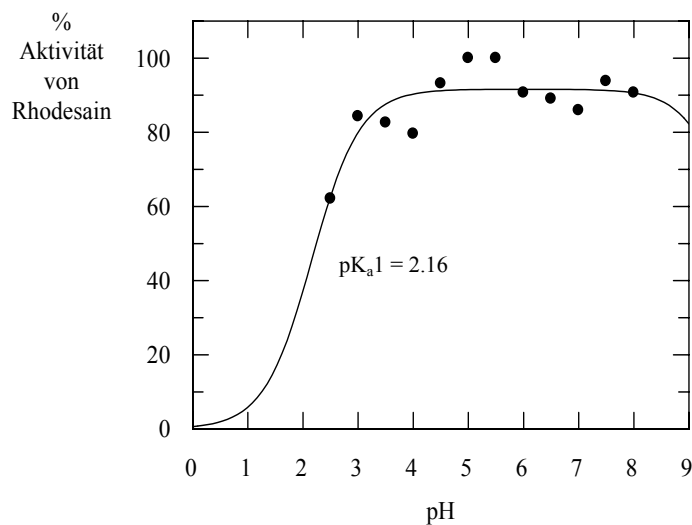
Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die Aktivität der Cystein-Protease Rhodesain bei verschiedenen pH-Werten fluorimetrisch vermessen. Der Assay wurde bei 25 °C in Citrat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Einstellungen (pH 2.5 – 8.0) unter den in Tab. 4.4 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

**Tab. 4.4:** Bedingungen für Messungen der pH-Abhängigkeit

Enzym	[S]	[I]	Puffer	$K_m$ -Wert
Rhodesain	20 $\mu$ M	0 - 160 $\mu$ M	Citrat-Puffer (pH 2.5 – 8.0)	827 nM
10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	230 $\mu$ l	

Dazu wird das in Acetat-Puffer (pH 5.5) gelöste Enzym (10  $\mu$ l) mit dem Inhibitor oder DMSO (5  $\mu$ l) versetzt. Dann folgt die Zugabe von Citrat-Puffer (230  $\mu$ l; pH 2.5 - 8.0) und Substrat (5  $\mu$ l). Sofort nach der letzten Zugabe wird alles vermischt und die Fluoreszenz-Zunahme gemessen. Bei Ermittlung der Aktivität der Protease bei verschiedenen pH-Werten wurde die Zugabe von Inhibitor durch DMSO ersetzt. Bei Bestimmung der Hemmkonstanten wurden Endkonzentrationen von 32 bis 160  $\mu$ M an Inhibitor verwendet.

Normalerweise ist das Rhodesain im Lysosom lokalisiert, in dem ein pH-Wert um die 5.5 herrscht. Bei der Bestimmung des pH-Optimums zeigte sich nun, dass die Cystein-Protease in einem weiten pH-Bereich von 5.0 - 8.0 eine sehr hohe Aktivität aufweist und auch im Bereich von pH 3.0 - 4.5 noch 80 % des Enzyms aktiv sind (Abb. 4.11). Erst ab einem relativ sauren pH-Bereich von 2.5 lässt die Aktivität des Rhodesains (~ 60 %) nach.

**Abb. 4.11:** pH-abhängige Aktivität von Rhodesain

Der aus den Versuchen ermittelte pK<sub>a</sub>-Wert im sauren pH-Bereich für Rhodesain liegt bei 2.16  $\pm$  0.13. Eine Berechnung des pK<sub>a</sub>-Wertes im alkalischen pH-Bereich war nicht möglich. Eine Anpassung der Werte an eine Glockenkurve liefert einen Wert von 9.9, der allerdings auf

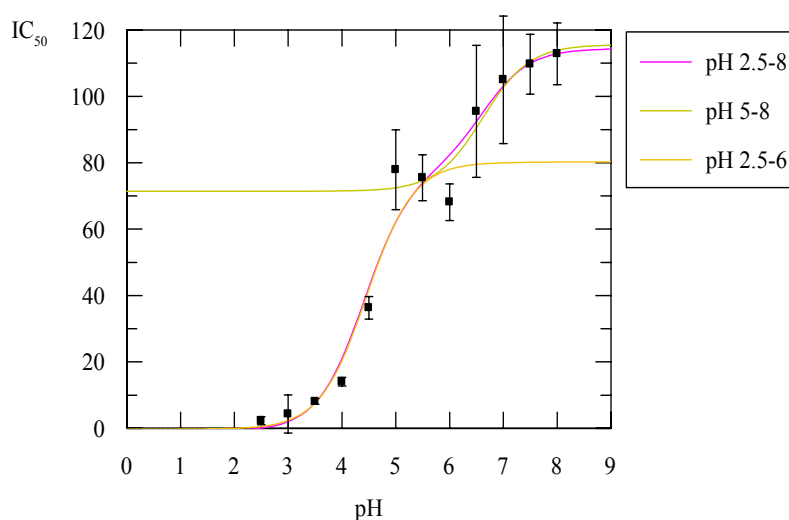
Grund der fehlenden Messwerte in diesem Bereich noch fehlerbehaftet ist. Im Vergleich dazu sind in Tab. 4.5 einige weitere  $pK_a$ -Werte von anderen Cystein-Proteasen der Papain-Familie aufgelistet.<sup>75</sup>

**Tab. 4.5:**  $pK_a$ -Werte verschiedener Cystein-Proteasen

Enzym	$pK_a1$	$pK_a2$
Papain	$3.32 \pm 0.01$	$8.34 \pm 0.04$
Caricain	$2.88 \pm 0.02$	$7.93 \pm 0.05$
Ficin	$2.49 \pm 0.02$	$8.39 \pm 0.02$

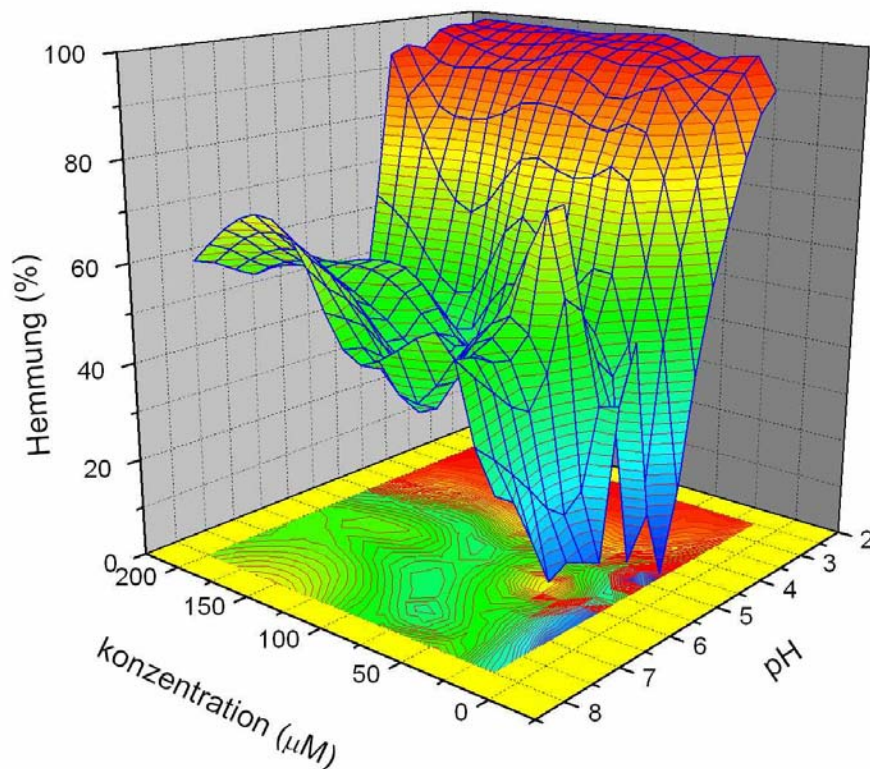
Bereits veröffentlichte Daten unterstützen die hier experimentell ermittelten Werte und die daraus folgende These, dass das Rhodesain auch im zytosolischen und extrazellulären Raum (pH 7.3) verschiedene Aufgaben übernimmt bzw. übernehmen kann.<sup>76</sup>

Die Bestimmung der pH-abhängigen Hemmung des Rhodesains erfolgte über  $IC_{50}$ -Werte, die jeweils bei den verschiedenen pH-Werten mit unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors **9.1b** bestimmt wurden.



**Abb. 4.12:** pH-Abhängigkeit der Hemmung von Rhodesain durch **9.1b**; im Diagramm angegeben sind  $IC_{50}$ -Werte in  $\mu M$ . Die experimentell gemessenen Werte wurden zwischen verschiedenen pH-Werten (a) pH 2.5 – 8; b) pH 5 – 8; c) pH 2.5 – 6) mittels nicht-linearer Regression ausgewertet. Die dabei erhaltenen  $pK_S$ -Werte sind  $pK_{S1} = 4.4 - 4.6$  und  $pK_{S2} = 6.6 - 6.7$ . Die großen Schwankungen in den oberen pH-Bereichen resultieren aus der Verwendung verschiedener Puffer (Phosphat, Acetat, Citrat).

An der Abb. 4.12 wird deutlich, dass die Hemmstärke des Inhibitors stark vom vorliegenden pH-Wert abhängt. Dabei ist die wesentlich bessere Hemmung im sauren Bereich (pH 2.5 - 4.5) wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der basische Stickstoff im Aziridinring des Inhibitors (**9.1b**) protoniert vorliegt und so ein nucleophiler Angriff durch die Thiolgruppe des Cysteins des katalytischen Zentrums des Enzyms begünstigt wird. Im Bereich von pH 5.0 - 6.0 unterscheiden sich die  $IC_{50}$ -Werte praktisch nicht voneinander; dort liegt das katalytische Zentrum des Enzyms als Ionenpaar vor und ein größerer Anteil des Aziridins liegt am Aziridin-Stickstoff unprotoniert vor. Der mittels nicht-linearer Regression gefundene  $pK_a$ -Wert von 4.4 - 4.6, der dem Aziridin zuzuordnen ist, entspricht früher gefundenen Werten.<sup>77</sup> Erst im neutralen bis alkalischen pH-Bereich (6.5 - 8.0) wird die Hemmung durch den Inhibitor deutlich schwächer. Vermutlich ist dafür das Histidin im katalytischen Zentrum verantwortlich, das in diesem pH-Bereich nicht mehr optimal als Protonendonator fungieren kann. Nicht-lineare Regression der Messwerte liefert hier einen  $pK_a$ -Wert von 6.6 - 6.7.



**Abb. 4.13:** 3D-Graph der Abhängigkeit der prozentualen Hemmung von der Konzentration des Inhibitors **9.1b** und dem vorliegenden pH-Wert

Die Abb. 4.13 veranschaulicht das Ganze noch mal in einer 3D-Graphik. Dabei wird auch die Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors deutlich sichtbar. Je höher die Konzentration von **9.1b** im pH-Bereich von 6.5 - 8.0, desto stärker ist die Hemmung des Enzyms, während im sauren pH-Bereich bereits geringe Konzentrationen ausreichen, um eine vollständige Hemmung zu erreichen.

#### 4.5. Enzym-Assay an SARS-CoV M<sup>pro</sup>

Die Klasse der Coronaviren beinhaltet etwa 25 verschiedene Coronaviren (CoVs), die eine Vielzahl an pathogenen Erkrankungen bei Menschen und Tieren auslösen können. Beispiele dafür sind die humanpathogenen Coronaviren 229E (HCoV-229E), NL63, OC43 und HKU1, die Infektionen im unteren und oberen Atemtrakt auslösen (Erkältungen, Lungenentzündung, etc.), oder das für Schweine gefährliche „transmissible gastroenteritis virus“ (TGEV).<sup>78</sup>

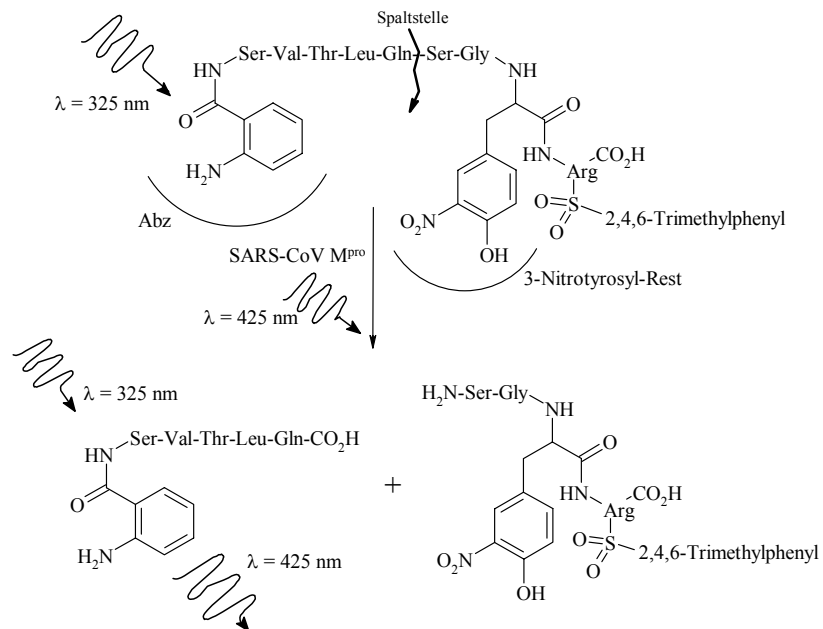
2003 wurde durch ein neu-entdecktes Coronavirus eine weltweite Epidemie eines schweren akuten Atemwegssyndroms (SARS, severe acute respiratory syndrom) ausgelöst. Die Mortalitätsrate dieses Virus beträgt trotz intensiver medizinischer Behandlung 10 %, wobei die meisten Patienten an einer fortschreitenden Zerstörung der Alveolen in den Lungenflügeln sterben. Zur Herkunft des hochkontagösen Virus gibt es bisher nur Vermutungen, wahrscheinlich wurde das Virus vom Tier auf den Menschen übertragen.<sup>79</sup>

Generell gehören die Coronaviren zur Familie der positivsträngigen RNA-Viren, d.b., dass die RNA des Virus in der Wirtszelle durch Zell-Enzyme in mehrere große Polyproteine translatiert wird. Sie haben alle eine sog. Hauptprotease (main protease, M<sup>pro</sup>) gemeinsam, die essentiell für den gesamten Replikationszyklus des Virus ist. Diese Hauptprotease spaltet sich autokatalytisch von den Polypeptiden ab und ist verantwortlich für einen Großteil der weiteren Prozessierung der Proteine zu Enzymen und Strukturproteinen. Sie gehört zu den Cystein-Proteasen und hat eine entfernt Chymotrypsin-ähnliche Tertiärstruktur. Allerdings fehlt ihr im katalytischen Zentrum eine Aminosäure, so dass sich dort nur eine katalytische Diade mit Cystein und Histidin befindet und ein konserviertes Wassermolekül die Funktion des Wasserstoffbrückenakzeptors übernimmt. Die SARS-CoV M<sup>pro</sup> weist eine ausgeprägte Substratspezifität für die Sequenz Val (Thr)-Leu-Gln || Ser-Gly-Phe (Leu) auf (|| markiert die Spaltstelle des Enzyms).<sup>80-82</sup>

Für die Entwicklung von Inhibitoren der Coronaviren stellt die SARS-CoV M<sup>pro</sup> ein sehr interessantes und vielversprechendes Target dar, weil sich kein entsprechendes Enzym im menschlichen Organismus findet.

#### 4.5.1. FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmkonstanten an der SARS-CoV M<sup>pro</sup>

Die Bestimmung der prozentualen Hemmung der Aziridin-2-carboxylate an der SARS-CoV M<sup>pro</sup> erfolgte über einen FRET-Assay (FRET = fluorescence resonance energy transfer). Bei diesem Verfahren wird ein Substrat verwendet, das sowohl Fluoreszenz-Donor als auch Fluoreszenz-Akzeptor besitzt. Dabei stimmen die Wellenlängen der Absorption und der Fluoreszenz im Substrat miteinander überein. Durch einen bestimmten Abstand im intakten Substrat dieser beiden Gruppen kommt es dadurch zum „inneren“ Quenching. Wenn das Substrat durch das Enzym gespalten wird, führt dies zur Änderung der räumlichen Struktur des Substrates, was eine Aufhebung des „inneren“ Quenchings zur Folge hat (Abb. 4.14). Es gilt, je mehr Substrat gespalten wird, desto höher ist die Fluoreszenz.



**Abb. 4.14:** Prinzip des FRET-Assays für die Bestimmung der Hemmung an der SARS-CoV M<sup>pro</sup>

#### 4.5.2. Screening und Bestimmung der Hemmkonstanten

Die Bestimmung der prozentualen Hemmung und der Hemmkonstanten an der SARS-CoV M<sup>pro</sup> erfolgte nach den Bedingungen eines kontinuierlichen Assays. Das eingesetzte Substrat Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(3'-NO<sub>2</sub>-Tyr)-(2,4,6-Trimethylphenylsulfonyl)-Arg-CO<sub>2</sub>H wurde von Dipl.-Chem. Markus Schiller in unserem Arbeitskreis dafür hergestellt. Bei 25 °C wurde der Assay in 20 mM Tris-Puffer (pH 7.5) in weißen 96-Well-Mirkotiterplatten unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 4.6):

**Tab. 4.6:** Bedingungen für den Assay an SARS-CoV M<sup>pro</sup>

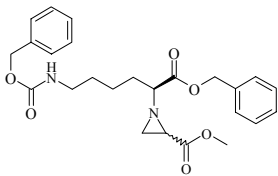
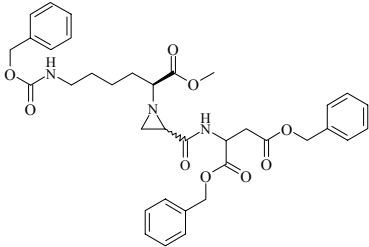
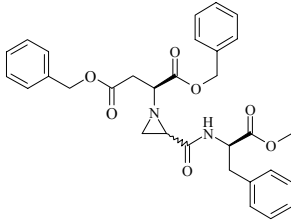
Enzym	[S]	[I]	Puffer	$K_m$ -Wert
SARS-CoV M <sup>pro</sup>	300 $\mu$ M	100 $\mu$ M bzw. weitere Verdünnungen	Tris-Puffer (pH 7.5)	190 $\mu$ M
5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	165 $\mu$ l	

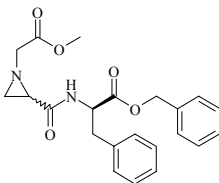
Zuerst wurde das Enzym (5  $\mu$ l) in Puffer (100  $\mu$ l) mit dem Inhibitor (20  $\mu$ l) oder DMSO versetzt. Beim Screening wurde eine Endkonzentration der Inhibitoren von 100  $\mu$ M, für die Bestimmung der Hemmkonstanten wurden Konzentrationen von 20 bis 150  $\mu$ M verwendet. Dann folgte die Zugabe von Puffer (65  $\mu$ l) und Substrat (10  $\mu$ l). Sofort nach der letzten Zugabe wird alles vermischt und die Fluoreszenz-Zunahme mittels eines Fluorimeters vermessen.

Für die Substanzen, die im Screening eine Hemmung von mindestens 40 % zeigten, wurden die Hemmkonstante  $K_i$  über den kontinuierlichen Assay oder zusätzlich  $k_i$  und  $k_{2nd}$  über einen Verdünnungs-Assay bestimmt (Tab. 4.7). Die getesteten Edukte (**6.1a/b**, **6.2b**, **6.3a**) zeigten keine Hemmung.



**Tab. 4.7:** Hemmkonstanten an SARS-CoV M<sup>pro</sup>

			
	<b>4.9b</b>	<b>9.3</b>	<b>9.2</b>
$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$87.7 \pm 7.2$	$64.5 \pm 15$	$78.6 \pm 0.9$

	
	<b>9.1b</b>
$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$28.5 \pm 0.8$
$k_i$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.063 \pm 0.025$
$k_{2nd}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$426 \pm 168$

Dabei zeigte sich, dass die Substanzen, die an der SARS-CoV M<sup>pro</sup> eine gute Hemmung zeigen, als strukturelle Gemeinsamkeit mind. zwei Phenylringe aufweisen. Der entsprechende Methylester von **4.9b**, Verbindung **4.9a**, und auch der Methylester von **9.1b**, Verbindung **9.1a**, zeigten kaum bis gar keine Aktivität gegen die Protease. So scheint dieses Strukturelement eine wichtige Rolle bei der Hemmung zu spielen.

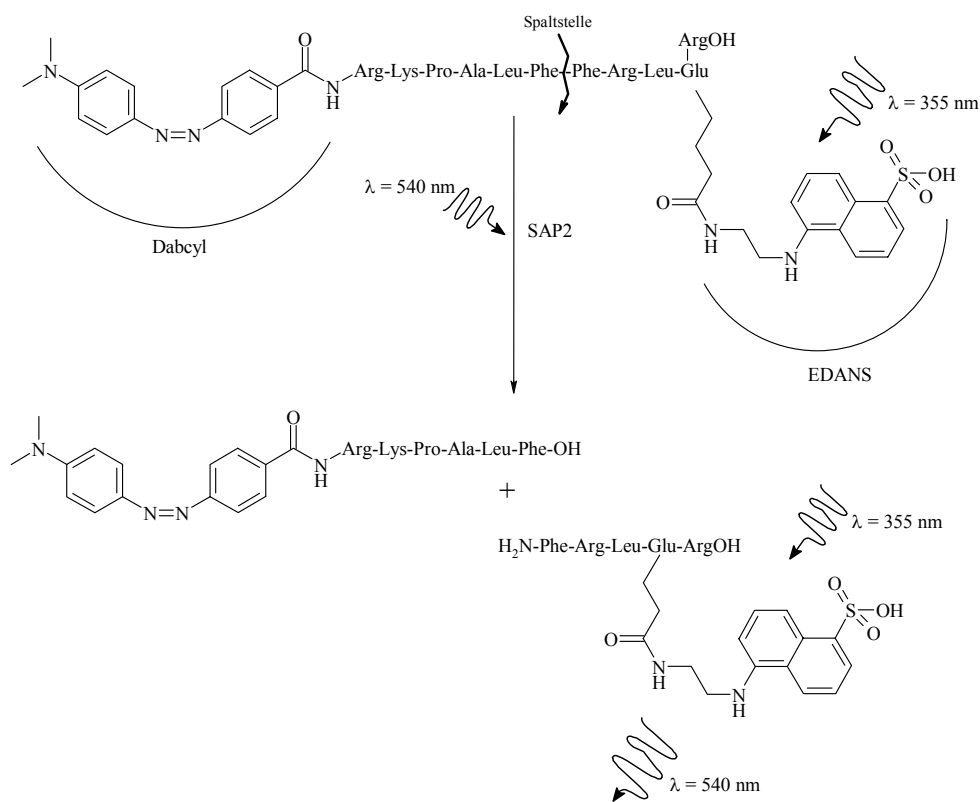
#### 4.6. Enzym-Assays an SAP2

Um zu untersuchen, ob die synthetisierten Verbindungen auch Aspartat-Proteasen hemmen, wurde ein Screening an der sekretorischen Aspartat-Protease 2 (SAP2) aus *Candida albicans* durchgeführt. Insgesamt sind bis dato 10 verschiedene sekretorische Aspartat-Proteasen (SAP1-10) in *Candida albicans* entdeckt worden, die verschiedene Aufgaben erfüllen. So sind die SAP1-3 für die initiale Anlagerung des Pilzes bei Beginn der Infektion und Gewebeschädigung verantwortlich, wohingegen SAP4-6 überwiegend beim Befall innerer

Organe wie Leber und Niere eine wichtige Rolle spielen. Bei der späteren Infektionsphase der inneren Organe tritt auch wieder die am stärksten exprimierte Aspartat-Protease SAP2 auf. Die Funktionen der SAP7-10 scheinen teilweise noch ungeklärt zu sein.<sup>83-87</sup>

#### 4.6.1. FRET-Assay zur Bestimmung der Hemmkonstanten an SAP2

Die Bestimmung der prozentualen Hemmung der Aziridin-2-carboxylate gegenüber SAP2 erfolgte über einen FRET-Assay (s. Kap. 4.4.1). Dabei wurde als Substrat Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(Edans)-ArgOH eingesetzt, das von der SAP2 zwischen den zwei aromatischen Aminosäuren Phe-Phe gespalten wird und dadurch den Abstand, der das innere Quenching verursacht, aufhebt (s. Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** Prinzip des FRET-Assays für die Bestimmung der Hemmung gegenüber SAP2

Es wurde ein Überstand von einer steril-filtrierte *Candida-albicans*-Zellkultur benutzt, in dem die SAP2 enthalten ist. Die Temperatur wurde mittels eines Heizelementes im Fluorimeter unter den Mikroliterplatten konstant auf  $30^\circ\text{C}$  gehalten, um eine optimale Enzym-Aktivität zu gewährleisten.

### 4.6.2. Screening

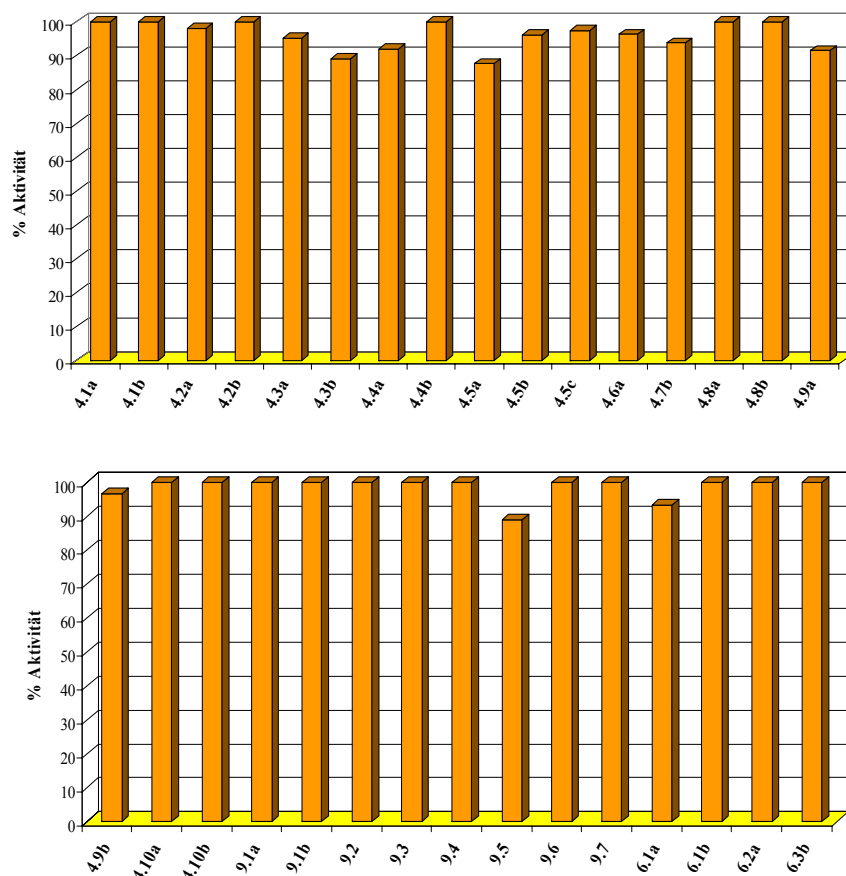
Zur Ermittlung der Aktivität der synthetisierten Aziridin-2-carboxylate und einiger Edukte an der SAP2 wurde ein Screening unter den folgenden Assay-Bedingungen durchgeführt.

Es wurde die Zunahme der Fluoreszenz bei 30 °C mit Hilfe eines Fluorimeters bei 540 nm detektiert. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm. Dafür wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc<sup>®</sup>) verwendet und eine selbstgebaute Heizeinheit bestehend aus Aluminiumplatte, Heizfolie mit Temperatursensor und Kontrolleinheit, die die Konstanz der Temperatur gewährleistete. Pro Ansatz wurden 10 µl eines *Candida-albicans*-Zellkultur-Überstandes verwendet, der soweit verdünnt ist, dass die Zunahme der Fluoreszenz über 20 min ~ 20 ΔF/min beträgt. In Tab. 4.8 sind die verwendeten Konzentrationen und Bedingung für den SAP2-Assay angegeben.

**Tab. 4.8:** Bedingungen für den SAP2-Assay

Enzym	[S]	[I]	Puffer	$K_m$ -Wert
SAP2	37.5 µM	100 µM	Citrat-Puffer (pH 3.2)	28.7 µM
10 µl	5 µl	5 µl	180 µl	

Zuerst wird das Enzym (10 µl) in Puffer (35 µl) mit dem Inhibitor oder DMSO (5 µl) vermischt und 5 min inkubiert. Anschließend wird die Mischung mit Puffer (145 µl) verdünnt und das Substrat (5 µl) zugegeben. Dabei ist es wichtig, dass der gesamte Ansatz noch mal gut vermischt wird. Anschließend folgt über 20 min die Messung der Fluoreszenz-Zunahme. Jede Substanz wurde mindestens 2-mal vermessen. Aus den Messergebnissen wurde dann jeweils der Mittelwert gebildet (Tab. 4.9).

