

**Synthese und Testung von Aza-Peptiden als Cystein- und
Aspartat-Protease Inhibitoren sowie Kristallisation und
Elektronendichtebestimmung von Aziridin-, Epoxid- und
Michael-Akzeptor substituierten Bausteinen**



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Thomas Pfeuffer
aus Würzburg

Würzburg 2009

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation.

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: ..

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister von Juni 2005 bis Dber 2009 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Simon Grabowsky, Thomas Pfeuffer, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Wolfgang Morgenroth, Peter Luger, and Tanja Schirmeister. Electron-Density Determination of Electrophilic Building Blocks as Model Compounds for Protease Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 17, 2759-2768.

S. Grabowsky, T. Pfeuffer, W. Morgenroth, C. Paulmann, T. Schirmeister, P. Luger. A comparative study on the experimentally derived electron density of three protease inhibitor model compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2295-2307.

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Überlassung eines sehr attraktiven Themas in einem medizinisch-chemischen und physikalisch-chemischen Forschungsgebiet danken, in dem ich viele neue Dinge gelernt und angewendet habe. Ihr reges Interesse und viele anregende Diskussionen haben sehr zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Unterstützung danken:

Prof. Dr. Peter Luger und Simon Grabowsky, FU Berlin, für die Zusammenarbeit im Rahmen des SPP 1178 der DFG und ihrem riesigen Beitrag zu den Elektronendichte-Ergebnissen.

Prof. Dr. Caroline Kisker und Uwe Dietzel, Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg, für die Überlassung von Rhodesain und SARS-CoV-pl^{pro}

PD Dr. August Stich und Dr. Tobias Ölschläger, Teilprojekt Z1 des SFB630, Universität Würzburg, für die Testungen an Bakterien, Parasiten und Makrophagen.

Dr. Bernd Reyer und Dr. Curd Schollmeyer, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, danke ich für alle Dinge, die sie für mich erledigt haben.

Cornelia Heindl, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Durchführung der Enzym-Assays.

Dipl.-Chem. Alexander Breuning, Dipl.-Chem. Caroline Schad, Dr. Christian Büchold, Dr. Markus Schiller, Dr. Radim Vičák, Dipl.-Chem. Monika Herb und Dipl.-Chem. Verena Buback, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Messung der NMR-Spektren.

Mein weiterer Dank gilt meinen, über die Jahre sehr zahlreichen Kollegen (in alphabetischer Reihenfolge), Alexander „Alex“ Breuning, Armin „Arminho“ Welker, Dr. Birgit „Wolfsberger“ Vedder, Dr. Björn „Hirschkäfer“ Degel, Caroline „Goldfischchen“ Schad, Dr. Christian „Büchi“ Büchold, Constanze „RM“ Waltenberger, Cornelia „Conny“ Heindl, Ferdinand „Ferd“ Matz, Dr. Franziska „Franzi“ Schulz, Hongmei „Rote-Blume“ Wu, Magdalena „Maggienator“

Schneider, Dr. Markus „Schillerman“ Schiller, Martin „Geile Sau“ Stempka, Matthias „Valero-Lacatoni“ Rappold, Monika „Moni“ Herb, Paula „Columbo“ Tabares, Phillip „PhilvonSophie“ Fey, Qing „MMÄ-Öhrchen“ Ye, Dr. Radim „Marderschaden“ Vičík, Roswitha „Roswidda“ Scheblein, Swarna Oli, Thilo „Hip Hop“ Waag, Thomas „Tomesch“ Schneider, Dr. Ulrich „Uli“ Käßler und Verena „Verooney“ Buback, vor allem für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Eine bessere Truppe kann man sich nicht wünschen.

Des weiteren bedanke ich mich bei meinen F-Praktikanten und Wahlpflichtfächlern Benjamin Fimmel, Christina Leibrock, Claudia Kobelt, Marion Strasser, Martin Haas, Matthias Rappold, Silvia Ganghammer, Simon Vogel, Steven Holloway und Thilo Waag, die mir, im Gegensatz zu den unzähligen und deshalb nicht erwähnten Großversuchlern, nicht ganz so oft auf der Nase herumgetanzt sind.

Den Werkstätten, Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, den Bau spezieller Spezialanfertigungen und die netten Gespräche.

Meinen Mitstreitern im 1. Semester Dr. Birgit Vedder, Dr. Björn Degel, Dr. Endang Lukitaningsih, Dr. Josef Scheiber, Dr. Radim Vičík, Annette Albrecht, Carina Rikanovic, David Zilian, Georg Hiltensperger, Martin Sippel, Monika Herb, Monika Nocker und Tanja Beyer, gilt mein Dank für das „Durchziehen“ der Studentenbetreuung.

Allen weiteren Kollegen am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie aus den Arbeitskreisen Prof. Holzgrave, Prof. Högger und Prof. Sotriffer danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Zum Schluss grüße ich noch meine Handball-Kollegen und Freunde, die nie verstanden haben was ich da eigentlich mache, sowie alle, die mich kennen.

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGEN

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

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Cystein-Proteasen	2
1.1.1	Vorkommen, Funktion und Bedeutung von CPs	2
1.1.2	Aufbau, Struktur und Katalysemechanismus von CPs.....	5
1.1.3	Inhibitoren der CPs	8
1.2	Aspartat-Proteasen.....	14
1.2.1	Vorkommen, Funktion und Bedeutung von APs	14
1.2.2	Aufbau, Struktur und Katalysemechanismus von APs.....	15
1.2.3	Inhibitoren der APs.....	17
1.3	Azapeptide	22
1.4	Elektronendichtebestimmung.....	24
2.	ZIELSETZUNG	27
3.	SYNTHESEN	29
3.1	Synthese von Aziridin-Bausteinen	29
3.1.1	Synthese <i>cis</i> -konfigurierter Aziridin-Bausteine nach Cromwell.....	29
3.1.2	Synthese <i>trans</i> -konfigurierter Aziridin-Bausteine nach Staudinger.....	30
3.1.3	Synthese von Aziridin-Bausteinen mit DPSI	31
3.2	Synthese von Epoxidbausteinen.....	32
3.2.1	Synthese <i>trans</i> -konfigurierter Oxiran-2,3-dicarboxylate aus Tartraten	33
3.2.2	Synthese von Oxiran-2,2-dicarboxylaten aus Malonat	34
3.2.3	Synthese von Tetracyanoethylenoxid (TP04) aus Tetracyanoethylen.....	34
3.3	Synthese von Michael-Akzeptoren	35
3.4	Synthese verschiedener Aminosäure-Hydrazide.....	36
3.5	Peptidkupplungsreaktionen.....	38
3.5.1	Verschiedene Peptidkupplungsverfahren	38
3.5.2	Aminosäure-verknüpfte Aziridine	40
3.5.3	Aminosäure verknüpfte Epoxide	42
3.5.4	Aminosäure verknüpfte Michael-Systeme.....	44
4.	ENZYM-ASSAYS	50
4.1	Einführung.....	50

4.2	Charakterisierung irreversibler Hemmung	51
4.3	Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou ^[132]	51
4.4	Charakterisierung reversibler Hemmung	54
4.5	Durchführung der fluorimetrischen Assays	55
4.6	Ergebnisse des Screenings	57
4.7	Ergebnisse der Verdünnungsreihen	61
4.7.1	Bestimmung des IC_{50} und K_i reversibler Inhibitoren	61
4.7.2	Bestimmung von k_i , K_i und k_{2nd} bei irreversiblen Inhibitoren	65
5.	BIOLOGISCHE TESTUNGEN	68
5.1	Antibakterielle und antifungale Aktivität	68
5.2	Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizitätstests	69
6.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN .	71
6.1	Enzymselektivität	72
6.1.1	Aspartat- vs. Cysteinproteasen	72
6.1.2	SAP2 vs. CD	72
6.1.3	FP vs. RD; CB vs. CL; Cathepsine vs. parasitäre Proteasen	73
6.2	Einfluss des nucleophilen Bausteins.....	74
6.3	Einfluss der Aminosäuren	76
6.3.1	Einfluss des Alkylrestes der Aminosäuren	76
6.3.2	Einfluss der Schutzgruppe am terminalen Ende der Aminosäure.....	79
6.4	Einfluss der Stereochemie	81
6.4.1	Einfluss der Konfiguration am Dreiring.....	81
6.4.2	Einfluss der Konfiguration der Aminosäure.....	82
6.4.3	Einfluss der <i>Z</i> - / <i>E</i> -Konfiguration bei Olefinen	84
6.5	Aza- vs. Nicht-Aza-Aminosäuren	84
6.6	Einfluss der Aminosäurerester	87
6.7	Aktivität gegen <i>Trypanosoma brucei brucei</i> und <i>Leishmania major</i>	88
6.8	Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehung	89
7.	ERGEBNISSE DER ELEKTRONENDICHTEBESTIMMUNG UND DER MODELLREAKTIONEN.....	90
7.1	Kristallisation und Elektronendichtebestimmung	90
7.2	Modell Reaktionen mit Schwefel-, Stickstoff-, und Sauerstoff-Nucleophilen	95
8.	ZUSAMMENFASSUNG	97
9.	SUMMARY	102

II. EXPERIMENTELLER TEIL	107
10. ALLGEMEINE ANGABEN	107
10.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden	107
10.2 Enzymassays.....	109
10.3 Enzyme, Substrate und Reagenzien	112
10.4 Arbeitsmethoden.....	113
11. ALLGEMEINE SYNTHETISCHE METHODEN	114
11.1 Aziridinsynthesen.....	114
11.2 Epoxidsynthesen.....	115
11.3 Olefinsynthesen	116
11.4 Peptidkupplungen	116
11.4.1 Kupplung mit DCC/HOBT	116
11.4.2 Kupplung mit DCC	117
11.4.3 Kupplung mit Thionylchlorid.....	117
11.4.4 Kupplung mit PPA.....	118
11.4.5 Kupplung mit IBCF	119
11.4.6 Kupplung mit DPPA	119
11.4.7 Kupplung von Aminosäuren an Maleinsäureanhydrid.....	120
11.5 Hydrazidsynthesen	120
11.6 Hydrolysen	121
11.6.1 Hydrolysen mit Lithiumhydroxid	121
11.6.2 Hydrolysen mit Kaliumhydroxid.....	122
11.7 Schutzgruppen.....	122
11.8 Bromierungen	123
12. SYNTHETISIERTE VERBINDUNGEN	124
12.1 Aziridinbausteine.....	124
12.2 Epoxidbausteine	129
12.3 Olefinbausteine	133
12.4 Aminosäurederivate	135
12.5 AS-verknüpfte Aziridine	152
12.6 AS-verknüpfte Epoxide	156
12.7 AS-verknüpfte Olefine.....	174
12.8 Sonstige Vorstufen.....	197
12.9 Allgemeine Prozedur der Testreaktionen mit Schwefel, Stickstoff- und Sauerstoffnucleophilen:	210

13. ÜBERSICHT DER SYNTHETISIERTEN UND GETESTETEN VERBINDUNGEN	213
14. LITERATURVERZEICHNIS	217
15. VERÖFFENTLICHUNGEN.....	226

I. Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Infektionskrankheiten wie Malaria, SARS oder HIV fordern laut einer Studie der WHO jährlich fast 15 Millionen Todesopfer.^[1] Verursacht durch pathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze können diese Krankheiten direkt oder indirekt sowohl von Menschen als auch von Tieren übertragen werden.

Proteasen, die als Peptid-hydrolysierende Enzyme essentielle Rollen im Krankheitsverlauf spielen können, gehören zu den wichtigen Zielstrukturen in der Wirkstoffentwicklung. Dabei gehört es zu den großen Herausforderungen, die komplexen Vorgänge zwischen den Ziel-Enzymen und den Arzneistoffen zu verstehen.

Ein neuartiger Ansatz dabei ist es, mit Hilfe von ultra-hochauflösender Röntgenstrukturanalyse bei ultra-niedrigen Temperaturen die Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu quantifizieren und mit den biologischen Aktivitäten, den Inhibitions-Mechanismen und der chemischen Reaktivität zu vergleichen und zu korrelieren. Gleichzeitig ist es wichtig, neben einer hohen Wirksamkeit auch eine hohe Selektivität und Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes zu gewährleisten. Dazu gehört beispielsweise eine gute Hydrolysebeständigkeit des Wirkstoffs, um einen enzymatischen Abbau zu verhindern.

Die Hydrolasen, welche für die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen verantwortlich sind, bezeichnet man als die sogenannten Proteasen (EC 3.4). Je nach dem Ort der Spaltstelle unterteilt man die Proteasen in zwei Gruppen. Die Exopeptidasen (EC 3.4.11-19) hydrolisieren ein Peptid an der terminalen Aminosäure des N- oder C-Endes, die Endopeptidasen (EC 3.4.21-99) spalten den Strang dazwischen.^[2]

Eine weitere Unterteilung findet anhand der reaktiven Gruppen im katalytischen Zentrum des Enzyms statt. So werden die Proteasen in Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 3.4.22), Aspartat- (EC 3.4.23), Metallo- (EC 3.4.24) und Threonin-Proteasen (EC 3.4.25) gegliedert.^[3] Glutamat-Proteasen^[4] wurden erst vor kurzem zur MEROPS-Datenbank für Proteasen hinzugefügt.

Weiterhin teilt die MEROPS-Datenbank^[5] die verschiedenen Proteasentypen aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen in sog. Familien ein, die wiederum zu Clans zusammengefasst werden. Proteine eines Clans sind genetisch verwandt und haben sich aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein entwickelt. Eine evolutionäre Verbindung leitet sich aus einer ähnlichen Tertiärstruktur oder vergleichbaren Aminosäuresequenzen um

das katalytische Zentrum ab. Weitere Informationen zu allen bekannten Proteasen finden sich unter <http://merops.sanger.ac.uk>.

1.1 Cystein-Proteasen

Die insgesamt zehn Clans der Cystein-Proteasen enthalten zusammen 88 (C1-C88) Subfamilien.^[6] Zu den Clans gehören der Papain-Clan (Clan CA), Caspase-Clan (Clan CD), Adenain-Clan (Clan CE), Clan der Pyroglutamyl-Peptidase I (Clan CF), Clan des Stachelschwein Proteins (Clan CH), Sortase-Clan (Clan CL), CM-Clan (ClanCM), CN-Clan (Clan CN), CO-Clan (Clan CO) und C-Clan (Clan C-). Dem Papain Clan (Clan-CA) gehören die meisten bisher gefundenen Cystein-Proteasen an. Dieser enthält Vertreter wie Papain, Cruzipain, Falcipaine 1-3, Rhodesain sowie die Cathepsine B, L, S, K, P, Q und W. Im Clan CD sind die Caspasen 1-14 und das ICE (interleukin 1 β converting enzyme) einordnet. Weitere wichtige Mitglieder des CL-Clans sind die Sortase bzw. im PA-Clan (ein Clan mit einem gemischten Katalysemechanismus) die SARS-CoV-M^{pro} (severe acute respiratory syndrom coronavirus main protease).

1.1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von CPs

Cystein Proteasen sind weit verbreitete Enzyme in vielen Organismen und kommen in Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Tieren und Viren vor (vgl. Tabelle 1-1). Die CPs sind in diesen Organismen für zahlreiche essentielle physiologische und pathologische Prozesse wie Verdauung, Fortpflanzung, Wachstum, Differenzierung, Signalübertragung, Immunabwehr, Wundheilung und Apoptose verantwortlich. Zu den humanen lysosomalen Cystein-Proteasen gehören die Cathepsine: Cathepsin B, C, O, X, L, V, K, S, W, F und H.^[7]

Eine Überexpression von Cathepsinen oder eine Veränderung des pH-Wertes der Umgebung (4.5-6.5) führt durch ein Ungleichgewicht zwischen den Cystein-Proteasen und ihren natürlichen Regulatoren (Cystatine, Kininogene) zu unerwünschtem Abbau verschiedener sowohl intrazellulärer als auch extrazellulärer Proteine und somit zu verschiedenen Krankheitsbildern wie beispielsweise Krebs^[8], Alzheimer oder rheumatoide Arthritis (vgl. Tabelle 1-2).

Tabelle 1-1: Vorkommen der Cystein-Protease Clans in verschiedenen Organismen.

Clan	Bakterien	Archaea	Protozoen	Pilze	Pflanzen	Tiere	Viren
CA	+	+	+	+	+	+	+
CD	+	+	+	+	+	+	+
CE	+	-	+	+	+	+	+
CF	+	+	+	+	+	+	-
CH	-	-	-	-	-	+	-
CL	+	+	-	-	-	-	-
CM	-	-	-	-	-	-	+
CN	-	-	-	-	-	-	+
CO	+	+	+	+	+	+	+
C-	+	-	-	-	-	+	+

Tabelle 1-2: Physiologische und pathologische Bedeutung einiger CPs.^[7, 9, 10]

<i>Humane Cathepsine</i>			
Physiologische Funktion	Beteiligte Enzyme	Erkrankung bei Überexpression	Mechanismus
Hormon-Reifung	CB, CL	Hypertensie?, Diabetes?	Prozessierung von Prohormonen
Haut-Homeostase	CL	Epidermale Hyperplasie, Haarverlust	Metabolismus der Haut-Zellen
Antigen-Präsentation	CV, CL, CS, CF	Autoimmun- erkrankungen, Asthma, Entzündungen	Freisetzung des MHC (major histo- compatibility complex) und Antigen- Präsentation
Protein-Abbau und - Recycling	CB, CL, CH	Muskuläre Dystrophie, Arteriosklerose, Krebs	Zerstörung der extrazellulären Matrix
Proenzym-Aktivierung	CC, CB	Pankreatitis	Frühzeitige Aktivierung pankreatischer Enzyme
Apoptosis	Calpaine, Caspasen	Schlaganfall, Hirntrauma, Alzheimer? Katarakt Herzinfarkt	Protein-Abbau in neuronalen Zellen Abbau von Proteinen der Augenlinse Abbau der Proteine der Myofibrillen

Resorption und Remodelling von Knochengewebe	CK	Osteoporose	Demineralisation und Abbau von Kollagen im Knochengewebe
Reparatur und Remodelling des Knorpels	CL, B, S, K	Rheumatoide Arthritis	Zerstörung von Knorpelgewebe durch Kollagen-Abbau

Tabelle 1-3: Beteiligung verschiedener Cystein-Proteasen an parasitären Krankheiten.^[7]

<i>Parasitäre Enzyme</i>		
<i>Protozoa</i>		
<i>Plasmodium falc.</i>	Falcipain 1, 2, 3	Malaria
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipain	Chagas-Krankheit
<i>T. brucei rhodesiense</i> + <i>gambiense</i>	Rhodesain, Brucipain, Congopain	Schlafkrankheit
<i>Leishmania sp.</i>	CL-Like: Typ I, II; CB-Like: Typ III	Leishmaniasis
<i>Giardia lamblia</i>	9 CPs: 3 CB-Like (ohne occluding loop)	Giardiasis
<i>Trichomonas vaginalis</i>	23 CPs	Trichomoniasis
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebapain, Histolysin (CL) 23 CPs, CB- und CL-Like	Amoebiasis
<i>Platyhelminthes</i>		
<i>Schistosoma sp.</i>	SmCL1, SmCL2 (CL-Like), Sm31 (CB-Like)	Bilharziosis
<i>Fasciola sp.</i>	FheCL1, FheCL2 (CL)	Befall der Leber
<i>Nematodes</i>		
<i>Ascaris sp.</i>	viele CB-Like, CL-Like selten	Befall mit Rundwürmern
<i>Toxocara</i>	CL-Like: TcCP1	Toxokariasis
<i>Haemonchus</i>	CB-Like	

Im Gegensatz zu den humanen sind parasitäre Cystein-Proteasen auch im neutralen bis schwach alkalischen Milieu noch aktiv. Dadurch ist es ihnen möglich, sich an extrazellulären Prozessen wie z.B. der Invasion oder Verbreitung des Parasiten im Wirtorganismus zu beteiligen. Dementsprechend sind parasitäre Cystein-Proteasen für viele entscheidende Schritte im Verlauf von Infektionskrankheiten wie z.B. Malaria^[11] verantwortlich. Eine Übersicht über die Beteiligung verschiedener Cystein-Proteasen an Infektionskrankheiten ist in Tabelle 1-3 zusammengestellt.

Durch die Beteiligung an diversen Prozessen im Verlauf verschiedenster Krankheiten stellen Cystein-Proteasen potentielle wichtige Targets bei der Entwicklung von neuen Medikamenten dar.

1.1.2 Aufbau, Struktur und Katalysemechanismus von CPs

Alle Vertreter der Papain-Familie weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf. Die Peptidkette ist in zwei Domänen gefaltet, zwischen denen sich die Spalte mit dem aktiven Zentrum erstreckt. In der sog. L-Domäne befindet sich der an der Hydrolyse beteiligte Cys-Rest, in der R-Domäne die dazugehörige His-Funktion.^[10] Die meisten Proteasen der Subfamilie C1 liegen als Monomer vor und besitzen eine hochkonservierte Faltung.



Abb. 1-4: Struktur von Cathepsin L (PDB-Code: 1icf^[12, 13], generiert mit PyMOL^[14]).

Bei Cathepsin L (vgl. Abb. 1-4) sind die Aminosäuren Cys²⁵ und His¹⁶³ im katalytischen Zentrum lokalisiert. Das Asn¹⁸⁷ gehört mit zur katalytischen Triade und dient zur Orientierung des His¹⁶³ in Richtung des Cys²⁵.^[7]

Die Benennung der verschiedenen Taschen im aktiven Zentrum eines Enzyms erfolgt nach der Schechter- und Berger-Nomenklatur.^[15]

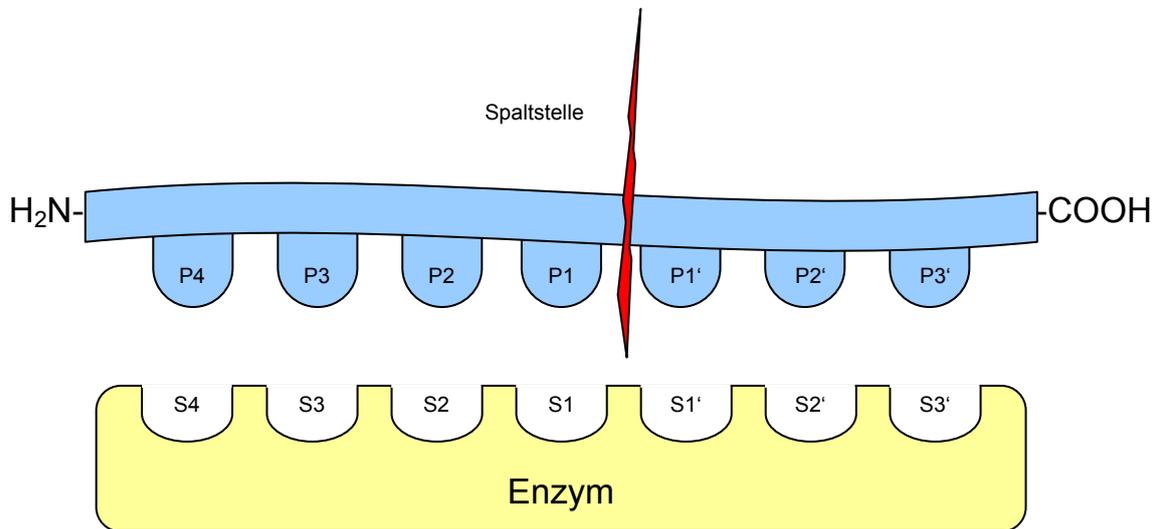
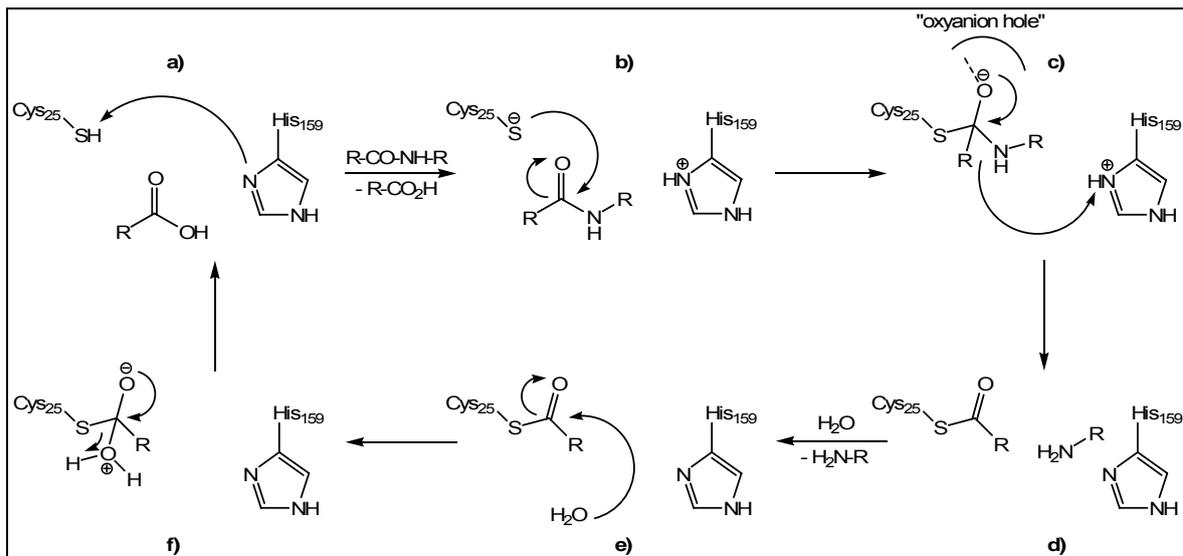


Abb. 1-5: Terminologie nach Schechter und Berger

Ausgehend von der Spaltstelle in Richtung des N-Terminus bezeichnet man die Taschen als S1-Sn, in Richtung des C-Terminus als S1'-Sn'. Die entsprechenden Aminosäuren des gebundenen Substrats gibt man mit P1-Pn bzw. P1'-Pn' an (vgl. Abb. 1-5).

Eine Übersicht des Hydrolysemechanismus^[16, 17] ist am Beispiel von Papain^[10] in Schema 1-6 dargestellt. Cys²⁵ bildet durch Protonentransfer zusammen mit His¹⁵⁹ ein Thiolat/Imidazolium-Ionenpaar (vgl. 1-6 **a**). Das entstandene Thiolat besitzt die nötige Nucleophilie für den Angriff auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung (vgl. 1-6 **b**). Das intermediäre Oxyanion wird über Wasserstoffbrücken (z.B. Gln¹⁹) im sog. „oxyanion hole“ stabilisiert. Dann finden die Acylierung des Enzyms und eine Protonierung des abgespaltenen Amins durch den Imidazolium-Rest statt (vgl. 1-6 **c**) und **d**). Schließlich erfolgt die Hydrolyse (vgl. 1-6 **e**) und **f**) des Thioesters und somit die Regeneration des aktiven Zentrums.



Schema 1-6: Katalytischer Hydrolysemechanismus von Papain.

Eine Besonderheit innerhalb der Cystein-Proteasen nehmen die Cathepsin-B-ähnlichen Enzyme ein. Sie besitzen neben ihrer Endo-Peptidasefunktion zusätzlich eine Exo-Peptidasefunktion durch den sog. „occluding loop“ (vgl. Abb. 1-7).

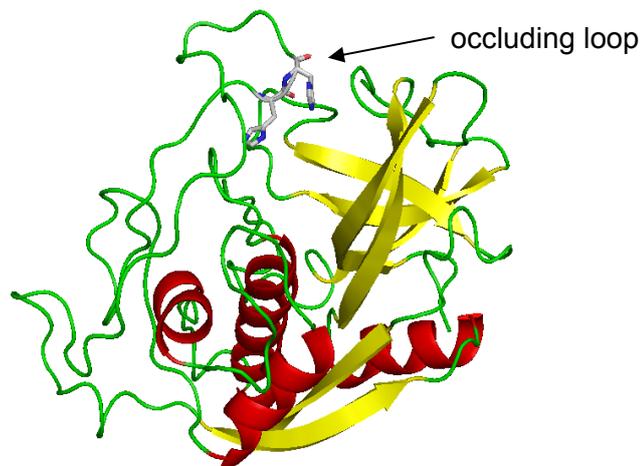


Abb. 1-7: Struktur von Cathepsin B (PDB-Code: 1cpj^[18], generiert mit PyMOL^[14]).

Diese Schleife bindet selektiv durch zwei Histidin-Reste (His¹¹⁰ und His¹¹¹) ein Substrat mit einem C-terminalen Carboxylat, dadurch kann die Peptidbindung nach der zweiten Aminosäure hydrolysiert werden.^[19]

1.1.3 Inhibitoren der CPs

Prinzipiell folgt das Design eines neuen, irreversiblen Inhibitors immer dem gleichen Konzept. Man orientiert sich an einem guten Substrat und kuppelt daran einen „warhead“, eine nucleophile Kopfgruppe. Als „warhead“ kommen alkylierende (z.B. Fluoromethylketone, Chloromethylketone, Acyloxymethylketone, Epoxide, Aziridine, Vinylsulfone und andere Michael-Akzeptoren), acylierende (z.B. β -Lactame, Lactone, Aza-Peptide und eine Reihe von heterocyclischen Derivaten), phosphorylierende (z.B. Peptidphosphonate and Phosphonylfluoride) und sulfonylierende (z.B. Sulfonylfluoride) Substanzen in Frage, die vom nucleophilen Cystein-Thiolat attackiert werden können (vgl. Abb. 1-8).^[20]

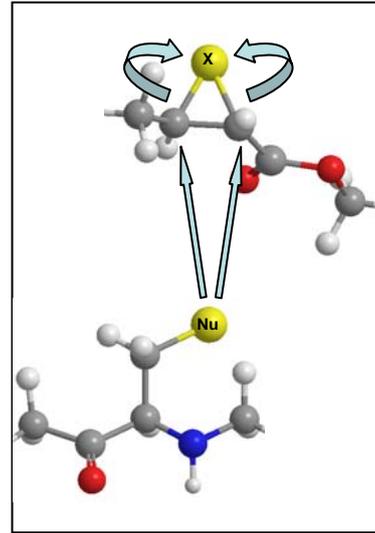


Abb. 1-8: Nucleophiler Angriff an eine elektrophile Kopfgruppe (X = N, O; Nu = S⁻, O⁻).

Dieses Konzept hat den Nachteil, dass die daraus resultierenden Inhibitoren, häufig Peptidketten, leicht hydrolysiert werden und deshalb eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzen. Hier kann eine Veränderung der Aminosäuresequenz, eine Derivatisierung der Reste oder der Einsatz von unnatürlichen Aminosäuren Abhilfe schaffen. Verwendet man Aldehyde, Ketone oder α -Ketosäuren als elektrophile Kopfgruppe, kommt es durch Bildung eines Halbacetals oder -ketals lediglich zu einer reversiblen Hemmung des Enzyms.^[20]

Das Design von Inhibitoren ist mittlerweile soweit fortgeschritten, dass es nicht genügt, einfach ein Substratmolekül mit einem „warhead“ zu verknüpfen. Aus diesem Grund werden zwei weitere Herangehensweisen verfolgt. Zum einen werden große Bibliotheken nach geeigneten kleinen Molekülen durchsucht (Screening), was aber ebenso eine Vielzahl von nicht spezifischen Alkylierungsreagenzien ergibt.^[21] Zum anderen existiert das strukturbasierte Wirkstoffdesign. Mit Hilfe hochaufgelöster Röntgenstrukturen der Enzyme lassen sich Leitstrukturen erstellen und stetig verbessern. Diese Anwendung wird sich zusammen mit immer besseren Möglichkeiten zur Strukturbestimmung weiterentwickeln.^[22]

B bzw. Cathepsin L sind auf deren Wechselwirkungen mit den S'-Bindungstaschen zurückzuführen.

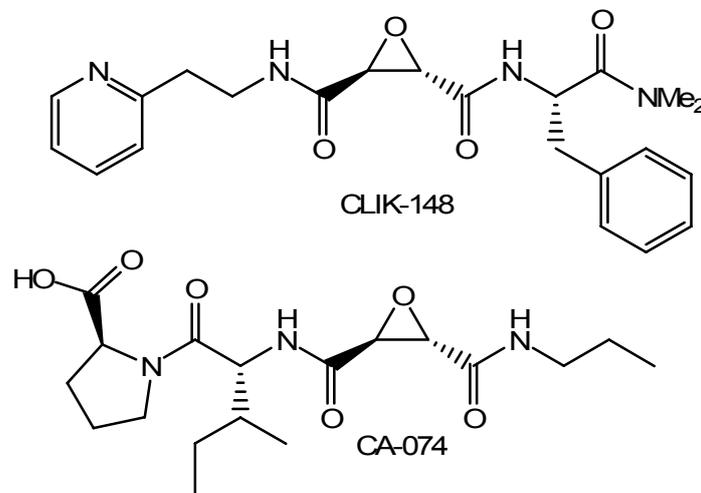


Abb. 1-11: Weitere Beispiele für Epoxysuccinyl-Inhibitoren.

Während CA-074 mit der freien Carbonsäurefunktion am Ile-Pro-OH Terminus in der Lage ist, mit beiden Histidin-Funktionen in der Schleife von Cathepsin B Wasserstoffbrücken auszubilden, blockiert der „occluding loop“ den Eintritt des Phenylrings von CLIK-148 in die Bindungstasche S2' von Cathepsin B und ist damit Cathepsin-L-selektiv.^[28]

1.1.3.2 Aziridinyl-Inhibitoren der CPs

Als Aziridinyl-Inhibitoren sind die aus *Streptomyces* isolierte (S,S)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure und das Miraziridin A^[29] (vgl. Abb. 1-12), ein Naturstoff aus dem Schwamm *Theonella mirabilis*, bekannt. Das Miraziridin A zeigt eine unspezifische Hemmung sowohl gegen Cystein-, als auch Serin- und Aspartat-Proteasen. Dies ist auf die drei enthaltenen Struktur motive ((R,R)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure, Statin und ein vinyloges Arginin) zurückzuführen.

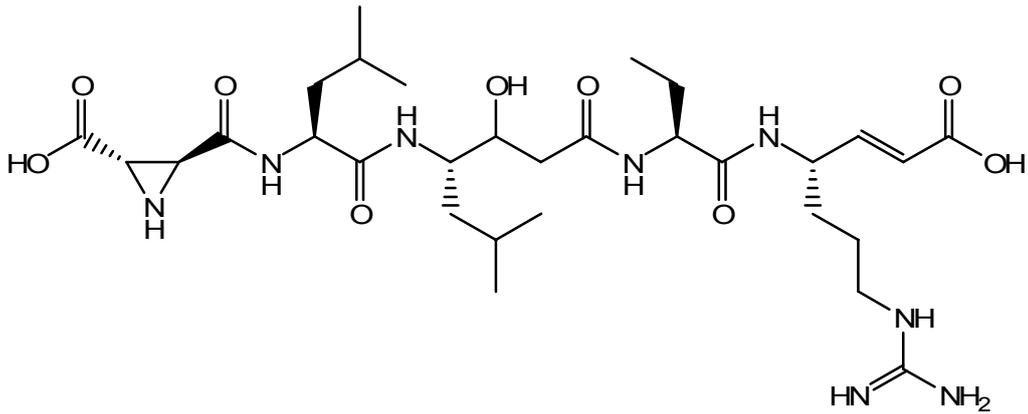


Abb. 1-12: Miraziridin A

Vergleicht man die Aziridine mit ihren entsprechenden Epoxysuccinyl-Analoga, findet man einige Unterschiede. So ist zwar die *trans*-Konfiguration des Dreierings bei beiden Spezies für die Hemmung von Cystein-Proteasen unerlässlich, aber während bei den Epoxiden die *S,S*-Konfiguration bevorzugt wird, ist bei den Aziridinen eine Begünstigung einer bestimmten Konfiguration nicht immer gegeben. Dennoch ist bei den Aziridinyl-Derivaten eine geringere Wirksamkeit vorhanden. Dies ist auf die geringere Reaktivität des Aziridinrings im Vergleich zum Oxiran zurückzuführen, was zu einer langsameren nucleophilen Ringöffnung und somit zu einer langsameren Alkylierung des Enzyms führt. Aziridine hingegen bieten den Vorteil, dass eine weitere Substitution am Stickstoffatom des Heterocyclus die Darstellung selektiver Inhibitoren ermöglicht.

Weitere Aziridinyl-Inhibitoren wurden in der eigenen Arbeitsgruppe bereits dargestellt und verfügen über gute Hemmeigenschaften gegen verschiedene Cystein-Proteasen. Dabei handelt es sich um Aziridin-2-carboxylate, Aziridin-2,2-dicarboxylate oder Aziridin-2,3-dicarboxylate (vgl. Abb. 1-13).^[30-36]

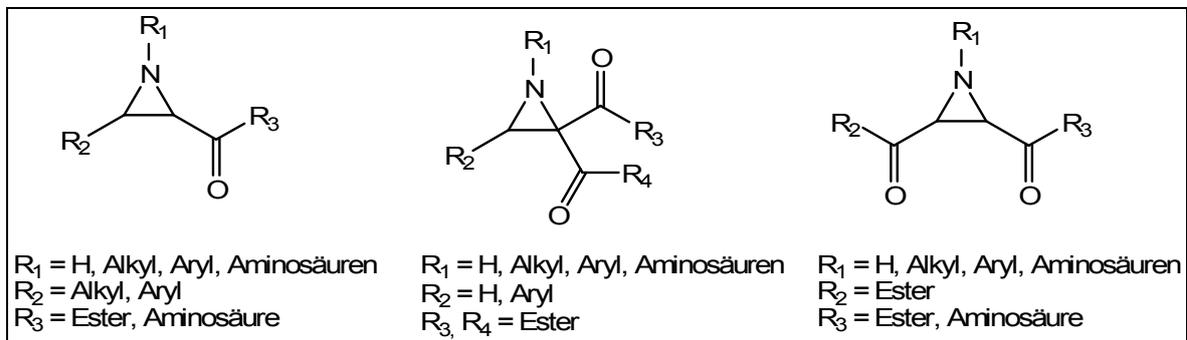


Abb. 1-13: Verschiedene Typen von Aziridinyl-Inhibitoren.

1.1.3.3 Michael-Akzeptor-substituierte Inhibitoren der CPs

Als weitere elektrophile Kopfgruppe haben sich, neben den Aziridinen und Epoxiden, die Michael-Akzeptor-substituierten Systeme bewährt.^[10, 20] Einer der ersten beschriebenen Michael-Akzeptoren ist das Fumarsäureanalogon von E-64c (vgl. Abb 1-14).^[37] Dieses hemmt selektiv Clan CA Cystein-Proteasen wie Cathepsin B, L und H, jedoch keinerlei Proteasen aus dem CD-Clan (z.B. Legumain oder Caspasen).

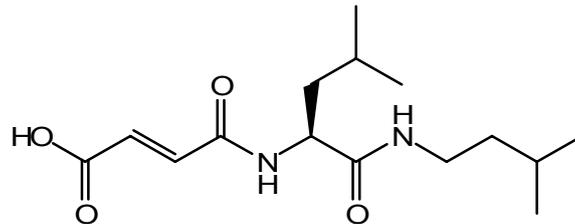


Abb.: 1-14: Fumarsäurederivat des E-64c.

Ein Wirkstoff, welcher gezielt für klinische Anwendungen entwickelt wurde, ist das Rupintrivir (vgl. Abb. 1-15). Es besitzt durch hervorragende antirhinovirale Aktivität und gleichzeitig niedrige Toxizität, scheiterte jedoch aufgrund zu geringer Wirksamkeit in der klinischen Testphase III.^[38]

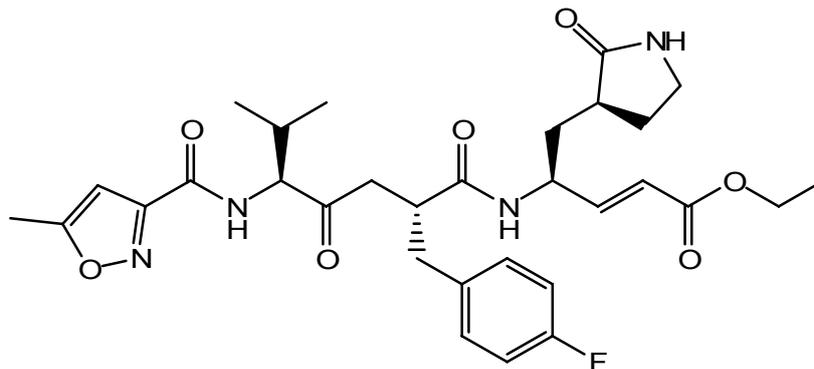


Abb. 1-15: Rupintrivir

Neben den typischen α,β -ungesättigten Cystein-Protease-Inhibitoren^[39-41] sind zudem noch einige Vinylsulfonsäuren bekannt, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.

1.1.3.4 Azapeptidische Inhibitoren der CPs

Die Klasse der Azapeptide wurde entwickelt, um dem proteolytischen Abbau normaler peptidischer Inhibitoren entgegen zu wirken (vgl. Kapitel 1.3). Aus diesem Grund wurden zahlreiche selektive Inhibitoren mit aza-peptidischem Rückrat synthetisiert.^[42] So entstanden einige potentielle Wirkstoffe die beispielsweise gegen die Falcipaine 1, 2 und 3^[43] oder gegen die Humane Rhinovirus-3C-Protease^[44] aktiv sind.

Azapeptide, die an einen „warhead“, wie z.B. Epoxide^[45] oder Michael-Akzeptoren^[46] gekuppelt sind, wurden von der Gruppe um Powers entwickelt. Beispiele für Epoxysuccinyl- bzw Fumaryl-Azapeptide mit einem Cbz-Ala-Ala-AAsn-X-COR Struktur-schema (AAsn = Azaasparaginyll, X = Epoxysuccinyl oder Fumaryl) sind in den Abbildungen 1-16 und 1-17 gezeigt.

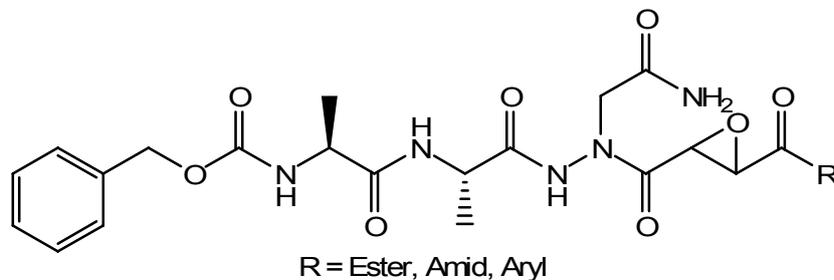


Abb. 1-16: Cbz-Ala-Ala-AAsn-EP-COR (Aasn = Azaasparaginyll, EP = Epoxysuccinyl).

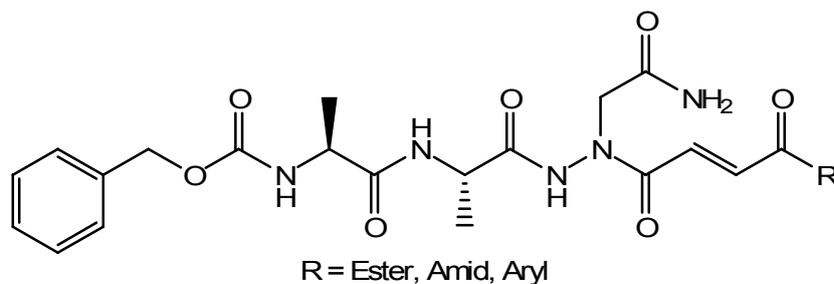


Abb. 1-17: Cbz-Ala-Ala-AAsn-*trans*-CH=CHCOR (Aasn = Azaasparaginyll).

Im Gegensatz zu ihren C-analogen Inhibitoren sind diese E-64-Analoga in der Lage, Clan CD-Proteasen zu hemmen.^[47] Beide zeigen sehr gute Ergebnisse bei der Inhibition von Legumainen.

1.2 Aspartat-Proteasen

Die 31 Subfamilien^[6] der Aspartat-Proteasen sind in sieben Clans, bestehend aus dem Pepsin-Clan (Clan AA), dem Nodavirus-Clan (Clan AB), den Clans AC und AD, dem GPR-Clan (Clan AE), dem Omptin-Clan (Clan AF) und dem Clan A- zusammengefasst.

1.2.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von APs

Ebenso wie die Cystein-Proteasen kommen auch die Aspartat-Proteasen in Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Viren und Tieren vor (vgl. Tab. 1-19) und spielen bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine große Rolle.

Tabelle 1-19: Vorkommen der Aspartat-Protease Clans in verschiedenen Organismen.

Clan	Bakterien	Archaea	Protozoen	Pilze	Pflanzen	Tiere	Viren
AA	+	-	+	+	+	+	+
AB	-	-	-	-	-	-	+
AC	+	-	-	-	+	-	-
AD	-	-	-	-	-	-	+
AE	+	+	-	-	-	-	-
AF	+	-	-	-	-	-	-
A-	-	+	-	-	-	-	-

Tabelle 1-20: Physiologische und pathologische Bedeutung einiger Aspartat-Proteasen.^[16]

Physiologische Bedeutung	Beteiligte Enzyme	Erkrankung bei Überexpression
Abbau von Nahrungsproteinen	Pepsin	
Blutdruckregulation	Renin	Bluthochdruck
unspezifischer Proteinabbau	Cathepsin D, E	Krebs, Alzheimer, Entzündungen
	Memapsin 2 Presenilin 1	Alzheimer

Im menschlichen Körper sind beispielsweise das Verdauungsenzym Pepsin, der Blutdruckregulator Renin oder die Cathepsine D und E zu finden. Eine Überexpression

der Enzyme führt auch hier zu schwerwiegenden Erkrankungen, wie z.B. Krebs oder Alzheimer. Eine Übersicht ist in Tabelle 1-20 und Tabelle 1-21 zusammengestellt.

Neben den humanen Aspartat-Proteasen sind noch eine Reihe weiterer parasitärer bzw. viraler APs bekannt. Diese haben entscheidende Funktionen im Verlauf von Virenerkrankungen (AIDS), Protozoenerkrankungen (Malaria) oder Infektionen mit Pilzen (*Candida albicans*).

Tabelle 1-21: Parasitäre, virale und fungale Erkrankungen unter Beteiligung von Aspartat-Proteasen.^[48]

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

Gerade im Kampf gegen das HI-Virus und Malaria sind die Aspartat-Proteasen ein bevorzugtes Ziel der Wirkstoffentwicklung.

1.2.2 Aufbau, Struktur und Katalysemechanismus von APs

Kristallographische Studien zeigen, dass Aspartat-Proteasen der Pepsinfamilie (Clan AA, Familie A1) aus zwei Domänen bestehen. Diese sind homolog und tragen jeweils einen für die Katalyse benötigten Aspartatrest. Die Hydrolyse eines Substrats findet zwischen beiden Domänen, im sog. „active site cleft“, statt.^[49]

Die Strukturen der Aspartat-Proteasen sind durch β -Faltblätter dominiert,^[50] weisen aber nur eine geringe Sequenz-Homologie auf. Die Sequenz im hydrophoben Bereich der Bindungstasche ist dagegen hochkonserviert.^[51]

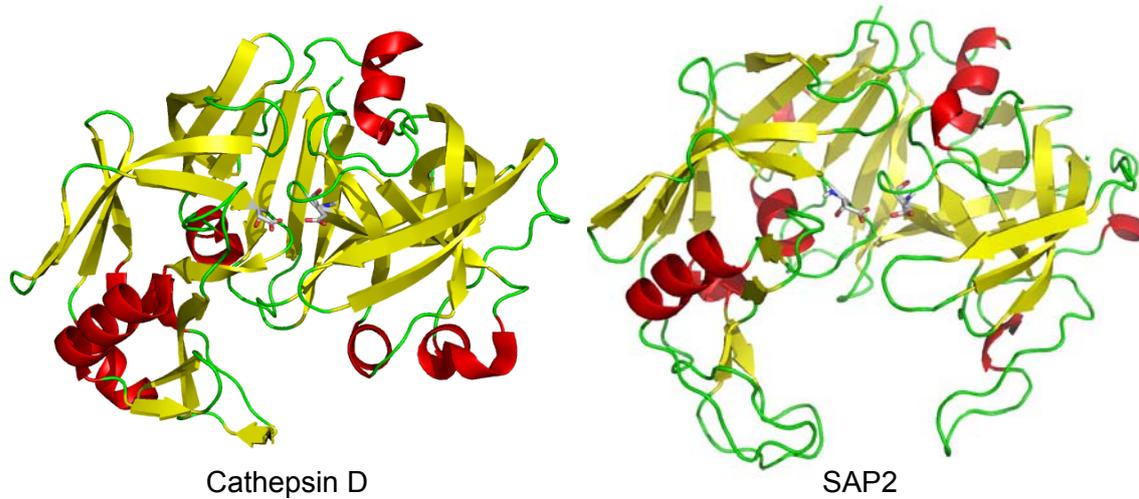
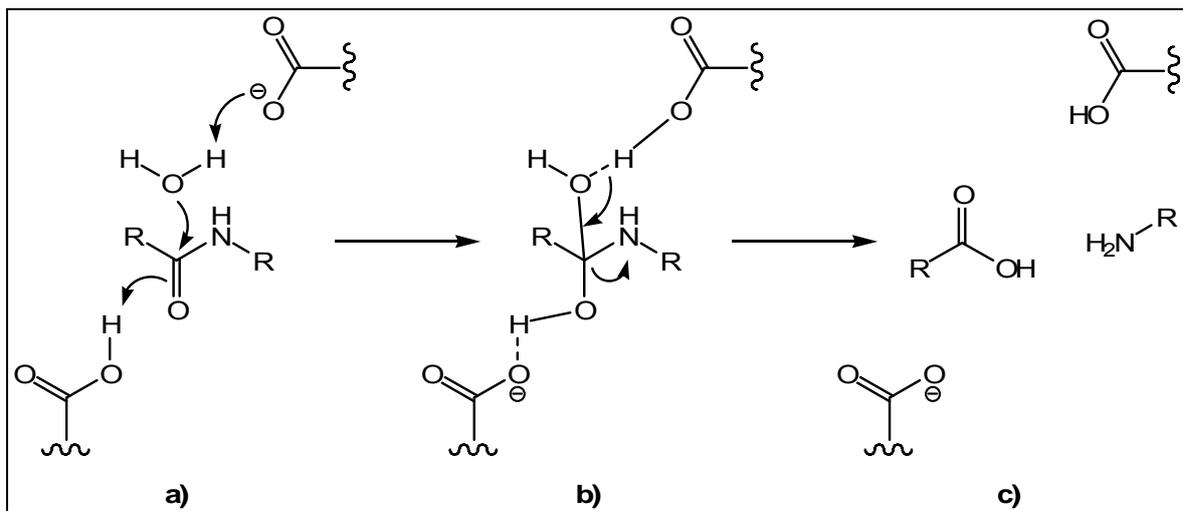


Abb. 1-22: Struktur der Aspartat-Proteasen Cathepsin D (links, PDB-Code: 1lya^[52]) und SAP2 (rechts, PDB-Code: 1zap^[53]) generiert mit PyMOL^[14].

Am Hydrolysemechanismus der Aspartat-Proteasen sind aktiv zwei Aspartatreste und ein Wassermolekül beteiligt. Die Aspartatreste agieren als Protonendonator bzw. -akzeptor bei der Hydrolyse der Peptidbindung. Das Wassermolekül wird vom Asp aktiviert und attackiert nucleophil den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats. Der Carbonyl-Sauerstoff wiederum deprotoniert die andere Asparaginsäure und bildet ein tetraedrisches Intermediat (vgl. 1-23 **a**). Aus dem Übergangszustand heraus ist das Amin die bessere Abgangsgruppe und ein Bindungsbruch (vgl. 1-23 **b**) führt zu einer Spaltung in zwei Peptidfragmente (vgl. 1-23 **c**).^[16, 54]



Schema 1-23: Katalytischer Hydrolysemechanismus von Aspartat-Proteasen.

Die Spaltstelle hängt von den Wechselwirkungen des Enzyms mit der Substratseitenkette ab. Diese Interaktionen bestehen hauptsächlich aus Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen in der Nähe des aktiven Zentrums. Das zu spaltende Substrat sollte eine Länge von sechs bis zehn Aminosäuren besitzen, welche hauptsächlich als Erkennungssequenz dienen.

Aspartat-Proteasen arbeiten bevorzugt im sauren pH-Bereich. Pepsin hat sein pH-Optimum bei 1.5-3, Renin, die Plasmepsine sowie Cathepsin D und E bei 3-4 und die HIV-Proteasen bei 4-6.^[49]

1.2.3 Inhibitoren der APs

Prinzipiell verfolgt man bei der Entwicklung von Aspartat-Protease-Inhibitoren die gleiche Strategie wie bei den Cystein-Protease-Inhibitoren. Eine Peptidkette, ähnlich dem natürlichen Substrat, wird an eine elektrophile Kopfgruppe gekuppelt, die zur irreversiblen Alkylierung des aktiven Zentrums führen soll. (vgl. Kapitel 1.1.3)

Außerdem gibt es zahlreiche Forschungen zu reversiblen Inhibitoren, die durch Imitation des Übergangszustands eine hohe Affinität zur Bindetasche zeigen und diese blockieren. Bislang sind viele Inhibitoren unterschiedlicher Typen bekannt.^[55] Als typische Vertreter seien hier das Pepstatin A, ein Standard-Aspartat-Protease-Inhibitor, (vgl. Abb. 1-24), ein nicht-peptidischer Renin-Inhibitor (vgl. Abb 1-25),^[56, 57] das Saquinavir,^[58-60] ein HIV-1-Inhibitor (vgl. Abb. 1-26) oder das SC-5003,^[16] ein Plasmepsin-1-Inhibitor (vgl. Abb. 1-27), genannt.

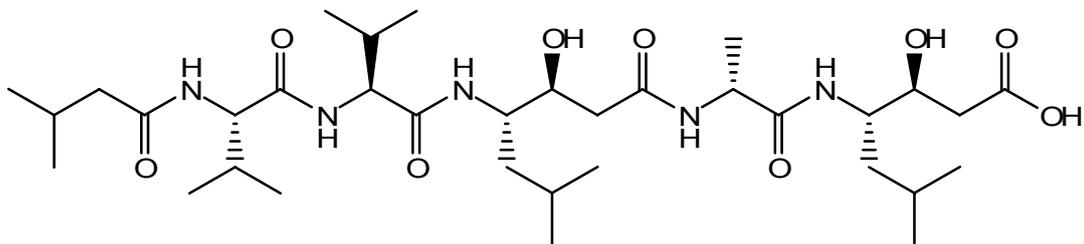


Abb. 1-24: Pepstatin A.

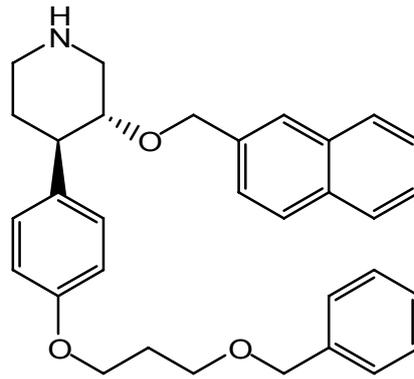


Abb. 1-25: Nicht-peptidischer Renin-Inhibitor.

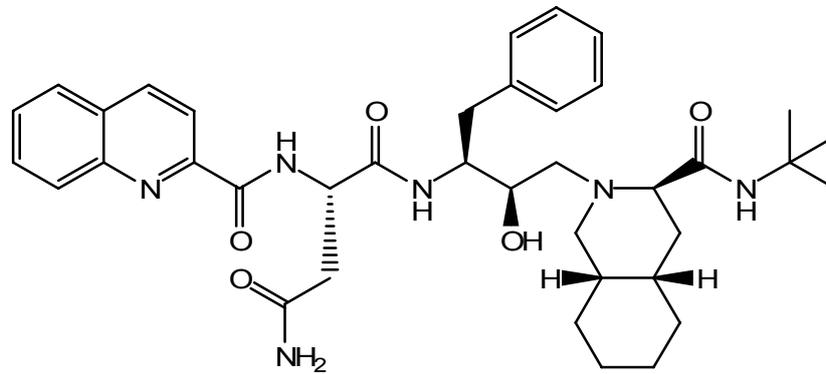


Abb. 1-26: Saquinavir.

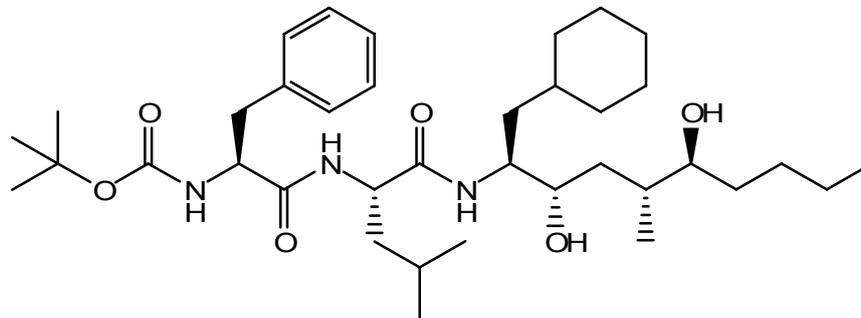


Abb. 1-27: SC-5003.

1.2.3.1 Epoxide als Inhibitoren von APs

Wie bereits in Kapitel 1.1.3.1 erläutert, war der Naturstoff E-64 ein Vorbild für die Entwicklung zahlreicher *trans*-konfigurierter Cystein-Protease-Inhibitoren mit Epoxidbaustein. Als Aspartat-Protease-Inhibitor wurde zunächst das 1,2-Epoxy-3-(*p*-

nitrophen-oxo)propan (EPNP, vgl. Abb. 1-28) gefunden, welches moderate Hemmeigenschaften gegen Pepsin^[61] und die HIV1-Protease^[62] besitzt.

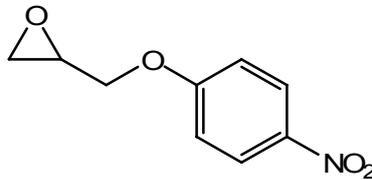


Abb. 1-28: EPNP.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass, im Gegensatz zu den Cystein-Proteasen, die *cis*-Konfiguration bei Aspartat-Proteasen bevorzugt wird.^[63] Dies führte zur Entwicklung zahlreicher neuer Leitstrukturen, wie beispielsweise einem Tripeptidylepoxid,^[64] einem HIV1-Inhibitor mit *cis*-konfiguriertem Epoxid (vgl. Abb. 1-29).

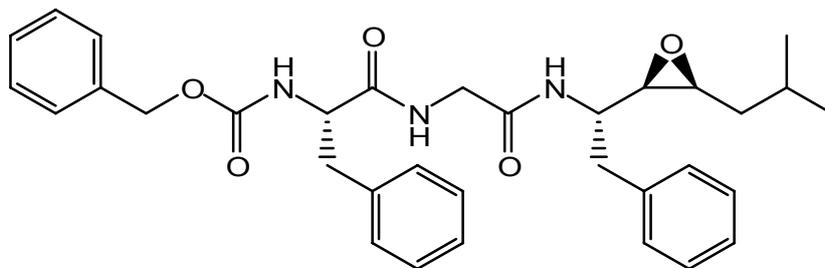
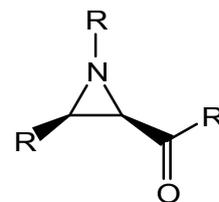


Abb. 1-29: Irreversibler HIV1-Inhibitor mit *cis*-konfiguriertem Epoxid.

1.2.3.2 Aziridiny-Inhibitoren der APs

Der in Kapitel 1.1.3.2 vorgestellte Naturstoff Miraziridin A hemmt wie bereits erwähnt neben Cystein-, auch Serin- und Aspartat-Proteasen. Jedoch nicht die Aziridiny-Funktion, sondern das Statinanalogen ist der Grund für die Aktivität gegenüber Aspartat-Proteasen.

Eine Reihe von irreversiblen Aziridiny-Inhibitoren, die zur Alkylierung des aktiven Zentrums führen, wurde in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt. Diese tragen, wie von Aspartat-Proteasen bevorzugt, ein *cis*-konfiguriertes Aziridin-2-carboxylat als elektrophile Kopfgruppe. Die übrigen Sub-



R = Alkyl, Aryl, Ester, Amid

Abb. 1-30: *cis*-Aziridiny-Inhibitoren

stituenten sind in den meisten Fällen diverse Alkyl- bzw. Arylreste oder Aminosäuren. Das allgemeine Schema dieser Klasse von Inhibitoren ist in Abb. 1-30 dargestellt. Einige Vertreter mit dem o.g. Substitutionsmuster hemmen diverse SAP-Enzyme (sekretorische Aspartat-Protease) sowie Cathepsin D.^[65, 66]

1.2.3.3 Michael-Akzeptor-substituierte Inhibitoren der APs

Für die Hemmung von Aspartat-Proteasen sind bislang nur wenige Michael-Akzeptor-substituierte Verbindungen bekannt. Hierzu gab es einige Untersuchungen mit α,β -ungesättigten Derivaten des Neuroleptikums Haloperidol (vgl. Abb. 1-31). Dessen Hemmung beruht allerdings nicht auf der irreversiblen Alkylierung eines Aspartatrestes im aktiven Zentrum, sondern auf einer kovalenten Bindung an eine allosterische Peptidsequenz des Enzyms.^[67, 68]

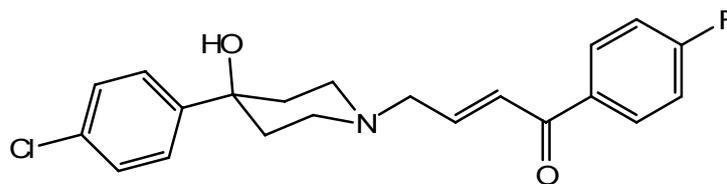


Abb. 1-31: α,β -ungesättigtes Haloperidol-Derivat.

1.2.3.4 Azapeptidische Inhibitoren der APs

Azapeptid-Inhibitoren für die Aspartat-Proteasen Renin^[69] und HIV1^[70] sind die bisher am häufigsten untersuchten Substanzen.

Das prominenteste Beispiel für einen Azapeptid-Aspartat-Protease-Inhibitor ist Atazanavir, welcher (vgl. Abb. 1-32) bereits HIV-Patienten in Kombination mit anderen Medikamenten verabreicht wird. Der Vorteil gegenüber anderen Wirkstoffen in der Proteaseinhibitor-basierten, hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) sind die geringeren Nebenwirkungen.^[71]

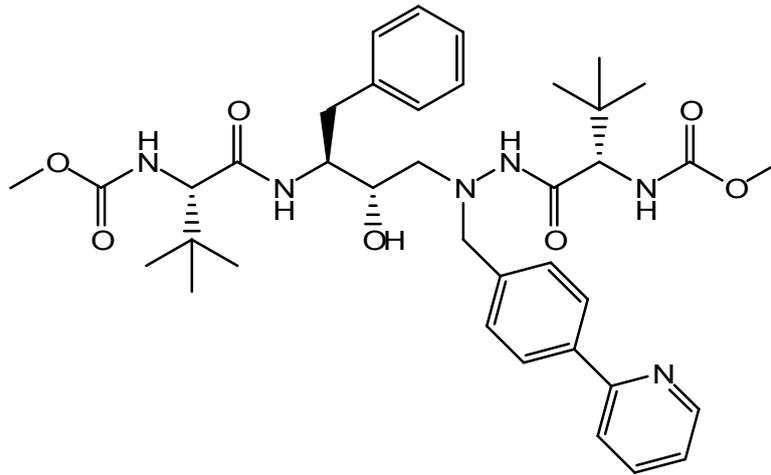


Abb. 1-32: Atazanavir

1.2.3.5 Nichtpeptidische Inhibitoren der APs

Durch Screening einer Datenbank kommerziell verfügbarer Verbindungen wurde eine Reihe von Inhibitoren ermittelt, die selektiv Plasmepsin 2 hemmen. Ein Beispiel ist das Harnstoffderivat WR-099445,^[72] welches in Abb. 1-33 gezeigt ist. Die Inhibition an Plasmepsinen wurde an isolierten Enzymen bestimmt, jedoch konnte keine Aktivität am Parasiten *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden.

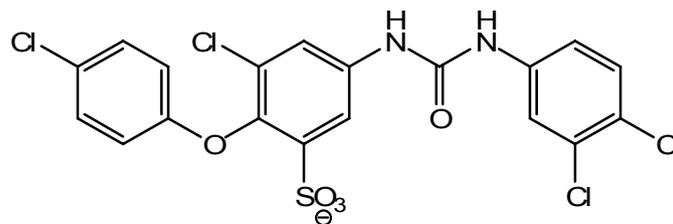


Abb. 1-33: Nicht-peptidischer Plasmepsin 2-Inhibitor WR-099445.

Wie bei den Plasmepsinen sind die bekannten nicht peptidischen Cathepsin D-Inhibitoren ebenfalls durch eine Datenbank-Sichtung ermittelt worden. Der vielversprechendste Vertreter der Cathepsin D-selektiven Verbindungen ist in Abb. 1-34 dargestellt.^[73, 74]

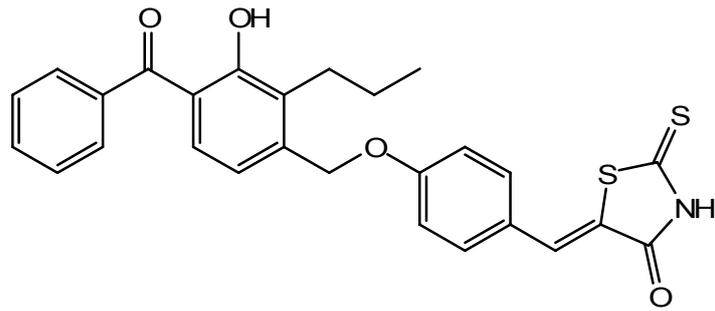


Abb. 1-34: Nicht-peptidischer Cathepsin D-Inhibitor.