**Tab. 4.9:** Ergebnisse des Screenings an SAP2

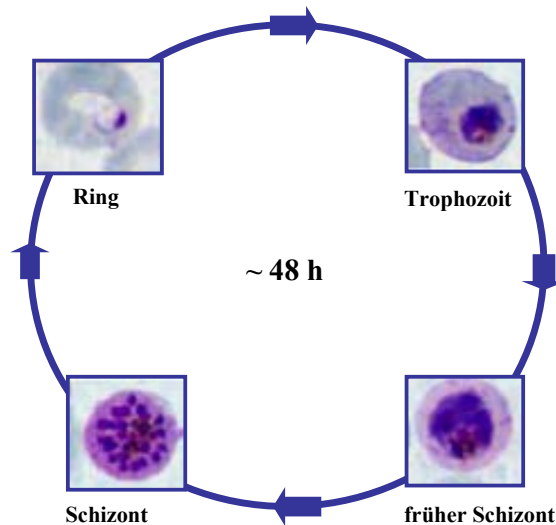
Das Screening zeigte, dass die getesteten Verbindungen praktisch kaum die Aspartat-Protease SAP2 von *Candida albicans* hemmen.

## 4.7. Infektionsbiologische Testungen

### 4.7.1. Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*

Malaria, eine der gefährlichsten humanen parasitären Krankheiten, verursacht jedes Jahr 0.7 - 2.7 Mio Todesfälle und 200 - 500 Mio Neuerkrankungen.<sup>88, 89</sup> Sie wird von einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht, die durch den Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen werden. Innerhalb der Gattung der Plasmodien sind die vier Erreger *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* für den Menschen pathogen. Sie unterscheiden sich im Krankheitsverlauf und in der

geographischen Ausbreitung. Die Symptome der Malaria sind hohes, wiederkehrendes bis periodisches Fieber, Schüttelfrost, Beschwerden des Magen-Darm-Trakts und Krämpfe. Besonders Kinder sind von dieser Erkrankung bedroht, da diese bei ihnen rasch zum Koma und Tod führen kann. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, ist einer der klinisch bedeutsamsten und gefährlichsten Erreger.



**Abb. 4.16** : Zyklus von *Plasmodium falciparum* im humanen Erythrocyten (asexueller Zyklus)

Im Laufe ihres Lebenszyklus vollziehen die Erreger der Malaria, die Plasmodien, einen Wirtswechsel. Als Endwirt dienen Stechmücken, insbesondere der Gattung *Anopheles*. In ihnen findet die Vermehrung der Plasmodien statt (sexuelle Phase = Sporogonie). Der Mensch dient dabei als Zwischenwirt, in ihm findet der asexuelle Zyklus (Schizogonie) statt. Nach der Übertragung von Sporozoiten durch die *Anopheles*-Mücke auf den Menschen gelangen diese mit dem Blutstrom in die Leber, wo sie in die Zellen des Lebergewebes eindringen. Nach Heranreifung zum Leberschizonten platzt dieser auf und die in ihm erhaltenen Merozoiten gelangen in die Blutbahn. Im Blutkreislauf angekommen dringen sie in die roten Blutkörperchen (Erythrocyten) ein, wo sie sich in Ringformen verwandeln, die dann über die Bildung eines Trophozoiten zu Schizonten heranreifen (Abb. 4.17). Dieser Zyklus dauert je nach *Plasmodium*-Art zwischen 24 und 48 h, kann aber auch bei einigen Erregerarten sehr unregelmäßig auftreten. Eine geringe Zahl von Merozoiten entwickelt sich zu Geschlechtsformen, den Gametozyten, die bei einem erneuten Stich einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden und sich in dieser wieder zu Sporozoiten entwickeln, die die Mücke dann auf den Menschen überträgt.

#### 4.7.2. Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte an *Plasmodium falciparum*

Im Zuge einer Kooperation mit Prof. Dr. P. Rosenthal, San Francisco, California, und durch die finanzielle Unterstützung von BaCaTec\*\* konnte ich sowohl die Aziridin-2-carboxylate als auch eine Reihe von weiteren Substanzen aus unserem Arbeitskreis am General Hospital, San Francisco, California, *in vitro* an *Plasmodium falciparum* testen.

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte an *Plasmodium falciparum* wurde eine Zellkultur unter Standardbedingungen angelegt.<sup>90</sup> Diese bestand aus einem Standard-Medium und Erythrocyten. Der Hämatokrit-Wert lag zwischen 2 und 5 % und die Parasitämie um die 1 %. Die Erythrocyten waren von der Blutgruppe A<sup>Rh+</sup>, und das Standard-Medium bestand aus RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES, 20 mM Natriumbicarbonat-Puffer und 0.5 % AlbuMAX I. Zu Beginn jeder Testung wurden die Parasiten mittels einer Sorbitol-Lösung synchronisiert, so dass sie alle im Ring-Stadium vorlagen. Dann wurden die Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen mit der Zellkultur 48 h inkubiert. Zuerst wurde ein Screening durchgeführt bei Endkonzentrationen von 1, 10 und 100  $\mu$ M der Substanzen. Nach 48 h wurde das Albumax-Medium entfernt und eine 1%ige Lösung aus Formaldehyd in PBS (pH 7.4) hinzugefügt und zwei Tage bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Erythrocyten wurden in eine 0.1%ige Triton-X-100-Lösung in PBS, die 1 nM YOYO-1 beinhaltetete, überführt. Dann wurde die Anzahl der infizierten und nicht-infizierten Erythrocyten mittels einer fluoreszenzaktivierten Zellanalyse bestimmt und mit denen der nicht behandelten Zellkulturen verglichen. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, wobei die maximale DMSO-Konzentration im Assay 0.1 % nicht überstieg. Es wurden zwei voneinander unabhängige Assays in weißen 96-Mikrotiterplatten mit einem Endvolumen von 200  $\mu$ l durchgeführt. Zeigten die Substanzen eine Hemmwirkung beim Screening, wurde der  $IC_{50}$ -Wert durch eine Konzentrationsreihe der Inhibitoren ermittelt.

#### 4.7.3. Ergebnisse der Aziridin-2-carboxylate an *Plasmodium falciparum*

Die Ergebnisse der Testungen von Aziridin-2-carboxylaten an *Plasmodium falciparum* sind in Tab. 4.10 dargestellt. Alle anderen Substanzen, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind, zeigten beim Screening keine Hemmung.

---

\*\* Bavaria California Technology Center, [www.bacatec.de](http://www.bacatec.de)

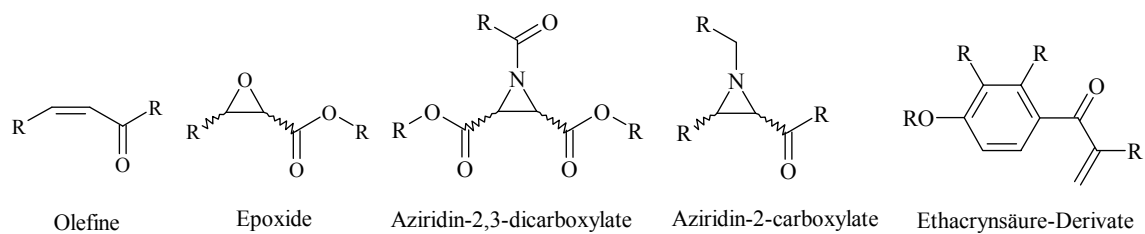
**Tab. 4.10:**  $IC_{50}$ -Werte von Aziridin-2-carboxylaten an *Plasmodium falciparum*

<i>P. falc.</i> $IC_{50}$ [ $\mu$ M]		<i>P. falc.</i> $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	
<b>4.8b</b>	4.5 $\pm$ 0.6	<b>9.1b</b>	9.7 $\pm$ 0.3
<b>4.9a</b>	5.2 $\pm$ 4.6	<b>9.2</b>	16.7 $\pm$ 3.1
<b>4.9b</b>	2.2 $\pm$ 0.3	<b>9.3</b>	5.5 $\pm$ 0.4
<b>4.10a</b>	28 $\pm$ 5.8	<b>9.4</b>	1.7 $\pm$ 0.4
<b>4.10b</b>	21.9 $\pm$ 0.4	<b>9.5</b>	21.4 $\pm$ 1.9
		<b>9.7</b>	13.4 $\pm$ 1.1

Die Testungen zeigen, dass die Verbindungen, die mit  $N\epsilon$ -geschütztem (**4.9a/b**, **9.3**, **9.4**) bzw.  $N\alpha$ -geschütztem Lysin (**4.8b**) synthetisiert wurden, die größte Aktivität gegen den Erreger aufweisen ( $IC_{50}$ -Bereich zwischen 2 und 5  $\mu$ M). Dabei zeigt das in Position C2 des Aziridins mit Phenylalaninmethylester substituierte Aziridin-2-carboxylat **9.4** eine etwas stärkere Hemmung als das mit Asparaginsäuredibenzylester substituierte **9.3**. Auch bei allen anderen synthetisierten Aziridin-2-carboxylaten, die einen Phenylalaninester in ihrer Struktur besitzen, **4.10a/b**, **9.1b**, **9.2**, **9.5** ist eine deutliche Hemmung an *Plasmodium falciparum* zu erkennen. Ausnahme dabei ist der Methylester **9.1a**, der keinerlei Hemmung am Erreger zeigt, wobei aber der entsprechende Benzylester **9.1b** einen sehr niedrigen  $IC_{50}$ -Wert von 9.7  $\mu$ M besitzt. Interessant ist auch, dass das mit Benzylamin und einem Valinmethylester-Derivat synthetisierte **9.7** eine Hemmung aufweist, die entsprechende Verbindung mit Benzylamin und Phenylalaninmethylester **9.6** aber den Erregern nicht hemmt.

#### 4.7.4. Screening verschiedener Klassen von Inhibitoren an *Plasmodium falciparum*

Im Rahmen dieses Forschungsaufenthaltes wurden außerdem verschiedenste Inhibitoren aus unserem Arbeitskreis *in vitro* an *Plasmodium falciparum* getestet. Zu diesen Substanz-Klassen gehören Olefine, Epoxide, Ethacrynsäure-Derivate, an Position-3-substituierte Aziridin-2-carboxylate und Aziridin-2,3-dicarboxylate (Abb. 4.17).<sup>91-95</sup>



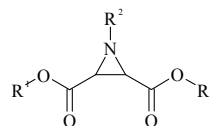
**Abb. 4.17:** An *Plasmodium falciparum* getestete Substanz-Klassen

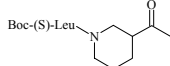
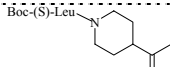
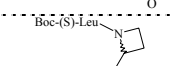
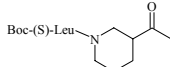
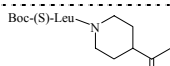
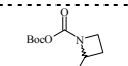
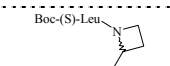
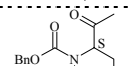
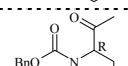
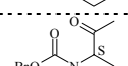
Außerdem wurden von den Verbindungen auch die  $IC_{50}$ -Werte an Falcipain 2 und 3 bestimmt, wobei die Substanzen 30 Min. mit dem jeweiligen Enzym vorinkubiert wurden.

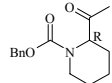
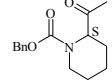
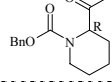
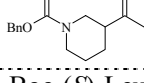
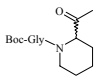
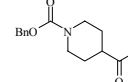
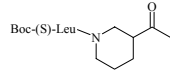
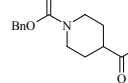
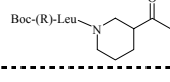
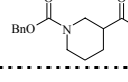
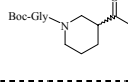
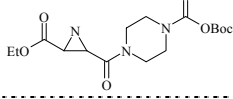
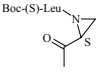
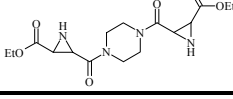
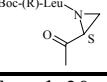
#### 4.7.5. Ergebnisse der Aziridin-2,3-dicarboxylate an *Plasmodium falciparum*

In Tab. 4.11 sind nachfolgend die Ergebnisse der Testungen der Aziridin-2,3-dicarboxylate an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum* dargestellt.




**Tab. 4.11:** Ergebnisse der Aziridin-2,3-dicarboxylate an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum*

Konf.	R¹	R²	FP2	FP3	<i>P. falc.</i>	Konf.	R¹	R²	FP2	FP3	<i>P. falc.</i>		
			$K_i^+$ [μM]	$IC_{50} / K_i^+$ [μM]	$IC_{50}$ [μM]				$K_i^+$ [μM]	$IC_{50} / K_i^+$ [μM]	$IC_{50}$ [μM]		
I-a	<i>S,S</i>	Et	Boc-( <i>S</i> )-Leu-( <i>S</i> )-Pro	45.3	>400	> 60	I-k	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>S</i> )-Phe-( <i>S</i> )-Ala	>400	170 / 125.9	> 60
I-b	<i>S,S</i>	Et		13.1	>400	> 60	I-l	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>S</i> )-Phe-( <i>R</i> )-Ala	6.5	74 / 54.8	> 60
I-c	<i>S,S</i>	Et		20.1	>400	> 60	I-m	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>R</i> )-Phe-( <i>S</i> )-Ala	>400	102 / 75.6	> 60
I-d	<i>R,R</i>	Et		38.7	>400	> 60	I-n	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>R</i> )-Phe-( <i>R</i> )-Ala	45.1	52 / 38.5	> 60
I-e	<i>R,R</i>	Et	Boc-( <i>S</i> )-Leu-( <i>S</i> )-Pro	>400	> 400	> 60	I-o	<i>S,S</i>	Et	Boc-( <i>S</i> )-Pro	>400	> 400	> 60
I-f	<i>R,R</i>	Et		28.3	>400	> 60	I-p	<i>R,R</i>	Et	Boc-( <i>S</i> )-Pro	>400	> 400	> 60
I-g	<i>R,R</i>	Et		>400	17 / 12.6	> 60	I-q	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
I-h	<i>S,S</i>	Bn		34.3	89 / 65.9	> 60	I-r	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
I-i	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>S</i> )-Leu-( <i>S</i> )-Pro	>400	83 / 61.5	> 60	I-s	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
I-j	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>S</i> )-Leu-( <i>R</i> )-Pro	43.3	149 / 110	16	I-t	<i>S,S</i>	Et		>400	> 400	> 60

Konf.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	FP2 K <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	FP3 IC <sub>50</sub> / K <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	<i>P. falc.</i> IC <sub>50</sub> [μM]	Konf.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	FP2 K <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	FP3 IC <sub>50</sub> / K <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	<i>P. falc.</i> IC <sub>50</sub> [μM]		
<b>I-tt</b>	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>R</i> )-Leu-( <i>S</i> )-Pro	15.2 <sup>+</sup>	76 / 56.3	> 60	<b>II-e</b>	<i>S,S</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>I-u</b>	<i>S,S</i>	Bn	Boc-( <i>R</i> )-Leu-( <i>R</i> )-Pro	>400	287 / 212.6	> 60	<b>II-f</b>	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>I-v</b>	<i>R,R</i>	Bn	Boc-( <i>S</i> )-Leu-( <i>S</i> )-Pro	0.4; 15.2 <sup>*</sup>	40 / 29.6	4	<b>II-g</b>	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>I-w</b>	<i>S,S</i>	Bn	Boc-Gly-( <i>S</i> )-Pro	>400	104 / 77	> 60	<b>II-h</b>	<i>S,S</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>I-x</b>	<i>S,S</i>	Bn	Boc-Gly-( <i>R</i> )-Pro	94.3	87 / 64.4	> 60	<b>II-i</b>	<i>R,R</i>	Et	Boc-( <i>S</i> )-Leu	0.4	>400	> 60
<b>I-y</b>	<i>S,S</i>	Bn		509	>400	> 60	<b>II-j</b>	<i>S,S</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>I-z</b>	<i>S,S</i>	Bn		36.2	78 / 57.8	> 60	<b>II-k</b>	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>II-a</b>	<i>S,S</i>	Bn		48.3	74 / 54.8	> 60	<b>II-l</b>	<i>R,R</i>	Et		>400	> 400	> 60
<b>II-b</b>	<i>S,S</i>	Bn		48.0	50 / 37	> 60	<b>II-m</b>	<i>S,S</i>			>400	> 400	> 60
<b>II-c</b>	<i>S,S</i>	Bn		0.2; 0.079 <sup>*</sup>	0.25 / 0.18	5	<b>II-n</b>	<i>S,S</i> ; <i>S,S</i>			>400	> 400	> 60
<b>II-d</b>	<i>S,S</i>	Bn		31.9	> 400	> 60							

<sup>+</sup> K<sub>i</sub>-Werte s. <sup>37</sup>; \* IC<sub>50</sub>-Wert [μM] nach 30 min Inkubation von E und I; <sup>+</sup> K<sub>i</sub> wurde aus IC<sub>50</sub>-Wert berechnet

Generell zeigten die Aziridin-2,3-dicarboxylate eine bessere Hemmung als die anderen elektrophilen Bausteine (Epoxide, Ethacrynsäure-Derivate und Aziridin-2-carboxylate). In den meisten Fällen war die Hemmung an FP2 größer als an FP3. Ausnahmen sind dabei die Inhibitoren **I-k**, **I-u** und **I-j**, die FP3 hemmen, aber keine Wirkung gegen FP2 zeigen.

Von den getesteten Aziridin-2,3-dicarboxylaten zeigen 3 Verbindungen sehr niedrige  $IC_{50}$ -Werte gegen den Parasiten, die unter 20  $\mu\text{M}$  liegen: **II-c**, **I-v** und **I-j**. Diese Verbindungen sind außerdem die wirksamsten Inhibitoren gegen die Falcipaine 2 und 3, wobei diese Ergebnisse gut mit der Hemmwirkung gegen *Plasmodium falciparum* korrelieren.

Die Verbindung **II-c** ist neben **I-v** der aktivste Inhibitor an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum* mit einem  $K_i$ -Wert von 0.2  $\mu\text{M}$  an FP2 bzw. einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.079  $\mu\text{M}$  (bei 30 Min. Vorinkubation), einem  $IC_{50}$ -Wert (bei 30 Min. Vorinkubation) von 0.25  $\mu\text{M}$  an FP3 und 5  $\mu\text{M}$  an *Plasmodium falciparum*. Die Verbdg. **I-v** dagegen, die zu einer Serie von Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit verschieden konfigurierten Leucin- und Prolin-Resten (**I-a**, **I-tt**, **I-v**, **I-j**, **I-u**, **I-i**) gehört, hat zwar einen  $IC_{50}$ -Wert von 4  $\mu\text{M}$  an *Plasmodium falciparum*, die Hemmung an FP2 ( $K_i$ : 0.4  $\mu\text{M}$ ;  $IC_{50}$ : 15.2  $\mu\text{M}$ ) und FP3 ( $IC_{50}$ : 40  $\mu\text{M}$ ) ist allerdings nicht ganz so gut wie bei **II-c**.

#### 4.7.6. Ergebnisse der Epoxide und an Position 3 substituierten Aziridin-2-carboxylate an *Plasmodium falciparum*

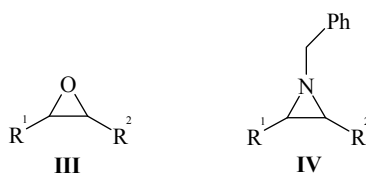
Die getesteten Epoxide und Aziridine wurden als selektive Inhibitoren von Aspartat-Proteasen synthetisiert. Daher besitzen sie auch in der Regel eine *cis*-Konfiguration am Ring, da dies ein Strukturmerkmal ist, das für die Hemmung von Aspartat-Proteasen sehr wichtig ist.

In Tab. 4.12 sind die Ergebnisse der Testungen der Epoxide und der Aziridin-2-carboxylate an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum* dargestellt.

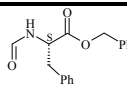
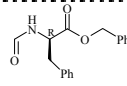
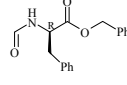
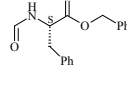
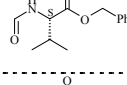
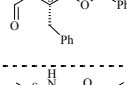

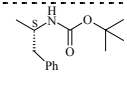
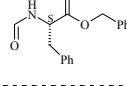
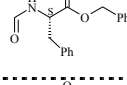
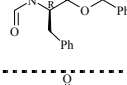
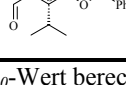
Als einzige Verbindung der getesteten Epoxide zeigt **III-4** eine Hemmung an FP3 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 371  $\mu\text{M}$ , allerdings keine Hemmung an FP2. **III-7** dagegen hemmt FP2 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 373  $\mu\text{M}$ , aber zeigt keinerlei Hemmung gegen FP3.

Keines der getesteten Epoxide zeigt Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*.

Die getesteten Aziridin-2-carboxylate zeigen alle eine Hemmung gegen FP2 im Bereich von unter 100  $\mu\text{M}$ , aber keine Hemmung gegen FP3. Die einzige Substanz, die das Wachstum von *Plasmodium falciparum* hemmt, ist **IV-2** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$ . Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 84  $\mu\text{M}$  an FP2 scheint die gute Hemmung am Parasiten eher auf die Inhibition der Aspartat-Proteasen des Parasiten, die Plasmeptinasen, zurückzuführen sein.



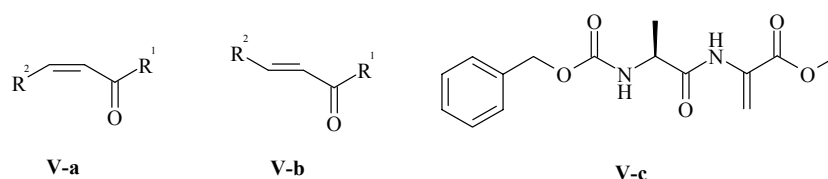
**Tab. 4.12:** Ergebnisse der Epoxide und *cis*-konfigurierten Aziridin-2-carboxylate an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum*

	Konf.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	FP2 <i>IC</i> <sub>50</sub> / <i>K</i> <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	FP3 <i>IC</i> <sub>50</sub> / <i>K</i> <sub>i</sub> <sup>+</sup> [μM]	<i>P. falc.</i> <i>IC</i> <sub>50</sub> [μM]
III-1	<i>R,R</i>	Me		n. I.	n. I.	n. I.
III-2	<i>R,R</i>	Me		>400	>400	n. I.
III-3	<i>S,S</i>	Me		>400	>400	n. I.
III-4	<i>S,S</i>	Me		>400	371 / 274.8	n. I.
III-5	<i>R,R</i>	Me		>400	>400	n. I.
III-6	<i>S,R</i>	CO <sub>2</sub> Et		>400	>400	n. I.
III-7	<i>S,R</i>			373 / 130.4	>400	n. I.
IV-1	<i>R,R</i> + <i>S,S</i>	Me		92 / 32.2	n. I.	n. I.
IV-1a	<i>R,R</i>	Me		61 / 21.3	n. I.	n. I.
IV-2	<i>R,R</i> + <i>S,S</i>	Ph		84 / 29.4	n. I.	11.
IV-3	<i>R,R</i>	Ph		51 / 17.8	n. I.	n. I.

n. I.: keine Hemmung; <sup>+</sup> *K*<sub>i</sub> wurde aus *IC*<sub>50</sub>-Wert berechnet

#### 4.7.7. Ergebnisse der Michael-Systeme und Ethacrynsäure-Derivate an *Plasmodium falciparum*

Keine der getesteten Substanzen aus der Serie der Michael-Systeme zeigt eine antiplasmodiale Aktivität. Die beste Verbindung unter den *Z*-Olefinen gegen die Falcipaine 2 und 3 ist **V-a5**, das einen  $IC_{50}$ -Wert an FP2 von 30  $\mu\text{M}$  und an FP3 von 58  $\mu\text{M}$  besitzt. Die Substanzen **V-a1**, **V-a2** und **V-a8** weisen  $IC_{50}$ -Werte um die 60  $\mu\text{M}$  auf, wobei nur **V-a1** auch FP3 hemmt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 266  $\mu\text{M}$ . Bei den *E*-Olefinen hemmen **V-b1** und **V-b2** FP2; FP3 wird von keinem der *E*-Olefine gehemmt (Tab. 4.13).



**Tab. 4.13:** Ergebnisse der Olefine an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum*

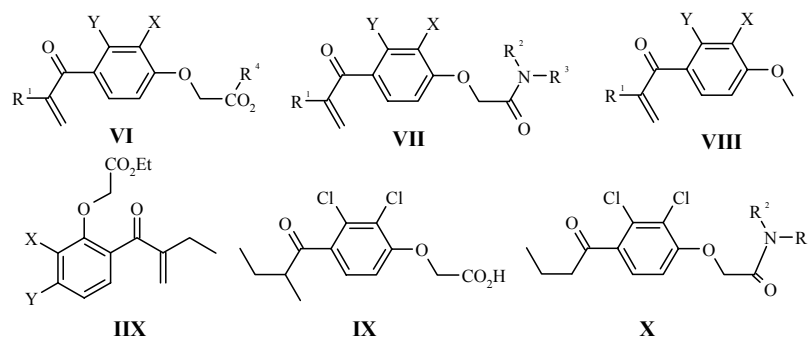
	$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	FP2 $IC_{50} / K_i^+ [\mu\text{M}]$	FP3 $IC_{50} / K_i^+ [\mu\text{M}]$	<i>P. falc.</i> $IC_{50} [\mu\text{M}]$
<b>V-a1</b>	OEt	-( <i>S</i> )-Phe-OBn	66 / 23	266 / 197	>100
<b>V-a2</b>	-( <i>S</i> )-Phe- <i>Or</i> Bu		69 / 24.1	>400	>100
<b>V-a3</b>	OEt	-CO-( <i>S</i> )-Phe-OBn	104 / 36.4	n. I.	>100
<b>V-a4</b>	OEt	-CO-( <i>S</i> )-Val-OBn	109 / 38.1	n. I.	>100
<b>V-a5</b>	OH	-CO-( <i>S</i> )-Phe-OBn	30 / 10.5	58 / 42.9	>100
<b>V-a6</b>	OEt		215 / 75.2	n. I.	>100
<b>V-a7</b>	-( <i>S</i> )-Phe-OBn	-CO-( <i>S</i> )-Phe-OBn	40 / 13.9	n. I.	>100
<b>V-a8</b>	-( <i>S</i> )-Val-OBn	-CO-( <i>S</i> )-Phe-OBn	60 / 20.9	n. I.	>100
<b>V-b1</b>	OEt		116 / 40.5	n. I.	>100
<b>V-b2</b>	-( <i>S</i> )-Phe-OBn	Me	80 / 27.9	>400	>100
<b>V-b3</b>	-( <i>S</i> )-Phe-OBn	CO <sub>2</sub> Et	>400	>400	>100
<b>V-c</b>			>400	>400	>100

n. I.: keine Hemmung;  $^+ K_i$  wurde aus  $IC_{50}$ -Wert berechnet

Nur zwei Verbindungen (**VII-b**, **VII-f**) aus der Serie der getesteten Ethacrynsäure-Derivate zeigen eine antiplasmodiale Aktivität. Im Hinblick auf die Hemmung der Falcipaine scheint

es allerdings keine Korrelation zwischen der Aktivität gegen die Falcipaine und der antiplasmodialen Aktivität zu geben (Tab. 4.14).

Die an den Falcipainen wirksamsten Substanzen zeigen nur moderate  $IC_{50}$ -Wert zwischen 20 und 60  $\mu\text{M}$  (**VI-a**: 21.2  $\mu\text{M}$  gegen FP2 ;**IX-a**: 38.6  $\mu\text{M}$  gegen FP2; **VII-c**: 56.7  $\mu\text{M}$  gegen FP3).



Tab. 4.14: Ergebnisse der Ethacrynsäure-Derivate an FP2, FP3 und *Plasmodium falciparum*

	$R^1$	$R^4$	Y	X	$\begin{matrix} R^2 \\   \\ N \\   \\ R^3 \end{matrix}$	FP2 $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	FP3 $IC_{50} / K_i^+$ [ $\mu\text{M}$ ]	<i>P. falc.</i> $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>VI-a</b>	Et		Cl	Cl		21.2	163 / 120.7	>100
<b>VI-b</b>	Me		CH <sub>3</sub>	H		299.7	>400	>100
<b>VI-c</b>	Et		CH <sub>3</sub>	H		228.7	326.7 / 242	>100
<b>VI-d</b>	Me		H	H		>400	n.I.	>100
<b>VI-e</b>	Et		H	Cl		174.1	346.4 / 256.6	>100
<b>VI-f</b>	Et	H	Cl	Cl		155.1	>400	>100
<b>VI-g</b>	Et	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		>400 <sup>#</sup>	n.I.	>100
<b>VII-a</b>	Et		Cl	Cl	-NH- <i>tert</i> -butyl	89	152.9 / 113.3	>100
<b>VII-b</b>	Et		Cl	Cl	-NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	111.2	>400	29.34
<b>VII-c</b>	Et		Cl	Cl	-( <i>S</i> )-AlaOBn	62.3	56.7 / 42	>100
<b>VII-d</b>	Et		Cl	Cl	-Gly-( <i>S</i> )-PheNH <sub>2</sub>	84.6	n.I.	>100
<b>VII-e</b>	Et		Cl	Cl	-NH- <i>n</i> -Butyl	64.2	158.1 / 117.1	>100
<b>VII-f</b>	Et		Cl	Cl		675 <sup>++</sup>	>400	27.41
<b>VII-g</b>	Et		Cl	Cl		107.4	>400	>100
<b>VII-h</b>	Et		Cl	Cl	-NH-Phenyl	94	87.2 / 64.6	>100
<b>VII-i</b>	Et		Cl	Cl	-NH- <i>n</i> -Hexyl	63.7	122.6 / 90.8	>100
<b>VII-j</b>	Et		Cl	Cl	-NH-Benzyl	116.6	157.8 / 116.8	>100
<b>VIII-a</b>	Me		H	Cl		25.6	>400	>100
<b>VIII-b</b>	Et		H	Cl		145.5	>400	>100
<b>VIII-c</b>			H	H		188	99.8 / 73.9	>100
<b>IIX-a</b>	Et		Cl	Cl		38.6	381.9 / 282.9	>100
<b>VI-h</b>	Me		H	Cl		>400	>400	>100
<b>VII-k</b>	Et		Cl		-Gly-( <i>S</i> )-Ala-NH <sub>2</sub>	74.1	>400	>100
<b>IX-a</b>						>400 <sup>#</sup>	>400	>100
<b>X-a</b>					-NH- <i>tert</i> -Butyl	>400 <sup>#</sup>	n.I.	>100
<b>X-b</b>					-NH- <i>n</i> -Butyl	>400 <sup>#</sup>	n.I.	>100

<sup>++</sup> $k_{2nd}$  zeitabhängig; n.I.: keine Hemmung; <sup>#</sup>  $IC_{50}$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]; in allen anderen Fällen liegt nicht-zeitabhängige Hemmung vor; <sup>+</sup>  $K_i$  wurde aus  $IC_{50}$ -Wert berechnet

#### 4.7.8. Aktivität gegen *Trypanosoma brucei brucei* und *Leishmania major*

Viele der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen konnten durch Kooperationen innerhalb des SFB630 (Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) gegen verschiedene Krankheitserreger getestet werden.

Es wurde dabei zum einen auf den Erreger der Nagana-Erkrankung bei Rindern, *Trypanosoma brucei brucei* (s. 4.4), und den für den Menschen gefährlichen Erreger der Leishmaniose, *Leishmania major*, getestet. Die Protozoen der Spezies *Leishmania major* werden durch die Sandmücke übertragen und greifen vor allem Lymphknoten, Leber, Milz und Knochenmark an. Gemeinsam haben die beiden Erreger, dass sie Makrophagen als Wirtszelle nutzen und Cystein-Proteasen eine sehr wichtige Rolle spielen.

Die in Tab. 4.15 dargestellten Testergebnisse zeigen, dass die bisher getesteten Verbindungen keine Aktivität gegen den Erreger *Leishmania major* aufweisen, aber eine deutliche Hemmwirkung gegen *Trypanosoma brucei brucei* sichtbar ist.

Unter den besten Verbindungen gegenüber *Trypanosoma brucei brucei* ist das mit Phenylalanin gekoppelte Aziridin **9.1b**, das einen  $IC_{50}$ -Wert um die 20  $\mu\text{M}$  sowohl nach 48 als auch nach 72 Std besitzt. Allerdings ist diese Verbindung als einzige toxisch gegenüber Makrophagen. Das sich nur um den Benzylester unterscheidende **9.1a** weist eine etwas schwächere Hemmwirkung auf den Erreger auf, ist aber im Gegensatz zum **9.1a** bei 100  $\mu\text{M}$  nicht toxisch an Makrophagen.

Ebenfalls interessant ist die Verbindung **4.9a**, die ähnlich gute  $IC_{50}$ -Werte aufweist wie **9.1b** und bei 100  $\mu\text{M}$  nicht toxisch gegenüber Makrophagen wirkt. Sie ist am Stickstoff der Seitenkette des Lysins Z-geschützt.

Auffallend bei den Testungen an *Trypanosoma brucei brucei* ist, dass alle wirksamen Verbindungen mindestens eine Phenylgruppe in ihrer Struktur besitzen, entweder als Benzylester oder aber als Seitenkette von Phenylalanin.

**Tab. 4.15:**  $IC_{50}$ -Werte an *Leishmania major*, *T. b. brucei* und Makrophagen

	<i>Leishmania major</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>		<i>Makrophagen</i>
	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] 48 h	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] 48 h	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] 72 h	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] 48 h
<b>4.1a</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.1b</b>	> 100	28.84	43.81	> 100
<b>4.2a</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.2b</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.3a</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.3b</b>	> 100	26.94	29.60	> 100
<b>4.4b</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.5b</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.6a</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.7b</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>4.9a</b>	> 100	19.58	27.36	> 100
<b>4.10a</b>	> 100	32.16	31.28	> 100
<b>9.1a</b>	> 100	26.73	31.00	> 100
<b>9.1b</b>	> 100	19.55	22.60	80

#### 4.7.9. Aktivität gegen Bakterien

In einem anderen Projekt des SFB630 wurden im Arbeitskreis von PD Dr. Wilma Ziebuhr am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg sog. Problemkeime, zu denen sowohl die gram-negativen Erreger *Escheria coli* und *Pseudomonas aeruginosa* als auch die gram-positiven *Staphylococcus*-Arten *S. aureus* (Linie 325 und 8325) und *S. epidermidis* (Linie RP-62) zählen, untersucht.



#### 4.7.10. Wachstumshemmung von Bakterien

Es wurde die Wachstumshemmung gegenüber „Krankenhaus-Erregern“ untersucht, wobei das Hemmvermögen der Inhibitoren, das Wachstum der Bakterien zu hemmen, in der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) ausgedrückt wird. Ist die MHK über einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$ , so gilt die Substanz als inaktiv.

Keine der untersuchten Substanzen zeigte Aktivität gegen die gram-negativen Erreger *Escheria coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Allerdings hemmen einige Verbindungen das Wachstum von *S. aureus* (**9.1b**) und *S. epidermidis* (**9.1b**, **6.1a**, **6.3b**) (s. Tab. 4.16).

**Tab. 4.16:** Ergebnisse der Wachstumshemmung an verschiedenen Erregern

<b>Mikrobouillondilutionstest - Wachstumshemmtest</b>					
<b>% Hemmung bei 160 <math>\mu\text{M}</math></b>					
	<i>S. aureus</i> 325	<i>S. aureus</i> 8325	<i>S. epi.</i> RP-62	<i>E. coli</i> 536	<i>P. aerugin.</i> Nr. 3
<b>9.1b</b>	> 160 $\mu\text{M}$	80 %	30 %	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$
<b>4.8b</b>	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$
<b>6.1a</b>	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$	50 %	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$
<b>6.3b</b>	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$	40 %	> 160 $\mu\text{M}$	> 160 $\mu\text{M}$

#### 4.7.11. Biofilmhemmung von Bakterien

Durch Ausbildung eines Biofilms ist es den Bakterien *S. aureus* und *S. epidermidis* möglich, sich an Kathetern, Beatmungsschläuchen, Implantaten oder Wundoberflächen festzusetzen, was eine erhebliche Gefährdung für Patienten darstellt. Zudem kann der Biofilm als Diffusionshindernis die Resistenz gegenüber Antibiotika bis zu 500-fach erhöhen. Grund für die Ausbildung des Biofilms ist das Polysaccharid PIA (Polysaccharid intrazellulärer Adhäsion), das den Kontakt zwischen den Bakterienzellen vermittelt.<sup>96, 97</sup>

Bei den untersuchten Verbindungen zeigten nur zwei Verbindungen eine Wirkung auf die Biofilmbildung, wobei eine von diesen die Biofilmbildung von *S. aureus* die andere von *S. epidermidis* hemmte (s. Tab. 4.17).

**Tab. 4.17:** Ergebnisse der Biofilm-Testungen an verschiedenen Erregern

<b>Biofilm-Testung</b>			
<b>% Hemmung (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
	<i>S. aureus</i> 325	<i>S. aureus</i> 8325	<i>S. epi.</i> RP-62
<b>9.1b</b>	100 (40)	0 (160)	0 (160)
<b>4.8b</b>	0 (160)	0 (160)	30 (160)
<b>6.1a</b>	0 (160)	0 (160)	0 (160)
<b>6.3b</b>	0 (160)	0 (160)	0 (160)

#### 4.7.12. Aktivität gegen *Candida albicans*

In einem weiteren Projekt des SFB630 wurden einige der synthetisierten Verbindungen auch an *Candida-albicans*-Zellkulturen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Joachim Morschhäuser vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg untersucht.

#### 4.7.13. Wachstumshemmung von *Candida albicans*

Der Hefepilz *Candida albicans* ist etwa bei der Hälfte aller Menschen in Haut und Schleimhäuten des Verdauungstraktes angesiedelt und kommt auch in der vaginalen Flora vor.<sup>98</sup> Eigentlich ist er für den Menschen ungefährlich. Bei einer geschwächten Immunabwehr kann es allerdings zu Kandidosen der Mund- und Rachenschleimhäuten sowie Genitalkrankheiten oder Allergien kommen. Nach Dissemination über die Blutbahn führt der Pilz zu lebensbedrohlichen Organschädigungen, vor allem der Leber und der Niere.<sup>83, 87</sup>

Bei den untersuchten Verbindungen zeigte sich, dass keine der Substanzen Aktivität gegenüber *Candida albicans* besaß.

## 5. Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen

Im folgenden Kapitel werden die Hemmdaten der synthetisierten Aziridin-2-carboxylate systematisch nach ausgewählten Kriterien analysiert. Dafür wird der Einfluss der verschiedenen Substituenten, der AS-Seitenketten und der Ester auf die Hemmung der Cystein-Proteasen untersucht. Außerdem wird auch die Selektivität zwischen den Cystein-Proteasen und im Vergleich zur Aspartat-Protease SAP2 gegenüber gestellt.

### 5.1. Selektivität bezüglich der Enzyme

#### 5.1.1. Aspartat-Protease SAP2 *versus* Cystein-Proteasen

Keines der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Aziridin-2-carboxylate zeigte an der Aspartat-Protease SAP2 eine größere Hemmung als 12 %. Das zeigt, dass die Verbindungen selektiv gegenüber Cystein-Proteasen sind.

#### 5.1.2. Cathepsin B *versus* Cathepsin L

Viele der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen zeigen eine Aktivität gegen Enzyme der Cathepsin-L-Subfamilie (Rhodesain, Falcipaine und Cathepsin L). Cathepsin B dagegen wird von keiner der Substanzen gehemmt. Da noch nicht alle Substanzen an den verschiedenen Enzymen getestet werden konnten, kann hier nur ein Trend in der Hemmstärke für die einzelnen Enzyme in Bezug auf die Verbindungen widerspiegelt werden.

Unter den an allen Cystein-Proteasen getesteten Verbindungen befinden sich einige, die selektiv Cathepsin L hemmen, d.b., dass für die anderen Proteasen keine Hemmung bei einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  festgestellt werden konnte. Zu diesen Verbindungen gehören **4.1a**, **4.1b**, **4.2a**, **4.2b**, **4.3a**, und **4.7b**, die alle einen  $K_i$ -Wert zwischen 80 und 18  $\mu\text{M}$  besitzen. In Tab. 5.1 sind die Verbindungen und die dazugehörigen  $K_i$ -Wert nach aufsteigendem  $\mu\text{M}$ -Bereich geordnet.

**Tab. 5.1:** Selektive Inhibitoren von Cathepsin L

Cathepsin L; $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	
<b>4.2b</b>	18.60
<b>4.1b</b>	38.65
<b>4.2a</b>	39.89
<b>4.3a</b>	40.04
<b>4.7b</b>	54.95
<b>4.1a</b>	78.78

Eine Substanz, **4.4b**, hemmt selektiv die Falcipaine 2 und 3 (Tab. 5.3). Dabei besitzt sie eine mittlere Hemmstärke von einem  $IC_{50}$ -Wert von 39.5  $\mu\text{M}$  an FP2 bzw. 57.9  $\mu\text{M}$  an FP3.

**Tab. 5.2:** Selektiver Inhibitor von Falcipain 2 und 3

	Falcipain 2; $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Falcipain 3; $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>4.4b</b>	39.5	57.9

Drei weitere Substanzen hemmen sowohl Rhodesain als auch Falcipain 2 und 3 (Tab. 5.3), **4.8b**, **9.1b** und **9.2**, wobei die Hemmstärke an FP3 immer etwas geringer ist als an FP2. Dies ist bedingt durch die strukturellen Eigenschaften der Enzyme.

**Tab. 5.3:** Rhodesain und Falcipain 2 und 3 hemmende Substanzen

	Rhodesain; $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Falcipain 2; $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Falcipain 3; $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>4.8b</b>	14.58	31.2	67.9
<b>9.1b</b>	2.99	2.2	3.8
<b>9.2</b>	24.47	31.7	64.2

Außerdem finden sich noch bei den an allen Enzymen getesteten Verbindungen zwei, **4.5b** und **9.1a**, die sowohl Cathepsin L als auch Rhodesain hemmen (Tab. 5.4).

**Tab. 5.4:** Rhodesain und Cathepsin L hemmende Substanzen

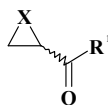
	Rhodesain; $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Cathepsin L; $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>4.5b</b>	29.18	47.53
<b>9.1a</b>	15.41	16.70

### 5.1.3. Hemmung von Rhodesain

Die Substanzen (**9.1-9.7**), die an der Carboxyl-Gruppe des Aziridinringes mit einem Aminosäureester substituiert sind, zeigen eine sehr gute Hemmung von Rhodesain. In Tab. 5.5 werden die an der Carboxyl-Gruppe des Aziridinringes unsubstituierten Substanzen (**4.1-4.10**) mit dieser Substanzklasse verglichen. Dafür werden nur die an Rhodesain wirksamen Substanzen in der Tabelle dargestellt.

Am besten wirken die Substanzen **9.1b** und **4.9b** an Rhodesain mit  $K_i$ -Werten von 2.99 bzw. 5.77  $\mu\text{M}$ . Alle anderen Verbindungen haben Hemmkonstanten zwischen 9 und 34  $\mu\text{M}$ .

Auffallend ist, dass alle an Rhodesain wirksamen Substanzen ähnliche Strukturmerkmale aufweisen. Die Substanzen **4.5a**, **4.5b** sind die aus Asparaginsäuredimethyl- bzw. -benzylester und hergestellten Aziridine. Sie zeigen eine ähnliche Hemmung um die 26  $\mu\text{M}$  an Rhodesain, wobei der Methylester etwas besser hemmt als der Benzylester. Um die 12  $\mu\text{M}$  dagegen hemmen der Methyl- (**a**) bzw. Benzylester (**b**) von **4.8**, der aus *N* $\alpha$ -geschütztem Lysinmethylester und Methyl-2,3-dibromopropanoat (**2**) hergestellt wurde, wobei im Gegensatz zu **4.5a/b** hier der Benzylester (**4.8b**) eine geringfügig bessere Hemmwirkung aufweist. Verwunderlich ist dagegen, dass bei den zu **4.8a/b** sehr ähnliche Verbindungen **4.9a/b** nur das aus *N* $\epsilon$ -geschützten Lysinbenzylester hergestellte Aziridin, **4.9b**, eine sehr hohe Wirksamkeit ( $K_i$ : 5.77  $\mu\text{M}$ ) gegen die Protease aufweist. Der Methylester, **4.9a**, ist praktisch unwirksam gegen die Protease.



Tab. 5.5: An Rhodesain wirksame Substanzen

	R <sup>1</sup>	X	Rhodesain K <sub>i</sub> [μM]
4.5a	OMe		23.17
4.5b	OMe		29.18
4.8a	OMe		9.53
4.8b	OMe		14.58
4.9b	OMe		5.77
9.1a		MeO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N	15.41
9.1b		MeO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N	2.99
9.2			24.47
9.3			33.00
9.4			23.46

Von den substituierten Aziridinen sind der Methyl- (**a**) bzw. Benzylester (**b**) von **9.1** am wirksamsten gegen Rhodesain (**9.1a**: K<sub>i</sub>: 15.41 μM; **9.1b**: K<sub>i</sub>: 2.99 μM). Der Ringstickstoff dieser Verbindungen stammt aus der Amin-Funktion von Glycinmethylester, an der Carboxylgruppe am Aziridinring sitzt ein Benzyl- bzw. Methylester von Phenylalanin. Die unsubstituierten Verbindungen aus Glycinester **4.1a** und **4.1b** zeigen dagegen keinerlei Hemmung, so dass angenommen werden kann, dass die substituierten Phenylalanine ein wichtiges Strukturmerkmal für die Hemmung der Protease sind. Aber auch der Glycinester scheint wichtig zu sein, da die zu **9.1a** fast identische Verbindung **9.5** keinerlei Hemmwirkung hat, obwohl sie sich nur um den Glycylglycinmethylester am Ringstickstoff unterscheidet. Die Verbindungen **9.2** und **9.4** haben einen ähnlichen K<sub>i</sub>-Wert um die 24 μM. Sie unterscheiden sich in der Struktur nur am Ringstickstoff, der einmal aus Asparaginsäurebenzylester und einmal aus ε-Z-geschützten Lysinmethylester stammt. Strukturell sind die beiden

Aminosäuren von ihrer räumlichen Dimension sehr ähnlich und scheinen somit eine ähnliche Wirkung bei der Hemmung an Rhodensain zu erzielen.

Die getesteten Edukte **6.1a/b**, **6.2a** und **6.3b** sind an der Cystein-Protease Rhodensain unwirksam.

#### 5.1.4. Hemmung von Falcipain 2 und 3

Einige Verbindungen zeigen auch an Falcipain 2 und 3 eine Hemmwirkung. Sie sind in Tab. 5.6 zusammengefasst.

**Tab. 5.6:** An Falcipain 2 und 3 wirksame Substanzen

	<b>Falcipain 2;</b> $IC_{50} / K_i^+ [\mu\text{M}]$	<b>Falcipain 3;</b> $IC_{50} / K_i^+ [\mu\text{M}]$
<b>4.4b</b>	39.5 / 13.8	57.9 / 42.89
<b>4.8b</b>	31.2 / 10.9	67.9 / 50.29
<b>9.1b</b>	2.2 / 0.77	3.8 / 2.81
<b>9.2</b>	31.7 / 11.08	64.2 / 47.56

<sup>+</sup>  $K_i$  wurde aus  $IC_{50}$ -Wert berechnet

Die Verbindung **9.1b** zeigt auch hier, wie an Rhodensain (**9.1b**:  $K_i$ : 2.99  $\mu\text{M}$ ), die größte Hemmstärke mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 2.2  $\mu\text{M}$  an FP2 bzw. 3.8  $\mu\text{M}$  an FP3 auf. Auffallend ist allerdings, dass der Methylester dieser Verbindung **9.1a** keine Hemmung an den Falcipainen zeigt, obwohl die zwei Verbindungen strukturell sich nur um den Ester unterscheiden. Die Aziridin-2-carboxylate **4.4b**, **4.8b** und **9.2** hemmen Falcipain 2 in einem Bereich zwischen 30 und 40  $\mu\text{M}$  und Falcipain 3 um die 60  $\mu\text{M}$ , wobei **4.4b** die einzige Substanz ist, die nur an den Falcipainen und nicht am Rhodensain eine Hemmwirkung zeigt. Interessant ist auch, dass der Methylester dieser Verbindung **4.4a** keine Hemmung an den getesteten Cystein-Proteasen zeigt. Im Gegensatz zur mit Phenylalaninmethylester modifizierten Verbindung **9.2** weist auch **4.5b** keine Hemmung an den Falcipainen auf.

## 5.2. Selektivität der Ester und eingesetzten Aminosäuren

### 5.2.1. Einfluss der Ester

Betrachtet man in Tab. 5.1 und 5.4 die an Cathepsin L wirksamen Substanzen, ist auffallend, dass bei den Substanzen **4.1a/b** und **4.2a/b** jeweils beide Ester eine Hemmung des Enzyms aufweisen. Bei **4.5b** zeigt nur der Benzylester eine Wirksamkeit gegen das Enzym (**4.5b**:  $K_i$ : 47.53  $\mu\text{M}$ ). Bei **4.1a/b** und **4.2a/b** wird deutlich, dass die Benzylester der jeweiligen Verbindungen immer eine bessere Hemmung aufweisen als die Methylester und somit wahrscheinlich besser in das katalytische Zentrum des Enzyms passen. Die  $K_i$ -Werte unterscheiden sich bei **4.1a/b** um ca. 40  $\mu\text{M}$  (**4.1a**:  $K_i$ : 78.78  $\mu\text{M}$ ; **4.1b**:  $K_i$ : 38.65  $\mu\text{M}$ ), bei **4.2a/b** um ca. 20  $\mu\text{M}$  (**4.2a**:  $K_i$ : 39.89  $\mu\text{M}$ ; **4.2b**:  $K_i$ : 18.60  $\mu\text{M}$ ). Generell scheint aber auch die Seitenkette der eingesetzten Aminosäure eine wichtige Rolle zu spielen. Die Verbindung **4.2a** aus dem Aminosäureester Valinmethylester weist eine bessere Hemmwirkung auf als die Benzylester-Derivate **4.5b** und **4.7b**. Da **4.3b** noch nicht an Cathepsin L getestet werden konnte und bei **4.7b** der Methylester nicht synthetisiert wurde, können hier keine Vergleiche gezogen werden.

Bei den an Rhodococcus wirksamen Substanzen (Tab. 5.4) **4.5a/b** und **4.8a/b** besitzen beide Ester eine sehr ähnliche Aktivität. Allerdings weisen die Methylester eine etwas bessere Hemmung auf als die Benzylester. Der Unterschied bei **4.5a/b** liegt bei 6  $\mu\text{M}$  (**4.5a**:  $K_i$ : 23.17  $\mu\text{M}$ ; **4.5b**:  $K_i$ : 29.18  $\mu\text{M}$ ), bei **4.8a/b** verhält es sich mit einem Unterschied von 5  $\mu\text{M}$  ähnlich (**4.8a**:  $K_i$ : 9.53  $\mu\text{M}$ ; **4.8b**:  $K_i$ : 14.58  $\mu\text{M}$ ). Der *tert*-Butylester des Asparaginsäurederivates **4.5c** zeigt keinerlei Hemmung an der Protease. Bei den Verbindungen **4.9a/b** weist der Benzylester **4.9b** eine sehr gute Hemmwirkung auf ( $K_i$ : 5.77  $\mu\text{M}$ ), wohingegen der Methylester an Rhodococcus völlig wirkungslos ist. Bei den an der Carboxylgruppe des Aziridinringes substituierten Aziridin-2-carboxylaten **9.1a** und **9.1b** besitzt der Benzylester eine um etwa 13  $\mu\text{M}$  bessere Hemmwirkung (**9.1a**:  $K_i$ : 15.41  $\mu\text{M}$ ; **9.1b**:  $K_i$ : 2.99  $\mu\text{M}$ ). Dieser Trend spiegelte sich auch bei den Verbindungen **4.1a/b** und **4.2a/b** an Cathepsin L wider. Die Verbindungen **9.2**, **9.3**, **9.4** und **9.5** liegen nicht als unterschiedliche Ester vor, womit auch ein Vergleich nicht möglich ist.

An den Falcipainen 2 und 3 hemmen nur die Benzylester-Derivate **4.4b**, **4.8b**, **9.1b** und **9.2** die Enzyme. Die entsprechenden Methylester dieser Verbindungen zeigen keinerlei Aktivität



gegen die Protease. Die Verbindung **9.1b** ist im Vergleich zu den anderen getesteten Aziridin-2-carboxylaten an den Falcipainen die beste Verbindung (**9.1b**: FP2:  $IC_{50}$ : 2.2  $\mu$ M; FP3:  $IC_{50}$ : 3.8  $\mu$ M). Auffallend ist auch, dass die aus *N* $\epsilon$ -geschützten Lysinbenzylester synthetisierte Verbindung **4.9b** trotz der strukturellen Ähnlichkeit keine Hemmung zeigt, sondern nur das aus *N* $\alpha$ -geschütztem Lysinbenzylester synthetisierte Aziridin-2-carboxylat **4.8b**.

### 5.2.2. Einfluss der Aminosäuren

Bei den unsubstituierten Aziridin-2-carboxylaten (**4.1-4.10**) zeigen die Verbindungen aus den (*S*)-Aminosäureestern Valin, Glycin, Alanin, Asparagin und Isoleucin eine gute Hemmung von Cathepsin L. Verbindungen aus den (*S*)-Aminosäureestern Leucin, Methionin und *N* $\epsilon$ -geschützten Lysin zeigen keinerlei Wirkung. Dabei besitzen die beiden Ester des Valin-Derivates, **4.2a** und **4.2b**, und der Benzylester des Glycin-Derivates **4.1b** die größte Aktivität. Sie werden gefolgt von dem Methylester des Alanin-Derivates **4.3a**, dem Benzylester des Asparaginsäure-Derivates **4.5b** und des Isoleucin-Derivates **4.7b** und dem Methylester des Glycin-Derivates **4.1a**. Das substituierte Derivat aus Glycinester und Phenylalanin **9.1a** weist allerdings in der Reihe der an Cathepsin L hemmenden Substanzen die beste Hemmwirkung auf.

Bei den an Rhodesain wirksamen Substanzen zeigt sich allerdings ein anderes Bild. Die aktivsten unsubstituierten Derivate sind vornehmlich aus den (*S*)-Aminosäureestern der Asparaginsäure, des *N* $\epsilon$ -geschützten und des *N* $\alpha$ -geschützten Lysins synthetisiert worden. Andere Aminosäure-Derivate, wie die Ester des Phenylalanins, Alanins, Glycins, Methionins, Valins, Isoleucins und Leucins, zeigen keinerlei Hemmung an der Protease. Die besten Verbindungen sind die *N* $\epsilon$ -geschützten und *N* $\alpha$ -geschützten Lysin-Derivate (**4.9b**, **4.8a/b**), wobei der Methylester des *N* $\epsilon$ -geschützten Lysin-Derivates **4.9a** keinerlei Hemmung zeigt. Danach folgen gleich die Derivate der Asparaginsäure **4.5a** und **4.5b**, wobei auch hier das Derivat aus dem *tert*-Butylester der Asparaginsäure **4.5c** keine Hemmung aufweist.

Bei den substituierten Aziridin-2-carboxylaten zeigen alle Derivate eine Hemmung bis auf die Benzylamin-Derivate **9.6**, **9.7** und das aus dem Dipeptid Glycylglycinmethylester synthetisierte Derivat **9.5**. Dabei sind die Verbindungen **9.1a** und **9.1b** aus den Estern von Glycin und Phenylalanin die effektivsten Inhibitoren gegen die Protease. Gefolgt werden sie von den Derivaten aus den Estern von *N* $\epsilon$ -geschütztem Lysin (**9.4**) bzw. Asparaginsäure (**9.2**) und

Phenylalanin. Das Derivat aus den Estern von *N* $\epsilon$ -geschütztem Lysin und Asparaginsäure (**9.3**) zeigt eine etwas schwächere Hemmung gegenüber Rhodesain. Auffallend dabei ist, dass das dem **9.1a** so ähnliche **9.5** keinerlei Hemmung zeigt, obwohl es sich nur in dem (*S*)-Aminosäureester Glycin bzw. Glycylglycin unterscheidet. Und auch das Benzylamin-Derivate der Verbindung **9.1a** **9.6** zeigt keinerlei Hemmung.

An den Falcipainen hemmen insgesamt nur zwei der unsubstituierten Aziridin-2-carboxylate, die Benzylester-Derivate aus den Aminosäuren (*S*)-Leucin (**4.4b**) und -*N* $\epsilon$ -geschütztem Lysin (**4.8b**) sind. Beide Verbindungen liegen mit ihrer Hemmstärke im Bereich von etwa 60  $\mu$ M, wobei die Verbindung **4.8b** eine um etwa 10  $\mu$ M bessere Hemmwirkung zeigt als **4.4b**. Außerdem hemmt **4.8b** auch die Cystein-Protease Rhodesain mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 14.58  $\mu$ M. **4.4b** dagegen weist keine Hemmung an Rhodesain auf, sondern hemmt selektiv die Falcipainen 2 und 3.

Von den substituierten Aziridin-2-carboxylate hemmen zwei Verbindungen die Falcipaine 2 und 3, **9.1b** und **9.2**. **9.1b** ist das eine Aziridin-2-carboxylat, das aus Glycinmethyl- und Phenylalaninbenzylester, und das andere ist **9.2**, dass aus Asparaginsäuredibenzylester und Phenylalaninmethylester synthetisiert wurde. Dabei besitzt die Verbindung **9.1b** eine wesentlich höhere Hemmwirkung als **9.2** (**9.1b**: FP2:  $IC_{50}$ : 2.2  $\mu$ M; FP3:  $IC_{50}$ : 3.8  $\mu$ M; **9.2**: FP2:  $IC_{50}$ : 31.7  $\mu$ M; FP3:  $IC_{50}$ : 64.2  $\mu$ M). Bei der Verbindung **9.2** scheint allerdings nicht nur der Phenylalaninmethylester eine große Rolle für die Hemmung zu spielen, sondern die Kombination mit dem Asparaginsäuredibenzylester. Das legen die Ergebnisse der Testungen an den Falcipainen nahe, da die Verbindung, die nur mit Asparaginsäuredibenzylester synthetisiert wurde, **4.5b**, die Protease nicht hemmt, aber auch die ähnlichen Verbindungen, die mit Phenylalaninmethylester synthetisiert wurden und nur am Ringstickstoff eine andere Aminosäure aufweisen, **9.1a**, **9.4**, **9.5** und **9.6** zeigen keine Hemmung.

Insgesamt scheint der Ester der (*S*)-Aminosäure Phenylalanin an der Carboxylgruppe des Aziridinringes ein Strukturmerkmal für eine gute Hemmung der getesteten Cystein-Proteasen zu sein. Die Verbindungen **4.10a** und **4.10b**, bei denen der Stickstoff des Aziridinringes aus dem Phenylalaninester stammt und die an 2-Position nicht derivatisiert sind, dagegen haben keinerlei Hemmwirkung auf die Protease.