1.3 Azapeptide

Peptidomimetika haben die Aufgabe, natürliche Peptide zu imitieren, sie sollen gleichzeitig eine höhere Bioverfügbarkeit, bessere metabolische Stabilität und Selektivität besitzen. Notwendige Modifizierungen der natürlichen Substrate können dabei sowohl an der Seitenkette als auch am Peptidrückgrat durchgeführt werden.

Azapeptide^[75] sind Peptidanaloga, bei denen eine oder mehrere zentrale α -CH-Gruppen durch ein Stickstoffatom ersetzt wurden. Bereits die Substitution dieses einzelnen Atoms hat erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der Peptidkette. Zunächst ist es offensichtlich, dass an dieser Stelle die Chiralität verloren geht (vgl. Abb. 1-35).

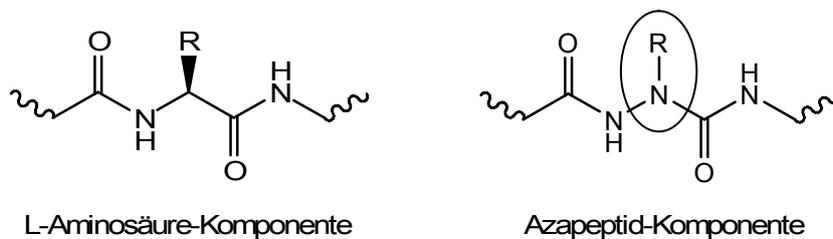


Abb. 1-35: Ausschnitt aus einem Polypeptid ohne (links) und mit (rechts) Azapeptid.

Ferner vermindert sich durch die weitere Amidbindung die Flexibilität der Kette gegenüber der ersetzten Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung. Diese Eigenschaften machen Azapeptide zu einem attraktiven Hilfsmittel in der auf der Sekundärstruktur von Peptiden basierten Wirkstoffentwicklung.^[76]

Ein weiteres Merkmal von Azapeptiden bei der Beeinflussung bezüglich der dreidimensionalen Proteinstruktur sind die beiden benachbarten Stickstoffatome, die bedingt durch die Abstoßung ihrer freien Elektronenpaare bestimmte Torsionswinkel des

Peptids verursachen. Diese Winkel sind vergleichbar mit denen in den sog. β -turns, bioaktiven Konformationen in vielen Peptiden (vgl. Abb. 1-36).^[77]

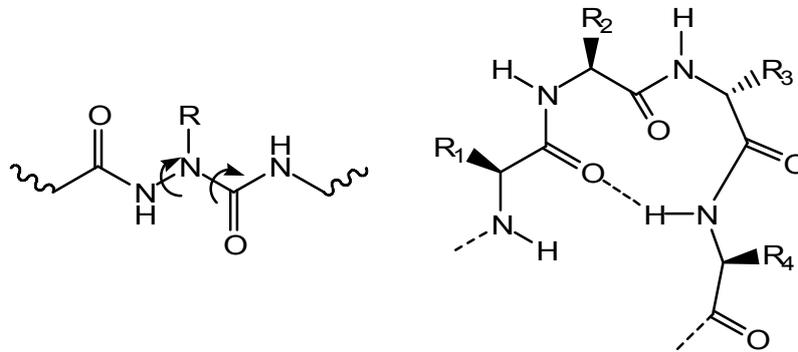


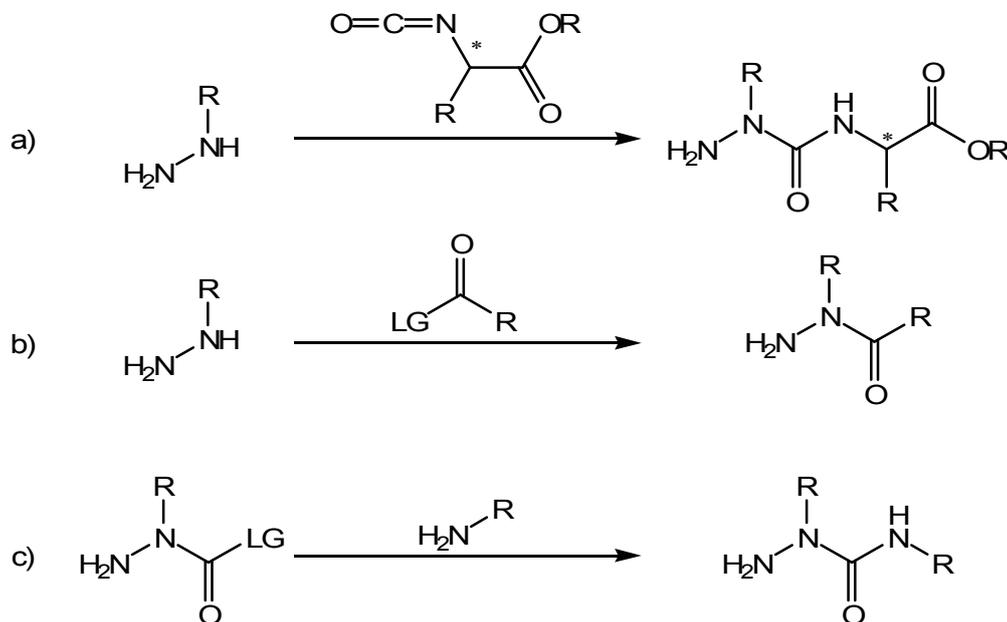
Abb. 1-36: Torsion der Azapeptids (links) und β -turn Struktur (rechts).

Der Austausch des α -Kohlenstoffs gegen Stickstoff in einem biologisch aktiven Peptid hat zweifelsohne einen Effekt auf viele seiner Eigenschaften wie beispielsweise die Erkennung durch einen Rezeptor oder ein Enzym. So ist es z.B. für Chymotrypsin-artige Proteasen nicht möglich, Azapeptide zu hydrolysieren. Bedingt durch die Ausbildung einer stärkeren Wasserstoffbrücke der N-H Gruppe am α -Stickstoff, kommt es nicht zur Entstehung einer anti-parallelen β -Faltblattstruktur und daher zu keiner Erkennung durch die Enzyme.^[77] Ihre Hydrolysebeständigkeit und somit ihre metabolische Stabilität machen die Azapeptide zu einer interessanten Stoffklasse für die Wirkstoffentwicklung. In den Kapiteln 1.1.3 und 1.2.3 sind Beispiele für Azapeptide als Inhibitoren für Cystein- bzw. Aspartatproteasen bereits aufgeführt.

Die Darstellung von Azaaminosäuren und deren Einbau in eine Peptidkette ist prinzipiell eine Kombination aus Hydrazin- und Peptidchemie. Zu diesem Zweck wird ein Hydrazin mit einer aktivierten Carbonyl-Gruppe zur Reaktion gebracht. Es ist aber auch möglich, das Hydrazin zu aktivieren und mit einem Amin zu verknüpfen. Eine Übersicht über die gängigsten Methoden zur Darstellung von Azapeptiden ist in Schema 1-37 dargestellt. Die Wahl der Methode hängt davon ab, wo sich hinterher die Azapeptid-Funktion in der Peptidkette befinden soll.

Verwendet man Hydrazine oder Alkylhydrazine in Verbindung mit Isocyanaten, erhält man Azaaminosäuren mit einem ungeschützten N-Terminus (vgl. Schema 1-37 a)).^[78] Eine andere Möglichkeit zur Aktivierung des Carbonyl-Kohlenstoffs im Vergleich zu den Isocyanaten ist der Einsatz als Säurechlorid (LG = Cl) oder als Ester (LG = OR) wie in Schema 1-37 b) dargestellt. Auf ähnliche Weise kann auch das Hydrazid aktiviert (vgl. Schema 1-37 c)) und mit einem Amin oder einer Aminosäure umgesetzt werden. Durch die bessere synthetische Verfügbarkeit der aktivierten Vorstufen und die erhöhte

Flexibilität bei der Synthese sind diese Methoden im Vergleich zur Isocyanat Methode günstiger.



Schema 1-37: Mögliche Routen zur Darstellung von Azapeptiden (LG = Abgangsgruppe).

In allen Beispielen wird die Kupplung am bereits substituierten Hydrazin-Stickstoff bevorzugt, so dass man beispielsweise mit Phenylhydrazin das Aza-Analogon zu Phenylalanin erhält.^[76]

1.4 Elektronendichtebestimmung

Viele biologische Prozesse beruhen auf der Reaktion zwischen einem kleinen Substratmolekül und einem großen Makromolekül, für gewöhnlich ein Protein. Im gegenseitigen Erkennungsprozess der beteiligten Teilchen sind Eigenschaften wie Sterik, Elektrostatik, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Effekte von entscheidender Bedeutung. Nach den ersten nicht-kovalenten Wechselwirkungen folgt in einigen Fällen eine kovalente chemische Modifizierung des kleinen Substratmoleküls.

Um Informationen über diese Art von elektronischen Interaktionen zu bekommen, ist die ultra-hochauflösende Röntgenstrukturanalyse^[79] eine geeignete Methode. Mit ihrer Hilfe ist es möglich aus experimentellen Daten die Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ und somit Informationen über elektronische Eigenschaften von bindenden und nicht-bindenden Wechselwirkungen, Atomeigenschaften, Stabilität und Reaktivität zu erhalten.^[80]

Die konventionelle Röntgenstrukturanalyse liefert jedoch lediglich Informationen über die Atomorte der gemessenen Verbindung, da die dahinter stehende Theorie (independent atom model) auf einer sphärischen Elektronenverteilung beruht. Asphärische Anteile, welche von bindenden und nicht-bindenden Interaktionen hervorgerufen werden, sind komplett vernachlässigt. Im so genannten Multipol-Modell von Hansen und Coppens^[81] aus dem Jahr 1978 werden die asphärischen Anteile beschrieben (vgl. Gl. 1-38).

$$\rho_a(r) = \rho_{core}(r) + P_v \kappa^3 \rho_{val}(\kappa r) + \rho_{def}(r)$$

mit

$$\rho_{def}(r) = \sum_{l=0}^{l_{max}} \kappa'^3 R_l(\kappa' r) \sum_{m=-l}^l P_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi)$$

Gleichung 1-38: Hansen-Coppens-Formalismus.

Die ersten beiden Terme beschreiben die Kern- (ρ_{core}) und Valenzdichten (ρ_{val}) und der dritte Term steht für den asphärischen Beitrag (ρ_{def}), welcher hauptsächlich durch kovalente Bindungen oder freie Elektronenpaare entsteht. Um diesen sehr kleinen asphärischen Beitrag sichtbar zu machen, sind sehr präzise Röntgenstruktorexperimente mit qualitativ hochwertigen Einkristallen notwendig, damit man Daten in ausreichender Menge und Auflösung erhält. Weiterhin sind möglichst tiefe Temperaturen nötig, welche die thermische Bewegung der Moleküle im Kristall auf ein Minimum reduzieren.

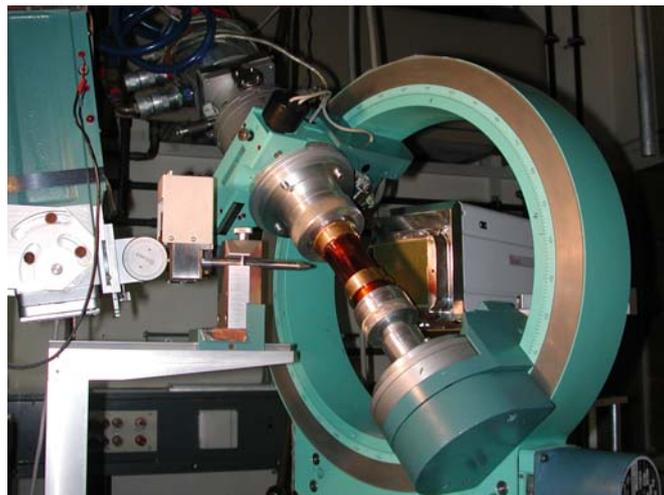


Abb. 1-39: Vierkreis-Diffraktometer, AG Prof. Luger, FU Berlin (mit freundlicher Genehmigung).

Erst durch den technischen Fortschritt der letzten Jahre (CCD-Flächendetektoren, Helium-Kühlsysteme, Synchrotron beamlines) ist es gelungen, die ultra-hochauflösende Röntgenstrukturanalyse zu einer erfolgreichen Routineanwendung zu machen.^[82]

Um schließlich eine quantitative Aussage aus den Messergebnissen zu bekommen, wendet man Baders QTAIM (The Quantum Theory of Atoms in Molecules)^[83, 84] an. Hier erhält man aus der ersten und zweiten partiellen Ableitung der Elektronendichtefunktion $\rho(r)$ das Gradientenvektorfeld $\nabla\rho(r)$ und den Laplacian $\nabla^2\rho(r)$. Aus der topologischen Analyse von $\rho(r)$ kann man eine quantitative Beschreibung von Atomen, Bindungen, nicht-bindende Interaktionen, elektronischer Struktur und Reaktivität bekommen. Das Konzept beschreibt eine Bindung als ein Maximum der Elektronendichte im Gradientenvektorfeld entlang des Bindungspfades. Die Stärke der Bindung ist durch den Wert der Elektronendichte am so genannten bindungskritischen Punkt $\rho(r_{BCP})$ gegeben. Der bindungskritische Punkt befindet sich zwischen zwei Atomvolumina auf der flusslosen Oberfläche (surface of zero-flux), wo das Gradientenvektorfeld $\nabla\rho(r)$ verschwindet. Weitere Eigenschaften der Atome, wie beispielsweise Ladung, sind durch Integration über die Ladungsdichte der Atomvolumina zugänglich.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen mehrere Teilprojekte bearbeitet werden.

Das erste Teilprojekt befasst sich mit der Synthese, Kristallisation und Elektronendichtebestimmung kleiner elektrophiler Bausteine, die in zukünftigen Inhibitoren als „warhead“ fungieren sollen. Als elektrophile Bausteine sind in Inhibitoren vor allem Aziridine, Epoxide oder Akzeptor-substituierte Olefine relevant (vgl. Kapitel 1). Das Substitutionsmuster soll hierbei relativ einfach gehalten werden, um eine gute Kristallisationsfähigkeit und eine rasche Auswertung der Elektronendichte-Ergebnisse zu ermöglichen (vgl. Abb. 2-1).

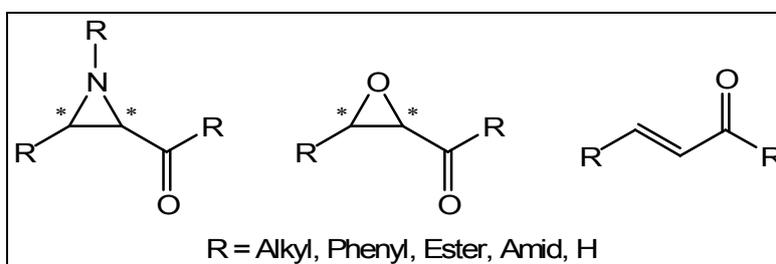


Abb. 2-1: Elektrophile Bausteine.

Die Elektronendichtemessungen selbst wurden im Rahmen des SPP 1178 und der damit verbundenen Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Luger (Institut für Chemie und Biochemie / Kristallographie, FU Berlin) am hauseigenen Vierkreisdiffraktometer oder an verschiedenen Synchrotronquellen (HASYLAB, Hamburg; Diamond Light Source, Oxfordshire; Advanced Photon Source, Chicago.) durchgeführt. Die Auswertung der Daten übernahm ebenfalls die Arbeitsgruppe Luger. Die Ergebnisse der Elektronendichtemessungen sollen dazu beitragen, alle Eigenschaften eines Inhibitors zu verstehen und so Vorhersagen über seine potentielle Aktivität zu ermöglichen.

Das zweite Teilprojekt umfasst die Synthese und Testung von Azapeptiden als Inhibitoren diverser Enzyme aus der Gruppe der Cystein- und Aspartat-Proteasen. Hierbei dienen bereits bekannte Inhibitoren als Vorbild (vgl. Abb 2-2).^[65]

Die vorhandenen Substanzen sollen zunächst um einige Derivate ergänzt und anschließend das entsprechende azapeptidische Analogon dargestellt werden.

Insbesondere die Klasse der Epoxide gehört mit ihrem natürlichen Vorbild, dem Naturstoff E64,^[23, 85] zu den Schwerpunkten des Teilprojekts.

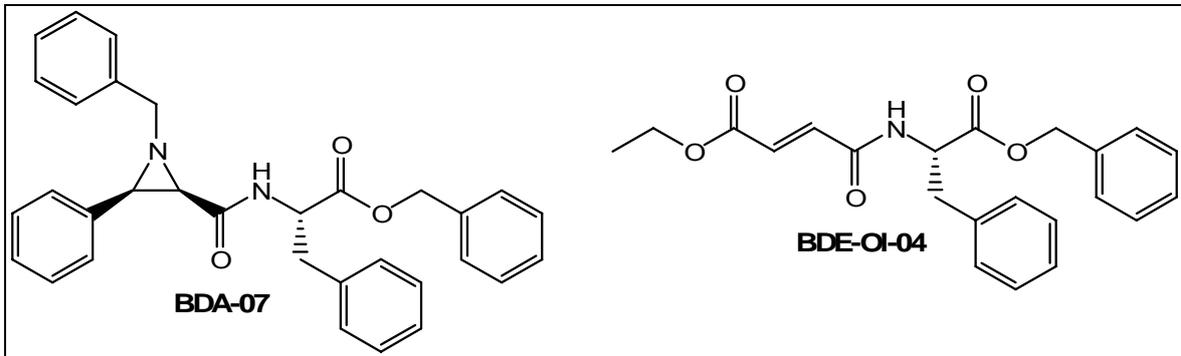


Abb. 2-2: Beispiele von bereits bekannten Aziridin- bzw. Olefin-Inhibitoren.

Betrachtet man die Anzahl der unterschiedlichen Substitutionsmuster, so ergibt sich eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten. So kann man zum einen den „warhead“ (Aziridin, Epoxid, Akzeptor-substituiertes Olefin) oder deren Substituenten variieren, zum anderen sind durch einen Austausch der Aminosäure verschiedenste Alkylreste am α -Kohlenstoff möglich. Schließlich gibt es auch bei der Wahl der Endgruppe mehrere Optionen. Ein Überblick der verschiedenen Variationsmöglichkeiten ist in Abb. 2-3 dargestellt.

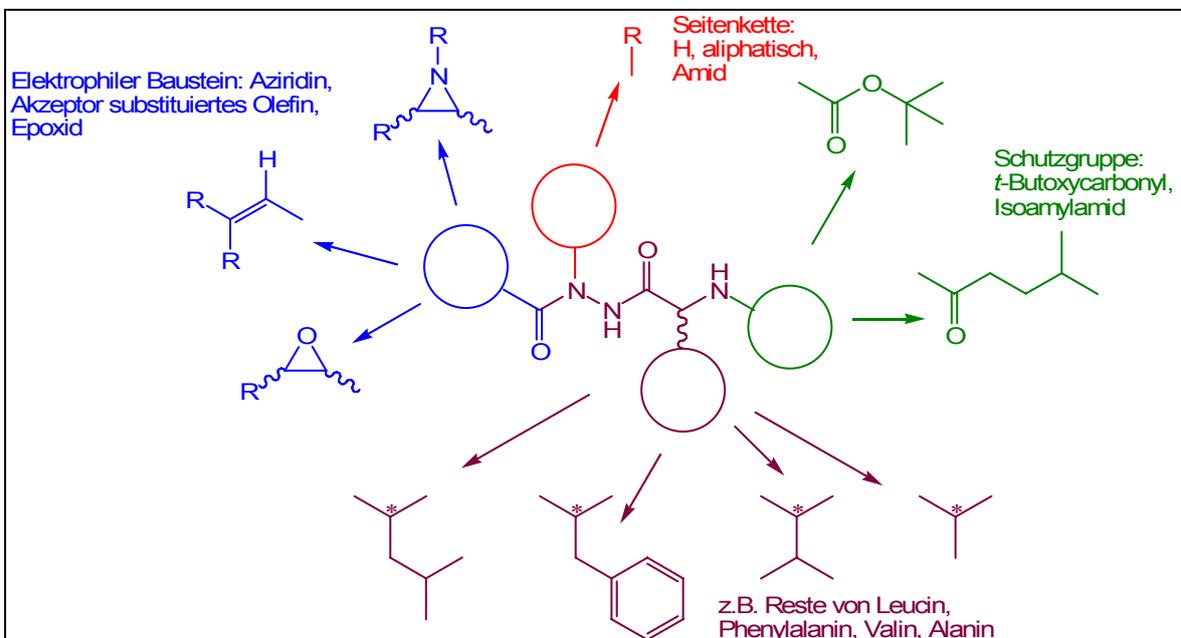


Abb. 2-3: Variationsmöglichkeiten der zu synthetisierenden Azapeptide.

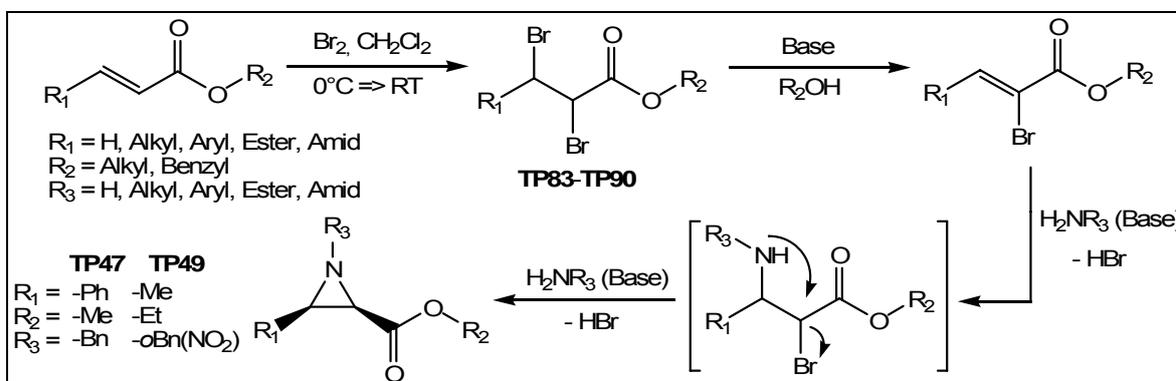
3. Synthesen

3.1 Synthese von Aziridin-Bausteinen

Aziridine sind weit verbreitete Bausteine in der organischen Synthese. In biologischen Systemen agiert der unsubstituierte Stickstoff als Wasserstoffbrückendonator, wohingegen ein Oxiran als Akzeptor fungiert. Ein weiterer Vorteil gegenüber verwandten Epoxiden liegt in der zusätzlichen Möglichkeit der Derivatisierung am Heteroatom. Zur Darstellung des dreigliedrigen Zyklus gibt es je nach gewünschtem Substitutionsmuster oder erforderlicher Stereochemie eine Vielzahl von Ansätzen.^[86] Aufgrund der Fülle der möglichen Aziridin-Synthesen soll hier nur auf die in dieser Arbeit verwendeten eingegangen werden.

3.1.1 Synthese *cis*-konfigurierter Aziridin-Bausteine nach Cromwell

Die Cromwell-Synthese startet mit der Bromierung eines Michael-Systems oder anderer ungesättigter Moleküle, welche in der Regel kommerziell erhältlich sind. Anschließend folgen unter Zugabe einer Base (z.B. Triethylamin) eine Bromwasserstoff-Eliminierung und die Entstehung eines α -bromierten-Michael-Systems. Nach einer Michael-Addition von Ammoniak oder einem primären Amin erfolgt, in Kombination mit einer weiteren HBr-Eliminierung, der Ringschluss zum überwiegend *cis*-konfiguriertem Aziridin (vgl. Schema 3-1).^[87-96]



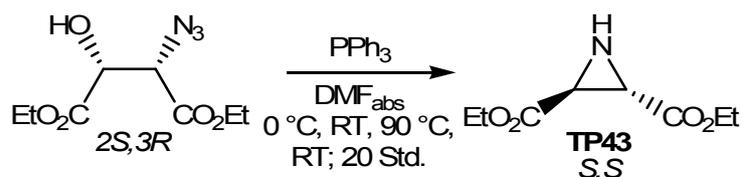
Schema 3-1: Cromwell-Synthese von Aziridinen.

Die Synthese liefert ein Gemisch der *cis/trans*-Isomere des Produkts im Verhältnis von ungefähr 3-4:1 (*cis:trans*), bestimmbar mittels NMR-Spektroskopie. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte das *cis*-Isomer bei der Synthese von **TP47** und **TP49** isoliert werden. Versuche mit anderen Aminen und/oder Dibrom-Verbindungen führten dagegen, auch bei Variation der Reaktionsbedingungen, nicht zum gewünschten Produkt.

Das verwendete Amin kann, im Überschuss eingesetzt, gleichzeitig als Base zum Abfangen der entstehenden Bromwasserstoffsäure fungieren. Trotz der einfachen Durchführung der Cromwell-Synthese ist die lange Reaktionsdauer von bis zu 20 Tagen ein Nachteil.

3.1.2 Synthese *trans*-konfigurierter Aziridin-Bausteine nach Staudinger

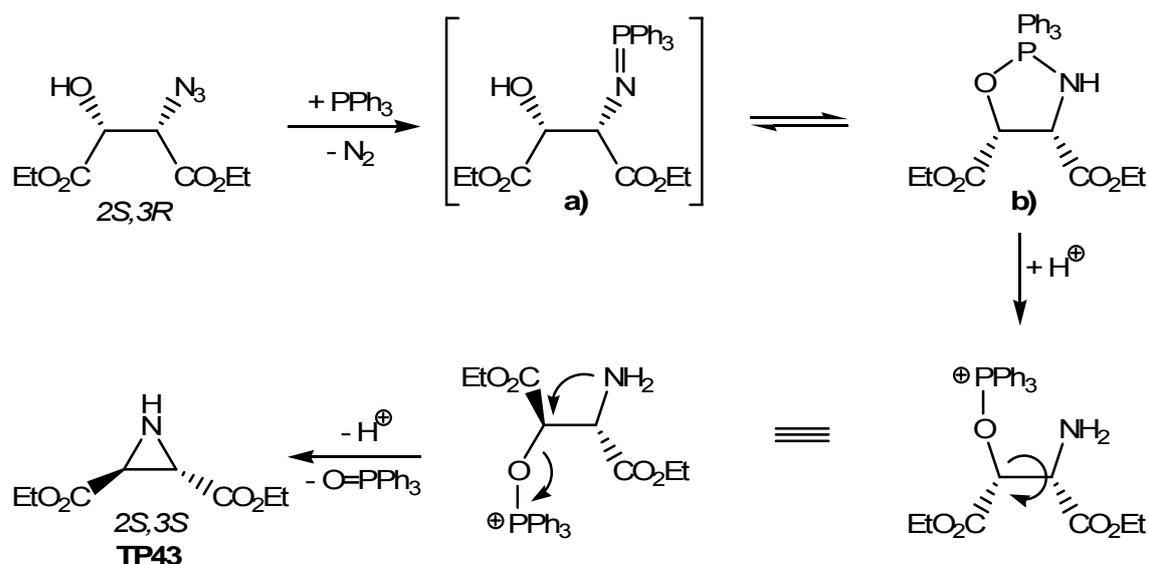
Eine allgemeine Methode zur Darstellung von am Stickstoff unsubstituierten Aziridincarboxylaten ist die Staudinger-Reaktion.^[97] Sie beinhaltet eine Triphenylphosphin-vermittelte reduktive Cyclisierung von Azidoalkoholen (vgl. Schema 3-2). Die Konfiguration des Azidoalkohols ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Wird beispielsweise der enantiomerenreine *anti*-Azidoalkohol eingesetzt, so erhält man als Produkt das *trans*-konfigurierte Aziridin und umgekehrt aus dem *syn*-Azidoalkohol das Aziridin mit *cis*-Konfiguration.



Schema 3-2: Staudinger-Reaktion ausgehend vom (2*S*,3*R*)-Azidoalkohol.

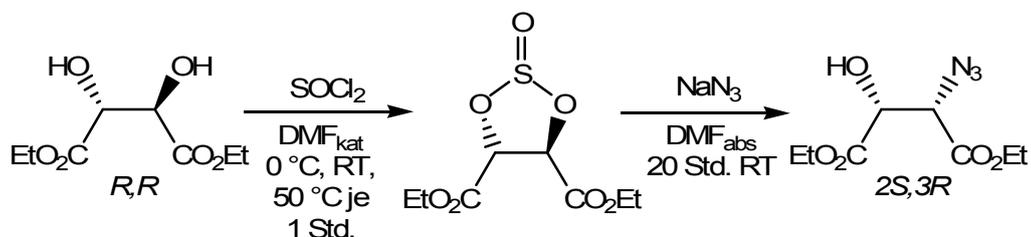
Ausgehend vom *anti*-(2*R*,3*S*)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat liefert die Staudinger-Reaktion (*S,S*)-Diethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (**TP43**) mit Ausbeuten von ca. 35 %.

Die reduktive Cyclisierung des Azidoalkohols verläuft über mehrere Zwischenstufen (vgl. Schema 3-3). Zunächst addiert sich das Triphenylphosphin unter Stickstoffabspaltung an den Azidsubstituenten und es bildet sich das 2-Hydroxyiminophosphoran **a**). Dem folgt ein intramolekularer Angriff der Hydroxygruppe auf die Phosphor-Stickstoff-Doppelbindung und somit die Entsehung von 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidin **b**). Nach der Öffnung der P-N-Bindung cyclisiert **b**) unter Inversion der Konfiguration an C3 zum Aziridinring.^[98]



Schema 3-3: Mechanismus der Staudinger-Reaktion zum *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat.

Die Darstellung des benötigten *anti*-($2R,3S$)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinats geschieht in einer zweistufigen Reaktion, ausgehend vom kommerziell erhältlichen ($2R,2R$)-Diethyltartrat. Zunächst erfolgt die Umsetzung mit Thionylchlorid zum Dioxathiolan^[99] und anschließend eine S_N2 -Reaktion mit Natriumazid unter Abspaltung von Schwefeldioxid zum Azidoalkohol mit einer Gesamtausbeute von 89 %.^[100-105]

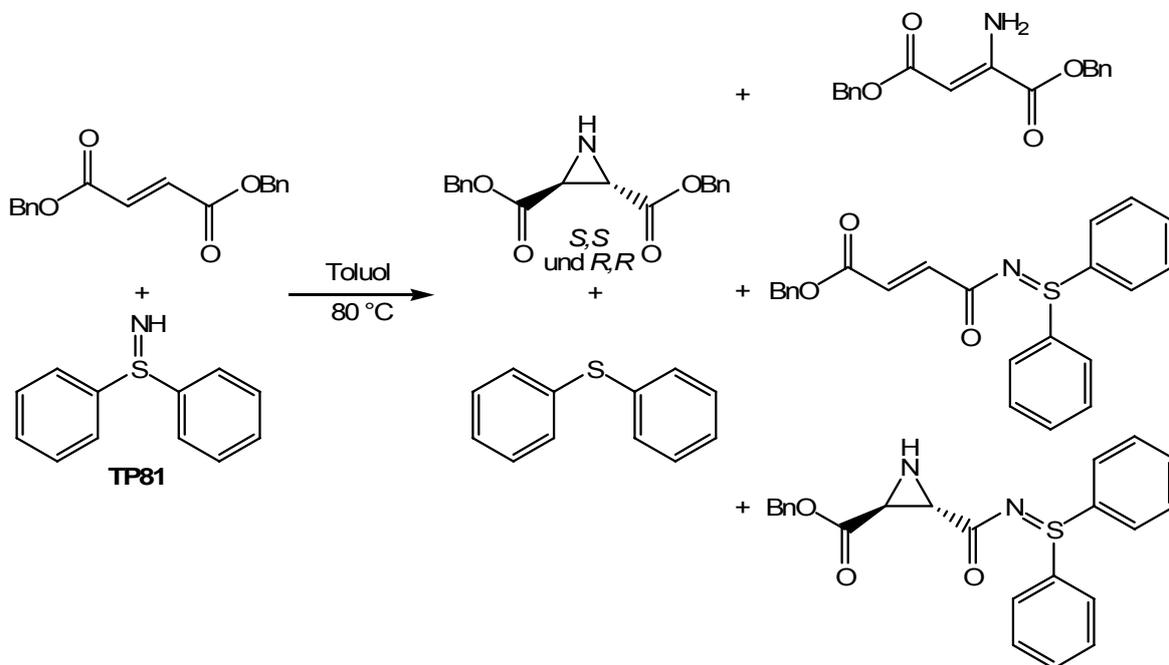


Schema: 3-4: Darstellung des ($2S,3R$)-Azidoalkohols aus ($2R,2R$)-Diethyltartrat.

3.1.3 Synthese von Aziridin-Bausteinen mit DPSI

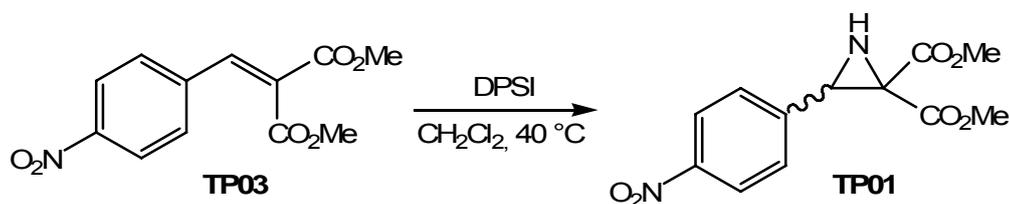
Eine einfache Methode zur Darstellung von *trans*-konfigurierten Aziridinen ist die Reaktion von Diphenylsulfimin (DPSI) mit Fumarsäurederivaten. Bei diesem Verfahren findet im ersten Reaktionsschritt eine Michael-Addition an die Doppelbindung des Fumarats statt. Anschließend folgt unter der Stabilisierung des intermediär gebildeten Enols und der Eliminierung des Diphenylsulfids die Ringbildung des Aziridins. Bedingt durch die

Reaktionstemperatur von 80 °C entsteht neben dem gewünschten Produkt jedoch eine Reihe von Nebenprodukten (vgl. Schema 3-5). In der Literatur werden Ausbeuten des Racemats von 25-35 % angegeben, die Nebenprodukte sind hauptsächlich Enamin oder DPSI-Addukte.^[106, 107]



Schema 3-5: Reaktion von Dibenzylfumarat mit DPSI.

Verwendet man mildere Reaktionsbedingungen, wie Refluxieren bei 40 °C in Dichlormethan, gelingen bei der Umsetzung von Dimethyl-2-(4-nitrobenzyliden)malonat (**TP03**) mit DPSI zu Dimethyl-3-(4-Nitrophenyl)aziridin-2,2-dicarboxylat (**TP01**) Ausbeuten von bis zu 86 %.^[108]



Schema 3-6: Synthese des Aziridins **TP01** ausgehend von **TP03**.

3.2 Synthese von Epoxidbausteinen

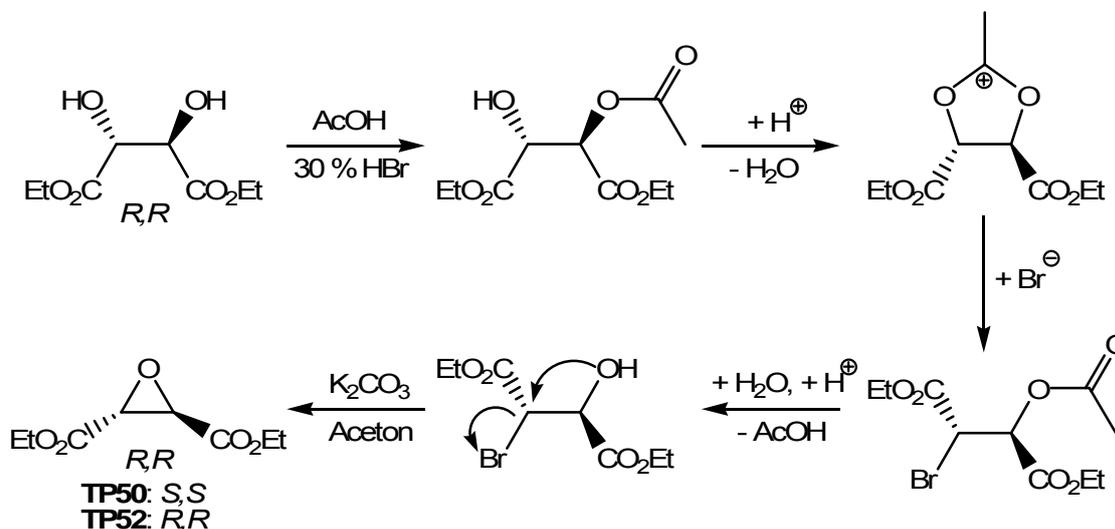
Epoxide sind sehr vielseitige Intermediate, welche bei der Synthese von komplexeren organischen Strukturen verwendet werden. Häufig findet eine Darstellung über die

Oxidation von Doppelbindungen, mit beispielsweise *m*-CPBA,^[109] statt. Diese verläuft meist unselektiv und daher sind andere Methoden, wie z.B. die Sharpless-Epoxidierung^[110] oder die Jacobsen-Epoxidierung,^[111] vorzuziehen.

Zur selektiven Darstellung von *trans*-konfigurierten Oxiran-2,3-dicarboxylaten wird in dieser Arbeit eine Synthese ausgehend von Weinsäure gewählt, die Darstellung von Oxiran-2,2-dicarboxylaten findet durch Oxidation von Maleaten mit Natriumhypochlorid statt.

3.2.1 Synthese *trans*-konfigurierter Oxiran-2,3-dicarboxylate aus Tartraten

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen D- bzw. L-Diethyltartrat findet zunächst in einem Bromwasserstoffsäure-Eisessig-Gemisch eine Mono-Acetylierung statt. Unter Säurekatalyse bildet sich intermediär das cyclische 1,3-Dioxolan-2-ylum-Ion, welches mit Bromid zu 2-Acetoxy-3-bromsuccinat reagiert. Nach der Hydrolyse mit HBr/Eisessig zum 2-Brom-3-hydroxysuccinat erfolgt der Ringschluss zum Epoxid im basischen Milieu.^[112] Als Base wurde Kaliumcarbonat in wasserfreiem Aceton verwendet. In der Literatur kommt auch Natriummethanolat als Base zum Einsatz.^[113, 114]



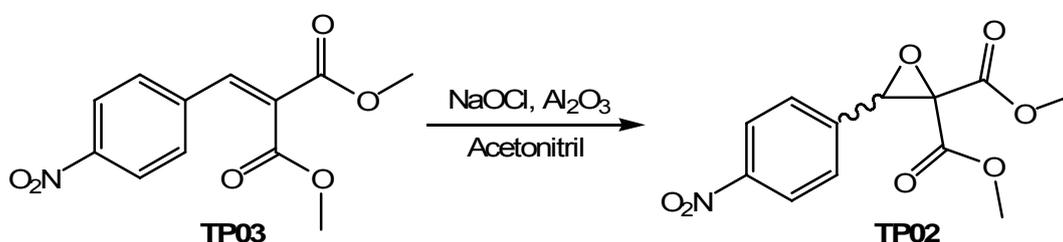
Schema 3-7: Synthese *trans*-konfigurierter Oxiran-2,3-dicarboxylate aus Tartrat.

Wenn man als Edukt das L-(+)-Diethyltartrat verwendet, liefert die dreistufige Reaktion (vgl. Schema 3-7) das (*R,R*)-Diethyl-oxiran-2,3-dicarboxylat (TP52), beim D-(-)-Diethyltartrat das entsprechende (*S,S*)-konfigurierte Produkt (TP50). Die Ausbeuten

variieren von 45 % (*R,R*) zu 52 % (*S,S*). Auf die gleiche Weise konnte das Dimethyl-(2*S*,3*S*)-oxiran-2,3-dicarboxylat (**TP05**) mit einer Ausbeute von 45 % dargestellt werden.

3.2.2 Synthese von Oxiran-2,2-dicarboxylaten aus Malonat

Sind Alkene geminal mit zwei Elektronen-ziehenden Gruppen (wie z.B. Estern) substituiert, lassen sich daraus unter milden Bedingungen Epoxide darstellen. Vermittelt durch Aluminiumoxid als Katalysator und Natriumhypochlorid als oxidierendes Agens reagiert das eingesetzte Olefin schon bei Raumtemperatur.^[115]



Schema 3-8: Oxidation von Dimethylmaleat zum Oxiran-2,2-dicarboxylat mit Natriumhypochlorid.

Die Umsetzung von Dimethyl-2-(4-nitrobenzyliden)malonat (**TP03**) zu den o.g. Bedingungen (vgl. Schema 3-8) liefert das entsprechende Dimethyl-3-(4-nitrophenyl)oxiran-2,2-dicarboxylat (**TP02**) in Ausbeuten bis zu 36 %.

3.2.3 Synthese von Tetracyanoethylenoxid (TP04) aus Tetracyanoethylen

Früheren Beobachtungen zufolge entsteht aus α,β -ungesättigten Nitrilen mit mehreren Elektronen-ziehenden Gruppen in Gegenwart von alkalischem Wasserstoffperoxid unweigerlich das Epoxyamid als Hauptprodukt. Im Gegensatz dazu findet die Oxidation von Tetracyanoethylenoxid mit Wasserstoffperoxid ohne weitere Zugabe von Base recht zügig statt.^[116]

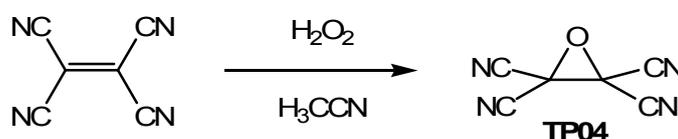


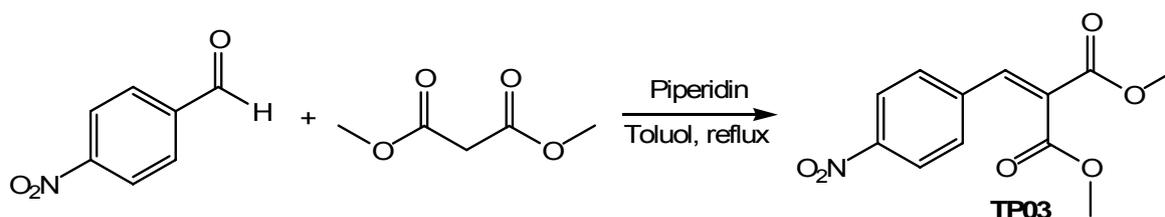
Abb. 3-9: Oxidation von Tetracyanoethylen mit Wasserstoffperoxid.

Die langsame Zugabe von 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung zu Tetracyanoethylen in gekühltem Acetonitril liefert glatt das Tetracyanoethylenoxid **TP04** mit einer Ausbeute von 51 %.

3.3 Synthese von Michael-Akzeptoren

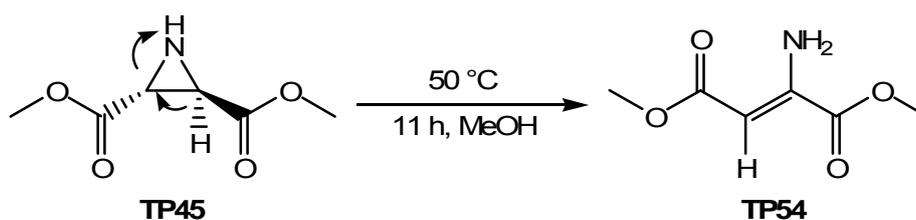
Gängige Michael-Systeme, die an eine Aminosäure oder ein Peptid geknüpft werden sollen, sind in der Regel in Form von beispielsweise Zimtsäure oder Crotonsäure kommerziell erhältlich.

Ein gängiges Verfahren zur Darstellung von Michael-Systemen ist die Knoevenagel-Kondensation. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Variante der Aldolreaktion, bei der C-H-acide Verbindungen (z.B. Malonsäureester) mit Aldehyden oder Ketonen umgesetzt werden. Als Katalysator wird meist ein Amin wie beispielsweise Piperidin verwendet. Bei der Reaktion von Malonsäurediethylester und *p*-Nitrobenzaldehyd entsteht so das kristalline Produkt **TP03** in guten Ausbeuten von 70 %.^[117]



Schema 3-10: Knoevenagel Kondensation zu **TP03**.

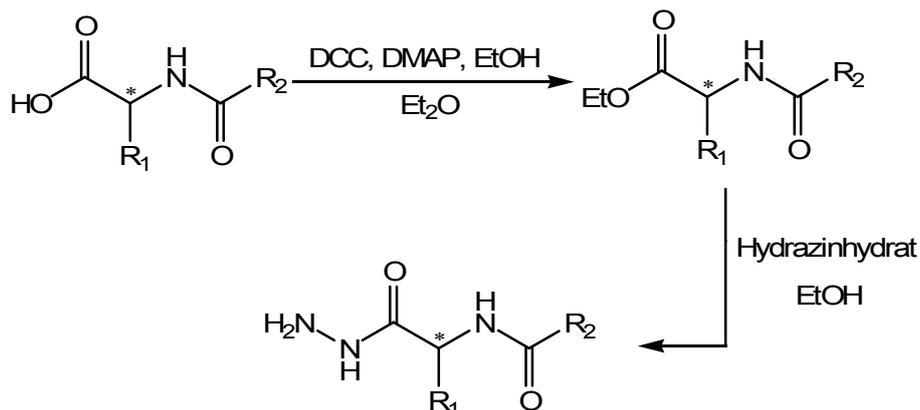
Wie in Abschnitt 3.1.3 bereits behandelt, entstehen in Folge der Reaktionsbedingungen, bei der Aziridinsynthese mit DPSI eine Reihe von Nebenprodukten. Mit 50 % den größten Anteil daran hat das Enamin.^[107] Erwärmt man eine Lösung des Dimethyl-aziridin-2,3-dicarboxylats (**TP45**) auf Temperaturen von ca. 50 °C, erfolgt der Ringöffnungsprozess und das Dimethyl-2-aminofumarat (**TP54**) kann durch säulenchromatische Aufarbeitung mit einer Ausbeute von 78 % isoliert werden.



Schema 3-11: Ringöffnung des Aziridins-2,3-dicarboxylats zum Enamin.

3.4 Synthese verschiedener Aminosäure-Hydrazide

Azaaminosäuren sind eine interessante Klasse von Aminosäurederivaten. Sie dienen beispielsweise als Vorstufen von 1,2,3-Oxadiazolen und sind durch eine Umsetzung von Aminosäureestern mit Hydrazinhydrat in einer einfachen Synthese zugänglich. Dazu muss zunächst der Ester über eine DCC-Kupplung aus der entsprechenden Aminosäure generiert werden, um eine geeignete Abgangsgruppe zu erhalten.^[118]



Schema 3-12: Darstellung von unsubstituierten Aminosäurehydraziden.

Tabelle 3-13: Übersicht über die synthetisierten Aminosäurehydrazide.

Name	R ₁	R ₂	Ausbeute
H ₂ N-NH-L-Val-ICA (TP59)	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	46 %
H ₂ N-NH-L-Phe-ICA (TP60)	-CH ₂ -Ph	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	91 %
H ₂ N-NH-L-Leu-ICA (TP61)	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	100 %
H ₂ N-NH-D-Phe-BOC (TP64)	-CH ₂ -Ph	-O-C(CH ₃) ₃	77 %
H ₂ N-NH-D-Leu-BOC (TP65)	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-O-C(CH ₃) ₃	79 %
H ₂ N-NH-L-Phe-BOC (TP66)	-CH ₂ -Ph	-O-C(CH ₃) ₃	39 %
H ₂ N-NH-L-Val-BOC (TP67)	-CH(CH ₃) ₂	-O-C(CH ₃) ₃	66 %
H ₂ N-NH-L-Leu-BOC (TP68)	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-O-C(CH ₃) ₃	69 %
H ₂ N-NH-L-Pro-BOC (TP69)	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N	-O-C(CH ₃) ₃	54 %
H ₂ N-NH-L-Ile-BOC (TP70)	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃	-O-C(CH ₃) ₃	100 %

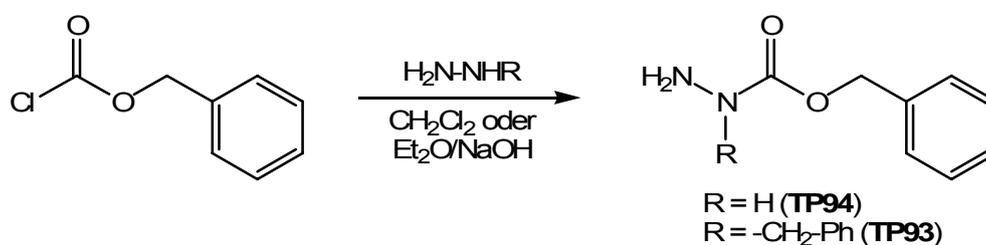
Je nach Aminosäurerest gelingt die Synthese in unterschiedlich guten Ausbeuten zwischen 39 % und 100 % (vgl. Tabelle 3-13). Der *N*-Terminus der Aminosäure ist dabei entweder *tert*-Butoxycarbonyl geschützt oder mit 4-Methylvaleriansäure (Isocaproensäure,

ICA) versehen. Synthesen mit Alanin als Aminosäure waren trotz der Variation des Kupplungsreagens (DCC oder CDI) nicht erfolgreich.^[119]

In der Literatur wird eine weitere Derivatisierung des Hydrazin-Stickstoffs erst nach der Kupplung mit einer weiteren Aminosäure, einem Epoxid oder Michael-System durchgeführt. Dies kann entweder durch reduktive Aminierung mit dem entsprechenden Aldehyd oder durch Alkylierung durchgeführt werden.^[120]

Als neuer Ansatz wurde versucht, eine Reihe von substituierten Aminosäurehydraziden aus kommerziell erhältlichen Hydrazinderivaten zu synthetisieren. Bei der Umsetzung von Methylhydrazin bzw. 2-Hydroxyethylhydrazin mit diversen Aminosäuren (Ala, Leu, Phe, Val) konnte jedoch keinerlei Hydrazid isoliert werden. Auch eine Umsetzung mit eigens hergestelltem Benzylhydrazin führte nicht zum gewünschten Produkt. Möglicherweise sinkt durch eine Substitution am Hydrazin dessen Reaktivität und verhindert so eine weitere Reaktion. Eine Alkylierung sollte demnach erst nach der Kupplungsreaktion an den nächsten Baustein erfolgen.

Eine andere Route bei der Hydrazin-Derivat-Synthese ist die Umsetzung des Hydrazins mit Benzylchloroformiat. Die Umsetzung erfolgte direkt mit Hydrazinhydrat bzw. dem eigens hergestellten *N*-Benzylhydrazin in Dichlormethan^[121] bzw. Diethylether/NaOH^[118] und lieferte eine Ausbeute von 74 % für das unsubstituierte Hydrazin und 83 % für das *N*-Benzylhydrazin.



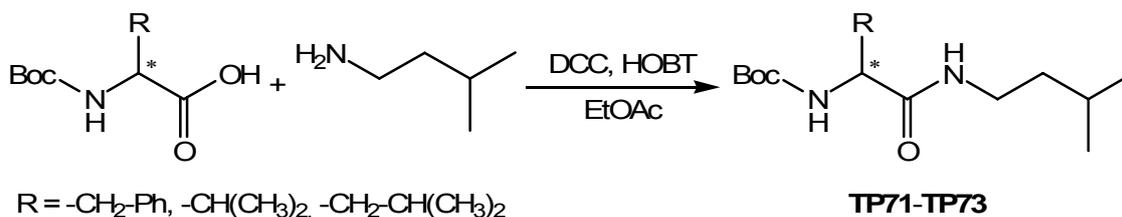
Schema 3-14: Hydrazincarbonsäurebenzylester **TP94** und *N*-Benzylhydrazincarbonsäurebenzylester **TP93**.

Die beiden Moleküle **TP93** und **TP94** (vgl. Schema 3-14) stellen die Hydrazid-Derivate der Aminosäuren Glycin und Phenylalanin dar, bei denen das α -Kohlenstoff- durch ein Stickstoffatom ersetzt wurde. Sie sind deshalb interessante Ausgangsverbindungen für die weitere Kupplung an eine nucleophile Gruppe, wie beispielsweise an das 1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-Lithiumsalz (**TP48**). Somit ließe sich ein Vergleich zum o.g. Aziridin **BDA-07** (vgl. Abb. 2-2) ziehen.

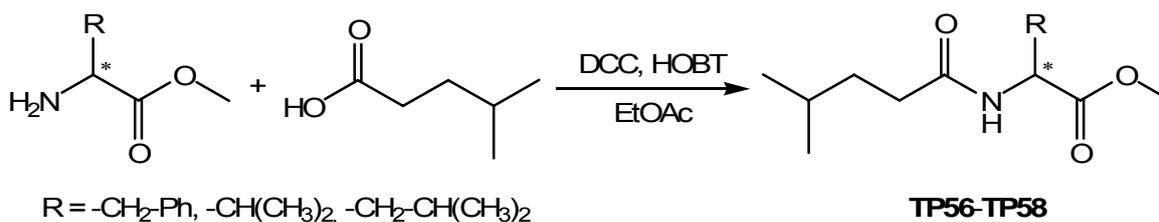
3.5 Peptidkupplungsreaktionen

3.5.1 Verschiedene Peptidkupplungsverfahren

Proteine bestehen aus über Amidbindungen verknüpften Aminosäuren. Aus diesem Grund ist es für die Synthese organischer Verbindungen nach dem Vorbild der Natur notwendig, Wege zur Ausbildung einer Peptidbindung zu kennen. Die unzähligen Methoden haben eines gemeinsam: die Aktivierung der Carboxylgruppe einer Carbon- oder Aminosäure. Dieses Ziel kann auf verschiedene Arten erreicht werden.^[122] Es lassen sich reaktive Intermediate der Carbonsäure wie Säurechloride mit Thionylchlorid oder gemischte Anhydride mit *iso*-Butylchloroformiat einfach darstellen. Eine weitere Klasse erfolgreicher Kupplungsreagentien sind die Carbodiimide mit ihrem bedeutendsten Vertreter Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (vgl. Schemata 3-15 und 3-16). Dieser wird häufig mit anderen Hilfsreagenzien wie *p*-Dimethylaminopyridin (DMAP) oder *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBT) eingesetzt.^[123]



Schema 3-15: Peptidkupplung diverser BOC-geschützter Aminosäuren an Isoamylamid.



Schema 3-16: Peptidkupplung diverser Aminosäureester an 4-Methylvaleriansäure.

Ebenfalls zur Gruppe der Benzotriazole gehört *o*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU),^[124] welches nur zur geringen Racemisierung führt. Als weitere nützliche Kandidaten zur Aktivierung von Carbonsäuren zur Peptidkupplung haben sich Phosphor-haltige Reagenzien erwiesen. Zum einen das Diphenylphosphorylazid (DPPA),^[125] welches vielfältige Anwendungen in der organischen Synthese findet, zum anderen bietet das cyclische Propylphosphonsäureanhydrid

(PPA)^[126] große Vorteile durch geringe Reaktionsdauer und bei der Aufarbeitung (vgl. Abb. 3-17).

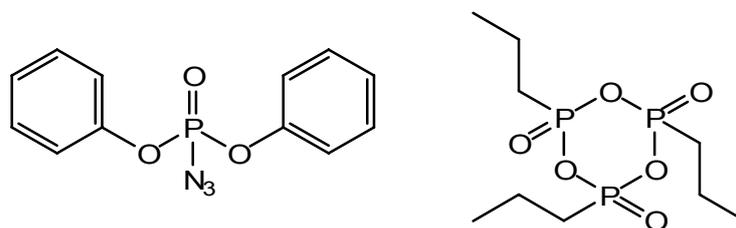


Abb. 3-17: DPPA (links), PPA (rechts).

Durchgeführte Reaktionen verschiedener Aminosäuren mit entweder ICA oder IAA vermittelt durch DCC und HOBT in Ethylacetat als Kupplungsreagenzien führten zu Ausbeuten zwischen 28 % und 84 %, wobei die durchschnittliche Ausbeute bei 70 % liegt (vgl. Tabelle 3-18). Die dargestellten Verbindungen dienen als Vorstufe für die entsprechenden Hydrazide bzw. deren Vergleichssubstanzen, welche im Anschluss an ein Aziridin-, Epoxid- oder Michael-Akzeptor gekuppelt werden sollen.

Tabelle 3-18: Ausbeuten der ICA- (Isocapronsäure) und IAA-Kupplungen (Isoamylamid).

Name	Ausbeute
ICA-L-Val-OMe (TP56)	70 %
ICA-L-Phe-OMe (TP57)	77 %
ICA-L-Leu-OMe (TP58)	84 %
BOC-L-Phe-IAA (TP71)	28 %
BOC-L-Val-IAA (TP72)	80 %
BOC-L-Leu-IAA (TP73)	83 %

Die Wahl des geeigneten Kupplungsreagenzes hängt von der Reaktivität und Löslichkeit der Edukte im verwendeten Lösungsmittel ab.

3.5.2 Aminosäure-verknüpfte Aziridine

Die Aziridine **BDA-07** und **BDA-08** (vgl. Abb. 3-19) wurden in der eigenen Arbeitsgruppe als Inhibitoren gegen Aspartat-Proteasen entwickelt und zeigen sehr gute Hemmeigenschaften an Cathepsin D und SAP2.^[65] Aus diesem Grund ist es ein interessantes Vorhaben, deren Azapeptid-Derivate darzustellen, um möglicherweise die Hydrolyse-

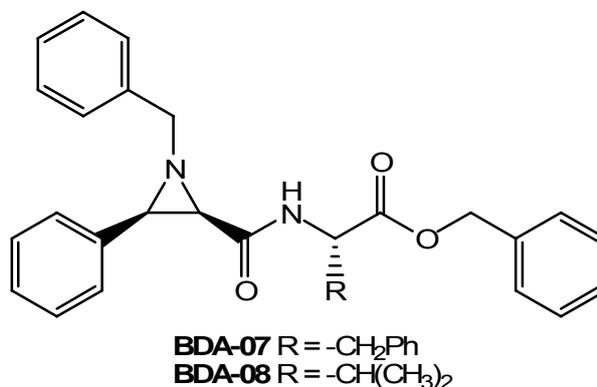
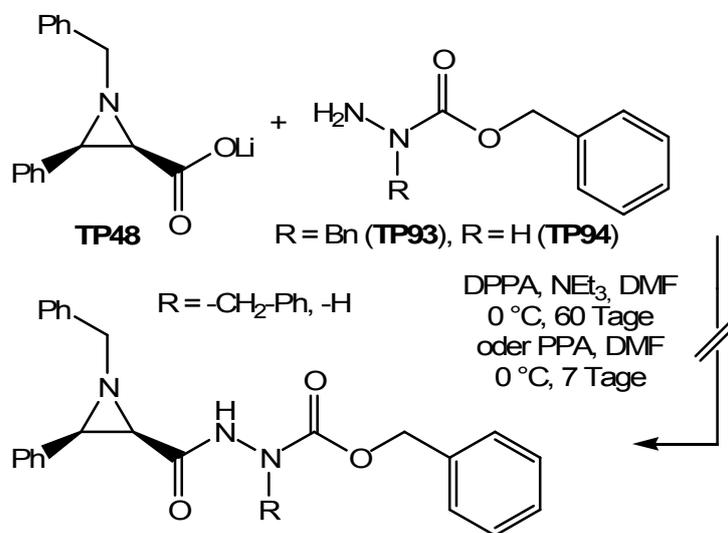


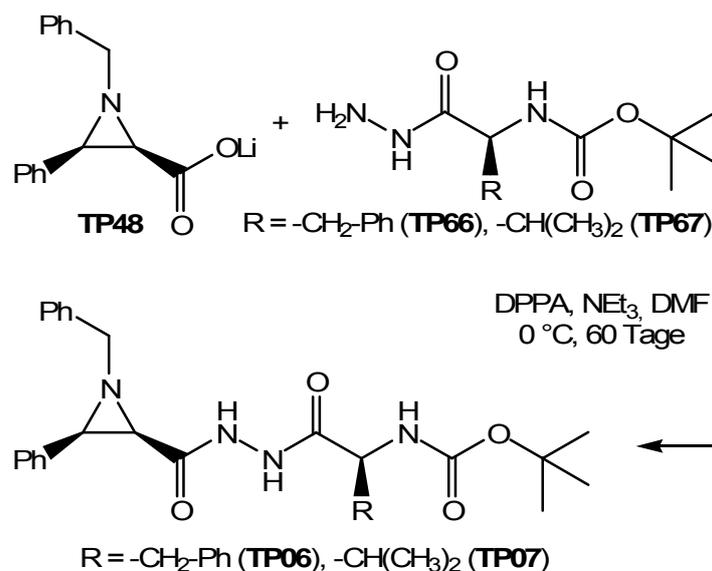
Abb. 3-19: Aziridine **BDA-07** und **BDA-08**.

beständigkeit der Peptidbindung und somit die Bioverfügbarkeit zu verbessern. Die Aza-Analoga von Glycin und Phenylalanin (**TP93** und **TP94**, vgl. Kapitel 3.4) sollen dazu über eine DPPA-vermittelte Kupplung an die elektrophile Kopfgruppe (**TP48**) geknüpft werden. Eine Isolierung der gewünschten Produkte gelang jedoch nicht. Ebenso brachte der Einsatz von PPA als Kupplungsreagenz keinen Erfolg (vgl. Schema 3-20).



Schema 3-20: Versuchte Kupplung zum Aziridinhydrazid.

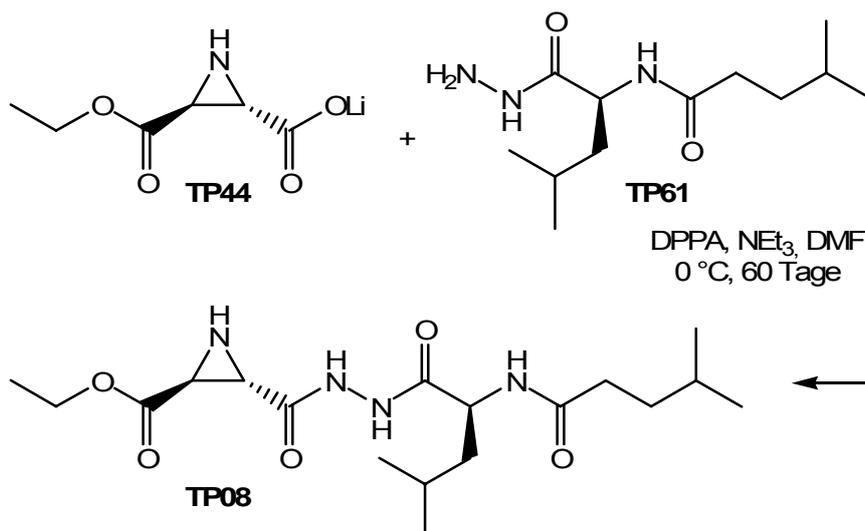
In der nächsten Versuchsreihe wird BOC-geschütztes Aza-Phenylalanin und Aza-Valin verwendet. Der Unterschied zu den vorher verwendeten Hydraziden ist, dass diesmal das Hydrazid am C-Terminus der Aminosäure sitzt.



Schema 3-21: DPPA-vermittelte Kupplung des Aziridins **TP48** und zwei Azaaminosäuren.

Ohne den Benzylester in direkter Nachbarschaft zur Hydrazid-Funktion, führt die Methode der DPPA-Kupplung zu den gewünschten Produkten. Das Phenylalanin-Derivat (**TP06**) kann mit einer Ausbeute von 18 % und das Valin-Derivat (**TP07**) mit 74 % isoliert werden (vgl. Schema 3-21).

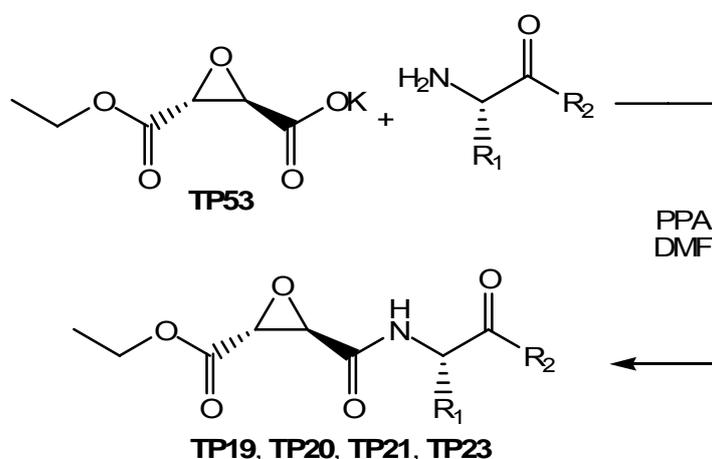
Ebenfalls zum gewünschten Produkt führt die DPPA-vermittelte Kupplung bei der Darstellung von **TP08**, das Aziridin-Derivat des Aza-E64d Analogons. Befindet sich, wie in Schema 3-22 gezeigt eine Isocapronsäure als Endruppe am Leucin-Hydrazid, so liefert die Reaktion mit dem Monoethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat-Lithiumsalz Ausbeuten von 69 %.



Schema 3-22: Darstellung des Aziridins **TP08**.