### 5.3. Bewertung der infektiologischen Testungen

In Tabelle 5.7 sind die Ergebnisse der infektiologischen Testungen zusammengefasst dargestellt.

Die aktivste Verbindung in den infektiologischen Testungen ist **9.1b**. Sie zeigt eine hohe Hemmwirkung an *Plasmodium falciparum* mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 9.7  $\mu\text{M}$  und *Trypanosoma brucei brucei* mit einem  $IC_{50}$ -Wert von um die 20  $\mu\text{M}$ . Außerdem hemmt sie auch noch das Wachstum der gram-positiven Erreger *S. aureus* 8325 und *S. epidermidis* RP-62 sowie die Biofilmbildung von *S. aureus* 325. Die Hemmung am *Plasmodium falciparum* von **9.1b** korreliert gut mit der sehr guten Hemmung an den Falcipainen (FP2:  $IC_{50}$ : 2.2  $\mu\text{M}$ ; FP3:  $IC_{50}$ : 3.8  $\mu\text{M}$ ), ebenso die Hemmung an den Trypanosomen, die sehr gut mit der Hemmung der Cystein-Protease Rhodesain ( $K_i$ : 2.99  $\mu\text{M}$ ) zusammenpasst, die aus dem Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* stammt. Der Methylester dieser Verbindung **9.1a** hingegen zeigt keine Hemmung am Erreger der Malaria tropica und eine etwas schlechtere Wirkung auf die Trypanosomen mit einer Hemmung um die 29  $\mu\text{M}$ .

An *Plasmodium falciparum* zeigen von den unsubstituierten Verbindungen diejenigen eine Aktivität, die entweder  $N\alpha$ - oder  $N\epsilon$ -geschütztes Lysin (**4.8b**, **4.9a/b**) oder den Methylester von Phenylalanin (**4.10a**) in ihrer Struktur aufweisen. Ausnahme dabei ist **4.4b**, das Leucinbenzylester-Derivat. Im Vergleich wird deutlich, dass die mit  $N\alpha$ - oder  $N\epsilon$ -geschütztem Lysin synthetisierten Verbindungen (**4.9a/b**) gegenüber dem Phenylalanin- (**4.10a**) und dem Leucin-Derivat (**4.4b**) eine um etwa 20  $\mu\text{M}$  bessere Hemmung zeigen, die zwischen um die 5  $\mu\text{M}$  liegt.

Da die Verbindungen **4.4b** und **4.8b** zwar eine Aktivität gegen die Falcipaine zeigen, die allerdings wesentlich schwächer ist als die Hemmwirkung gegen *Plasmodium falciparum*, wird die Inhibition des Parasiten wahrscheinlich durch einen anderen Mechanismus als die Hemmung von FP2 und FP3 ausgelöst werden. Das Gleiche gilt für die Verbindungen **4.9a/b** und **4.10a**, die die Falcipaine praktisch gar nicht hemmen. Etwas aus dem Rahmen fällt der Benzylester **4.10b** der Verbindung **4.10a**, da dieser gar keine Aktivität weder an den Falcipainen noch gegen den Erreger zeigt.

Tab. 5.7: Ergebnisse der infektiologischen Testungen

	<i>P. falc.</i>	<i>T. b. brucei</i>		Wachstumshemmung		Biofilmhemmung	
	<i>IC</i> <sub>50</sub> [μM]	<i>IC</i> <sub>50</sub> [μM]		<i>S. aureus</i> *	<i>S. epi.</i> *	<i>S. aureus</i> 325	<i>S. epidermidis</i>
		48 h	72 h	8325 [%]	RP62 [%]	[% (μM)]	RP62 [% (μM)]
<b>4.1b</b>	n. I.	28.54	43.51	n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>4.3b</b>	n.I.	26.94	29.60	n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>4.4b</b>	21.9	n. I.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>4.8b</b>	4.5	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	30 (160)
<b>4.9a</b>	5.2	19.58	27.36	n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>4.9b</b>	2.2	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>4.10a</b>	28	32.16	31.28	n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.1a</b>	n. I.	26.73	31.00	n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.1b</b>	9.7	19.55	22.60	80	30	40 (100)	n. I.
<b>9.2</b>	16.7	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.3</b>	5.5	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.4</b>	1.7	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.5</b>	21.4	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>9.7</b>	13.4	n. b.		n. I.	n. I.	n. I.	n. I.
<b>6.1a</b>	n. b.	n. b.		n. I.	50	n. I.	n. I.
<b>6.3b</b>	n. b.	n. b.		n. I.	40	n. I.	n. I.

\*MHK 160 μM; n. I.: keine Hemmung; n. b.: nicht bestimmt

Die substituierten Aziridin-2-carboxylate zeigen alle bis auf die zwei Verbindungen **9.1a** und **9.6** eine Hemmung von *Plasmodium falciparum*. Am aktivsten in dieser Substanzklasse ist das **9.4**, das aus einen Phenylalaninmethylester an der Carboxylgruppe des Ringes trägt und dessen Aziridin-Stickstoff aus der Aminfunktion eines *Nε*-geschützten Lysinmethylesters stammt. Da diese Verbindung allerdings nur eine geringe Hemmung an den Falcipainen zeigt, wird wahrscheinlich eine anderes Target als die Cystein-Proteasen FP2 und FP3 verantwortlich für die gute Hemmung sein. Das Gleiche gilt auch für die an dem Erreger etwas weniger aktiven Verbindungen **9.3**, **9.5** und **9.7**, die auch keine Aktivität gegen die Falcipaine aufweisen.

Insgesamt zeigen die Testungen an *Plasmodium falciparum*, dass die Verbindungen, die mit *N* $\epsilon$ -geschütztem (**4.9a/b**, **9.3**, **9.4**) bzw. *N* $\alpha$ -geschütztem Lysin (**4.8b**) synthetisiert wurden, die größte Hemmstärke an dem Erreger in einem *IC*<sub>50</sub>-Bereich zwischen 5 und 10  $\mu$ M aufweisen. Auch bei allen anderen synthetisierten Aziridin-2-carboxylaten, die einen Phenylalaninester in ihrer Struktur besitzen, **4.10a**, **9.1b**, **9.2**, **9.4** und **9.5** ist eine große Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* zu erkennen. Ausnahmen davon sind **9.1a**, **4.10b** und **9.6**.

Die Verbindungen **4.1b**, **4.3b**, **4.9a** und **4.10a** weisen ebenso wie **9.1a/b** alle eine Aktivität gegen die Trypanosomen auf, die bei *IC*<sub>50</sub>-Werten um die 30  $\mu$ M liegt, zeigen aber keinerlei Wirkung bei der Wachstums- oder Biofilmmhemmung von Erregern.

Die Edukte **6.1a** und **6.3b** zeigen eine Hemmung des Wachstums von *S. epidermidis* RP-62 von 50 bzw 40 %. Alle anderen Verbindungen außer **9.1b** zeigen keinerlei Wirkung auf das Wachstum der Erreger. Bei der Biofilmmhemmung an *S. epidermidis* RP-62 zeigt nur **4.8b** eine 30%ige Hemmung bei einer Konzentration von 160  $\mu$ M.

#### 5.4. Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen und Ausblick

Generell findet sich der Trend, dass die Benzylester der getesteten Verbindungen den Methylestern überlegen sind.

An Cathepsin L stellten sich die Verbindungen aus den Aminosäureestern Valin (**4.2a/b**), Glycin (**4.1a/b**), Alanin (**4.3a**), Isoleucin (**4.7b**) und Asparaginsäure (**4.5b**) als beste Inhibitoren heraus.

An Rhodesain waren bei den unsubstituierten Verbindungen die Aziridin-2-carboxylate am aktivsten, die aus den Estern der Asparaginsäure (**4.5a/b**) und aus *N* $\epsilon$ -geschütztem (**4.9b**) bzw. *N* $\alpha$ -geschütztem Lysin (**4.8a/b**) hergestellt wurden. Von den substituierten Aziridin-2-carboxylaten sind die Derivate am effektivsten, die an der Carboxylgruppe des Aziridinringes Phenylalaninmethylester (**9.1a/b**, **9.2**, **9.4**) oder Asparaginsäurebenzylester (**9.3**) besitzen. Die Derivate mit Benzylamin (**9.6**, **9.7**) und mit dem Dipeptid Glycylglycinmethylester (**9.5**) sind unwirksam.

An Falcipain 2 und 3 besaßen nur vier Verbindungen eine Aktivität gegen die Proteasen. Zwei dieser Verbindungen haben einen Phenylalaninester (**9.1b** und **9.2**) in ihrer Struktur, wobei die Verbindung **9.1b** die beste Hemmung zeigte. Die zwei anderen Verbindungen sind aus Leucinmethylester (**4.4b**) und *N*α-geschütztem Lysin (**4.8b**) synthetisiert worden.

In den infektionsbiologischen Testungen haben sich, korrelierend zu den Testungen an Rhodesain, die Verbindungen **9.1a** und **9.1b** als sehr potente Inhibitoren des Erregers *Trypanosoma brucei brucei* gezeigt. Dabei zeigt die Verbindung **9.1b** anders als **9.1a** auch Aktivität gegen die Bakterien *S. aureus* 8325 und *S. epidermidis* RP-62 und die Biofilmbildung von *S. aureus* 325. An *Plasmodium falciparum* war ebenfalls die Verbindung **9.1b** sehr wirkungsvoll, aktiver an diesem Erreger waren allerdings der Methylester **4.9a** bzw. Benzylester **4.9b**. Diese Verbindungen zeigten allerdings keine oder nur eine geringere Hemmung der Falcipaine 2 und 3, was vermuten lässt, dass die antiplasmodiale Aktivität auf einen anderen Mechanismus als die Inhibition dieser Enzyme zurückzuführen ist.

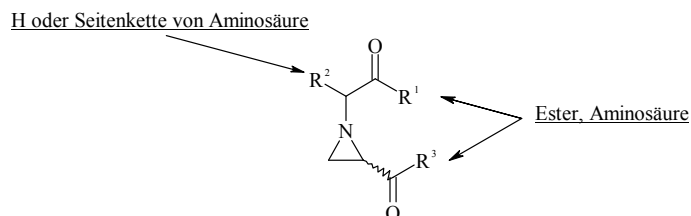
Nach den bisherigen Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit wäre es sehr interessant, weitere Substanzen zu synthetisieren, die verschiedene Derivate von **9.1a** bzw. **9.1b** und **4.9a** darstellen. So könnte man z.B. das Aziridin-2-carboxylat aus (*S*)-Benzyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat (**6.1b**) und einem Alaninester herstellen und dann an den verschiedenen Cystein-Proteasen und Erregern testen. Außerdem sollte versucht werden, das Target der Inhibition der an *Plasmodium falciparum* wirksamen Substanzen zu finden, indem man z.B. die Verbindungen auch an Plasmeptinen testet, den in *Plasmodium falciparum* vorkommenden Aspartat-Proteasen.

Interessant wäre es außerdem Docking-Studien der wirksamsten Verbindungen **9.1a** bzw. **9.1b** und **4.9a/b** durchzuführen und es sollte auch versucht werden, einen Enzym-Inhibitor-Komplex zu kristallisieren, um die genaue Position des Inhibitors im Enzym und die Wechselwirkungen mit den Substratbindungstaschen der Protease analysieren zu können. Auf dieser Grundlage kann man dann weitere und bessere Inhibitoren für Cystein-Proteasen entwickeln.

## 6. Zusammenfassung

Cystein-Proteasen sind in Säugetieren, im menschlichen Organismus, aber auch bei Pflanzen, Viren, Protozoen und Würmern weit verbreitet und spielen dort lebenswichtige Rollen. Im Menschen sind Cystein-Proteasen an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, aber auch in humanpathogenen Parasiten sind sie essentiell für das Überleben der Erreger. Daher könnten Substanzen, die diese Cystein-Proteasen hemmen, als neue Arzneistoffe bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue Struktur abgeleitet von den potenten Aziridin-2,3-dicarboxylaten zu synthetisieren und diese dann an verschiedenen humanen und parasitären Cystein-Proteasen zu testen. Dafür wurde als Baustein die Aziridin-2-carbonsäure gewählt, die an C3-Position unsubstituiert ist und an C2-Position eine Carboxyl-Funktion trägt. Außerdem sollte der Ringstickstoff im Gegensatz zu den bisher bekannten *N*-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten basische Eigenschaften besitzen. Die Struktur der synthetisierten Aziridin-2-carboxylate ist daher wie folgt gewählt worden:

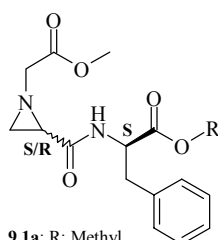
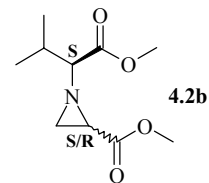


Die durch Cromwell-Synthese erhaltenen Verbindungen wurden als Racemate oder als Diastereomeregemische erhalten. Dabei wurden die Diastereomeren-Verhältnisse der einzelnen Verbindungen über die Integrale in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bestimmt. Die an Position R<sup>3</sup> mit einer Aminosäure substituierten Aziridin-2-carboxylate wurden durch eine Modifikation der Cromwell-Synthese erhalten. Es wurden insgesamt 27 Aziridin-2-carboxylate synthetisiert, die dann an verschiedenen Proteasen getestet wurden.

Zu den getesteten Cystein-Proteasen gehören die parasitären Enzyme Falcipain 2, 3 und Rhodesain, die virale SARS-CoV M<sup>Pro</sup> und die humanen Proteasen Cathepsin B und L. Es wurde jeweils ein Screening der Substanzen an den Proteasen durchgeführt. Bei den wirksamen Verbindungen wurden dann die  $K_i$ -,  $k_i$ -,  $k_{2nd}$ - oder  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Außerdem wurden die Substanzen auch an der SAP2, einer Aspartat-Protease aus *Candida albicans*, getestet, an der sie allerdings kaum eine Hemmwirkung zeigten.

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten wurde der kontinuierliche Assay nach Tian und Tsou gewählt. Die Hemmkonstanten an SARS-CoV M<sup>pro</sup> und SAP2 wurden mittels eines FRET-Assays ermittelt.

An CB zeigten die synthetisierten Aziridin-2-carboxylate keine Aktivität. Die selektivste Verbindung gegenüber Cathepsin L ist das Aziridin-2-carboxylat-Derivat **4.2b**.



9.1a: R: Methyl  
9.1b: R: Benzyl

Bei den nicht-selektiven Inhibitoren stellte sich die Verbindung **9.1a**, die auch an Rhodesain eine gute Aktivität besitzt, als ein noch potenterer Inhibitor heraus. Hauptsächlich zeigten an Rhodesain Verbindungen eine gute Hemmwirkung, die *N* $\epsilon$ - oder *N* $\alpha$ -geschütztes Lysin-, Phenylalanin- oder Asparaginsäureester als Substituenten enthalten. Dabei waren die Verbindungen **9.1a/b**, **4.9b** und **4.8a/b** die potentesten Inhibitoren am Rhodesain und **9.1b**, **9.2**, **4.4b** und **4.8b** an Falcipain 2 und 3. An der SARS-CoV M<sup>pro</sup> hemmte die Verbindung **9.1b** am besten.

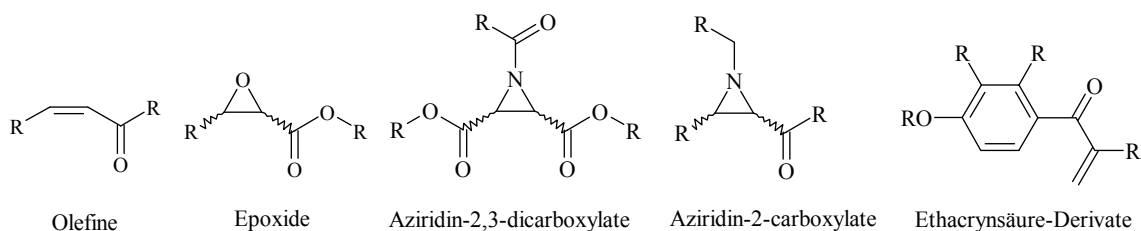
Es wurde weiterhin die Abhängigkeit der Aktivität der parasitären Cystein-Protease Rhodesain vom pH-Wert bestimmt, indem die Fluoreszenzzunahme durch die hydrolytische Spaltung des Substrates durch das Enzym bei pH-Werten zwischen 2.5 und 8.0 über 30 min vermessen wurde. Dabei zeigte sich, dass das Rhodesain in einem sehr weiten pH-Bereich von 3.0 – 8.0 eine sehr hohe Aktivität aufweist (80 – 100 %) und erst im relativ sauren Bereich bei pH 2.5 die Aktivität nachlässt (~ 60 %). Außerdem wurde auch die Hemmung von Rhodesain durch **9.1b** in Abhängigkeit vom pH-Wert analysiert, wobei die Hemmstärke im sauren pH-Bereich durch die Protonierung des Stickstoffes des Aziridinringes sehr stark zunahm.

Im Rahmen des SFB630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“) konnten viele der synthetisierten Verbindungen an verschiedenen Krankheitserregern, wie *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major*, sowie an sog. Problemkeimen, zu denen die gram-negativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escheria coli*, sowie die gram-positiven *Staphylococcus*-Arten *S. aureus* (Linie 325, 8325) und *S. epidermidis* (Linie RP62) gehören, untersucht werden.



Dabei stellten sich die Verbindungen **9.1a/b** an *Trypanosoma brucei brucei* als wirksame Inhibitoren gegen den Erreger heraus. Dies korreliert auch sehr gut mit der hohen Aktivität der beiden Verbindungen gegen Rhodesain (**9.1a**:  $K_i$ : 15.41  $\mu\text{M}$ ; **9.1b**:  $K_i$ : 2.99  $\mu\text{M}$ ), wobei die Verbindung **9.1b** allerdings an Makrophagen toxisch wirkte (**9.1b**:  $IC_{50}$ : 80  $\mu\text{M}$ ). Außerdem war **9.1b** auch ein Inhibitor des Wachstumes und der Biofilmbildung von *S. aureus*. Gegenüber *Plasmodium falciparum* zeigten die Verbindungen **4.9a/b** (**4.9a**:  $IC_{50}$ : 0.5  $\mu\text{M}$ ; **4.9b**:  $IC_{50}$ : 2.2  $\mu\text{M}$ ) und **9.4** (**9.4**:  $IC_{50}$ : 1.7  $\mu\text{M}$ ) die größte Aktivität, wobei allerdings diese Verbindungen keine Hemmung an den Falcipainen aufwiesen und somit das Target der Inhibition noch ungeklärt ist.

Im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Philip Rosenthal, San Francisco, California, wurde außerdem ein Screening verschiedener im Arbeitskreis synthetisierter Substanzklassen an Falcipain 2, 3 und an *Plasmodium falciparum* durchgeführt. Die dabei getesteten Substanzklassen sind in Abb. 6.1 aufgezeigt.



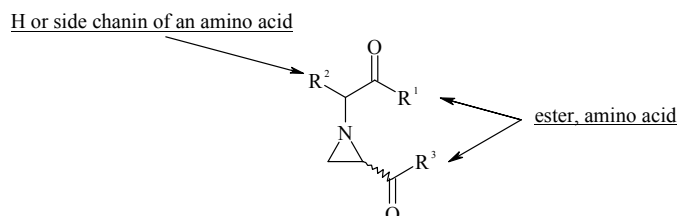
**Abb. 6.1:** An *Plasmodium falciparum* getestete Substanzklassen

Die Aziridin-2,3-dicarboxylate **II-c**, **I-v** und **I-j** zeigten dabei die beste Aktivität, sowohl an den Falcipainen als auch an dem Parasiten. Unter den Epoxiden und an Position C3 substituierten Aziridin-2-carboxylaten ist die Verbindung **IV-2** die einzige, die eine Hemmwirkung aufweist. Unter den anderen getesteten Verbindungen zeigten nur die Ethacrynsäure-Derivate **VII-b** und **VII-f** eine antiplasmodiale Aktivität.

## 7. Summary

Cysteine proteases are ubiquitous in mammals, in plants, viruses, protozoa, and worms, playing pivotal roles. In the human organism cysteine proteases participate in a lot of physiological and pathophysiological processes, but they are also essential in some human pathogens for their survival. Thus, substances which inhibit these cysteine proteases could be used as new drugs for many different diseases.

The goal of the present work was the syntheses of a new structure derived from the aziridine-2,3-dicarboxylate motif, and the testing against different human and parasitic cysteine proteases. Therefore we chose the aziridine-2-carboxylate motif as building block which is unsubstituted at position C3 of the aziridine ring and substituted with a carboxyl function at position C2. In addition to this, the nitrogen of the ring should have basic properties in opposite to the common *N*-acylated aziridine-2,3-dicarboxylates. In summary, the structure of the aziridine-2-carboxylates to be synthesized was chosen as shown in this figure:

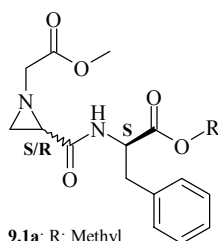
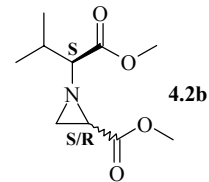


The compounds were obtained as racemic or diastereomeric mixtures by the Cromwell synthesis. The diastereomeric excesses were determined by analysis of the integrals of the signals of the ring protons in the <sup>1</sup>H-NMR spectra. The aziridine-2-carboxylates substituted with an amino acid ester at position R<sup>3</sup> were synthesized by a modification of the Cromwell synthesis. Overall, 27 new aziridine-2-carboxylates were synthesized as new potential irreversible inhibitors of cysteine proteases.

The aziridine-2-carboxylates were tested against the parasitic cysteine proteases falcipain 2 and 3 and rhodesain, the viral SARS-CoV M<sup>PRO</sup> and the human enzymes cathepsin B and L. First, we screened the aziridine-2-carboxylates to identify new potential agents against the proteases. Then we determined the inhibition constants  $K_i$ ,  $k_i$ ,  $k_{2nd}$  or  $IC_{50}$  for the most potent compounds. Against the aspartatic protease SAP2 from *Candida albicans* the aziridine-2-carboxylates showed no activity.

In order to determine the inhibition constants we chose the continuous assay according to Tian and Tsou. The inhibition constants against SARS-CoV M<sup>Pro</sup> and SAP2 were determined using a FRET assay.

Against the cysteine protease CB the aziridine-2-carboxylates showed no inhibition. The most potent selective compound against cathepsin L was the aziridine-2-carboxylate derivate **4.2b**.



**9.1a:** R: Methyl  
**9.1b:** R: Benzyl

Within the non-selective inhibitors the compound **9.1a** was identified as a very potent inhibitor of cathepsin L and rhodesain. Compounds showing activity against rhodesain are the *Nε*- or *Nα*-protected lysine, phenylalanine or aspartic acid derivatives. Thus, the aziridine-2-carboxylates **9.1a/b**, **4.9b** and **4.8a/b** were the most potent inhibitors against rhodesain and **9.1b**, **9.2**, **4.4b** and **4.8b** against falcipain 2 and 3.

Against the SARS-CoV M<sup>Pro</sup> the compound **9.1b** showed the highest activity.

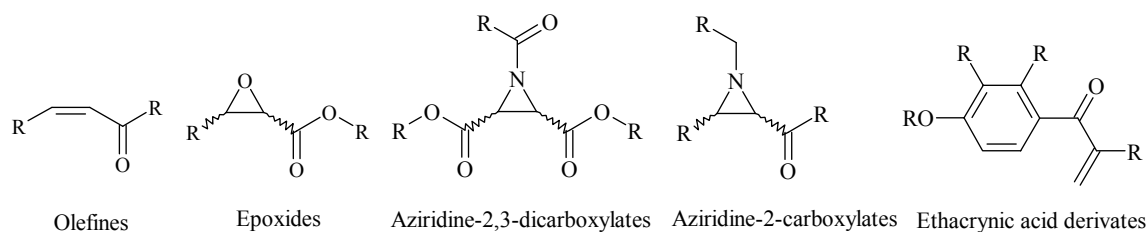
In order to analyse the pH-dependency of hydrolytic activity of the parasitic cysteine protease rhodesain we determined the activity of the enzyme in dilution assays measuring the increase of the fluorescence at different pH values between 2.5 and 8.0. Rhodesain was active in a wide pH range from 3.0 – 8.0 (80 – 100 %) with decreased activity at pH 2.5 (~ 60 %). In addition to this, we determined the pH-dependence of the inhibition constants of **9.1b** against rhodesain. We found that the inhibition potency increased at an acid pH range due to the protonation of the basic nitrogen of the aziridine ring.

Within the framework of the Collaborative Research Centre SFB 630 most compounds were examined for the activity against various pathogens: *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major*, the gramnegative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escheria coli*, as well as grampositive *Staphylococcus* strains *S. aureus* (Linie 325, 8325) and *S. epidermidis* (line RP62).

Tests against *Trypanosoma brucei brucei* revealed some active compounds which are not cytotoxic against the host cells, the macrophages ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). The best compounds against this pathogen were **9.1a/b** (**9.1a**:  $K_i$ : 15.41  $\mu M$ ; **9.1b**:  $K_i$ : 2.99  $\mu M$ ). These results correlate well with the inhibition constants of this compounds against rhodesain, but unfortunately **9.1b** showed cytotoxicity against the macrophages (**9.1b**:  $IC_{50}$ : 80  $\mu M$ ).

Furthermore, **9.1b** inhibited the growth and biofilm production of *S. aureus*. The compounds **4.9a/b** (**4.9a**:  $IC_{50}$ : 0.5  $\mu$ M; **4.9b**:  $IC_{50}$ : 2.2  $\mu$ M) and **9.4** (**9.4**:  $IC_{50}$ : 1.7  $\mu$ M) showed the highest activity against *Plasmodium falciparum*, but unfortunately they did not inhibit falcipain 2 or 3 and so the target of the inhibition of the pathogen is uncertain.

Within the framework of another collaboration with the working group of Prof. Dr. Philip Rosenthal, San Francisco, California, I determined the inhibition constants of series of different compounds (scheme 6.1) against falcipain 2, falcipain 3 and *Plasmodium falciparum*.



**Scheme 6.1:** Series of different compounds tested against *Plasmodium falciparum*

The aziridine-2,3-dicarboxylates **II-c**, **I-v** and **I-j** showed the highest activity both against the falcipains and the pathogen *Plasmodium falciparum*. Within the series of epoxides and the aziridine-2-carboxylates substituted at position 3 only the compound **IV-2** showed activity against the pathogen. Besides this, the ethacrynic acid derivatives **VII-b** and **VII-f** showed a high antiplasmodial activity.

## 8. Experimenteller Teil

### 8.5. Allgemeine Angaben

#### 8.5.1. Analytische und chromatographische Methoden und verwendete Messgeräte

##### *Kernresonanzspektren (NMR)*

Die NMR-Spektren wurden mit einem AVANCE 400 MHz Spektrometer der Fa. Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, aufgenommen. Die Frequenz bei den Aufnahmen der Spektren betrug für  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren 400.13 MHz, für  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren 100.61 MHz. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz. Als interner Standard dienen TMS (Tetramethylsilan) ( $\delta$  (TMS) = 0.00 ppm) bzw. die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 7.26 ppm).

Die Multiplizität der Signale wird wie folgt angegeben:

s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; quin, Quintett; sext, Sextett; sept, Septett; dd, Dublett von Dublett; m, Multipllett. Arom.  $\text{C}_q$  bezeichnet ein aromatisches quartäres C-Atom. Die Zuordnung der Signale zu einzelnen Protonen oder Kohlenstoff-Atomen erfolgte über zweidimensionale  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelations- und Dept135-Spektren.

##### *Infrarotspektren (IR)*

Die IR-Spektren wurden mit einem PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer der Fa. Bio-Rad, Cambridge, MA, USA, mittels einer ATR-Einheit aufgenommen.

##### *Polarimetrie*

Die spezifischen Drehwerte [ $\alpha_D^{\text{Temp.}}$ ] wurden an einem 241 Polarimeter der Fa. PerkinElmer, MA, USA, ermittelt (Natrium-D-Linie:  $\lambda = 589$  nm).

##### *Fluorimetrie*

Für die fluorimetrischen Enzymassays wurde ein Cary Eclipse Fluorimeter der Fa. Varian GmbH, Darmstadt, mit einer Mikrotiterplatten-Leseinheit verwendet. Zur Einstellung der Messtemperatur diente eine selbstgebaute Heizeinheit, die aus einer Aluminiumplatte mit aufgeklebter Heizfolie, einem Temperaturcontroller mit Sensor und einem 12-Volt-Netzgerät

bestand. Es kamen weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden, zum Einsatz.

### **Massenspektrometrie**

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 Analyse der Reinheit der Verbindungen fand mittels LC-MS statt. Dafür wurde eine *Phenomenex* Jupiter 4 $\mu$  Proteo 90A RP C-18 Säule (4.6 x 150 mm) verwendet. Der dafür verwendete Gradient und Fluss des Lösungsmittelgemisches ist in Tabelle 8.1 aufgeführt.

**Tab. 8.1:** Verwendeter Gradient zur Analyse der Reinheit der Substanzen

<b>Zeit [min]</b>	<b>Solvens B [%]</b>	<b>Fluss [<math>\mu</math>l/min]</b>
0	20	500
10	70	500
15	40	500

Solvens A: Milipore-Wasser mit 0.1 % Ameisensäure

Solvens B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure

Es wurde mittels eines UV-Detektors bei 254 nm detektiert. Die Kapillarspannung betrug dabei standardgemäß 2.6 kV und als Trockengas wurde N<sub>2</sub> eingesetzt. Die Verbindungen wurden im positiven Modus vermessen.

Die bei der LC-MS erhaltenen Retentionszeiten (in min) sowie die Reinheit (in %) über die gesamte Fläche aller auftretenden Peaks werden jeweils für die Verbindungen angegeben.

### **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Dünnschichtchromatographie wurden mittels DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Fa. Merck KGaA, Darmstadt, durchgeführt. Die Substanzen wurden durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, durch Eigenfluoreszenz bei 365 nm oder mittels Ehrlichs-Reagenz detektiert.

### **Säulenchromatographie (SC)**

Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mittels Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm bzw. 70-230 mesh) der Firmen Merck. Die Säulen wurden mit organischem Lösungsmittel nass befüllt.

## 8.6. Verwendete Reagenzien

### 8.6.1. Enzyme, Substrate, Zell-Kulturen und Syntheschemikalien

#### **Enzyme**

Papain	Fluka
Cathepsin B (humane Leber)	Calbiochem
Cathepsin L ( <i>Paramethium tetraurelia</i> )	Calbiochem
Falcipain 2 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	Prof. Dr. Hilgenfeld, Lübeck; Prof. Dr. P. Rosenthal, UCSF, California
Falcipain 3 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	Prof. Dr. P. Rosenthal, UCSF, California
Rhodesain ( <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> )	Prof. Dr. J. McKerrow, Dr. C. Caffrey, UCSF, USA
SARS-CoV M <sup>pro</sup>	Prof. Dr. John Ziebuhr, Queen's University, Belfast, UK
SAP2	Prof. Dr. J. Morschhäuser, Würzburg
Trypsin (boviner Pankreas)	Merck
$\alpha$ -Chymotrypsin (boviner Pankreas)	Fluka

#### **Substrate**

Z-(L)-Phe-(L)-Arg-AMC	Bachem
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Glu-Ser-Gly-Tyr(3'-NO <sub>2</sub> )-Arg (Mts)OH	Dipl.-Chem. Markus Schiller
Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin; GenScript Corporation, New Jersey, USA

#### **Zell-Kulturen**

<i>Plasmodium falciparum</i> (W2)	Prof. Dr. P. Rosenthal, UCSF, California
-----------------------------------	--

#### **Syntheschemikalien**

Aminosäuren, Dipeptide	Merck, Bachem
------------------------	---------------

## 8.7. Enzym-Assays

Die angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen während der Messung. Es werden folgende Abkürzungen benutzt: S, Substrat; E, Enzym; I, Inhibitor; P, Puffer. Alle Messungen wurden fluorimetrisch an einem Cary Eclipse Fluorimeter der Fa. Varian GmbH, Darmstadt, mit einer Mikrotiterplatten-Leseinheit und einem Heizelement durchgeführt.

### 8.7.1. Screening

Das Screening wurde je nach Enzym nach den Angaben des kontinuierlichen Assays durchgeführt mit einer Inhibitor-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Jede Inhibitor-Konzentration wurde mindestens 3-mal vermessen.

### 8.7.2. Cathepsin B

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	Cathepsin B
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin, HCl (40.5 $\mu\text{M}$ )
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Tris-Puffer (pH 6.5)
<b>Volumina:</b>	100 $\mu\text{l}$ P, 7 $\mu\text{l}$ E, 118 $\mu\text{l}$ P, 20 $\mu\text{l}$ I oder DMSO, 5 $\mu\text{l}$ S $\Sigma$ 250 $\mu\text{l}$

### 8.7.3. Cathepsin L

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	Cathepsin L
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin, HCl (40.5 $\mu\text{M}$ )
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Tris-Puffer (pH 6.5)
<b>Volumina:</b>	100 $\mu\text{l}$ P, 7 $\mu\text{l}$ E, 118 $\mu\text{l}$ P, 20 $\mu\text{l}$ I oder DMSO, 5 $\mu\text{l}$ S $\Sigma$ 250 $\mu\text{l}$



#### 8.7.4. Rhodensain-Assay

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	Rhodensain-Lyophilisat
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin, HCl (20 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Acetat-Puffer (pH 5.5)
<b>Volumina:</b>	100 $\mu$ l P, 10 $\mu$ l E, 115 $\mu$ l P, 20 $\mu$ l I oder DMSO, 5 $\mu$ l S $\Sigma$ 250 $\mu$ l

- Verdünnungs-Assay

<b>Enzym:</b>	Rhodensain-Lyophilisat
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin, HCl (20 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Acetat-Puffer (pH 5.5)
<b>Volumina:</b>	10 $\mu$ l E, 35 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l I oder DMSO → Inkubationszeit (5, 10, 20, 60 bzw. 5, 15, 30, 45 Min) 200 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l S $\Sigma$ 255 $\mu$ l

- pH-Abhängigkeits-Assay

<b>Enzym:</b>	Rhodensain-Lyophilisat in Acetat-Puffer (pH 5.5) gelöst
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin, HCl (20 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Citrat-Puffer für Testungen (pH 2.5 – 8.0), Acetat-Puffer für Enzym (pH 5.5)
<b>Volumina:</b>	100 $\mu$ l P, 10 $\mu$ l E, 130 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l I oder DMSO, 5 $\mu$ l S $\Sigma$ 250 $\mu$ l

### 8.7.5. Sap2-Assay

- Screening

<b>Enzym:</b>	<i>Candida-albicans</i> -Zellkultur-Überstand
<b>Substrat:</b>	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(Edans)-ArgOH (37.5 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	30 °C
<b>Puffer:</b>	Na-Citrat-Puffer (pH 3.2)
<b>Volumina:</b>	33 $\mu$ l P, 12 $\mu$ l E, 5 $\mu$ l I oder DMSO, 145 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l S $\Sigma$ 200 $\mu$ l

### 8.7.6. SARS-CoV M<sup>pro</sup>-Assay

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	SARS-CoV M <sup>pro</sup>
<b>Substrat:</b>	H <sub>2</sub> N-Anthranilsäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(NO-2)Tyr-Arg-(MTS), TFA-Salz (300 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Tris-Puffer (pH 7.5)
<b>Volumina:</b>	100 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l E, 65 $\mu$ l P, 20 $\mu$ l I oder DMSO, 10 $\mu$ l S $\Sigma$ 200 $\mu$ l

- Verdünnungs-Assay

<b>Enzym:</b>	SARS-CoV M <sup>pro</sup>
<b>Substrat:</b>	H <sub>2</sub> N-Anthranilsäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(NO-2)Tyr-Arg-(MTS), TFA-Salz (300 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	25 °C
<b>Puffer:</b>	Tris-Puffer (pH 7.5)
<b>Volumina:</b>	5 $\mu$ l E, 40 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l I oder DMSO → Inkubationszeit (5, 10, 20, 35 Min) 140 $\mu$ l P, 10 $\mu$ l S $\Sigma$ 200 $\mu$ l

**8.7.7. Falcipain-2-Assay**

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	Falcipain 2
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-AMC (40 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	37 °C
<b>Puffer:</b>	Acetat-Puffer (pH 5.5)
<b>Volumina:</b>	5 $\mu$ l E, 215 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l I oder DMSO → Inkubationszeit (30 Min) 30 $\mu$ l S $\Sigma$ 255 $\mu$ l

**8.7.8. Falcipain-3-Assay**

- Kontinuierlicher Assay

<b>Enzym:</b>	Falcipain 3
<b>Substrat:</b>	Z-Phe-Arg-AMC (25 $\mu$ M)
<b>Temperatur:</b>	37 °C
<b>Puffer:</b>	Acetat-Puffer (pH 5.5)
<b>Volumina:</b>	5 $\mu$ l E, 215 $\mu$ l P, 5 $\mu$ l I oder DMSO → Inkubationszeit (30 Min) 30 $\mu$ l S $\Sigma$ 255 $\mu$ l

### 8.7.9. *Plasmodium-falciparum*-Assay

- Zellkultur-Assay

<b>Parasit</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> , W2-Strang
<b>Erythrocyten:</b>	Erythrocyten, Blutgruppe A, Resus-Faktor positive, 1 % Parasitämie
<b>Medium:</b>	→ 2 % Hämatocrit RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (500 ml), 1M HEPES Puffer (5 ml), Gentamicin (50g/l, 0.5 ml) und 0.5% Albumax
<b>Temperatur:</b>	37 °C
<b>Gas-</b>	3% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 91% N <sub>2</sub>
<b>Zusammensetzung:</b>	
<b>Volumina:</b>	1 % Parasitämie, 2 % Hämatocrit 90 µl Medium, 100 µl Erythrocyten-Lösung, 10 µl Inhibitor-Lösung (Mischung aus Medium und DMSO) DMSO-Konzentration < 0.1 %

Parasitämie: prozentualer Anteil an infizierten RBC's; Hämatocrit: Anteil der Erythrocyten im Gesamtvolumen; RPMI 1640 medium: Bicarbonat-Puffer-System; Albumax medium: Rinderserum Albumin; HEPES Puffer: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure

### 8.7.10. Verwendete Puffer

#### *ACETAT-Puffer (pH 5.5)*

Enzym-Puffer: 50 mM Natrium-Acetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT.

Assay-Puffer: wie Enzym-Puffer nur ohne DTT und mit 0.005% Brij 35.

#### *TRIS-Puffer (pH 7.5)*

Enzym-Puffer: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT.

Assay-Puffer: wie Enzym-Puffer nur ohne DTT und mit 0.005% Brij 35.

#### *CITRAT-Puffer (pH 3.2-8.0)*

Enzym-Puffer: 50 mM CITRAT, 50 mM NaCl.

Assay-Puffer: wie Enzym-Puffer.

## 8.8. Arbeitsmethoden

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Literaturangaben getrocknet. Alle Glasgeräte wurden vor Benutzung ausgeheizt.

## 8.9. Darstellung der Edukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Aminosäureester waren *S*- bzw. *L*-konfiguriert. Der angegebene Diastereomeren-Überschuss ist bezogen auf das Diastereomergemisch vor chromatographischer Trennung.

### Allgemeine Synthesen der Edukte:

#### **Methode I:** Bromierung der Olefine<sup>59</sup>

Zu einer eisgekühlten Lösung aus dem entsprechenden Olefin (50 mmol / 1 Äq.) in Dichlormethan (30 ml) wird langsam Brom (55 mmol / 1.1 Äq.) in Dichlormethan (30 ml) hinzuge tropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei sich die Lösung langsam auf RT erwärmt. Dann wird die Reaktionsmischung mit Natriumthiosulfat-Lösung (0.5 mol/l) ausgeschüttelt (3 x 30 ml). Die wässrige Phase wird nochmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt (2 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt.

#### **Methode II:** Eliminierung<sup>99</sup>

Zu einer Lösung aus 2,3-Dibromo-Derivat (50 mmol / 1 Äq.) in 50 ml Chloroform wird bei Raumtemperatur ein Überschuss an Triethylamin (65 mmol / 1.3 Äq.) gegeben. Nach 2 Std. Rühren wird die Reaktionsmischung 3-mal mit 1 M HCl (je 40 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

#### **Methode III:** Substitution<sup>100</sup>

Zu einer Lösung aus dem entsprechenden Aminosäureester (50 mmol / 1 Äq.) in Chloroform wird langsam Acryloylchlorid (55 mmol / 1.1 Äq.) hinzuge tropft. Mittels gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wird der pH-Wert zwischen 6 und 8 gehalten. Es muss darauf geachtet werden, dass die Reaktionsmischung sehr gut durchmischt wird. Nach

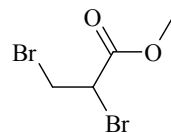
Beendigung der Zugabe von Acryloylchlorid wird die Reaktionsmischung noch eine weitere  $\frac{1}{2}$  h gerührt. Dann wird die organische Phase 2-mal mit 2 M Schwefelsäure (30 ml) und 2-mal mit dest. Wasser ausgeschüttelt. Anschließend wird diese mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

**Methode IV:** Substitution<sup>101</sup>

Zu einer Lösung des entsprechenden Aminosäureesters (50 mmol / 1 Äq.) in der dem jeweiligen Ester entsprechenden alkoholischen Kaliumhydroxid-Lösung (10%ig) wird langsam unter Eiskühlung Acryloylchlorid (55 mmol / 1.1 Äq.) dazugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wird 1 h gerührt. Dann wird die Reaktionsmischung mit Chloroform ausgeschüttelt. Die erhaltene organische Phase wird 2-mal mit ges. Natriumchlorid-Lösung (30 ml) ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

---

**8.9.1. Methyl-2,3-dibromopropanoat (2)**



**Methode I; Ansatz:** 4.53 ml (50 mmol) Methylacrylat, 2.81 ml (55 mmol) Brom, 60 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 98%, gelbliche Flüssigkeit

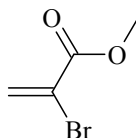
Molare Masse: 245.90 g/mol

Summenformel: C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 3.61 (dd, 1 H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 4.54 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 9.90 Hz), 3.78 (s, 3 H; CH<sub>3</sub>), 3.86 (dd, 1 H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 10.10 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1B,A</sub> = 9.90 Hz), 4.37 (dd, 1 H, CH, <sup>3</sup>J<sub>2,A/B</sub> = 4.54, 10.10 Hz).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>60</sup>

---

**8.9.2. Methyl-2-bromoacrylat (3)**

**Methode II; Ansatz:** 5.025 g (30 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 21 ml (150 mmol) Triethylamin, 60 ml Hexan;

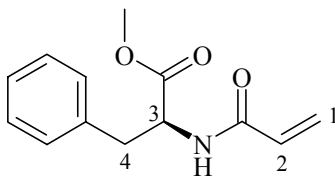
Ausbeute: 69% (1.76 g; 20.7 mmol), gelbliche Flüssigkeit

Molare Masse: 164.99 g/mol

Summenformel: C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.78 (s, 3 H), 6.21 (d, 1 H, <sup>2</sup>J<sub>A,B</sub> = 1.77 Hz), 6.90 (d, 1 H, <sup>2</sup>J<sub>B,A</sub> = 1.77 Hz).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>99</sup>

**8.9.3. (S)-Methyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat (6.1a)**

**Methode IV; Ansatz:** 2.53 g (8.6 mmol) Phenylalaninmethylester, 696 µl (8.6 mmol) Acrylsäurechlorid, 8.6 ml Kaliumhydroxid-Lösung;

Ausbeute: 1.75 g (7.51 mmol, 87 %), farbloser Feststoff

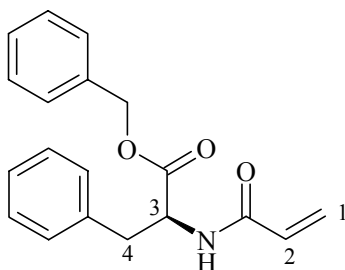
Molare Masse: 233.3 g/mol

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.10 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3 H), 4.92 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.61 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 10.36 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.26 Hz), 6.00 (bs, NH), 6.05 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 6.22 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 16.93 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.26 Hz), 7.18-7.23 (m, 5H).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>102</sup>

#### 8.9.4. (S)-Benzyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat (6.1b)



**Methode IV; Ansatz:** 2 g (6.9 mmol) Phenylalaninbenzylester, 1.25 ml (14 mmol) Acrylsäurechlorid, 60 ml Chloroform;

Ausbeute: 2 g (5.79 mmol; 84 %), farbloser Feststoff

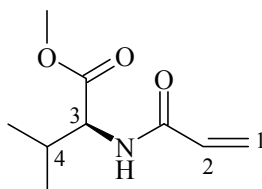
Molare Masse: 309.37 g/mol

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.10 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 4.94 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.10 (m, 2 H, <sup>2</sup>CH), 5.60 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 10.36 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.27 Hz), 5.92 (bs, NH), 6.01 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,A/B</sub> = 10.36, 16.92 Hz), 6.21 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 16.92 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.27 Hz), 7.13-7.30 (m, 10 H).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>103</sup>

#### 8.9.5. (S)-Methyl-2-(acryloylamino)-3-methylbutanoat (6.2a)





**Methode III; Ansatz:** 1 g (5.96 mmol) Valinmethylester, 530  $\mu$ l (5.96 mmol) Acrylsäurechlorid, 60 ml Chloroform;

Ausbeute: 947 mg (4.27 mmol, 72 %), farbloser Feststoff

Molare Masse: 185.22 g/mol

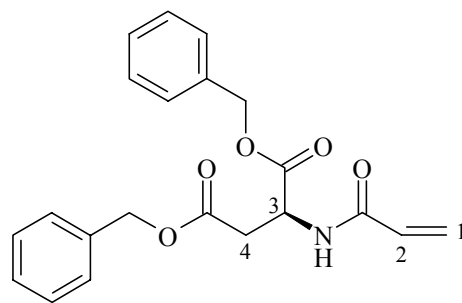
Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.84-0.91 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>), 2.13-2.17 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 3.68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.42-4.45 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.58 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 10.37 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.29 Hz), 5.95 (bs, NH), 6.03 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 10.37, 16.92 Hz), 6.21 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 16.92 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.29 Hz).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>104</sup>

---

### 8.9.6. (S)-Dibenzyl-2-(acryloylamino)succinat (6.3b)



**Methode III; Ansatz:** 1.09 g (2.25 mmol) Asparaginsäuredibenzylester, 186  $\mu$ l (2.25 mmol) Acrylsäurechlorid, 30 ml Chloroform;

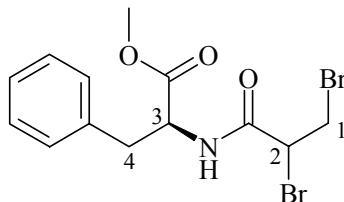
Ausbeute: 626 mg (1.7 mmol, 76 %), farbloser Feststoff

Molare Masse: 367.41 g/mol

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 2.86-3.08 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 4.89-4.92 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.00 (s, 2 H), 5.09 (s, 2 H), 5.61 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 10.36 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.55 Hz), 5.99-6.06 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 10.36, 17.07 Hz), 6.21 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 17.07 Hz, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.55 Hz), 6.43 (bs, NH), 7.21-7.29 (m, 10 H, aromatisch).

### 8.9.7. (S)-Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat (7.1a)



**Methode I; Ansatz:** 1.75 g (7.5 mmol) Methyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat, 400  $\mu$ l (8 mmol) Brom, 60 ml Chloroform;

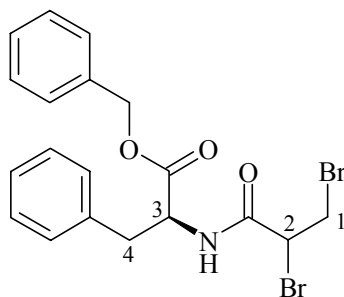
Ausbeute: 1.83 g (4.66 mmol, 62 %), weißer Feststoff

Molare Masse: 393.08 g/mol

Summenformel:  $C_{13}H_{15}NO_3Br_2$

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 3.06-3.17 (m, 2 H,  $^4CH_2$ ), 3.63-3.95 (m, 2 H,  $^1CH_2$ ), 3.69 (s, 3 H), 4.31-4.43 (m, 1 H,  $^2CH$ ), 4.82-4.88 (m, 1 H,  $^3CH$ ), 6.56 (bs, NH), 7.05-7.25 (m, 5 H).

### 8.9.8. (S)-Benzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat (7.1b)



**Methode I; Ansatz:** 1.3 g (3.76 mmol) Benzyl-2-(acryloylamino)-3-phenylpropanoat, 200  $\mu$ l (4 mmol) Brom, 30 ml Chloroform;

Ausbeute: 1.33 g (2.63 mmol, 70 %), farbloser Feststoff

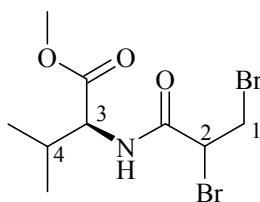
Molare Masse: 469.18 g/mol

Summenformel:  $C_{19}H_{19}NO_3Br_2$

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.01-3.10 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.58-3.65 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.82-3.91 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 4.28-4.36 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 4.86-4.90 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.02-5.13 (m, 2 H), 6.66 (bs, NH), 6.94-7.30 (m, 10 H).

---

### 8.9.9. (S)-Methyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-methylbutanoat (7.2a)



**Methode I; Ansatz:** 947 mg (4.27 mmol) Methyl-2-(acryloylamino)-3-methylbutanoat, 262 µl Brom, 40 ml Chloroform;

Ausbeute: 1.03 g (2.7 mmol, 63 %), farbloser Feststoff

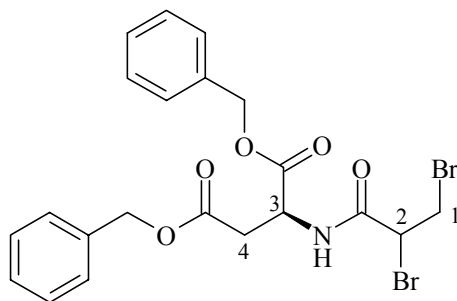
Molare Masse: 345.03 g/mol

Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 0.87-0.93 (m, 6 H), 2.14-2.22 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 3.68-3.80 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3 H), 3.87-3.93 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 4.36-4.49 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 4.51-4.55 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 6.55 (bs, NH).

---

### 8.9.10. (S)-Dibenzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]succinat (7.3b)



**Methode I; Ansatz:** 600 mg (1.64 mmol) Dibenzyl-2-(acryloylamino)succinat, 90  $\mu$ l (1.8 mmol) Brom, 50 ml Chloroform;

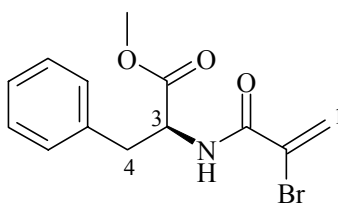
Ausbeute: 810 mg (1.5 mmol; 92 %), gelblicher Feststoff

Molare Masse: 527.21 g/mol

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 2.86-3.08 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.60-3.67 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.76-3.88 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 4.29-4.40 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 4.80-4.84 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 4.98 (s, 2 H), 5.09 (s, 2 H), 7.10-7.29 (m, 10 H), 9.00 (bs, NH).

### 8.9.11. (S)-Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat (8.1a)



**Methode II; Ansatz:** 2.16 g (5.49 mmol) Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat, 840  $\mu$ l (6 mmol) Brom, 40 ml Chloroform;

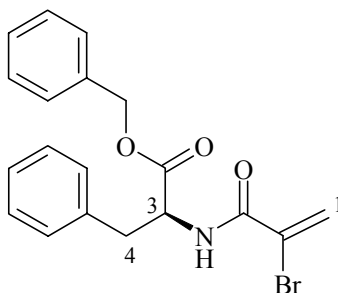
Ausbeute: 1.29 g (4.1 mmol, 75 %), gelbliches Öl

Molare Masse: 312.17 g/mol

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>Br

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 3.09-3.11 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3 H), 4.76-4.81 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.97 (bs, NH), 6.90 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>IA,B</sub> = 1.65 Hz), 7.05 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>IB,A</sub> = 1.65 Hz), 7.09-7.25 (m, 5 H).

Die übrigen physikalischen Daten entsprechen der Literatur.<sup>43</sup>

**8.9.12. (S)-Benzyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat (8.1b)**

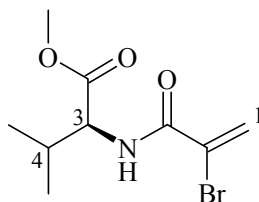
**Methode II; Ansatz:** 139 mg (0.275 mmol) Benzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat, 42  $\mu$ l (0.3 mmol) Triethylamin, 20 ml Chloroform;

Ausbeute: 97 mg (0.25 mmol, 91 %), gelblicher Feststoff

Molare Masse: 388.26 g/mol

Summenformel: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub>Br

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 3.10 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 4.81-4.85 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 5.04-5.14 (m, 2 H), 5.97 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>1A,B</sub> = 1.65 Hz), 6.91 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>1B,A</sub> = 1.65 Hz), 6.98 (bs, NH), 7.15-7.31 (m, 10 H).

**8.9.13. (S)-Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-methylbutanoat (8.2a)**

**Methode II; Ansatz:** 629 mg (1.65 mmol) Methyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-methylbutanoat, 280  $\mu$ l Triethylamin, 60 ml Chloroform;

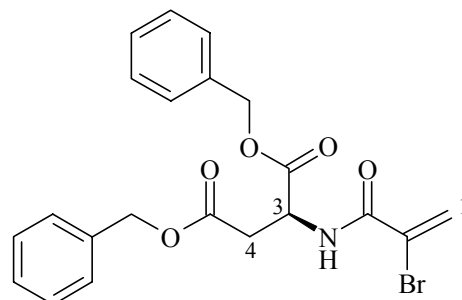
Ausbeute: 430 mg (1.427 mmol, 87 %), gelblicher Feststoff

Molare Masse: 264.12 g/mol

Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>Br

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 0.84-0.91$  (m, 6 H), 2.13-2.17 (m, 1 H,  $^4\text{CH}$ ), 3.68 (s, 3 H), 4.44-4.47 (m, 1 H,  $^3\text{CH}$ ), 5.98 (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^2J_{1A,B} = 1.65$  Hz), 6.91 (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^2J_{1B,A} = 1.65$  Hz), 7.03 (bs, NH).

#### 8.9.14. (S)-Dibenzyl-2-[(2-bromoacetyl)amino]succinat (8.3b)



**Methode II; Ansatz:** 800 mg (1.5 mmol) Dibenzyl-2-[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-succinat, 255  $\mu\text{l}$  Triethylamin, 50 ml Chloroform;

Ausbeute: 490 mg (1.1 mmol, 73 %), gelblicher Feststoff

Molare Masse: 446.30 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{Br}$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 2.86-3.08$  (m, 2 H,  $^4\text{CH}_2$ ), 4.88-4.93 (m, 1 H,  $^3\text{CH}$ ), 5.01 (s, 2 H), 5.07 (s, 2 H), 5.98 (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^2J_{1A,B} = 1.65$  Hz), 6.91 (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^2J_{1B,A} = 1.65$  Hz), 7.02 (bs, NH), 7.21-7.29 (m, 10 H, aromatisch).

## 8.10. Darstellung der Aziridine

### Allgemeine Synthese der Aziridin-2-carboxylate

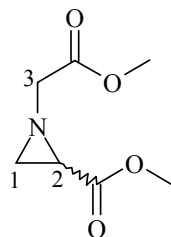
#### Methode A:<sup>41</sup>

Zu 2.0 mmol Methyl-2-bromoacrylat oder Methyl-2,3-dibromopropanoat gelöst in 30 ml Chloroform werden bei RT 2.0 mmol des entsprechenden Aminosäureesters und 6.0 mmol Triethylamin oder *N*-Methylmorpholin hinzugefügt. Nach Ende der Reaktion (mehrere h, ermittelt durch DC-Kontrolle) wird die Reaktionsmischung je 3-mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 ml) und Natriumchlorid-Lösung (30 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

#### Methode B:<sup>105</sup>

Zu einer Lösung aus 2.0 mmol Methyl-2-bromoacrylat oder der entsprechenden mit einer Aminosäure verknüpften Verbindung in 40 ml Methanol werden bei RT 2.0 mmol des entsprechenden Aminosäureesters und 6.0 mmol Triethylamin oder *N*-Methylmorpholin hinzugefügt. Wenn keine Umsetzung stattfindet (DC-Kontrolle), werden nochmals 3 Äq Base dazugegeben. Nach 9 - 16 h unter Rückfluss (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Chloroform gelöst. Die organische Phase wird je 3-mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 ml) und Natriumchlorid-Lösung (30 ml) extrahiert. Nach Trocknung mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

### 8.10.1. 1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.1a)



**Methode A**, 24 h;

**Ansatz:** 2.09 g (23.44 mmol) Glycinmethylester, 5.77 g (23.44 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 9.925 ml Triethylamin, 50 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.25 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat)

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2996, 2956 (s, CH<sub>2</sub>), 2848 (m, OCH<sub>3</sub>), 1736 (s, Ester), 1436 (m, CH<sub>2</sub>), 1372 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1209, 1181 (s, C-O), 764 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.67 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 2.15 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 6.57, 3.16 Hz), 2.27 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.16 Hz), 3.09 (d, 1 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 16.16 Hz), 3.14 (d, 1 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 16.16 Hz), 3.67 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H).

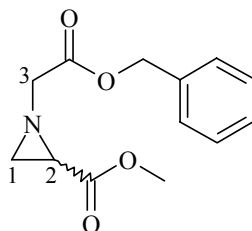
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.27 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.44 (<sup>2</sup>CH), 52.00, 52.33 (OCH<sub>3</sub>), 60.31 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 169.59, 170.47 (C=O).

**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>, 173.2; found: [MH]<sup>+</sup> 174.1.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 0.9 min, Reinheit: 100 %.

**Ausbeute:** 50 %.



**8.10.2. 1-Benzoyloxycarbonylmethyl-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.1b)**

**Methode A**, 32 h;

**Ansatz:** 844 mg (2.5 mmol) Glycinbenzylester, 615 mg (2.5 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 813  $\mu$ l (7.5 mmol) *N*-Methylmorpholin, 30 ml Methanol.