3.5.3 Aminosäure verknüpfte Epoxide

Zur Reihe der Epoxysuccinyl-Inhibitoren gehören einige wirksame Vertreter wie beispielsweise das E-64d (vgl. Kapitel 1.1.3.1).^[25] Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Derivate über die PPA vermittelte Kupplung dargestellt (vgl. Schema 3-23). Das mit verschiedenen Aminosäuren verknüpfte Oxiran besitzt (*R,R*)-Konfiguration, im Gegensatz zum natürlichen Vorbild, welches (*S,S*) konfiguriert ist. Dies soll zur besseren Vergleichbarkeit mit den später synthetisierten Azapeptiden dienen, die durch die Kupplung über dem C-Terminus eine invertierte Aminosäuresequenz besitzen.



Schema 3-23: Allgemeine Darstellung von Aminosäure verknüpften Epoxysuccinaten.

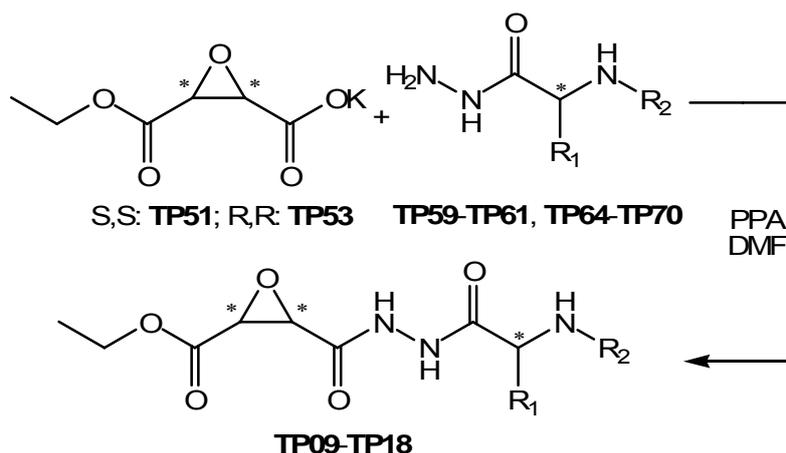
Die Kupplung des Oxirans mit verschiedenen Aminosäurederivaten gelang mit Ausbeuten von 10-69 % (vgl. Tabelle 3-24). Hierbei erwies sich der Einsatz des Kupplungsreagenz PPA in DMF als einfache und elegante Methode. Die Isolierung der gewünschten Produkte erfolgte nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Tabelle 3-24: Übersicht über die synthetisierten Aminosäureepoxide.

Name	Epoxid	R ₁	R ₂	Ausbeute
TP19	<i>R,R</i>	L-Phe	IAA	10 %
TP20	<i>R,R</i>	L-Val	IAA	16 %
TP21	<i>R,R</i>	L-Leu	IAA	58 %
TP23	<i>R,R</i>	L-Phe	OBn	69 %

IAA = Isoamylamid

Als nächster Schritt schloss sich die Synthese der Aza-Analoga der Epoxysuccinate an. Auch hier wurde hauptsächlich das (*R,R*)-Epoxid eingesetzt, allerdings zu Vergleichszwecken in zwei Fällen auch das (*S,S*)-Derivat (vgl. Schema 3-25). Bei den peptidischen Substituenten variierte in diesem Fall nicht nur der Aminosäurerest (Phe, Val, Leu), sondern auch dessen Stereozentrum (L- bzw. D-Konfiguration) und die Endgruppe (BOC, ICA) (vgl. Tabelle 3-26).



Schema 3-25: Allgemeine Darstellung von Hydrazid-verknüpften Epoxysuccinaten.

Tabelle 3-26: Übersicht über die synthetisierten Azaaminosäureepoxide.

Name	Epoxid	R ₁	R ₂	Ausbeute
TP09	<i>R,R</i>	L-Phe	BOC	37 %
TP10	<i>R,R</i>	L-Val	BOC	17 %
TP11	<i>R,R</i>	L-Leu	BOC	44 %
TP12	<i>R,R</i>	D-Phe	BOC	36 %
TP13	<i>R,R</i>	D-Leu	BOC	37 %
TP14	<i>R,R</i>	L-Phe	ICA	29 %
TP15	<i>R,R</i>	L-Val	ICA	17 %
TP16	<i>R,R</i>	L-Leu	ICA	52 %
TP17	<i>S,S</i>	L-Phe	ICA	56 %
TP18	<i>S,S</i>	L-Leu	ICA	51 %

BOC = *tert*-Butoxycarbonyl, ICA = Isocapronsäure

Bei der Darstellung der Epoxysuccinylhydrazide erwies sich, im Gegensatz zu den Aziridinhydraziden, erneut PPA in DMF als zuverlässige Methode. Die Kupplung lieferte nach säulenchromatischer Aufreinigung Ausbeuten zwischen 17 % und 56 %.

Die Synthesen mit Valin-Derivaten führten dabei mit jeweils 17 % immer zu mäßigeren Ausbeuten. Der Einsatz von Phenylalanin oder Leucin hat offensichtlich ebenso wie die Variation des Stereozentrums und eine Änderung der Endgruppe keinen erheblichen Einfluss auf das Reaktionsergebnis.

3.5.4 Aminosäure verknüpfte Michael-Systeme

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bislang einige Verbindungen mit Michael-Akzeptor dargestellt. Sie tragen einerseits stets ein L-Phe-OBn-Motiv, variieren aber bei weiteren Substituenten direkt am Olefin (vgl. Abb. 3-27).

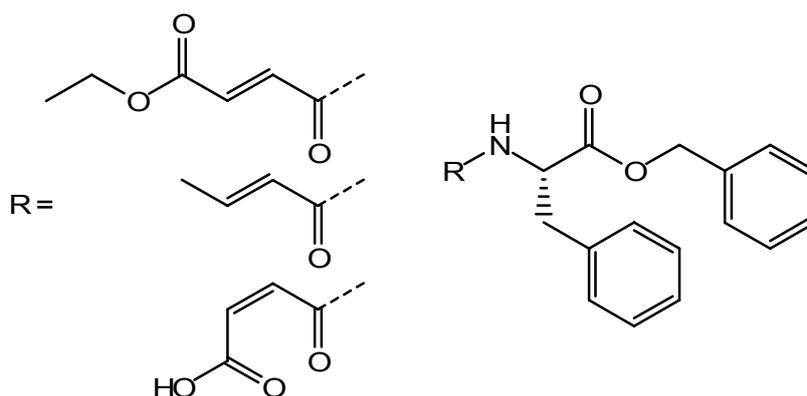
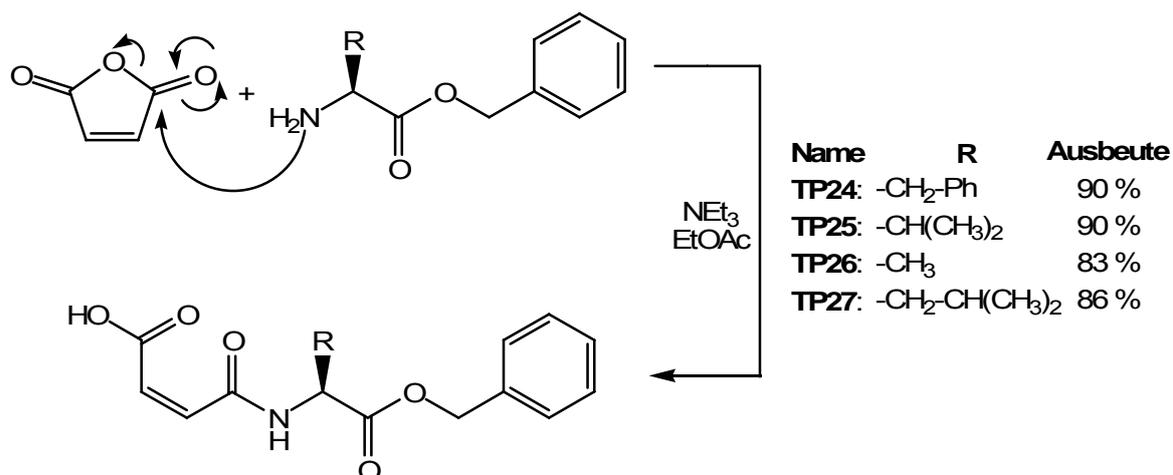


Abb. 3-27: Verschiedene Michael-Systeme mit L-Phe-OBn Motiv.

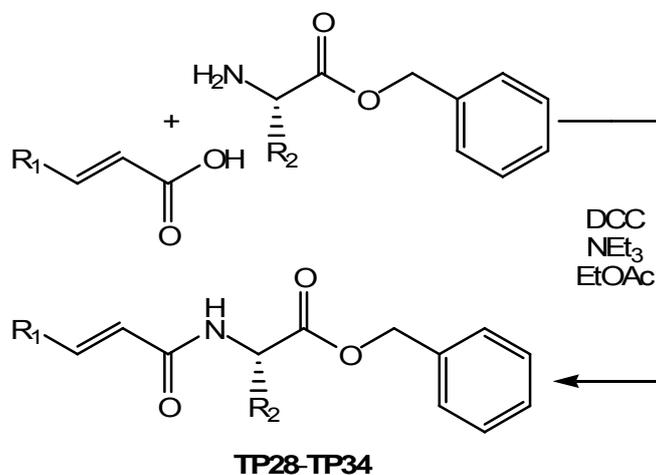
Jedoch zeigten sie nur schwache bis keine Aktivität in diversen Enzym-Tests.^[65] Durch eine Veränderung der Aminosäure oder des Michael-Systems sollen zunächst deren Inhibitions-Eigenschaften verbessert und anschließend die Aza-Analoga dargestellt werden.

Inhibitoren mit einem Michael-System als elektrophile Kopfgruppe tragen in der Regel eine *E*-konfigurierte Doppelbindung.^[38] Zu Vergleichszwecken wurden diverse Derivate mit *Z*-Doppelbindung dargestellt. Eine einfache Möglichkeit, eine *Z*-konfigurierte Doppelbindung zu erhalten, ist eine Umsetzung der Benzyl-geschützten Aminosäure mit Maleinsäureanhydrid (vgl. Schema 3-28). Die Addition der Aminosäureester Alanin-, Valin-, Leucin- und Phenylalaninbenzylester an das Anhydrid zum Maleat gelang unter basischen Bedingungen in sehr guten Ausbeuten von 83-90 %.



Schema 3-28: Synthese Aminosäure-verknüpfter Michael-Systeme mit Z-Konfiguration.

Die Kupplung von Michael-Systemen mit *E*-Doppelbindung an unterschiedliche Aminosäuren wurde über eine DCC-vermittelte Methode durchgeführt. Als Olefine kamen die kommerziell erhältlichen Carbonsäuren Crotonsäure, Monoethylfumarsäure und Zimtsäure zum Einsatz. Die Wahl der Aminosäureester beschränkte sich auf die bereits oben genannten Alanin-, Valin-, Leucin- und Phenylalaninbenzylester.



Schema 3-29: Kupplung von Aminosäuren an verschiedene ungesättigte Carbonsäuren.

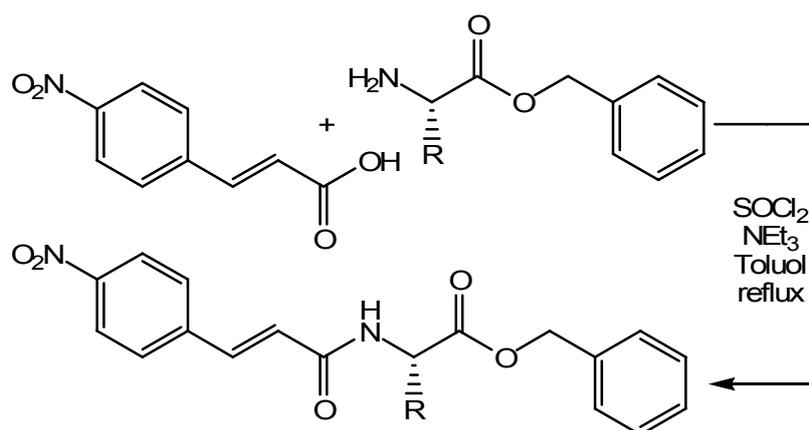
Die DCC-Kupplung führte in den meisten Fällen zum gewünschten Produkt. Die Umsetzungen mit Crotonsäure hingegen erwiesen sich als schwierig. In diesen Fällen sollte auf eine andere Kupplungsmethode zurückgegriffen werden. Die Isolierung kleiner Mengen des Produkts gelang nur über die präparative HPLC. Auf eine Aufreinigung der Verbindungen in größerem Maßstab wurde aufgrund der Screening-Ergebnisse (vgl.

Kapitel 4.6) verzichtet. Die Ausbeuten sind in Tabelle 3-30 angegeben und bewegen sich zwischen 30 % und 92 %.

Tabelle 3-30: Übersicht der synthestierten *E*-Olefine.

Name	R ₁	R ₂	Ausbeute
TP28	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	51 %
TP29	-CO ₂ Et	-CH(CH ₃) ₂	37 %
TP30	-CO ₂ Et	-CH ₃	85 %
TP31	-CO ₂ Et	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	92 %
TP32	-Ph	-CH ₂ Ph	50 %
TP33	-Ph	-CH(CH ₃) ₂	50 %
TP34	-Ph	-CH ₃	30 %

Die Doppelbindung im Michael-Akzeptor ist die entscheidende Funktion, wenn es um die Desaktivierung eines Enzyms geht. Aus diesem Grund soll eine Substitution am konjugierten Aromaten mit Elektronen-ziehenden bzw. Elektronen-schiebenden Gruppen zeigen, ob diese einen Einfluss auf die Doppelbindung und somit die Hemmeigenschaften haben. Als elektronenarme Carbonsäure wurde *p*-Nitrozimtsäure und als elektronenreiche Carbonsäure *p*-Dimethylaminozimtsäure gewählt.

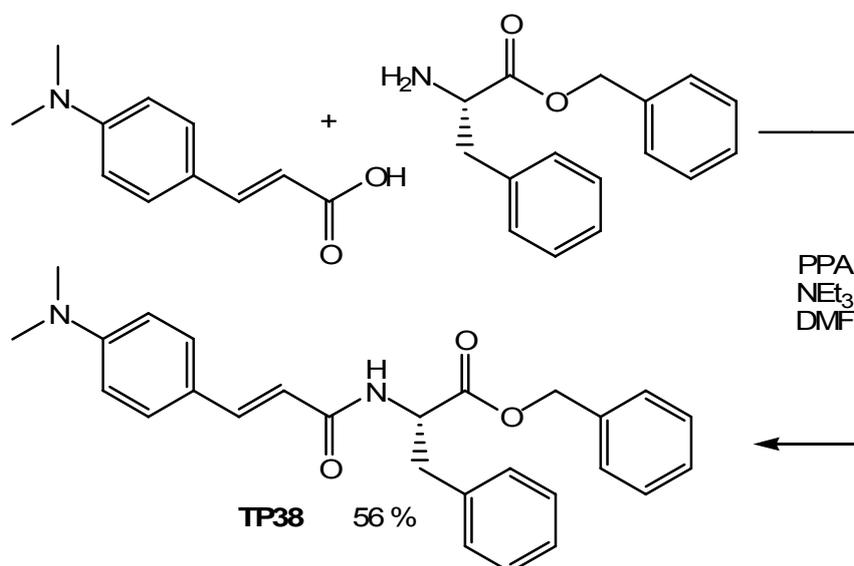


Name	R	Ausbeute
TP35:	-CH ₂ -Ph	90 %
TP36:	-CH(CH ₃) ₂	55 %
TP37:	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	59 %

Schema 3-31: Darstellung von Aminosäure-verknüpften 4-Nitrophenyl-Michael-Systemen.

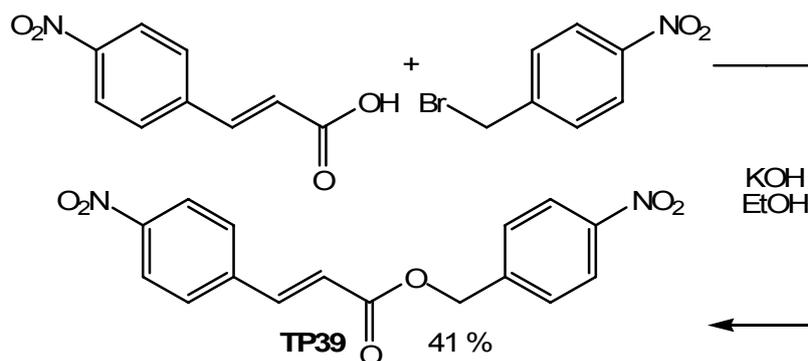
Die Kupplung der *p*-Nitrozimtsäure an verschiedene Aminosäuren wurde nach einer in der Literatur bekannten Methode^[127] durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Aktivierung der Carbonsäure unter der Verwendung von Thionylchlorid. Diese Methode mit drastischeren Reaktionsbedingungen wurde gewählt, da es sich bei *p*-Nitrozimtsäure um eine schwerlösliche Verbindung handelt. Die Umsetzung des intermediär erzeugten Säurechlorids mit Phenylalanin-, Valin- und Leucinbenzylester führte zu Ausbeuten zwischen 55 % und 90 % (vgl. Schema 3-31).

Die Umsetzung von *p*-Dimethylaminozimtsäure mit Phenylalaninbenzylester über die bereits verwendete DCC- bzw. Thionylchlorid-Methode führte aufgrund der geringen Löslichkeit zu keiner Reaktion. Erst der Einsatz von PPA in DMF als Kupplungsreagenz ermöglichte, nach säulenchromatographischer Aufreinigung, die Isolierung des gewünschten Produkts mit einer Ausbeute von 56 % (vgl. Schema 3-32).



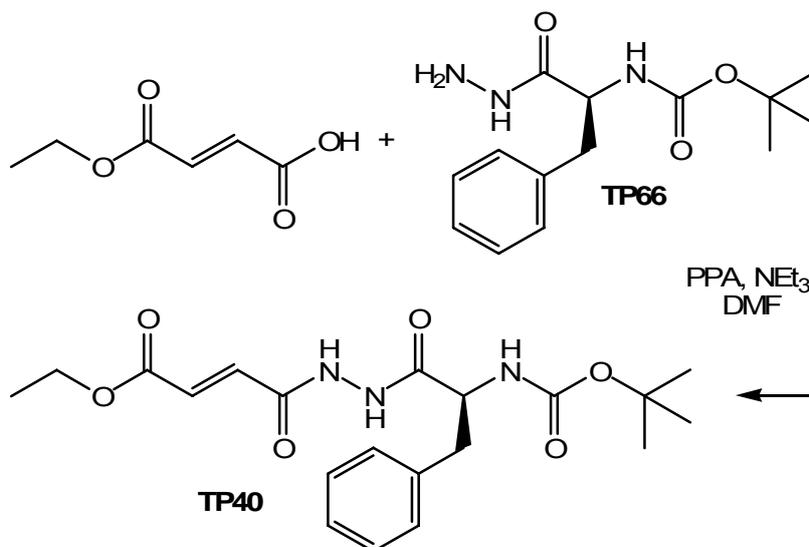
Schema 3-32: Darstellung von **TP38**.

Eine weitere Verbindung in der Reihe der Zimtsäure-Derivate ist das **TP39**. Hier ist an die *p*-Nitrozimtsäure keine Benzyl-geschützte Aminosäure geknüpft, sondern es wurde direkt der *p*-Nitrobenzylester dargestellt. Dies gelang jedoch nicht mit *p*-Nitrobenzylalkohol und *p*-Toluolsulfonsäure am Wasserabscheider^[128] oder mit DCC/DMAP in verschiedenen Lösungsmitteln.^[129] Das gewünschte Produkt konnte erst durch eine Umsetzung mit *p*-Nitrobenzylbromid und Kaliumhydroxid^[130] mit 41 % Ausbeute isoliert werden (vgl. Abb. 3-33).



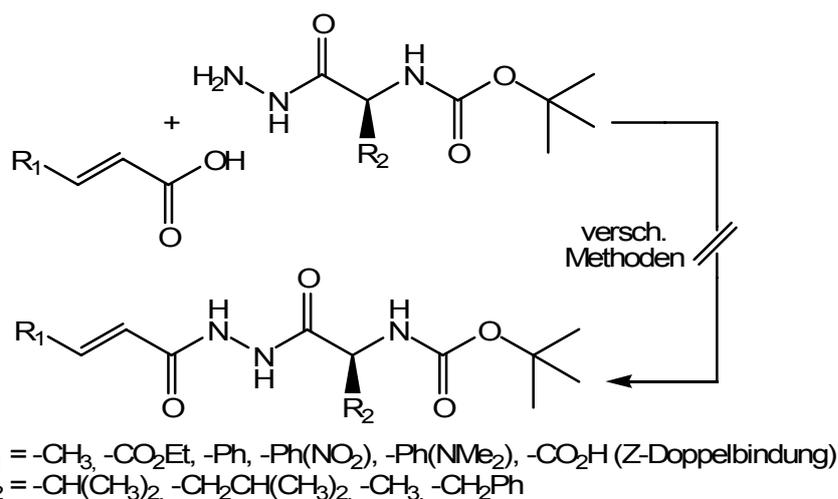
Schema 3-33: Darstellung von **TP39**.

Als weitere Vertreter von Michael-Akzeptor-substituierte Inhibitoren sollten die entsprechenden Aza-Analoga der oben genannten Doppelbindungssysteme dargestellt werden. Hierbei waren wie bereits erwähnt Crotonsäure, Monoethylfumarsäure, Zimtsäure, *p*-Nitrozimtsäure, *p*-Dimethylaminozimtsäure und Maleinsäureanhydrid als Michaelsysteme ausgewählt worden. Als Aza-Peptidkomponente wurden *tert*-Butoxycarbonyl geschützte Hydrazide von Alanin-, Valin-, Leucin- und Phenylalanin eingesetzt.



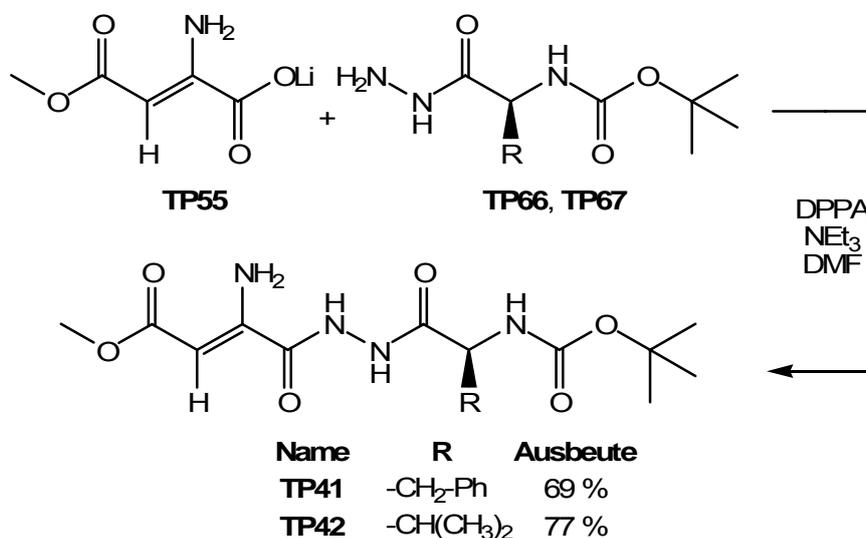
Schema 3-34: Darstellung von **TP40**.

Jedoch konnte lediglich in einer Kombination von Carbonsäure und Hydrazid das gewünschte Produkt **TP40** isoliert werden (vgl. Schema 3-34). Dies gelang nach PPA-Kupplung durch Aufreinigung mittels präparativer HPLC mit einer mäßigen Ausbeute von 13 %. Auch eine Variation der Kupplungsmethoden führte zu keiner Verbesserung. Als Kupplungsreagenzien wurden DCC/DMAP, DCC/HOBT, iBCF, EDC, DPPA, PPA oder Thionylchlorid verwendet. Alle anderen in Schema 3-35 gezeigten Versuche konnten mit den oben genannten Methoden nicht erfolgreich dargestellt werden.



Schema 3-35: Versuchte Darstellung verschiedener Aza-Michael-Systeme.

Ein anderes Michaelsystem, bei dem eine Verknüpfung mit BOC-Phe-Hydrazid oder BOC-Val-Hydrazid gelang, stellt das Methyl-2-aminofumarat-Lithium-Salz (**TP55**) dar (vgl. Schema 3-36). Über eine DPPA-vermittelte Kupplung wurden nach säulen-chromatographischer Aufreinigung Ausbeuten von 69 % bis 77 % erreicht.



Schema 3-36: Darstellung der Azapeptide **TP41** und **TP42**.

Die Hydrolyse des Dimethyl-2-aminofumarats **TP54** zum Lithium-Salz **TP55** findet stehts an C1-Position statt und wurde nach den Kupplungen mit **TP66** bzw. **TP67** mittels NMR-Spektroskopie bestätigt.

4. Enzym-Assays

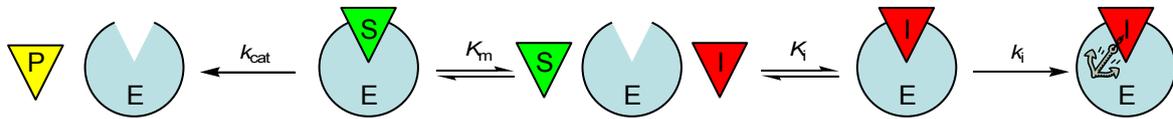
4.1 Einführung

Die in dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Verbindungen sind als Protease-Inhibitoren konzipiert. Dabei wird aufgrund der elektrophilen Bausteine erwartet, dass die Hemmung auf einer Alkylierung des aktiven Zentrums der Proteasen beruht. Der Cystein- bzw. Aspartat-Rest im katalytischen Zentrum bindet durch einen nucleophilen Angriff an einen elektrophilen Akzeptor (hier: Aziridin oder Epoxid). Es entsteht nach der Ringöffnung eine kovalente Bindung, damit sind diese Substanzen irreversible Hemmstoffe. Abhängig von der chemischen Struktur des Inhibitors kann es jedoch durch substratanaloge Peptidketten hier auch zu einer reversiblen Hemmung kommen. Ebenso können Inhibitoren mit einem nicht-kovalenten oder kovalent-reversiblen Hemmmechanismus eine pseudo-irreversible Hemmung vortäuschen. Eine Unterscheidung von einer tatsächlich irreversiblen Hemmung ist nur schwer möglich. Dies trifft auch zu, wenn sich im Hemmstoff ein Michael-Akzeptor als elektrophiler Baustein befindet.

Eine Möglichkeit zur Unterscheidung von reversibler und irreversibler Hemmung ist die Entfernung des Inhibitors durch Gelfiltration oder Dialyse. Liegt ein reversibler Mechanismus vor, steigt die Enzymaktivität wieder an, während bei irreversibler Hemmung ein Ansteigen der Aktivität nicht möglich ist. Zur Lösung der Fragestellung kann auch ein Verdünnungsassay durchgeführt werden. Durch eine Verdünnung der Enzymlösung fällt im Falle eines reversiblen Inhibitors die Aktivität des Enzyms nicht so stark wie erwartet ab, da der Hemmstoff wieder aus dem aktiven Zentrum heraus diffundiert. Bei einer irreversiblen Inhibition hingegen bleibt der Anteil an noch aktivem Enzym gleich. Alle genannten Verfahren können jedoch schon aufgrund der Vorgehensweise Aktivitätsverluste bei den empfindlichen Enzymen hervorrufen und so eine irreversible Inhibition vortäuschen. Eine weitere Unterscheidung kann durch eine zeitabhängige Messung erzielt werden. Hier wird die Aktivitätsabnahme durch einen reversiblen Inhibitor nach der Einstellung des Gleichgewichtszustands (steady-state) einen festen Wert annehmen, welcher sich nicht mehr ändert. Eine irreversible Hemmung verläuft nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung und folgt aus diesem Grund einem exponentiellen Verlauf im Umsatz-Zeit-Diagramm.

4.2 Charakterisierung irreversibler Hemmung

Dem Fall einer irreversiblen Hemmung eines Enzyms durch einen Inhibitor liegt folgendes Schema zu Grunde.



Schema 4-1: Prinzip einer irreversiblen Hemmung.

Hierbei wird angenommen, dass zunächst das Enzym mit dem Inhibitor einen reversiblen Assoziationskomplex EI bildet. Anschließend erfolgt ein irreversibler Schritt und es entsteht die inaktive E-I Form. Das natürliche Substrat des Enzyms konkurriert dabei mit dem Inhibitor um die Bindungstasche im Enzym. Wichtige Größen bei diesem Vorgang sind die Bindungsaffinität des Substrats zum Enzym, beschrieben durch die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die Wechselzahl (k_{cat}). Die Hemmung des Enzyms durch den Inhibitor wird durch die charakteristischen Größen k_i , K_i und k_{2nd} beschrieben.

k_i = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I in $[\text{min}^{-1}]$.

K_i = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes in $[M]$, welche die Affinität vom Enzym zum Inhibitor angibt.

k_{2nd} = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung in $[M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$ des Inaktivierungsschrittes. $k_{2nd} = k_i/K_i$

Es existieren mehrere Möglichkeiten zur Bestimmung der Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} . Dies ist zum einen ein Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson,^[131] auf den hier nicht näher eingegangen wird und zum anderen den kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou.^[132]

4.3 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou^[132]

Gibt man ein Enzym zu einer Mischung aus Substrat und Inhibitor, so beobachtet man über die Zeit eine Verringerung der Produktzunahme. Bei einem irreversiblen Hemmmechanismus wird die Produktzunahme exponentiell abnehmen und sich der Produktkonzentration $[P]_{\infty}$ annähern.

$$[P]_t = [P]_{\infty} (1 - \exp(-k_{obs} t)) \quad 4-2$$

Hierbei muss der Inhibitor im Überschuss vorliegen $[I] \gg [E]_0$. Um sicher zu gehen, dass die Aktivitätsabnahme tatsächlich durch den Inhibitor verursacht wird, ist ebenso eine hohe Substrat-Konzentration Voraussetzung (steady-state-Bedingungen). Die Abnahme der Enzymaktivität E_a pro Zeit folgt dann einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, die durch Gleichung 4-3 wiedergegeben wird. k_{obs} ist hierbei die charakteristische Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung.

$$[E]_a = [E]_0 \exp(-k_{obs} t) \Leftrightarrow -k_{obs} = \ln \left(\frac{[E]_a}{[E]_0} \right) \text{ mit } t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{obs}} \quad 4-3$$

Die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ ergibt sich durch Addition der Konzentration an freiem Enzym $[E]$, der Konzentration an reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex $[EI]$ und der Konzentration an inaktiviertem Enzym $[E-I]$ (vgl. Gleichung 4-4).

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E-I] \quad 4-4$$

Unter der Voraussetzung dass $[I] \gg [E]_0$, ist die Entstehung von kovalent modifiziertem Enzym E-I proportional der Konzentration an reversiblen Komplex $[EI]$.

$$\frac{d[E-I]}{dt} = k_i [EI] \quad 4-5$$

Entspricht die Bildung des inaktiven Komplexes E-I der Abnahme an aktivem Enzym $[E]_a$, so bleibt die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ konstant und somit ist $[E-I] = [E]_a$.

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i [EI] \quad 4-6$$

Mit $K_i = [E][I] / [EI]$ gilt für $[E]_a = [EI] K_i / [I]$ bzw. $[EI] = [E]_a / (1 + K_i / [I])$ und es ergibt sich daraus für die Abnahme der Enzymaktivität Gleichung 4-7.

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = \frac{k_i [E]_a}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad 4-7$$

Eine Integration über die Zeit t führt zu Gleichung 4-8.

$$\ln\left(\frac{[E]_a}{[E]_0}\right) = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad 4-8$$

Unter den Bedingungen pseudo-erster Ordnung mit $\ln([E]_a / [E]_0) = -k_{obs} t$ ergibt sich die hyperbolische Funktion in Gleichung 4-9.

$$-k_{obs} t = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \Leftrightarrow k_{obs} = \frac{k_i [I]}{(K_i + [I])} \quad 4-9$$

Liegt ein schlecht löslicher oder schnell reagierender Inhibitor vor, können die Hemmkonstanten nicht unter den Sättigungsbedingungen $[I] \gg K_i$ bestimmt werden. In diesem Fall müssen relativ niedrige Inhibitorkonzentrationen gewählt werden, die unterhalb der Dissoziationskonstante liegen $[I] \ll K_i$ und Gleichung 4-9 vereinfacht sich zu Gleichung 4-10.

$$-k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i} \Leftrightarrow k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad 4-10$$

Allerdings lassen sich nun die Hemmkonstanten k_i und K_i nicht mehr unabhängig voneinander bestimmen und man berechnet daher näherungsweise die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_{2nd} .

Bei der ermittelten Dissoziationskonstante handelt es sich jedoch nicht um den wahren K_i -Wert, sondern um K_{iapp} , die apparente Dissoziationskonstante. Sie muss noch durch den Faktor f dividiert werden, welcher berücksichtigt, dass der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle im Enzym konkurriert. Der Faktor f ist in Gleichung 4-11 definiert.

$$f = 1 + \frac{[S]}{K_m} \quad 4-11$$

Hier ist $[S]$ die Substratkonzentration und K_m die Michaelis-Menten-Konstante, welche die Affinität des Enzyms zum Substrat angibt.

K_m wird in einem gesonderten Experiment bestimmt, in dem man die Reaktionsgeschwindigkeit (dFluoreszenz / min) gegen die Substratkonzentration aufträgt.

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad 4-12$$

Bei Gleichung 4-12 ergibt sich der K_m -Wert als Substratkonzentration bei halbmaximaler Enzymaktivität $v_{\max} / 2$.^[133]

4.4 Charakterisierung reversibler Hemmung

Ob eine Hemmung reversibel ist oder nicht, lässt sich sowohl durch einen Verdünnungsassay als auch durch einen kontinuierlichen Assay ermitteln. Die Enzymaktivität wird in einem Verdünnungsassay nach Einstellung des Gleichgewichts auf einem konstanten Niveau verbleiben und sich nicht mehr mit der Zeit ändern. Verwendet man einen kontinuierlichen Assay, so ergibt sich bei einer Hemmung eine Umsatz-Zeit-Kurve mit geringerer Steigung als im ungehemmten Fall.^[134]

Zur Auswertung der erhaltenen Kurven wird Gleichung 4-13 herangezogen.

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{\min} \quad 4-13$$

Verwendet man stattdessen^[135] den nicht-linearisierten Dixon-Plot (siehe Gleichung 4-14) mit $v_0 = 100\%$, so erhält man hier den zunächst den K_{iapp} -Wert. Liegt eine kompetitive Hemmung vor, so folgt aus den Gleichungen 4-13 und 4-14 $K_{iapp} = IC_{50}$, da beide Gleichungen unter idealen Bedingungen gleiche Werte liefern.

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad 4-14$$

Hier sind v_0 und v_i die Enzymaktivitäten ohne bzw. mit Inhibitor. K_i berechnet sich aus der Steigung $1 / K_i$ des linearisierten Dixon-Plots. Hier handelt es sich ebenso um eine

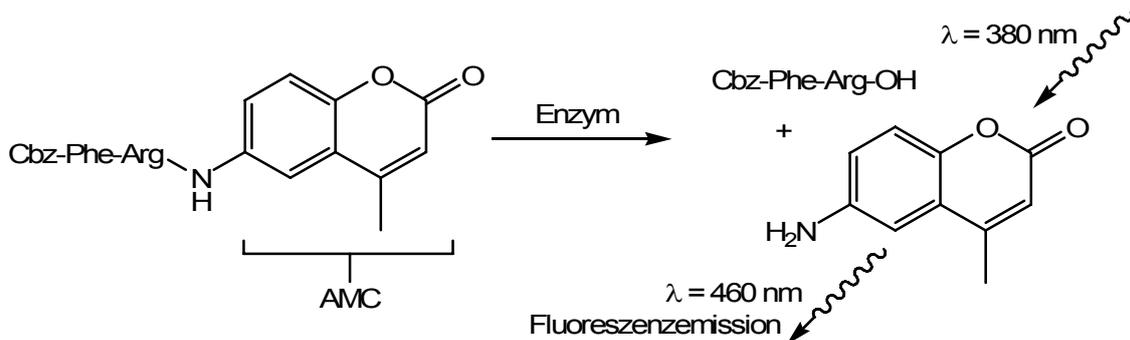
kompetitive Hemmung, bei der von einer Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor ausgegangen wird. Deshalb muss auch hier die erhaltene apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} durch den Faktor f (4-11) dividiert werden.

Die nicht-lineare Regressionsanalyse zur Auswertung der durchgeführten Versuche wurde mit Hilfe der Enzymkinetik Software GraFit® durchgeführt.

4.5 Durchführung der fluorimetrischen Assays

Alle potentiellen Inhibitoren, die im Rahmen dieser Arbeit vorliegen, wurden in fluorimetrischen Assays auf Hemmung der Cystein-Proteasen Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodesain, SARS-CoV-M^{pro} und sowie SARS-CoV-pl^{pro} und der Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D getestet.

Bei den Assays für Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2 und Rhodesain wird Z-Phe-Arg-AMC als Substrat verwendet, beim Assay für SARS-CoV-pl^{pro} Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC. Die 7-Amino-4-methylcumarin-(AMC)-Substrate zeigen selbst nur eine schwache Fluoreszenz, sind jedoch nach der enzymatischen Spaltung zwischen Arg und AMC bzw. Gly und AMC in der Lage, durch eine Anregung bei 380 nm, Licht der Wellenlänge von 460 nm zu emittieren. Das Prinzip der enzymatischen Spaltung ist in Schema 4-15 gezeigt.

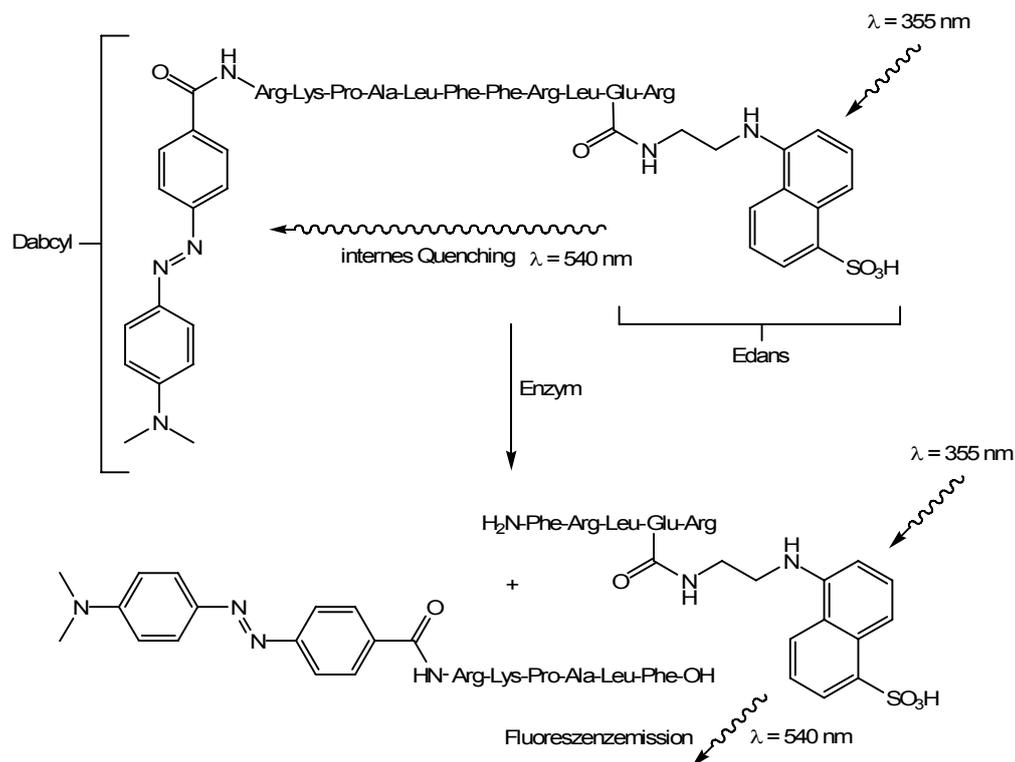


Schema 4-15: Enzymatische Spaltung von Cbz-Phe-Arg-AMC.

Wird das Substrat durch ein aktives Enzym gespalten, steigt im Verlauf der Messung die emittierte Fluoreszenz immer weiter an. Ist das Enzym durch einen Inhibitor deaktiviert, bleibt das Substrat intakt und die Fluoreszenz steigt langsamer an.

Beim FRET-Assay (FRET : fluorescence resonance energy transfer) mit den Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D kommt das Substrat Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-

Phe-Arg-Leu-Glu(Edans)-Arg-OH zum Einsatz. Das Undecapeptid ist für diese Enzyme optimal. In diesem Molekül befinden sich ein Fluoreszenz-Donor und ein Fluoreszenz-Akzeptor in gewissem Abstand zueinander. Der Akzeptor quencht dadurch die Wellenlänge von 540 nm, die der Donor emittiert. Spaltet ein Enzym das Peptidrückgrat, so ist ein internes Quenching nicht mehr möglich und die ansteigende Fluoreszenzemission wird detektiert. Im Assay mit SARS-CoV-M^{PRO} wird als Substrat ein FRET-Substrat mit dem Donor/Quencher-Paar Anthranilsäure-Nitrotyrosin eingesetzt. Die Assay-Bedingungen sind in Tabelle 4-17 angegeben.



Schema 4-16: Enzymatische Spaltung des Dabcyl-Edans-Substrats.

Tabelle 4-17: Bedingungen für die Assays mit verschiedenen Enzymen.

Enzym	Cathesin B
Substrat	Z-Phe-Arg 7-amino-4-methylcumarin x HCl
Konzentrationen	[S]: 100 μ M; K_m (CathB): 150 μ M
Bedingungen	Puffer 1; λ (Anreg): 380 nm; λ (Detek): 460 nm; Temp.: 25 °C
Enzym	Cathesin L
Substrat	Z-Phe-Arg 7-amino-4-methylcumarin x HCl
Konzentrationen	[S]: 6.25 μ M; K_m (CathL): 6.50 μ M
Bedingungen	Puffer 1; λ (Anreg): 380 nm; λ (Detek): 460 nm; Temp.: 25 °C

Enzym	Falcipain 2
Substrat	Z-Phe-Arg 7-amino-4-methylcumarin x HCl
Konzentrationen	[S]: 25.0 μ M; K_m (Falcipain 2): 21.5 μ M
Bedingungen	Puffer 2; λ (Anreg): 380 nm; λ (Detek): 460 nm; Temp.: 25 °C
Enzym	Rhodesain
Substrat	Z-Phe-Arg 7-amino-4-methylcumarin x HCl
Konzentrationen	[S]: 10.0 μ M; K_m (Rhodesain): 826.5 nM
Bedingungen	Puffer 2; λ (Anreg): 380 nm; λ (Detek): 460 nm; Temp.: 25 °C
Enzym	SARS-CoV-M^{pro}
Substrat	H ₂ N-Anthranilsäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln Ser-Gly-(NO ₂)Tyr-Arg-(MTS) x TFA
Konzentrationen	[S]: 50.0 μ M; K_m (SARS-M ^{pro}): 190 μ M
Bedingungen	Puffer 3; λ (Anreg): 325 nm; λ (Detek): 425 nm; Temp.: 25 °C
Enzym	SARS-CoV-pl^{pro}
Substrat	Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly AMC x HOAc
Konzentrationen	[S]: 50.0 μ M; K_m (SARS-pl ^{pro}): 850 μ M
Bedingungen	Puffer 3; λ (Anreg): 325 nm; λ (Detek): 425 nm; Temp.: 25 °C
Enzym	SAP2
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH
Konzentrationen	[S]: 1.10 μ M; K_m (SAP2): 28.7 μ M
Bedingungen	Puffer 4; λ (Anreg): 355 nm; λ (Detek): 540 nm; Temp.: 30 °C
Enzym	Cathesin D
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(Edans)-ArgOH
Konzentrationen	[S]: 1.10 μ M; K_m (CathD): 7.67 μ M
Bedingungen	Puffer 5; λ (Anreg): 355 nm; λ (Detek): 540 nm; Temp.: 30 °C

| | markiert die Spaltstelle.

Puffer 1: 50 mM Tris-Puffer pH 6.5 mit 2 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

Puffer 2: 50 mM Acetat-Puffer pH 5.5 mit 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

Puffer 3: 20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT und 200 mM NaCl

Puffer 4: 50 mM Na-Citrat-Puffer pH 3.2

Puffer 5: 0.1 M Ameisensäure-Puffer pH 3.7

4.6 Ergebnisse des Screenings

Mit den 37 synthetisierten Inhibitoren wurde zunächst ein Screening durchgeführt, um die potentiellen Hemmeigenschaften zu bestimmen. Bei vielversprechenden Kandidaten mit einem hohen prozentualen Hemmwert folgte im Anschluss eine Verdünnungsreihe nach

Tian und Tsou^[132] zur Berechnung der IC_{50} , K_i und k_{2nd} -Werte (vgl. Abschnitt 4.3). Dies ermöglicht eine quantitative Aussage über die Hemmung eines potentiellen Inhibitors.

Das Screening wurde mit einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M durchgeführt und mit dem Referenzwert von reinem DMSO verrechnet. Aus dem Verhältnis der Steigungen der im fluorimetrischen Assay gemessenen Geraden ergibt sich die Hemmung in [%]. Die angegebene Zahl stellt jeweils den Mittelwert zweier Messreihen dar und hat eine Abweichung von etwa 15 %. Alle Ergebnisse über 80 % sind in den Tabellen 4-18, 4-19 und 4-20 hervorgehoben.

Tabelle 4-18: Übersicht über die Screening-Ergebnisse der synthetisierten Aziridine in %.

Name	Cath. B	Cath. L	Falc.	Rhod.	M ^{pro}	pl ^{pro}	SAP2	Cath. D
TP06	10	2	8	19	27	21	43	56
TP07	10	4	12	13	18	14	7	25
TP08	9	47	75	48	0	0	47	38
TP41	6	13	27	57	61	35	8	4
TP42	11	8	12	28	65	38	3	17

Cath. B = Cathepsin B; Cath. L = Cathepsin L; Falc. = Falcipain 2; Rhod. = Rhodesain; M^{pro} = SARS-CoV-M^{pro}; pl^{pro} = SARS-CoV-pl^{pro}; Cath. D = Cathepsin D, Screening mit c = 100 μ M; Werte angegeben in [%].

Tabelle 4-19: Übersicht über die Screening-Ergebnisse der synthetisierten Epoxide in %.

Name	Cath. B	Cath. L	Falc.	Rhod.	M ^{pro}	pl ^{pro}	SAP2	Cath. D
TP09	71	73	54	40	3	25	47	15
TP10	98	87	38	0	0	14	0	0
TP11	63	24	56	24	21	13	12	0
TP12	74	31	56	23	2	56	6	16
TP13	66	52	34	3	8	8	0	48
TP14	82	90	80	53	0	33	6	5
TP15	97	96	61	25	0	23	9	13
TP16	75	88	64	35	5	24	10	0
TP17	11	50	48	44	11	17	28	43
TP18	4	39	37	12	4	22	24	15
TP19	31	100	20	99	0	12	11	7
TP20	54	70	21	46	0	8	0	14
TP21	49	99	67	95	4	0	21	17
TP22	98	100	99	100	5	0	22	12
TP23	70	98	42	79	9	5	19	95

Cath. B = Cathepsin B; Cath. L = Cathepsin L; Falc. = Falcipain 2; Rhod. = Rhodesain; M^{pro} = SARS-CoV-M^{pro}; pI^{pro} = SARS-CoV-pI^{pro}; Cath. D = Cathepsin D, Screening mit c = 100 µM; Werte angegeben in [%].

Von den getesteten Aziridinen zeigte keines herausragende Hemmeigenschaften im Screening (vgl. Tabelle 4-18). Lediglich **TP41** und **TP42** wiesen gegen die SARS-CoV-M^{pro} Werte von über 60 % auf.

Die synthetisierten Azapeptid-Epoxide **TP09**, **TP10**, **TP12**, **TP13**, **TP14**, **TP15** und **TP16** zeigen im Screening insbesondere gegen Cathepsin B und L durchaus gute bis sehr gute Hemmeigenschaften. Etwas besser schneiden die Vergleichssubstanzen **TP19**, **TP20**, **TP21**, **TP22** und **TP23** ab. Hier sind zudem noch sehr gute Werte bei der Rhodesain- und Falcipain 2-Hemmung erreicht worden. Außerdem ist beim Epoxid **TP23** auch eine hohe Aktivität gegen die Aspartat-Protease Cathepsin D zu finden.

Tabelle 4-20: Screening-Übersicht der synthetisierten Michael-Systeme in %.

Name	Cath. B	Cath. L	Falc.	Rhod.	M ^{pro}	pI ^{pro}	SAP2	Cath. D
TP24	13	3	7	46	1	1	4	20
TP25	12	12	7	24	0	8	3	7
TP26	18	8	13	32	1	10	0	23
TP27	13	8	11	26	6	13	0	23
TP28	2	8	23	15	6	8	24	8
TP29	15	14	22	7	1	3	52	39
TP30	12	10	9	10	2	3	34	20
TP31	28	25	41	26	8	5	58	32
TP32	57	70	39	33	18	16	14	100
TP33	34	29	23	31	18	18	22	99
TP34	13	18	17	14	13	16	42	99
TP35	60	46	75	94	19	18	68	94
TP36	35	46	72	95	25	18	90	69
TP37	32	40	51	56	47	14	100	100
TP38	99	69	88	89	52	52	100	100
TP39	81	14	81	99	25	20	100	100
TP40	10	3	20	26	7	0	5	0

Cath. B = Cathepsin B; Cath. L = Cathepsin L; Falc. = Falcipain 2; Rhod. = Rhodesain; M^{pro} = SARS-CoV-M^{pro}; pI^{pro} = SARS-CoV-pI^{pro}; Cath. D = Cathepsin D, Screening mit c = 100 µM; Werte angegeben in [%].

Die Michael-Akzeptor substituierten Inhibitoren zeigen eine breite Aktivität gegen verschiedene Enzyme. Insbesondere Verbindungen, die einen Aromaten konjugiert zur Doppelbindung tragen (**TP32**, **TP35**, **TP36**, **TP37**, **TP38** und **TP39**) heben sich hervor. Eine Derivatisierung am aromatischen Ringsystem mit Elektronen-ziehenden oder Elektronen-schiebenden Substituenten führt zu einer weiteren Steigerung der Hemmeigenschaften.

Korrekturmessungen

Die Verbindungen **TP35**, **TP36**, **TP37**, **TP38** und **TP39** zeigten in einem ersten Screening sehr gute Hemmergebnisse (vgl.: Tabelle 4-20). Da es sich bei diesen Verbindungen um substituierte Aromaten mit Absorptionseigenschaften im Bereich der Wellenlänge der emittierten Strahlung des Substrates handelt, bestand der Verdacht, dass im fluorimetrischen Enzymassay durch Quenching ein falsch positives Messergebnis hervorgerufen wird.^[136] Um diesen Fall auszuschließen, wurde für die Korrekturmessungen zunächst eine Messung unter Standardbedingungen (vgl. Kapitel 4.5) mit Puffer und Fluorophor, aber ohne Inhibitor durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Messung mit Puffer, Fluorophor und dem Inhibitor in DMSO. Erhält man einen niedrigeren Fluoreszenzwert, so muss ein Quenching-Prozess innerhalb der Lösung stattfinden. Die aus der Messung mit Inhibitor erhaltenen Intensitäten werden durch die Intensität ohne Inhibitor dividiert und man erhält den Korrekturfaktor für den Enzym-Assay. Im Idealfall ist der Korrekturfaktor = 1 (kein Quenching), in schlechteren Fällen kleiner, so dass daraus eine falsch positive Hemmung, hervorgerufen durch Quenching des Inhibitors, resultiert. Die Ergebnisse der Korrekturmessungen sind in Tabelle 4-21 aufgelistet.

Tabelle 4-21: Übersicht über die erhaltenen Korrekturfaktoren.

Name	CathB	Falcpain 2	Rhodesain	SAP2	CathD
TP35	---	0.83	0.88	---	1.18
TP36	---	0.77	0.80	0.94	---
TP37	---	---	---	1.03	1.04
TP38	2.53	3.15	1.52	5.57	2.69
TP39	0.83	0.97	0.83	0.91	1.26

Anhand der oben gezeigten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass lediglich ein zu vernachlässigendes Quenching durch die Inhibitoren vorhanden ist. Die Abweichung vom Standard-Screening bewegt sich innerhalb der normalen Messtoleranz von ca. 10 %. **TP38** zeigt zudem eine Eigenfluoreszenz in allen Assays, so dass das Verhältnis von Korrekturmessung zur Standardmessung den Faktor 1 übersteigt.

4.7 Ergebnisse der Verdünnungsreihen

Bei der Durchführung der Verdünnungsreihe nach Tian und Tsou (vgl. Kapitel 4.3) inkubiert man das Enzym zusammen mit dem Substrat und dem Inhibitor bei verschiedenen Konzentrationen. Die Inhibitor-Konzentrationen sind 0 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM , 80 μM und 100 μM in DMSO. Bei sehr guten Inhibitoren verdünnt man die Lösungen noch einmal um den Faktor zehn auf 0 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 8 μM und 10 μM .

Für jede Testung wurden zwei Verdünnungsreihen durchgeführt, jeweils alle Hemmkonstanten berechnet und anschließend die Mittelwerte gebildet.

4.7.1 Bestimmung des IC_{50} und K_i reversibler Inhibitoren

Die in Kapitel 4.4 beschriebenen Grundlagen zur Bestimmung der Hemmkonstanten werden im Folgenden am Beispiel der Hemmung von Rhodesain durch **TP32** für eine reversible Hemmung gezeigt und mit Hilfe verschiedener Diagramme erläutert. Anschließend sind die IC_{50} - und K_i -Werte aller reversibel hemmenden Inhibitoren zusammengefasst.

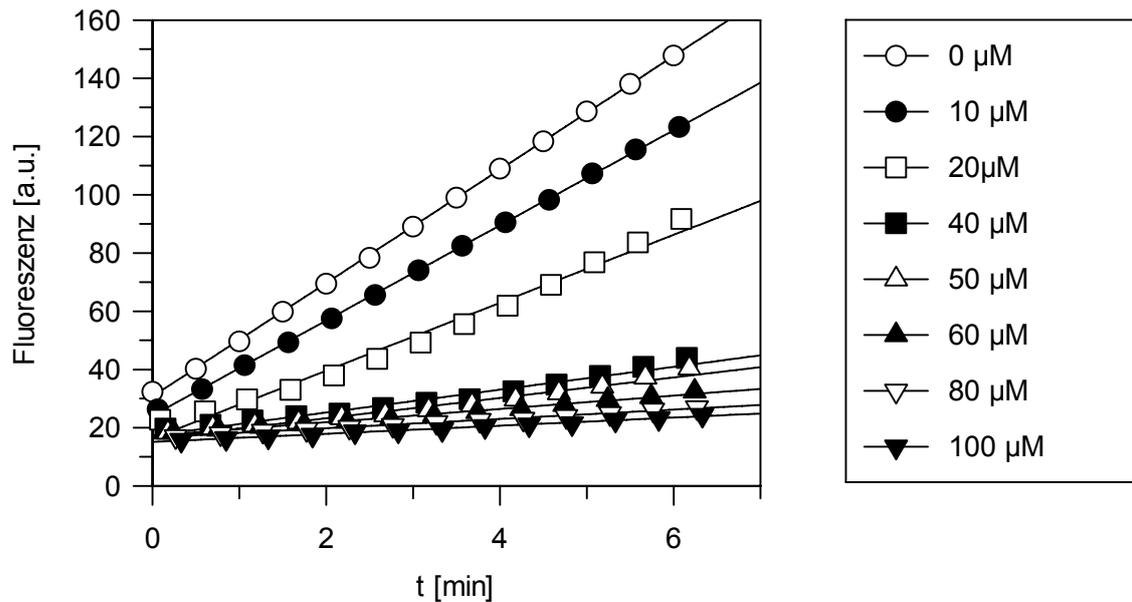


Abb. 4-22: Umsatz-Zeit-Diagramm des kontinuierlichen Assays bei der reversiblen Hemmung von Rhodesain durch **TP32**. Der Übersichtlichkeit halber ist nur eine der beiden Messreihen dargestellt.

Zunächst wird die Enzymrestaktivität bei konstanter Substratkonzentration aus den Umsatz-Zeit Kurven (vgl. Abb. 4-22) bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Hierzu verwendet man die Steigungen der Kurven. Anschließend trägt man die Restaktivität gegen die Inhibitorkonzentration auf (vgl. Abb. 4-23) und berechnet den IC_{50} -Wert aus den erhaltenen Werten anhand von Gleichung 4-13.

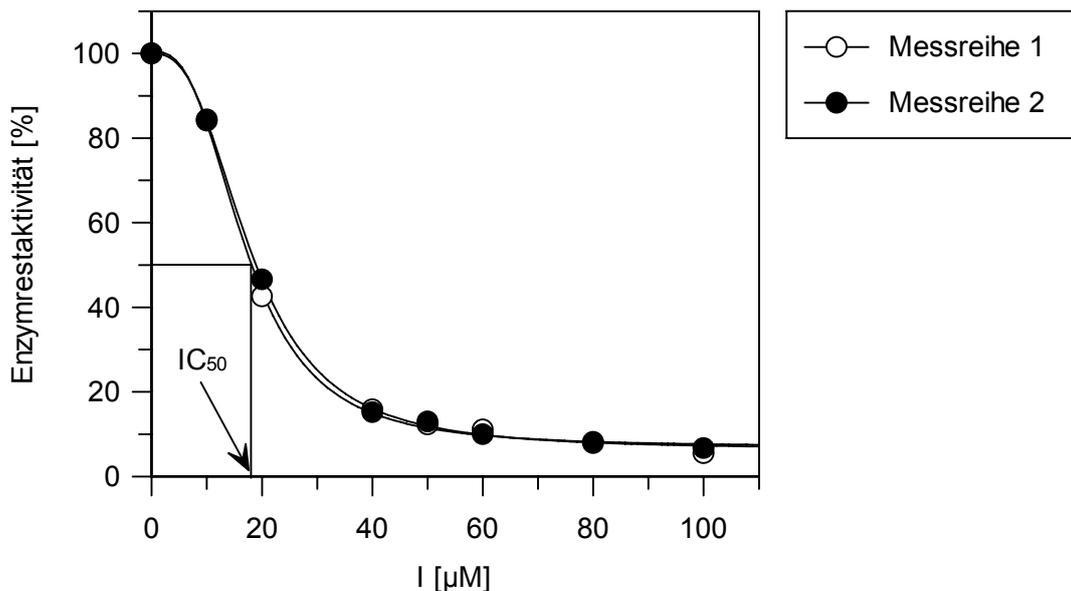


Abb. 4-23: Restaktivität gegen I des kontinuierlichen Assays bei der reversiblen Hemmung von Rhodesain durch **TP32**.

Als Resultat für **TP32** erhält man hier einen IC_{50} -Wert von $14.3 \mu\text{M}$, welcher mit Hilfe von Gleichung 4-11 in den K_i -Wert umgerechnet wird. In diesem Fall ergibt sich ein K_i -Wert von $1.09 \mu\text{M}$.

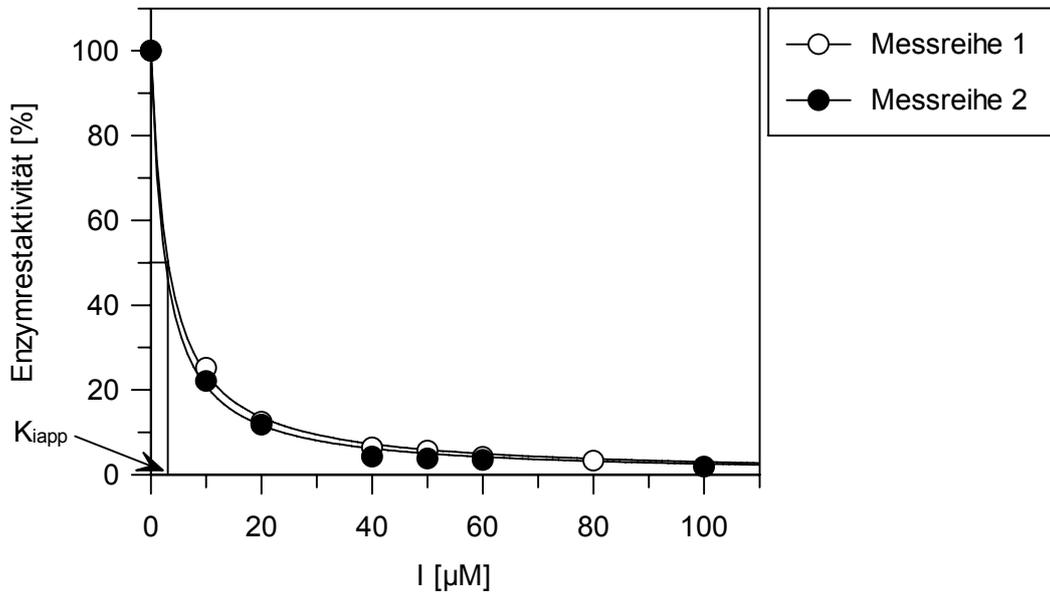


Abb. 4-24: Nicht-linearisierter Dixon-Plot des kontinuierlichen Assays bei der reversiblen Hemmung von Rhodensain durch **TP39**.

Bei einer kompetitiven Hemmung entspricht der IC_{50} -Wert der apparanten Dissoziationskonstante K_{iapp} , die durch die Dixon-Gleichung (Gleichung 4-14) berechnet werden kann (vgl. Kapitel 4.4).

In nahezu allen Fällen hat der Dixon-Plot die geringere Abweichung und wird deshalb zur Ergebnisermittlung herangezogen. Die Ergebnisse aller anderen Inhibitoren sind in Tabelle 4-25 zusammengefasst.

Tabelle 4-25: IC₅₀-Werte und K_i-Werte des kontinuierlichen Assays aller getesteten nicht zeitabhängigen Inhibitoren auf verschiedene Enzyme.

Enzym	Name	IC ₅₀ bzw. K _{iapp} [μM]	K _i [μM]
Cathepsin B	TP32	62.5 ± 3.06	37.5 ± 1.84
Cathepsin B	TP35	10.2 ± 0.50	6.13 ± 0.30
Cathepsin B	TP38*	9.09 ± 0.28	5.46 ± 0.17
Cathepsin B	TP39	6.88 ± 0.36	4.13 ± 0.22
Cathepsin L	TP32	13.5 ± 0.53	6.88 ± 0.27
Cathepsin L	TP38	39.7 ± 16.7	20.4 ± 8.50
Falcpain 2	TP36	75.3 ± 10.1	34.8 ± 4.68
Falcpain 2	TP38	18.7 ± 6.22	8.63 ± 2.88
Falcpain 2	TP39	4.03 ± 1.31	1.86 ± 0.61
Rhodesain	TP32	14.3 ± 0.22	1.09 ± 0.02
Rhodesain	TP35	22.9 ± 1.32	1.75 ± 0.10
Rhodesain	TP36	54.3 ± 1.06	4.14 ± 0.08
Rhodesain	TP38	4.96 ± 1.69	0.38 ± 0.13
Rhodesain	TP39	2.89 ± 0.25	0.22 ± 0.02
SARS-CoV-M ^{pro}	TP41	261 ± 66.5	207 ± 52.6
SARS-CoV-M ^{pro}	TP42	199 ± 6.63	158 ± 5.25
SAP2	TP32	14.7 ± 0.26	5.15 ± 0.12
SAP2	TP35	187 ± 51.7	65.4 ± 23.9
SAP2	TP36	49.7 ± 4.56	17.4 ± 2.11
SAP2	TP37	13.8 ± 3.45	4.85 ± 1.59
SAP2	TP38	31.3 ± 3.05	11.0 ± 1.41
SAP2	TP39	142 ± 30.1	49.8 ± 13.9
Cathepsin D	TP23	51.2 ± 0.14	44.8 ± 0.12
Cathepsin D	TP32*	10.8 ± 7.69	9.47 ± 6.72
Cathepsin D	TP33	16.3 ± 4.20	14.3 ± 3.67
Cathepsin D	TP34	k.H.	k.H.
Cathepsin D	TP35	21.9 ± 3.88	19.1 ± 3.40
Cathepsin D	TP36	16.7 ± 0.57	14.6 ± 0.50
Cathepsin D	TP37*	5.60 ± 1.22	4.89 ± 1.07
Cathepsin D	TP38*	4.76 ± 0.35	4.16 ± 0.31
Cathepsin D	TP39	33.5 ± 5.30	29.3 ± 4.63

* 1-10 μM statt 10-100 μM; k.H.: keine Hemmung

4.7.2 Bestimmung von k_i , K_i und k_{2nd} bei irreversiblen Inhibitoren

Anders als bei der Bestimmung der reversiblen Hemmdaten ermittelt man aus den Umsatz-Zeit-Diagrammen zunächst unter Verwendung von Gleichung 4-9 die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster-Ordnung (k_{obs}) bei verschiedenen Inhibitor-konzentrationen. Die auf diese Weise berechneten k_{obs} -Werte trägt man nun (siehe Gleichung 4-10) gegen die verschiedenen Inhibitor-konzentrationen auf und erhält K_{iapp} und k_i durch Kurvenanpassung an die hyperbolische Funktion 4-26.

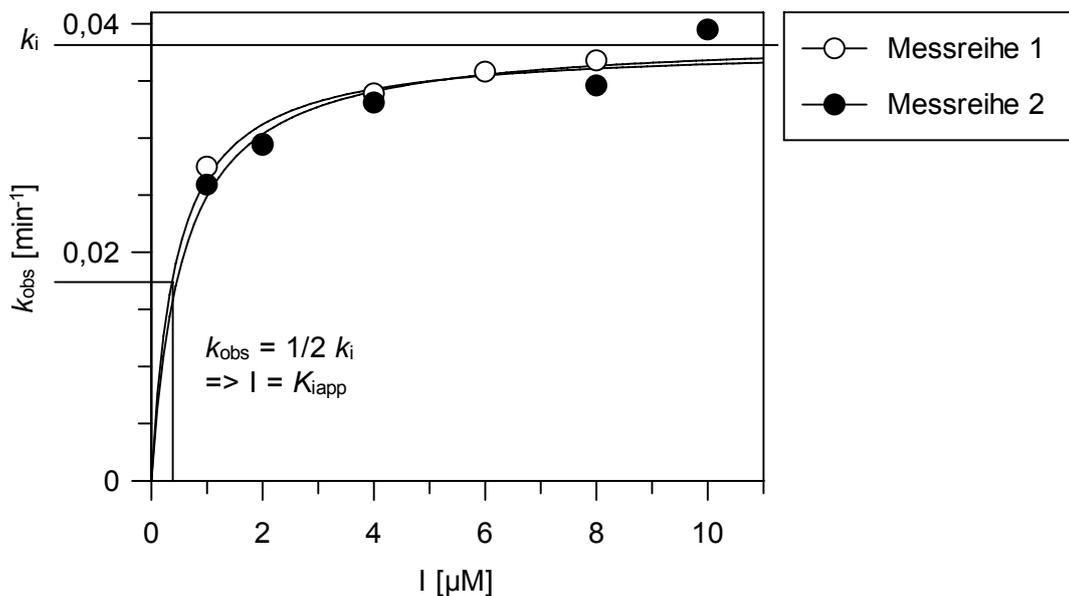


Abb. 4-26: k_{obs} / I-Diagramm des kontinuierlichen Assays bei der irreversiblen Hemmung von Rhodesain durch **TP21**.

K_{iapp} wird wie oben bereits beschrieben mit Gleichung 4-11 in K_i umgerechnet. Man erhält als Dissoziationskonstante $K_i = 0.0383 \mu\text{M}$, als Alkylierungskonstante $k_i = 0.0385 \text{ min}^{-1}$ und als Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung $k_i / K_i = k_{2nd} = 1,019,674 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Da k_i der Maximalwert ist, an den sich die Kurve annähert, kann k_i in manchen Fällen nur ungenau bestimmt werden. Dann trägt man k_{obs} gegen I linear auf, um so aus der Steigung (k_{obs} / I) direkt den k_{2nd} -Wert zu ermitteln.

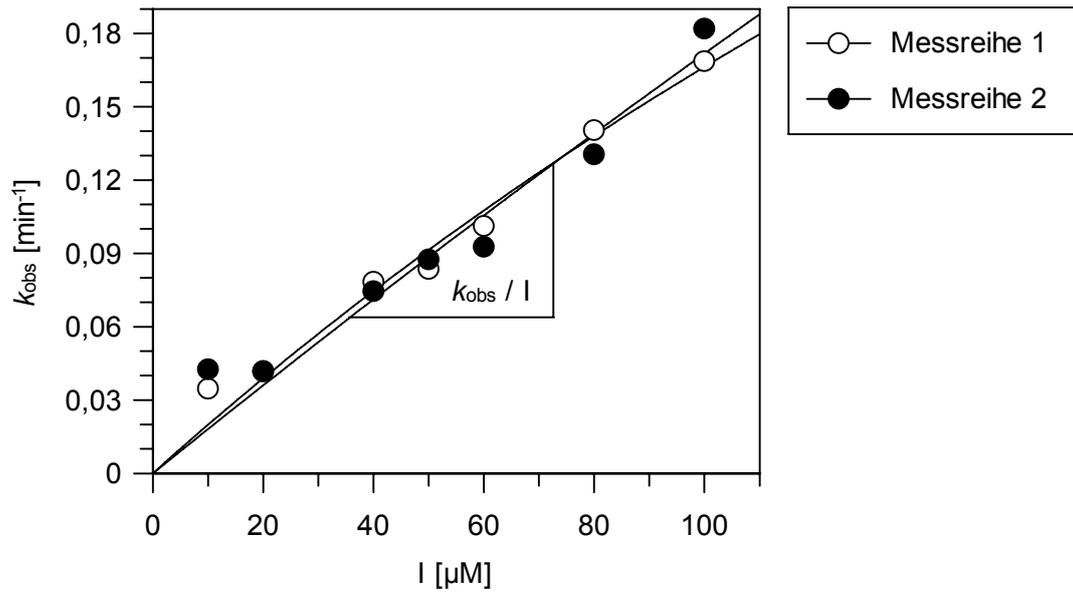


Abb. 4-27: k_{obs} / I -Diagramm des Verdünnungsassays der irreversiblen Hemmung von Cathepsin L durch **TP13**.

Als Hemmkonstante wird $k_{\text{obs}} / I = k_{2\text{nd}} = 2,942 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erhalten.

Weitere Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 4-28 zusammengestellt.

Tabelle 4-28: Hemmdaten des kontinuierlichen Assays aller getesteten zeitabhängigen Inhibitoren auf verschiedene Enzyme.

Enzym	Name	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]	$k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]
Cathepsin B	TP09	n. b.	6,250 ± 583
Cathepsin B	TP10*	n. b.	33,500 ± 1,667
Cathepsin B	TP11	0.91 / 77.4	11,690 ± 221
Cathepsin B	TP12	n. b.	5,167 ± 333
Cathepsin B	TP13	n. b.	5,000 ± 167
Cathepsin B	TP14	n. b.	4,750 ± 83.3
Cathepsin B	TP15*	n. b.	29,083 ± 750
Cathepsin B	TP16	n. b.	4,250 ± 83.3
Cathepsin B	TP22*	0.81 / 8.19	100,231 ± 9,917
Cathepsin B	TP23	n. b.	4,917±417
Cathepsin L	TP09	0.47 / 65.9	7,100 ± 2.83
Cathepsin L	TP10	0.66 / 54.8	12,024 ± 194
Cathepsin L	TP13	n. b.	2,942 ± 0.00
Cathepsin L	TP14	0.89 / 55.9	16,072 ± 1,218
Cathepsin L	TP15	0.31 / 8.42	39,972 ± 8,830
Cathepsin L	TP16	0.78 / 64.7	11,999 ± 78.5
Cathepsin L	TP19*	0.91 / 3.47	273,272 ± 4,317
Cathepsin L	TP20	0.83 / 120	6,873 ± 46.5
Cathepsin L	TP21*	n. b.	40,604 ± 1,177
Cathepsin L	TP22**	0.78 / 0.77	1,078,152 ± 184,001
Cathepsin L	TP23*	0.36 / 5.79	72,718 ± 24,738
Falcipain 2	TP08	0.18 / 13.6	13,042 ± 380
Falcipain 2	TP14	0.53 / 53.3	10,272 ± 1,149
Falcipain 2	TP15	0.14 / 26.8	5,763 ± 1,302
Falcipain 2	TP16	0.16 / 31.6	5,052 ± 416
Falcipain 2	TP21	0.27 / 16.7	16,456 ± 1,217
Falcipain 2	TP22*	n. b.	99,488 ± 0.00
Rhodesain	TP19	1.35 / 7.94	183,944 ± 31,485
Rhodesain	TP21*	0.04 / 0.04	1,019,674 ± 114,065
Rhodesain	TP22*	n. b.	643,235 ± 8,524
Rhodesain	TP23	0.29 / 9.03	32,804 ± 2,629

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; ** 0.1-10 μM , n. b.: nicht bestimmt.

5. Biologische Testungen

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 630 (SFB630) „Recognition, Preparation, and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases“ arbeitet die Arbeitsgruppe Schirmeister als Teilprojekt A4 an der Universität Würzburg zusammen mit anderen interdisziplinären Teilprojekten, die diverse biologische Tests nach festgelegten SOP-Arbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures) durchführen. Zuständig sind PD Dr. Heike Bruhn (Qualitätsmanagement), Dr. Tobias Ölschläger und PD. Dr. August Stich vom Teilprojekt Z1 sowie Prof. Dr. Joachim Morschhäuser (Teilprojekt B2). Im Folgenden sind die verwendeten Spezies und Testungen beschrieben, sowie deren Ergebnisse zusammengefasst.

5.1 Antibakterielle und antifungale Aktivität

Am Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) fanden mehrere Testungen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) an verschiedenen Bakterienstämmen und dem Hefepilz *Candida albicans* statt. Die MHK bezeichnet die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der die Vermehrung von Mikroorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann.

Es wurde an folgenden Spezies getestet:

Bakterien:

- *Staphylococcus aureus* NCTC 8325
- *Staphylococcus epidermidis* RP62A
- *Enterococcus faecalis* JH212
- *Enterococcus faecium* 6413
- *Escherichia coli* 536
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Yersinia pseudotuberculosis* 252 01A
- *Yersinia pestis* KUMA

Pilze:

- *Candida albicans* 5314

Zudem wurde die Biofilmwachstumshemmung der getesteten Substanzen auf den Bateriaenstamm *Staphylococcus epidermidis* RP62A untersucht.

Es stellte sich heraus, dass keine der getesteten Substanzen das Wachstum von Bakterien oder Pilzen hemmt. Die MHK lag für alle Verbindungen über dem definierten Schwellenwert von 40 μM .

5.2 Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizitätstests

Die antiparasitären Eigenschaften der untersuchten Substanzen wurden an trypomastigoten Formen von *Trypanosoma brucei brucei* TC 221 und Promastigoten von *Leishmania major* MHOM/IL/81/FE/BNI getestet. Die erhaltenen Hemmdaten sind in Tabelle 5-1 zusammengestellt.

Weiterhin wurde anhand von Cytotoxizitätstests an Makrophagen J774.1 untersucht, ob die inhibitorischen Eigenschaften der Wirksubstanzen auf Inaktivierung des Enzyms oder unspezifischer Cytotoxizität beruhen. Die erhaltenen Ergebnisse der Makrophagentests sind ebenso wie die Daten an den Parasiten in Tabelle 5-1 ersichtlich.

Tabelle 5-1: Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen.

Name	<i>T. brucei brucei</i> IC ₅₀ [μM] (72 h)	<i>L. major</i> IC ₅₀ [μM] (48 h)	Makroph. J774.1 IC ₅₀ [μM] (48 h)
TP06	15.2 \pm 0.22	70	46.6
TP07	21.5 \pm 3.20	>100	>100
TP08	>40	>100	>100
TP09	3.34 \pm 0.39	>100	13.7
TP10	16.1 \pm 3.53	>100	50.8
TP12	13.4 \pm 6.00	>100	44.4
TP13	>40	>100	>100
TP14	16.0 \pm 2.87	>100	>100
TP15	12.3 \pm 5.25	>100	43.2
TP16	3.43 \pm 0.31	>100	33.5

TP20	18.8 ± 6.74	>100	>100
TP24	>40	>100	>100
TP25	>40	>100	>100
TP26	>40	>100	>100
TP27	>40	>100	>100
TP29	0.51 ± 0.29	>100	18
TP32	7.58 ± 3.60	>100	40.5
TP35	2.28 ± 1.25	>100	10
TP36	5.69 ± 3.77	>100	40.6
TP39	>40	>100	>100
TP41	>40	>100	>100
TP42	>40	>100	>100

Die erhaltenen Testergebnisse werden in Kapitel 6 ausführlicher diskutiert.

6. Diskussion der Ergebnisse und Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen zeigen in den kinetischen Messungen (vgl. Kapitel 4) unterschiedliche Hemmeigenschaften gegen verschiedene Enzyme. In diesem Kapitel soll nun diskutiert werden, welche Charakteristika eines potentiellen Inhibitors für die Hemmung eines Enzyms von Vorteil sind. Die getesteten Substanzen unterscheiden sich einerseits in der elektrophilen Kopfgruppe (Aziridin, Epoxid oder Michael-Akzeptor), in der daran gekuppelten Aminosäure (Phe, Val, Leu oder Ala), der Endgruppe (BOC, ICA, IAA oder OBn) und in der Art der Verknüpfung (Peptid oder Aza-Peptid). Andererseits spielt ebenso die Konfiguration an der elektrophilen Kopfgruppe (z.B. *cis*, *trans*) oder der verwendeten Aminosäure (*R*, *S*) eine Rolle, insbesondere bei den Aza-Peptiden, die nicht über den *N*-Terminus an den „warhead“ geknüpft sind, sondern über den *C*-Terminus der Aminosäure.

Die synthetisierten Verbindungen wurden gegen die Cystein-Proteasen Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodesain, SARS-CoV-M^{pro} und SARS-CoV-pl^{pro} getestet. Zudem wurden noch Assays an den Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D durchgeführt.

Hierbei erhält man, je nach Hemmmechanismus, unterschiedliche Daten. Michael-Akzeptor-substituierte Verbindungen hemmen, wie aus den Daten hervorgeht, reversibel und somit können für diese Klasse nur IC₅₀- und K_i-Werte angegeben werden. Epoxide und Aziridine hingegen sind irreversible Hemmstoffe und es ist dadurch möglich, die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung (k_{2nd}) zu ermitteln.

Im Folgenden werden nun die Struktur-Wirkungsbeziehungen anhand der erhaltenen Ergebnisse der Enzymassays diskutiert. Es können jedoch für den Bindungsmodus keine Beweise wie eine Röntgenstruktur des co-kristallisierten Enzym-Wirkstoffkomplexes oder Docking-Studien zu Grunde gelegt werden. Ebenso war es nicht möglich, alle denkbaren Kombinationen aus elektrophiler Kopfgruppe, Aminosäure und Endgruppen mit allen möglichen Stereovariationen darzustellen. Daher spiegelt die folgende Analyse lediglich Trends wieder.

6.1 Enzymselektivität

6.1.1 Aspartat- vs. Cysteinproteasen

An den Hemmdaten aus Kapitel 4 lässt sich erkennen, dass lediglich die Akzeptor-substituierten Michael-Systeme Aktivität gegen die Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D zeigen. Die Epoxide und Aziridine inhibieren hingegen selektiv die Cystein-Proteasen Cathepsin B, Cathepsin L, Rhodesain und Falcipain 2.

Einige der synthetisierten Substanzen desaktivieren sowohl Cystein- als auch Aspartat-Proteasen. Eine Übersicht ist in Tabelle 6-1 zusammen gestellt.

Tabelle 6-1: Synthetisierte Verbindungen, die Cystein- und Aspartat-Proteasen hemmen.

Name	Enzyme
TP23	Cath. L / Cath. B / Rhod. / Cath. D
TP32	Cath. L / Cath. D
TP35	Rhod. / Cath. D
TP36	Falc. / Rhod. / SAP2 / Cath. D
TP38	Cath. B / Cath. L. / Rhod. / Falc. / SAP2 / Cath. D
TP39	Cath. B / Falc. / Rhod. / SAP2 / Cath. D

Cath. B = Cathepsin B; Cath. L = Cathepsin L; Falc. = Falcipain 2; Rhod. = Rhodesain; Cath. D = Cathepsin D

6.1.2 SAP2 vs. CD

Als wirksame Inhibitoren der SAP2 stellten sich die Michael-Systeme **TP32**, **TP35**, **TP36**, **TP37**, **TP38** und **TP39** heraus. Während ihre Crotonsäure-, Fumarsäure- und Maleinsäure-Derivate nicht aktiv waren, zeigen die Inhibitoren mit Zimtsäure-Struktur durchaus gute Hemmeigenschaften. Die entsprechenden Verbindungen hemmen auch Cathepsin D in etwa gleichem Maße (vgl. Kapitel 4.7). Cathepsin D-selektiv hingegen sind **TP33** und **TP23**. Während bei **TP33** die Selektivität im Vergleich zu **TP32** offenbar durch eine Variation der Aminosäure (Phe zu Val) verursacht wird, nimmt das Epoxid **TP23** eine

besondere Stellung ein. Hierbei handelt es sich um ein Oxiran, welches entgegen der Erwartung einen nicht-zeitabhängigen Hemmechanismus besitzt. Vermutlich liegt die Aktivität des Epoxids nicht am elektrophilen Dreiring, sondern am Phe-OBn-Motiv, das es mit anderen getesteten aktiven Substanzen gemeinsam hat.

Bei dem Michael-Akzeptor **TP34** ist trotz guter Screening-Ergebnisse an Cathepsin D keine Hemmung in der Verdünnungsreihe zu beobachten.

6.1.3 FP vs. RD; CB vs. CL; Cathepsine vs. parasitäre Proteasen

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine breite Palette an Inhibitoren dargestellt worden. In den meisten Fällen werden mehrere Enzyme von diversen Stoffklassen gehemmt. Die Enamine **TP41** und **TP42** bilden in der Reihe der getesteten Verbindungen eine Ausnahme. Sie sind die einzigen Substanzen, die das Enzym SARS-CoV-M^{pro}, welches zu den Chymotrypsin-ähnlichen Cystein-Proteasen zählt, und das Enzym SARS-CoV-pl^{pro} hemmen. Jedoch sind die Dissoziationskonstanten (K_i) im niedrigen dreistelligen Bereich zu hoch, um als Leitstruktur für neue Inhibitoren zu dienen.

Der Michael-Akzeptor **TP38** hingegen deaktiviert vier Cystein-Proteasen, während seine Derivate **TP32** (Cath. B, Cath. L, Rhod.), **TP35** (Cath. B, Rhod.) und **TP36** (Falc., Rhod.) selektiver hemmen. Die K_i -Werte für alle nicht-zeitabhängigen Inhibitoren bewegen sich für die Cystein-Proteasen bei sehr guten Werten zwischen 0.22 μM und 8.63 μM . Drei Werte sind geringfügig höher und rangieren zwischen 20.4 μM und 37.5 μM .

Betrachtet man die Kinetik-Daten der zeitabhängigen Inhibitoren, so findet man hier wie zu erwarten hauptsächlich die Epoxide. Das Aziridin **TP08** bildet hier die einzige Ausnahme, hat aber mit $k_{2\text{nd}} = 13,042 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nur einen durchschnittlichen $k_{2\text{nd}}$ -Wert bei Falcipain 2. Bei den Epoxiden hingegen zeigt sich ebenfalls ein breites Hemmspektrum. **TP22** hemmt die vier Cystein-Proteasen mit sehr guten $k_{2\text{nd}}$ -Werten zwischen 100,231 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und 1,078,152 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Fünf weitere Oxirane **TP21** (Cath. L, Falc. Rhod.), **TP14**, **TP15**, **TP16** (Cath. B, Cath. L, Falc.) und **TP23** (Cath. B, Falc., Rhod.) inhibieren je drei Proteasen mit mäßigen bis sehr guten Werten (4,250-1,019,674 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). **TP09**, **TP10** und **TP13** hemmen selektiv Cathepsin B und L mit eher durchschnittlichen Resultaten. Lediglich **TP10** weist mit $k_{2\text{nd}}(\text{Cath. B}) = 33,500 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ einen etwas besseren Wert auf. **TP19** ist an Cathepsin L (273,272 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und Rhodesain (183,944 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) sehr aktiv, seine Derivate hemmen dagegen Cathepsin L (**TP20**: 6,873 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) bzw. Cathepsin B (**TP11**: 11,690 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; **TP12**: 5,167 $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) nur schwach.

6.2 Einfluss des nucleophilen Bausteins

Der elektrophile „warhead“ spielt bei der Desaktivierung eines Enzymes die entscheidende Rolle. Während Aziridine am Stickstoffheteroatom zur weiteren Verbesserung des Inhibitors modifiziert werden können, bieten Epoxide nur bedingt eine Möglichkeit zur Derivatisierung. Im Normalfall reagieren Aziridine langsamer mit Nucleophilen als Epoxide,^[137] so dass letztere bevorzugt verwendet werden. Vergleicht man hingegen **TP08** mit **TP18**, die beide gleiche Substituenten und die gleiche Konfiguration besitzen, so beobachtet man keine Aktivität beim Epoxid gegenüber den getesteten Enzymen, jedoch eine selektive Hemmung von Falcipain 2 durch das Aziridin (vgl. Kapitel 6.1.3).

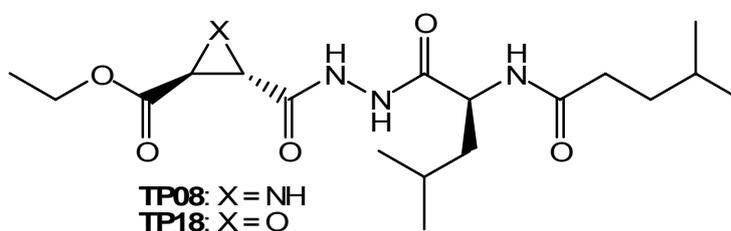


Abb. 6-2: Vergleich des Aziridins **TP08** mit dem Epoxid **TP18**.

Die vielfältigsten Modifikationsmöglichkeiten bieten jedoch die Michael-Akzeptor-substituierten Substanzen, insbesondere am Aromaten der Zimtsäure-Derivate. Hier kann man durch Eigenschaften des phenylogenen Substituenten die Doppelbindung direkt und somit auch die Hemmeigenschaften beeinflussen.

		SAP2	Cath. D
Name	R	K _i [μM]	K _i [μM]
TP32	H	5.15 ± 0.12	*9.47 ± 6.72
TP35	-NO ₂	65.4 ± 23.9	19.1 ± 3.40
TP38	-NMe ₂	11.0 ± 1.41	*4.16 ± 0.31

* 1-10 μM statt 10-100 μM

Abb. 6-3: Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substitutionsmustern in *para*-Position.

Variiert man den Phenylring in 2-Position in der *para*-Position mit verschiedenen Substituenten, die neutralen (Wasserstoff), elektronenziehenden (Nitro) oder elektronenschiebenden Charakter (Dimethylamino) besitzen, so ergibt sich für die Hemmeigenschaften **TP32>TP38>TP35** und somit $-H>-NMe_2>-NO_2$ (vgl. Abb. 6-3).

Enzym- und Cytotoxizitäts-Testungen mit **TP39** (vgl. Abb. 6-4) zeigen, dass der Nitroaromat für die Aktivität (K_i (SAP2) = 49.8 μ M; K_i (Cath. D) = 29.3 μ M) der Substanz ausschlaggebend ist. Dabei scheint eine *E*-konfigurierte Doppelbindung für die Hemmung essentiell zu sein. Keines

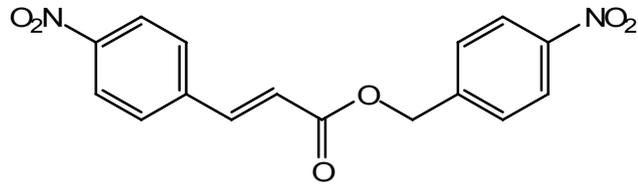


Abb. 6-4: Michael-Akzeptor **TP39**.

der dargestellten Maleate (**TP24**, **TP25**, **TP26**, **TP27**) ist bei den Enzym-Assays aktiv.

Vergleicht man die Inhibition durch die oben gezeigten Michael-Systeme **TP32**, **TP35** und **TP38** mit der des Epoxids **TP23**, das ebenso ein Phe-OBn Motiv trägt, so erkennt man, dass die Hemmung etwas schlechter, aber dennoch beachtlich ist, zudem die Oxiran-Funktion nicht für den Hemmmechanismus verantwortlich zu sein scheint (vgl. Kapitel 6.1.2). Ein Vergleich mit dem entsprechenden *cis*-Epoxid ist nicht möglich, da hier lediglich Werte für SAP2 und nicht für Cathepsin D vorhanden sind.^[65]

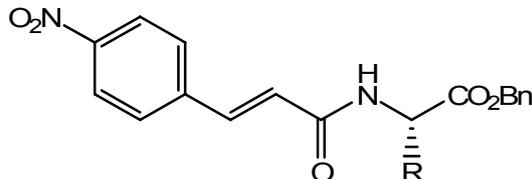
Ein Vergleich der Hemmeigenschaften zwischen Epoxiden und Doppelbindungssystemen ist nicht direkt möglich, wenn bei beiden Spezies unterschiedliche Bindungsmodi vorliegen. Olefine hemmen meist nur nicht-zeitabhängig und werden somit lediglich durch die Affinität zum Enzym, dem K_i -Wert (vgl. Kapitel 4.2), charakterisiert. Epoxide hingegen sind in der Regel irreversible Inhibitoren und hier spielen sowohl die Affinität zum Enzym, als auch die Geschwindigkeit des Alkylierungsschritts (k_i , vgl. Kapitel 4.2), eine Rolle. Dies bedeutet, dass man die eigentliche Hemmleistung prinzipiell nur unter der Berücksichtigung beider Komponenten (k_{2nd} -Wert) beurteilen kann. Ist hingegen die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung durch lineare Auftragung direkt bestimmt worden, ist die Dissoziationskonstante K_i nicht zugänglich. Vergleicht man nun die Affinität, also die K_i -Werte, der dargestellten Michael-Systeme mit denen der Epoxide bei der Hemmung von Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2 und Rhodesain, fällt auf, dass die Michael-Systeme in den meisten Fällen einen einstelligen K_i -Wert besitzen, die irreversiblen Systeme dagegen sich mit wenigen Ausnahmen generell eher im zwei- bis dreistelligen Bereich bewegen (vgl. Tabelle 4-25 und 4-28). Beispielsweise weisen **TP19**, **TP21** und **TP23** im Gegensatz zu anderen Epoxysuccinaten eine sehr hohe Affinität zu Rhodesain und Cathepsin L, mit K_i -Werten von 0.04 μ M bis 9.03 μ M, auf.

6.3 Einfluss der Aminosäuren

6.3.1 Einfluss des Alkylrestes der Aminosäuren

Synthetische Inhibitoren imitieren oft das Peptid-Rückgrat des natürlichen Substrats, um eine hohe Affinität zur Bindungstasche des Ziel-Enzyms zu erreichen. Aus diesem Grund ist die Aminosäure in unmittelbarer Umgebung zum „warhead“ von immenser Bedeutung für die Platzierung in der Nähe des katalytischen Zentrums.

Aus der Reihe der Zimtsäurederivate mit Phenylalanin in direkter Nachbarschaft zur Doppelbindung (vgl. Abb. 6-5) weist **TP35** etwas schlechtere Werte als die anderen getesteten Derivate auf. Tauscht man hingegen Phenylalanin durch Valin oder Leucin aus, so verbessert sich die Aktivität um das dreizehnfache bei SAP2 und ca. das vierfache bei Cathepsin D (vgl. Abb. 6-5).

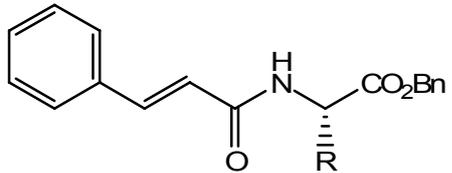


		SAP2	CathD
Name	R	K_i [μM]	K_i [μM]
TP35	$-\text{CH}_2\text{-Ph}$	65.4 ± 23.9	19.1 ± 3.40
TP36	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	17.4 ± 2.11	14.6 ± 0.50
TP37	$-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	4.85 ± 1.59	$*4.89 \pm 1.07$

* 1-10 μM statt 10-100 μM

Abb. 6-5: 4-Nitrozimtsäure-Derivate mit verschiedenen Aminosäuren.

Vermutlich eignen sich die, im Gegensatz zum Benzyl-Rest des Phenylalanins, kleineren Alkylreste besser für hydrophobe Wechselwirkungen in der benachbarten Bindetasche. Allerdings liefert eine Variation der Aminosäure des unsubstituierten Zimtsäurederivats **TP32** (Phe) zu **TP33** (Val) in etwa gleiche K_i -Werte ($K_i(\text{TP32}) = 9.47 \pm 6.72 \mu\text{M}$; $K_i(\text{TP33}) = 14.3 \pm 3.67 \mu\text{M}$) bei der Hemmung von Cathepsin D. Das Alanin-Analogon **TP34** zeigt keinerlei Hemmung von Cathepsin D. Alle drei Verbindungen sind gegenüber SAP2 inaktiv (vgl. Abb. 6-6).

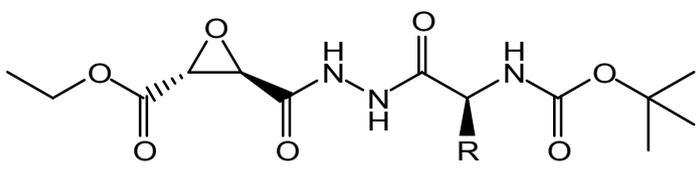


		CathL	CathD
Name	R	K_i [μM]	K_i [μM]
TP32	$-\text{CH}_2\text{-Ph}$	13.5 ± 0.53	6.88 ± 0.27
TP33	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	k. H.	14.3 ± 3.67
TP34	$-\text{CH}_3$	k. H.	k. H.

* 1-10 μM statt 10-100 μM

Abb. 6-6: Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Aminosäuren.

Neben den Michael-Systemen sind, wie in Kapitel 1.1.3.1 bereits behandelt, Epoxysuccinate vielversprechende Leitstrukturen für Cystein-Protease-Inhibitoren. Die dargestellten Verbindungen unterscheiden sich entweder durch die Verknüpfung zum Elektrophil, durch die Gruppe am terminalen Ende der Aminosäure oder durch den Alkylrest an der Aminosäure selbst. Zunächst wird hier aber lediglich auf den Effekt des Aminosäurerestes eingegangen. Der Einfluss der anderen Gruppen wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert.



		Cathepsin B	Cathepsin L
Name	R	$k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]	$k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]
TP09	$-\text{CH}_2\text{-Ph}$	$6,250 \pm 583$	$7,100 \pm 2.83$
TP10	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	* $33,500 \pm 1,667$	$12,024 \pm 194$
TP11	$-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	$11,690 \pm 221$	k. H.

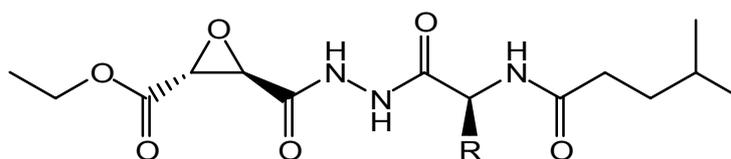
* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-7: Epoxid-Hydrazide mit verschiedenen (S)-Aminosäuren und BOC-Schutzgruppe.

Betrachtet man Epoxysuccinate mit EtO-(2*R*,3*R*)-Eps-NH-NH-AS-BOC-Schema, so findet man sowohl bei der Hemmung von Cathepsin B als auch bei Cathepsin L eine Bevorzugung von Isopropyl gegenüber Benzyl oder Isobutyl als Aminosäureseitenkette.

Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung sind im Fall der Hemmung von Cathepsin B durch **TP10** vier- bis fünfmal höher als bei den Phenylalanin- bzw. Leucin-Derivaten (vgl. Abb. 6-7). Der Grund hierfür könnte die sperrige *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe sein, die durch ihren enormen sterischen Anspruch den Inhibitor weiter in Richtung der hydrophoben S2-Tasche verschiebt, so dass daher nur noch kleinere Reste in dieser Tasche Platz finden.

Epoxysuccinate mit EtO-(2*R*,3*R*)-Eps-NH-NH-AS-IAA-Motiv folgen bei der Inhibition von Cathepsin B und L dem gleichen Trend wie ihre BOC-geschützten Analoga. Der Isopropyl-Rest des Valins hebt sich deutlich von den Derivaten mit Phenylalanin bzw. Leucin ab, die beide in etwa gleiche Hemmkonstanten aufweisen (vgl. Abb. 6-8). Die für die Hemmung von Falcipain 2 ermittelten k_{2nd} -Werte aller drei Verbindungen bewegen sich ungefähr im gleichen Bereich, mit leichten Vorzügen zugunsten des Phenylalanin-substituierte Epoxids **TP14**.



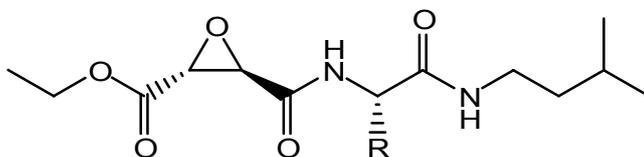
		Cathepsin B	Cathepsin L	Falcipain 2
Name	R	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]
TP14	-CH ₂ -Ph	4,759 ± 83.3	16,072 ± 1,218	10,272 ± 1,149
TP15	-CH(CH ₃) ₂	*29,083 ± 750	39,972 ± 8,830	5,763 ± 1,302
TP16	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	4,250 ± 83.3	11,999 ± 78.5	5,052 ± 416

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-8: Epoxid-Hydrazide mit verschiedenen (S)-Aminosäuren und ICA-Gruppe.

Die Untersuchungen an den Epoxiden ohne Hydrazid-Funktion **TP19**, **TP20** und **TP21** zeigt einen entgegen gesetzten Trend im Vergleich zu den in Abb. 6-7 und 6-8 dargestellten Epoxiden. Hier schneidet **TP20** mit Valin als Aminosäure bei den Testungen an Cathepsin L, Falcipain 2 und Rhodesain am schlechtesten ab (vgl. Abb. 6-9). **TP19** mit Phenylalanin dagegen hemmt mit einer sehr guten Hemmkonstante von $k_{2nd} = 273,272 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ Cathepsin L offensichtlich besser als das **TP21** mit dem Isobutyl-Rest des Leucins ($k_{2nd} = 40,604 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Beim Rhodesain-Assay dreht sich diese Tendenz um. Hier zeigt **TP19** zwar immer noch einen guten Wert von $k_{2nd} = 183,944 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ist

TP21 jedoch deutlich unterlegen, welches einen k_{2nd} -Wert von $1,019,674 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufweist. **TP21** hemmt als Einzige dieser drei Verbindungen Falcipain 2.

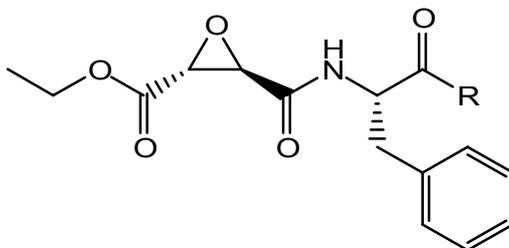


		Cathepsin L	Falcipain 2	Rhodesain
Name	R	$k_{2nd} [\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}]$	$k_{2nd} [\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}]$	$k_{2nd} [\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}]$
TP19	-CH ₂ -Ph	*273,272 ± 4,317	k. H.	183,944 ± 31,485
TP20	-CH(CH ₃) ₂	6,873 ± 46.5	k. H.	k. H.
TP21	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	*40,604 ± 1,177	16,456 ± 1,217	*1,019,674 ± 114,065

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-9: Epoxysuccinate mit verschiedenen (S)-Aminosäuren und IAA-Gruppe.

6.3.2 Einfluss der Schutzgruppe am terminalen Ende der Aminosäure



		Cathepsin B	Cathepsin L	Rhodesain	Cathepsin D
Name	R	k_{2nd}	k_{2nd}	k_{2nd}	K_i
TP19	-IAA	k. H.	*273,272 ± 4,317	183,944 ± 31,485	k. H.
TP23	-O-Bn	4,917 ± 417	*72,718 ± 24,738	32,804 ± 2,629	44.8 ± 0.12

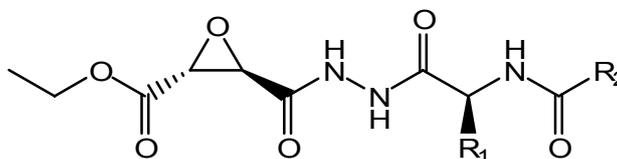
1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung, k_{2nd} -Werte in $[\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}]$, K_i -Werte in $[\mu\text{M}]$

Abb. 6-10: Epoxysuccinate mit Benzyl- oder IAA- geschütztem Terminus.

Ein weiterer Faktor, der die Hemmeigenschaften der synthetisierten Inhibitoren beeinflussen kann, ist das terminale Ende der Aminosäure. In den bekannten Epoxysuccinaten E64c (HO-(2S,3S)-Eps-Leu-IAA) und E64d (EtO-(2S,3S)-Eps-Leu-IAA) befindet sich hier ein Isoamylamid-Rest (IAA), welcher mit seinem Isobutyl-Rest die hydrophobe S3-Tasche (Phe75) von Cathepsin B adressiert.^[138] Hier bietet sich ein Vergleich mit einer aromatischen Endgruppe an, wie einem Benzylester, der zudem noch π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Sechsringen möglich machen könnte.

Tatsächlich ist es so, dass durch den Austausch des Isoamylamids gegen den Benzylester ein aktiver Inhibitor entsteht. Die Geschwindigkeitskonstante k_{2nd} beträgt für **TP23** in diesem Fall $4,917 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. **TP23** zeigt im Gegensatz zu **TP19** auch eine Hemmung von Cathepsin D, welche, wie in Kapitel 6.1.2 bereits beschrieben, auf das Phe-OBn-Motiv zurückzuführen sein könnte. Beide in Abb. 6-10 gezeigten Epoxide hemmen Cathepsin L und Rhodocain. **TP19** besitzt hier im Vergleich zu **TP23** drei- bis fünffach höhere Hemmkonstanten.

Nimmt man nun die in Abb. 6-11 aufgelisteten Verbindungen in Augenschein, um den Einfluss auf die Hemmeigenschaften zwischen *tert*-Butoxycarbonyl- (BOC) und Isocaproinsäure-Gruppe (ICA) zu vergleichen, so lässt sich auch hier ein gewisser Trend feststellen.



Name	R ₁	R ₂	Cathepsin B			Cathepsin L		Falcipain 2	
			$k_{2nd} [\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}]$						
TP09	-CH ₂ -Ph	-BOC	6,250 ± 583	7,100 ± 2.83				k. H.	
TP14	-CH ₂ -Ph	-ICA	4,750 ± 83.3	16,072 ± 1,218				10,272 ± 1,149	
TP10	-CH(CH ₃) ₂	-BOC	33,500 ± 1,667	12,024 ± 194				k. H.	
TP15	-CH(CH ₃) ₂	-ICA	29,083 ± 750	39,972 ± 8,830				5,763 ± 1,302	
TP11	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-BOC	11,690 ± 221		k. H.			k. H.	
TP16	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-ICA	4,250 ± 83.3	11,999 ± 78.5				5,052 ± 416	

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-11: Epoxid-Hydrazide mit verschiedenen (S)-Aminosäuren und Endgruppen.

Zunächst ist bei der Hemmung von Cathepsin B kein großer Unterschied zwischen beiden Varianten zu erkennen. Lediglich zwischen **TP11** und **TP16** ist ein kleiner Unterschied zugunsten des BOC-Derivats vorhanden.

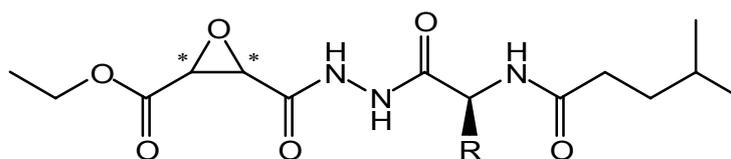
Betrachtet man nun die Ergebnisse der Cathepsin L-Assays, so wird der Unterschied zwischen den Endgruppen schon deutlicher. Hier wird das Enzym stets effektiver durch das ICA-Derivat als durch das entsprechende BOC-Derivat desaktiviert. Die größte Selektivität besitzen die ICA-substituierten Epoxide jedoch bei der Hemmung von Falcipain 2. Hier ergeben sich k_{2nd} -Werte zwischen $5,052 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $10,272 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, während die BOC-geschützten Derivate komplett inaktiv sind.

6.4 Einfluss der Stereochemie

6.4.1 Einfluss der Konfiguration am Dreiring

Im natürlichen Vorbild für Epoxysuccinyl-Inhibitoren E-64 ist die (2S,3S)-Konfiguration des Elektrophils von entscheidender Bedeutung für die Hemmeigenschaften gegenüber Cystein-Proteasen wie Cruzain, Cathepsin B und L. Auch bei vielen Derivaten wird die (2S,3S)-Form bevorzugt. Als eine der wenigen Ausnahmen ist ein (2R,3R)-Derivat bekannt, welches am Ende der Peptidkette ein freies Carboxylat trägt und dadurch die Wechselwirkung mit dem „occluding loop“ von Cathepsin B nutzt.^[139]

Die in Abb. 6-11 gezeigten Epoxysuccinyl-Hydrazide sind die Aza-Analoga von E64d und ihren Derivaten mit Phenylalanin statt Leucin. Sie besitzen, neben dem Epoxysuccinylethylester, eine über ein Hydrazid verknüpfte Aminosäure mit aliphatischer Isocapronsäure-Gruppe am terminalen Ende. Dies hat zur Folge, dass die Aminosäure über den C- und nicht wie gewöhnlich über den N-Terminus an das Succinat geknüpft ist. Betrachtet man nun die Hemmeigenschaften der synthetisierten Verbindungen **TP16** und **TP18** bzw. **TP14** und **TP17**, so zeigt sich, dass ausschließlich die (2R,3R)-Derivate gegenüber Cathepsin B, Cathepsin L und Falcipain 2 aktiv sind. Die (2S,3S)-Analoga zeigen keinerlei Aktivität.



Name	TP16	TP18	TP14	TP17
Epoxid	<i>R,R</i>	<i>S,S</i>	<i>R,R</i>	<i>S,S</i>
R	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ -Ph	-CH ₂ -Ph
CathB	4,250 ± 83.3	k. H.	4,750 ± 83.3	k. H.
CathL	11,999 ± 78.5	k. H.	16,072 ± 1,218	k. H.
Falc.	5,052 ± 416	k. H.	10,272 ± 1,149	k. H.

* 1-10 µM statt 10-100 µM; k. H.: keine Hemmung, k_{2nd} -Werte in [M⁻¹ min⁻¹]

Abb. 6-12: (2*R*,3*R*)-Epoxysuccinate im Vergleich mit ihren (2*S*,3*S*)-Derivaten.

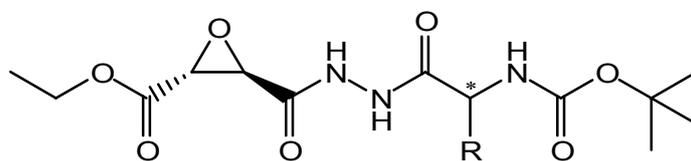
Nun kann man vermuten, dass die Hydrazide wie bekannte aktive (2*R*,3*R*)-Epoxysuccinate einen anderen Bindungsmodus in Cathepsin B besitzen. Diese (2*R*,3*R*)-Epoxide lassen dagegen die NH-Gruppe in β-Position zu C3 vermissen, welche eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe des Gly198 ausbildet und so ein notwendiges Strukturmerkmal darstellt. Inhibitoren mit Proton-Donor in dieser Position sind in der Regel mit (2*S*,3*S*)-Konfiguration deutlich aktiver.^[138]

Bei den Epoxysuccinyl-Hydraziden ist jedoch das Gegenteil der Fall. Hier erzielen die Epoxide mit (2*R*,3*R*)-Konfiguration Hemmwerte zwischen 4,250 M⁻¹ min⁻¹ und 16,072 M⁻¹ min⁻¹.

6.4.2 Einfluss der Konfiguration der Aminosäure

Das Strukturmotiv der in dieser Arbeit synthetisierten Epoxide besteht, wie oben bereits erwähnt, aus EtO-Eps-NH-NH-AS-PG mit PG für die terminale Schutzgruppe (protective group). Durch die Hydrazid-Verknüpfung zwischen dem Epoxysuccinat und der Aminosäure kommt es zu einer Inversion der Aminosäuresequenz (vgl. Kapitel 6.4.1) und damit auch zu einer anderen räumlichen Orientierung des Aminosäurerestes. Als Folge daraus ist es wahrscheinlich, dass beispielsweise die S2-Bindetasche von Cathepsin B nicht mehr adressiert werden kann und zudem sterische Effekte eine gute Hemmung

verhindern. Da die Aminosäure jedoch einen erheblichen Teil zur Wechselwirkung mit dem Enzym beiträgt, ist es wichtig in Erfahrung zu bringen, welche Auswirkung die Konfiguration des Stereozentrums der Aminosäure auf die inhibitorischen Eigenschaften des Moleküls hat.



Name	R	Stereo	Cathepsin B		Cathepsin L	
			k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]			
TP09	-CH ₂ -Ph	S	6,250 ± 583	7,100 ± 2.83		
TP12	-CH ₂ -Ph	R	5,167 ± 333	k. H.		
TP11	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	S	11,690 ± 221	k. H.		
TP13	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	R	5,000 ± 167	2,942 ± 0.00		

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-13: Epoxid-Hydrazide mit verschiedenen konfigurierten Aminosäuren.

Wie in Abb. 6-13 zu sehen ist, wurden EtO-(2*R*,3*R*)-Epoxy succinate über eine Hydrazid-Bindung jeweils mit dem *R*- bzw. *S*-Enantiomer von Phenylalanin oder Leucin verknüpft. Am terminalen Ende der Sequenz befindet sich eine *tert*-Butoxycarbonylgruppe.

Die Enzymkinetik-Daten zeigen, dass bei der Hemmung von Cathepsin B kaum ein Unterschied zwischen der *R*- bzw. *S*-Konfiguration besteht. Die k_{2nd} -Werte befinden sich alle in der gleichen Größenordnung zwischen 5,000 $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ und 11,690 $M^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Die Ergebnisse der Cathepsin L-Assays andererseits lassen keine eindeutige Interpretation zu. Wird Phenylalanin als Aminosäure eingebaut, hemmt lediglich das *S*-Enantiomer mit $k_{2nd} = 7,100 M^{-1} \text{ min}^{-1}$, wohingegen das (*R*)-Phenylalanin-Derivat inaktiv bleibt. Befindet sich Leucin in der Aminosäure-Sequenz ist das Gegenteil der Fall. Das Epoxy succinat mit (*S*)-Leucin ist die inaktive Spezies, während das *R*-Enantiomer einen k_{2nd} -Wert von 2,942 $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufweist.

6.4.3 Einfluss der Z- / E-Konfiguration bei Olefinen

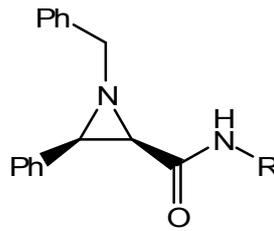
Ausgehend von dem bereits untersuchten Fumarat EtO-Fum-Phe-OBn, welches geringe Aktivität gegen Cathepsin L und SAP2 aufweist,^[65] wurden die entsprechenden Derivate mit anderen Aminosäuren (Val, Ala, Leu) dargestellt. Bedauerlicherweise sind diese gegenüber keinem der getesteten Enzyme aktiv. Andererseits blieb die Cytotoxizität gegenüber Makrophagen erhalten.

Die synthetisierten Maleate mit HO-Mal-AS-OBn-Motiv sind häufig untersuchte Substanzen im Rahmen von QSAR-Studien (quantitative structure-activity relationship) für α -Chymotrypsin.^[140] Sie zeigen zusammen mit ihren *p*-Nitrobenzyl-Derivaten vielversprechende Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung.^[141] Die Testung der synthetisierten Maleate, welche an verschiedene Aminosäurebenzylester (Phe, Val, Ala, Leu) geknüpft sind, führte bei keiner der acht verwendeten Cystein- bzw. Aspartatproteasen zu einer Inaktivierung. Folglich hemmen die Olefine mit Z-Konfiguration Chymotrypsin selektiv und sind im Vergleich zu den Fumaraten als Inhibitor ebenfalls keine Alternative für die getesteten Proteasen. Interessant ist hier lediglich die Tatsache, dass **TP24** und **TP25** im Gegensatz zu ihren Ethylestern^[65] nicht toxisch für Makrophagen sind.

6.5 Aza- vs. Nicht-Aza-Aminosäuren

Im Allgemeinen bieten azapeptidische Verbindungen eine bessere Beständigkeit gegenüber enzymatischer Hydrolyse als peptidische Inhibitoren. Dies hat den Vorteil, dass der Wirkstoff nicht abgebaut wird, bevor er seinen Wirkungsort erreicht hat (vgl. Kapitel 1.3). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch die Umkehr der Hydrazid-verknüpften Peptidsequenz eine Veränderung der räumlichen Anordnung stattfindet. Dadurch ist es denkbar, dass die Aktivität des ursprünglichen Wirkstoffes verloren geht, da die Bindungstasche des Ziel-Enzyms nicht mehr vollständig adressiert werden kann. Andererseits kann die räumliche Veränderung auch dazu führen, dass eine unwirksame Substanz zu einem aktiven Stoff wird. Durch die Synthese von azapeptidischen Aziridinen und Epoxiden ist es möglich, einen Vergleich mit verwandten Inhibitoren anzustellen.

Ausgehend von den bereits bekannten Aziridinen **BDA-07** und **BDA-08**,^[65] welche Aktivität gegen die Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D zeigen, wurden die Azapeptide **TP06** und **TP07** synthetisiert (vgl. Abb. 6-14).



		SAP2	Cathepsin D
Name	R	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]
BDA-07	-Phe-OBn	9,265	34,770
TP06	-NH-Phe-BOC	k. H.	k. H.
BDA-08	-Val-OBn	14,386	260,663
TP07	-NH-Val-BOC	k. H.	k. H.

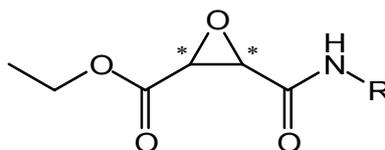
* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-14: k_{2nd} -Werte von azapeptidischen und nicht-azapeptidischen Aziridinen.

Die Assays an SAP2 und Cathepsin D ergaben jedoch keinerlei Aktivität der beiden Substanzen. Durch die Kettenverlängerung aufgrund der Hydrazid-Funktion und die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe ist anzunehmen, dass eine Adressierung der S1'- und S2'-Bindungstasche der SAP2 nicht mehr gewährleistet ist.

Bei den Epoxysuccinaten stellt sich ein anderes Bild dar, denn hier verändert sich in einigen Fällen die Enzym-Selektivität der azapeptidischen Analoga. Vergleicht man **TP23** und **TP09**, die beide Phenylalanin als Aminosäure tragen, sich aber in deren Verknüpfung und der Endgruppe unterscheiden, so erkennt man, dass **TP09** zwar bei der Hemmung von Cathepsin L oder Rhodesain deutlich schwächer als **TP23** ist, aber bei der Inhibition von Cathepsin B Hemmkonstanten in der gleichen Größenordnung erreicht werden (vgl. Abb. 6-15).

Tauscht man nun die unterschiedliche Endgruppe in beiden Fällen durch *iso*-Butyl-Reste aus, so lässt sich erkennen, dass im Falle von **TP19** die k_{2nd} -Werte gegen Cathepsin L und Rhodesain um das vier- bis sechsfache auf bis zu $273,272 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ansteigen. Damit ist **TP19** dem **TP14** deutlich überlegen. Im Gegensatz zu **TP19** jedoch, zeigt das Hydrazid **TP14** Aktivität gegen Cathepsin B und Falcipain 2 mit k_{2nd} -Werten von $4,750 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Cathepsin B) und $10,272 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Falcipain 2).



Name	R	Ring-Konf.	Cath.B	Cath.L	Falc.	Rhod.
TP23	-Phe-OBn	<i>R,R</i>	4,917	*72,718	k. H.	32,804
TP09	-NH-Phe-BOC	<i>R,R</i>	6,250	7,100	k. H.	k. H.
TP19	-Phe-IAA	<i>R,R</i>	k. H.	*273,272	k. H.	183,944
TP14	-NH-Phe-ICA	<i>R,R</i>	4,750	16,072	10,272	k. H.
TP20	-Val-IAA	<i>R,R</i>	k. H.	6,873	k. H.	k. H.
TP15	-NH-Val-ICA	<i>R,R</i>	*29,083	39,972	5,763	k. H.
TP21	-Leu-IAA	<i>R,R</i>	k. H.	*40,604	16,456	*1,019,674
TP16	-NH-Leu-ICA	<i>R,R</i>	4,250	11,999	5,052	k. H.
E64d	-Leu-IAA	<i>S,S</i>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
TP18	-NH-Leu-ICA	<i>S,S</i>	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; k. H.: keine Hemmung; n. b.: nicht bestimmt; $k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]; Cath.B: Cathepsin B, Cath.L: Cathepsin L, Falc.: Falcipain 2, Rhod.: Rhodesain.

Abb. 6-15: $k_{2\text{nd}}$ -Werte von azapeptidischen und nicht-azapeptidischen Epoxid-Inhibitoren.

Substituiert man in **TP19** und **TP14** die Aminosäure Phenylalanin mit dem kleineren Valin, so unterscheiden sich die daraus erhaltenen Hemmdaten von **TP20** und **TP15** völlig im Vergleich zu denen von **TP19** und **TP14**. **TP20** zeigt nur noch schwache Aktivität gegen Cathepsin L und ist gegen Cathepsin B, Falcipain 2 und Rhodesain komplett inaktiv. **TP15** hingegen hemmt Cathepsin B und Cathepsin L mit guten Geschwindigkeitskonstanten von etwa 30,000-40,000 $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ und Falcipain 2 mit $k_{2\text{nd}} = 5,763 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass im Vergleich zu den Derivaten ohne Hydrazid-Funktion ein anderer Bindungsmodus der Aza-Inhibitoren bei den getesteten Enzymen vorliegt. Die strukturellen Unterschiede des Azapeptids **TP15** im Vergleich zu **TP20** scheinen für den anderen Bindungsmodus entscheidend zu sein.

Ersetzt man die verwendete Aminosäure durch Leucin, erhält man das (*2R,3R*)-Analogon von E64d. Dieses hemmt, wie zu erwarten, sehr gut Cathepsin L ($k_{2\text{nd}} = 40,604 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$) und Rhodesain ($k_{2\text{nd}} = 1,019,674 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$), zeigt aber auch passable Aktivität gegen Falcipain 2 ($k_{2\text{nd}} = 16,456 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$). Gegen Cathepsin B wurde keine Hemmung

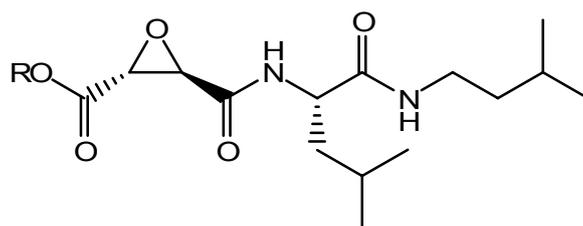
beobachtet. Das azapeptidische Pendant **TP16** hingegen zeigt wiederum schwache Aktivität gegen Cathepsin B ($k_{2nd} = 4,250 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ist allerdings gegen Cathepsin L und Falcipain 2 **TP21** deutlich unterlegen (vgl. Abb. 6-15). **TP16** hemmt zudem auch nicht Rhodesain.

Die bislang diskutierten Epoxysuccinate sind, wie oben bereits erwähnt, im Gegensatz zu den natürlichen Vorbildern nicht (2S,3S)-konfiguriert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das (2S,3S)-Epoxid **TP18** dargestellt, bei dem es sich um das Azapeptid-Analogon zu (2S,3S)-E64d handelt. E64d ist ein bekannter Inhibitor, der gegen Cathepsin B^[26] und Falcipain 2^[4] IC₅₀-Werte im mikro- bis nanomolaren Bereich aufweist. Testungen an dem verwandeten Papain lieferten Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von ca. $45,000 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.^[142] Erstaunlicherweise zeigt **TP18** gegen keines der getesteten Enzyme Aktivität. Offensichtlich ist die Insertierung einer Hydrazid-Funktion zwischen Epoxysuccinat und Aminosäure und aller damit verbundenen räumlichen Konsequenzen ausreichend, um das Molekül inkompatibel zum Enzym zu machen und so alle Hemmeigenschaften zu verlieren.

6.6 Einfluss der Aminosäurerester

Neben dem Einfluss auf die Cytotoxizität (vgl. Kapitel 6.4.3) spielt ein Ethylester im Vergleich zu einem Carboxylat noch eine andere Rolle. Beispielsweise ist das Epoxysuccinat E64c mit seinem freien Carboxylat nicht in der Lage Zell-Membranen zu durchdringen und so an seinen eigentlichen Wirkungsort zu gelangen. Anders hingegen ist der dazugehörige Ethylester E64d lipophiler und somit membrangängig. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass E64d intrazellulär durch Esterasen in seine aktive Form E64c umgewandelt wird,^[143, 144] was durch die höhere Aktivität von E64d im Vergleich zu E64c bei *In-vivo*-Tests an Hamstern erklärt werden kann.^[143]

Die (2R,3R)-Derivate der (2S,3S)-konfigurierten Epoxysuccinate E64c und E64d sind schon in der Literatur bekannt und an Papain ((2R,3R)-E64d) bzw. Cathepsin B und Cathepsin L ((2R,3R)-E64c) getestet worden.^[145, 146] Sowohl (2R,3R)-E64c als auch (2R,3R)-E64d zeigen hierbei sehr gute Hemmeigenschaften. Das in dieser Arbeit synthetisierte Kalium-Salz des (2R,3R)-E64c (**TP22**) zeigt in Übereinstimmung mit der Literatur im Gegensatz zu seinem Ethylester-Derivat Aktivität an Cathepsin B. Ebenso ist bei den Assays an Cathepsin L, Falcipain 2 und Rhodesain eine deutlich stärkere Hemmung durch das (2R,3R)-E64c-Kalium-Salz (**TP22**) beobachtet worden (vgl. Abb. 6-16).



		Cathepsin B	Cathepsin L	Falcipain 2	Rhodesain
Name	R	k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]			
TP22	K	*100,231 ± 9,917	**1,078,152 ± 184,001	99,488 ± 0.00	*643,235 ± 8,524
TP21	Et	k. H.	*40,604 ± 1,177	16,456 ± 1,217	*1,019,674 ± 114,065

* 1-10 μM statt 10-100 μM ; ** 0.1-10 μM ; k. H.: keine Hemmung

Abb. 6-16: Vergleich der (2R,3R)-Derivate von E64c und E64d.

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

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Zentrum für Infektionsforschung (Zinf) der Universität Würzburg zahlreiche Verbindungen gegen zwei verschiedene Parasiten getestet (vgl. Kapitel 5.2).

Zum einen handelt es sich hierbei um den Parasiten *Trypanosoma brucei brucei*, welcher für die häufig in Afrika auftretende Tierseuche Nagana verantwortlich ist. Verwandte Erreger wie z.B. *Trypanosoma brucei rhodesiense* können beim Menschen die Schlafkrankheit auslösen.^[147] Eine ganze Reihe der getesteten Verbindungen (**TP06**, **TP07**, **TP09**, **TP35**, **TP29**, **TP32**, **TP16**, **TP10**, **TP14**, **TP15**, **TP12**, **TP20**, **TP36**) sind gegen den Parasiten aktiv und erreichen IC_{50} -Werte von 0.51 μM bis 21.5 μM . Jedoch geht diese Aktivität meist mit einer Cytotoxizität der Substanzen einher. Bei Cytotoxizitätstests mit dem Makrophagen-Stamm J774.1 erhält man IC_{50} -Werte zwischen 10.0 μM und 50.8 μM , die allerdings immer höher als der jeweilige IC_{50} -Wert an Trypanosomen liegen (vgl. Tabelle 5-1). Drei der untersuchten Inhibitoren (**TP07**, **TP14**, **TP20**) haben erfreulicherweise keine cytotoxische Wirkung auf die Makrophagen und weisen gegen *T. brucei brucei* IC_{50} -Werte von $IC_{50}(\text{TP07}) = 21.5 \mu\text{M}$, $IC_{50}(\text{TP14}) = 16.0 \mu\text{M}$ und $IC_{50}(\text{TP20}) = 18.8 \mu\text{M}$ auf.

Der zweite Parasit *Leishmania major* ist der Auslöser für die Infektionskrankheit Leishmaniose.^[148] Hier zeigte **TP06** als Einzige der getesteten Verbindungen mit einem

IC₅₀ von 70 µM eine Wirkung auf die Parasiten. Tests an Makrophagen J774.1 belegen jedoch, dass die Substanz auch cytotoxisch ist.

6.8 Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden viele Strukturmerkmale der synthetisierten Inhibitoren miteinander verglichen. Diese unterscheiden sich nicht nur in den elektrophilen Kopfgruppen mit unterschiedlicher Substitution oder Konfiguration, sondern auch in der Verknüpfung der Aminosäure und deren Gruppe am terminalen Ende der Aminosäure.

Zusammenfassend fällt auf, dass zum einen die dargestellten Michael-Systeme im Gegensatz zu den Epoxiden oder Azirdinen die getesteten Aspartat-Proteasen hemmen und dass sich hier die substituierten Zimtsäurederivate mit Leucin mit K_i -Werten von etwa 5.0 µM als sehr effektiv erweisen. Die Inaktivität der Epoxide ist nicht unerwartet, da, wie in Kapitel 1.2.3.1 erwähnt, elektrophile Dreiringe als Inhibitoren von Aspartat-Proteasen lediglich mit *cis*-Konfiguration bekannt sind.

Zum anderen hat sich bei den Oxiranen gezeigt, dass mit keinem der dargestellten Inhibitoren, ähnliche Inaktivierungskonstanten, wie die der beiden bekannten Vergleichssubstanzen E64c und E64d, erzielt wurden. Betrachtet man nun separat die azapeptidischen Verbindungen, so sind folgende Charakteristika des Inhibitors für die Hemmung von Cathepsin B von Vorteil. Das Azapeptid sollte ein Epoxysuccinyl mit (2*R*,3*R*)-Konfiguration sowie Valin als Aminosäure mit *S*-Konfiguration und eine *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe am terminalen Ende besitzen. Kombiniert man diese Strukturmerkmale, so gelangt man zum Azapeptid **TP10**, welches mit $k_{2nd} = 33,500 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ die höchste Geschwindigkeitskonstante aller dargestellten Azapeptide gegen Cathepsin B aufweist. Die Substitution der Endgruppe von BOC zu ICA führt zu **TP15**, welches im Cathepsin L-Assay mit $k_{2nd} = 39,972 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ den vielversprechendsten Inhibitor darstellt. Falcipain 2 hingegen wird von **TP14**, **TP15** und **TP16** in etwa gleichem Maße gehemmt.

Insgesamt betrachtet erzielen die azapeptidischen Verbindungen geringere Inaktivierungskonstanten in den Enzym-Assays als ihre peptidischen Vergleichssubstanzen. Möglicherweise erhält man eine Optimierung der Strukturen durch Alkylierung eines Hydrazid-Stickstoffes, wie bereits in diversen Veröffentlichungen^[46, 120] gezeigt werden konnte.

7. Ergebnisse der Elektronendichtebestimmung und der Modellreaktionen

Da es sich in diesem Kapitel um die Ergebnisse unserer Kooperationspartner von der FU Berlin handelt, wird nur eine kurze Übersicht über die Vorgehensweise der Kristallzucht und die Ergebnisse der Elektronendichtemessungen gegeben. Alle gezeigten Bilder sind mit freundlicher Genehmigung von Simon Grabowsky, AG Prof. Peter Luger, FU Berlin, abgebildet.

7.1 Kristallisation und Elektronendichtebestimmung

Für eine Elektronendichtemessung ist eine hohe Anzahl an Reflexionen erforderlich. Aus diesem Grund wird neben der hohen Primärstrahlung ein Einkristall von hoher Qualität und ausreichender Größe (ca. 0.6 mm in jeder Raumrichtung) der zu messenden Verbindung benötigt.

Das Standardverfahren zur Kristallisation von Proteinen nach der Hanging-drop-Methode^[149, 150] wird für gewöhnlich im wässrigen Medium durchgeführt. Die zu kristallisierenden elektrophilen Bausteine **TP01**, **TP02** und **TP03** sind jedoch nur in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Dichlormethan löslich, welches aufgrund seiner zu geringen Oberflächenspannung nicht zur Tropfenbildung neigt. Jedoch konnten geeignete Einkristalle der o.g. 2,2-Dicarboxylate über die Diffusionsmethode^[151] oder die Abdampfmethode gewonnen werden.



Abb. 7-1: Kristalle des Dimethyl 3-(4-nitrophenyl)aziridin-2,2-dicarboxylats (**TP01**).

Neben den Verbindungen **TP01**, **TP02** und **TP03** gelang auch die Kristallisation von sieben weiteren Verbindungen, die in Tabelle 7-2 aufgeführt sind. Sowohl die

Kristallisation, als auch die Vermessung der Kristalle sowie die dazugehörige Auswertung sind jedoch Teil einer anderen Arbeit,^[152] so dass hier nur kurz auf die bereits veröffentlichten Resultate^[153, 154] des elektrophilen Bausteins **TP01** eingegangen wird.

Tabelle 7-2: Kristallisierte Verbindungen für die Synchrotronmessungen.