**R<sub>f</sub>:** 0.21 (5% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2997, 2953 (s, CH<sub>2</sub>), 2841 (m, OCH<sub>3</sub>), 1738 (s, Ester), 1436 (m, CH<sub>2</sub>), 1381 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1174, 1126 (s, C-O), 740 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.65 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>I<sub>A</sub>,2</sub> = 6.57 Hz), 2.14 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 6.56, 3.42 Hz), 2.25 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>I<sub>B</sub>,2</sub> = 3.42 Hz), 3.05 (d, 1 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 16.04 Hz), 3.20 (d, 1 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 16.04 Hz), 3.63 (s, 3 H), 5.09 (s, 2 H), 7.18-7.26 (m, 5 H, aromatisch).

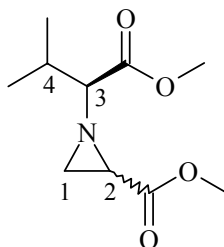
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.23 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.51 (<sup>2</sup>CH), 52.35 (OCH<sub>3</sub>), 60.37 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.79 (OCH<sub>2</sub>Ph), 126.94, 128.37, 128.59 (aromatisch), 141.02 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 169.59, 170.47 (C=O).

**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>, 249.3; found: [MH]<sup>+</sup> 250.1.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.2 min, Reinheit: 91.4 %.

**Ausbeute:** 46 %.

### 8.10.3. 1-((S)-Methoxycarbonyl-2-methyl-propyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.2a)



**Methode A**, 2.5 h;

**Ansatz:** 1.25 (9.53 mmol) Valinmethylester, 2.34 g (9.53 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 3.24 ml Triethylamin, 40 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.20 (2:1 Cyclohexan/Ethylacetat)

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2960 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2876 (m, OCH<sub>3</sub>), 1735 (s, Ester), 1436 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1372 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1202, 1152 (s, C-O), 766 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (9 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.83-1.02 (m, 6 H, 2x CH<sub>3</sub>), 1.65 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>3,4,2</sub> = 6.56 Hz), 2.07-2.23 (m, 4 H, <sup>4</sup>CH, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>2</sup>CH), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 19.01, 19.28 (CH<sub>3</sub>), 31.87 (<sup>2</sup>CH), 32.03 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 39.24 (<sup>4</sup>CH), 52.31, 52.33 (OCH<sub>3</sub>), 77.91 (<sup>3</sup>CH), 170.87, 174.45 (C=O).

2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 0.83-1.02 (m, 6 H, 2x CH<sub>3</sub>), 2.07-2.23 (m, 4 H, <sup>4</sup>CH, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>2</sup>CH), 2.35 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 3.28 Hz), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 19.28, 19.44 (CH<sub>3</sub>), 31.91 (<sup>2</sup>CH), 35.11 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 35.60 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 51.83, 51.90 (OCH<sub>3</sub>), 77.96 (<sup>3</sup>CH), 169.86, 174.05 (C=O).

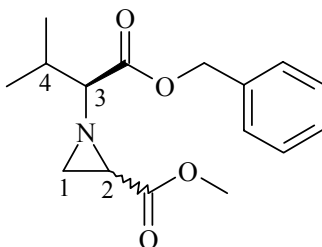
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>, 215.2; found: [MH]<sup>+</sup> 216.2.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 0.8, 1.4 min, Reinheit: 90.8 %.

$[\alpha]_D^{26} = -13$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 10 %.

**8.10.4. 1-((S)-Benzyloxycarbonyl-2-methyl-propyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.2b)**



**Methode A**, 28 h;

**Ansatz:** 7.38 g (20 mmol) Valinbenzylester, 4.92 g (20 mmol) Methyl-2,3-dibromopronoat, 6.8 ml Triethylamin, 80 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.61 (5% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2962 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2874 (m, OCH<sub>3</sub>), 1731 (s, Ester), 1456 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1372 (s, COCH<sub>3</sub>), 1178, 1147 (s, C-O), 748 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (33 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.79-0.96 (m, je 3 H, 2x CH<sub>3</sub>) 1.63 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 1.92-2.03 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 2.15-2.36 (m, 3 H, <sup>2</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.07-5.12 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.24-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 17.94, 18.18 (CH<sub>3</sub>), 35.00 (<sup>2</sup>CH), 35.09 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 44.08 (<sup>4</sup>CH), 51.23 (OCH<sub>3</sub>), 65.63 (CH<sub>2</sub>Ph), 77.70 (<sup>3</sup>CH), 127.35, 127.57, 128.52 (aromatisch), 135.66 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 169.46, 173.83 (C=O).

2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.79-0.96 (m, je 3 H, 2x CH<sub>3</sub>), 1.92-2.03 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 2.15-2.36 (m, 3 H, <sup>2</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.07-5.12 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.24-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 17.94, 18.18 (CH<sub>3</sub>), 31.93 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 32.00 (<sup>2</sup>CH), 44.08 (<sup>4</sup>CH), 51.28 (OCH<sub>3</sub>), 67.67 (CH<sub>2</sub>Ph), 78.00 (<sup>3</sup>CH), 127.35, 127.57, 128.52 (aromatisch), 135.66 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 169.98, 173.82 (C=O).

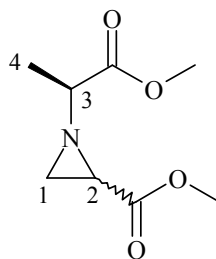
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, 291.3; found: [MH]<sup>+</sup> 292.4.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 0.7, 2.3 min, Reinheit: 100 %.

$[\alpha]_D^{26} = -26$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 41 %.

### 8.10.5. 1-((S)-1-Methoxycarbonyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.3a)



**Methode A**, 8 h;

**Ansatz:** 3.09 g (30 mmol) Alaninmethylester, 4.94 g (30 mmol) Methyl-2-bromoacrylat, 12.67 ml Triethylamin, 100 ml Dichlormethan;

→ Diastereomere getrennt (17 % de)

1. Diastereomer:

**R<sub>f</sub>:** 0.45 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2994, 2955 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2846 (m, OCH<sub>3</sub>), 1734 (s, Ester), 1437 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1377 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1202, 1169 (s, C-O), 753 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.37 (d, 3 H, <sup>4</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.57 Hz), 1.82 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 2.06 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 6.57, 3.28 Hz), 2.27 (q, 1 H, <sup>3</sup>CH, <sup>3</sup>J = 6.82 Hz), 2.29 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 3.68 (s, 3 H), 3.72 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 16.25 (<sup>4</sup>CH<sub>3</sub>), 33.87 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 35.58 (<sup>2</sup>CH), 51.16, 51.36 (OCH<sub>3</sub>), 65.75 (<sup>3</sup>CH), 169.66, 170.95 (C=O).

**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>, 187.2; found: [MH]<sup>+</sup> 188.2.

**LC-MS:** R<sub>f</sub> = 1.3 min, Reinheit: 100 %.

$[\alpha]_D^{26}$  = -5 (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

Ausbeute: 15 %.

2. Diastereomer:

**R<sub>f</sub>**: 0.31 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat)

**IR**:  $\tilde{\nu}$  = 2996, 2949 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2839 (m, OCH<sub>3</sub>), 1741 (s, Ester), 1432 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1359 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1211, 1185 (s, C-O), 742 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.37 (d, 3 H, <sup>4</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.57 Hz), 1.59 (d, 1H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.82 Hz), 2.20 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 2.24-2.30 (m, 2 H, <sup>2</sup>CH und <sup>3</sup>CH), 3.72 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 17.22 (<sup>4</sup>CH<sub>3</sub>), 34.84 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.04 (<sup>2</sup>CH), 51.63, 52.31 (OCH<sub>3</sub>), 66.69 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 171.9, 172.12 (C=O).

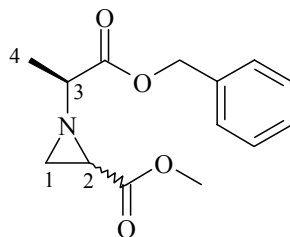
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>, 187.2; found: [MH]<sup>+</sup> 188.2.

$[\alpha]_D^{26} = -3$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 1.0 min, Reinheit: 100 %.

**Ausbeute**: 21 %.

### 8.10.6. 1-((S)-1-Benzylloxycarbonyl-ethyl)-aziridin-2-carboxymethylester (4.3b)



**Methode A**, 16 h;

**Ansatz:** 2.2 g (8.95 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 3.14 g (8.95 mmol) Alaninbenzylester, 3.73 ml (26.85 mmol) Triethylamin, 60 ml Benzol;

**R<sub>f</sub>:** 0.79 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3063, 3033 (m, CONH); 2953 (s, CH<sub>2</sub>), 2891 (m, OCH<sub>3</sub>), 1732 (s, Ester), 1455 (m, CH<sub>2</sub>), 1357 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1211, 1165 (s, C-O), 737, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (23 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.37 (d, 3 H, <sup>4</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.82 Hz), 1.58 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 2.08 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.16, 6.57 Hz), 2.20 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.16 Hz), 2.26-2.32 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.58 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.06-5.15 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.24-7.29 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 17.11 (<sup>4</sup>CH<sub>3</sub>), 34.86 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.57 (<sup>2</sup>CH), 52.37 (OCH<sub>3</sub>), 66.69 (<sup>3</sup>CH), 66.78 (CH<sub>2</sub>Ph), 128.29, 128.33, 128.59 (CH, aromatisch), 135.64 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.70, 171.48 (C=O).

2. Diastereomer:



**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.38 (d, 3 H, <sup>4</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.82 Hz), 1.82 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 2.26-2.32 (m, 3 H, <sup>3</sup>CH, <sup>2</sup>CH und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.06-5.15 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.24-7.29 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 17.15 (<sup>4</sup>CH<sub>3</sub>), 33.00 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.22 (<sup>2</sup>CH), 52.28 (OCH<sub>3</sub>), 66.67 (<sup>3</sup>CH), 66.86 (CH<sub>2</sub>Ph), 128.18, 128.24, 128.54 (CH, aromatisch), 135.55 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.45, 171.23 (C=O).

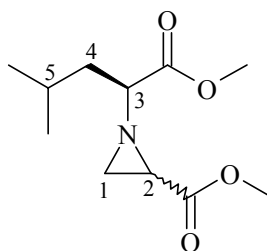
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>, 263.3; found: [MH]<sup>+</sup> 264.5.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 0.9, 1.1 min, Reinheit: 100 %.

$[\alpha]_D^{26} = +4$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 88 %.

**8.10.7. 1-((S)-1-Methoxycarbonyl-3-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäure-methylester (4.4a)**



**Methode A**, 6 h;

**Ansatz:** 2.05 g (11.3 mmol) Leucinmethylester, 3.73 g (15.2 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 6.32 ml Triethylamin, 50 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.62 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2956 (m, CH<sub>3</sub>), 2872 (w, CH<sub>2</sub>), 1734 (s, C=O), 1439 (m, CH<sub>2</sub>/ CH<sub>3</sub>), 1197 (s, C-O-C), 1170 (s, C-O-C), 753 (m, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Überschuss konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.82-1.71 (m, 8 H, CH<sub>3</sub>, <sup>5</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 1.74-1.84 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.07-2.10 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.22-2.36 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH), 3.65, 3.66 (s, je 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 22.35, 22.85 (CH<sub>3</sub>), 24.80 (<sup>5</sup>CH), 33.85 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.27 (<sup>2</sup>CH), 41.52 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 51.96, 52.24 (OCH<sub>3</sub>), 70.10 (<sup>3</sup>CH), 169.56, 171.00 (C=O).

2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.82-1.71 (m, 9 H, CH<sub>3</sub>, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 1.74-1.84 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.22-2.36 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>CH), 3.65, 3.66 (s, je 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22.41, 22.91 (CH<sub>3</sub>), 24.75 (<sup>5</sup>CH), 33.47 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.42 (<sup>2</sup>CH), 41.52 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 51.96, 52.24 (OCH<sub>3</sub>), 69.59 (<sup>3</sup>CH), 169.56, 171.22 (C=O).

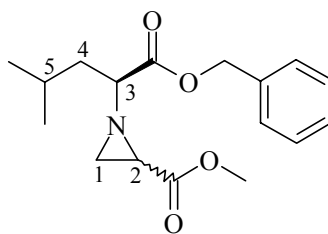
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, 229.28; found: [MH]<sup>+</sup> 230.3.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.0 min, Reinheit: 100 %.

$[\alpha]_D^{26} = +17$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 78 %.

**8.10.8. 1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-3-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäure-methylester (4.4b)**



**Methode A**, 6 h;

**Ansatz:** 3.91 g (9.94 mmol) Leucinbenzylester, 2.44 g (9.92 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 4.13 ml Triethylamin, 50 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>:** 0.59 (5% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2957 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2871 (m, OCH<sub>3</sub>), 1736 (s, Ester), 1498 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1369 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1155, 1123 (s, C-O), 745 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.77-0.90 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>), 1.37-1.78 (m, 4 H, <sup>5</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.06 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.28, 6.57 Hz), 2.20-2.35 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.57, 3.65 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 5.05-5.11 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.26-7.28 (m, 5H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 21.07, 22.10 (CH<sub>3</sub>), 24.74 (<sup>5</sup>CH<sub>3</sub>), 33.99 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.58, (<sup>2</sup>CH), 41.56 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.25 (OCH<sub>3</sub>), 66.70 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.10 (<sup>3</sup>CH), 128.22, 128.53, 128.56 (aromatisch), 134.41 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 170.51, 171.54 (C=O).

## 2. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.77-0.90 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>), 1.37-1.78 (m, 4H, <sup>5</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.20-2.35 (m, 5 H, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH), 3.57, 3.65 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 5.05-5.11 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.26-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.44, 22.91 (CH<sub>3</sub>), 24.77 (<sup>5</sup>CH<sub>3</sub>), 33.50 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.38 (<sup>2</sup>CH), 41.37 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.33 (OCH<sub>3</sub>), 66.75 (CH<sub>2</sub>Ph), 69.78 (<sup>3</sup>CH), 128.27, 128.30, 128.58 (aromatisch), 135.64 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 170.58, 171.30 (C=O).

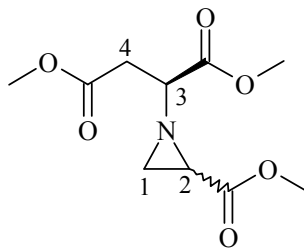
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>, 305.4; found: [MH]<sup>+</sup> 306.4.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 2.1 min, Reinheit: 94.1 %.

$[\alpha]_D^{26} = -10$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 48 %.

### 8.10.9. (S)-2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredimethylester (4.5a)



**Methode A**, 4 h;

**Ansatz:** 1.56 g (7.9 mmol) Asparaginsäuredimethylester, 1.29 g (7.9 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 4.8 ml Triethylamin, 80 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>:** 0.61 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3003, 2956 (s, CH<sub>2</sub>), 2850 (m, OCH<sub>3</sub>), 1730 (s, Ester), 1437 (m, CH<sub>2</sub>), 1365 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1196, 1170 (s, C-O).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (9 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.77 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.82 Hz), 2.18 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.54 Hz), 2.43 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.54, 6.82 Hz), 2.66-2.77 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.95-3.02 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.64, 3.67, 3.69 (s, je 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.51 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.61 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 37.05 (<sup>2</sup>CH), 52.03, 52.43, 52.55 (OCH<sub>3</sub>), 66.68 (<sup>3</sup>CH), 170.19, 170.26, 171.19 (C=O).

2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.96 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.82 Hz), 2.30 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.29 Hz), 2.23 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.29, 6.82 Hz), 2.66-2.77 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.95-3.02 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.64, 3.66, 3.70 (s, je 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 33.52$  ( $^1\text{CH}_2$ ),  $36.78$  ( $^4\text{CH}_2$ ),  $37.77$  ( $^2\text{CH}$ ),  $52.03$ ,  $52.39$ ,  $52.52$  ( $\text{OCH}_3$ ),  $66.96$  ( $^3\text{CH}$ ),  $170.37$ ,  $170.49$ ,  $171.11$  ( $\text{C}=\text{O}$ ).

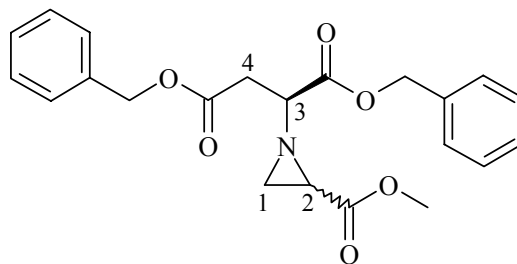
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f.  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_6$ , 245.23; found:  $[\text{MH}]^+$  246.2.

**LC-MS:**  $R_t = 1.2$  min, Reinheit: 100 %.

$[\alpha]_D^{26} = +39$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0.1$ ).

**Ausbeute:** 17 %.

### 8.10.10. 2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredibenzylester (4.5b)



**Methode A**, 6 h;

**Ansatz:** 4.6 g (10 mmol) Asparaginsäuredibenzylester, 2.5 g (10 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 4.2 ml Triethylamin, 75 ml Methanol;

→ die Diastereomere wurden säulenchromatographisch getrennt (9 % de)

1. Diastereomer:

**R<sub>f</sub>:** 0.59 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3034, 2954 (s, CH<sub>2</sub>), 2850 (m, OCH<sub>3</sub>), 1730 (s, Ester), 1438 (m, CH), 1355 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1235, 1167 (s, C-O), 740 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.96 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.44 Hz), 2.24 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1AB</sub> = 3.15, 6.44 Hz), 2.28 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.15 Hz), 2.70-2.78 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH), 3.06 (dd, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 5.56 Hz, <sup>2</sup>J = 14.65 Hz), 3.62 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.01-5.09 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.24-7.31 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 33.49 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 35.95 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 36.05 (<sup>2</sup>CH), 51.38 (OCH<sub>3</sub>), 65.79, 65.95 (CH<sub>2</sub>Ph), 66.95 (<sup>3</sup>CH), 127.27, 127.34, 127.56 (aromatisch), 135.45 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 168.44, 169.26, 169.48 (C=O).

**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, 397.4; found: [M]<sup>+</sup> 397.0.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 0.8 min, Reinheit: 98.5 %.



$$[\alpha]_D^{26} = -16 \text{ (CHCl}_3\text{, c = 0.1)}.$$

**Ausbeute:** 12 %.

2. Diastereomer:

**R<sub>f</sub>:** 0.47 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3035, 2958 (s, CH<sub>2</sub>), 2847 (m, OCH<sub>3</sub>), 1731 (s, Ester), 1441 (m, CH<sub>2</sub>), 1387 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1197, 1169 (s, C-O), 746 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.71 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.69 Hz), 2.09 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.54 Hz), 2.40 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.54, 6.69 Hz), 2.71-2.79 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.04 (dd, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.07 Hz, <sup>2</sup>J = 15.67 Hz), 3.56 (s, 3 H), 4.99-5.12 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.22-7.30 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 32.48 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 35.84 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 36.91 (<sup>2</sup>CH), 51.31 (OCH<sub>3</sub>), 65.80, 66.32 (CH<sub>2</sub>Ph), 65.81 (<sup>3</sup>CH), 127.35, 127.54, 127.54 (aromatisch), 134.45 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 168.81, 169.57 (C=O).

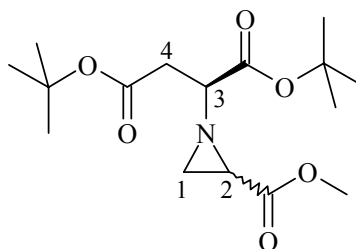
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>, 397.4; found: [M]<sup>+</sup> 397.0.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.5 min, Reinheit: 97.1 %.

$$[\alpha]_D^{26} = -9 \text{ (CHCl}_3\text{, c = 0.1)}.$$

**Ausbeute:** 9 %.

**8.10.11. (S)-2-(2-Methoxycarbonyl-aziridin-2-yl)-bernsteinsäuredi-*tert*-butylester (4.5c)**



**Methode A**, 96 h;

**Ansatz:** 2 g (7.1 mmol) Asparaginsäuredibutylester, 1.16 g (7.1 mmol) Methyl-2,3-bromopropanoat, 2.5 ml *N*-Methylmorpholin, 100 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.53 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3004, 2952 (s, CH<sub>2</sub>), 2458 (m, OCH<sub>3</sub>), 1728 (s, Ester), 1457 (m, CH<sub>2</sub>), 1367 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1198, 1142 (s, C-O), 766 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (29 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.37-1.40 (m, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.78 (d, 1H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.83 Hz), 2.14 (d, 1H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.54 Hz), 2.23-2.26 (m, 1H, <sup>2</sup>CH), 2.51-2.59 (m, 2H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.82-2.89 (m, 1H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 27.90, 27.99, 28.03 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.26 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.05 (<sup>2</sup>CH), 37.98 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.26 (OCH<sub>3</sub>), 67.72 (<sup>3</sup>CH), 81.14, 82.04 (C<sub>q</sub>), 168.90, 170.07, 170.71 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.37-1.40 (m, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.96 (d, 1H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.56 Hz), 2.23-2.26 (m, 2H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.40 (dd, 1H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.54, 6.56 Hz), 2.51-2.59 (m, 2H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.82-2.89 (m, 1H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 27.90, 27.99, 28.03 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 33.61 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.81 (<sup>2</sup>CH), 38.12 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.26 (OCH<sub>3</sub>), 67.81 (<sup>3</sup>CH), 81.14, 82.04 (C<sub>q</sub>), 169.20, 170.26, 170.66, (C=O).

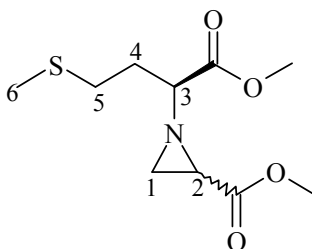
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>, 329.40; found: [M+H]<sup>+</sup> 330.3.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 1.2 min, Reinheit: 96.5 %.

$[\alpha]_D^{26} = + 51$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 31 %.

**8.10.12. 1-((S)-Methoxycarbonyl-3-methylsulfanyl-propyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.6a)**



**Methode A**, 15 h;

**Ansatz:** 4.79 g (24 mmol) Methionin, 5.97 g (24 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 10 ml Triethylamin, 60 ml Dichlormethan;

**R<sub>f</sub>:** 0.30 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2985 (s, CH<sub>2</sub>), 1736 (s, Ester), 1437 (m, CH<sub>2</sub>), 1374 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1198 (s, C-O), 762 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (17 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.74 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.07 Hz), 2.02 (s, 3 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 1.93-2.12 (m, 5 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.21-2.30 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.46-2.53 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.56 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 15.08 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 31.55 (<sup>5</sup>CH<sub>3</sub>), 32.17 (<sup>4</sup>CH<sub>3</sub>), 33.66, (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.76 (<sup>2</sup>CH), 51.82, 52.15 (OCH<sub>3</sub>), 69.08 (<sup>3</sup>CH), 164.87, 171.12 (C=O).

2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.80 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.75 Hz), 2.02 (s, 3 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 1.93-2.12 (m, 5 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.21-2.30 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.46-2.53 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.59 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.63 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 15.14$  ( $^6\text{CH}_3$ ), 31.47 ( $^5\text{CH}_3$ ), 32.35 ( $^4\text{CH}_3$ ), 33.77 ( $^1\text{CH}_2$ ), 37.02 ( $^2\text{CH}$ ), 51.85, 52.00 ( $\text{OCH}_3$ ), 69.27 ( $^3\text{CH}$ ), 164.87, 170.19 ( $\text{C=O}$ ).

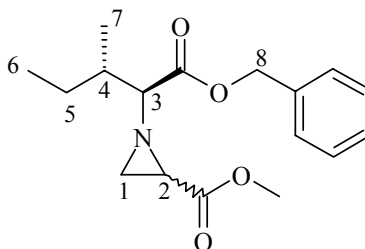
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f.  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ , 247.3; found:  $[\text{M}]^+$  247.3.

**LC-MS:**  $R_t = 0.9$  min, Reinheit: 92.5 %.

$[\alpha]_D^{26} = -30$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0.1$ ).

**Ausbeute:** 24 %.

**8.10.13. 1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-methyl-butyl)-aziridin-2-carboxylsäure-methylester (4.7b)**



**Methode A**, 6 h;

**Ansatz:** 2 g (6.55 mmol) Isoleucinbenzylester, 1.69 g (6.55 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 2.75 ml Triethylamin, 100 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>:** 0.62 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat)

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2962, 2936 (s, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 2877 (m, OCH<sub>3</sub>), 1731 (s, Ester), 1440 (m, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>), 1381 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1237, 1177 (s, C-O), 741 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (57 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.77-0.90 (m, 6 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>7</sup>CH<sub>3</sub>), 1.17-1.52 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.57-1.64 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.84-1.92 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 2.07 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.03, 6.31 Hz), 2.20-2.23 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.02-5.16 (m, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.24-7.29 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 11.48 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 15.68 (<sup>7</sup>CH<sub>3</sub>), 25.70 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 32.59 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.49 (<sup>4</sup>CH), 38.76 (<sup>2</sup>CH), 52.22 (OCH<sub>3</sub>), 66.54 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 76.52 (<sup>3</sup>CH), 128.37, 128.43, 128.54 (CH, aromatisch), 135.68 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.52, 170.93 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.77-0.90 (m, 6 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>7</sup>CH<sub>3</sub>), 1.17-1.52 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.57-1.64 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.84-1.92 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 2.14 (dd, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.28, 6.57 Hz), 2.20-2.23 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.02-5.16 (m, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.24-7.29 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 11.67 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 15.72 (<sup>7</sup>CH<sub>3</sub>), 25.70 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 35.38 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 35.64 (<sup>2</sup>CH), 38.49 (<sup>4</sup>CH), 52.26 (OCH<sub>3</sub>), 66.54 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 76.83 (<sup>3</sup>CH), 128.26, 128.34, 128.52 (CH, aromatisch), 135.62 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.71, 171.41 (C=O).

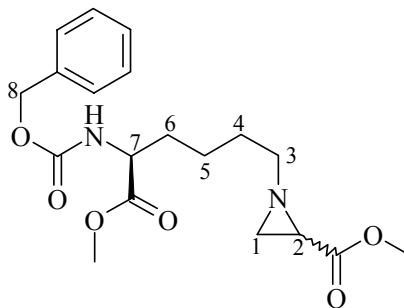
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>, 305.4; found: [MH]<sup>+</sup> 306.4.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 2.9 min, Reinheit: 96.2 %.

$[\alpha]_D^{26} = -57$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 56 %.

**8.10.14. 1-((S)-5-Benzyloxycarbonylamino-5-methoxycarbonyl-pentyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.8a)**



**Methode A**, 12 h;

**Ansatz:** 500 mg (1.51 mmol) *N* $\alpha$ -Z-Lysinmethylester, 371 mg (1.51 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 1.267 ml Triethylamin, 80 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>:** 0.38 (5% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2952 (s, CH<sub>2</sub>), 2862 (m, OCH<sub>3</sub>), 1716 (s, Ester), 1439 (m, CH<sub>2</sub>), 1336 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1205, 1178 (s, C-O), 784, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18-1.82 (m, 8 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.93-1.95 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.42, 6.31 Hz), 2.14-2.30 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65, 3.67 (s, OCH<sub>3</sub>), 4.27-4.32 (m, 1 H, <sup>7</sup>CH), 5.04 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.21 (bs, 1 H, NH), 7.22-7.30 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.69 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 28.80 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 32.57 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 34.40 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.11 (<sup>2</sup>CH), 52.01, 52.17 (OCH<sub>3</sub>), 52.75 (<sup>7</sup>CH), 60.36 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.80 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 127.91, 127.98, 128.32 (CH, aromatisch), 135.24 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 154.84 (NHC=O), 170.33, 171.84 (C=O).



## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18-1.82 (m, 8 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.09 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.03 Hz), 2.14-2.30 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65, 3.67 (s, OCH<sub>3</sub>), 4.27-4.32 (m, 1 H, <sup>7</sup>CH), 5.04 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.21 (bs, 1 H, NH), 7.22-7.30 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.69 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 28.80 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 32.57 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 34.47 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.01 (<sup>2</sup>CH), 52.01, 52.17 (OCH<sub>3</sub>), 52.75 (<sup>7</sup>CH), 60.36 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.80 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 127.91, 127.98, 128.32 (CH, aromatisch), 135.24 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 154.84 (NHC=O), 170.33, 171.84 (C=O).

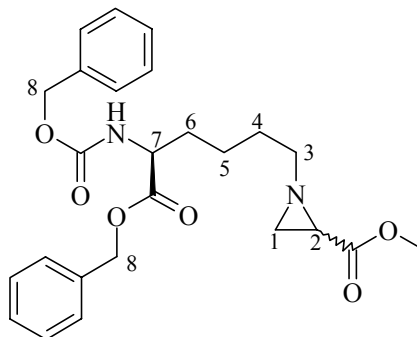
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 378.43; found: [MH]<sup>+</sup> 379.4.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 1.6 min, Reinheit: 83.4 %.

$[\alpha]_D^{26} = -41$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 94 %.

**8.10.15. 1-[5-Benzyloxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,4-dienyloxycarbonyl-amino)-pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.8b)**



**Methode A**, 16 h;

**Ansatz:** 2.5 g (4.7 mmol) *N* $\alpha$ -Z-Lysinbenzylester, 1.16 g (4.7 mmol) Methyl-2,3-dibromopropoat, 3 ml Triethylamin, 60 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (5% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2951 (s, CH<sub>2</sub>), 2862 (m, OCH<sub>3</sub>), 1716 (s, Ester), 1438 (m, CH<sub>2</sub>), 1334 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1204, 1178 (s, C-O), 740, 698 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.20-2.24 (m, 11 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.28-4.34 (m, 1 H, <sup>7</sup>CH), 5.01-5.12 (m, 4 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.38 (bs, 1 H, NH), 7.21-7.26 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.85 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 28.95 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 32.38 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 34.59 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.21 (<sup>2</sup>CH), 52.18 (OCH<sub>3</sub>), 53.87 (<sup>7</sup>CH), 60.50 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.93, 67.08 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 128.09, 128.14, 128.31, 128.46, 128.51, 128.62 (CH, aromatisch), 135.37, 136.30 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 155.91 (HNC=O), 171.30, 172.25 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.20-2.24 (m, 11 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.28-4.34 (m, 1 H, <sup>7</sup>CH), 5.01-5.12 (m, 4 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.38 (bs, 1 H, NH), 7.21-7.26 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.94 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 29.00 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 32.41 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 34.61 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.25 (<sup>2</sup>CH), 52.18 (OCH<sub>3</sub>), 53.87 (<sup>7</sup>CH), 60.53 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.93, 67.08 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 128.09, 128.14, 128.31, 128.46, 128.51, 128.62 (CH, aromatisch), 135.37, 136.30 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 155.91 (HNC=O), 171.30, 172.25 (C=O).

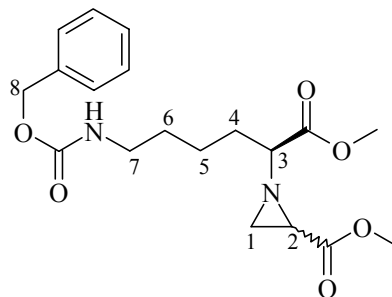
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 454.53; found: [M+Na]<sup>+</sup> 477.5.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 2.1 min, Reinheit: 91.1 %.

$[\alpha]_D^{26} = -56$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 40 %.

**8.10.16. 1-[(S)-Methoxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,3-dienyloxycarbonyl-amino)-pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.9a)**



**Methode A**, 24 h;

**Ansatz:** 2 g (6 mmol) *N*- $\epsilon$ -Z-Lysinmethylester, 1.5 g (6 mmol) Methyl-2,3-bromopropanoat, 2.52 ml Triethylamin, 60 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (10% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2949 (s, CH<sub>2</sub>), 2865 (m, OCH<sub>3</sub>), 1699 (s, Ester), 1442 (m, CH<sub>2</sub>), 1335 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1242, 1175 (s, C-O), 738, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.29-1.47 (m, 4 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.60 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.75-1.84 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.06-2.09 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.20-2.26 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>3</sup>CH), 3.06-3.13 (m, 2 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.80 (bs, NH), 5.01 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.21-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.75 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 31.89 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 33.80 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 35.26 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.35 (<sup>2</sup>CH), 40.71 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 52.15, 52.37 (OCH<sub>3</sub>), 66.57 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 71.43 (<sup>3</sup>CH), 128.07, 128.08, 128.49, (aromatisch, CH), 136.65 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 156.37, 170.47, 171.57 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.29-1.47 (m, 4 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.75-1.84 (m, 3 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.20-2.26 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH und <sup>3</sup>CH), 3.06-3.13 (m, 2 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 3.64 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.80 (bs, NH), 5.01 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.21-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 22.75 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 31.89 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 33.80 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 35.47 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.86 (<sup>2</sup>CH), 40.20 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 52.15, 52.37 (OCH<sub>3</sub>), 66.57 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 71.31 (<sup>3</sup>CH), 128.07, 128.08, 128.49, (aromatisch, CH), 136.65 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 156.37, 170.47, 171.57 (C=O).

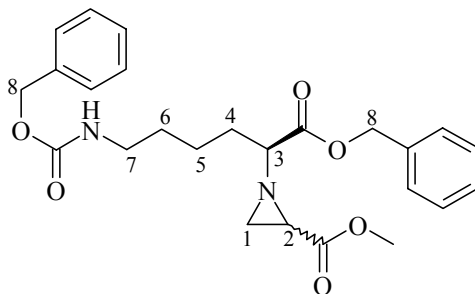
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 378.4; found: [M]<sup>+</sup> 378.3.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 1.1 min, Reinheit: 87.1 %.

$[\alpha]_D^{26} = +5$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 23 %.

**8.10.17. 1-[(S)-Benzyloxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,3-dienyloxycarbonyl-amino)-pentyl]-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.9b)**



**Methode A**, 24 h;

**Ansatz:** 322 mg (0.79 mmol) *N*-*Z*-Lysinbenzylester, 195 mg (0.79 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 350  $\mu$ l Triethylamin, 40 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>** 0.4 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat)

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3063, 3034 (m, CONH); 2951 (s, CH<sub>2</sub>), 2862 (m, OCH<sub>3</sub>), 1716 (s, Ester), 1439 (m, CH<sub>2</sub>), 1343 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1200, 1178 (s, C-O), 737, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18-1.41 (m, 4 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.59-1.80 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.20-2.25 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>CH), 3.06-3.10 (m, 2 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 3.58 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.01-5.11 (m, 4 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.24-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 21.70 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 28.34 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 31.02 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 32.97 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.34 (<sup>2</sup>CH), 39.69 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 51.28 (OCH<sub>3</sub>), 65.58 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 70.35 (<sup>3</sup>CH), 127.08, 127.44, 127.50, 127.55, 127.59, 127.64 (aromatisch, CH), 134.55, 134.64 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 155.36, 169.49, 169.87 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18-1.41 (m, 4 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 1.59-1.80 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 2.02-2.04 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.20-2.25 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>CH), 3.06-3.10 (m, 2 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 3.58 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.01-5.11 (m, 4 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 7.24-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 21.70 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 28.34 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 30.83 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 31.02 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 35.89 (<sup>2</sup>CH), 39.69 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 51.28 (OCH<sub>3</sub>), 65.58 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 70.35 (<sup>3</sup>CH), 127.08, 127.44, 127.50, 127.55, 127.59, 127.64 (aromatisch, CH), 134.55, 134.64 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 155.36, 169.49, 169.87 (C=O).

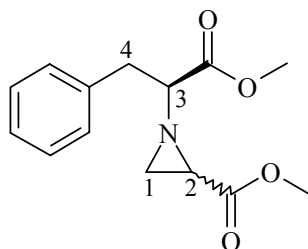
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 454.53; found: [MH]<sup>+</sup> 455.5.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.8 min, Reinheit: 93 %.

$[\alpha]_D^{26} = +21$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 40 %.

**8.10.18. 1-((S)-1-Methoxycarbonyl-2-phenyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.10a)**



**Methode A**, 4 h;

**Ansatz:** 8.05 g (27.6 mmol) Phenylalaninmethylester, 4.56 g (27.6 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 9.06 ml *N*-Methylmorpholin, 80 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.75 (10% Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3062, 3028, 2953 (s, CH<sub>2</sub>), 2847 (m, OCH<sub>3</sub>), 1736, 1672 (s, Ester), 1454 (m, CH<sub>2</sub>), 1350 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1200, 1175 (s, C-O), 748 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (41 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 1.66-1.72 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.01 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 2.45-2.49 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 2.78-2.83 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.15-3.11 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.58, 3.66 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 7.11 – 7.26 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 33.05 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.28 (<sup>2</sup>CH), 38.97 (CH<sub>2</sub>Ph), 52.01, 52.23 (OCH<sub>3</sub>), 73.07 (<sup>3</sup>CH), 125.84, 127.52, 128.27 (aromatisch), 136.32 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 169.22, 170.19 (C=O).



## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.66-1.72 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.15-2.18 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>CH), 2.45-2.49 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 2.78-2.83 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.15-3.11 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65, 3.67 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 7.11-7.26 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.49 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.38 (<sup>2</sup>CH), 41.00 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.09, 52.25 (OCH<sub>3</sub>), 73.30 (<sup>3</sup>CH), 126.85, 127.58, 129.28 (aromatisch), 137.15 (aromatisch, C<sub>q</sub>), 169.58, 174.27 (C=O).

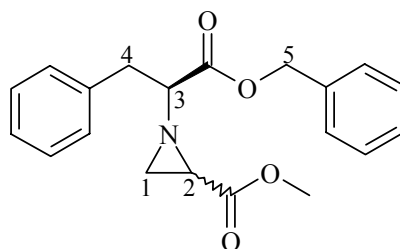
**LOOP-ESI-MS**: calcd. f. C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>, 263.30; found: [MH]<sup>+</sup> 264.3.

**LC-MS**: R<sub>t</sub> = 1.5 min, Reinheit: 98.2 %.

$[\alpha]_D^{26} = -13$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute**: 85 %.

**8.10.19. 1-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenyl-ethyl)-aziridin-2-carboxylsäuremethylester (4.10b)**



**Methode A**, 10 h;

**Ansatz:** 3.49 g (12 mmol) Phenylalaninbenzylester, 2 g (12 mmol) Methyl-2,3-dibromopropanoat, 4.2 ml *N*-Methylmorpholin, 60 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.39 (1:1 Cyclohexan/Ethylacetat).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3062, 3031, 2953 (s, CH<sub>2</sub>), 2860 (m, OCH<sub>3</sub>), 1734 (s, Ester), 1439 (m, CH<sub>2</sub>), 1382 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1197, 1173 (s, C-O), 746 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (9 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.19 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>I,A,2</sub> = 6.57 Hz), 1.68-1.73 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.00 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>I,B,2</sub> = 3.29 Hz), 2.48-2.53 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.01-3.24 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.57 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.04-5.11 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 7.08-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 33.05 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.22 (<sup>2</sup>CH), 38.83 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.09 (OCH<sub>3</sub>), 66.92 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 72.94 (<sup>3</sup>CH), 126.81, 128.38, 129.47 (CH, aromatisch), 135.37, 135.45 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.26, 170.72 (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.68-1.73 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 2.15-2.19 (m, 2 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub> und <sup>2</sup>CH), 2.48-2.53 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.01-3.24 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 3.56 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.04-5.11 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 7.08-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 34.47 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.45 (<sup>2</sup>CH), 38.87 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 52.29 (OCH<sub>3</sub>), 67.01 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 73.31 (<sup>3</sup>CH), 128.54, 128.56, 129.36 (CH, aromatisch), 136.94, 137.33 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.48, 170.55 (C=O).

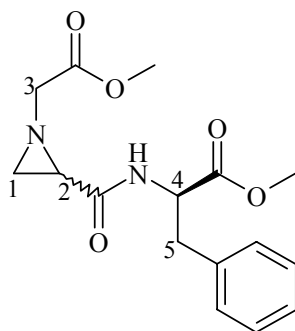
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, 339.39; found: [M+Na]<sup>+</sup> 362.4.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 13.2 min, Reinheit: 99.6 %.

$[\alpha]_D^{26} = -8$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

Ausbeute: 29 %.

**8.10.20. (R)-2-[(1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenylpropionsäuremethylester (9.1a)**



**Methode B**, 11.5 h;

**Ansatz:** 273.69 mg (2.18 mmol) Glycinmethylester, 684 mg (2.18 mmol) Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat, 477  $\mu$ l *N*-Methylmorpholin, 40 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.67 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2953, 2926 (s, CH<sub>2</sub>), 2853 (m, OCH<sub>3</sub>), 1737 (s, Ester), 1436 (m, CH<sub>2</sub>), 1358 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1206, 1176 (s, C-O), 746, 700 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (9 % de)

1. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.58 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.07 Hz), 1.73 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.29 Hz), 2.03 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.29, 7.07 Hz), 2.89-3.29 (m, 4 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65, 3.67 (m, je 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.72-4.80 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 5.79 (bs, 1 H, NH), 7.16-7.23 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.27 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.99 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 39.38 (<sup>2</sup>CH), 51.96, 52.48 (OCH<sub>3</sub>), 54.32 (<sup>4</sup>CH), 59.41 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 128.47, 129.26, 129.32 (CH, aromatisch), 135.98 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.32, 171.22, (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.64 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.08 Hz), 1.98 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.29 Hz), 2.07 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.29, 7.08 Hz), 2.89-3.29 (m, 4 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.66, 3.67 (s, je 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.72-4.80 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 5.79 (bs, 1 H, NH), 7.16-7.23 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.41 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.67, (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 39.45 (<sup>2</sup>CH), 52.02, 52.31, (OCH<sub>3</sub>), 52.68 (<sup>4</sup>CH), 59.41 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 128.53, 128.70, 129.21 CH, (aromatisch), 135.38 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.88, 171.70 (C=O).

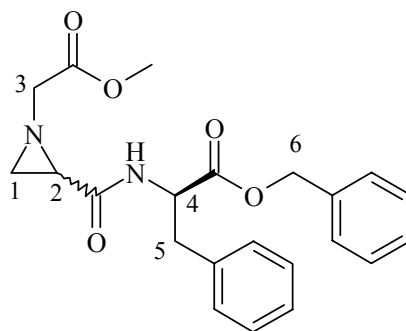
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 320.3; found: [MH]<sup>+</sup> 321.3.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.9, 2.4 min, Reinheit: 88.9 %.

$[\alpha]_D^{26} = +12$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 51 %.

**8.10.21. (R)-2-[(1-Methoxycarbonylmethyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (9.1b)**



**Methode B**, 4 h;

**Ansatz:** 214 mg (1.7 mmol) Glycinmethylester, 690 mg (1.7 mmol) Benzyl-2[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat, 372  $\mu$ l Triethylamin, 60 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>**: 0.59 (10 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2962, 2919 (s, CH<sub>2</sub>), 2849 (m, OCH<sub>3</sub>), 1736 (s, Ester), 1452 (m, CH<sub>2</sub>), 1349 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1204, 1174 (s, C-O), 741, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (0 % de)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.57-1.61 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.73 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.29 Hz), 2.03 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.29, 6.82 Hz), 2.83-3.29 (m, 4 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.77-4.85 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 5.00-5.14 (m, 2 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 5.97 (bs, 1 H, NH), 7.14-7.29 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 33.21 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.91 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 38.38 (<sup>2</sup>CH), 50.99 (OCH<sub>3</sub>), 53.20 (<sup>4</sup>CH), 58.40 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.07 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 125.98, 126.26, 127.43, 128.25, 128.31 (CH, aromatisch), 133.93 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 167.59, 169.60, 170.09 (C=O).

## 2. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.57-1.61 (m, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 1.92 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 2.06 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.28, 6.83 Hz), 2.83-3.29 (m, 4 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.77-4.85 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 5.00-5.14 (m, 2 H, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 5.97 (bs, 1 H, NH), 7.14-7.29 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 33.40 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 36.61 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 38.44 (<sup>2</sup>CH), 50.94 (OCH<sub>3</sub>), 51.49 (<sup>4</sup>CH), 58.40 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 66.46 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 125.98, 126.26, 127.43, 128.25, 128.31 (CH, aromatisch), 133.93 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 167.59, 169.60, 170.09 (C=O).

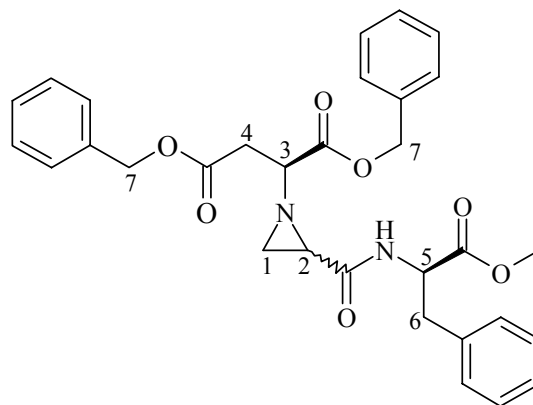
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 396.45; found: [MH]<sup>+</sup> 397.5.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.6 min, Reinheit: 93.1 %.

$[\alpha]_D^{26} = -14$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 26 %.

**8.10.22. (S)-2-[2-((R)-1-Methoxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-aziridin-1-yl]-bernsteinsäuredibenzylester (9.2)**



**Methode B**, 13 h;

**Ansatz:** 1.13 g (2.33 mmol) Asparaginsäuredibenzylester, 0.915 g (2.33 mmol) Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat, 2 ml Triethylamin, 60 ml Benzol;

**R<sub>f</sub>:** 0.75 (5 % Methanol in Chloroform).

IR:  $\tilde{\nu}$  = 3063, 3031 (m, CONH); 2952 (s, CH<sub>2</sub>), 1733 (s, Ester), 1452 (m, CH<sub>2</sub>), 1357 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1209, 1172 (s, C-O), 742, 697 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.67 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.33 Hz), 1.85 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.54 Hz), 2.33 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.54, 7.33 Hz), 2.67-3.11 (m, 5 H, <sup>3</sup>CH, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 3.57 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.65-4.70 (m, 1 H, <sup>5</sup>CH), 4.97-5.08 (m, 4 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 6.97 (bs, 1 H, NH), 7.00-7.31 (m, 15 H, aromatisch).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 36.86$  ( $^1\text{CH}_2$ ),  $37.13$  ( $^6\text{CH}_2$ ),  $37.85$  ( $^4\text{CH}_2$ ),  $39.16$  ( $^2\text{CH}$ ),  $52.32$  ( $\text{OCH}_3$ ),  $52.40$  ( $^5\text{CH}$ ),  $65.82$  ( $^3\text{CH}$ ),  $66.85$  ( $^7\text{CH}_2$ ),  $127.85$ ,  $128.35$ ,  $128.43$ ,  $128.49$ ,  $128.62$ ,  $128.72$ ,  $129.27$ ,  $129.31$  (CH, aromatisch),  $135.18$ ,  $135.42$ ,  $135.78$  ( $\text{C}_q$ , aromatisch),  $169.03$ ,  $170.06$ ,  $171.52$ ,  $171.63$  ( $\text{C}=\text{O}$ ).

## 2. Diastereomer

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 1.74$  (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^3J_{1A,2} = 3.28$  Hz),  $1.88$  (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^3J_{1B,2} = 7.07$  Hz),  $2.12$  (dd, 1 H,  $^2\text{CH}$ ,  $^3J_{2,1A/B} = 3.28, 7.07$  Hz),  $2.67$ - $3.11$  (m, 5 H,  $^3\text{CH}$ ,  $^4\text{CH}_2$ ,  $^6\text{CH}_2$ ),  $3.57$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ),  $4.65$ - $4.70$  (m, 1 H,  $^5\text{CH}$ ),  $4.97$ - $5.08$  (m, 4 H,  $^7\text{CH}_2$ ),  $6.97$  (bs, 1 H, NH),  $7.00$ - $7.31$  (m, 15H, aromatisch).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 33.85$  ( $^1\text{CH}_2$ ),  $37.13$  ( $^6\text{CH}_2$ ),  $37.85$  ( $^4\text{CH}_2$ ),  $38.55$  ( $^2\text{CH}$ ),  $52.15$  ( $\text{OCH}_3$ ),  $52.40$  ( $^5\text{CH}$ ),  $65.92$  ( $^3\text{CH}$ ),  $67.27$  ( $^7\text{CH}_2$ ),  $127.85$ ,  $128.35$ ,  $128.43$ ,  $128.49$ ,  $128.62$ ,  $128.72$ ,  $129.27$ ,  $129.31$  (CH, aromatisch),  $135.18$ ,  $135.42$ ,  $135.78$  ( $\text{C}_q$ , aromatisch),  $169.03$ ,  $170.06$ ,  $171.52$ ,  $171.63$  ( $\text{C}=\text{O}$ ).

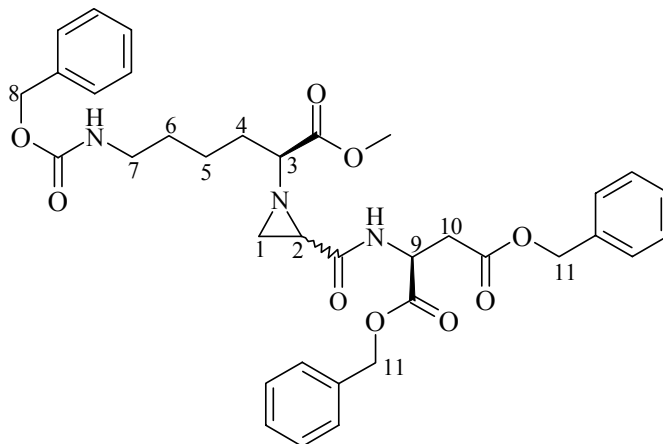
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f.  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$ , 544.61; found:  $[\text{MH}]^+$  545.5.

**LC-MS:**  $R_t = 1.9$ . 4.6 min, Reinheit: 94.9 %.

$[\alpha]_D^{26} = -33$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0.1$ ).

**Ausbeute:** 11 %.

**8.10.23. (S)-2-({1-[(S)-1-Methoxycarbonyl-5-((2E,4Z)-2-vinyl-hexa-2,4-dienyloxycar-bonylamino)-pentyl]-aziridin-2-carbonyl}-amino)-bernsteinsäuredibenzyl-ester (9.3)**



**Methode B**, 8 h;

**Ansatz:** 262 mg (0.8 mmol *N*-*Z*-Lysinmethylester, 357 mg (0.8 mmol) Dibenzyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]succinat, 672  $\mu$ l Triethylamin, 40 ml Benzol;

**R<sub>f</sub>:** 0.69 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3064, 3033 (m, CONH); 2950 (s, CH<sub>2</sub>), 2864 (m, OCH<sub>3</sub>), 1730 (s, Ester), 1454 (m, CH<sub>2</sub>), 1354 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1211, 1174 (s, C-O), 749, 696 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.30-1.47 (m, 4 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 1.57 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.83Hz), 1.67-1.75 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 1.91 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.03 Hz), 2.11 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.03, 6.83 Hz), 2.28-2.32 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 2.80-3.04 (m, 2 H, <sup>10</sup>CH<sub>2</sub>), 3.05-3.13 (m,

1 H,  $^7\text{CH}$ ), 3.54 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.75-4.82 (m, 1 H,  $^9\text{CH}$ ), 4.94-5.00 (m, 6 H,  $^8\text{CH}_2$ ,  $^{11}\text{CH}_2$ ), 7.14-7.30 (m, 15 H, aromatisch).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 22.75$  ( $^5\text{CH}$ ), 31.89 ( $^6\text{CH}_2$ ), 33.70 ( $^4\text{CH}_2$ ), 36.38 ( $^7\text{CH}_2$ ), 36.48 ( $^1\text{CH}_2$ ), 38.54 ( $^2\text{CH}$ ), 40.85 ( $^{10}\text{CH}_2$ ), 48.15 ( $^9\text{CH}$ ), 52.09 ( $\text{OCH}_3$ ), 66.52, 66.54, 67.67 ( $^8\text{CH}_2$ ,  $^{11}\text{CH}_2$ ), 70.09 ( $^3\text{CH}$ ), 128.10, 128.17, 128.27, 128.44, 128.48, 128.52 (CH, aromatisch), 135.21, 135.42, 136.65 ( $\text{C}_q$ , aromatisch), 156.42, 169.61, 170.40, 171.91 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

## 2. Diastereomer

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 1.30$ -1.47 (m, 4 H,  $^5\text{CH}_2$ ,  $^6\text{CH}_2$ ), 1.67-1.75 (m, 3 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^4\text{CH}_2$ ), 1.89 (d, 1 H,  $^1\text{CH}_2$ ,  $^3J_{1B,2} = 3.03$  Hz), 2.05 (dd, 1 H,  $^2\text{CH}$ ,  $^3J_{2,1A/B} = 3.03$ , 7.07 Hz), 2.28-2.32 (m, 1 H,  $^3\text{CH}$ ), 2.80-3.04 (m, 2 H,  $^{10}\text{CH}_2$ ), 3.05-3.13 (m, 2 H,  $^7\text{CH}_2$ ), 3.54 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.75-4.82 (m, 1 H,  $^9\text{CH}$ ), 4.94-5.00 (m, 6 H,  $^8\text{CH}_2$ ,  $^{11}\text{CH}_2$ ), 7.14-7.30 (m, 15 H, aromatisch).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 22.75$  ( $^5\text{CH}$ ), 31.89 ( $^6\text{CH}_2$ ), 33.70 ( $^4\text{CH}_2$ ), 36.38 ( $^7\text{CH}_2$ ), 36.48 ( $^1\text{CH}_2$ ), 38.54 ( $^2\text{CH}$ ), 40.85 ( $^{10}\text{CH}_2$ ), 48.05 ( $^9\text{CH}$ ), 51.96 ( $\text{OCH}_3$ ), 66.52, 66.54, 67.67 ( $^8\text{CH}_2$ ,  $^{11}\text{CH}_2$ ), 69.88 ( $^3\text{CH}$ ), 128.10, 128.17, 128.27, 128.44, 128.48, 128.52 (CH, aromatisch), 135.21, 135.42, 136.65 ( $\text{C}_q$ , aromatisch), 156.42, 169.61, 170.40, 171.91 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

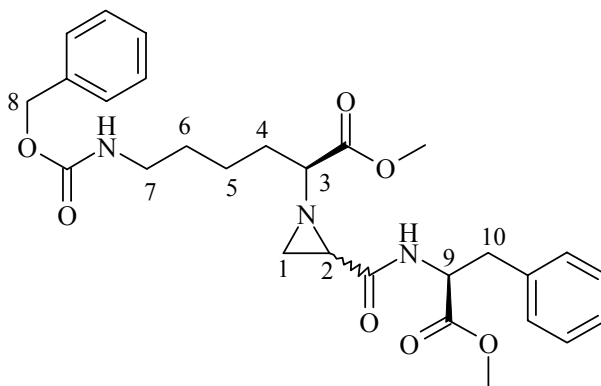
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f.  $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_9$ , 675.79; found:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  699.6.

**LC-MS:**  $R_t = 1.3, 1.9$  min, Reinheit: 92.5 %.

$[\alpha]_D^{26} = +2$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0.1$ ).

**Ausbeute:** 17 %.

**8.10.24. (S)-6-Benzyloxycarbonylamino-2-[2-(1-methoxycarbonyl-2-phenyl-ethyl-carbamoyl)-aziridin-1-yl]-hexansäuremethylester (9.4)**



**Methode B**, 16 h;

**Ansatz:** 173 mg (0.524 mmol) *Nε-Z*-Lysinmethylester, 206 mg (0.524 mmol) Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-phenylpropanoat, 440 µl Triethylamin, 30 ml Methanol;

**R<sub>f</sub>:** 0.6 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 2951 (s, CH<sub>2</sub>), 2863 (m, OCH<sub>3</sub>), 1736 (s, Ester), 1437 (m, CH<sub>2</sub>), 1355 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1214, 1177 (s, C-O), 742, 699 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.18-1.47 (m, 4 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 1.57 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>3A,2</sub> = 7.08 Hz), 1.65-1.76 (m, 2 H, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 1.91 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.03 Hz), 2.13 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.03, 7.08 Hz), 2.27 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.01-3.11 (m, 4 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>10</sup>CH<sub>2</sub>), 3.52, 3.58 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.68-4.81 (m, 1 H, <sup>9</sup>CH), 5.02 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.17 (bs, 1 H, NH), 6.97-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 22.64 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 31.95 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 33.92 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 37.67 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.81 (<sup>10</sup>CH<sub>2</sub>), 38.60 (<sup>2</sup>CH), 40.78 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 51.99, 52.43 (OCH<sub>3</sub>), 59.23 (<sup>9</sup>CH), 66.63 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 70.01 (<sup>3</sup>CH), 127.08, 128.11, 129.36 (CH, aromatisch), 135.87, 136.76 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 156.41, 169.37, 171.22, 172.16 (C=O).

## 2. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.18-1.47 (m, 4 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 1.65-1.76 (m, 3 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 1.78 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 1.97-1.99 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.27 (m, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.01-3.11 (m, 4 H, <sup>7</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>10</sup>CH<sub>2</sub>), 3.57, 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.68-4.81 (m, 1 H, <sup>9</sup>CH), 5.00 (s, 2 H, <sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 5.17 (bs, 1 H, NH), 6.97-7.28 (m, 10 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 22.51 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 31.86 (<sup>6</sup>CH<sub>2</sub>), 34.85 (<sup>4</sup>CH<sub>2</sub>), 37.93 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.66 (<sup>10</sup>CH<sub>2</sub>), 38.60 (<sup>2</sup>CH), 40.70 (<sup>7</sup>CH<sub>2</sub>), 52.07, 52.20 (OCH<sub>3</sub>), 59.23 (<sup>9</sup>CH), 66.56 (<sup>8</sup>CH<sub>2</sub>), 70.01 (<sup>3</sup>CH), 128.49, 128.53, 129.11 (CH, aromatisch), 135.91, 136.65 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 156.52, 169.51, 171.73, 171.84 (C=O).

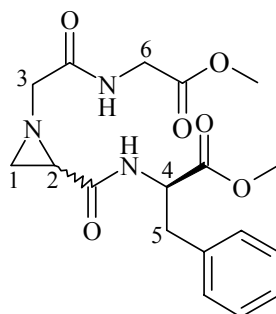
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 525.61; found: [MH]<sup>+</sup> 526.5.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.5, 1.9 min, Reinheit: 94.9 %.

$[\alpha]_D^{26} = +11$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 21 %.