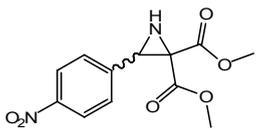
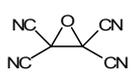
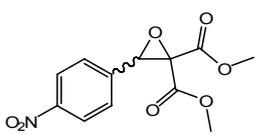
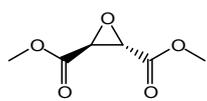
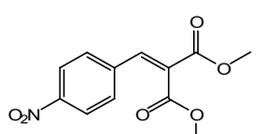
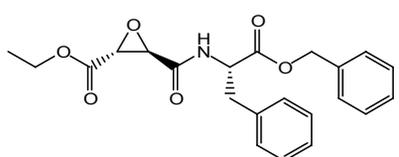
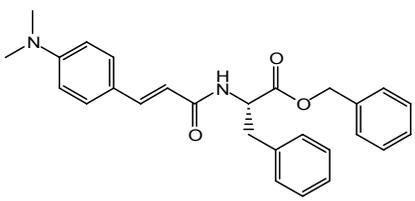
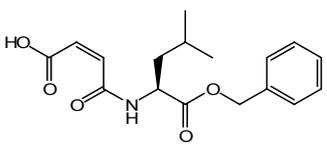
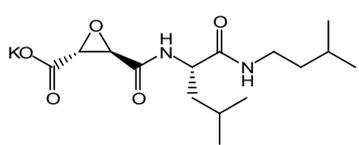
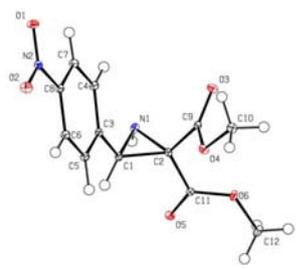
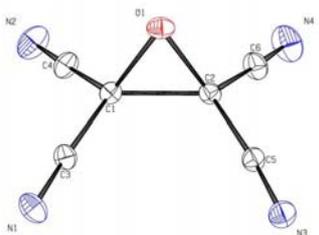
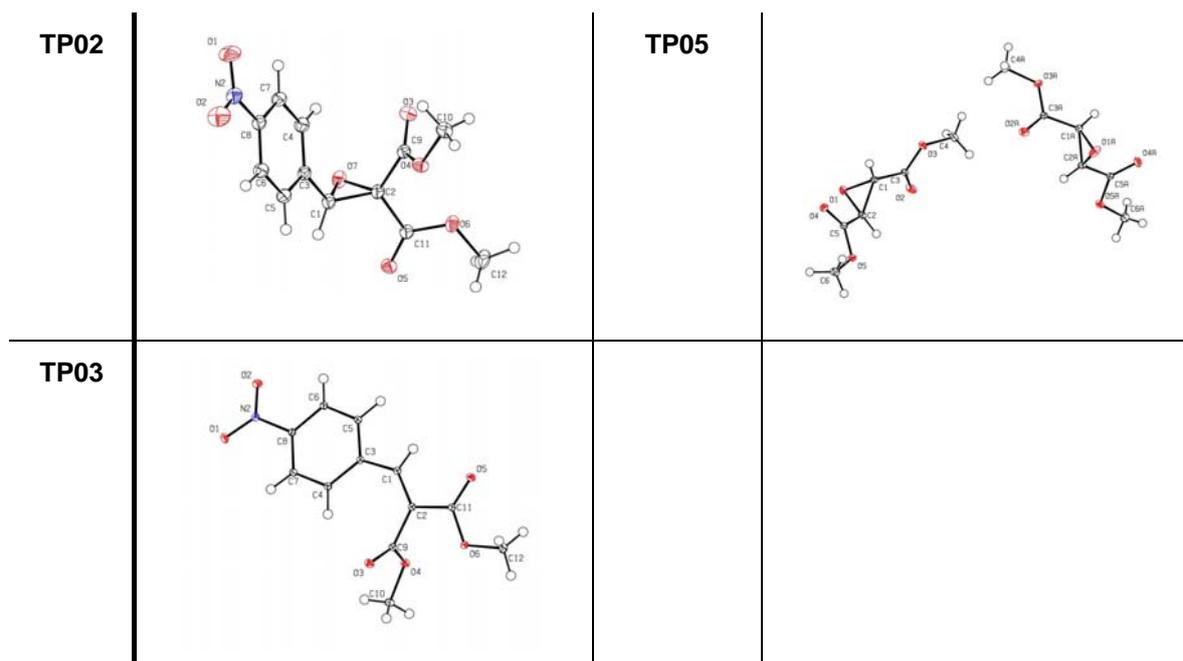
Name	Struktur	Name	Struktur
TP01		TP04	
TP02		TP05	
TP03		TP23	
TP38		TP27	
TP22			

Tabelle 7-3: Strukturen der bereits vermessenen Verbindungen.

Name	Struktur	Name	Struktur
TP01		TP04	



Topologische Analyse

Abbildung 7-4 zeigt die Laplace'sche Dichteverteilung $\nabla^2\rho(r)$ (links) und die statische Deformationsdichteverteilung (rechts) des Dreirings im Aziridin **TP01**. Gut zu erkennen ist, dass die Maxima der Deformationsdichte außerhalb der direkten Verbindung der Atome liegen, was einer typischen „Bananen“-Bindung für gespannte Systeme^[155] entspricht. Im Bild der Laplace'schen Dichteverteilung repräsentieren die blauen Linien negative Werte mit einem Konturintervall von $10 \text{ e}^*\text{\AA}^{-5}$, die roten positive Werte mit einem Konturintervall von $25 \text{ e}^*\text{\AA}^{-5}$. Trotz des unsymmetrischen Substitutions-Musters an C1 und C2 zeigt die Darstellung eine symmetrische Verteilung der Laplace Dichte, wie man aus den Ladungsdichten an den jeweiligen bindungskritischen Punkten (bcp) ablesen kann. Die Werte hierfür betragen $\rho(\text{bcp}_{\text{N1-C1}})$ $1.83 \text{ e}^*\text{\AA}^{-3}$ und $\rho(\text{bcp}_{\text{N1-C2}})$ $1.80 \text{ e}^*\text{\AA}^{-3}$ bzw. $\nabla^2\rho(\text{bcp}_{\text{N1-C1}})$ $-8.9 \text{ e}^*\text{\AA}^{-5}$ sowie $\nabla^2\rho(\text{bcp}_{\text{N1-C2}})$ $-7.6 \text{ e}^*\text{\AA}^{-5}$ und sind im Bereich einer normalen Einzelbindung.

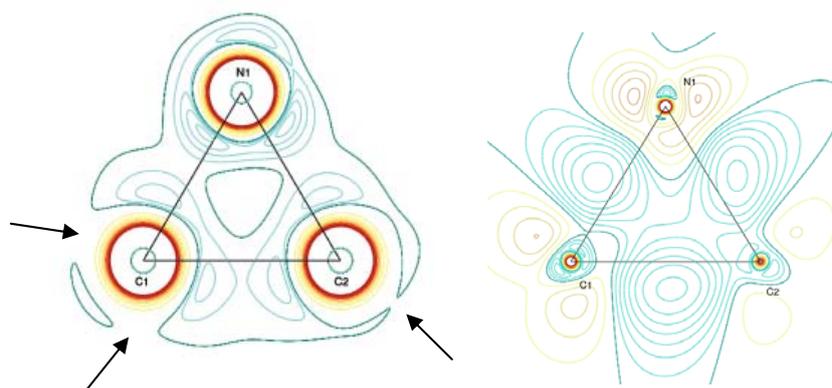


Abb. 7-4: Laplace'sche Dichteverteilung (links) und die statische Deformationsdichteverteilung (rechts) des elektrophilen Dreirings im Aziridin **TP01**. Die Pfeile deuten die bevorzugten Stellen für einen nucleophilen Angriff an.

Um heraus zu finden, welches Atom im Dreiring die bevorzugte Stelle für einen möglichen nucleophilen Angriff darstellt, wurde das elektrostatische Potential auf die Isooberfläche der Elektronendichte bei $0.5 \text{ e} \cdot \text{\AA}^{-3}$ gezeichnet (vgl. Abb. 7-5). Die verschiedenen farbigen Markierungen zeigen die Regionen mit einem großen positiven (blau) bzw. großen negativen (rot) elektrostatischen Potential. So ist ein nucleophiler Angriff auf das elektrophilere C1 wahrscheinlicher als auf C2. Ferner besitzt C1 mit dem aromatischen Substituenten eine nicht so sterisch anspruchsvolle Seitenkette, wie C2 mit den beiden Methylestern, die zudem durch ihre negative Polarisierung eine Annäherung eines ebenfalls negativ polarisierten Nucleophils erschweren.

Prinzipiell ist anhand der erhaltenen Strukturen ebenso eine Vorhersage der Stereoselektivität der Ringöffnungsreaktion möglich. Wie aus Abb. 7-5 teilweise ersichtlich ist, gibt es mehrere Stellen (Maxima des elektrostatischen Potentials) für einen möglichen nucleophilen Angriff auf C1. Einige der Maxima können nicht aus Richtung der flachen Aryl-Ebene erreicht werden, sondern lediglich von der Seite der Aryl-Gruppe, auf der nur das Wasserstoff- und das Stickstoffatom den Angriff behindern. Darüber hinaus besitzt genau dieses Maximum (1a) den höchsten Wert des elektrostatischen Potentials ($C1(\text{esp}_{1a}) = 0.73 \text{ e} \cdot \text{\AA}^{-1}$), verglichen mit den anderen Maxima an C1.

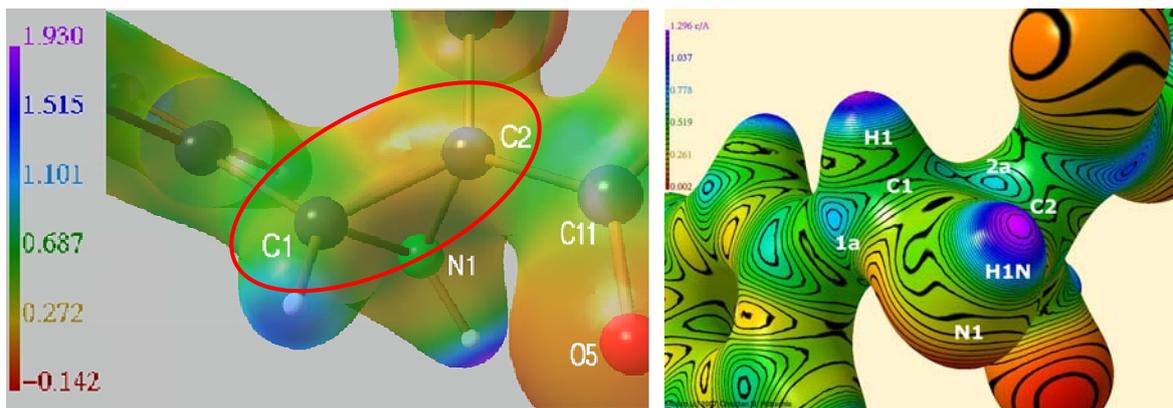


Abb. 7-5: Ausschnitt des elektrostatischen Potentials des Aziridins **TP01** dargestellt mit MOLISO.^[156]

Deutlicher werden die möglichen Angriffsrichtungen, wenn man die reaktive Oberfläche $\nabla^2\rho = 0$ (Zero-Laplacian iso-surface) betrachtet. Hier sind elektrophile Zentren durch eine reduzierte Valenzschalen-Ladungskonzentration (reduced valence shell charge concentration), die als Löcher in der Oberfläche erscheinen, dargestellt (vg. Abb. 7-6). Das elektrophile Zentrum, welches mit 1a gekennzeichnet ist, steht in guter Übereinstimmung mit dem Maximum 1a des elektrostatischen Potentials in Abb. 7-5. Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die sterisch begünstigte Position auch elektronisch bevorzugt wird.

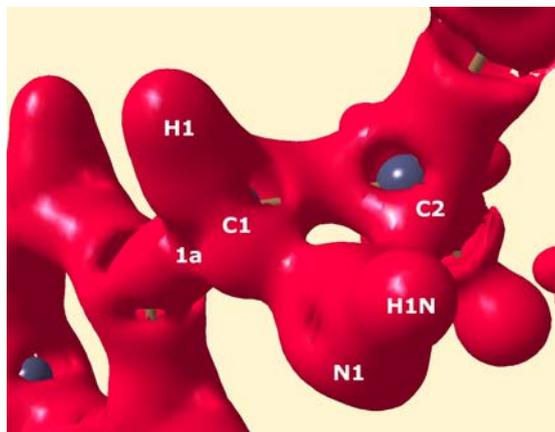


Abb. 7-6: Reaktive Oberfläche des Aziridin Dreirings.

Stellt man diese experimentellen Resultate theoretischen Berechnungen^[153] gegenüber, so findet man eine ausgeprägtere Ladungstrennung bei den experimentellen Ergebnissen. Das Atom C1 besitzt eine größere Polarisierung verglichen mit den theoretischen Berechnungen. Der Grund für diese Differenz sind die intermolekularen Wechselwirkungen im Kristall, von denen angenommen werden kann, dass sie den

Wechselwirkungen in biologischen Systemen ähnlicher sind als Gasphasen-Rechnungen von isolierten Molekülen. Eine Begünstigung von C1 bei einem nucleophilen Angriff lässt sich also nicht von den theoretischen Ergebnissen ableiten, ist jedoch aus den experimentellen Daten ersichtlich.

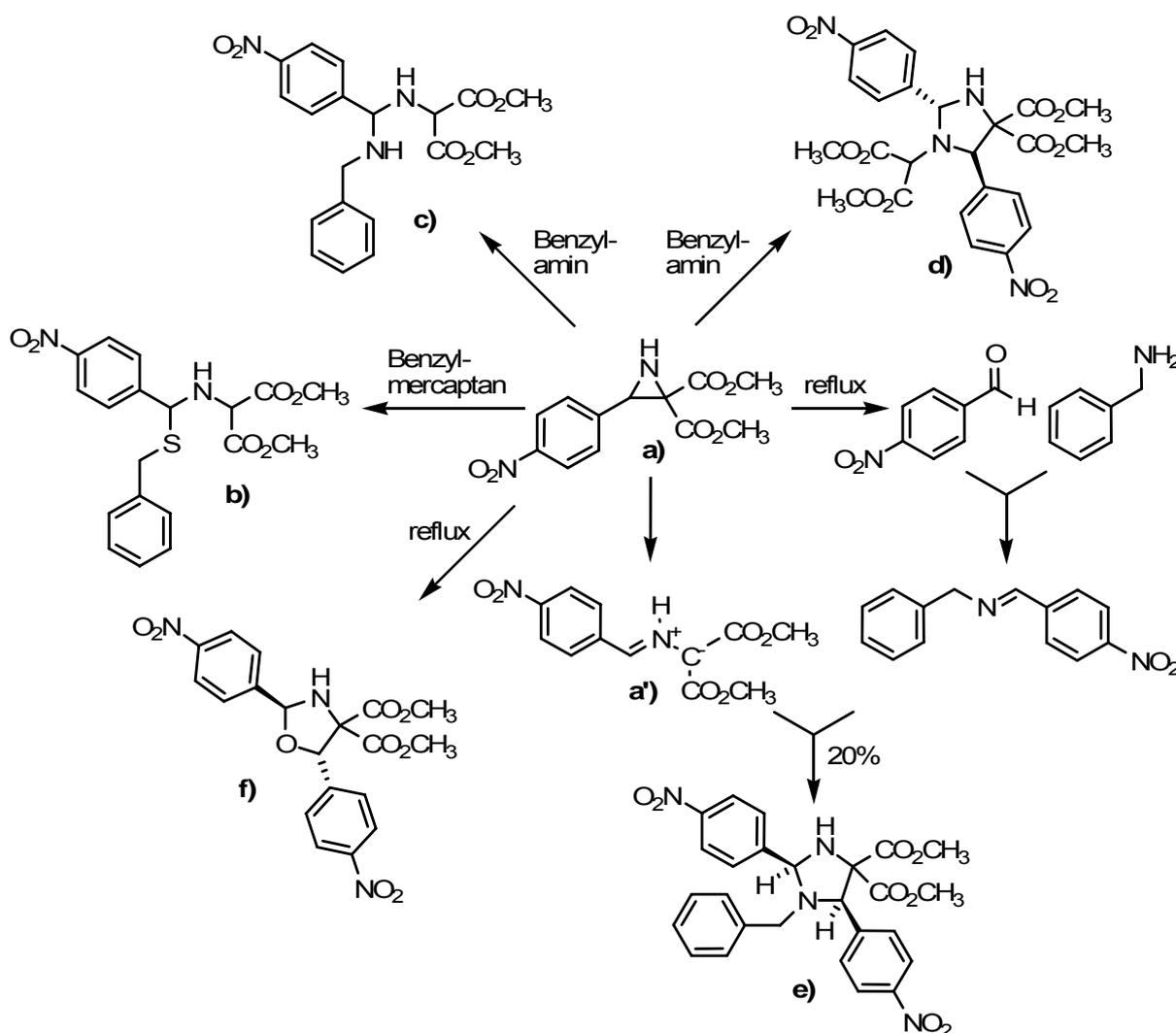
Diese Erkenntnisse gehen jedoch von einem direkten nucleophilen Angriff auf das C1 des intakten Dreirings aus. Weiterführende theoretische Untersuchungen zeigen, dass bei entsprechendem Substitutionsmuster eine C1-C2-Bindungspaltung einem C1-N1 Bindungsbruch bevorzugt wird. Das entstehende Ylid (vgl. Schema 7-7, **a'**) erfährt eine Stabilisierung durch die elektronenziehenden Carboxylat-Substituenten und reagiert erst anschließend mit einem Nucleophil (vgl. Schema 7-7, **b**) und **c**).^[157]

7.2 Modell Reaktionen mit Schwefel-, Stickstoff-, und Sauerstoff-Nucleophilen

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits behandelt, kann man anhand der Ergebnisse aus den theoretischen Berechnungen und der Ladungsdichtebestimmung erkennen, wo sich bei dem elektrophilen Baustein **TP01** die Regionen mit geringerer Elektronendichte befinden. Logischerweise sind es diese Orte, welche im Falle einer Reaktion mit einem Enzym das Ziel eines nucleophilen Angriffs werden. Um die Resultate zu stützen, wurden die o.g. genannten Verbindungen **TP01-TP03** einer Reihe von Testreaktionen mit Schwefel-, Stickstoff-, und Sauerstoff-Nucleophilen unterworfen, die die Seitenketten der entsprechenden Aminosäuren (Cys, Lys, Asp) im aktiven Zentrum eines Enzyms simulieren sollen.

Als Nucleophile wurden Benzylmercaptan, Benzylamin und Essigsäure ausgewählt und jeweils zusammen mit einer äquimolaren Menge der Bausteine **TP01**, **TP02** bzw. **TP03** in Toluol- d_8 refluxiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR-Spektroskopie und LC-MS nach einer Reaktionsdauer von zwei, vier und acht Stunden. Die erhaltenen Spektren der Reaktion von Aziridin **TP01** mit Benzylmercaptan als Nucleophil zeigen das bereits publizierte Imidazol-Dimer **d**)^[108] und das erwartete Mercaptan-Addukt **b**)^[153] (vgl. Schema 7-7). Das Epoxid **TP02** und das Olefin **TP03**, die auf die gleiche Weise umgesetzt wurden, wiesen keinerlei Umsetzung auf. Im Falle der Modell-Reaktion mit Benzylamin als Nucleophil konnte das Benzylamin-Addukt **c**) zusammen mit den Imidazolidinen **d**) und **e**) detektiert werden.^[108] Wieder erfolgte keinerlei Umsetzung bei den Reaktionen mit dem Epoxid **TP02** und dem Olefin **TP03**. Während der Reaktionen mit Essigsäure als Nucleophil bildeten sich keinerlei Addukte mit den drei nucleophilen Bausteinen. Lediglich die Bildung des bereits bekannten Oxazolidins **f**) konnte nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ausschließlich das Aziridin **TP01** mit dem Schwefel- und Stickstoff-Nucleophil reagiert. Neben den Addukten, die sich durch eine Ringöffnung nach einem nucleophilen Angriff auf C1 bilden (Verbindungen **b**) und **c**), konnten mehrere Produkte gefunden werden, welche aus 1,3-dipolaren Cycloadditionen von **TP01** resultieren. Einerseits findet eine Dimerisierung des Aziridins **TP01** zu **d**) statt, andererseits kann eine Cycloaddition von **TP01** mit einem Imin, ein Produkt der Reaktion von *p*-Nitrobenzaldehyd mit Benzylamin, zu **e**) beobachtet werden. Zudem kommt es zu einer Cycloaddition zu **f**)^[108] von **TP01** mit *p*-Nitrobenzaldehyd.



Schema 7-7: Reaktionspfade des Aziridins **TP01** mit Benzylmercaptan bzw. Benzylamin.

Anhand der durchgeführten Testreaktionen werden die Ergebnisse der Elektronendichtemessung und der daraus gewonnenen Informationen bestätigt. Der nucleophile Angriff findet regiospezifisch ausschließlich auf C1 (vgl. Schema 7-7, Verbindungen **b**) und **c**), aber in keinem Fall auf C2, statt.

8. Zusammenfassung

Im Verlauf verschiedenster pathogener Erkrankungen wie SARS, Malaria oder Alzheimer spielen Proteasen als Peptid-hydrolysierende Enzyme eine essentielle Rolle. Die irreversible Hemmung dieser Proteasen wird als ein neues Konzept im Wirkstoffdesign betrachtet. Dabei ist es von immenser Bedeutung, die Interaktion der beteiligten Proteine zu kennen, um einen geeigneten Wirkstoff zu entwickeln.

Viele der ablaufenden biologischen Prozesse beruhen auf der Komplex-Bildung eines kleinen Liganden mit einem makromolekularen Enzym. Hierbei sind Sterik, Elektrostatik und Wasserstoffbrücken der beiden Interaktionspartner für den gegenseitigen Erkennungsprozess verantwortlich. In etlichen Fällen kommt es nach der ersten nicht-kovalenten Wechselwirkung zu einer kovalenten Modifizierung des Targets.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, kleine elektrophile Bausteine wie Aziridine, Epoxide oder Akzeptor-substituierte Olefine zu synthetisieren und zu kristallisieren. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Luger von der FU Berlin konnten mittels ultra-hochauflösender Röntgenstrukturanalyse bei ultra-niedrigen Temperaturen die Elektronendichten von mehreren Protease-Inhibitor-Modell-Verbindungen bestimmt werden.

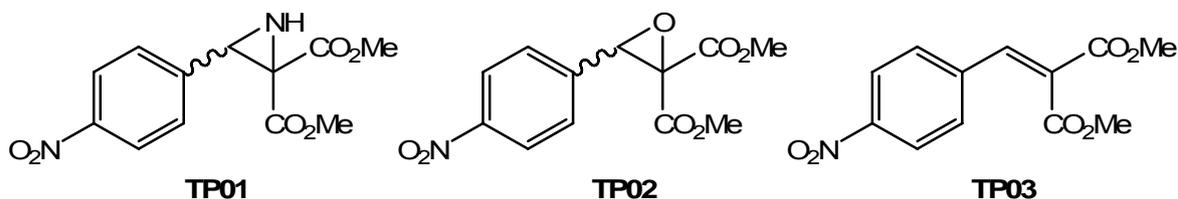


Abb. 8-1: Synthetisierte und kristallisierte elektrophile Bausteine.

Exemplarisch sind hier das Aziridin **TP01**, das Epoxid **TP02** und das Olefin **TP03** dargestellt (vgl. Abb. 8-1), die auf ihre biologische Aktivität und Reaktivität untersucht wurden. Es zeigte sich anhand von Gitter- und Interaktionsenergien und dem elektrostatischen Potential, dass **TP01** die Reaktivste der drei Verbindungen ist. Die Regioselektivität bei der Reaktion des Aziridin **TP01** mit einem Nucleophil wurde ebenfalls durch Betrachtung der Sterik und des elektrostatischen Potentials analysiert (vgl. Abb. 8-2).

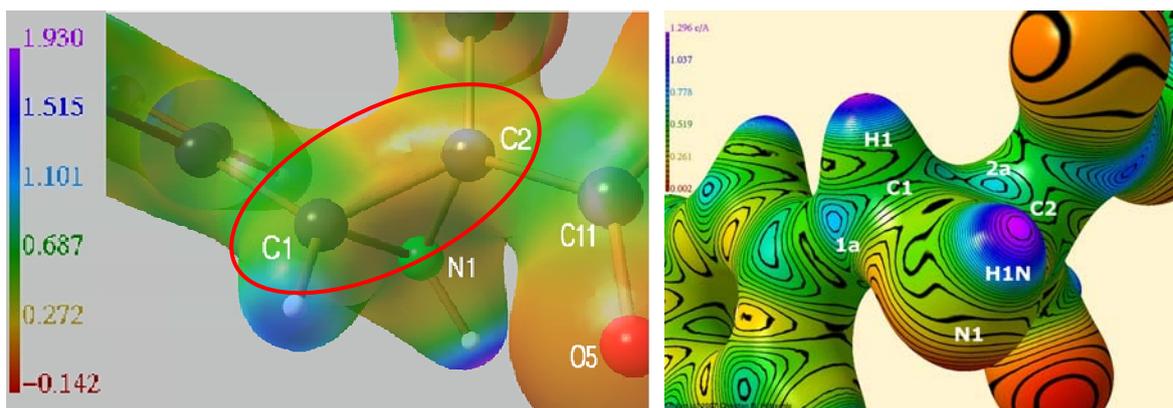


Abb. 8-2: Ausschnitt des elektrostatischen Potentials von Aziridin **TP01** bei $0.5 \text{ e} \cdot \text{Å}^{-3}$ dargestellt mit MOLISO.^[156]

Ein nucleophiler Angriff erfolgt somit bevorzugt an C1 und nicht an C2 des Dreirings. Diese Erkenntnis wurde durch Modellreaktionen mit Schwefel, Stickstoff- und Sauerstoff-Nucleophilen an **TP01**, **TP02** und **TP03** bestätigt. Das Aziridin **TP01** ist reaktiv, das Epoxid **TP02** und das Olefin **TP03** sind nicht reaktiv.

Die Studie zeigt, dass das Konzept der experimentellen Elektronendichtebestimmung Zugang zu strukturellen und elektronischen Eigenschaften von biologisch aktiven Molekülen oder ihren Modellverbindungen ermöglicht. Folglich ist diese Methode ein geeignetes Werkzeug, welches zur Entwicklung, Optimierung und Analyse pharmazeutisch relevanter Verbindungen eingesetzt werden kann.

In einem lebenden System ist die Bioverfügbarkeit eines neu entwickelten Wirkstoffs nicht immer gegeben. Oft fehlt es den Substanzen an mangelnder Hydrolysebeständigkeit und es kommt dadurch ungewollt zu enzymatischem Abbau, bevor der Wirkstoff seinen Wirkungsort erreicht hat. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, ausgehend von bereits bekannten aktiven Aziridinen, Epoxiden und Michael-Systemen, azapeptidische Analoga darzustellen, welche durch ihre Hydrazid-Verknüpfung eine bessere Hydrolysebeständigkeit bieten. Alle synthetisierten Verbindungen wurden anschließend in fluorimetrischen Enzym-Assays an acht Proteasen getestet und die jeweiligen Hemmkonstanten bestimmt. Als Proteasen wurden die Cystein-Proteasen Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodesain, SARS-CoV-M^{pro} und SARS-CoV-p^{ro} verwendet, als Aspartat-Proteasen die sekretorische Aspartat-Protease SAP2 und Cathepsin D.

Ausgehend von den Aziridinen **BDA-07** und **BDA-08**, wurden die Azapeptide **TP06** und **TP07** dargestellt (vgl. Abb. 8-3), welche jedoch die Protease im Gegensatz zu ihren Analoga nicht mehr inhibieren.

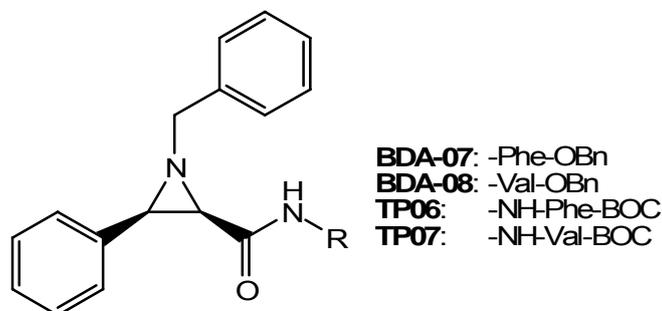


Abb. 8-3: Aziridin-Hydrazide und Analoga.

Eine weitere Klasse viel untersuchter Inhibitoren sind die Epoxysuccinate. Bekannte Vertreter sind E64c und E64d (Loxistatin), beides Derivate des aus *Aspergillus japonicus* gewonnenen Naturstoffs E64.

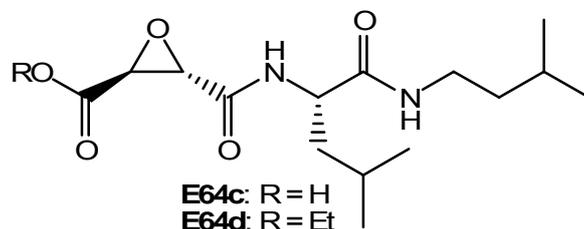


Abb. 8-4: Leitstrukturen für die synthetisierten Epoxysuccinat-Inhibitoren.

Mit dem (2*S*,3*S*)-konfigurierten E64d als Leitstruktur wurde zunächst eine Reihe von weiteren (2*R*,3*R*)-Epoxysuccinaten dargestellt (vgl. Abb. 8-5).

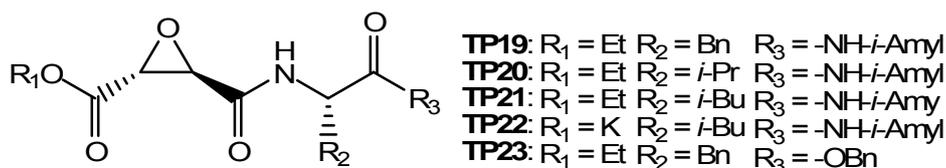


Abb. 8-5: Derivate der Leitstrukturen E64c und E64d.

Diese zeigen gegenüber unterschiedlichen Enzymen teilweise hervorragende Hemmeigenschaften (**TP22**: $k_{2nd}(\text{Cathepsin L}) = 1,078,152 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und dienen als Vergleichssubstanzen für die nachfolgend beschriebenen azapeptidischen Epoxy-succinate.

Der nächste Schritt war nun die Darstellung verschiedenster Varianten von azapeptidischen Epoxy-succinaten. Am in Abb. 8-6 gezeigten Strukturmotiv wurden unterschiedliche Modifikationen vorgenommen. Das Epoxid wurde immer als *trans*-Epoxid, sowohl mit (2*S*,3*S*)- als auch mit (2*R*,3*R*)-Konfiguration eingesetzt. Über ein Hydrazid folgt eine C-terminal verknüpfte Aminosäure (Phe, Val, Leu) mit entweder *S*- oder *R*-Konfiguration und an deren *N*-Terminus entweder eine *tert*-Butoxycarbonyl oder eine Isoamyl-Gruppe. Über eine PPA-vermittelte Kupplung gelang so die Darstellung von zehn verschiedenen Derivaten.

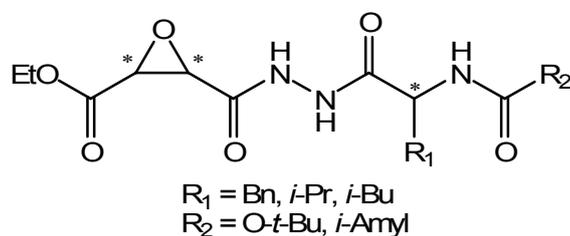


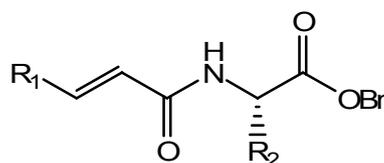
Abb. 8-6: Azapeptidische Derivate der Leitstrukturen E64c und E64d.

Im Gegensatz zu ihren natürlichen Vorbildern zeigte keines der synthetisierten (2*S*,3*S*)-Aza-Epoxy-succinate Aktivität gegenüber einem der getesteten Enzyme. Alle acht (2*R*,3*R*)-Derivate hingegen sind gegen Cathepsin B aktiv mit k_{2nd} -Werten zwischen $4,250 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $33,500 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Cathepsin L wird von sechs dieser Azapeptide und Falcipain 2 noch von dreien gehemmt, wieder mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von $2,942 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bis $39,972 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dabei sind sie zwar den Vergleichssubstanzen ohne Hydrazid-Struktur in der Hemmleistung in den meisten Fällen unterlegen, weisen jedoch eine andere Enzym-Selektivität auf und sind somit eine Alternative zu den peptidischen Epoxy-succinaten. Das Azapeptid **TP14** (EtO-(2*R*,3*R*)-Epoxy-succinyl-NH-NH-L-Phe-*i*-Amyl) nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Zum einen ist es eine der drei Verbindungen, welche sowohl Cathepsin B, Cathepsin L und Falcipain 2 hemmen, zum anderen zeigt es zudem keinerlei Cytotoxizität bei Tests an Makrophagen J774.1.

Eine weitere Inhibitor-Klasse sind Michael-Systeme, welche ausgehend von **BDE-OI04** (EtOC₂-CH=CH-CO-NH-Phe-OBn)^[65] synthetisiert wurden. Das allgemeine Strukturmotiv der dargestellten Olefine ist in Abb. 8-7 gezeigt. Als Doppelbindungssysteme fanden

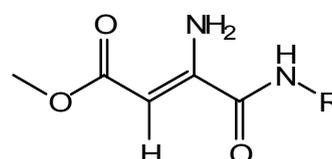
Crotonsäure-, Monoethylfumarat- oder Zimtsäure-Derivate Verwendung, die an vier verschiedenen Aminosäuren (Phe, Val, Leu, Ala) geknüpft wurden. Anhand verschiedener Peptidkupplungsmethoden gelang die Darstellung von 16 unterschiedlich substituierten Doppelbindungssystemen. Sieben dieser Olefine sind aktiv und zeigten ein breites Hemmspektrum gegenüber den getesteten Enzymen. Im Gegensatz zu den Epoxy-succinaten findet man auch Aktivität gegen die Aspartat-Proteasen SAP2 und Cathepsin D. Hierbei wurden K_i -Werte zwischen 0.22 μM und 65.4 μM erreicht. Als das Aktivste aller getesteten Doppelbindungssysteme erwies sich **TP38** (*p*-(Me₂N)-Ph-CH=CH-Phe-OBn), welches gegen sechs Proteasen (Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodesain, SAP2 und Cathespin D) K_i -Werte von 0.38 μM bis 20.4 μM aufweisen kann. Die Darstellung azapeptidischer Michael-Systeme gelang trotz Anwendung von sieben unterschiedlichen Kupplungsmethoden lediglich in einem Fall. Das Fumarat **TP40** (EtO₂C-CH=CH-CO-NH-NH-Phe-BOC) konnte nach einer PPA-vermittelten Kupplung isoliert werden, ist jedoch gegen alle getesteten Enzyme inaktiv.

Ein besonderes Augenmerk verdienen die Enamine **TP41** und **TP42** (vgl. Abb. 8-8), die als einzige aller dargestellten Verbindungen Aktivität ($K_i = 207 \mu\text{M}$ (**TP41**) und 158 μM (**TP42**)) gegenüber SARS-CoV-M^{pro} zeigen.



$R_1 = \text{Ph, Ph-}p\text{-(NO}_2\text{), Ph-}p\text{-(NMe}_2\text{), CO}_2\text{Et, Me}$
 $R_2 = \text{Bn, } i\text{-Pr, } i\text{-Bu, Me}$

Abb. 8-7: Michael-Akzeptor substituierte Inhibitoren.



TP41: -NH-Phe-BOC
TP42: -NH-Val-BOC

Abb. 8-8: SARS-CoV-M^{pro} aktive Enamine.

9. Summary

Proteases as peptide hydrolyzing enzymes play essential roles in the pathogenesis of various diseases, e. g. SARS, Malaria or Alzheimer's disease. The irreversible inhibition of these proteases is considered to be a new concept in drug design. Therefore it is fundamental for the development of a suitable drug to know the interactions of the involved proteins.

Most biological processes rely on the complex formation between a small ligand and a macromolecular enzyme. In the recognition process the steric, electrostatic and hydrogen-bonding properties of the two species play dominant roles. In some cases the non-covalent complex formation is followed by a second step, namely a chemical reaction between ligand and target leading to covalent modification of the target macromolecule.

One aim of this thesis is to synthesize and to crystallize small electrophilic building blocks like aziridines, oxiranes or acceptor substituted olefins. In collaboration with Prof. Luger's work group (FU Berlin) the topological electron density of multiple protease inhibitor model compounds was derived using ultra-high resolution X-ray diffraction experiments at ultra-low temperature .

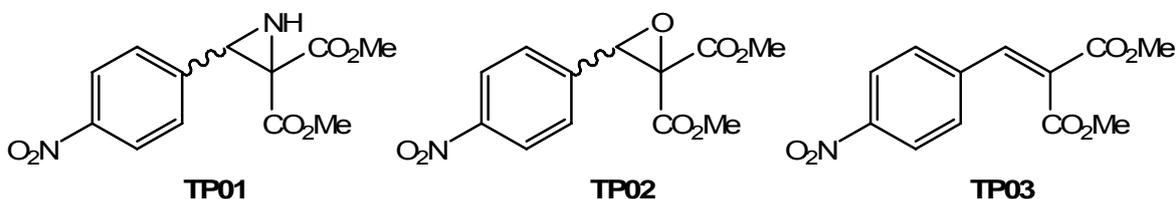


Fig. 9-1: Synthesized and crystallized electrophilic building blocks.

This was done with irreversible aspartic and cysteine protease inhibitors containing an electrophilic moiety as reactive pharmacophore. Aziridine **TP01**, oxirane **TP02** and olefin **TP03** are shown in Fig. 9-1. **TP01** is most reactive because it is outstanding in the properties that can be related to the lattice and interaction energies and the electrostatic potential. The regioselectivity of the reaction of aziridine **TP01** with a nucleophile was found within steric considerations and the electrostatic potential (see Fig. 9-2).

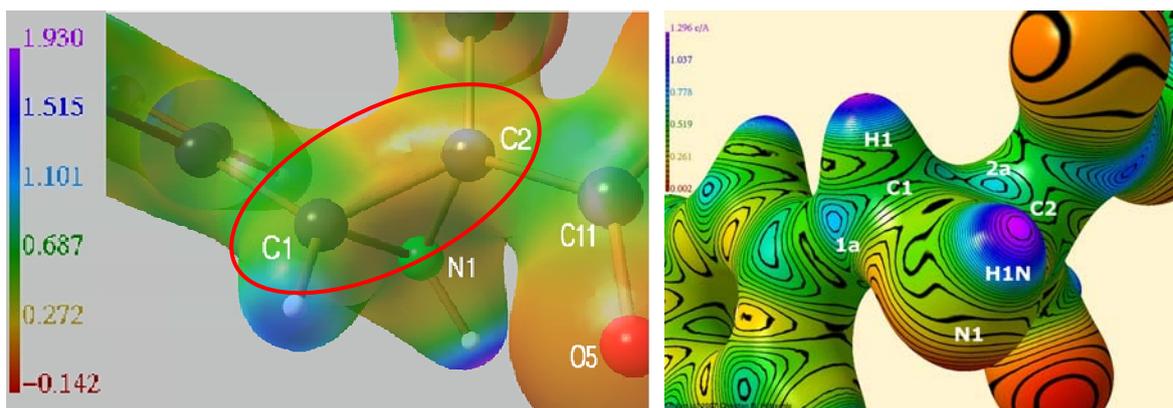


Fig. 9-2: Detail of the electrostatic potential of aziridine **TP01** at $0.5 \text{ e}^* \text{ \AA}^{-3}$ created with MOLISO.^[156]

A nucleophilic attack happens at carbon atom C1 rather than at carbon atom C2 of the three-membered-cycle. Moreover hints for the stereoselectivity could be found by examining the zero Laplacian isosurfaces. These findings were proven by preparative model reactions with sulphur-, nitrogen- and oxygen-nucleophiles. Aziridine **TP01** is reactive and the reaction is specific at C1, oxirane **TP02** and olefin **TP03** are not reactive. These studies show that it is possible to gain access to structural and electronic properties of biological active molecules or their model compounds using the concept of experimental electron density determination. Therefore this method can be a capable tool to develop, optimize and analyze pharmaceutical relevant compounds.

In a living system the bioavailability of a new developed drug is not always granted. Often the substances are lacking resistance to hydrolysis and are decomposed by enzymatic breakdown before they can be effective. Because of this it was another aim of this thesis to synthesize azapeptidic analogs of known aziridine, oxirane and Michael-acceptor based Inhibitors which should offer a better stability towards hydrolysis. All of the synthesized compounds were tested against eight proteases using a fluorimetric assay for the determination of the inhibition constants. As cysteine-proteases Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodesain, SARS-CoV M^{pro} and SARS-CoV p1^{pro} were used, and as aspartic-proteases the secretoric aspartate protease SAP2 and Cathepsin D.

Based on aziridines **BDA-07** and **BDA-08** the azapeptides **TP06** and **TP07** were synthesized (see Fig. 9-3). However these two new compounds did not show any activity anymore.

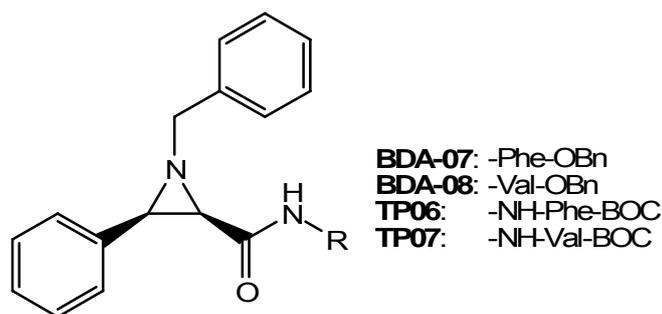


Abb. 9-3: Aziridin-hydrazide and analogs.

Another class of well investigated inhibitors are epoxysuccinates. Known members are E64c and E64d (Loxistatin), which are both derivatives of the natural product E64, found in *Aspergillus japonicus*.

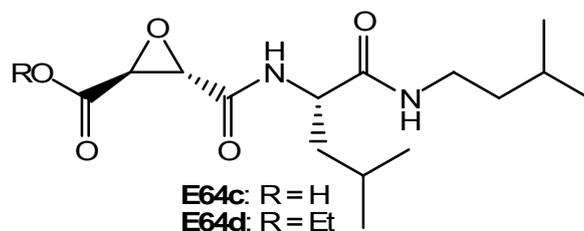


Fig. 9-4: Epoxysuccinyl-inhibitor lead structures.

Using the (2*S*,3*S*)-configured E64d as a lead structure, a set of (2*R*,3*R*)-epoxysuccinates were prepared (see Fig 9-5).

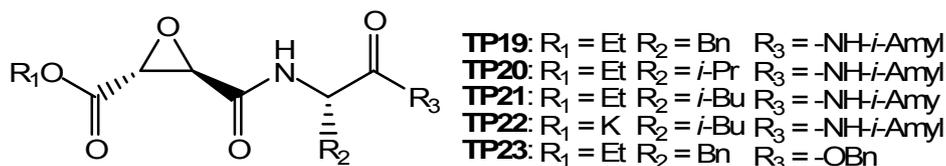


Fig. 9-5: Derivatives of the lead structures E64c and E64d.

Some of them show excellent inhibition properties (**TP22**: $k_{2nd}(\text{Cathepsin L}) = 1078152 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and were compared to the azapeptidic epoxysuccinates.

Different modifications were made to the structure motif shown in Fig. 9-6. The oxirane was always used in *trans*-configuration, either (2*S*,3*S*)-, or (2*R*,3*R*)-configuration. The hydrazide function is coupled to an amino acid (Phe, Val, Leu), either with *S*- or *R*-

configuration. At the n-terminus either a *tert*-butoxycarbonyl or a isoamyl-group is attached. Using a PPA mediated coupling method, the synthesis of ten different derivatives was performed.

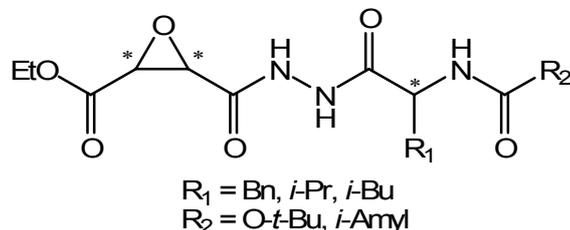
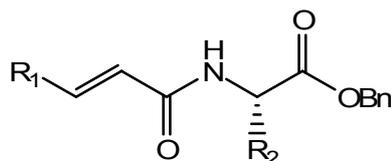


Abb. 9-6: Azapeptidic derivatives of the lead structures E64c and E64d.

None of the synthesized (2*S*,3*S*)-aza-epoxysuccinates showed activity towards the tested enzymes in contrast to their natural examples. On the contrary all eight (2*R*,3*R*)-derivatives are active against Cathepsin B with 2nd order rate constants between 4,723 M⁻¹ min⁻¹ and 48446 M⁻¹ min⁻¹. Cathepsin L is inhibited by six of these azapeptides and Falcipain 2 by three of them, again with 2nd order rate values between 3,780 M⁻¹ min⁻¹ and 39,972 M⁻¹ min⁻¹. All azapeptides were inferior to the peptidic substances, but show a different selectivity. Because of this they are a suitable alternative to the peptidic epoxysuccinates. Among them, the aza-peptide **TP14** (EtO-(2*R*,3*R*)-Epoxy succinyl-NH-NH-L-Phe-*i*-Amyl) is interesting since on the one hand it is one of three compounds which inhibit Cathepsin B, Cathepsin L and Falcipain 2, on the other hand it is not toxic towards macrophages J774.1.

Another inhibitor class are Michael-systems, which were synthesized based on **BDE-OI04** (EtOC₂-CH=CH-CO-NH-Phe-OBn).^[65] The common structure motif of the prepared olefins is shown in Fig. 9-7. The unsaturated systems crotonic acid, mono ethylfumarate or cinnamic acid were coupled to an amino acid (Phe, Val, Leu, Ala). With the help of different peptide coupling methods the preparation of 16 different substituted Michael-systems were successful. Seven of these were active against a variety of enzymes and also, in contrary to the epoxysuccinates, against the aspartic-proteases SAP2 and Cathepsin D. The *K_i*-values for these compounds are between 0.22 μM and 65.4 μM. The most active among these compounds was **TP38** (*p*-(Me₂N)-Ph-CH=CH-Phe-OBn) which offers *K_i*-values between 0.38 μM and 20.4 μM against six proteases (Cathepsin B, Cathepsin L, Falcipain 2, Rhodospain, SAP2 and Cathepsin D).

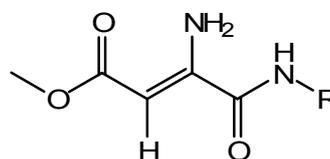


$R_1 = \text{Ph}, \text{Ph-}p\text{-(NO}_2\text{)}, \text{Ph-}p\text{-(NMe}_2\text{)}, \text{CO}_2\text{Et}, \text{Me}$
 $R_2 = \text{Bn}, i\text{-Pr}, i\text{-Bu}, \text{Me}$

Fig. 9-7: Michael-acceptor substituted inhibitors.

The preparation of azapeptidic Michael-systems was, in spite of the application of seven different coupling methods, only successful in one case. The fumarate **TP40** was isolated after a PPA-mediated method, but it is inactive towards all tested enzymes.

The enamines **TP41** and **TP42** (see Fig. 8-8) are the only compounds which show activity against SARS-CoV M^{pro} with K_i -values of 207 μM (**TP41**) and 158 μM (**TP42**).



TP41: -NH-Phe-BOC
TP42: -NH-Val-BOC

Abb. 9-8: SARS-CoV- M^{pro} active enamines.

II. Experimenteller Teil

10. Allgemeine Angaben

10.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden

Schmelzpunkte (Smp.):

Alle Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare an einem Schmelzpunktgerät der Firma *Büchi*, Typ 510, Flavil, Schweiz bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Infrarotspektroskopie (IR):

Alle IR-Spektren wurden unverdünnt (*neat*) an einem *Merlin-Biotech*-FTIR-Spektrometer des Typs *PharmalyzIR* mittels ATR-Einheit aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm^{-1} . Die Kennzeichnung der Intensitäten erfolgt mit den Abkürzungen w (schwach), m (mittel), s (stark) und br (breit).

Spezifische Drehwerte:

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{Temp.}}$ wurden an einem *Perkin-Elmer* 241 Polarimeter ermittelt (Na_{D} -Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$).

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$):

Die Aufnahme der NMR-Spektren wurde an einem *Bruker Avance* 400 Spektrometer durchgeführt. Die Arbeitsfrequenz betrug für $^1\text{H-NMR}$ -Spektren 400.13 MHz und für $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren 100.61 MHz und die Messtemperatur lag bei 300 K. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm und die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Wurde als interner Standard bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren das Tetramethylsilan $\delta(\text{TMS}) = 0.0 \text{ ppm}$ verwendet, ist dies angegeben. Ansonsten dienten für $^1\text{H-NMR}$ -Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.25 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 2.50 \text{ ppm}$, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79 \text{ ppm}$], und bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren dessen ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 39.52 \text{ ppm}$] als Standard.

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sep = Septett, m = Multiplett, m_{c} = zentriertes Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet, dq = Dublett vom Quartett und br. = breit.

Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale erfolgte über 2D-Korrelationsspektren (COSY, HMQC und HMBC).

Konnten die Signale einzelnen Diastereomeren zugeordnet werden, so erfolgt dies mit den Bezeichnungen Dia1 und Dia2 bzw. unter Angabe der absoluten Konfiguration.

Massenspektrometrie (MS):

Die Aufnahmen der ESI-Massenspektren und die LC-MS-Analysen erfolgten an einer *Agilent 1100 LC / MSD-Trap* ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von *Agilent*. Die LC-MS-Analysen wurden auf einer *Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18* Säule (4.6 x 150 mm), mit einem Gradient von 40% auf 95 % Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure über 25 min und weitere 15 min bei 95 % Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure, Fluss von 600 μ l/min und UV-Detektion bei 215 oder 254 nm durchgeführt. Die Kapillarenspannung betrug dabei standardmäßig 2.6 kV und als Trockengas diente N₂. Gemessen wurde im positiven Modus.

Die mittels LC-MS-Analysen erhaltenen Reinheiten wurden aus dem Verhältnis der Integrale aller auftretenden Peaks ermittelt und sind jeweils in Klammern angegeben.

Tabelle 10-1: Gradient für LC-MS

Zeit [min]	Solvens B [%]	Fluss [ml/min]
5.0	40.0	0.600
25.0	95.0	0.600
40.0	95.0	0.600

Solvens A: Wasser + 0.1% Ameisensäure;
Solvens B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F254 der Firma *Merck* verwendet.

Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlösung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber *Ehrlich's Reagenz* (Amine; (Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/MeOH [3/7]; Detektion durch Erhitzen auf ca. 150 °C) oder Ioddampf.

Säulenchromatographie (SC):

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm mesh) der Firma *Merck* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt.

Die Laufmittelzusammensetzungen für DC und SC sind in Volumenteilen angegeben.

10.2 Enzymassays

Alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

Verwendete Abkürzungen: E = Enzym; S = Substrat; P = Puffer; I = Inhibitor.

Fluorimetrie:

a) Gerät:

Cary Eclipse Fluorimeter von *Varian* mit *microplate reader* und Heizeinheit;

Durchführung der Assays in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc®).

b) Assay-Bedingungen:

Cathepsin B

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	85 µL P, 10 µL E, 85 µL P, 5 µL DMSO, 10 µL I, 5 µL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 µM K_m (CB): 150 µM
Enzym	Cathepsin B (humane Leber): 14.5 ng/mL
Puffer	TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%;
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 µM, bei guter Hemmung 1-10 µM

| | markiert die Spaltstelle.

Cathepsin L

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	85 µL P, 10 µL E, 85 µL P, 5 µL DMSO, 10 µL I, 5 µL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 µM K_m (CL): 6.5 µM
Enzym	Cathepsin L (<i>Paramecium tetraurelia</i>): 14.5 ng/mL
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 6.5 mit 2 mM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij;
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 µM, bei guter Hemmung 1-10 µM

| | markiert die Spaltstelle.

Falcipain 2

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	128 μ L P, 21 μ L E, 49.5 μ L P, 1 μ L I, 0.5 μ L S
Substrat	Z-Phe-Arg 7-amino-4-methylcumarin*HCl [S]: 25 μ M K_m (FP): 21.5 μ M
Enzym	Falcipain 2 aus <i>Escherichia coli</i> exprimiert
Puffer	50 mM NaOAc, pH 5.5, 125 μ M DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 μ M
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 μ M, bei guter Hemmung 1-10 μ M markiert die Spaltstelle.

Rhodesain

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	90 μ L P, 5 μ L E, 85 μ L P, 10 μ L DMSO, 5 μ L I, 5 μ L S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC [S]: 40.5 μ M K_m (RD): 826.5 nM
Enzym	Rhodesain (<i>Trypanosoma rhodesiense</i>): 832.5 ng/mL
Puffer	50 mM Acetat-Puffer pH 5.5 mit 0.005 % Brij, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 μ M
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 μ M, bei guter Hemmung 1-10 μ M markiert die Spaltstelle.

SARS-CoV M^{pro}

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	90 μ L P, 5 μ L E, 85 μ L P, 5 μ L I, 15 μ L S
Substrat	Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln Ser-Gly-Tyr(3'-NO ₂)-Arg(Mts)OH [S]: 150 μ M K_m (SARS-CoV M ^{pro}): 190 μ M
Enzym	SARS-CoV M ^{pro} : 8.5 μ g/mL
Puffer	20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.1 mM EDTA, 0.005 % Brij, 200 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 320 nm / Em: 420 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 μ M
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 μ M, bei guter Hemmung 1-10 μ M markiert die Spaltstelle.

SARS-CoV pl^{pro}

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	175 µL P, 10 µL E, 5 µL I, 10 µL S
Substrat	Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly AMC-acetat Salz [S]: 50 µM K_m (SARS-CoV pl ^{pro}): 850 µM
Enzym	SARS-CoV pl ^{pro}
Puffer	20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.1 mM EDTA, 0.005 % Brij 200 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 360 nm / Em: 460 nm, 20 min
Screening	[I]: 100 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 µM, bei guter Hemmung 1-10 µM

| | markiert die Spaltstelle.

SAP2

Assaymethode	Verdünnungsassay
Volumina	35 µL P, 10 µL E, 5 µL I + 145 µL P, 5 µL S
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 µM K_m (SAP2): 28.7 µM
Enzym	*SAP2 (10 µL verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand)
Puffer	50 mM Na-Citrat-Puffer pH 3.2, 50 mM, NaCl 50 mM
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 20 min (Screening), 10 min (Verd.-reihe)
Screening	[I]: 100 µM Inkubation E + I: 5 min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe
Verdünnungsreihen	[I]: 10-100 µM, bei guter Hemmung 1-10 µM

| | markiert die Spaltstelle.

Cathepsin D

Assaymethode	Verdünnungsassay
Volumina	35 µL P, 10 µL E, 5 µL I + 145 µL P, 5 µL S
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH [S]: 37.5 µM K_m (CD): 7.67 µM
Enzym	CD (Bovine Spleen, Calbiochem, lyophilisiert)
Puffer	0.1 M Ameisensäure-Puffer pH 3.7, 50 mM, NaCl 50 mM
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 20 min (Screening), 10 min (Verd.-reihe)
Screening	[I]: 100 µM Inkubation E + I: 5 min, Verdünnung 1:4 vor Substratzugabe

Verdünnungsreihen [I]: 10-100 μM , bei guter Hemmung 1-10 μM

| | markiert die Spaltstelle.

10.3 Enzyme, Substrate und Reagenzien**Enzyme:**

Cathepsin B (humane Leber)	Calbiochem
Cathepsin L (<i>Paramecium tetraurelia</i>)	Calbiochem
Falcipain 2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	M. Stempka (Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg)
Rhodesain (<i>Trypanosoma rhodesiense</i>)	U. Dietzel (Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg)
SARS-CoV M ^{pro}	M. Stempka (Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg)
SARS-CoV p1 ^{pro}	U. Dietzel (Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg)
SAP2	Prof. Dr. J. Morschhäuser; Würzburg
Cathepsin D (bovine Milz)	Calbiochem

Substrate:

DabcyI-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin;
Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH	GenScript Corporation, New Jersey, USA
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-	Dipl.-Chem. M. Schiller (AK Schirmeister),
Tyr(3'-NO ₂)-Arg(Mts)OH	Würzburg; GenScript Corporation, New Jersey, USA
Cbz-Phe-Arg-AMC	Bachem
Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC-Acetat	Bachem

Reagenzien:

LiOH•H ₂ O, NaN ₃ , Ph ₃ P, Tartrate, PLE-Suspension	Fluka
DMAP, DBU, TBAF•H ₂ O, Collidin Fumarylchlorid, Monoethylfumarat	Merck

DPPA, HOSuc, IBCF, TBDMSCI, Isoamyltriphenylphosphoniumbromid, 4-Bromcrotonsäureethylester	Aldrich
PyBOP, DCC	IRIS Biotech
Pd-C 10% typ E 10 N/D	Degussa
PPA (Allessan® CAP)	AllessaChemie
Aminosäuren, Dipeptide	Bachem, Novabiochem, IRIS Biotech

Alle verwendeten AS / Peptide werden mit dem 3-Buchstaben-Code abgekürzt und besitzen *L*-Konfiguration. *D*-konfigurierte AS / Peptide werden explizit benannt. Als *N*-terminale Schutzgruppen dienten BOC bzw. Cbz und als *C*-terminale Schutzgruppen kamen OBn bzw. OMe zum Einsatz. Abspaltung der Schutzgruppen vor Kupplungen erfolgte durch die gängigen Methoden und die als Hydrochloride, *para*-Tosylate bzw. TFA-Salze eingesetzten AS / Peptide wurden vor den Kupplungen mittels Stickstoffbasen, wie TEA, NMM oder DIEA freigesetzt.

Die Ermittlung der Diastereomerenverhältnisse erfolgte, falls Grundlinientrennung vorlag, anhand der LC-MS-Chromatogramme, ansonsten wurde das Verhältnis anhand der NMR-Spektren bestimmt.

Ehrlich's Reagenz: Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 mL konz. Salzsäure / MeOH (3 / 7); Detektion durch Erhitzen auf ca. 150 °C.

10.4 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt und getrocknet (KOH, Molekularsieb 4 Å, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂CO₃). Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmittel (Natrium, P₄O₁₀, K₂CO₃, KOH, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4 Å, KOH oder Natrium aufbewahrt.

Als Schutzgas wurde, sofern nötig, Argon oder Stickstoff verwendet.

11. Allgemeine synthetische Methoden

11.1 Aziridinsynthesen

Cromwell-Synthese von Aziridinen

Methode A1:

Eine Lösung von 1 Äq. 2,3-Dibromester in Alkohol wird bei 0 °C langsam zu einer Lösung von 3.6 Äq. Benzylamin in Alkohol zugetropft. Das Gemisch wird langsam auf RT (~ 3 h) erwärmt und 1-12 d gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in Diethylether aufgenommen, die organische Phase 3-mal mit Wasser gewaschen und die wässrigen Phasen 3-mal mit Diethylether reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch SC gereinigt.

Synthese von Aziridinen nach Staudinger

Methode A2:

Es werden 1.00 Äq. des (*R,R*)-Tartrats in Dichlormethan gelöst und bei 0 °C 1.20 Äq. Thionylchlorid zugetropft. Um entstehendes Schwefeldioxid und Salzsäure zu entfernen, wird Stickstoff durch die Reaktionsmischung geleitet. DMF wird in katalytischen Mengen hinzu gegeben. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wird eine weitere Stunde bei 50 °C gerührt. Überschüssiges SOCl₂ wird an der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Das erhaltene Dioxathiolan wird in DMF gelöst und 2.30 Äq. Natriumazid in kleinen Mengen unter Eiskühlung hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Dichlormethan und Wasser (5:3) versetzt und weitere zwei Stunden gerührt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen achtmal mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Der so erhaltene Azidoalkohol wird in DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und in kleinen Mengen mit 2.00 Äq. Triphenylphosphin versetzt. Nach 90 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird anschließend vier Stunden bei 80 °C unter Rückfluss erhitzt. Das DMF wird schließlich unter Vakuum entfernt und der gelbe, ölige Rückstand durch SC gereinigt.

Synthese von Aziridinen mit DPSI

Methode A3:

Es werden 1.00 Äq. Olefin und 1.50 Äq. *S,S*-Diphenylsulfimid in Dichlormethan gelöst und über einen Zeitraum von 8 Stunden refluxiert. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in einem Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (5:1) suspendiert und abfiltriert. Der Filterkuchen wird schließlich in Dichlormethan gelöst, mit Methanol ausgefällt und erneut abfiltriert. Das gewünschte Produkt kann durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) isoliert werden.

11.2 Epoxidsynthesen

Methode B1:

Es werden 1.00 Äq. (2*R*,3*R*)-(+)-Diethyltartrat in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 17.0 Äq. Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig) versetzt. Der Ansatz wird für vier Stunden gerührt, anschließend in 300 ml Wasser gegeben, mit Diethylether (4 x 100 ml) extrahiert und schließlich die Etherphase mit Wasser (2 x 100 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (2 x 100 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 400 ml Ethanol aufgenommen, mit 1.70 Äq. Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig) versetzt, für fünf Stunden refluxiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird mit 400 ml Aceton aufgenommen, mit 2.00 Äq. Kaliumcarbonat (oder Kaliumhydroxid in Ethanol) versetzt und 14 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingedampft und destilliert.

Methode B2:

Eine Lösung aus 1.00 Äq. Olefin in Acetonitril wird mit der dreifachen Menge an neutralem Aluminiumoxid (Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Aktivitätsstufe I) versetzt und dazu bei Raumtemperatur langsam 10.0 Äq. wässrige Natriumhypochloridlösung (25 %) getropft. Nach zwei Stunden Rühren wird die Lösung abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Noch einmal wird die gleiche Menge Aluminiumoxid, Acetonitril und

Natriumhypochlorid-Lösung hinzu gegeben. Dieser Schritt wird bis zur Vollständigkeit der Reaktion wiederholt ($^1\text{H-NMR}$ -Kontrolle). Das Produkt wird durch Extraktion mit Dichlormethan isoliert.

Methode B3:

Es wird 1.00 Äq. Olefin in Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit 1.90 Äq. Wasserstoffperoxid versetzt. Nach vier Minuten Rühren werden 20.0 Äq. Wasser hinzu gegeben, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

11.3 Olefinsynthesen

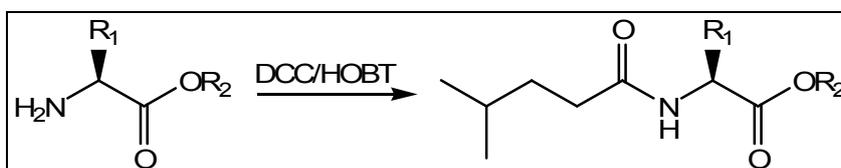
Methode C1:

Es werden 1.0 Äq. des Aziridins in Methanol gelöst und über einen Zeitraum von 11 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das gewünschte Produkt säulenchromatographisch isoliert.

11.4 Peptidkupplungen

11.4.1 Kupplung mit DCC/HOBT

Methode D1:



Mit

R_1 : $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Val), $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Leu), $-\text{CH}_2-\text{Ph}$ (Phe)

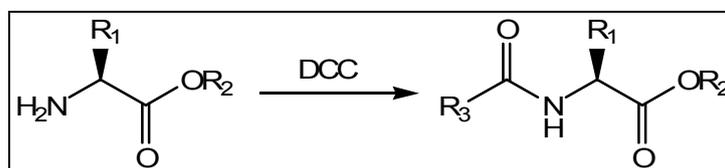
R_2 : $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

Es werden 1.05 Äq. DCC in 5 ml Ethylacetat zu einer Lösung aus 1.0 Äq. der Carbonsäure, 1.0 Äq. des Aminosäureesterhydrochlorids, 2.0 Äq. Triethylamin und 1.0 Äq. HOBT in 10 ml Ethylacetat getropft. Der Ansatz wird für 3 Stunden im Eisbad und 48 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wird der ausgefallene Harnstoff abfiltriert und

mit 10 ml Ethylacetat gewaschen. Die gesammelten organischen Fraktionen werden vereinigt und nacheinander mit 2 M HCl (20 ml), ges. NaCl-Lösung (20 ml), ges. Natriumhydrogencarbonat- (20 ml) und wieder ges. NaCl-Lösung (20 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der erhaltene Rückstand wird erneut in Ethylacetat aufgenommen und der nachträglich ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird anschließend i. Vak. entfernt (vgl. Literatur^[145, 158]).

11.4.2 Kupplung mit DCC

Methode D2:



Mit

R₁: -CH(CH₃)₂ (Val), -CH₂-CH(CH₃)₂ (Leu), -CH₂-Ph (Phe)

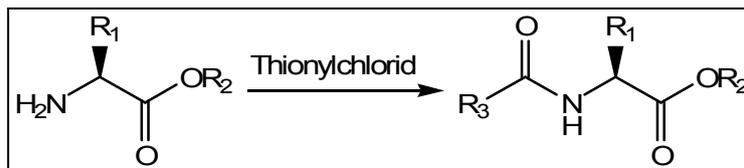
R₂: -CH₂-Ph

R₃: Michael-System

Es wird 1.0 Äq. des Aminosäurebenzylesterhydrochlorids in Ethylacetat gelöst und bei 0 °C mit 2.0 Äq. Triethylamin versetzt. Parallel werden dazu 2.2 Äq. der Carbonsäure mit 1.05 Äq. DCC in Ethylacetat umgesetzt. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert, mit 10 ml Ethylacetat gewaschen und das Filtrat zum Aminosäure-Ansatz getropft. Der Ansatz wird für 3 Stunden im Eisbad gerührt und anschließend in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit ges. NaCl-Lösung (20 ml) ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. (vgl. Literatur^[159, 160]).