**8.10.25. (R)-2-({1-[(Methoxycarbonylmethyl-carbamoyl)-methyl]-aziridin-2-carbo-nyl}-amino)-3-phenyl-propionsäuremethylester (9.5)**



**Methode B**, 5 h;

**Ansatz:** 1.04 g (2.63 mmol) Glycylglycinbenzylester, 1.33 g (2.63 mmol) Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat, 3.3 ml Triethylamin, 60 ml Methanol;  
→ Umesterung durch basische Bedingungen von Benzylestern zu Methylestern

**R<sub>f</sub>:** 0.24 (5 % Methanol in Chloroform).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (Diastereomeren-Verhältnis konnte nicht bestimmt werden)

1. Diastereomer

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3061, 3029 (m, CONH); 2962 (s, CH<sub>2</sub>), 2845 (m, OCH<sub>3</sub>), 1741 (s, Ester), 1436 (m, CH<sub>2</sub>), 1369 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1206, 1179 (s, C-O), 758, 700 (w, CH<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.52 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.57 Hz), 1.74 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.54 Hz), 1.98-2.02 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.87-3.10 (m, 6 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.61, 3.62 (OCH<sub>3</sub>), 4.68-4.78 (m, 1H, <sup>4</sup>CH), 6.98-7.21 (m, 5H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 34.27 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.99 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 39.74 (<sup>2</sup>CH), 51.26, 52.36 (OCH<sub>3</sub>), 53.22 (<sup>4</sup>CH), 60.26 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 125.92, 127.41, 129.32 (CH, aromatisch), 135.98 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.32, 171.22, (C=O).

## 2. Diastereomer:

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.53 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.08 Hz), 1.73 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.28 Hz), 1.98-2.02 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 2.87-3.10 (m, 6 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>6</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.57, 3.59 (OCH<sub>3</sub>), 4.68-4.78 (m, 1H, <sup>4</sup>CH), 6.98-7.21 (m, 5H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 36.48 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.13 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 39.81 (<sup>2</sup>CH), 51.47, 52.31 (OCH<sub>3</sub>), 54.32 (<sup>4</sup>CH), 60.55 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 126.40, 127.67, 129.26 (CH, aromatisch), 135.98 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.36, 170.92, (C=O).

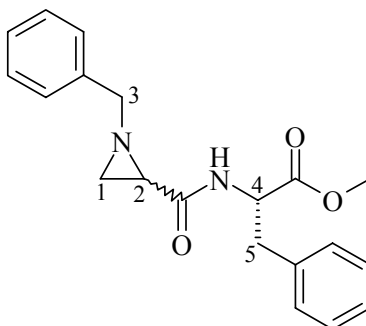
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, 377.40; found: [MH]<sup>+</sup> 378.4.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.4 min, Reinheit: 90.7 %.

$[\alpha]_D^{26} = -5$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1)

**Ausbeute:** 9 %.

**8.10.26. (S)-2-[(1-Benzyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester (9.6)**



**Methode A**, 2 h;

**Ansatz:** 454 mg (4.24 mmol) Benzylamin, 989 mg (4.24 mmol) Methyl-2[(2,3-dibromopropanoyl)amino]-3-phenylpropanoat, 600  $\mu$ l Triethylamin, 30 ml Chloroform;

**R<sub>f</sub>:** 0.69 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3061, 3029, 3005 (m, CONH); 2951 (s, CH<sub>2</sub>), 2845 (m, OCH<sub>3</sub>), 1741 (s, Ester), 1452 (m, CH<sub>2</sub>), 1349 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1202, 1177 (s, C-O), 740, 698 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (9 % de)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.60 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.07 Hz), 1.65 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.03 Hz), 2.11 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.03, 7.07 Hz), 2.91-3.10 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 3.25-3.67 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.70-4.76 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 6.90 (bs, 1 H, NH), 7.17-7.35 (m, 10H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 35.14 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.93 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 38.88 (<sup>2</sup>CH), 52.28 (OCH<sub>3</sub>), 52.39 (<sup>4</sup>CH), 62.79 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 127.10, 127.48, 127.86, 128.03, 128.45, 128.51, 129.18 (CH, aromatisch), 135.86, 137.88 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.11, 171.73 (C=O).



## 2. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 1.68 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.83 Hz), 1.93 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.04 Hz), 2.07 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.04, 6.83 Hz), 2.91-3.10 (m, 2 H, <sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 3.25-3.67 (m, 2 H, <sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.70-4.76 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 6.79 (bs, 1 H, NH), 7.17-7.35 (m, 10H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 35.21 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 37.89 (<sup>5</sup>CH<sub>2</sub>), 38.88 (<sup>2</sup>CH), 52.24 (OCH<sub>3</sub>), 52.32 (<sup>4</sup>CH), 62.79 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 127.10, 127.48, 127.86, 128.03, 128.45, 128.51, 129.18 (CH, aromatisch), 135.86, 137.88 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 170.11, 171.73 (C=O).

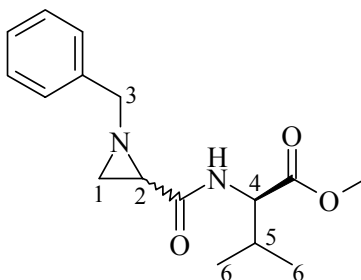
**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 338.41; found: [MH]<sup>+</sup> 339.4.

**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 1.4, 2.4 min, Reinheit: 97.5 %.

$[\alpha]_D^{26} = +13$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0.1).

**Ausbeute:** 16 %.

**8.10.27. (S)-2-[(1-Benzyl-aziridin-2-carbonyl)-amino]-3-methyl-butyräuremethyl-ester (9.7)**



**Methode A**, 5 h;

**Ansatz:** 93  $\mu$ l (0.85 mmol) Benzylamin, 256 mg (0.85 mmol) Methyl-2-[(2-bromoacryloyl)amino]-3-methylbutanoat, 119  $\mu$ l Triethylamin, 20 ml Dichlormethan;

**R<sub>f</sub>:** 0.26 (5 % Methanol in Chloroform).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  = 3063, 3030 (m, CONH); 2963 (s, CH<sub>2</sub>), 2876 (m, OCH<sub>3</sub>), 1739 (s, Ester), 1452 (m, CH<sub>2</sub>), 1355 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 1206, 1151 (s, C-O), 734, 698 (w, CH<sub>2</sub>).

→ die Diastereomere wurden nicht getrennt (44 % de)

1. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.75-0.92 (m, 6 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 1.73 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 6.82 Hz), 1.92 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 2.53 Hz), 2.02-2.11 (m, 1 H, <sup>5</sup>CH), 2.06-2.09 (m, 1 H, <sup>2</sup>CH), 3.21 (s, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.35-4.41 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 6.89 (bs, 1 H, NH), 7.19-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 17.50 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 18.95 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 30.93 (<sup>5</sup>CH), 35.15 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 38.98 (<sup>2</sup>CH), 52.04 (OCH<sub>3</sub>), 56.35 (<sup>4</sup>CH), 62.87 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 127.46, 127.93, 128.50 (CH, aromatisch), 136.26, 136.90 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.91, 171.53 (C=O).

## 2. Diastereomer

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 0.75-0.92 (m, 6 H, <sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 1.74 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1A,2</sub> = 7.07 Hz), 2.02 (d, 1 H, <sup>1</sup>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>1B,2</sub> = 3.03 Hz), 2.02-2.11 (m, 1 H, <sup>5</sup>CH), 2.13 (dd, 1 H, <sup>2</sup>CH, <sup>3</sup>J<sub>2,1A/B</sub> = 3.03, 7.07 Hz), 3.24 (s, 1 H, <sup>3</sup>CH), 3.63 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.35-4.41 (m, 1 H, <sup>4</sup>CH), 6.99 (bs, 1 H, NH), 7.19-7.28 (m, 5 H, aromatisch).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 17.69 (<sup>5</sup>CH<sub>3</sub>), 19.01 (<sup>6</sup>CH<sub>3</sub>), 31.27 (<sup>5</sup>CH), 35.48 (<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>), 39.12 (<sup>2</sup>CH), 52.08 (OCH<sub>3</sub>), 56.31 (<sup>4</sup>CH), 62.87 (<sup>3</sup>CH<sub>2</sub>), 127.46, 127.93, 128.50 (CH, aromatisch), 136.26, 136.90 (C<sub>q</sub>, aromatisch), 169.91, 171.53 (C=O).

**LOOP-ESI-MS:** calcd. f. C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 290.37; found: [MH]<sup>+</sup> 291.4.

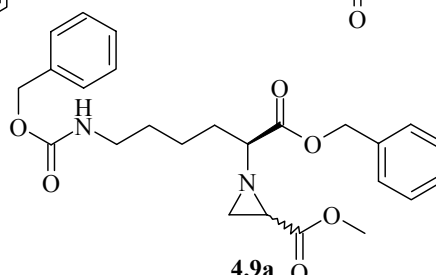
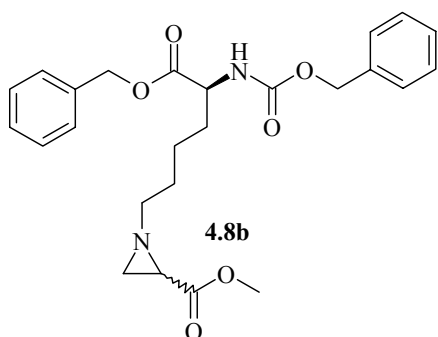
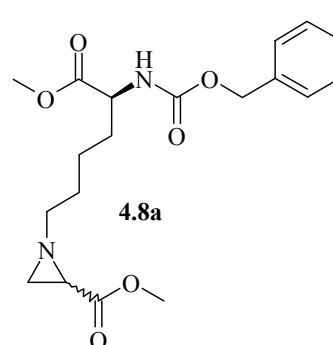
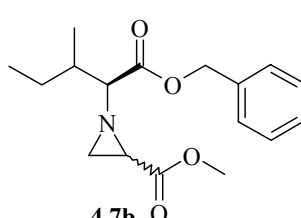
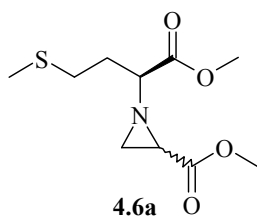
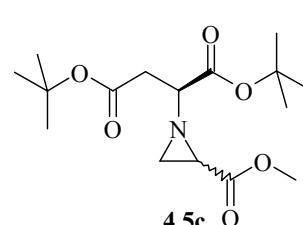
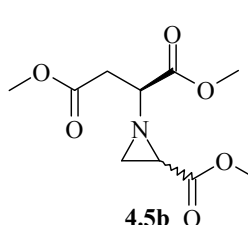
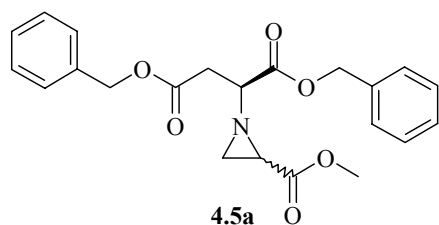
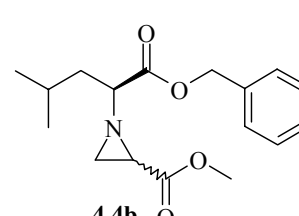
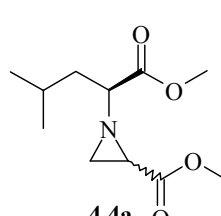
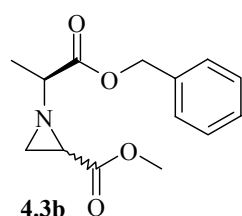
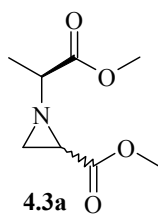
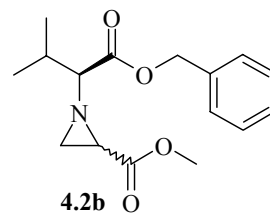
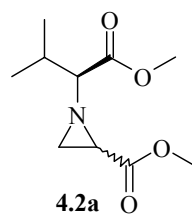
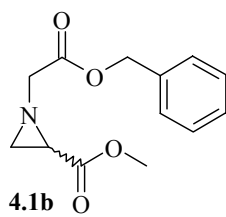
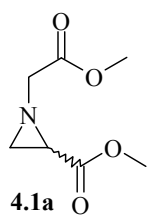
**LC-MS:** R<sub>t</sub> = 3.7 min, Reinheit: 91.2 %.

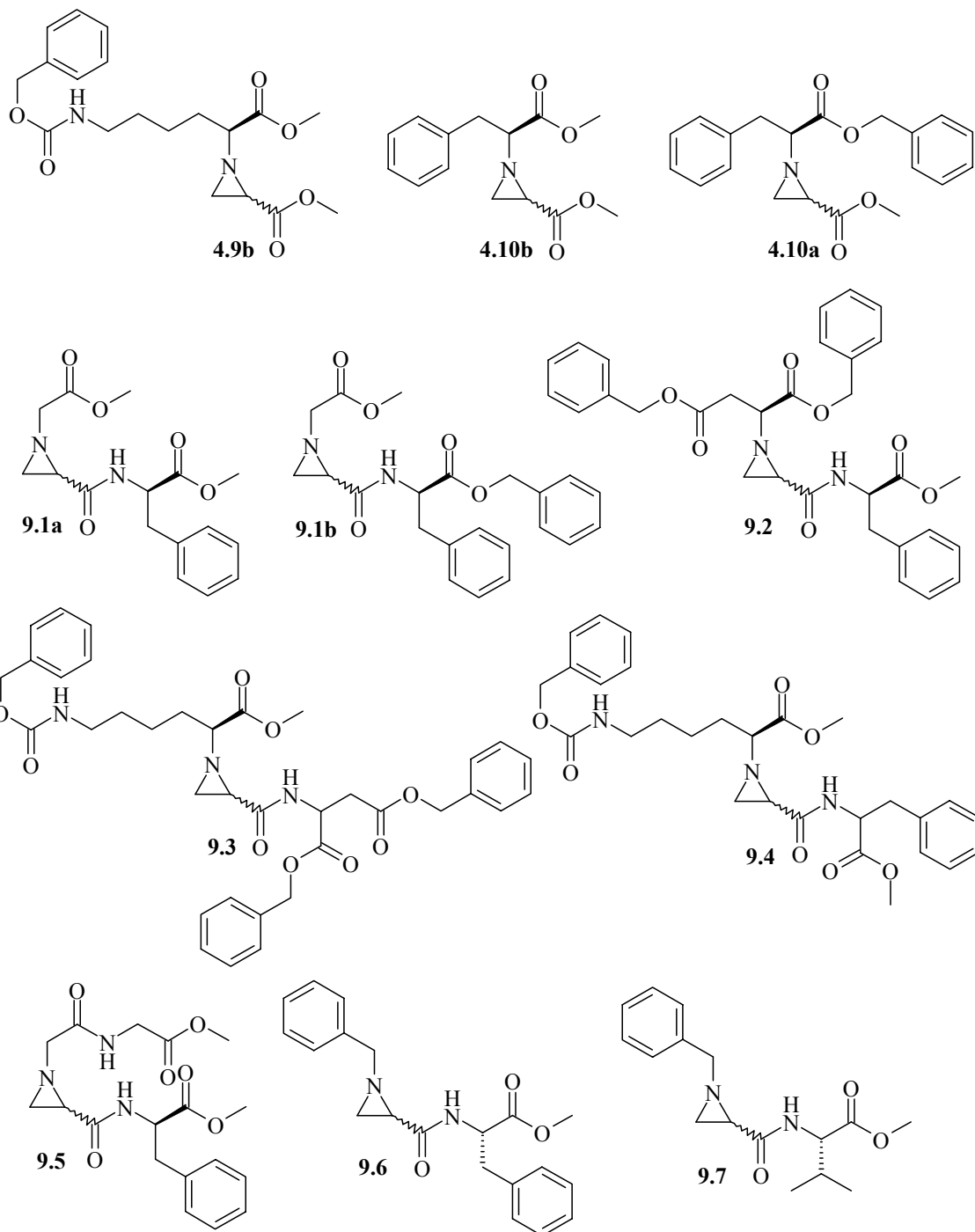
$[\alpha]_D^{26} = +5$  (CHCl<sub>3</sub>, 100mg in 100ml).

**Ausbeute:** 23 %.



## 9. Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen





## 10. Literaturverzeichnis

- (1) Drenth, J. *Biochemistry* **1979**, *15*, 3731-3738.
- (2) Rawlings, N. D., Barrett, A. J. *Biochemistry Journal* **1993**, *290*, 205-218.
- (3) Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A.J. *Nucleic Acid Research* **2004**, *32*, D160-D164.
- (4) DeClerck, Y. A., Imren, S., Montgomery, A. M., Mueller, B. M., Reisfeld, R. A., Laug, W. E. **1997**, *89*, 1260-1270.
- (5) Chambers, A. F., Matrisian, L. M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1260-1270.
- (6) Yan, S.-Q., Sameni, M., Sloane, B. F. *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 113-123.
- (7) Bernstein, H. G., Kirschke, H., Wiederanders, B. et al. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1996**, *27*, 225-247.
- (8) Kirschke, H., Barrett, A. J., Rawlings, N. D. *Protein Profile 2* **1995**, 1581-1643.
- (9) Cathers, B., Barrett, C., Palmer, J., Rydzewski, R. *Bioorganic Chemistry* **2002**, *30*, 264-275.
- (10) Yano, M., Hirai, K., Naito, Z. *Surg Today* **2001**, *31*, 385-389.
- (11) Wagrey, A., Keppler, D., Sloane, B. F., Schuger, L., Chen, Y. Q. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11533-11538.
- (12) Werle, B., Ebert, W., Klein, W., Spiess, E. *Anticancer Res.* **1994**, *14*, 1169-1174.
- (13) Schweiger, A., Staib, A., Werle, B. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 782-788.
- (14) Dolenc, I., Turk, B., Pungeric, G. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21626-21631.
- (15) Turk, B., Turk, V., Turk, D. *Biol. Chem.* **1997**, *378*.
- (16) Delaisse, J.-M., Engsig, M. T., Everts, V. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 223-224.
- (17) Hansen, T., Petrow, P. K., Gaumann, A. et al. *J. Rheumatol.* **2000**, *27*, 859-865.
- (18) Cazzub, J. J., Stoka, V., Turk, V. *Current Pharmaceutical Design* **2001**, *7*, 1143-1156.
- (19) Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E., Schneewind, O. *PNAS* **2000**, *97*, 5510-5515.
- (20) Sijwali, P. S., Kentaro, K., Seydel, K. B., et al. *PNAS* **2004**, *101*, 8721-8726.
- (21) Sijwali, P. S., Bhaskar, R., Gut, J., Rosenthal, P. J. *Biochem. J.* **2001**, 481-489.
- (22) Palakodeti, V., Mohammed, A., Kumar, A., Hossain, M., et al. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2005**, *336*, 1062-1068.
- (23) Lecaille, F., Kaleta, J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.
- (24) Schechter, I., Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1967**, *27*, 157-162.
- (25) Otto, H., Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.
- (26) Palmer, J. T., Rasnick, D., Klaus, J. L. In *Patent*; WO 9630353, 1996, pp 92 S.
- (27) Klaus, J. T., Rasnick, D., Palmer, J. T., Kuo, E. Y.-L. In *Patent*; WO 9640737, 1996, pp 79 S.
- (28) Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., James, K. E. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.
- (29) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M. et al. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523-528.
- (30) Barrett, A. J., Kembahvi, A. A., Brown, M. A., et al. *J. Biol. Chem.* **1982**, *201*, 198-210.
- (31) Fukushima, K., Arai, M., Kohno, Y. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *105*, 1-12.
- (32) Maekawa, Y., Himeno, K., Ishiwaka, H., et al. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2120-2132.
- (33) Schaschke, N., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Moroder, L. *FEBS Letters* **1998**, *421*, 80-96.
- (34) Katunuma, N., Murata, E., Kakegawa, H., et al. *FEBS Letters* **1999**, *458*, 6-10.
- (35) Leung-Toung, R., Li, W., Tam, T. F., Karimian, K. *Current Medicinal Chemistry* **2002**, *9*, 979-1002.
- (36) Nakao, Y., Fujita, M., Warabi, K., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*.

- (37) Vicik, R. *Dissertation*, 2004.
- (38) Gelhaus, C., Vicik, R., Hilgenfeld, R., Schmidt, C. L., Leippe, M., Schirmeister, T. *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 435-438.
- (39) Schirmeister, T., Kaeppler, U. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 361-373.
- (40) Davoli, P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1801-1812.
- (41) Harada, K., Nakamura, I. *J. C. S. Chem. Comm.* **1978**, 522-523.
- (42) De Shong, P., Kell, D. A., Sidler, D. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2309-2315.
- (43) Filigheddu, S. N. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 3857-3860.
- (44) Cardillo, G., Gentulucci, L., Tomasini, C., Castejon-Bordas, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 755-762.
- (45) Eremeev, A. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1982**, *18*, 1254-1257.
- (46) Filigheddu, S. N. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 6503-6506.
- (47) Kaiser, E. *Anal. Biochemistry* **1970**, *34*, 595.
- (48) Mahoney, J. M., Smith, C. R., Johnston, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1354-1355.
- (49) Kumar, H. M., Rao, M. S., Chakravarthy, P. P., Yadav, J. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 127-130.
- (50) Bongini, A., Cardillo, G., Gentulucci, L., Tomasini, C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9148-9150.
- (51) Cardillo, G., Gentulucci, L., Bastardes I. R., Tolomelli, A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8217-8222.
- (52) Dalla, V., Decroix, B. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 1657-1660.
- (53) Tranchant, M.-J., Vincent, D., Jabin, I., Decroix, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8425-8432.
- (54) Thompson, C. M., Frick, J. A., Green, D. L. *C. J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 111-115.
- (55) Häner, R., Olano, B., Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1676-1693.
- (56) Nakajima, K., Takai, F., Tanaka, T., Okawa, K. *Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1577-1578.
- (57) Korn, A., Rudolphbohner, S., Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, *50*.
- (58) Ugi, I., Schmid, T. *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 652-655.
- (59) Heasley, V., Spaite, D. W., Shellhammer, D. F. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2608-2611.
- (60) Moon, B., Han, S., Kim, D. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3359-3361.
- (61) Andersson, P., Guijarro, D., Tanner, D. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7364-7375.
- (62) Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1995.
- (63) Schirmeister, T. *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 1895-1899.
- (64) Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560-572.
- (65) Bisswanger, H. *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*; VCH: Weinheim, 1994.
- (66) Kitz, R., Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237.
- (67) Tian, W. X., Tsou, I. B. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- (68) Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- (69) Dahl, E. L., Rosenthal, P. J. *Molecular & Biochemical Parasitology* **2005**, *139*, 205-212.
- (70) Hide, G., Mottram, J. C., Coombs, G. H., Holmes, P. H. *CAB International* **1997**, 39-50.
- (71) Scory, S., Caffrey, C. R., Stierhof, Y.-D., Ruppel, A., Steverding, D. *Exp. Parasitol.* **1999**, *91*, 327-333.
- (72) Caffrey, C. R., Scory, S., Steverding, D. *Current Drug Targets* **2000**, *1*, 155-162.
- (73) Lonsdale-Eccles, J. D., Grab, D. *J. Eur. J. Biochem.* **1987**, *69*, 467-475.
- (74) Troeberg, L., Pike, R. N., Morty, R. E., Berry, R. K., Coetzer, T. H. T., Lonsdale-Eccles, J. D. *J. Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 728-736.
- (75) Pinitglang, S., Watts, A. B., Patel, M., Reid, J. D., Noble, M. A., et al. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9968-9982.



- (76) Caffrey, C. R., Hansell, E., Lucas, K., Brinen, L. E., et al. *Molecular & Biochemical Parasitology* **2001**, *118*, 61-73.
- (77) Martichonok, V., Plouffe, C., Storer, A. C., Ménard, R., Jones, J. B. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3078-3085.
- (78) Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., et al. *J. Virol.* **2005**, *79*, 884-895.
- (79) Yang, H., Xie, W., Xue, X., Yang, K., et al. *PLoS Biology* **2005**, *3*, 1742-1752.
- (80) Ziebuhr, J., Heusipp, G., Siddell, S.G. *J. Virol.* **1997**, *71*, 3992-3997.
- (81) Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S.G., Ziebuhr, J. *EMBO J.* **2002**, *21*, 3213-3224.
- (82) Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhvani, P., Mesters, J. R., Hilgenfeld, R. *Science* **2003**, *300*, 1763-1767.
- (83) Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 400-428.
- (84) Backman, D., Danielson, U. H. *Biochem. Biophys. Acta* **2003**, *1646*, 184-195.
- (85) Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B., Korting, H. C. *J. Med. Microbiol.* **2001**, *50*, 743-747.
- (86) Pichova, I., Pavlickova, L., Dostal, J., et al. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2669-2677.
- (87) Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Morschhäuser, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6102-6207.
- (88) Breman, J. G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *64*, 1-11.
- (89) Dominguez, J. N. *Curr. Trop. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1173-1185.
- (90) Trager, W., Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673-675.
- (91) Martina, E., Stiefl, N., Degel, B., Schulz, F., Breuning, A., Schiller, M., Vicik, R., Baumann, K., Ziebuhr, J., Schirmeister, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5365-5369.
- (92) Vicik, R., Busemann, M., Gelhaus, C., Stiefl, N., Scheiber, J., Schmitz, W., Schulz, F., Mladenovic, M., Engels, B., Leippe, M., Baumann, K., Schirmeister, T. *ChemMedChem* **2006**, *in revision*.
- (93) Käppler, U., Schirmeister, T. *Med. Chem.* **2005**, *1*, 361-370.
- (94) 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.
- (95) Bitar, Y., Degel, B., Schirmeister, T., Holzgrabe, U. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2313-2319.
- (96) Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3357-3363.
- (97) Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 175-183.
- (98) Caldera, P. S., Pavlickova, L., Dostal, J., et al. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2669-2677.
- (99) Sainz-Díaz, C. I. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 74-83.
- (100) Blaschke, G., Schwanghart, A.-D. *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 1967-1975.
- (101) Bentolila, A., Vlodarsky, I., Ishai-Michaeli, R., Kovalchuk, O., Haloun, C., Domb, A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2591-2600.
- (102) Bueno, M., Cativiela, C. A., Mayoral, J. A., Avenoza, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6551-6555.
- (103) Blaschke, G., Schwanghart, A.-D. *J. Pharm. Sciences* **1985**, *74*, 438-442.
- (104) Nonaka, T., Abe, S., Fuchigami, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 2778-2783.
- (105) Beria, I., Baraldi, P. G., Cozzi, P., Caldarelli, M., Geroni, C., Marchini, S., Mongelli, N., Romagnoli, R. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2611-2623.



## 11. Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

**Name:** Franziska Schulz, geb. Jenke  
**Geburtstag:** 16. Mai 1977  
**Geburtstort:** Hamburg  
**Familienstand:** verheiratet  
**Nationalität:** deutsch

### Schulausbildung:

**09/83 – 07/87** **Grundschule** Eichendorf- und Bonnerstrasse Hannover  
**09/87 – 06/89** **Orientierungsstufe** Birkenstrasse Hannover  
**09/89 – 06/96** **Humanistisches Ratsgymnasium** Hannover

### Freiwilliges soziales Jahr:

**08/96 – 09/96** **Ausbildung** zur Schwesternhelferin  
**08/96 – 09/97** **Schwesternhelferin** bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in der häuslichen Krankenpflege

### Studium:

**10/97 – 01/03** **Diplomstudiengang** der Fachrichtung **Chemie** an der bayerischen Julius-Maximillian-Universität Würzburg  
**10/99** **Vordiplom**-Prüfung  
**01/02** **Diplom**-Prüfung  
**04/02 - 01/03** **Diplomarbeit** am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der bayerischen Julius-Maximillian-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Schirmeister

**seit April 2003:** **Doktorarbeit** am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der bayerischen Julius-Maximillian-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Schirmeister

## 12. Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen:

**Aziridin-2,2-dicarboxylate als Cystein-Protease-Inhibitoren**, DPhG-Jahrestagung, Würzburg (2003)

**N-Substituted aziridine carboxylates as new building blocks for inhibitors of cysteine proteases**, PhD students symposium SFB630, Würzburg (2004)

**N-alkylierte Aziridin-carboxylate als neue Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten**, DPhG-Jahrestagung, Regensburg (2004)

**Synthese und Testung von N-substituierten Aziridin-carboxylaten als neue Inhibitoren gegen Cystein-Proteasen**, DPhG-Jahrestagung, Mainz (2005)

**Screening of electrophilic compounds as inhibitors of parasitic and viral cysteine proteases**, SFB630, internationale Tagung, Würzburg (2006)

**Effekt of aziridine-based protease inhibitors on *Plasmodium falciparum***, Gehlhaus C., Vicik R., Jenke F., Degel B., Fritsch J., Schirmeister T., 1<sup>st</sup> International Symposium, SFB630, Würzburg (2006)

### Publikationen:

**Raman spectroscopic study of spatial distribution of propolis in comb of *Apis mellifera carnica* (Pollm.)**. Strehle, M. A.; Jenke, F.; Froehlich, B.; Tautz, J.; Riederer, M.; Kiefer, W.; Popp, J., *Biopolymers* **2003**, 72(4), 217-224.

**Screening of electrophilic compounds yields an aziridinyl peptide as new active-site directed SARS-CoV main protease inhibitor**. Martina, E.; Stiefl, N.; Degel, B.; Schulz, F.; Breuning, A.; Schiller, M.; Vicik, R.; Baumann, K.; Ziebuhr, J.; Schirmeister, T., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15(24), 5365-9.

**Aziridide-Based Inhibitors of Cathepsin L: Synthesis, Inhibition Activity, and Docking Studies.** Vicik, R.; Busemann, M.; Gelhaus, C.; Stiefl, N.; Scheiber, J.; Schmitz, M.; Schulz, F.; Mladenovic, M.; Engels, B.; Leippe, M.; Baumann, K.; Schiremeister, T., *ChemMedChem* **2005**, angenommen.



**ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**SYNTHESE UND TESTUNG VON AZIRIDIN-2-CARBOXYLATEN ALS CYSTEIN-  
PROTEASE-INHIBITOREN**

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 .....

---

Franziska Schulz