11.4.3 Kupplung mit Thionylchlorid

Methode D3:



Mit

R₁: -CH₂-Ph (Phe)

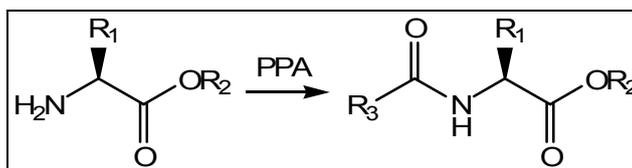
R₂: -CH₂-Ph

R₃: Michael-System

Es werden 1.05 Äq. der Carbonsäure in Toluol gelöst und mit 1.58 Äq. Thionylchlorid fünf Stunden bis zur vollständigen Entstehung von HCl refluxiert. Parallel dazu wird 1.00 Äq. des Aminosäurebenzylesterhydrochlorids mit 3.50 Äq. Triethylamin umgesetzt und nach ebenfalls fünf Stunden zum bereits abgekühlten Ansatz hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird für weitere 24 h bei Raumtemperatur weitergerührt, filtriert und mit Wasser (4 x) gewaschen. Die organische Phase wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. (vgl. Literatur^[127]).

11.4.4 Kupplung mit PPA

Methode D4:



Mit

R₁: -CH(CH₃)₂ (Val), -CH₂-CH(CH₃)₂ (Leu), -CH₂-Ph (Phe)

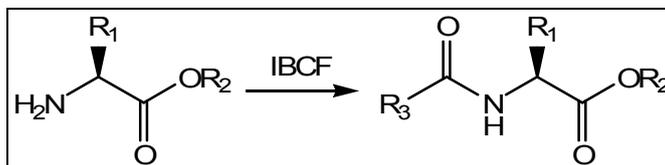
R₂: -CH₂-Ph

R₃: Michael-System

Es wird 1.00 Äq. der Carbonsäure bzw. des Lithium- oder Kaliumcarboxylats zusammen mit 1.00 Äq. des Amins bzw. Hydrazids in wenig DMF gelöst und bei 0 °C mit 1.00 Äq. PPA (50 wt% in DMF) versetzt. Der Ansatz wird über 24 Stunden gerührt und danach in Ethylacetat gegeben. Anschließend wird die organische Phase nacheinander mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Kaliumhydrogensulfat (1 M) und ges. Natriumchlorid-Lösung (4 x) gewaschen. Schließlich wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. (vgl. Literatur^[161]).

11.4.5 Kupplung mit IBCF

Methode D5:



Mit

R₁: -CH(CH₃)₂ (Val), -CH₂-CH(CH₃)₂ (Leu), -CH₂-Ph (Phe)

R₂: -CH₂-Ph

R₃: Michael-System

Zu einer Lösung von 1 Äq. Säure in abs. THF werden bei – 15 °C 1 Äq. NMM und 5 min später 1 Äq. IBCF gegeben. Nach weiteren 5 min erfolgt die Zugabe von 1 Äq. C-geschützter AS in abs. DMF. Die sofort trüb werdende Reaktionsmischung wird anschließend 1 h bei – 15 °C, 1-2 h bei 0 °C und 10-18 h bei RT gerührt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, nacheinander je 2-mal mit NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethylacetats i. Vak. wird das Rohprodukt mittels SC gereinigt.

11.4.6 Kupplung mit DPPA

Methode D6:

Zu einer Suspension aus 1 Äq. Kalium- bzw. Lithiumcarboxylat der Epoxide bzw. Aziridine in abs. DMF werden bei 0 °C nacheinander 1.05 Äq. N-geschütztes Hydrazid bzw. C-geschützte AS, 1.1 Äq. DPPA und 1.05 Äq. TEA gegeben. Das Gemisch wird 1-2 d bei 0 °C sowie 4-8 d bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung in Ethylacetat gegossen und nacheinander je 3-mal mit Wasser, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC aufgereinigt.

form : Methanol = 9 : 1). Das ausgefallene Hydrazid wird wenn möglich isoliert und charakterisiert oder ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode E2:

Eine Lösung aus dem *N*-geschützten *L*-Aminosäuremethylester in Methanol wird mit Hydrazin-Hydrat versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Das Hydrazid wird im Kühlschrank ausgefällt, abfiltriert und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode E3:

Zu einer Lösung aus der *N*-geschützten *L*-Aminosäure und Triethylamin in THF wird Chlorameisensäureethylester gegeben und bei -15°C für 30 Minuten gerührt. Das entstandene Triethylammoniumhydrochlorid wird abfiltriert und das Filtrat mit Hydrazin-Hydrat in THF versetzt. Der Ansatz wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. (vgl. Literatur^[118]).

11.6 Hydrolysen

11.6.1 Hydrolysen mit Lithiumhydroxid

Methode: F1

Monohydrolyse von Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat

0.95 Äq. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ werden bei 0°C in einer Lösung aus 1 Äq. Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat in abs. Ethanol suspendiert. Die Suspension, die sich allmählich gelb färbt, wird 1 d bei 0°C sowie 2 d bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird nach $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Kontrolle der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

Methode: F2

Hydrolyse von Aziridin-2-carboxylaten

1 Äq. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ wird bei 0°C in einer Lösung aus 1 Äq. Aziridin-2-carboxylat in abs. Alkohol suspendiert. Die Suspension wird 2 d bei 0°C sowie 2-4 d bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. vollständig entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung der DPPA-vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

11.6.2 Hydrolysen mit Kaliumhydroxid

Methode: F3

Monohydrolyse von Diestern

Zu einer eisgekühlten (0 °C) Lösung von 1 Äq. Diester in abs. Ethanol werden 0.95 Äq. ethanolische Kaliumhydroxidlösung (0.5 M) langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wird durch Zugabe von Diethylether das Produkt (weiße Flocken) ausgefällt, abfiltriert und i. Vak. getrocknet. Das Rohprodukt wird nach ¹H-NMR-spektroskopischer Kontrolle der DPPA- oder PPA- vermittelten AS- / Peptidkupplung zugeführt.

Methode: F4

Hydrolyse von Monoestern

Zu einer eisgekühlten (0 °C) Lösung von 1 Äq. Monoester in abs. Ethanol wird 1.1 Äq. ethanolische Kaliumhydroxidlösung (0.5 M) langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wird durch Zugabe von Diethylether das Produkt (weiße Flocken) ausgefällt, abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

11.7 Schutzgruppen

Methode G1: Schützen der Aminfunktion mit *tert*-Butoxycarbonyl (BOC)

Es werden 1.00 Äq. desamins in Dioxan gelöst und mit 1.20 Äq. versetzt. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wird mit 2 M wässriger Natriumhydroxid Lösung auf 9.5 gehalten. Nach 15 Stunden bei Raumtemperatur wird das Dioxan i. Vak. entfernt und der wässrige Rückstand mit Diethylether (2 x 75 ml) extrahiert. Die wässrige Phase wird schließlich mit 2 M Salzsäure auf pH 2 angesäuert und mit Ethylacetat (2 x 100 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. (vgl. Literatur^[162]).

Methode G2: Veresterung von Carbonsäuren

Es werden 1.00 Äq. der Carbonsäure und 4.00 Äq. des Alkohols in Toluol gelöst und mit 1.05 Äq. *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Der Ansatz wird am Wasserabscheider refluxiert,

bis sich die Wassermenge nicht mehr erhöht hat. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung eingeeengt und mit Diethylether versetzt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

Methode G3: Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit TFA

Das BOC-geschützte Amin wird in Dichlormethan gelöst, mit 10.0 Äq. Trifluoressigsäure versetzt und für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand erneut mit Dichlormethan versetzt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die Reaktionsmischung keine TFA mehr enthält. Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Aufreinigung der nächsten Synthesestufe zugeführt.

Methode G4: Benzylierung von Carbonsäuren

Es werden 1.00 Äq. der Carbonsäure, 1.70 Äq. des Benzylhalogenids in Ethanol unter erwärmen gelöst. Anschließend wird eine Lösung aus 2.20 Äq. Kaliumhydroxid in Wasser zugegeben und ohne Rückflusskühler so lange erhitzt, bis sich das Volumen halbiert hatte. Nach dem Abkühlen im Eisbad wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit wenig kaltem Ethanol gewaschen, aus Methanol umkristallisiert und i. Vak. getrocknet.

11.8 Bromierungen

Methode zur Bromierung von Olefinen

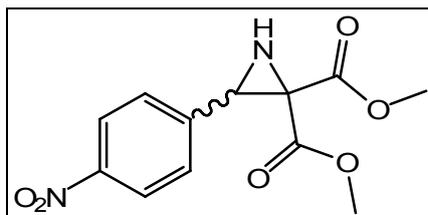
Methode H1:

Das Olefin wird in Dichlormethan vorgelegt und unter Rühren im Eisbad wird Brom zugetropft. Der Ansatz wird für 1 d gerührt (0 °C -> RT), anschließend mit wässriger 2 M Natriumthiosulfatlösung versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

12. Synthetisierte Verbindungen

12.1 Aziridinbausteine

Dimethyl 3-(4-nitrophenyl)aziridin-2,2-dicarboxylat (TP01)



Methode: A3

Ansatz: 1.73 g (6.52 mmol) *p*-Nitrobenzalmalonsäuredimethylester (TP03), 2.00 g (9.94 mmol) *S,S*-Diphenylsulfimid (TP81), Dichlormethan 50 ml.

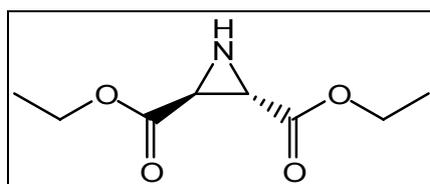
Reaktionsdauer: 8 Stunden.

Ausbeute: 1.58 g (5.64 mmol; 86 %) rote Kristalle, Smp.: 128-129 °C.^[108]

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 2.56 (d, 1 H, *J* = 9.9 Hz, Ar-CHNHC(CO₂CH₃)₂), 3.51 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.80 (d, 1 H, *J* = 9.6 Hz, Ar-CHNHC(CO₂CH₃)₂), 3.89 (s, 3 H, CO₂CH₃), 7.52 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 8.17 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[108]

Diethyl-(2*S*,3*S*)-aziridin-2,3-dicarboxylat (TP43)



Methode: A2

Ansatz: 8.87 g (43.0 mmol) (2*R*,3*R*)-Diethyltartrat, 3.70 ml (53.0 mmol) Thionylchlorid, 6.50 g (100 mmol) Natriumazid, 22.5 g (86.0 mmol) Triphenylphosphin.

Reaktionsdauer: 32 Stunden

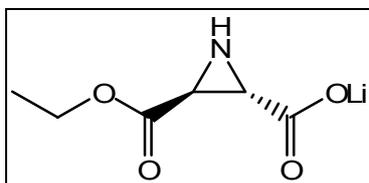
Säulenchromatographie: Cyclohexan/Ethylacetat 4:1

Ausbeute: 2.72 g (14.5 mmol, 34 %), gelbes Öl.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 1.28 (t, 6 H, *J* = 7.1 Hz, 2 x -CH₃), 1.72 (br. s, 1 H, -NH), 2.85 (s, 2 H, -CH-CH), 4.22 (q, 4 H, *J* = 7.1 Hz, 2 x -CH₂-CH₃).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[100, 103, 137, 163, 164]

Ethyl-(2*S*,3*S*)-aziridin-2,3-dicarboxylat-Lithiumsalz (TP44)

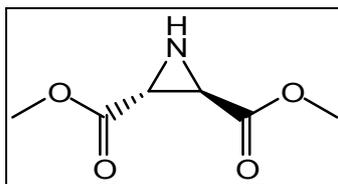


Methode: F1

Ansatz: 1.00 g (5.34 mmol) Diethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (TP43), 213 mg (5.08 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat, 20 ml Ethanol.

Rohprodukt: 827 mg eines farblosen Feststoffs.

Das erhaltene Lithiumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauffolgenden Kupplungsschritt zugeführt.

Dimethyl-(2*R*,3*R*)-aziridin-2,3-dicarboxylat (TP45)

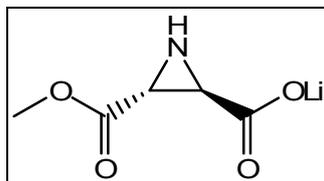
Methode: A2

Ansatz: 5.00 g (28.1 mmol) (2*R*,3*R*)-Dimethyltartrat, 2.46 ml (33.7 mmol) Thionylchlorid, 4.20 g (64.6 mmol) Natriumazid, 14.7 g (56.1 mmol) Triphenylphosphin.

Ausbeute: 1.20 g (7.54 mmol, 27 %), gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.72 (br. s, 1 H, -NH-), 2.85 (s, 2 H, -CH-CH-), 3.64 (q, 4 H, 2 x -CH₃).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[165]

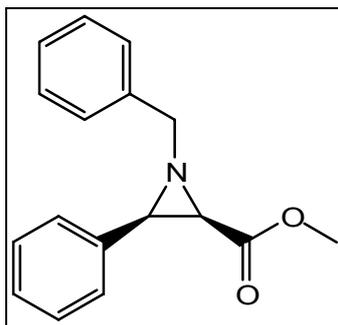
Methyl-(2*R*,3*R*)-aziridin-2,3-dicarboxylat Lithium-Salz (TP46)

Methode: F1

Ansatz: 1.20 g (7.54 mmol) (2*R*,3*R*)-2,3-Dimethylaziridin-2,3-dicarboxylat (**TP45**), 301 mg (7.16 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat, 20 ml Methanol.

Rohprodukt: 941 mg, gelblicher Feststoff.

Das erhaltene Lithiumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauf folgenden Kupplungsschritt zugeführt.

(2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (TP47)

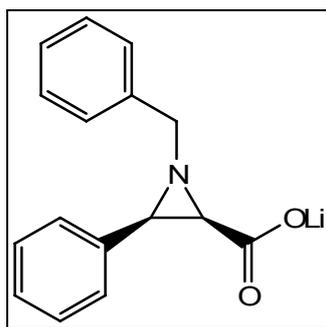
Methode: A1

Ansatz: 5.00 g (15.5 mmol) Methyl-2,3-dibromo-3-phenylpropanoat, 6.11 ml (55.9 mmol) Benzylamin, 100 ml Methanol

Säulenchromatographie: Cyclohexan/Ethylacetat 3:1.

Ausbeute: 2.52 g (9.43 mmol, 61 %) gelbes Öl.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[87]

(2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-Lithiumsalz (TP48)

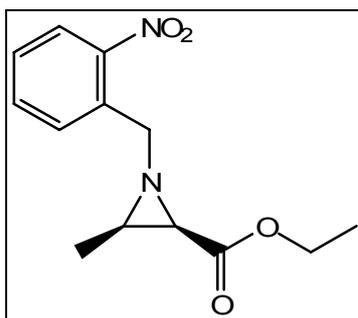
Methode: F2

Ansatz: 2.52 g (9.43 mmol) 1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (TP47), 396 mg (9.43 mmol) Lithiumhydroxid Monohydrat, 50 ml Methanol.

Rohprodukt: 2.45 g eines farblosen Feststoffs.

Das erhaltene Lithiumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauf folgenden Kupplungsschritt zugeführt.

Darstellung von (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-Ethyl 1-(2-nitrobenzyl)-3-methylaziridin-2-carboxylat (TP49)



Methode: A1

Ansatz: 500 mg (1.83 mmol) 2,3-Dibrombutansäureethylester, 1.24 g (6.57 mmol) 2-Nitrobenzylaminhydrochlorid, 262 mg (6.57 mmol) Natriumhydroxid, 10 ml Ethanol.

Säulenchromatographie: Cyclohexan:Essigester = 2:1 ($R_f = 0.54$).

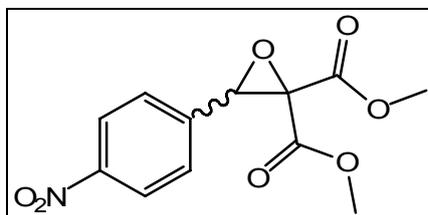
Ausbeute: 184 mg (0.70 mmol, 38 %), dunkelbraune, hochviskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 1.28\text{-}1.31$ (t, 3 H, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.36 (d, 3 H, $J = 5.8$ Hz, $-\text{CH-CH}_3$), 2.05-2.10 (m, 1 H, $-\text{CH-CH-CH}_3$), 2.25 (d, 1 H, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CH-CH-CH}_3$), 3.84 (d, 1 H, $J = 17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.10 (d, 1 H, $J = 17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.22-4.27 (q, 2 H, $J = 7.8$ Hz, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 7.40-7.44 (m, 1 H, $-\text{Ph}$), 7.64-7.68 (m, 1 H, $-\text{Ph}$), 8.04-8.08 (m, 2 H, $-\text{Ph}$).

Die Verbindung ist nicht stabil und zersetzt sich rapide. Aus diesem Grund sind keine weiteren spektroskopischen Daten angegeben.

12.2 Epoxidbausteine

Dimethyl 3-(4-nitrophenyl)oxiran-2,2-dicarboxylat (TP02)



Methode: B2

Ansatz: 1.33 g (5.00 mmol) Dimethyl-*p*-nitrobenzylidenmalonat (**TP03**), 4.50 g Aluminiumoxid (Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Aktivitätsstufe I), 3.36 ml 25 %ige Natriumhypochloridlösung.

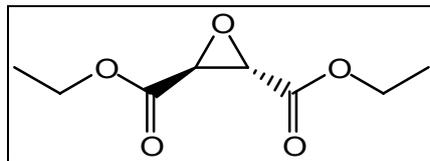
Reaktionsdauer: 8 Stunden.

Ausbeute: 509 mg (1.81 mmol, 36 %) farblose Kristalle (Smp.: 131-133 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , TMS, 300 K): δ = 3.52 (s, 3 H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.83 (s, 3 H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4.59 (s, 1 H, $-\text{CHOC}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$), 7.45-7.48 (m, 2 H, Ph-H), 8.15-8.17 (m, 2 H, Ph-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 52.9 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.8 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 61.0 ($-\text{CHOC}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$), 63.0 ($\text{CHO}\text{C}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$), 123.7 (C3-Ph), 127.3 (C2-Ph), 139.0 (C1-Ph), 148.5 (C4-Ph), 163.3 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 165.1 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3116 (w, C-H); 1753 (s, O-C=O); 1431 (m, arom. C=C, C-H); 1344 (s, $-\text{NO}_2$); 1330 (s, O-C=O); 1228 (s, -C-O-C-); 788 (s, arom. C-H) cm^{-1} .

Diethyl-(2S,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat (TP50)

Methode: B1

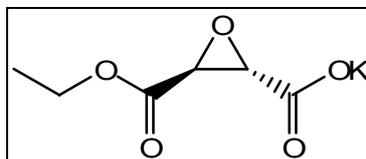
Ansatz: 16.0 g (75.3 mmol) (2S,3S)-(-)-Diethyltartrat, 77.0 ml (1.35 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), nochmals 8 ml (0.14 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), 62.0 g (24.0 mmol) Kaliumcarbonat, Destillation (kleine Kolonne/Stickstoff; $2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 67 °C).

Ausbeute: 7.37 g (39.2 mmol, 52 %), farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.29-1.32 (t, 6 H, J = 7.3 Hz, 2 x $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.65 (s, 2 H, $-\text{CH}-\text{CH}-$), 4.24-4.27 (t, 4 H, J = 7.1 Hz, 2 x $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +102.8^\circ$ (0.40, CHCl_3), Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +105.5^\circ$ (1.41, Et_2O).^[112]

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[112]

Ethyl-(2S,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP51)

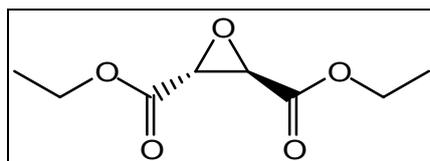
Methode: F3

Ansatz: 848 mg (15.1 mmol) Kaliumhydroxid, 3.00 g (15.9 mmol) Diethyl-(2S,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat (TP50).

Rohprodukt: 3.00 g eines farblosen Feststoffs.

Das erhaltene Kaliumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauf folgenden Kupplungsschritt zugeführt.

Diethyl-(2*R*,3*R*)-oxiran-2,3-dicarboxylat (TP52)



Methode: B1

Ansatz: 32.0 g (155 mmol) (2*R*,3*R*)-(+)-Diethyltartrat, 154 ml (2.70 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), nochmals 16 ml (0.28 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), 124 g (48.0 mmol) Kaliumcarbonat, Destillation (kleine Kolonne/Stickstoff; $2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 67 °C).

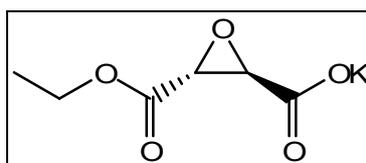
Ausbeute: 13.1 g (69.7 mmol, 45 %), farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 1.29\text{-}1.32$ (t, 6 H, $J = 7.3$ Hz, 2 x $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.65 (s, 2 H, $-\text{CH-CH-}$), 4.24-4.27 (t, 4 H, $J = 7.1$ Hz, 2 x $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -71.6^\circ$ (3.07, CHCl_3), Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -88.5^\circ$ (1.03, Et_2O).^[112]

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[112]

Ethyl-(2*R*,3*R*)-oxiran-2,3-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP53)



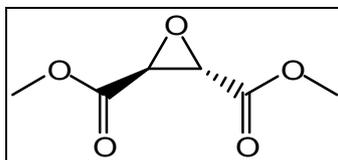
Methode: F3

Ansatz: 848 mg (15.1 mmol) Kaliumhydroxid, 3.00 g (15.9 mmol) Diethyl-(2*R*,3*R*)-oxiran-2,3-dicarboxylat (**TP52**).

Rohprodukt: 3.00 g eines farblosen Feststoffs.

Das erhaltene Kaliumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauf folgendem Kupplungsschritt zugeführt.

Dimethyl-(2*S*,3*S*)-oxiran-2,3-dicarboxylat (**TP05**)

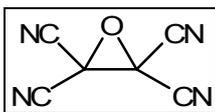


Methode: B1

Ansatz: 28.0 g (155 mmol) (2*S*,3*S*)-(-)-Dimethyltartrat, 154 ml (2.70 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), nochmals 16 ml (0.28 mol) Bromwasserstoffsäure/Eisessig-Gemisch (33 %ig), 124 g (48.0 mmol) Kaliumcarbonat.

Ausbeute: 11.2 g (69.9 mmol, 45 %), farblose Nadeln.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[166]

Tetracyanoethylenoxid (TP04)

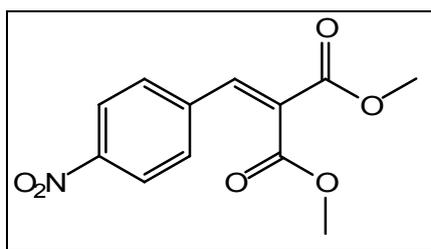
Methode: B3

Ansatz: 504 mg (3.91 mmol) Tetracyanoethylen, 0.45 ml Wasserstoffperoxid (30 %), 3.00 ml Acetonitril, 14.7 ml Wasser.

Ausbeute: 287 mg (1.99 mmol, 51 %), farbloser Feststoff.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, Aceton- d_6 , 300 K): $\delta = 54.91$ (2 x -C-CN), 109.17 (4 x -C-CN) ppm.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[116]

12.3 Olefinbausteine**Dimethyl-2-(4-nitrobenzyliden)malonat (TP03)**

Methode: Es wurden 1 eq. *p*-Nitrobenzaldehyd und 1 eq. Malonsäuredimethylester in Toluol gelöst, mit 0.1 eq. Piperidin versetzt und der Ansatz für vier Stunden refluxiert. Nachdem sich kein Wasser mehr im Wasserabscheider gesammelt hat, wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt, mit halb gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethanol umkristallisiert.

Ansatz: 5.00 g (33.1 mmol) *p*-Nitrobenzaldehyd, 4.37 g (33.1 mmol) Malonsäuredimethylester, 0.27 ml Piperidin, 50 ml Toluol.

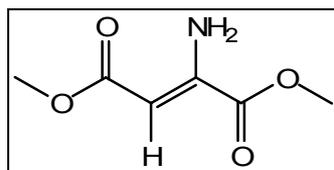
Reaktionsdauer: 4 Stunden.

Ausbeute: 6.18 g (23.3 mmol, 70 %), gelbe Kristalle, Smp.: 92-95 °C (Lit.: 93-95 °C).^[117]

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, TMS, 300 K): δ = 3.83 (s, 3 H, -CO₂-CH₃), 3.87 (s, 3 H, -CO₂-CH₃), 7.57 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz, Ph-H), 7.79 (s, 1 H, -CH-C(-CO₂-CH₃)₂), 8.23 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz, Ph-H).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[117]

Dimethyl-2-aminofumarat (TP54)



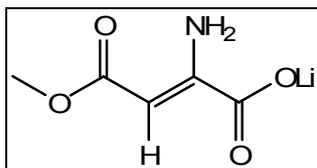
Methode: C1

Ansatz: 1.53 g (9.61 mmol) Dimethylaziridin-2,3-dicarboxylat (TP45)

Ausbeute: 1.20 g (7.54 mmol, 78 %), gelbes Öl.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, TMS, 300 K): δ = 3.71 (s, 6 H, 2 x -CO₂-CH₃), 5.09 (s, 1 H, -C=CH-CO₂-CH₃), 6.64 (br. s., 2 H, -NH₂).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[167]

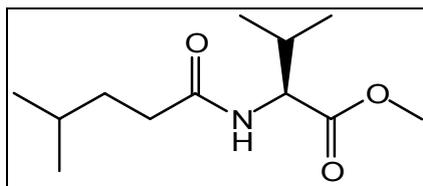
Methyl 2-aminofumarat-Lithiumsalz (TP55)

Methode: F1

Ansatz: 1.20 g (7.54 mmol) Dimethyl-2-aminofumarat, 301 mg (7.16 mmol) Lithiumhydroxid Monohydrat, 20 ml Methanol.

Ausbeute: 941 mg (6.23 mmol, 83%) eines hellbraunen Feststoffs (Smp.: > 230 °C).

Das erhaltene Lithiumsalz wurde ohne weitere Aufreinigung dem darauf folgenden Kupplungsschritt zugeführt.

12.4 Aminosäurederivate**Darstellung von 4-Methylpentanamido-(S)-Valinmethylester (TP56)**

Methode: D1

Ansatz: 1.00 g (5.97 mmol) HCl*H₂N-Val-OMe, 693 mg (0.75 ml, 5.97 mmol) 4-Methylvaleriansäure, 1.29 g (6.26 mmol) DCC, 914 mg (5.97 mmol) HOBT, 1.21 g (1.65 ml, 11.9 mmol) Triethylamin, 25 ml Ethylacetat.

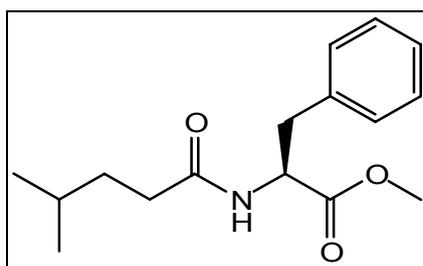
Reaktionsdauer: 50 Stunden

Ausbeute: 961 mg (4.19 mmol; 70 %), hochviskose Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.88-0.93 (m, 12 H, 4 x $-\text{CH}_3$), 1.50-1.61 (m, 3 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}$), 2.10-2.18 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.21-2.25 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3.73 (s, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4.55-4.59 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5.88 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 17.82 ($-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 18.92 ($-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 22.25 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 22.32 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 27.78 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 31.34 ($-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 34.49 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 34.76 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 52.10 ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 56.79 ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 172.75 ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 173.14 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$).

Darstellung von 4-Methylpentanamido-(S)-phenylalaninmethylester (TP57)



Methode: D1

Ansatz: 1.00 g (4.64 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Phe-OMe}$, 539 mg (0.58 ml, 4.64 mmol) 4-Methylvaleriansäure, 1.00 g (4.87 mmol) DCC, 7.10 mg (4.64 mmol) HOBT, 938 mg (1.29 ml, 9.27 mmol) Triethylamin, 25 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 50 Stunden

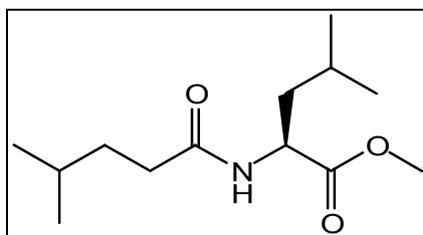
Ausbeute: 993 mg (3.58 mmol; 77 %), hochviskose Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$: (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.88-0.89 (m, 6 H, 2 x $-\text{CH}_3$), 1.46-1.57 (m, 3 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}$), 2.16-2.20 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3.07-3.19 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.74 (s, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4.89-4.94 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5.88 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz,

-NH-CH-CO₂CH₃), 7.10 (d, 2 H, J = 6.3 Hz, 2 x Ph-H (ortho)), 7.23-7.32 (m, 3 H, 2 x Ph-H (meta), Ph-H (para)).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 22.20 (CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 22.26 (CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 27.66 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 34.31 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 34.51 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 37.90 (-CH-CH₂-Ph), 52.26 (-NH-CH-CO₂CH₃), 52.88 (-NH-CH-CO₂CH₃), 127.08 (-C₆H₅ (C4)), 128.52 (2 x -C₆H₅ (C2)), 129.22 (2 x -C₆H₅ (C3)), 135.86 (-C₆H₅ (C1)), 172.17 (-NH-CH-CO₂CH₃), 172.77 (-CH₂-CO-NH-).

Darstellung von 4-Methylpentanamido-(S)-leucinmethylester (TP58)



Methode: D1

Ansatz: 1.00 g (5.51 mmol) HCl·H₂N-Leu-OMe, 639 mg (0.69 ml, 5.51 mmol) 4-Methylvaleriansäure, 1.19 g (5.78 mmol) DCC, 843 mg (5.51 mmol) HOBT, 1.11 g (1.53 ml, 11.0 mmol) Triethylamin, 25 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 50 Stunden

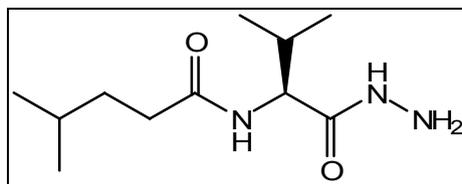
Ausbeute: 1.13 g (4.63 mmol, 84 %), hochviskose Flüssigkeit

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.88-0.93 (m, 12 H, 4 x -CH₃), 1.49-1.62 (m, 6 H, 2 x -CH₂-CH-), 2.18-2.22 (m, 2 H, -CH₂-CONH-), 3.71 (s, 1 H, -NH-CH-CO₂CH₃), 4.61-4.66 (m, 1 H, -NH-CH-CO₂CH₃), 5.80 (d, 1 H, J = 7.9 Hz, -NH-CH-CO₂CH₃).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 21.98 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 22.25 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 22.78 (2 x (CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 24.88 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 27.76 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 34.35 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 34.57 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-

CO-NH-), 41.80 (-CH-CH₂-CH-), 50.22 (-NH-CH-CO₂CH₃), 52.22 (-NH-CH-CO₂CH₃), 173.01 (-NH-CH-CO₂CH₃), 173.76 (-CH₂-CO-NH-).

Darstellung von 4-Methylpentanamido-(S)-valinylhydrazid (TP59)



Methode: E2

Ansatz: 900 mg (3.93 mmol) (S)-2-(4-Methylpentanamido)-valinmethylester (TP56), 589 mg (0.57 ml, 11.8 mmol) Hydrazin-Hydrat, 10 ml Methanol.

Aufarbeitung: Umkristallisation aus Chloroform

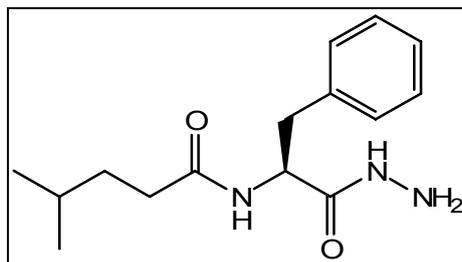
Reaktionsdauer: 72 Stunden

Ausbeute: 302 mg (1.32 mmol; 34 %), farbloser Feststoff (Smp.: 203 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.80-0.91 (m, 12 H, 4 x -CH₃), 1.35-1.47 (m, 3 H, (H₃C)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 1.81-1.91 (m, 1 H, -CH-CH-(CH₃)₂), 2.06-2.21 (m, 2 H, (H₃C)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 4.04-4.08 (m, 1 H, -CH-CH-(CH₃)₂), 6.25 (br. s, 2 H, -CO-NH-NH₂), 7.87 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, (H₃C)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 9.56 (s, 1 H, -CO-NH-NH₂).

¹³C-NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 18.41, 19.09 (-CH-CH-(CH₃)₂), 22.14, 22.37 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 27.19 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 30.30 (-CH-CH-(CH₃)₂), 33.13 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 34.35 ((CH₃)₂-CH-CH₂-CH₂-CO-NH-), 56.33 (-NH-CH-CO₂-NH-NH₂), 170.46 (-NH-CH-CO₂-NH-NH₂), 172.29 (-CH₂-CO-NH-).

Darstellung von (S)-2-(4-Methylpentanamido)-phenylalanylhydrazid (TP60)



Methode: E2

Ansatz: 900 mg (3.25 mmol) (S)-2-(4-Methylpentanamido)-phenylalaninmethylester (TP57), 487 mg (0.47 ml, 9.47 mmol) Hydrazin-Hydrat, 10 ml Methanol.

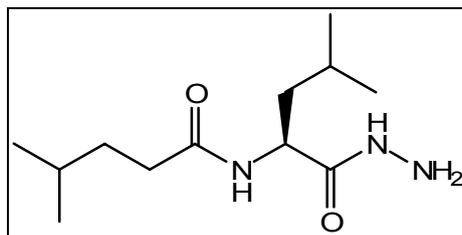
Aufarbeitung: Umkristallisation aus Chloroform

Reaktionsdauer: 72 Stunden

Ausbeute: 816 mg (2.94 mmol; 91 %), farbloser Feststoff (Smp.: 151 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.77 (m, 6 H, 2 x - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 1.18-1.31 (m, 3 H, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$), 2.01 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$), 2.69-2.75 (m, 1 H, -CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 2.88-2.93 (m, 1 H, -CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 4.20 (br. s, 2 H, -CO-NH- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}_2$), 4.41-4.47 (m, 1 H, - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$), 7.16-7.25 (m, 5 H, -CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 7.99 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$), 9.14 (s, 1 H, -CO-NH- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 22.11, 22.32 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}$), 26.90 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}$), 33.16 $((\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$), 34.11 $((\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$), 37.93 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 52.44 (-NH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2\text{-NH-NH}_2$), 126.10 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$, C₄), 127.91 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$, C₂, C₆), 129.07 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$, C₃, C₅), 137.95 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$, C₁), 170.53 (-NH-CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2\text{-NH-NH}_2$), 171.96 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CO-NH-}$).

Darstellung von (S)-2-(4-Methylpentanamido)-leucinylnhydrazid (TP61)

Methode: E2

Ansatz: 900 mg (3.70 mmol) (S)-2-(4-methylpentanamido)-leucinmethylester (TP58), 555 mg (0.54 ml, 11.1 mmol) Hydrazin-Hydrat, 10 ml Methanol.

Aufarbeitung: Umkristallisation aus Chloroform

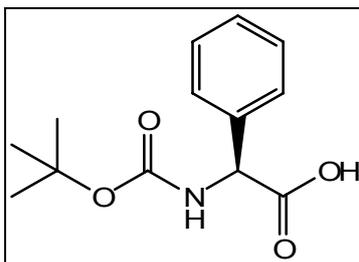
Reaktionsdauer: 72 Stunden

Ausbeute: quantitativ, farbloser Feststoff (Smp.: 146 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.88-0.94 (m, 12 H, 4 x $-\text{CH}_3$), 1.49-1.67 (m, 8 H, je 2 x $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}_2$), 2.18 (t, 2 H, J = 7.6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 4.37-4.43 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 5.87-5.89 (m, 1 H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-$), 7.62 (s, 1 H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 300 K): δ = 0.81-0.86 (m, 12 H, 4 x $-\text{CH}_3$), 1.30-1.54 (m, 8 H, je 2 x $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}_2$), 2.06-2.13 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 4.21-4.27 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 7.83-7.85 (m, 1 H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-$), 9.09 (s, 1 H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 300 K): δ = 21.64, 22.17, 22.34, 22.86 (4 x $-\text{CH}_3$), 24.18 ($-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 27.18 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 33.21 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 34.23 ($(\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 41.19 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 49.36 ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2-\text{NH}-\text{NH}_2$), 171.35 ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}_2-\text{NH}-\text{NH}_2$), 173.76 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$).

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-phenylglycin (TP62)**

Methode: G1

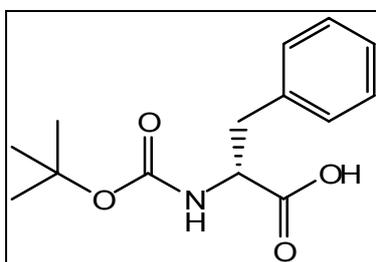
Ansatz: 1.00 g (6.62 mmol) Phenylglycin, 1.73 g (7.94 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat, 30.0 ml Dioxan, 6.60 ml (13.2 mmol) 2 M Natronlauge, 100 ml Diethylether.

Reaktionsdauer: 20 Stunden

Ausbeute: 1.66 g (6.62 mmol, quantitativ), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.35 (s, 9 H, -C(H)₃), 5.65 (br. s, 1 H, -CH-Ph), 7.20-7.29 (m, 5 H, -CH-Ph), 7.33 (d, 1 H, J = 7.0 Hz, -CONH-).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[168]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-D-phenylalanin (TP63)**

Methode: G1

Ansatz: 1.00 g (6.05 mmol) D-Phenylalanin, 1.59 g (7.26 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat, 30.0 ml Dioxan, 6.00 ml (12.0 mmol) 2 M Natronlauge, 100 ml Diethylether.

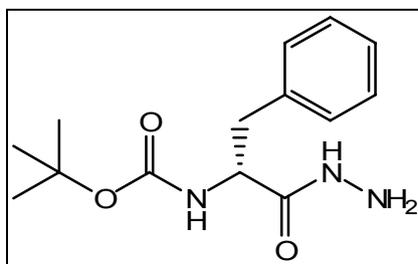
Reaktionsdauer: 16 Stunden

Ausbeute: 1.36 g (5.12 mmol, 84 %), gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.40 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{H}}_3)_3$), 3.04-3.09 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$), 3.13-3.28 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$), 4.59 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-$), 4.93 (s, 1 H, $\text{BOC-N}\underline{\text{H}}$), 7.17-7.31 (m, 5 H, $-\underline{\text{Ph}}$), 11.2 (s, 1 H, $-\text{CO}_2\underline{\text{H}}$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[162]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*D*-phenylalaninhydrazid (TP64)**



Methode: E1

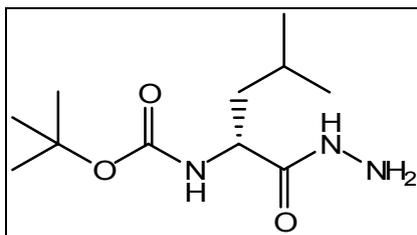
Ansatz: 1.36 g (5.12 mmol) BOC-*D*-Phenylalanin (**TP63**), 1.16 g (5.63 mmol) DCC, 30.0 ml Dioxan, 62.0 mg (5.12 mmol) DMAP, 943 mg Ethanol, 0.55 ml (11.3 mmol) Hydrazin-Hydrat.

Reaktionsdauer: 46 Stunden

Ausbeute: 1.10 g (3.93 mmol, 77 %), farbloser Feststoff (Smp.: 107 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): δ = 1.28 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.69-2.75 (m, 1 H, $-\text{CH-C}\underline{\text{H}}_2-\text{Ph}$), 2.84-2.88 (m, 1 H, $-\text{CH-C}\underline{\text{H}}_2-\text{Ph}$), 4.04-4.12 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 4.19 (br. s, 2 H, $-\text{CO-NH-N}\underline{\text{H}}_2$), 6.87 (d, 1 H, J = 8.6 Hz, $-\text{N}\underline{\text{H}}-\text{CO}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 7.15-7.27 (m, 5 H, $-\text{CH-CH}_2-\underline{\text{Ph}}$), 9.10 (s, 1 H, $-\text{CO-N}\underline{\text{H}}-\text{NH}_2$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[169]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-D-leucinhydrazid (TP65)**

Methode: E1

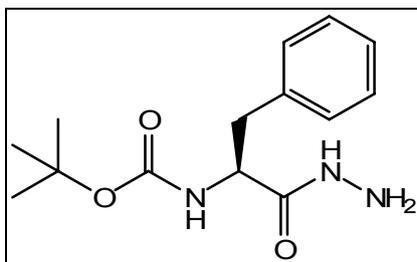
Ansatz: 1.00 g (4.01 mmol) BOC-D-Leucin*H₂O, 910 mg (4.41 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 49.0 mg (0.40 mmol) DMAP, 739 mg Ethanol, 0.58 ml (12.0 mmol) Hydrazin-Hydrat.

Reaktionsdauer: 46 Stunden

Ausbeute: 679 mg (2.77 mmol, 69 %), farbloser Feststoff (Smp.: 78 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.81-0.86 (m, 6 H, 2 x -CH₃), 1.31-1.53 (m, 12 H, -CH₂-CH-(CH₃)₂); davon 1.35, s, 9 H, -C(CH₃)₃, 3.90 (m, 1 H, -CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 4.16 (br. s, 2 H, -CO-NH-NH), 6.75 (d, 1 H, J = 8.4 Hz, -NH-CO₂-C(CH₃)₃), 9.00 (s, 1 H, -CO-NH-NH₂).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[169]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Phenylalaninhydrazid (TP66)**

Methode: E1

Ansatz: 5.00 g (18.8 mmol) BOC-L-Phenylalanin, 4.30 g (20.7 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 230 mg (1.88 mmol) DMAP, 2.16 ml (37.7 mmol) Ethanol, 2.70 ml (56.4 mmol) Hydrazin-Hydrat.

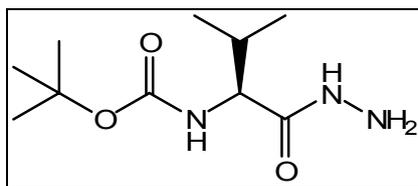
Reaktionsdauer: 14 Stunden

Ausbeute: 2.11 mg (6.43 mmol, 39 %), farbloser Feststoff (Smp. 118 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.36 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 2.99 (m, 2 H, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph), 3.45 (br. s, 2 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}_2$), 4.25 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$ -Ph), 6.46 (br. s, 1 H, BOC- $\underline{\text{N}}\text{H}$ -), 7.10-7.28 (m, 5 H, $-\underline{\text{P}}\text{h}$), 8.14 (s, 1 H, $-\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$) ppm.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[119]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-valinhydrazid (TP67)**



Methode: E1

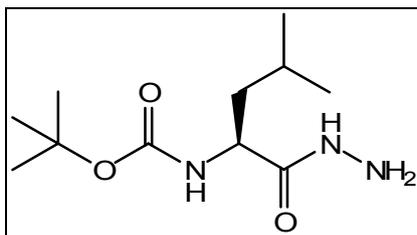
Ansatz: 2.00 g (9.20 mmol) BOC-L-Valin, 1.89 mg (9.40 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 110 mg (0.92 mmol) DMAP, 1.05 ml (18.4 mmol) Ethanol, 1.38 ml (27.5 mmol) Hydrazin-Hydrat.

Reaktionsdauer: 14 Stunden

Ausbeute: 1.40 g (6.05 mmol, 66 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): δ = 0.96 (m, 6 H, $-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 1.44 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 2.20 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 4.19 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.52 (br. s, 2 H, $-\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$), 6.99 (br. s, 1 H, BOC- $\underline{\text{N}}\text{H}$ -), 8.22 (s, 1 H, $-\underline{\text{N}}\text{H}-\underline{\text{N}}\text{H}_2$) ppm.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[119]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-leucinhydrazid (TP68)**

Methode: E1

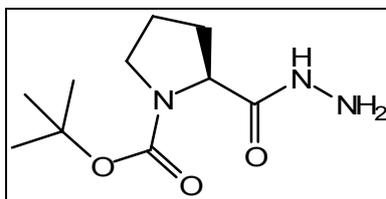
Ansatz: 1.00 g (4.32 mmol) BOC-L-Leucin, 1.10 g (5.18 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 50.0 mg (0.43 mmol) DMAP, 0.49 ml (8.64 mmol) Ethanol, 0.65 ml (13.0 mmol) Hydrazin-Hydrat.

Reaktionsdauer: 14 Stunden

Ausbeute: 730 mg (2.98 mmol, 69 %), oranger, hochviskoser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.92 (m, 6 H, $-\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$), 1.09 (m, 2 H, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.43 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 1.94 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$), 3.48 (br. s, 2 H, $-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}_2$), 3.70 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.47 (br. s, 1 H, BOC- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 8.20 (s, 1 H, $-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}-\text{NH}_2$) ppm.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[119]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-prolinhydrazid (TP69)**

Methode: E1

Ansatz: 937 mg (4.33 mmol) BOC-L-Prolin, 903 mg (4.37 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 53.7 mg (0.44 mmol) DMAP, 739 mg Ethanol, 0.63 ml (13.0 mmol) Hydrazin-Hydrat.

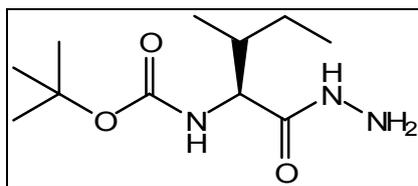
Reaktionsdauer: 46 Stunden

Ausbeute: 810 mg (2.34 mmol, 54 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.44 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{H}}_3)_3$), 1.83-2.30 (m, 4 H, 2 x $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$), 3.33-3.44 (m, 2 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-$), 4.16 (s, 2 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}_2$), 4.32 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-$), 9.03 (s, 1 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[170]

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-iso-leucinhydrazid (TP70)**



Methode: E1

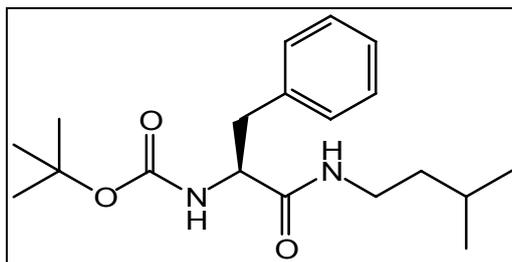
Ansatz: 1.00 g (4.33 mmol) BOC-L-Isoleucin, 903 mg (4.37 mmol) DCC, 25.0 ml Diethylether, 53.7 mg (0.44 mmol) DMAP, 739 mg Ethanol, 0.63 ml (13.0 mmol) Hydrazin-Hydrat.

Reaktionsdauer: 46 Stunden

Ausbeute: 1.06 g (4.33 mmol, 100 % quant.), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.87-0.89 (m, 6 H, 2 x $-\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 1.09-1.18 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-\text{CH}_3$), 1.23-1.27 (m, 2 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2-\text{CH}_3$), 1.42 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{H}}_3)_3$), 1.82 (br. s, 2 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}_2$), 4.10-4.23 (m, 1 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}-\text{CH}-\text{CH}_3$), 5.05 (m, 1 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}$), 9.00 (s, 1 H, $-\text{CO}-\text{N}\underline{\text{H}}-\text{NH}_2$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[171]

[(S)-1-(3-Methyl-butylcarbamoyl)-phenylalanyl]-ameisensäure-*tert*-butylester (TP71)

Methode: D1

Ansatz: 5.00 g (18.8 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanin, 2.40 ml (20.7 mmol) 4-Methylbutanamin, 5.21 ml (37.6 mmol) Triethylamin, 2.54 g, (18.8 mmol) HOBT, 4.06 g (19.7 mmol) DCC, 60.0 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 48 Stunden

Ausbeute: 1.76 g (5.26 mmol, 28 %), farbloser Feststoff.

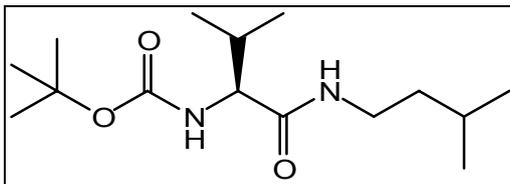
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.83 (d, J = 4.3 Hz, 6 H, $-\text{CH}_2\text{-CH-}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$), 1.24 (m, 3 H, $-\text{CH}_2\text{-C}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{-CH-}(\text{CH}_3)_2$), 1.40 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 3.02 (m, 2 H, $-\text{NH-C}\underline{\text{H}}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.16 (m, 2 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 4.24 (m, 2 H, $-\text{NH-C}\underline{\text{H}}\text{-CO-}$), 5.10 (br. s, 1 H, $-\text{CON}\underline{\text{H}}\text{-CH}_2\text{-}$), 5.65 (br. s, 1 H, $-\text{CO}_2\text{N}\underline{\text{H}}\text{CH}$), 7.18-7.30 (m, 5 H, $-\underline{\text{Ph}}$).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$, 334.5, gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 357.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 691.5.

LC-MS: R_t = 20.7 min, Reinheit > 99 %.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[172]

[(S)-1-(3-Methyl-butylcarbamoyl)-valinyl]-ameisensäure-*tert*-butylester (TP72)



Methode: D1

Ansatz: 944 mg (4.34 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-valin, 550 μ l (4.77 mmol) 4-Methylbutanamin, 1.20 ml (8.68 mmol) Triethylamin, 586 mg, (4.34 mmol) HOBt, 941 mg (4.56 mmol) DCC, 20.0 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 48 Stunden

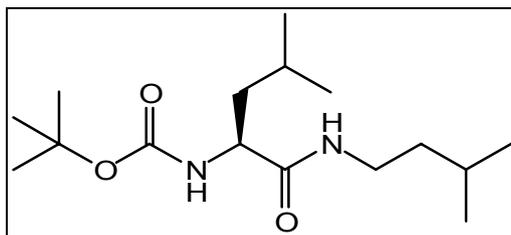
Ausbeute: 990 mg (3.46 mmol, 80 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 6 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 6 H, $-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.38 (q, 2 H, J = 14.4, 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.43 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.59 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.10 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.26 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.80 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$), 5.04 (br. s, 1 H, $-\text{CO}_2-\text{NH}-\text{CH}-$), 5.92 (br. s, 1 H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$, 286.4, gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 309.2, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 595.3.

LC-MS: R_t = 18.9 min, Reinheit > 99 %.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[173]

[(S)-1-(3-Methyl-butylcarbamoyl)-leucanyl]-ameisensäure-*tert*-butylester (TP73)

Methode: D1

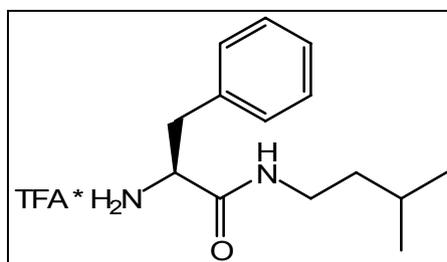
Ansatz: 5.78 g (25.0 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-Leucin, 2.90 ml (25.0 mmol) 4-Methylbutanamin, 3.83 g, (25.0 mmol) HOBT, 5.42 g (26.3 mmol) DCC, 30.0 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 48 Stunden

Ausbeute: 6.22 g (20.7 mmol, 83 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.88-0.93 (m, 12 H; 4 x $-\text{CH}_3$), 1.33-1.69 (m, 6 H, 2 x $-\text{CH}_2-\text{CH}$), 1.42 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.22-3.27 (m, 2 H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 4.02 (m, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}$), 4.87 (br. s, 1 H, BOC- NH), 6.10 (br. s, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[145]

2-Amino-N-(3-methyl-butyl)-(S)-Phenylalanin * TFA (TP74)

Methode: G3

Ansatz: 1.76 g (5.26 mmol) BOC-Phe-IAA (TP71), 4.05 ml (52.6 mmol) TFA.

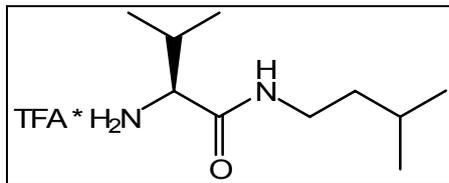
Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 1.23 g (3.53 mmol, 67 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.76 (m, 6 H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.91 (m, 1 H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.11 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.29 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.12 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.29 (m, 1 H, $\text{H}_2\text{N-CH-CO-}$), 6.70 (s, 1 H, $-\text{CO-NH-CH}_2\text{-}$), 7.12-7.29 (m, 5 H, $-\text{Ph}$), 8.12 (br. s, 2 H, $-\text{NH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 22.08 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.37 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.91 ($-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 37.39 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 38.08 ($-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 55.06 ($\text{H}_2\text{N-CH-CO-}$), 127.85 ($-\text{Ph}$), 129.03 ($-\text{Ph}$), 129.29 ($-\text{Ph}$), 133.93 ($-\text{Ph}$), 168.03 ($-\text{CH-CO-NH-}$).

2-Amino-N-(3-methyl-butyl)-(S)-Valin * TFA (TP75)



Methode: G3

Ansatz: 990 mg (3.46 mmol) BOC-Val-IAA (TP72), 2.67 ml (34.6 mmol) TFA.

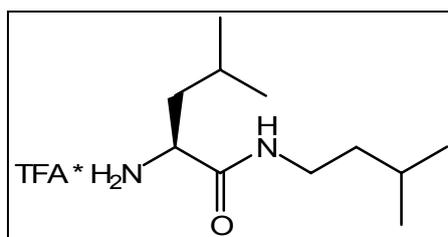
Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 645 mg (2.15 mmol, 62 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): δ = 0.85 (m, 6 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.91 (d, 6 H, J = 6.8 Hz, $-\text{CH-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.32 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.58 (m, 1 H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.71 (m, 2 H, $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 2.03 (m, 1 H, $-\text{CH-CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.21 (m, 1 H, $\text{H}_2\text{N-CH-CO-}$), 8.10 (br. s, 2 H, $-\text{NH}_2$), 8.38 (br. s, 1H, $-\text{NH-}$).

^{13}C -NMR (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 18.25 (-CH-CH-(C H_3) $_2$), 22.31 (-CH $_2$ -CH $_2$ -CH-(C H_3) $_2$), 25.03 (-CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 29.72 (-CH-CH-(CH $_3$) $_2$), 36.88 (-CH $_2$ -CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 37.80 (-CH $_2$ -CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 57.62 (H $_2$ N-CH-CO-), 167.47 (H $_2$ N-CH-CO-).

2-Amino-N-(3-methyl-butyl)-(S)-Leucin * TFA (TP76)



Methode: G3

Ansatz: 6.00 g (20.0 mmol) BOC-Leu-IAA (TP73), 15.4 ml (200 mmol) TFA.

Reaktionsdauer: 24 Stunden

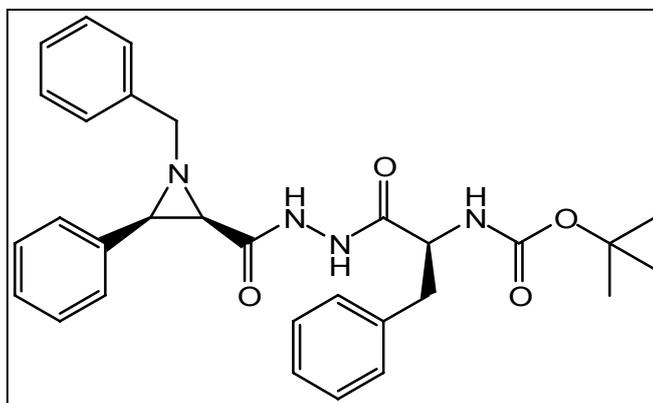
Ausbeute: 4.00 g (12.7 mmol, 64 %), hellbraune, hochviskose Flüssigkeit.

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.87-0.89 (m, 6 H, 2 x -CH $_3$), 0.91-0.94 (m, 6 H, 2 x -CH $_3$), 1.34-1.39 (q, 2 H, J = 7.3 Hz, -NH-CH $_2$ -CH $_2$ -CH-), 1.51-1.71 (m, 4 H, 2 x -CH(CH $_3$) $_2$; -CH-CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 3.13-3.21 (m, 1 H, -NH-CH $_2$ -CH $_2$ -), 3.25-3.33 (m, 1 H, -NH-CH $_2$ -CH $_2$ -), 4.09-4.15 (m, 1 H, H $_2$ N-CH-CO-NH-), 7.24-7.26 (br. t, 1 H, -CO-NH-CH $_2$ -), 7.92 (br. s, 2 H, H $_2$ N-CH-).

^{13}C -NMR (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 21.91 (-CH-(C H_3) $_2$), 22.09 (-CH-(C H_3) $_2$), 22.14 (-CH-(C H_3) $_2$), 22.17 (-CH-(C H_3) $_2$), 24.42 (-CH $_2$ -CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 25.75 (-CH-CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 37.56 (-NH-CH $_2$ -CH $_2$ -), 38.39 (-NH-CH $_2$ -CH $_2$ -), 40.54 (-CH-CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 52.69 (H $_2$ N-CH-CO-NH-), 169.37 (-CONH-).

12.5 AS-verknüpfte Aziridine

Darstellung von (2*R*,3*R*)- + (2*S*,3*S*)- 1-Benzyl-3-phenylaziridine-2-((*S*)-1-(butoxy-carbonyl)-phenylalanyl)-hydrazid (TP06):



Methode: D6

Ansatz: 200.0 mg, (0.77 mmol) (2*R*,3*R*)- + (2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-Lithiumsalz (TP48), 226 mg (0.81 mmol) H₂N-NH-Phe-NH-BOC (TP66), 0.18 ml (0.83 mmol) DPPA, 0.21 ml (1.54 mmol) Triethylamin, 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 60 Tage

Ausbeute: 72.0 mg (0.14 mmol, 18 %), gelblicher Feststoff (Smp.: 102 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 1.33 (m, 9 H, -C(CH₃)₃), 2.70 (d, 1 H, *J* = 6.8 Hz, Ph-CH-CH-CONH-), 3.00 (m_c, 2 H, -CH₂-Ph), 3.17 (d, 1 H, *J* = 6.8 Hz, Ph-CH-CH-CONH-), 3.54-3.62 (dd, 1 H, *J* = 13.4 Hz, -CH-CH₂-Ph), 3.92-3.99 (dd, 1 H, *J* = 13.6 Hz, -CH-CH₂-Ph), 4.32 (br. s, 1 H, -NH-CO₂-C(CH₃)₃), 4.86 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 7.03-7.07 (m, 2 H, -Ph), 7.19-7.41 (m., 13 H, -Ph), 8.53 (br. s, 1 H, -NH-NH-), 8.63 (br. s, 1 H, -NH-NH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 28.17 (-C(CH₃)₃), 38.04 (-CH-CH₂-Ph), 45.26 (Ph-CH-CH-CONH-), 47.99 (Ph-CH-CH-CONH-), 56.73 (-CH-CH₂-Ph), 63.19 (-CH₂-Ph;), 83.04 (-C(CH₃)₃), 127.57 (Ph), 128.31 (Ph), 128.69 (Ph), 129.26 (Ph), 134.19 (Ph),

135.80 (Ph), 137.24 (Ph), 163.81 (-CO₂-C(CH₃)₃), 169.82 (-CO-NH-NH-CO-CH-), 169.89 (-CO-NH-NH-CO-CH-).

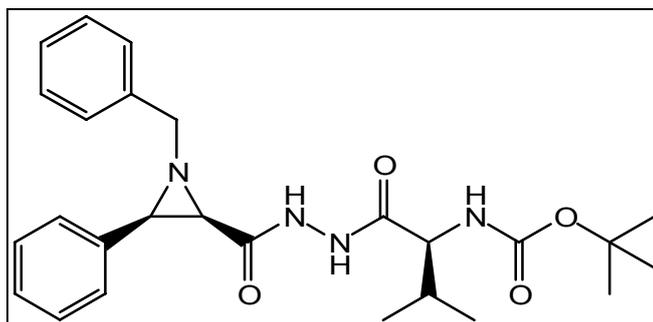
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₀H₃₄N₄O₄, 514.3; gef.: [M+H]⁺ 515.4, [M+Na]⁺ 537.3.

LC-MS: R_t = 21.1 min, Reinheit (¹H-NMR): 90 %.

[α]_D²⁵ = -11.6 ° (0.38, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3316, 3178 (m, -CONH-); 1695, 1610 (s, -C=O); 1167 (s, -O-C=O); 694 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (2R,3R)- + (2S,3S)- 1-Benzyl-3-phenylaziridine-2-((S)-1-(butoxy-carbonyl-valinyl))-hydrazid (TP07):



Methode: D6

Ansatz: 200.0 mg (0.77 mmol) (2R,3R)- + (2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäure-Lithiumsalz (**TP48**), 387 mg (0.81 mmol) H₂N-NH-Val-NH-BOC (**TP67**), 0.18 ml (0.83 mmol) DPPA, 0.21 ml (1.54 mmol) Triethylamin, 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 60 Tage

Ausbeute: 265 mg (0.57 mmol, 74 %), gelblicher Feststoff (Smp.: 74 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.81 (d, 6 H, J = 6.8 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.39 (m, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.99-2.10 (m, 1 H, -CH(CH₃)₂), 2.72 (d, 1 H, J = 6.8 Hz, Ph-CH-CH-

CONH-), 3.18 (d, 1 H, $J = 6.8$ Hz, Ph-CH-C \underline{H} -CONH-), 3.54-3.57 (dd, 1 H, je $J = 13.3$ Hz, -C \underline{H}_2 -Ph), 3.87 (br. s, 1 H, -N \underline{H} -CO₂-C(CH₃)₃), 3.96-4.01 (dd, 1 H, $J = 13.3$ Hz, -C \underline{H}_2 -Ph), 4.89 (m, 1 H, -C \underline{H} -CH(CH₃)₂), 7.17-7.48 (m, 10 H, 2 x - \underline{Ph}), 8.40 (br. s, 1 H, -NH-NH-), 8.65 (br. s, 1 H, -NH-NH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): $\delta = 18.95$ (-CH-(\underline{C} H₃)₂), 19.04 (-CH-(\underline{C} H₃)₂), 28.25 (-C(\underline{C} H₃)₃), 30.65 (- \underline{C} H-(CH₃)₂), 45.14 (Ph- \underline{C} H-CH-CONH-), 47.90 (Ph-CH- \underline{C} H-CONH-), 63.14 (- \underline{C} H₂-Ph), 63.33 (- \underline{C} H-CH-(CH₃)₂), 81.68 (- \underline{C} (CH₃)₃), 127.55 (\underline{Ph}), 127.57 (\underline{Ph}), 127.69 (\underline{Ph}), 127.74 (\underline{Ph}), 128.31 (\underline{Ph}), 128.68 (\underline{Ph}), 134.20 (\underline{Ph}), 137.24 (\underline{Ph}), 162.25 (- \underline{C} O₂-C(CH₃)₃), 165.64 (-CO-NH-NH- \underline{C} O-CH-), 166.74 (- \underline{C} O-NH-NH-CO-CH-).

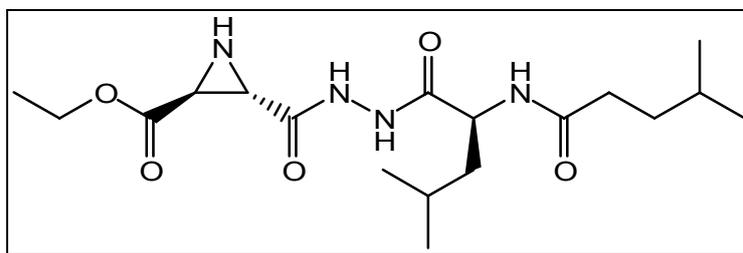
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₆H₃₄N₄O₄, 466.3; gef.: [M+H]⁺ 467.3, [M+Na]⁺ 489.3.

LC-MS: R_t = 19.9 min, Reinheit (¹H-NMR): 91 %.

$[\alpha]_D^{25} = -12.9^\circ$ (0.28, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3305, 3189$ (m, -CONH-); 1693, 1678, 1614 (s, -C=O); 1167 (s, -O-C=O); 696 (s, arom. C-H) cm⁻¹.

(2S,3S)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-leuciny)-hydrazinocarbonyl]-aziridin-2-carboxylat (TP08)



Methode: D6

Ansatz: 50.0 mg (303 μ mol) (2S,3S)-Monoethyl-aziridin-dicarboxylat-Lithiumsalz (TP44), 77.4 mg (318 μ mol) H₂N-NH-Leu-Isocapronsäure (TP61), 70.5 μ l (0.33 mmol) DPPA, 84.0 μ l (606 μ mol) Triethylamin, 10.0 ml DMF.

Reaktionsdauer: 14 Tage

Ausbeute: 75.0 mg (0.20 mmol, 64 %), gelber Feststoff (Smp.: 114 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.81-0.88 (m, 12 H, 4 x - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 1.19 (br. s, 1 H, -CH-N $\underline{\text{H}}$ -CH-), 1.22 (m, 3 H, -CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 1.32 -1.64 (m, 6 H, -CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$, -CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ (CH $_3$) $_2$, - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), -CH $_2$ -CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ (CH $_3$) $_2$), 2.05-2.13 (m, 2 H, -CO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH $_2$ -), 2.62 (m $_c$, 2 H, - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CO-NH-), 4.10-4.15 (m, 2 H, - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH $_3$), 4.31-4.37 (m, 1 H, -CO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -NH-) 7.96 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, -CO-CH-N $\underline{\text{H}}$ -), 10.08 (s, 1 H, -NH-N $\underline{\text{H}}$ -CO-CH-), 10.49 (s, 1 H, -N $\underline{\text{H}}$ -NH-CO-CH-).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.99 (-CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 21.57, 22.22, 22.34, 22.91 (-CH $_2$ -CH-($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_2$, -CH $_2$ -CH $_2$ -CH-($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_2$), 24.09 (-CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -(CH $_3$) $_3$), 27.18 (-CH $_2$ -CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -(CH $_3$) $_2$), 33.17 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 34.26 (-CH $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 40.97 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH-(CH $_3$) $_3$), 49.20 (-NH-CO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -NH-), 50.78 (-CO $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -), 51.75 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CO-NH-), 62.85 (- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -CH $_3$), 164.27 (-CO $_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -), 166.96 (-CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -NH-), 170.94 (-NH-NH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -CH-), 171.71 (-NH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -CH $_2$ -).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C $_{18}$ H $_{32}$ N $_4$ O $_5$, 384.2, gef.: [M+H] $^+$ 385.3, [M+Na] $^+$ 407.3, [2M+H] $^+$ 769.5, [2M+Na] $^+$ 791.4.

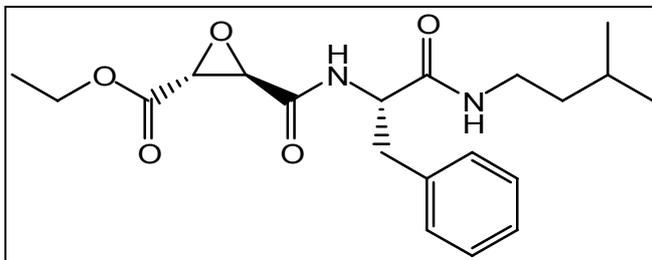
LC-MS: R $_t$ = 13.9 min, Reinheit 90 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = -23.3 ° (0.12, CHCl $_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3272, 3189 (m, -CONH-); 2954, 2925 (s, -CH $_3$, -CH $_2$ -); 1735, 1641 (s, -C=O); 1606 (s, -N-N-); 1198 (s, -O-C=O) cm $^{-1}$.

12.6 AS-verknüpfte Epoxide

Darstellung von (2*R*,3*R*)-Ethyl 3-((*S*)-1-(isopentylcarbamoyl)-phenylalanyl)oxiran-2-carboxylat (TP19)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (0.49 mmol) (2*R*,3*R*)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP53), 115 mg, (0.49 mmol) L-Phenylalanin-IAA (TP74), 314 μ l (0.54 mmol) PPA (50 wt% in DMF), DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 40 Stunden

Ausbeute: 18.0 mg (0.05 mmol, 10 %), farbloser Feststoff (Smp.: 101 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.83 (d, 6 H, J = 6.5 Hz, 2 x - CH_3), 1.28-1.41 (m, 6 H, - $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.92-3.17 (m, 4 H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, - $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 3.48 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, - $\text{CH-CH-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.65 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, - $\text{CH-CH-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.21-4.29 (m, 2 H, - $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.43-4.48 (m, 1 H, - $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 5.25 (m, 1 H, - $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.73 (d, 1 H, J = 8.3 Hz, - CONH-CH-), 7.19-7.23 (m, 2 H, $\text{Ph-H}_{\text{meta}}$), 7.26-7.32 (m, 3 H, $\text{Ph-H}_{\text{ortho,para}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 14.02 (- $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 22.29 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.57 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 29.69 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 37.80 (- $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 38.02 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 38.74 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 52.80 (- $\text{CH-CH-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 53.76 (- $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 54.63 (- $\text{CH-CH-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 62.30 (- $\text{CH-CH-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 127.25 (Ph_{para}), 128.82 (Ph_{ortho}), 129.19 (Ph_{meta}), 136.22 (Ph_{quart}), 165.76 (- $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 166.43 (- $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 169.52 (- CH-CH-CONH-CH-).

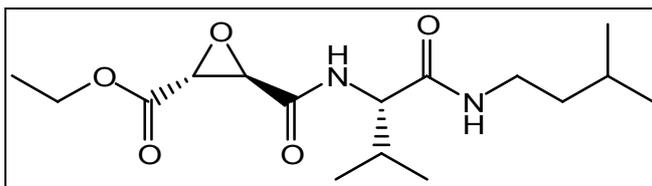
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{20}H_{28}N_2O_5$, 376.2; gef.: $[M+H]^+$ 377.4, $[M+Na]^+$ 399.3, $[2M+Na]^+$ 775.5.

LC-MS: $R_t = 17.5$ min, Reinheit (1H -NMR): 85 %.

$[\alpha]_D^{25} =$ zu wenig Substanz.

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3278$ (s, -C-H); 3093 (m, -CONH-); 1739, 1645 (s, -C=O); 1556 (s, -O-C=O); 1028 (s, -C-O-C-) cm^{-1} .

Darstellung von (2R,3R)-Ethyl 3-((S)-1-(isopentylcarbamoyl)-valinyl)oxiran-2-carboxylat (TP20)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (0.49 mmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP53), 91.0 mg, (0.49 mmol) L-Valin-IAA (TP75), 314 μ l (0.54 mmol) PPA (50 wt% in DMF), DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 40 Stunden

Ausbeute: 26.0 mg (0.08 mmol, 16 %), farbloser Feststoff (Smp.: 170 °C).

1H -NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): $\delta = 0.80$ - 0.85 (m, 12 H, 4 x - $\underline{C}H_3$), 1.21 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz, -CO₂-CH₂- $\underline{C}H_3$), 1.24-1.30 (m, 2 H, -CH₂- $\underline{C}H_2$ -CH-(CH₃)₂), 1.50-1.62 (m, 1 H, -CH₂-CH₂- $\underline{C}H$ (CH₃)₂), 1.89-1.97 (m, 1 H, -CH- $\underline{C}H$ (CH₃)₂), 2.96-3.05 (m, 1 H, - $\underline{C}H_2$ -CH₂-CH-(CH₃)₂), 3.07-3.15 (m, 1 H, - $\underline{C}H_2$ -CH₂-CH-(CH₃)₂), 3.56 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H, -CH- $\underline{C}H$ -CO₂-CH₂-CH₃), 3.82 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H, - $\underline{C}H$ -CH-CO₂-CH₂-CH₃), 4.08-4.12 (m, 1 H, - $\underline{C}H$ -CH-(CH₃)₂), 4.15-4.18 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz, -CO₂- $\underline{C}H_2$ -CH₃), 7.99 (m, 1 H, -CON \underline{H} -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 8.51 (d, 1 H, $J = 8.9$ Hz, -CON \underline{H} -CH-).

^{13}C -NMR (100.62 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.86 (-CO₂-CH₂-CH₃), 18.08 (-CH-CH-(CH₃)₂), 19.02 ((-CH-CH-(CH₃)₂), .22.30 (2 x (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 25.04 ((-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 30.47 (-CH-CH-(CH₃)₂), 36.63 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 37.91 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 51.04 (-CH-CH-CO₂-CH₂-CH₃), 52.72 (-CH-CH-CO₂-CH₂-CH₃), 58.11 (-CH-CH-(CH₃)₂), 61.41 (-CO₂-CH₂-CH₃), 164.75 (-CO₂-CH₂-CH₃), 167.23 (-CONH-CH₂-CH₂-), 169.82 (-CH-CH-CONH-CH-).

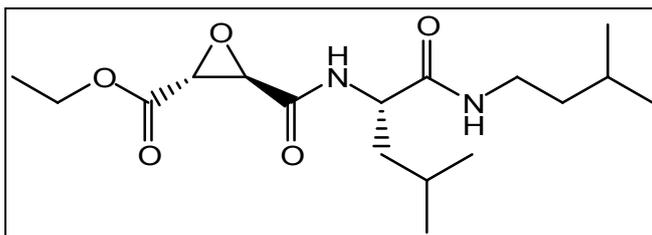
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₆H₂₈N₂O₅, 328.2; gef.: [M+H]⁺ 329.4, [M+Na]⁺ 351.3, [2M+Na]⁺ 679.4.

LC-MS: R_t = 15.1 min, Reinheit > 99 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = -5.9 ° (0.22, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3280 (s, -C-H); 3100 (m, -CONH-); 2958, 2925, 2871, 2852 (s, -CH₃, -CH₂-); 1751, 1639 (s, -C=O); 1558 (s, -O-C=O); 1198 (s, -O-C=O); 1026 (s, -C-O-C-) cm⁻¹.

Darstellung von ((2*R*,3*R*)-Ethyl 3-((*S*)-1-(isopentylcarbamoyl)-leucinyloxiran-2-carboxylat) (TP21)



Methode: D4

Ansatz: 200.0 mg (1.01 mmol) (2*R*,3*R*)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 202 mg, (1.01 mmol) L-Leu-IAA (**TP76**), 0.93 ml PPA (1.59 mmol) (50 wt% in DMF), 0.35 ml (2.52 mmol) Triethylamin, DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 40 Stunden

Ausbeute: 200 mg (0.58 mmol, 58 %), farbloser Feststoff (Smp.: 128 °C, Lit.: 124 °C^[145]).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.82-0.87 (m, 12 H, 4 x -CH₃), 1.20-1.23 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, -CO₂-CH₂-CH₃), 1.24-1.30 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.42-1.46 (m, 2 H, -CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.49-1.57 (m, 2 H, 2 x -CH₂-CH(CH₃)₂), 3.01-3.08 (m, 2 H, -CONH-CH₂-CH₂-CH-), 3.59 (d, 1 H, *J* = 1.7 Hz, -CO₂-CH-CH-CONH-), 3.71 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, -CO₂-CH-CH-CONH-), 4.13-4.28 (m, 3 H, -CH-CH₂-CH-(CH₃)₂, -CO₂-CH₂-CH₃), 7.96-7.98 (m, 1 H, -CONH-CH₂-), 8.56-8.58 (m, 1 H, -CONH-CH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 13.87 (-CH₂-CH₃), 21.67, 22.31, 22.34, 22.78, 24.23, 25.08 (2 x -CH-(CH₃)₂; 4 x -CH₃), 36.74 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 37.95 (-CONH-CH₂-CH₂-CH-), 40.99 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 51.04 (-CO₂-CH-CH-CONH-), 51.36 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 52.89 (-CO₂-CH-CH-CONH-), 61.46 (-CH₂-CH₃), 164.62 (-CO₂-CH₂-CH₃), 167.19 (-CONH-CH₂-), 170.88 (-CONH-CH-).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₇H₃₀N₂O₅, 342.4; gef.: [M+H]⁺ 343.5, [M+Na]⁺ 365.4, [2M+Na]⁺ 707.4

LC-MS: R_t = 17.3 min, Reinheit > 99 %.

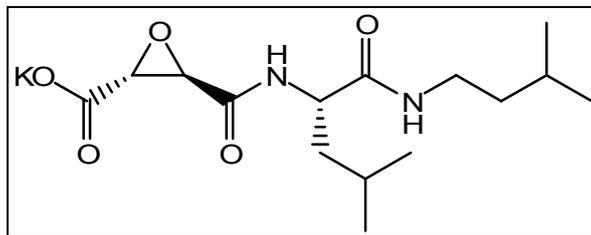
R_f = 0.84 (Cyclohexan: Ethylacetat = 1:1)

[α]_D²⁵ = -50.6 ° (0.18, CHCl₃), Lit.: [α]_D²⁰ = -50.0 ° (1.00, EtOH).^[145]

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3303, 3239 (s, -C-H); 3091 (m, -CONH-); 2958, 2929, 2871 (s, -CH₂-, -CH₃); 1753, 1637 (s, -C=O); 1556 (s, -O-C=O); 1028 (s, -C-O-C-) cm⁻¹.

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[145]

Darstellung von ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(Isopentylcarbamoyl)-leucinyloxiran-2-carboxylat Kalium-Salz) (TP22)



Methode: F4

Ansatz: 75.0 mg (0.22 mmol) **TP21**, 14 mg (0.24 mmol) Kaliumhydroxid, 10 ml Ethanol.

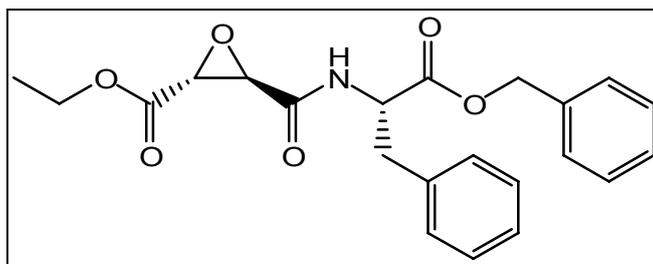
Reaktionsdauer: 12 Stunden

Ausbeute: 27.0 mg (0.08 mmol, 35 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.80-0.86 (m, 12 H, 4 x $-\text{CH}_3$), 1.22-1.28 (m, 2 H, $-\text{CONH-CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH-}$), 1.34-1.56 (m, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CONH-CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH-}$), 2.91 (s, 1 H, $\text{KCO}_2-\text{CH-CH-CONH-}$), 3.02-3.03 (m, 2 H, $-\text{CONH-CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH-}$), 3.19 (s, 1 H, $\text{KCO}_2-\text{CH-CH-CONH-}$), 4.18-4.24 (m, 1 H, $-\text{CH-CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.86 (br. s, 1 H, $-\text{CONH-CH}_2-$), 7.97 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz, $-\text{CONH-CH-}$).

Die erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ -Daten entsprechen den Literaturangaben des Carboxylats.^[137]

Darstellung von (2*R*,3*R*)-Ethyl 3-((*S*)-1-((benzyloxy)carbonyl)-phenylalanyl)oxirane-2-carboxylat (TP23)



Methode: D4

Ansatz: 200.0 mg, (1.01 mmol) (2*R*,3*R*)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 295 mg, (1.01 mmol) L-Phe-OBn Hydrochlorid, 1.30 ml (2.22 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF, 0.28 ml (2.22 mmol) Triethylamin.

Reaktionsdauer: 30 Stunden

Ausbeute: 278 mg (0.70 mmol, 69 %), farbloser Feststoff (Smp.: 86 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 1.21-1.23 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, -CO₂-CH₂-CH₃), 2.94-3.00 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 3.07-3.12 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 3.44 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, -CO₂-CH-CH-CONH-), 3.65 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, -CO₂-CH-CH-CONH-), 4.14-4.19 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.55-4.61 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 5.05-5.13 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 7.18-7.38 (m, 10 H, 2 x -Ph), 8.89 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, -CONH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 13.85 (-CO₂-CH₂-CH₃), 36.28 (-CH-CH₂-Ph), 51.11 (-CO₂-CH-CH-CONH-), 52.59 (-CO₂-CH-CH-CONH-), 53.70 (-CH-CH₂-Ph), 61.54 (-CO₂-CH₂-CH₃), 66.20 (-CO₂-CH₂-Ph), 126.63 (-Ph_{para}), 127.83 (-Ph_{ortho}), 128.06 (-Ph_{para}), 128.26 (-Ph_{ortho}), 128.38 (-Ph_{meta}), 129.04 (-Ph_{meta}), 135.59 (-Ph_{quart}), 136.74 (-Ph_{quart}), 165.20 (-CO₂-CH-CH-CONH-), 166.85 (-CO₂-CH₂-Ph), 170.66 (-CO₂-CH-CH-CONH-).

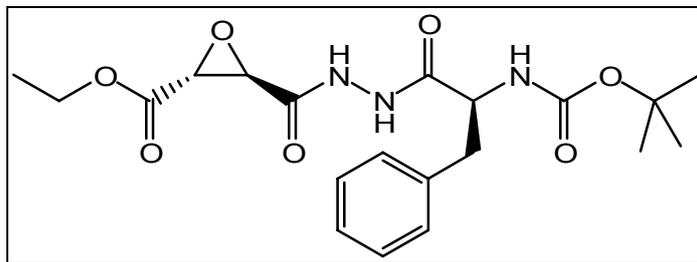
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₃NO₆, 397.4; gef.: [M+H]⁺ 398.4, [M+Na]⁺ 420.3, [2M+Na]⁺ 817.5.

LC-MS: R_t = 20.4 min, Reinheit > 99 %.

[α]_D²⁵ = -41.7 ° (0.23, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3334 (s, -C-H); 3031 (m, -CONH-); 1754, 1728, 1664 (s, -C=O); 1531 (s, -O-C=O); 1188 (s, -C-O-C-); 700 (s, arom. -C-H) cm⁻¹.

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-phenylalanyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP09)



Methode: D4

Ansatz: 213 mg (1.07 mmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 300 mg, (1.07 mmol) BOC-L-Phe-Hydrazid (**TP66**), 7.44 μ l (1.28 mmol) PPA (50 wt% in DMF), DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 30 Stunden

Säulenchromatographie: Cyclohexan: Ethylacetat = 3:1

Ausbeute: 168 mg (399 μ mol, 37 %), farbloser Feststoff (Smp.: 166 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.29-1.33 (t, 3 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.40 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.02-3.18 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.63, 3.75 (2 x s, 2 x 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 4.22-4.30 (m, 2 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.40-4.45 (m, 1 H, $-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}-$), 4.85 (br. s, 1 H, $-\text{NH}-\text{CO}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 7.18-7.35 (m, 5 H, $-\text{Ph}$), 8.19, 8.36 (2 x s, 2 x 1 H, $-\text{NH}-\text{NH}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 14.02 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 28.22 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 35.46 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 53.01 $-\text{CO}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$, 53.06 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 62.46 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 77.20 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 122.87, 128.81, 129.26, 135.87 ($-\text{Ph}$), 163.17 ($-\text{CO}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 166.18, 169.01, 172.11 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$).

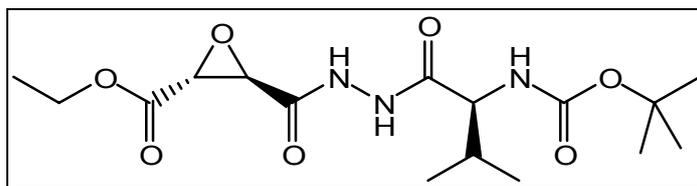
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$, 421.4; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 444.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 865.5.

LC-MS: R_t = 16.4 min, Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 85 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = -29.4 ° (0.18, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3289 (s, -C-H); 3239 (m, -CONH-); 2927, 2852 (m, -CH₃, -CH₂-); 1751, 1732, 1699, 1684 (s, -C=O); 1620 (m, arom. -C=C-); 1531 (s, -O-C=O); 1167 (s, -C-O-C-); 696 (s, arom. -C-H) cm⁻¹.

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-valinyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP10)



Methode: D4

Ansatz: 257 mg (1.07 mmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 300 mg, (1.07 mmol) BOC-L-Val-Hydrazid (**TP67**), 7.44 μ l (1.28 mmol) PPA (50 wt% in DMF), DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 30 Stunden

Säulenchromatographie: Cyclohexan: Ethylacetat = 3:1

Ausbeute: 67.0 mg (0.18 mmol, 17 %), farbloser Feststoff (Smp.: 182 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.87 (m, 6 H, -CH-(H₃)₂), 1.22 (t, 3 H, J = 7.1 Hz -CH₂-H₃), 1.37 (s, 9 H, -C(H₃)₃), 1.89 (m, 1 H, -H-(CH₃)₂), 3.64 (s, 1 H, -CH-H-CO-NH-), 3.67 (s, 1 H, -H-CH-CO-NH-), 3.81 (t, 1 H, J = 8.0 Hz -CO-H-NH-), 4.18 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, -H₂-CH₃), 6.76 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, -CO-CH-H-CO₂-), 10.09 (s, 1 H, -NH-H-CO-CH-), 10.51 (s, 1 H, -H-NH-CO-CH-)

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 13.85 (-CH₂-CH₃), 18.30 (-CH-(CH₃)₂), 19.01 (-CH-(CH₃)₂), 28.15 (-C(CH₃)₃), 30.26 (-CH-(CH₃)₂), 51.14 (-CH-CH-CO-NH-), 51.88 (-CH-CH-CO-NH-), 58.22 (-CO-CH-NH-), 61.57 (-CH₂-CH₃), 77.97 (-C(CH₃)₃), 163.60 (-NH-CO₂-C(CH₃)₃), 166.84, 170.08 (-CO₂-CH₂-CH₃, -CH-CO-NH-CH-).

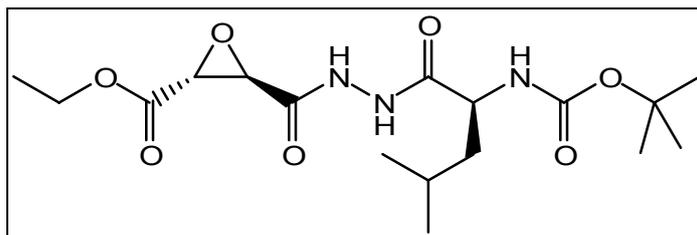
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{16}H_{27}N_3O_7$, 373.4, gef.: $[M+Na]^+$ 396.3, $[2M+Na]^+$ 769.5

LC-MS: $R_t = 11.7$ min, Reinheit (1H -NMR): 86 %.

$[\alpha]_D^{25} = -48.7^\circ$ (0.31, $CHCl_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3289$ (s, -C-H); 3208 (m, -CONH-); 2925 (m, -CH₃, -CH₂-); 1755, 1728, 1662 (s, -C=O); 1533 (s, -O-C=O); 1249 (m, -C-O-C-); 1187 (s, -C-O-C-) cm^{-1} .

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-leucinyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP11)



Methode: D4

Ansatz: 120 mg (489 μ mol) BOC-L-Leu-Hydrazid (**TP68**), 97.0 mg (489 μ mol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 4.00 ml DMF, 314 μ l (583 μ mol) PPA.

Reaktionsdauer: 43 Stunden

Ausbeute: 83.0 mg (214 μ mol, 44 %), farbloser Feststoff (Smp.: 169 °C).

1H -NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): $\delta = 0.85$ (2 x d, 6 H, $J = 9.6, 6.5$ Hz, -CH-(CH_3)₂), 1.22 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz, -CH₂CH₃), 1.36 (s, 9 H, -C(CH_3)₃), 1.43 (m, 1 H, -CH(CH_3)₂), 1.61 (m, 2 H, -CH₂-CH-(CH_3)₂), 3.64 (s, 1 H, -CH-O-CH-CO-NH-), 3.66 (s, 1 H, -CH-O-CH-CO-NH-), 4.02 (m, 1 H, -CO-CH-NH-), 4.17 (q, 2 H, $J = 7.0$ Hz, -CH₂-CH₃), 6.92 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, -CO-CH-NH-), 10.10 (s, 1 H, -NH-NH-CO-CH-), 10.51 (s, 1H, -NH-NH-CO-CH-).

^{13}C -NMR (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.85 (-CH $_2$ -CH $_3$), 22.50, 22.87 (-CH-(CH $_3$) $_2$), 24.07 (-CH-(CH $_3$) $_2$), 28.17 (-CH-(CH $_3$) $_3$), 33.31, 41.51 (-CH $_2$ -CH-(CH $_3$) $_2$), 51.13 (-CO-CH-NH-, -CO $_2$ -CH-), 51.88 (-CHCO-NH-), 61.59 (-CH $_2$ -CH $_3$), 77.94 (-CH-(CH $_3$) $_3$), 155.22 (-NH-CO $_2$ -), 163.54 (-CO $_2$ -CH $_2$ -CH $_3$), 166.86 (-CH-CO-NH-NH-), 171.34 (-NH-NH-CO-CH-).

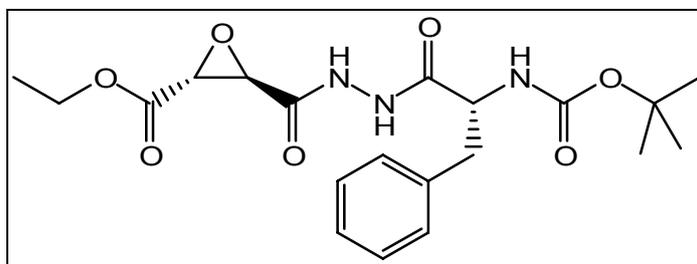
LOOP-ESI-MS: ber. f. C $_{17}$ H $_{29}$ N $_3$ O $_7$, 387.4; gef.: [M+Na] $^+$ 410.3, [2M+Na] $^+$ 797.5.

LC-MS: R $_t$ = 14.2 min, Reinheit: 89 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = -51.0 ° (0.10, CHCl $_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3343 (s, -C-H); 3164 (m, -CONH-); 2927, 2850 (m, -CH $_3$, -CH $_2$ -); 1751, 1718, 1672 (s, -C=O); 1531 (s, -O-C=O); 1226 (m, -C-O-C-); 1187 (s, -C-O-C-) cm $^{-1}$.

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((R)-2-tert-Butoxycarbonyl-phenylalanyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP12)



Methode: D4

Ansatz: 137 mg (489 μmol) BOC-D-Phe-Hydrazid (**TP64**), 97.0 mg (489 μmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 314 μl (0.54 mmol) PPA (50 wt% in DMF), DMF 4.00 ml.

Reaktionsdauer: 40 Stunden

Ausbeute: 75.0 mg (178 μmol , 36 %), farbloser Feststoff (Smp.: 175 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 1.23 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 1.28 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.76 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 2.97 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 3.66 (s, 1 H, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 3.71 (s, 1 H, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CONH}$), 4.19 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CH}_3$), 4.24 (m, 1 H, $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-NH-}$), 7.00 (d, 1 H, J = 8.6 Hz, $-\text{CH}-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\text{-CO}_2^-$), 7.16-7.31 (m, 5 H, $-\underline{\text{Ph}}$), 10.32 (s, 1 H, $-\text{NH}-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\text{-CO-CH-NH-}$), 10.65 (s, 1H, $-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\text{-NH-CO-CH-NH-}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.86 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 28.10 ($-\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 37.39 ($-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 51.14, 51.90, 54.29 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO-NH-}$ -, $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CO-}$), 61.60 ($-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CH}_3$), 78.02 ($-\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 126.22 ($-\underline{\text{Ph}}$), 128.00 ($-\underline{\text{Ph}}$), 129.17 ($-\underline{\text{Ph}}$), 137.91 ($-\underline{\text{Ph}}$), 155.43 ($-\text{NH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2^-$), 163.43 ($-\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2\text{-CH-}$), 166.88 ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\text{-NH-}$), 170.50 ($-\text{NH-NH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}-$).

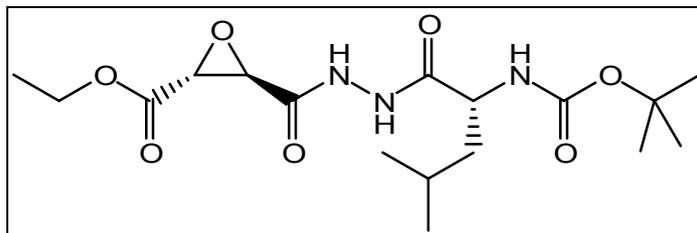
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$, 421.4; gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 444.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 865.6.

LC-MS: R_t = 15.1 min, Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 95 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = -14.0° (0.20, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3293 (s, $-\text{C-H}$); 3235 (m, $-\text{CONH-}$); 2927, 2852 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1743, 1699, 1684 (s, $-\text{C=O}$); 1619 (s, $-\text{N-N-}$); 1523 (s, $-\text{O-C=O}$); 1163 (s, $-\text{C-O-C-}$) cm^{-1} .

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((R)-2-tert-Butoxycarbonyl-leuciny)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP13)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (0.49 mmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP53), 120 mg (0.49 mmol) BOC-D-Leu-Hydrazid (TP65), 314 μl (0.54 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 70.0 mg (181 μ mol, 37 %), farbloser Feststoff (Smp.: 135 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.84, 0.87 (2 x d, 6 H, J = 9.6, 6.5 Hz, $-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 1.22 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.36 (s, 9 H, $-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 1.44 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 1.62 (m, 2 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.64 (s, 1 H, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.66 (s, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 4.02 (m, 1 H, $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}-$), 4.18 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 6.92 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}-\underline{\text{N}}\text{H}-$), 10.10 (s, 1 H, $-\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CO}-\text{CH}-$), 10.53 (s, 1 H, $-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.85 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.50, 22.87 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 24.07 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 28.17 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 33.31, 41.51 ($-\text{CH}_2-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 51.09 ($-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}-$, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-$), 51.88 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-$), 61.59 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 77.94 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_3$), 155.23 ($-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}_2-$), 163.49 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 166.88 ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{NH}-\text{NH}-$), 171.31 ($-\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}-$).

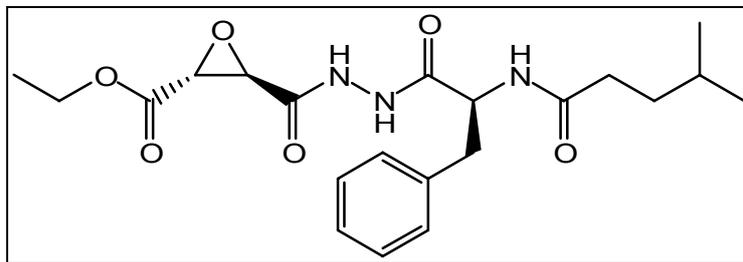
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$, 387.4, gef.: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 410.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 797.5.

LC-MS: R_t = 14.3 min, Reinheit > 99 %

$[\alpha]_D^{25} = -1.3^\circ$ (0.15, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3293 (s, $-\text{C}-\text{H}$); 3220 (m, $-\text{CONH}-$); 2956, 2929 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1759, 1699, 1682 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1616 (s, $-\text{N}-\text{N}-$); 1531 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 1200, 1167 (s, $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) cm^{-1} .

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-phenylalanyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP14)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (489 μ mol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP53), 134 mg (489 μ mol) BOC-L-Phe-Isocaprone (TP60), 314 μ l (583 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 59.0 mg (141 μ mol, 29 %), farbloser Feststoff (Smp.: 185 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.76 (s, 6 H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1.23 (m, 6 H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 2.01 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2.75 (q, 1 H, $J = 13.9, 10.6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.00 (q, 1 H, $J = 13.9, 9.6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.66 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.70 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 4.19 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.60 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 7.16-7.27 (m, 5 H, $-\text{Ph}$), 8.09 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz, $-\text{NH}-\text{CH}-$), 10.31-10.67 (br. s, 2 H, $-\text{NH}-\text{NH}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.88 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 22.32 ($-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 26.88 ($-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 33.12 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 34.10 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 37.74 ($-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 51.18, 51.92, 52.21, ($-\text{CO}_2-\text{CH}-$, $-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$), 61.62 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 126.23 ($-\text{Ph}$), 127.96 (C_6H_5), 129.13 ($-\text{Ph}$), 137.68 ($-\text{Ph}$), 163.56 ($-\text{CH}_2-\text{CO}_2-$), 166.88 ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-$), 170.21 ($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$), 172.22 ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

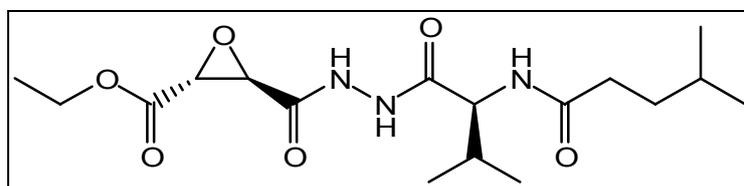
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$, 419.5, gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 420.2, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 442.3, $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 839.5, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 861.6.

LC-MS: $R_t = 15.0$ min, Reinheit > 99 %.

$[\alpha]_D^{25} = -40.0^\circ$ (0.10, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3280$ (s, -C-H); 3201 (m, -CONH-); 2925, 2852 (m, -CH₃, -CH₂-); 1753 (s, -C=O); 1612 (s, -N-N-); 1196, 1165 (s, -C-O-C-); 700 (s, arom. -C-H) cm^{-1} .

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-valinyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP15)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (489 μmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 112 mg (489 μmol) BOC-L-Val-Isocapronsäure (**TP59**), 314 μl (583 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 31.0 mg (83.5 μmol , 17 %), farbloser Feststoff (Smp.: 183 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): $\delta = 0.85$ (d, 6 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₃), 0.88 (d, 6 H, -CH₂-CH-(CH₃)₃), 1.22 (t, 3 H, -CH₂-CH₃), 1.37 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₃), 1.47 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₃), 1.91 (m, 1 H, -CH-(CH₃)₂), 2.14 (s, 2 H, -CO-CH₂-CH₂-), 3.63 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 3.65 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 4.18 (m, 3 H, -CH₂-CH₃, -CO-CH-NH-), 7.90 (d, 1 H, $J = 9.1$ Hz, -CO-CH-NH-), 10.00-10.50 (br. s, 2 H, -NH-NH-CO-CH-).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): $\delta = 13.87$ (-CH₂-CH₃), 18.27 (-CH-CH-(CH₃)₂), 19.04 (-CH-CH-(CH₃)₂), 22.37 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 27.19 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 30.45 (-CH-CH-(CH₃)₂), 33.11 (-CO-CH₂-CH₂-), 34.37 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 51.16 (-CO₂-CH-),

51.98 (-CH-CO-NH-), 56.08 (-CO-CH-NH-), 61.60 (-CH₂-CH₃), 163.68 (-CH₂CO₂-), 166.90 (-CO-NH-NH-), 169.88 (-NH-NH-CO-CH-), 172.39 (-NH-CO-CH₂-CH₂-).

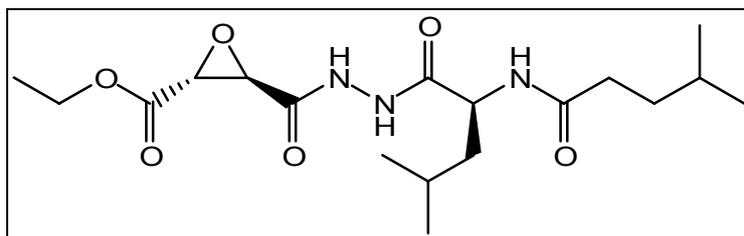
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₇H₂₉N₃O₆, 371.4, gef.: [M+H]⁺ 372.1, [M+Na]⁺ 394.3, [2M+H]⁺ 743.4, [2M+Na]⁺ 765.5.

LC-MS: R_t = 11.6 min, Reinheit > 99 %.

[α]_D²⁵ = -55.0 ° (0.14, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 1751 (s, -C=O); 1610 (s, -N-N-); 1201 (s, -C-O-C-); 897 (s, -C-O-C-) cm⁻¹.

(2R,3R)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-leucinyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP16)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (489 μmol) (2R,3R)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 119 mg (489 μmol) BOC-L-Leu-Isocaprönsäure (**TP61**), 314 μl (583 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 97.0 mg (252 μmol, 52 %), farbloser Feststoff (Smp.: 173 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.83 (d, 6 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 0.87 (d, 6 H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.22 (t, 3 H, -CH₂-CH₃), 1.36 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.45 (m, 3 H, -CH₂-CH-(CH₃)₂, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.62 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 2.11 (s, 2 H, -CO-CH₂-CH₂-), 3.63 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 3.65 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 4.18

(q, 2 H, $J = 7.0$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 4.36 (m, 1 H, $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}-$) 7.97 (d, 1 H, $J = 8.3$ Hz, $-\text{CO}-\text{CH}-\underline{\text{N}}\text{H}-$), 10.13 (s, 1 H, $-\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CO}-\text{CH}-$), 10.46 (s, 1 H, $-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$).

^{13}C -NMR (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): $\delta = 13.86$ ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.50, 22.18, 22.32, 22.91 ($-\text{CH}_2-\text{CH}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 24.10 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_3)_3$), 27.16 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_3)_2$), 33.14 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 34.23 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 40.96 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_3$), 49.19 ($-\text{NH}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}-$), 51.14 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-$), 51.90 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-$), 61.60 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 163.63 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-$), 166.87 ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{NH}$), 171.07 ($-\text{NH}-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}-$), 172.24 ($-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}_2-$).

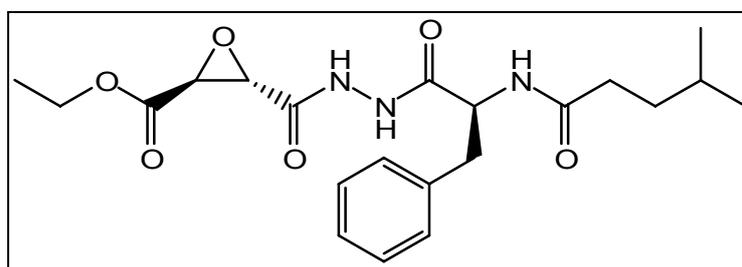
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$, 385.5, gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 386.2, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 408.3, $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 771.4, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 793.5.

LC-MS: $R_t = 14.0$ min, Reinheit > 99 %.

$[\alpha]_D^{25} = -84.2^\circ$ (0.19, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3264$ (s, $-\text{C}-\text{H}$); 3189 (m, $-\text{CONH}-$); 2954, 2927, 2852 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1751, 1689 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1610 (s, $-\text{N}-\text{N}-$); 1200 (s, $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) cm^{-1} .

(2S,3S)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-phenylalanyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP17)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (489 μmol) (2S,3S)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (TP51), 136 mg (489 μmol) $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{L}-\text{Phe}$ -Isocapronsäure (TP60), 628 μl (1.17 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 72.0 mg (172 μ mol, 52 %), farbloser Feststoff (Smp.: 186 °C).

Säulenchromatographie: Cyclohexan : Ethylacetat = 1 : 1 (Rf = 0.11).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 0.75 (d, 6 H, J = 6.3 Hz, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_3$), 1.19-1.24 (m, 6 H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 1.97-2.02 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2.71-2.77 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 2.97-3.02 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.66 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.70 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 4.16-4.21 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.59 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 7.17-7.27 (m, 5 H, $-\text{Ph}$), 8.09 (d, 1 H, J = 8.6 Hz, $-\text{NH}-\text{CH}-$), 10.30, 10.57 (br. s, 2 H, $-\text{NH}-\text{NH}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 13.91 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 22.16, 22.34 ($-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 26.90 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 33.16 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 34.13 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 37.72 ($-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 51.21, 51.95, 52.24, ($-\text{CO}_2-\text{CH}-$, $-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$), 61.68 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 126.28 ($-\text{Ph}$), 128.02 ($-\text{Ph}$), 129.15 ($-\text{Ph}$), 137.70 ($-\text{Ph}$), 163.56 ($-\text{CH}_2-\text{CO}_2-$), 166.91 ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-$), 170.29 ($-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$), 172.32 ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$, 419.5, gef.: $[\text{M}]^+$ 418.9.

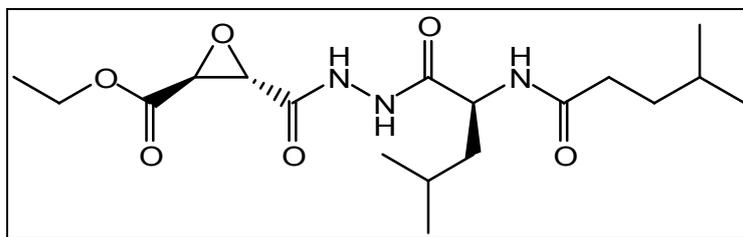
LC-MS: R_t = 9.9 min, Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 95 %.

(Phenomenex 4 μ Proteo 90A RP C-18 (2.0 x 150 mm), flow 0.3 ml/min, 0-1 min. 40 % ACN, 1-5 min. 40-100 % ACN, 5-9 min. 100 % ACN, 9-10 min. 100-40 % ACN, 10-15 min. 40 % ACN).

$[\alpha]_D^{25}$ = -4.00 ° (0.20, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3275 (s, $-\text{C}-\text{H}$); 3174 (m, $-\text{CONH}-$); 2953, 2925, 2852 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1739, 1649 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1620 (s, $-\text{N}-\text{N}-$); 1210 (s, $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) cm^{-1} .

(2S,3S)-Ethyl-3-[N'-((S)-2-tert-Butoxycarbonyl-leucinyl)-hydrazinocarbonyl]-oxiran-2-carboxylat (TP18)



Methode: D4

Ansatz: 97.0 mg (489 μ mol) (2S,3S)-Monoethyl-oxiran-dicarboxylat-Kaliumsalz (**TP53**), 119 mg (489 μ mol) H₂N-NH-L-Leu-Isocaprönsäure (**TP61**), 628 μ l (1.17 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 4 Tage

Ausbeute: 96.0 mg (249 μ mol, 51 %), farbloser Feststoff (Smp.: 173 °C).

Säulenchromatographie: Cyclohexan : Ethylacetat = 1 : 1 (R_f = 0.14).

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 0.82-0.88 (m, 12 H, 4 x -CH₃), 1.22 (t, 3 H, -CH₂-CH₃), 1.34-1.50 (m, 5 H, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂, -CH₂-CH(CH₃)₂, -CH₂-CH(CH₃)₂), 1.58-1.63 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)₂), 2.07-2.12 (s, 2 H, -CO-CH₂-CH₂-), 3.64 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 3.66 (s, 1 H, -CH-CH-CO-NH-), 4.16-4.21 (q, 2 H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₃), 4.33-4.39 (m, 1 H, -CO-CH-NH-) 7.97 (d, 1 H, J = 8.3 Hz, -CO-CH-NH-), 10.14 (s, 1 H, -NH-NH-CO-CH-), 10.48 (s, 1 H, -NH-NH-CO-CH-).

¹³C-NMR (100.61 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 13.86 (-CH₂-CH₃), 21.50, 22.19, 22.31, 22.92 (-CH₂-CH-(CH₃)₃, -CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 24.04 (-CH₂-CH-(CH₃)₃), 27.15 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 33.14 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 34.23 (-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂), 40.92 (-CH₂-CH-(CH₃)₃), 49.18 (-NH-CO-CH-NH-), 51.12 (-CO₂-CH-), 51.89 (-CH-CO-NH-), 61.60 (-CH₂-CH₃), 163.57 (-CO₂-CH-), 166.87 (-CH-CO-NH), 171.07 (-NH-NH-CO-CH-), 172.24 (-NH-CO-CH₂-).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₈H₃₁N₃O₆, 385.5, gef.: [M]⁺ 385.1.

LC-MS: $R_t = 9.3$ min, Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 86 %.

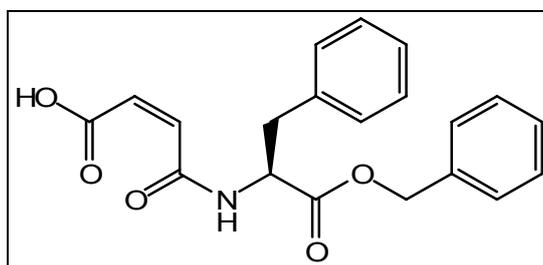
(Phenomenex 4μ Proteo 90A RP C-18 (2.0 x 150 mm), flow 0.3 ml/min, 0-1 min. 40 % ACN, 1-5 min. 40-100 % ACN, 5-9 min. 100 % ACN, 9-10 min. 100-40 % ACN, 10-15 min. 40 % ACN).

$[\alpha]_D^{25} = -22.4^\circ$ (0.25, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3273$ (s, -C-H); 3190 (m, -CONH-); 2959, 2925, 2854 (m, -CH₃, -CH₂-); 1753, (s, -C=O); 1620 (s, -N-N-); 1200 (s, -C-O-C-) cm^{-1} .

12.7 AS-verknüpfte Olefine

Darstellung von (Z)-3-((S)-1-((Benzyloxy)carbonyl)-2-phenylethylcarbamoyl)acrylsäure (TP24)



Methode: D7

Ansatz: 650 mg (2.23 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Phe-OBn}$, 218 mg (2.23 mmol) Maleinsäureanhydrid, 451 mg (0.63 ml, 4.46 mmol) Triethylamin, 7.0 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 16 Stunden

Ausbeute: 712 mg (2.01 mmol, 90 %), farblose Kristalle.

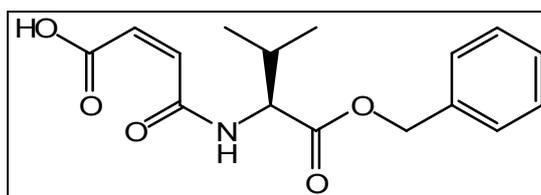
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 3.17$ -3.25 (m, 2 H, -CH-CH₂-Ph), 4.92-4.96 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 5.16-5.24 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.20 (d, 1 H, $J = 12.9$ Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.37 (d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.79 (d, 1 H, -CO-NH-CH-), 6.94-6.96

(m 2 H, -Ph), 7.20-7.24 (m, 4 H, -Ph), 7.31-7.34 (m, 2 H, -Ph), 7.36-7.40 (m, 2 H, -Ph), 15.12 (br. s, 1 H, -CH=CH-CO₂H).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 37.21 (-CH-CH₂-Ph), 54.09 (-CH-CH₂-Ph), 68.09 (-CO₂-CH₂-Ph), 127.61, 128.80, 128.85, 128.96, 129.24 (-Ph), 129.73 (-CH=CH-CO₂H), 134.46, 134.52 (-Ph), 137.71 (-CH=CH-CO₂H), 164.18 (-NH-CO-CH-CH-CO₂H), 165.48 (-CO₂-CH₂-Ph), 170.07 (-CO₂H).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[65]

Darstellung von (Z)-3-((S)-1-((Benzyloxy)carbonyl)-2-methylpropylcarbamoyl)acrylsäure (TP25)



Methode: D7

Ansatz: 1.00 mg (4.10 mmol) HCl·H₂N-Val-OBn, 402 mg (4.10 mmol) Maleinsäureanhydrid, 830 mg (1.15 ml, 8.20 mmol) Triethylamin, 5.0 ml Dichlormethan.

Reaktionsdauer: 26 Stunden

Ausbeute: 1.12 g (3.69 mmol, 90 %), farblose Kristalle (Smp.: 133°C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.90-0.95 (m, 6 H, -CH-(CH₃)₂), 2.24-2.31 (m, 1 H, -CH-CH(CH₃)₂), 4.63-4.65 (m, 1 H, -CH-CH-(CH₃)₂), 5.17-5.25 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.31 (d, 1 H, J = 12.6 Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.41 (d, 1 H, J = 12.7 Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.85 (br. s, 1 H, -CO-NH-CH-), 7.33-7.40 (m 5 H, -Ph), 15.12 (br. s, 1 H, -CH=CH-CO₂H).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 17.74 (-CH₃), 18.79 (-CH₃), 31.51 (-CH-CH(CH₃)₂), 58.08 (-CH-CH-(CH₃)₂), 67.82 (-CO₂-CH₂-Ph), 128.57 (-Ph), 128.74 (-Ph), 130.01 (-CH=CH-CO₂H), 134.68 (-Ph), 137.51 (-CH=CH-CO₂H), 164.28 (-CO-NH-CH-), 165.84 (-CH=CH-CO₂H), 170.54 (-CO₂-CH₂-Ph).

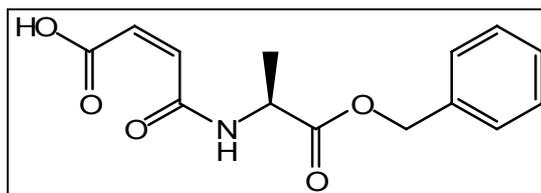
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{16}H_{19}NO_5$, 305.3; gef.: $[M+H]^+$ 306.3, $[M+Na]^+$ 328.3, $[2M+Na]^+$ 633.2.

LC-MS: $R_t = 16.8$ min, Reinheit > 99%.

$[\alpha]_D^{25} = 7.70^\circ$ (0.26, $CHCl_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3266$ (s, -C-H); 2969 (s, -CO₂H); 1737, 1703 (s, -C=O); 1633, 1554 (s, -CONH-); 1271, 1155 (s, -O-C=O); 850 (s, arom. -C-H); 694 (s, -CH=CH-, arom. -C-H) cm^{-1} .

Darstellung von (Z)-3-((S)-1-((Benzyloxy)carbonyl)ethylcarbamoyl)acrylsäure (TP26)



Methode: siehe D7

Ansatz: 1.00 g (4.64 mmol) $HCl \cdot H_2N-Ala-OBn$, 456 mg (4.64 mmol) Maleinsäureanhydrid, 1.30 ml (9.28 mmol) Triethylamin, 5.0 ml Dichlormethan.

Reaktionsdauer: 26 Stunden

Ausbeute: 1.07 mg (3.85 mmol, 83 %), farblose Kristalle (Smp.: 52°C).

1H -NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 300 K): $\delta = 1.52$ (d, 3 H, $J = 7.0$ Hz, -CH-CH₃), 4.63-4.70 (m, 1 H, -CH-CH₃), 5.22 (s, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.25 (d, 1 H, $J = 12.6$ Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.41 (d, 1 H, $J = 12.9$ Hz, -CH=CH-CO₂H), 6.95 (br. s, 1 H, -CO-NH-CH-), 7.33-7.40 (m 5 H, -Ph), 15.08 (br. s, 1 H, -CH=CH-CO₂H).

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 17.90 (-CH-CH₃), 49.22 (-CH-CH₃), 67.97 (-CO₂-CH₂-Ph), 128.32 (-Ph), 128.77 (-Ph), 129.85 (-CH=CH-CO₂H), 134.68 (-Ph), 137.62 (-CH=CH-CO₂H), 164.21 (-CO-NH-CH-), 165.37 (-CH=CH-CO₂H), 171.55 (-CO₂-CH₂-Ph).

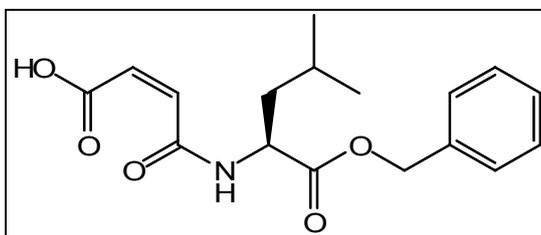
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_5$, 277.3; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278.2, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 300.2, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 577.2.

LC-MS: R_t = 12.9 min, Reinheit > 99%.

$[\alpha]_D^{25}$ = 0.0 ° (0.15, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3319 (s, -C-H); 3278, 3056 (m, -CONH-); 2969 (s, -CO₂H); 1745, 1699 (s, -C=O); 1631, 1579, 1540 (s, -CONH-); 1458 (m, -CH₃, -CH₂-); 1203, 1146 (s, -O-C=O); 852 (s, arom. -C-H); 702 (s, -CH=CH-, arom. -C-H) cm^{-1} .

Darstellung von (Z)-3-((S)-1-((Benzyloxy)carbonyl)-3-methylbutylcarbamoyl)acrylsäure (TP27)



Methode: D7

Ansatz: 1.00 mg (2.54 mmol) TosOH*H₂N-Leu-OBn, 249 mg (2.54 mmol) Maleinsäureanhydrid, 0.56 ml (5.08 mmol) NMM, 5.0 ml Dichlormethan.

Reaktionsdauer: 26 Stunden

Ausbeute: 698 mg (2.18 mmol, 86 %), farblose Kristalle (Smp.: 97°C).

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.92-0.95 (m, 6 H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 1.59-1.76 (m, 3 H, -CH₂-CH-(CH₃)₂), 4.69-4.74 (m, 1 H, -CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 5.20 (s, 2 H, -CO₂-

$\text{CH}_2\text{-Ph}$), 6.27 (d, 1 H, $J = 12.9$ Hz, $-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2\text{H}$), 6.40 (d, 1 H, $J = 12.9$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{H}$), 6.83 (br. s, 1 H, $-\text{CO}-\text{N}\underline{\text{H}}-\text{CH}-$), 7.31-7.40 (m 5 H, $-\underline{\text{P}}\text{h}$), 15.08 (br. s, 1 H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 14.21$ ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_3)_2$), 21.98 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.61 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 41.32 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 51.88 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 67.85 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}$), 128.41 ($-\underline{\text{P}}\text{h}$), 128.75 ($-\underline{\text{P}}\text{h}$), 129.92 ($-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2\text{H}$), 137.56 ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{H}$), 164.29 ($-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{NH}-\text{CH}-$), 165.67 ($-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{H}$), 171.56 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$).

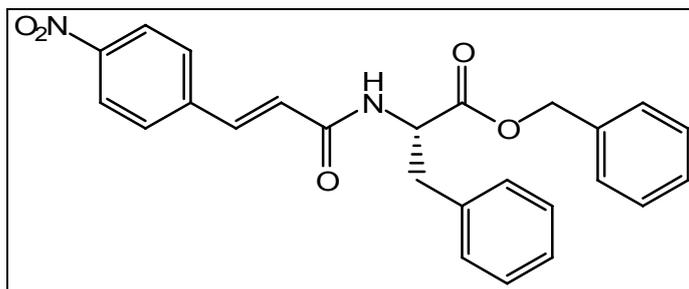
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, 319.4; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320.3, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 342.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 661.1.

LC-MS: $R_t = 18.2$ min, Reinheit > 99%.

$[\alpha]_D^{25} = 0.0^\circ$ (0.17, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3278, 3066$ (m, $-\text{CONH}-$); 3035 (m, $-\text{C}=\text{CH}-$); 2962 (s, $-\text{CO}_2\text{H}$); 2931, 2871 (s, $-\text{CH}_3, -\text{CH}_2-$); 1739, 1720 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1631 (s, $-\text{CONH}-$); 1203 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 850 (s, arom. $-\text{C}-\text{H}$); 694 (s, $-\text{CH}=\text{CH}-$, arom. $-\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

Darstellung von (S)-Benzyl 2-((E)-3-(4-nitrophenyl)acrylamido)-3-phenylpropanoat (TP35)



Methode: D3

Ansatz: 1.00 g (3.43 mmol) HCl·H₂N-Phe-OBn, 695 mg (3.60 mmol) *p*-Nitrozimtsäure, 1.21 g (1.66 ml, 12.0 mmol) Triethylamin, 642 mg (0.40 ml, 5.40 mmol) Thionylchlorid, 20.0 ml Toluol.

Reaktionsdauer: 31 Stunden

Ausbeute: 1.34 g (3.10 mmol, 90 %), hellgelber Feststoff (Smp.: 128°C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 3.20-3.22 (m, 2 H, -CH-CH₂-Ph), 5.05-5.09 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 5.14-5.22 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.14 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, -CO-NH-CH-), 6.49 (d, 1 H, *J* = 15.4 Hz, -CH=CH-CO₂-NH-CH-), 6.99-7.01 (m, 2 H, -Ph), 7.32-7.38 (m, 8 H, -Ph), 7.61-7.64 (m, 2 H, -Ph), 7.66 (d, 1 H, *J* = 17.5 Hz, -CH=CH-CO₂-NH-CH-), 8.21-8.23 (m, 2 H, -Ph).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 37.75 (-CH-CCH₂-Ph), 53.41 (-CH-CH₂-Ph), 67.54 (-CO₂-CCH₂-Ph), 124.08 (-CH=CCH-CONH-), 124.13 (-Ph_{meta}-NO₂), 127.20 (-CH-CH₂-Ph_{para}), 128.47, 128.62, 128.68, 129.35 (Ph_{ortho,meta}), 134.87, 135.43, 139.19 (Ph_{quart}), 140.81 (-CCH=CH-CONH-), 148.21 (-C-NO₂), 164.14 (-CH=CH-CCONH-), 171.22 (-CO₂-CH₂-Ph).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₅H₂₂N₂O₅, 430.2; gef.: [M+H]⁺ 431.4, [M+Na]⁺ 453.4, [2M+Na]⁺ 883.0.

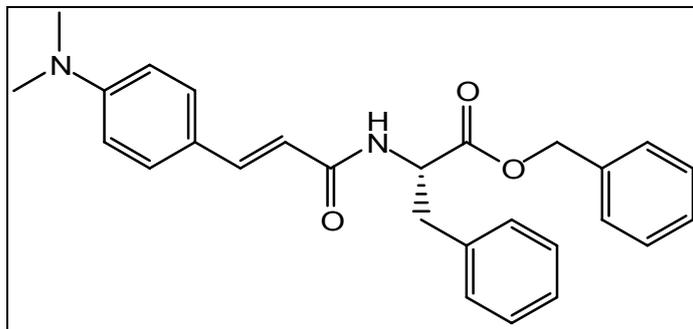
LC-MS: R_t = 22.2 min, Reinheit > 99%.

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ = 308 (max), 228 nm.

[α]_D²⁵ = 59.3 ° (0.14, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3286, 3197 (m, -CONH-); 3029 (m, -C=CH-); 1726 (s, -C=O); 1620 (s, -C=C-); 1518 (s, -CONH-); 1342 (s, -C-NO₂); 1196 (s, -O-C=O); 696 (s, -CH=CH-, arom. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-Benzyl 2-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-phenylpropanoat (TP38)



Methode: D4

Ansatz: 500 mg (1.71 mmol) Phenylalaninbenzylester Hydrochlorid, 328 mg (1.71 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 1.09 g (1.71 mmol, 1.00 ml) PPA, 3.47 mg (3.43 mmol, 0.48 ml) Triethylamin, 20 ml DMF.

Reaktionsdauer: 34 Stunden

Ausbeute: 413 mg (0.96 mmol, 56 %), gelber Feststoff (Smp.: 116 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 3.05 (s, 6 H, 2 x $-\text{CH}_3$), 3.18-3.20 (m, 2 H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.05-5.09 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.12-5.20 (m, 2 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.99 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, NH), 6.25 (d, 1 H, $J = 15.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-$), 6.99-7.02 (m, 3 H, $-\text{Ph}$), 7.20-7.22 (m, 3 H, $-\text{Ph}$), 7.30-7.32 (m, 2 H, $-\text{Ph}$), 7.34-7.38 (m, 4 H, $-\text{Ph}$), 7.45-7.47 (m, 2 H, $-\text{Ph}$), 7.57 (d, 1 H, $J = 15.6$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 37.95 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 41.70 (2 x $-\text{CH}_3$), 53.27 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 67.28 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 116.40 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-$), 127.01 ($-\text{Ph}$), 128.52 ($-\text{Ph}$), 128.62 ($-\text{Ph}$), 129.43 ($-\text{Ph}$), 129.48 ($-\text{Ph}$), 135.07 ($-\text{Ph}$), 135.78 ($-\text{Ph}$), 138.72 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-$), 165.79 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-$), 171.55 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$, 428.2; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 429.1.

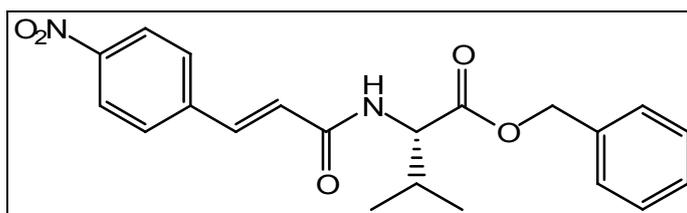
LC-MS: $R_t = 10.7$ min, Reinheit 99 %.

(Phenomenex 4 μ Proteo 90A RP C-18 (2.0 x 150 mm), flow 0.3 ml/min, 0-1 min. 40 % ACN, 1-5 min. 40-100 % ACN, 5-9 min. 100 % ACN, 9-10 min. 100-40 % ACN, 10-15 min. 40 % ACN).

$[\alpha]_D^{25} = 111.8^\circ$ (0.40, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3350$ (m, -N-C-); 3062 (m, -CONH-); 3032 (m, -C=CH-); 2910 (s, -CH₃, -CH₂-); 1736 (s, -C=O); 1651, 1603 (s, -CONH-); 1157 (s, -O-C=O); 694 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-Benzyl 2-((E)-3-(4-nitrophenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (TP36)



Methode: D3

Ansatz: 1.00 g (4.10 mmol) Valinbenzylester Hydrochlorid, 832 mg (4.31 mmol) 4-Nitrozimtsäure, 769 mg (0.47 ml, 6.46 mmol) Thionylchlorid, 1.45 g (14.4 mmol, 2.00 ml) Triethylamin, 50.0 ml Toluol.

Reaktionsdauer: 34 Stunden

Säulenchromatographie: Chloroform:Methanol = 99:1 ($R_f = 0.23$).

Ausbeute: 870 mg (2.28 mmol, 55 %), gelber Feststoff (Smp.: 197 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): $\delta = 0.91$ (d, 3 H, $J = 6.9$ Hz, -CH₃), 0.96 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, -CH₃), 2.21-2.30 (m, 1 H, -CH(CH₃)₂), 4.76-4.79 (m, 1 H, -CH-CH-(CH₃)₂), 5.16-5.23 (m, 2 H, -CH₂-Ph), 6.27 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz, NH), 6.59 (d, 1 H, $J = 15.6$ Hz,

-CH=C \underline{H} -CONH-), 7.32-7.39 (m, 5 H, -CH₂- \underline{Ph}), 7.63 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz, - \underline{Ph}_{ortho} -NO₂), 7.66 (d, 1 H, $J = 15.7$ Hz, -C \underline{H} =CH-CONH-), 8.22 (d, 2 H, $J = 8.6$ Hz, - \underline{Ph}_{meta} -NO₂).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): $\delta = 17.70$ (-CH-CH-(\underline{C} H₃)₂), 18.98 (-CH-CH-(\underline{C} H₃)₂), 31.61 (-CH- \underline{C} H-(CH₃)₂), 57.30 (- \underline{C} H-CH-(CH₃)₂), 67.30 (-CO₂- \underline{C} H₂-Ph), 124.14 (-CH= \underline{C} H-CONH-), 124.38 (- \underline{Ph}_{meta} -NO₂), 128.41, 128.65, ($\underline{Ph}_{ortho,meta,para}$), 135.13, 139.09 (\underline{Ph}_{quart}), 140.92 (- \underline{C} H=CH-CONH-), 148.25 (- \underline{C} -NO₂), 164.58 (-CH=CH- \underline{C} ONH-), 171.87 (- \underline{C} O₂-CH₂-Ph).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₁H₂₂N₂O₅, 382.2; gef.: [M+H]⁺ 383.4, [M+Na]⁺ 405.3, [2M+Na]⁺ 786.9.

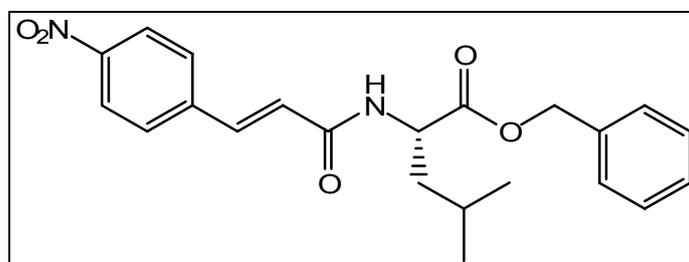
LC-MS: R_t = 21.1 min, Reinheit 87%.

UV-Vis (CH₂Cl₂): $\lambda = 309$ (max), 228 nm.

$[\alpha]_D^{25} = 35.8^\circ$ (0.53, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3307$ (m, -CONH-); 3035 (m, -C=CH-); 2935 (s, -CH₃, -CH₂-); 1736 (s, -C=O); 1654, 1620, 1520 (s, -CONH-); 1342 (s, -C-NO₂); 1182 (s, -O-C=O); 698 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-Benzyl 2-((E)-3-(4-nitrophenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat (TP37)



Methode: D3

Ansatz: 515 mg (2.67 mmol) 4-Nitrozimtsäure, 1.00 g (2.54 mmol) Tos*H₂N-Leu-OBn, 0.29 ml Thionylchlorid (4.00 mmol), 0.98 ml (8.89 mmol) *N*-Methylmorpholin, 30 ml Toluol.

Reaktionsdauer: 24 Stunden

Ausbeute: 592 mg (1.49 mmol, 59 %), orange, hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.92-0.96 (m, 6 H, 2 x -CH₃), 1.57-1.76 (m, 3 H, -CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 4.81-4.87 (m, 1 H, -,CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 5.19 (s, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.14 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, -CONH-), 6.55 (d, 1 H, *J* = 15.4 Hz, -CH=CH-CO-), 7.33-7.39 (m, 5 H, -CO₂-CH₂-Ph), 7.61-7.64 (m, 3 H, O₂N-Ph_{ortho}-, -CH=CH-CO-), 8.21-8.23 (m, 2 H, O₂N-Ph_{meta}-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 21.93 (-CH₃), 22.78 (-CH₃), 24.92 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 41.70 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 51.13 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 67.29 (-CO₂-CH₂-Ph), 124.09 (-Ph_{ortho}-NO₂), 124.26 (-CH=CH-CONH-), 128.22, 128.39, 128.49, 128.62 (Ph_{ortho}, Ph_{meta}, Ph_{para}), 135.16 (Ph_{quart}), 139.00 (-CH=CH-CONH-), 140.90 (Ph_{quart}), 148.19 (-CNO₂), 164.47 (-CONH-), 173.03 (-CCO₂-CH₂-Ph).

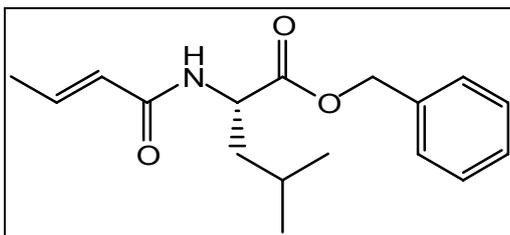
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₄N₂O₅, 396.4; gef.: [M+H]⁺ 397.4, [M+Na]⁺ 419.4, [2M+Na]⁺ 815.0.

LC-MS: R_t = 22.6 min, Reinheit 61 %.

[α]_D²⁵ = 17.8 ° (0.50, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3273 (m, -CONH-); 3066 (m, -C=CH-); 2958, 2870 (s, -CH₃, -CH₂-); 1737 (s, -C=O); 1658, 1624, 1518 (s, -CONH-); 1340 (s, -C-NO₂); 696 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-2-((E)-But-2-enoylamino)-leucin benzylester (TP28)



Methode: D2

Ansatz: 481 mg (5.59 mmol) Crotonsäure, 1.00 g (2.54 mmol) Tos*H₂N-Leu-OBn, 550 mg (2.67 mmol) DCC, 0.71 ml (5.08 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 393 mg (1.11 mmol; 51%), farbloser, öliges Feststoff.

Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC. (Methode siehe LC-MS).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.91 (m, 6 H, 2 x -CH-(CH₃)₂), 1.30 (m, 1 H, -CH₂-CH(CH₃)₂), 1.65 (m, 2 H, -CH₂-CH(CH₃)₂), 1.84-1.85 (m, 3 H, -CH=CH-CH₃), 4.75 (m, 1 H, -CH-CH₂-CH(CH₃)₂), 5.12 (m, 2 H, -CH₂-Ph), 5.84 (m, 2 H, -CH=CH-CO-NH-), 6.84-6.86 (m, 1 H, -CH=CH-CO-NH-), 7.34 (m, 5 H, -Ph).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 17.74 (-CH=CH-CH₃), 22.00 (-CH-CH₂-CH(CH₃)₂), 22.78 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 24.87 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 41.86 (-CH-CH₂-CH(CH₃)₂), 50.74 (-CH-CH₂-CH(CH₃)₂), 67.09 (-CO₂-CH₂-Ph), 124.52 (-CO₂-CH₂-Ph), 128.20 (-CO₂-CH₂-Ph), 128.58 (-CO₂-CH₂-Ph), 135.33 (-CH=CH-CH₃), 140.91 (-CO₂-CH₂-Ph), 143.11 (-CH=CH-CH₃), 165.57 (-CO-NH-), 173.06 (-CO₂-CH₂-Ph).

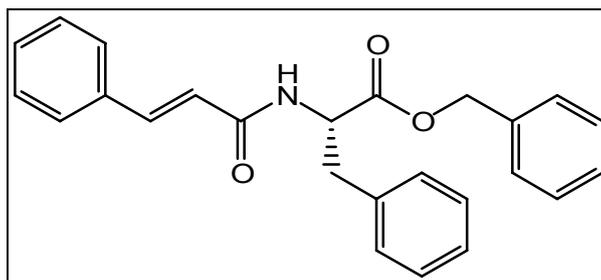
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₇H₂₃NO₃, 289.2; gef.: [M+H]⁺ 290.1, [M+Na]⁺ 312.2, [2M+H]⁺ 578.8, [2M+Na]⁺ 601.1.

LC-MS: R_t = 19.5 min, Reinheit (¹H-NMR): 83 %.

[α]_D²⁵ = -3.2 ° (0.69, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3255 (m, -CONH-); 3062 (m, -C=CH-); 2924, 2852 (s, -CH₃, -CH₂-); 1703 (s, -C=O); 1660 (s, -CONH-); 1446 (m, -CH₃, -CH₂-); 1230 (s, -O-C=O); 692 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-2-[(E)-(3-Phenyl-acryloyl)amino]-phenylalanin benzylester (TP32)



Methode: D2

Ansatz: 1.12 g (7.54 mmol) Zimtsäure, 1.01 g (3.44 mmol) HCl*H₂N-Phe-OBn, 746 mg (3.62 mmol), DCC, 691 mg (6.83 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 665 g (1.73 mmol; 50%), farbloser Feststoff (Smp.: 146 °C).

Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC. (Methode siehe LC-MS).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 3.19-3.21 (m, 2 H, -CH-CH₂-), 4.70 (d, 1 H, J = 5.6 Hz, -CH-CH₂-), 5.05-5.08 (m, 1 H, -CO₂-CH₂-Ph), 5.13-5.21 (m, 1 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.02 (br. s, 1 H, -NH-), 6.37 (d, 1 H, J = 15.6 Hz, Ph-CH=CH-), 6.75 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, Ph-CH=CH-), 6.99-7.02 (m, 3 H, -Ph), 7.20-7.22 (m, 3 H, -Ph), 7.30-7.38 (m, 4 H, -Ph), 7.48-7.51 (m, 3 H, -Ph), 7.60-7.70 (m, 2 H, -Ph).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 37.86 (-CH-CH₂-Ph), 53.31 (-CH-CH₂-Ph), 67.40 (-CO₂-CH₂-Ph), 127.10, 127.91, 128.57, 128.60, 128.65, 128.83, 129.41, 129.89, 134.59, 135.38 (-Ph), 135.62 (Ph-CH=CH-CO-NH-), 141.94, 143.54 (-Ph), 144.96 (Ph-CH=CH-CO-NH-), 160.86, 171.40 (-CO-).

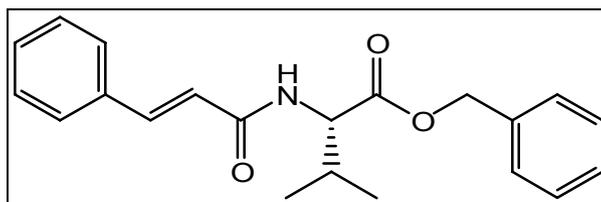
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{25}H_{23}NO_3$, 385.2; gef.: $[M+H]^+$ 386.4, $[M+Na]^+$ 408.3, $[2M+H]^+$ 770.9, $[2M+Na]^+$ 793.2.

LC-MS: $R_t = 22.3$ min, Reinheit (1H -NMR): 90 %.

$[\alpha]_D^{25} = 30.5^\circ$ (0.19, $CHCl_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3253$ (m, -CONH-); 3058, 3027 (m, -C=CH-); 2927, 2852 (s, -CH₃, -CH₂-); 1732, 1705 (s, -C=O); 1646 (s, -CONH-); 1616 (m, -C=C-); 1450 (m, -CH₃, -CH₂-); 1228 (s, -O-C=O); 762, 694, 684 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm^{-1} .

Darstellung von (S)-2-[(E)-(3-Phenyl-acryloyl)amino]-valin benzylester (TP33)



Methode: D2

Ansatz: 1.34 g (9.02 mmol) Zimtsäure, 1.01 g (4.12 mmol) $HCl \cdot H_2N-Val-OBn$, 892 mg (4.32 mmol) DCC, 828 mg (8.18 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 665 mg (1.73 mmol; 50%), farbloser Feststoff (Smp.: 150 °C).

Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC. (Methode siehe LC-MS).

1H -NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 300 K): $\delta = 0.91$ (d, 3 H, $J = 6.9$ Hz, -CH-(CH₃)₂), 0.96 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, -CH-(CH₃)₂), 2.19-2.28 (m, 1 H, -CH-(CH₃)₂), 4.76-4.79 (m, 1 H, -CH-CH-(CH₃)₂), 5.15-5.23 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.08 (d, 1 H, $J = 8.9$ Hz, -NH-), 6.45 (d, 1 H, $J = 15.6$ Hz, Ph-CH=CH-), 7.33-7.38 (m, 8 H, -Ph), 7.48-7.52 (m, 2 H, -Ph), 7.64 (d, 1 H, $J = 15.6$ Hz, Ph-CH=CH-).

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 17.74$ ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 18.94 ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 31.67 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 57.19 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}-\text{CH}_3$), 67.20 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}$), 120.05 ($\text{Ph}-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-$), 127.89 , 128.41 , 128.51 , 128.63 , 128.83 , 127.83 , 134.63 ($-\underline{\text{P}}\text{h}$), 141.98 ($\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-$), 171.99 ($\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{NH}-$), 178.58 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$).

Die ^1H -NMR und ^{13}C -spektroskopischen Daten entsprechen der Literatur.^[174]

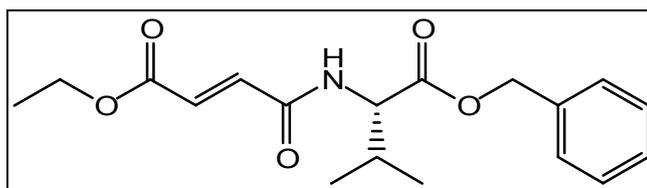
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_3$, 337.2; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.3, $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 375.0, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 697.1.

LC-MS: $R_t = 21.6$ min, Reinheit > 99 %.

$[\alpha]_D^{25} = 21.2^\circ$ (0.33, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3253$ (m, $-\text{CONH}-$); 3059 (m, $-\text{C}=\text{CH}-$); 2927 , 2852 (s, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1727 , 1703 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1645 (s, $-\text{CONH}-$); 1622 (m, $-\text{C}=\text{C}-$); 1541 (s, $-\text{CONH}-$); 1450 , 1379 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1217 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 761 , 694 (s, $-\text{CH}=\text{CH}-$, arom. $-\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

Darstellung von (S)-2-((E)-3-Ethoxycarbonyl-acryloylamino)-valin benzylester (TP29)



Methode: D2

Ansatz: 1.30 g (9.03 mmol) Fumarsäuremonoethylester, 1.00 g (4.10 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Val-OBn}$, 903 mg (4.38 mmol) DCC, 828 mg (8.18 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 460 mg (1.38 mmol; 37%), gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 0.88 (d, 3 H, J = 6.8 Hz, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 0.92 (d, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1.29-1.32 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 2.19-2.25 (m, 1 H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 4.22-4.27 (q, 2 H, J = 7.2 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.69-4.72 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 5.12-5.22 (m, 2 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 6.28 (d, 1 H, J = 8.6 Hz, $-\text{NH}-$), 6.79-6.83 (m, 2 H, J = 15.5 Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 6.93-6.97 (m, 2 H, J = 15.4 Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 7.32-7.38 (m, 5 H, $-\text{Ph}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 14.06 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 17.63 ($-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 18.86 ($-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 31.45 ($-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 57.32 ($-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 61.17 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 67.21 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 128.32, 128.46, 128.55 ($-\text{Ph}$), 130.89 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 135.08 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 135.86 ($-\text{Ph}$), 163.52, 165.49, 171.53 ($-\text{CO}-$).

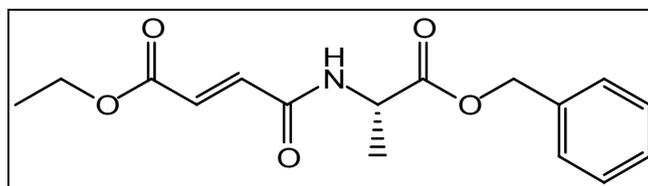
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, 333.2; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.3, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 356.3, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 689.3.

LC-MS: R_t = 19.7 min, Reinheit 94 %.

$[\alpha]_D^{25} = 5.4^\circ$ (0.74, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3311 (m, $-\text{CONH}-$); 3035 (m, $-\text{C}=\text{CH}-$); 2964, 2935 (s, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1724, 1668 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1531 (s, $-\text{CONH}-$); 1450, 1379 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1259 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 696 (s, $-\text{CH}=\text{CH}-$, arom. $-\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

Darstellung von (S)-2-((E)-3-Ethoxycarbonyl-acryloylamino)-alanin benzylester (TP30)



Methode: D2

Ansatz: 1.47 g (10.2 mmol) Fumarsäuremonoethylester, 1.00 g (4.64 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Ala-OBn}$, 1.00 g (4.86 mmol) DCC, 936 mg (9.25 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 1.26 g (4.13 mmol; 85%), gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.28-1.32 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.46 (d, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4.21-4.26 (q, 2 H, J = 7.2 Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 4.68-4.75 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 5.16-5.22 (m, 2 H, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}$), 6.46 (d, 1 H, J = 7.1 Hz, $-\text{NH}-$), 6.81 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 6.92 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, $-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-$), 7.29-7.38 (m, 5 H, $-\text{Ph}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 14.01 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 18.12 ($-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 48.38 ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 61.13 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 67.24 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}$), 128.05, 128.40, 128.55 ($-\text{Ph}$), 130.77 ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$), 135.10 ($-\text{Ph}$), 135.75 ($-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-$), 163.08, 165.44, 172.43 ($-\text{CO}-$).

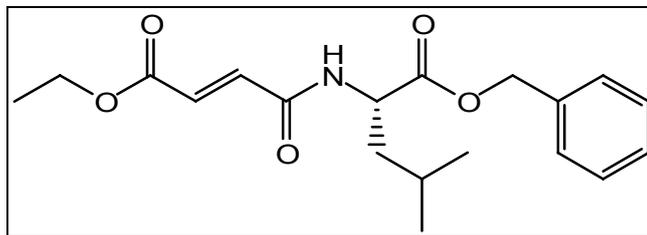
LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_5$, 305.1; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.2, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 328.3, $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 610.6, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 633.1.

LC-MS: R_t = 16.8 min, Reinheit 96 %.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 2.3^\circ$ (1.24, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3311 (m, $-\text{CONH}-$); 3066 (m, $-\text{C}=\text{CH}-$); 2983, 2937 (s, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1722, 1672 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1535 (s, $-\text{CONH}-$); 1454, 1367 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$); 1159 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 696 (s, $-\text{CH}=\text{CH}-$, aromat. $-\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

Darstellung von (S)-2-((E)-3-Ethoxycarbonyl-acryloylamino)-leucin benzylester (TP31)



Methode: D2

Ansatz: 809 mg (5.61 mmol) Fumarsäuremonoethylester, 1.00 g (2.54 mmol) Tos*H₂N-Leu-OBn, 559 mg (2.71 mmol) DCC, 511 mg (5.05 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 812 mg (2.34 mmol; 92%), gelbes Öl.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.90-0.93 (m, 6 H, -CH(CH₃)₂), 1.28-1.32 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₃), 1.56-1.73 (m, 3 H, -CH₂-CH-, -CH₂-CH-), 4.21-4.26 (q, 2 H, J = 7.2 Hz, -CH₂-CH₃), 4.74-4.80 (m, 1 H, -CH-CH₂-CH(CH₃)₂), 5.17 (s, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.28 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, -NH-), 6.81 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, -CH=CH-CO-NH-), 6.93 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, -CH=H-CO-NH-), 7.31-7.39 (m, 5 H, -Ph).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 14.05 (-CH₂-CH₃), 21.85 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 22.68 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 24.82 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 41.43 (-CH₂-CH-(CH₃)₂), 51.11 (-CH-CH₂-CH-(CH₃)₂), 61.17 (-CH₂-CH₃), 67.20 (-CO₂-CH₂-Ph), 128.16, 128.39, 128.55 (-Ph), 130.83 (-CH=CH-CO-NH-), 135.14 (-Ph), 135.82 (-CH=CH-CO-NH-), 163.34, 165.53, 172.53 (-CO-).

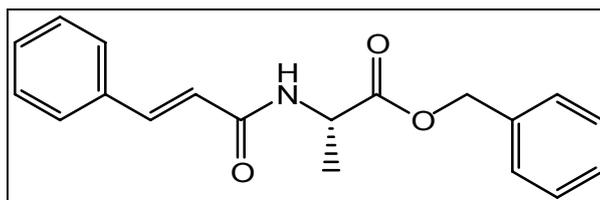
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₂₅NO₅, 347.2; gef.: [M+H]⁺ 348.2, [M+Na]⁺ 370.3, [2M+Na]⁺ 717.2.

LC-MS: R_t = 21.9 min, Reinheit (¹H-NMR): 89 %.

[α]_D²⁵ = -1.7° (0.46, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3300 (m, -CONH-); 3066 (m, -C=CH-); 2956, 2871 (s, -CH₃, -CH₂-); 1724, 1668 (s, -C=O); 1537 (s, -CONH-); 1454, 1367 (m, -CH₃, -CH₂-); 1159 (s, -O-C=O); 696 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (S)-2-[(E)-(3-Phenyl-acryloyl)amino]-alanin benzylester (TP34)



Methode: D2

Ansatz: 1.52 g (10.2 mmol) Zimtsäure, 1.00 g (4.64 mmol) HCl·H₂N-Ala-OBn, 1.01 g (4.81 mmol) DCC, 936 mg (9.25 mmol) Triethylamin, 10 ml Ethylacetat.

Reaktionsdauer: 5 Stunden

Ausbeute: 180 mg (581 μmol; 13%), farbloser Feststoff (Smp.: 104 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 1.48 (d, 3 H, J = 7.1 Hz, -CH₃), 4.75-4.82 (m, 1 H, -CH-CH₃), 5.17-5.24 (m, 2 H, -CO₂-CH₂-Ph), 6.19 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, -NH-), 6.42 (d, 1 H, J = 15.7 Hz, Ph-CH=CH-), 7.33-7.39 (m, 8 H, -Ph), 7.48-7.50 (m, 2 H, -Ph), 7.63 (d, 1 H, J = 15.7 Hz, Ph-CH=CH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 18.62 (-CH-CH₃), 48.31 (-CH-CH₃), 67.23 (-CO₂-CH₂-Ph), 120.07 (-Ph-CH=CH-CO-NH-), 127.83, 128.12, 128.45, 128.62, 128.79, 129.77, 134.66, 135.27 (-Ph), 141.64 (-Ph-CH=CH-CO-NH-), 165.24, 173.02 (-CO-).

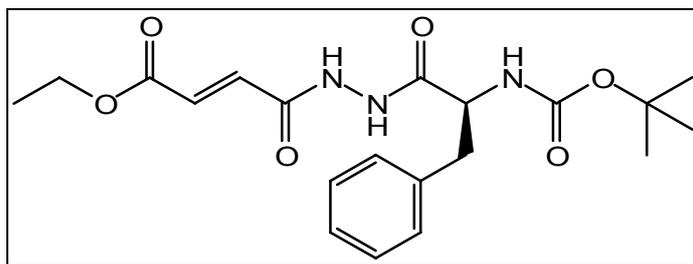
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₆H₁₉NO₃, 309.1; gef.: [M+H]⁺ 310.1, [M+Na]⁺ 332.2, [2M+Na]⁺ 641.2.

LC-MS: R_t = 19.7 min, Reinheit 90 %.

$[\alpha]_D^{25}$ = 19.2 ° (0.12, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3309 (m, -CONH-); 3062 (m, -C=CH-); 2927, 2852 (s, -CH₃, -CH₂-); 1743, (s, -C=O); 1655 (v, -C=C-), 1523 (s, -CONH-); 1452 (m, -CH₃, -CH₂-); 1188, 1151 (s, -O-C=O); 970 (s, -CH=CH-), 694 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (*E*)-4-[*N*-((*S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-phenylalanyl)-hydrazino]-4-oxo-but-2-ensäureethylester (TP40)



Methode: D4

Ansatz: 139 mg (964 μ mol) Monoethylfumarat, 270 mg (964 μ mol) BOC-L-Phe-NH-NH₂ (**TP66**), 338 mg (1.06 mmol) PPA (50 wt% in DMF), 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 24 Stunden

Säulenchromatographie: Cyclohexan : Ethylacetat = 1 : 1 (R_f = 0.41).

Ausbeute: 51 mg (126 μ mol, 13 %), farbloser Feststoff (Smp.: 162 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 1.30 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₃), 1.36 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 3.01-3.18 (m, 2 H, -CH₂-Ph), 4.23-4.28 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₃), 4.65 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 5.24 (br. s, 1 H, -CO-NH-C(CH₃)₃), 6.92 (d, 1 H, J = 15.4 Hz, -CH=CH-CO-NH-), 7.08-7.30 (m, 6 H, -Ph, -CH=CH-CO-NH-), 9.71, 9.87 (br. s, 2 H, -NH-NH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 14.13 (-CH₂-CH₃), 28.25 (-C(CH₃)₃), 29.69 (-CH₂-Ph), 61.33 (-CH-CH₂-Ph), 68.91 (-CH₂-CH₃), 77.71 (-C(CH₃)₃), 127.31, 128.66,

129.28 (**-Ph**), 131.81, 132.58 (**-CH=CH-**), 140.58, 152.39, 157.46, 161.90, (**-Ph**), 164.05, 167.37, 171.05 (**-CO-**).

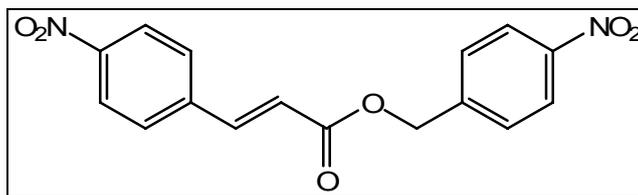
LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{20}H_{27}N_3O_6$, 405.2; gef.: $[M+H]^+$ 406.0.

LC-MS: $R_t = 16.1$ min, Reinheit (1H -NMR): 70 %.

$[\alpha]_D^{25} = -13.5^\circ$ (0.17, $CHCl_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3349, 3309, 3243$ (m, -CONH-); 2925, 2852 (m, -C=CH-); 2983, 2937 (s, -CH₃, -CH₂-); 1714, 1691, 1678 (s, -C=O); 1604, 1577 (s, -N-N-); 1463 (m, -CH₃, -CH₂-); 1163 (s, -O-C=O) cm^{-1} .

Darstellung von (*E*)-4-Nitrobenzyl 3-(4-nitrophenyl)acrylat (TP39)



Methode:

Es wurden 1.0 eq. 4-Nitrozimtsäure und 1.7 eq. 4-Nitrobenzylbromid in Ethanol gelöst und mit Kaliumhydroxid-Lösung (3 M) versetzt. Das Reaktionsvolumen wurde durch Erhitzen halbiert, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, in kaltem Ethanol gewaschen und aus Methanol umkristallisiert.

Ansatz: 1.89 mg (8.62 mmol) 4-Nitrobenzylbromid, 1.00 mg (5.18 mmol) 4-Nitrozimtsäure, 0.62 g (11.3 mmol in 3.80 ml Wasser) KOH, 180 ml Ethanol, 60 ml Methanol.

Reaktionsdauer: 2 Stunden

Ausbeute: 700 mg (2.13 mmol, 41 %), farbloser Feststoff (Smp.: 183 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 5.41 (s, 2 H, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 6.62 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz, $-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2-$), 7.57 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 7.68 (d, 2 H, $J = 8.9$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 7.77 (d, 1 H, $J = 15.9$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{CO}_2-$), 8.24-8.26 (dd, 4 H, $J = 8.9$ Hz, 8.8 Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 65.24 ($-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 121.39 ($-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}_2-$), 123.89, 124.23 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$), 128.52, 128.77 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 140.10 ($-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{quart}}-\text{NO}_2$), 142.85, 142.98 ($-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{para}}-\text{NO}_2$, $-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{para}}-\text{NO}_2$), 148.74 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{P}}\text{h}_{\text{quart}}-\text{NO}_2$), 165.47 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2-\text{CH}_2-$).

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$, 328.1; LC-MS liefert kein Ergebnis bei verschiedenen Lösungsmitteln.

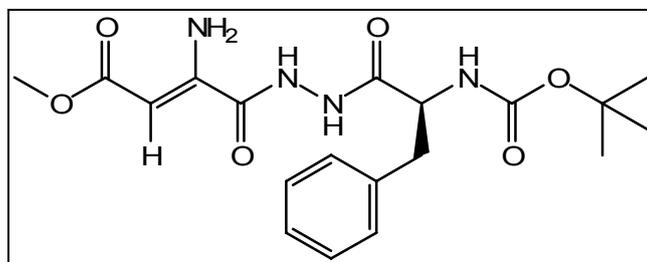
LC-MS: $R_t = 21.6$ min, Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): > 99 %.

UV-Vis (CH_2Cl_2): $\lambda = 300$ (max), 222 nm.

$[\alpha]_D^{25} = -101.6^\circ$ (0.31, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2160$ (m, $-\text{HC}=\text{CH}-$); 1699 (s, $-\text{C}=\text{O}$); 1608 (s, $-\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); 1533 (s, $-\text{C}-\text{N}=\text{O}$); 1346 (s, $-\text{C}-\text{NO}_2$); 1176 (s, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$); 848 (w, arom. $-\text{C}-\text{H}$) cm^{-1} .

Darstellung von (Z)-Methyl-3-amino-carbamoylacrylat(S)-phenylalanoylbutoxy-carbonylhydrazid (TP41):



Methode: D6

Ansatz: 200.0 mg (1.32 mmol) (Z)-3-(Methoxycarbonyl)-2-aminoacrylsäure-Lithiumsalz (**TP55**), 388 mg (1.39 mmol) H₂N-NH-Phe-NH-BOC (**TP66**), 0.31 ml (1.43 mmol) DPPA, 0.37 ml (2.65 mmol) Triethylamin, 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 26 Tage

Ausbeute: 370 mg (0.91 mmol, 69 %), gelblicher Feststoff (Smp.: 135 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 1.35 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 2.95-3.01 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 3.12-3.17 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 3.68 (s, 3 H, -CO₂-CH₃), 4.61 (m, 1 H, -CH-CH₂-Ph), 5.16 (s, 1 H, -C=CH-CO₂-CH₃), 5.31 (br. d., 1 H, J = 6.3 Hz, -NH-CO₂-C(CH₃)₃), 6.70 (br. s., 2 H, -NH₂), 7.16-7.24 (m, 5 H, -CH-CH₂-Ph), 9.33 (br. s, 2 H, -NH-NH).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 28.22 (-C(CH₃)₃), 38.15 (-CH₂-Ph), 50.90 (-CO₂-CH₃), 55.54 (-NH-CO-CH-), 80.79 (-C(CH₃)₃), 84.78 (-CH=C(NH₂)-CO-NH-), 127.04 (-Ph), 128.64 (-Ph), 129.28 (-Ph), 136.02 (-Ph), 146.41(-CH=C(NH₂)-CO-NH-), 148.31(-NH-CO₂-C(CH₃)₃), 168.97 (-CH=C(NH₂)-CO-NH-), 169.90 (-NH-NH-CO-CH-), 170.90 (-CO₂-CH₃).

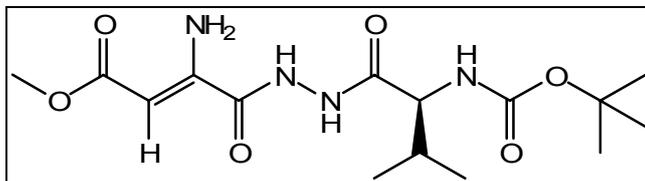
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₂₆N₄O₆, 406.2; gef.: [M+Na]⁺ 429.3, [2 x M + Na]⁺ 835.5.

LC-MS: R_t = 19.9 min, Reinheit (¹H-NMR): 90%.

[α]_D²⁵ = -20.0 ° (0.25, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3450, 3307, 3239 (m, -CONH-); 3085, 3025 (m, -C=CH-); 2958, 2870 (s, -CH₃, -CH₂-); 1728 (s, -C=O); 1685 (s, -CONH-); 1597 (s, -N-N-); 1444 (m, -CH₃, -CH₂-); 1169 (s, -O-C=O); 702 (s, -CH=CH-, aromat. -C-H) cm⁻¹.

Darstellung von (Z)-Methyl-3-amino-carbamoylacrylat(S)-valinoylbutoxycarbonyl-hydrazid (TP42):



Methode: D6

Ansatz: 200.0 mg (1.32 mmol) (Z)-3-(Methoxycarbonyl)-2-aminoacrylsäure-Lithiumsalz (TP55), 322 mg (1.39 mmol) H₂N-NH-Val-NH-BOC (TP67), 0.31 ml (1.43 mmol) DPPA, 0.37 ml (2.65 mmol) Triethylamin, 4.00 ml DMF.

Reaktionsdauer: 26 Tage

Ausbeute: 365 mg (1.02 mmol, 77 %), gelblicher Feststoff (Smp.: 142 °C).

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 0.95-0.99 (m, 6 H, -CH(CH₃)₂), 1.41 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 2.06-2.08 (m, 1 H, -CH(CH₃)₂), 3.67 (s, 3 H, -CO₂-CH₃), 4.13-4.15 (m, 1 H, -CH-CH(CH₃)₂), 5.19 (s, 1 H, -C=CH-CO₂-CH₃), 5.43 (br. d., 1 H, J = 7.8 Hz, -NH-CO₂-C(CH₃)₃), 6.74 (br. s., 2 H, -NH₂), 9.48 (br. s., 2 H, -NH-NH-).

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 19.09 (-CH-(CH₃)₂), 28.29 (-C(CH₃)₃), 29.67 (-CH-(CH₃)₂), 50.86 (-CO₂-CH₃), 58.72 (-NH-CO-CH-), 80.41 (-C(CH₃)₃), 92.75 (-CH=C(NH₂)-CO-NH-), 148.44 (-CH=C(NH₂)-CO-NH-), 156.15 (-NH-CO₂-C(CH₃)₃), 161.06 (-CO-NH-NH-CO-CH-), 169.51 (-CO-NH-NH-CO-CH-), 169.95 (-CO₂-CH₃).

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₅H₂₆N₄O₆, 358.2; gef.: [M+Na]⁺ 381.3, [2M + Na]⁺ 739.4.

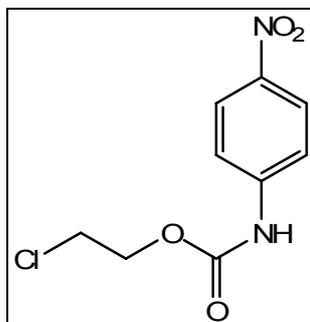
LC-MS: R_t = 19.9 min, Reinheit (¹H-NMR): 95%.

[α]_D²⁵ = -24.0 ° (0.35, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3332, 3180 (m, -CONH-); 2970 (s, -CH₃, -CH₂-); 1666 (s, -C=O); 1599 (s, -N-N-); 1504 (w, -NH-); 1163 (s, -O-C=O) cm⁻¹.

12.8 Sonstige Vorstufen

2-Chloroethyl 4-nitrophenylcarbammat (TP77)



Methode: Zu einer Lösung von 7.24 mmol 4-Nitroanilin in 20 ml Toluol wurde tropfenweise eine Mischung aus 3.62 mmol β -Chloroethyl-chloroformiat und 0.63 ml Toluol hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 Tage gerührt, Anschließend wurde das 4-Nitroanilinhydrochlorid abfiltriert, die Toluolphase mit verdünnter Salzsäure (1 x 30 ml) und Wasser (4 x 30 ml) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Toluol (3 x 20 ml) reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

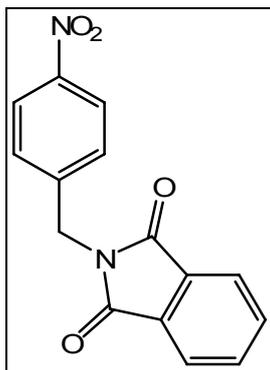
Ansatz: 1.00 g (7.24 mmol) 4-Nitroanilin, 0.37 ml (0.52 g, 3.62 mmol) β -Chloroethyl-chloroformiat.

Reaktionsdauer: 2 Tage.

Ausbeute: 700 mg (2.86 mmol, 40 %) gelbe Kristalle (Smp.: 114 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 3.74-3.76 (t, 2 H, J = 4.3 Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 4.45-4.48 (t, 2 H, J = 5.3 Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 6.99 (s, 1 H, N-H), 7.55 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Ar-H), 8.21 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Ar-H).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[175, 176]

2-(4-Nitrobenzyl)-isoindolin-1,3-dion (TP78)

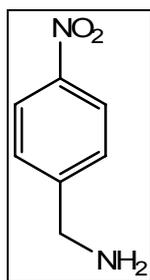
Methode (Gabrielsynthese): Es wurden 28.0 mmol Phthalimid in 50 ml DMF gelöst und mit 28.0 mmol Kaliumcarbonat versetzt. Nach 5 Stunden Rühren wurden 23.3 mmol 4-Nitrobenzylchlorid hinzu gegeben und der Ansatz für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 150 ml Wasser gegeben, der Feststoff abgefrittet, mit Wasser gewaschen und im Exikkator über Blaugel getrocknet.

Ansatz: 4.10 g (28.0 mmol) Phthalimid, 50 ml DMF, 3.90 g (28.0 mmol) Kaliumcarbonat, 4.00 g (23.3 mmol) 4-Nitrobenzylchlorid.

Reaktionsdauer: 25 Stunden.

Ausbeute: 6.58 g (23.3 mmol; quantitativ), brauner Feststoff; Smp.: 169 °C (Lit. 171 °C).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[177]

4-Nitrobenzylamin (TP79)

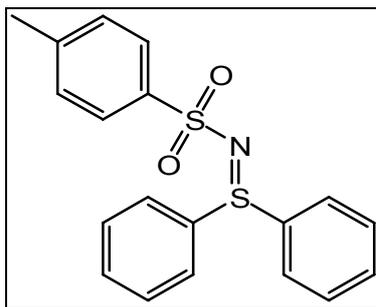
Methode (Gabrielsynthese): Es wurden 17.7 mmol des Imides und 80.0 mmol Hydrazin Hydrat in 250 ml Ethanol über einen Zeitraum von acht Stunden refluxiert. Anschließend wurde das Ethanol i. Vak. entfernt, der Ansatz mit 300 ml Wasser versetzt und mit 40 ml Eisessig angesäuert. Der entstandene Niederschlag (Phthalazin-1,4-dion) wurde abfiltriert, das Filtrat etwas i. Vak. eingengt und mit 125 ml Natriumhydroxid-Lösung (ca. 2.50 M) versetzt. Das Gemisch wurde in Diethylether ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ansatz: 5.00 g (17.7 mmol) Imid (**TP78**), 4.00 g (3.90 ml, 80.0 mmol) Hydrazin Hydrat, 250 ml Ethanol, 300 ml Wasser, 40 ml Eisessig, 125 ml Natriumhydroxid-Lösung (ca. 2.50 M).

Reaktionsdauer: 8 Stunden.

Ausbeute: 1.68 g (11.0 mmol; 62 %) dunkelbrauner Feststoff bzw. Flüssigkeit (Schmelzpunkt ca. 20 °C bzw. Raumtemperatur).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[177]

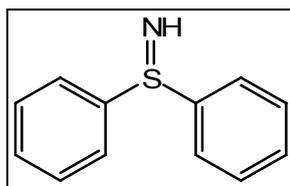
Diphenyl-*N-p*-tosylsulfilimid (TP80)

Methode: Es wurden unter Rühren zu einer Lösung von 20.0 g (107 mmol) Diphenylsulfid in 320 ml Methanol 30.1 g (107 mmol) Chloramin-*T*-Trihydrat gegeben. Nach zwei Minuten unter Rühren wurde langsam eine Lösung von 11 ml Essigsäure in 50 ml Methanol zugetropft. Danach wurde das Reaktionsgemisch für vier Stunden auf 50 °C erhitzt und nach dem Abkühlen der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Anschließend wurde mit Natronlauge (1 M) der pH des Filtrats auf 10 eingestellt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Wasser gewaschen (3 x 20 ml). Das erhaltene Rohprodukt wurde in Methanol/Wasser (9:1) umkristallisiert und über Orangegel im Exikkator (Vakuum) getrocknet.

Ansatz: 20.0 g (107 mmol) Diphenylsulfid, 30.1 g (107 mmol) Chloramin-*T*-Trihydrat, 370 ml Methanol, 11 ml Essigsäure.

Ausbeute: 34.2 g (96.3 mmol, 90 %) farblose Kristalle (Smp.: 109-111 °C).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[178]

***S,S*-Diphenylsulfimin (DPSI) (TP81)**

Methode: Es wurden in einem 100 ml Rundkolben 2.50 g (7.03 mmol) Diphenyl-*N-p*-tosylsulfilimid (TP80) in 4.0 ml (7.36 g, 75.0 mmol) 98 %iger Schwefelsäure gelöst. Sobald

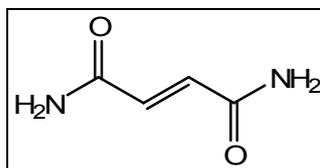
sich der Feststoff gelöst hatte, wurde der Ansatz im Eisbad gekühlt, eine Hand voll Eis hinzu gegeben, mit ca. 30 ml wässriger Natriumhydroxid (5.0 mol / L) Lösung alkalisch (pH = 11) gemacht und mit Dichlormethan in einem 250 ml Scheidetrichter ausgeschüttelt (3 x 25 ml). Die organische Phase wurde in einen 100 ml Rundkolben überführt, das Lösungsmittel der i. Vak. entfernt, der Rückstand erneut in 18.0 ml 3 %iger Schwefelsäure gelöst und wieder mit ca. 10 ml Natriumhydroxid Lösung alkalisch gemacht (siehe oben, pH = 11, Eisbad). Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und im Exikkator (Vakuum) über Orangegel mehrere Tage getrocknet.

Ausbeute: 1.29 g (6.41 mmol; 91 %) eines farblosen Feststoffes (Smp: 60-72 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 2.34 (s, 1 H, =NH), 7.13-7.96 (m, 10 H, -Ph).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[179]

Fumarsäurediamid (TP82)



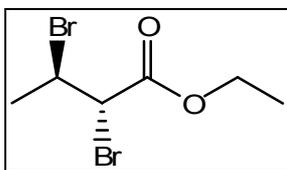
Methode: Es wurde 1.00 g (6.00 mmol) Fumarsäurediethylester in einem Rundkolben vorgelegt und 1.10 ml (1.00 g) 25 %ige Ammoniaklösung sowie 3.80 ml Ethanol hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Ethanol (10 ml) gewaschen.

Ansatz: 1.00 g (6.00 mmol) Fumarsäurediethylester, 1.00 g 25 %ige Ammoniaklösung, 3.80 ml Ethanol.

Reaktionsdauer: 24 Stunden

Ausbeute: 343 mg (3.00 mmol, 51 %) eines farblosen Feststoffs (Smp: 266 °C, Zersetzung).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[180, 181]

(2R,3S)- und (2S,3R)-Ethyl 2,3-dibromobutanoat (TP83)

Methode: H1

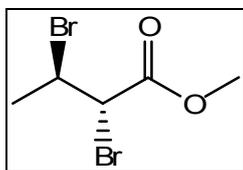
Ansatz: 5.00 g (44.2 mmol) Crotonsäureethylester, 2.48 ml (7.78 g, 48.7 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 11.6 g (42.3 mmol, 96 %) einer gelblichen Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 1.29\text{-}1.33$ (t, 3 H, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.88 (d, 3 H, $J = 6.6$ Hz, $-\text{CHBr-CH}_3$), 4.24-4.29 (q, 2 H, $J = 7.0$ Hz, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.42 (d, 1 H, $J = 10.9$ Hz, $-\text{CHBr-CHBr-CH}_3$), 4.31-4.33 (m, 1 H, $-\text{CHBr-CHBr-CH}_3$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[182]

(2R,3S)- und (2S,3R)-Methyl 2,3-dibromobutanoat (TP84)

Methode: H1

Ansatz: 5.29 ml (5.00 g, 49.9 mmol) Crotonsäuremethylester, 2.80 ml (8.78 g, 54.9 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

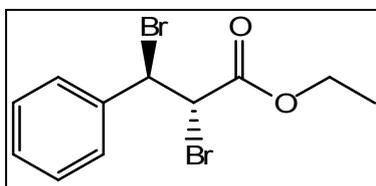
Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 12.1 g (46.7 mmol; 93 %) einer farblosen Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.88 (d, 3 H, J = 6.6 Hz, $-\text{CHBr}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3.67 (s, 3 H, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4.52 (d, 1 H, J = 10.9 Hz, $-\text{CHBr}-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{CO}_2-$), 4.55-4.57 (m, 1 H, $-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{CHBr}-\text{CO}_2-$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[183]

(2R,3S)- und (2S,3R)-Ethyl 2,3-dibromo-3-phenylpropanoat (TP85)



Methode: H1

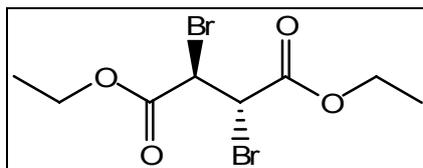
Ansatz: 5.00 g (28.2 mmol) Zimtsäureethylester, 1.58 ml (4.95 g, 31.0 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 8.83 g (26.3 mmol, 93 %) gelblicher Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.21-1.25 (t, 3 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4.19-4.24 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$), 4.68 (d, 1 H, J = 11.8 Hz, $-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{CHBr}-\text{Ph}$), 5.20 (d, 1 H, J = 11.9 Hz, $-\text{CHBr}-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{Ph}$), 7.17-7.27 (m, 5 H, $-\underline{\text{P}}\text{h}$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[183]

meso-Diethyl 2,3-dibromobornsteinsäure (TP86)

Methode: H1

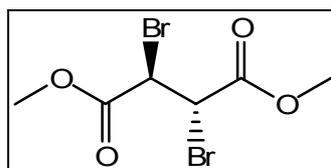
Ansatz: 5.00 g (29.0 mmol) Fumarsäurediethylester, 1.63 ml (5.11 g, 32.0 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 8.66 g (26.1 mmol, 90 %) gelblicher Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.30-1.34 (t, 6 H, J = 7.1 Hz, 2 x $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.27-4.32 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, 2 x $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.65 (s, 2 H, $-\text{CHBr}-\text{CHBr}-$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[184]

meso-Dimethyl 2,3-dibromobornsteinsäure (TP87)

Methode: H1

Ansatz: 5.00 g (34.7 mmol) Fumarsäuredimethylester, 1.94 ml (6.10 g, 38.2 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

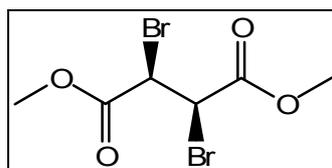
Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 9.65 g (31.8 mmol, 92 %) farblose Kristalle (Smp.: 60-61 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 3.84$ (s, 3 H, 2 x $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 4.68 (s, 2 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{Br}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{Br}-$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[185]

(2R,3R)- und (2S,3S)-Dimethyl 2,3-dibrombernsteinsäure (TP88)



Methode: H1

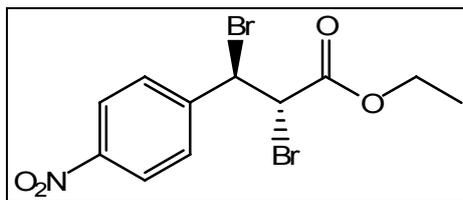
Ansatz: 5.00 g (34.7 mmol) Maleinsäuredimethylester, 1.94 ml (6.10 g, 38.2 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 9.14 g (30.1 mmol, 87 %) farblose Kristalle (Smp.: 40-43 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 3.78$ (s, 3 H, 2 x $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 4.67 (s, 2 H, $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{Br}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{Br}-$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[185]

(2R,3S)- und (2S,3R)-Ethyl 2,3-dibromo-3-(4-nitrophenyl)propanoat (TP89)

Methode: H1

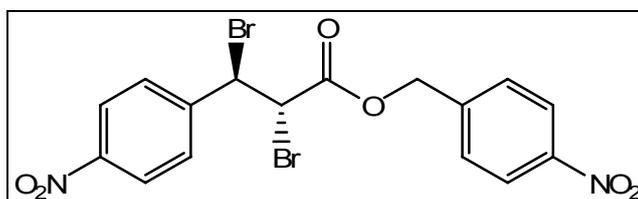
Ansatz: 5.00 g (22.6 mmol) *p*-Nitrozimtsäureethylester, 1.27 ml (3.97 g, 24.9 mmol) Brom, 50 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

Reaktionsdauer: drei Tage

Ausbeute: 7.57 g (19.9 mmol, 88 %) gelber Feststoff (Smp.: 114-115 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 1.36-1.39 (t, 3 H, J = 7.0 Hz, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.34-4.39 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.77 (d, 1 H, J = 11.7 Hz, $-\text{CHBr}-\text{CHBr}-\text{CO}_2-$), 5.38 (d, 1 H, J = 11.6 Hz, $-\text{CHBr}-\text{CHBr}-\text{CO}_2-$), 7.58 (d, 2 H, J = 8.9 Hz, $-\text{Ph}_{\text{ortho}}$), 8.25 (d, 2 H, J = 8.8 Hz, $-\text{Ph}_{\text{meta}}$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[186]

(2R,3S)- und (2S,3R)-4-Nitrobenzyl 2,3-dibromo-3-(4-nitrophenyl)propanoat (TP90)

Methode: H1

Ansatz: 500 mg (1.52 mmol) *p*-Nitrozimtsäure-4-nitrobenzylester, 0.11 ml (343 mg, 2.15 mmol) Brom, 15 ml wässrige Natriumthiosulfatlösung, 20 ml Dichlormethan

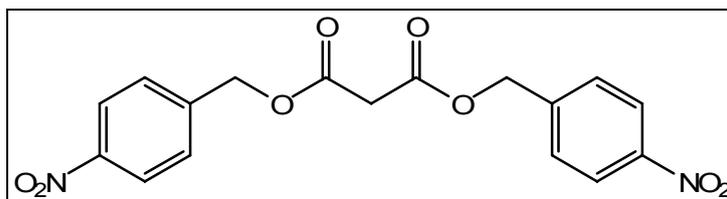
Reaktionsdauer: sechs Tage

Ausbeute: 500 mg (2.46 mmol, 97 %) farbloser Feststoff (Smp.: > 220 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 4.87 (d, 1 H, J = 11.6 Hz, $-\text{CHBr}-\underline{\text{CH}}\text{Br}-\text{CO}_2^-$), 5.39 (d, 1 H, J = 5.8 Hz, $-\underline{\text{CH}}\text{Br}-\text{CHBr}-\text{CO}_2^-$), 5.42 (s, 2 H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 7.57-7.61 (m, 4 H, 2 x $-\underline{\text{Ph}}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 8.25-8.27 (m, 4 H, 2 x $-\underline{\text{Ph}}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 45.60 ($-\text{CHBr}-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{CO}_2^-$), 47.94 ($-\underline{\text{C}}\text{HBr}-\text{CHBr}-\text{CO}_2^-$), 66.77 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 123.95 ($-\underline{\text{Ph}}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$), 124.23 ($-\underline{\text{Ph}}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$), 128.73 ($-\underline{\text{Ph}}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 129.16 ($-\underline{\text{Ph}}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 141.56, 144.02, 148.27 (quart. $-\underline{\text{Ph}}$), 166.84 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2^-$).

bis(4-Nitrobenzyl) malonat (TP91)



Methode: G4

Ansatz: 10.0 g (96.2 mmol) Malonsäure, 35.0 g (160 mmol) 4-Nitrobenzylbromid, 11.5 g (210 mmol) Kaliumhydroxid, 200 ml Ethanol, 140 ml Wasser.

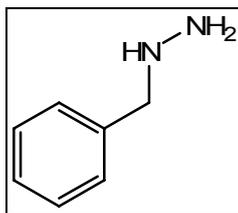
Reaktionsdauer: drei Stunden

Aufarbeitung: Umkristallisation aus 50.0 ml Methanol

Ausbeute: 9.00 g (24.0 mmol, 25 %) farbloser Feststoff (Smp.: 84-86 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 3.56 (s, 2 H, $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}_2^-$), 5.27 (s, 4 H, 2 x $-\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 7.49-7.51 (m, 4 H, $-\underline{\text{Ph}}_{\text{ortho}}-\text{NO}_2$), 8.19- 8.21 (m, 4 H, 2 x $-\underline{\text{Ph}}_{\text{meta}}-\text{NO}_2$).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[130]

N-Benzylhydrazin (TP92)

Methode: Es wurde 3.00 Äq. Hydrazinhydrat in EtOH (100 ml) vorgelegt und die Lösung bis zum Refluxieren erhitzt. Innerhalb von 2.5 Stunden wurde eine Lösung von 1.00 Äq. Benzylchlorid in EtOH (100 ml) langsam zu der refluxierenden Lösung zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 4.5 h refluxiert und weitere 2 Tage bei RT gerührt. Das Ethanol wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde mit Et₂O (3 x 25 ml) ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Der Diethylether wurde abgezogen.

Ansatz: 24.3 ml (500 mmol) Hydrazinhydrat, 11.5 ml (100 mmol) Benzylchlorid, 200 ml Ethanol.

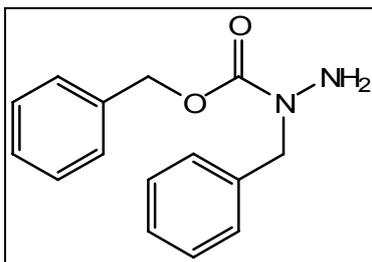
Reaktionsdauer: 3 Tage

Aufarbeitung: Destillation (Sdp.: 89 °C, 5.70 mbar).

Ausbeute: 6.62 g (54.2 mmol, 54%), klares leicht gelbliches Öl.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 2.95 (br. s, 3 H, H₂N-NH-), 3.93 (s, 2 H, -CH₂-Ph), 7.25-7.38 (m, 5 H, -CH₂-Ph)

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[187]

N-Benzylhydrazidcarbonsäurebenzylester (TP93)

Methode: Es wurde 1.00 Äq. Benzylhydrazin in CH_2Cl_2 (4.0 ml) gelöst, 0.95 Äq. 1 M NaOH zugegeben und diese Lösung auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb von 30 Minuten wurde eine Lösung von 0.90 Äq. Benzylchloroformiat in CH_2Cl_2 (5.0 ml) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 21 Stunden lang gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Zum Ausschütteln wurde CH_2Cl_2 (20 ml) zugegeben, die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 40 ml) und ges. NaCl-Lösung (1 x 30 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen.

Ansatz: 192 mg (1.57 mmol) Benzylhydrazin, 1 M Natriumhydroxid (1.49 mmol), 200 μl Benzylchloroformiat (1.41 mmol), 30.0 ml Dichlormethan.

Reaktionsdauer: 22 Stunden

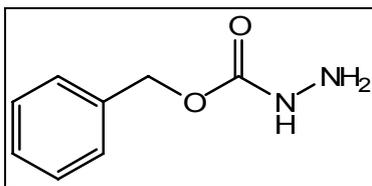
Ausbeute: 266 mg (1.04 mmol, 74%), gelber kristalliner Feststoff (Smp.: 82 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 4.01 (s, 2 H, $-\underline{\text{NH}}_2$), 4.56 (s, 2H, $-\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ph}$), 5.15 (s, 2 H, $-\text{CO}_2\text{-C}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$), 7.20-7.35 (m, 10 H, $-\underline{\text{Ph}}$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -46.4^\circ$ (0.14, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3297, 3062, 3033 (m, $-\text{CONH-}$); 2954 (s, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-}$); 1741, 1701, 1684 (s, $-\text{C=O}$); 1604, 1587 (s, $-\text{N-N-}$); 1435 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-}$); 1268, 1215, 1128, 1053 (s, $-\text{O-C=O}$); 729, 694 (s, arom. $-\text{C-H}$) cm^{-1} .

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[118]

Hydrazidcarbonsäurebenzylester (TP94)

Methode: Es wurde 5.00 Äq. Hydrazinhydrat in 10.0 ml Et₂O vorgelegt und die Lösung auf -5 °C abgekühlt. Innerhalb von 1.5 Stunden wurde eine Lösung von 1.00 Äq. Benzylchloroformiat in 70.0 ml Et₂O langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei RT gerührt.

Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 25 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Kolben in den Kühlschrank überführt, wo ein wachsartiger, weißer Feststoff ausgefallen ist.

Ansatz: 16.8 ml (346 mmol) Hydrazinhydrat, 10.0 ml (70.3 mmol) Benzylchloroformiat, 80 ml Diethylether.

Reaktionsdauer: 26 Stunden

Ausbeute: 9.70 g (58.4 mmol, 83 %), farbloser wachsartiger Feststoff.

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 3.70 (br. s, 2 H, H₂N-NH-), 5.06 (s, 2 H, -CH₂-Ph), 7.29-7.44 (m, 5H, -Ph), 8.64 (br. s, 1 H, H₂N-NH).

Die erhaltenen Daten entsprechen der Literatur.^[121]

12.9 Allgemeine Prozedur der Testreaktionen mit Schwefel, Stickstoff- und Sauerstoffnucleophilen:

10 mg des nucleophilen Bausteins wurden in 3.0 ml Toluol-d₈ gelöst und über einen Zeitraum von acht Stunden mit einer äquimolaren Menge von entweder Benzylmercaptan,

Benzylamin, oder Essigsäure refluxiert. NMR-Proben wurden nach zwei, vier und acht Stunden Reaktionsdauer entnommen.

Ansätze mit Benzylmercaptan:

10 mg (35.7 μmol) Aziridin **TP01**, Benzylmercaptan (35.6 μmol , 4.42 mg, 4.18 μl).

10 mg (35.6 μmol) Epoxid **TP02**, Benzylmercaptan (35.6 μmol , 4.42 mg, 4.18 μl).

10 mg (37.7 μmol) Olefin **TP03**, Benzylmercaptan (37.7 μmol , 4.68 mg, 4.43 μl).

Ansätze mit Benzylamin:

10 mg (35.7 μmol) Aziridin **TP01**, Benzylamin (35.7 μmol , 3.83 mg, 3.90 μl).

10 mg (35.6 μmol) Epoxid **TP02**, Benzylamin (35.6 μmol , 3.81 mg, 3.88 μl).

10 mg (37.7 μmol) Olefin **TP03**, Benzylamin (37.7 μmol , 4.04 mg, 4.11 μl).

Bei den Versuchen von **TP02** und **TP03** mit Benzylamin wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, einmal ohne und einmal mit Phosphatpuffer (0.50 μl in D_2O). Trotzdem fand keinerlei Reaktion statt.

c): $^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, C_7D_8 , 300 K): $\delta = 1.48$ (s, 1 H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 1.90 (m, 1 H, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CH}-$), 3.79 (m, 2 H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.87 (s, 6 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_3$), 4.22 (s, 1 H, $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$), 4.88 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 7.39-7.41 (m, 5 H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 7.92-7.95 (m, 2 H, $J = 8.8$ Hz, $-\text{CH}-o-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 8.25-8.27 (m, 2 H, $J = 8.8$ Hz, $-\text{CH}-m-\text{Ph}-\text{NO}_2$).

e): $^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): $\delta = 3.15$ (s, 3 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_3$), 3.47 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, $-\text{NH}-$), 3.57 (dd, 2 H, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3.78 (s, 3 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_3$), 4.61 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, $-\text{CH}-\text{NH}-$), 4.96 (s, 1 H, $-\text{CH}-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 6.80-7.02 (m, 5 H, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 7.67 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}-o-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 7.81 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}-o-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 8.14 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}-m-\text{Ph}-\text{NO}_2$), 8.22 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}-m-\text{Ph}-\text{NO}_2$).

e): $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 53.03$, 53.52, 54.27, 70.60, 76.09, 80.60, 123.29, 123.92, 127.62, 128.08 (2 peaks), 129.69, 129.71, 134.56, 145.52, 145.62, 147.66, 148.46, 169.16, 169.83.

Ansätze mit Essigsäure:

10 mg (35.7 μmol) Aziridin **TP01**, Essigsäure (35.7 μmol , 2.14 mg, 2.04 μl).

10 mg (35.6 μmol) Epoxid **TP02**, Essigsäure (35.6 μmol , 2.14 mg, 2.04 μl).

10 mg (37.7 μmol) Olefin **TP03**, Essigsäure (37.7 μmol , 2.26 mg, 2.16 μl).

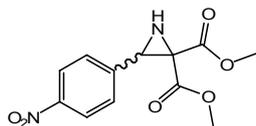
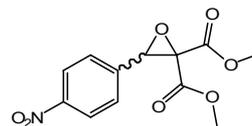
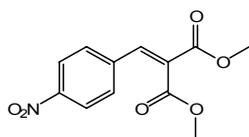
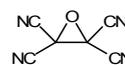
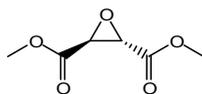
LC-MS:

a): $R_t = 18.2$ min, $[M + H] = 281$; **c)**: $R_t = 18.2$ min, $[M + H] = 388$; **d)**: $R_t = 4.2$ min, $[M + H] = 561$; **e)**: $R_t = 22.5$ min, $[M + H] = 521$.

(Säule: Phenomenex® Jupiter 4u Proteo 90 A, 150 x 4.60 mm, 4 micron, RP 18; UV-Detektion bei 210 nm und 254 nm; Eluent: Acetonitril/Wasser mit jeweils 0.1 % Ameisensäure; Gradient: 10-60% Acetonitril in 20 min; flow: $0.40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 20 μl ; gemessen aus der Reaktionsmischung nach 8 Stunden).

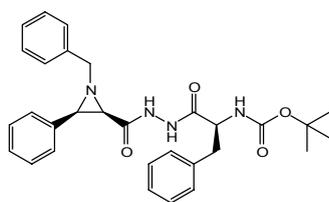
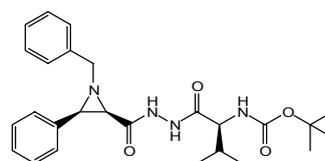
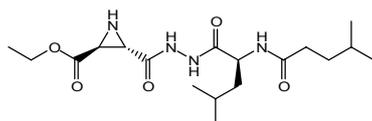
13. Übersicht der synthetisierten und getesteten Verbindungen

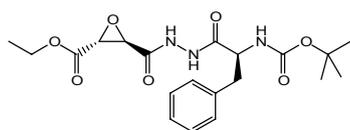
Verbindungen für die experimentelle Elektronendichtebestimmung

**TP01****TP02****TP03****TP04****TP05**

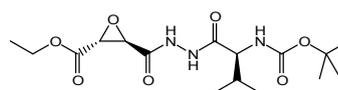
Als potentielle Protease-Inhibitoren synthetisierte Verbindungen

Aziridine

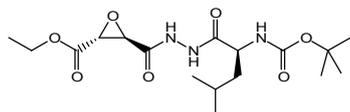
**TP06****TP07****TP08**

Epoxide

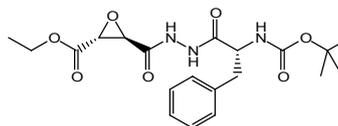
TP09



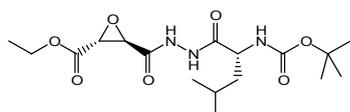
TP10



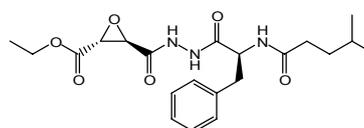
TP11



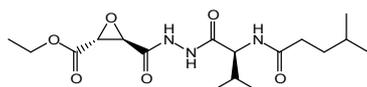
TP12



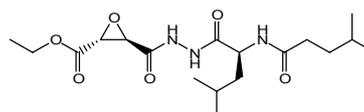
TP13



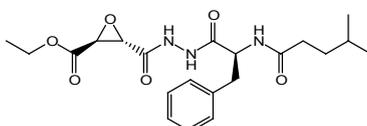
TP14



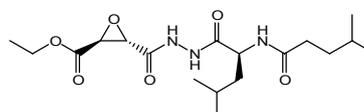
TP15



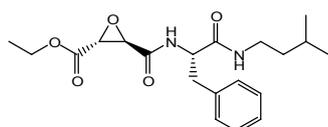
TP16



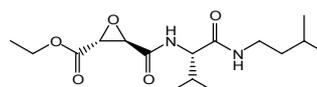
TP17



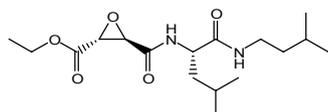
TP18



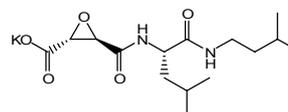
TP19



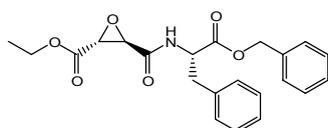
TP20



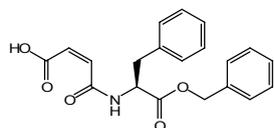
TP21



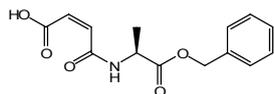
TP22



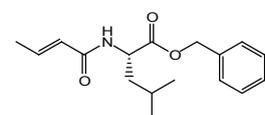
TP23

Olefine

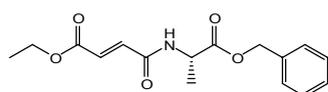
TP24



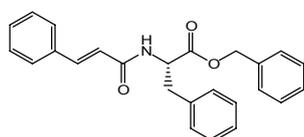
TP26



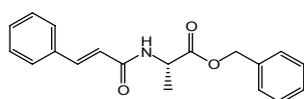
TP28



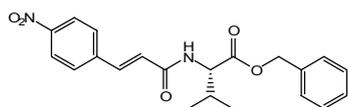
TP30



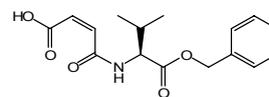
TP32



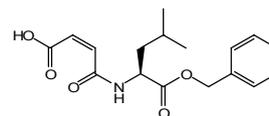
TP34



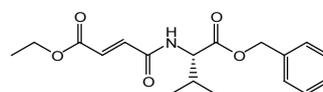
TP36



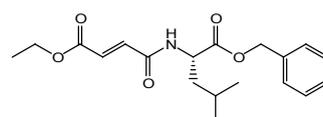
TP25



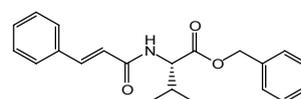
TP27



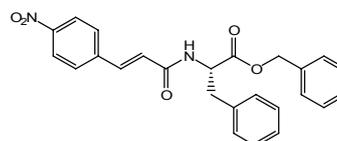
TP29



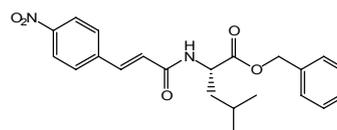
TP31



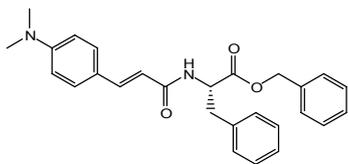
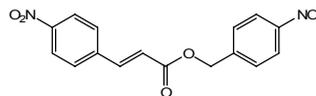
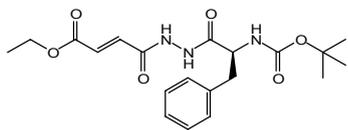
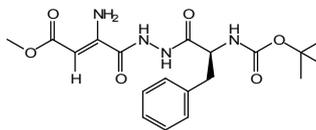
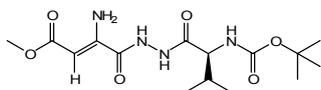
TP33



TP35



TP37

**TP38****TP39****TP40****TP41****TP42**

14. Literaturverzeichnis

1. WHO, *The World Health Report*, **2004**, WHO.
2. I.U.o. Biochemistry, *Enzyme Nomenclature*, ed. E.C. Webb, **1992**, New York, Academic Press Inc.
3. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 2, 610-650.
4. M. Fujinaga, M.M. Cherney, H. Oyama, K. Oda, M.N. James, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10, 3364-3369.
5. N.D. Rawlings, F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, Database issue, D320-325.
6. N.D. Rawlings, A.J. Barrett, *Biochem. J.* **1993**, *290* (Pt 1), 205-218.
7. F. Lecaille, J. Kaleta, D. Bromme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 12, 4459-4488.
8. C. Jedeszko, B.F. Sloane, *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 11, 1017-1027.
9. B. Turk, D. Turk, V. Turk, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 1-2, 98-111.
10. H.H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1, 133-172.
11. P.J. Rosenthal, *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 13-14, 1489-1499.
12. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1, 235-242.
13. G. Guncar, G. Pungercic, I. Klemencic, V. Turk, D. Turk, *EMBO J.* **1999**, *18*, 4, 793-803.
14. W.L. Delana, <http://www.pymol.org>.
15. I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 2, 157-162.
16. D. Leung, G. Abbenante, D.P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3, 305-341.
17. G.N. Rudenskaya, D.V. Pupov, *Biochem. (Mosc.)* **2008**, *73*, 1, 1-13.
18. Z. Jia, S. Hasnain, T. Hiram, X. Lee, J.S. Mort, R. To, C.P. Huber, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10, 5527-5533.
19. B.E. Cathers, C. Barrett, J.T. Palmer, R.M. Rydzewski, *Bioorg. Chem.* **2002**, *30*, 4, 264-275.
20. J.C. Powers, J.L. Asgian, O.D. Ekici, K.E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 12, 4639-4750.
21. P.J. Whittle, T.L. Blundell, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 349-375.
22. I.D. Kuntz, E.C. Meng, B.K. Shoichet, *Acc.Chem. Res.* **1994**, *27*, 5, 117-123.
23. K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 3, 523-528.
24. B.J. Gour-Salin, P. Lachance, C. Plouffe, A.C. Storer, R. Menard, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 6, 720-725.

25. K. Fukushima, M. Arai, Y. Kohno, T. Suwa, T. Satoh, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *105*, 1, 1-12.
26. S. Sumiya, T. Yoneda, K. Kitamura, M. Murata, C. Yokoo, M. Tamai, A. Yamamoto, M. Inoue, T. Ishada, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2, 299-203.
27. N. Katunuma, E. Murata, H. Kakegawa, A. Matsui, H. Tsuzuki, H. Tsuge, D. Turk, V. Turk, M. Fukushima, Y. Tada, T. Asao, *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 1, 6-10.
28. R. Vicik, M. Busemann, K. Baumann, T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 4, 331-353.
29. Y. Nakao, M. Fujita, K. Warabi, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 42, 10462-10463.
30. T. Schirmeister, *Arch. Pharm.* **1996**, *329*, 5, 239-244.
31. T. Schirmeister, *Biopolym.* **1999**, *51*, 1, 87-97.
32. T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4, 560-572.
33. R. Vičák, *N-Acylierte Aziridin-2,3-dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren der Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Proteasen: Synthese und Eigenschaften.* **2004**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
34. C. Gelhaus, R. Vicik, R. Hilgenfeld, C.L. Schmidt, M. Leippe, T. Schirmeister, *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 5, 435-438.
35. F. Schulz, *Synthese und Testung von aziridin-2-carboxylaten als cystein-protease-inhibitoren.* **2006**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
36. C. Schad, *Synthese und Testung neuer N-acylierter Aziridin-2,3-carbonsäure-Derivate als Inhibitoren von parasitären Cystein-Proteasen.* **2009**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
37. A.J. Barrett, A.A. Kembhavi, M.A. Brown, H. Kirschke, C.G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 1, 189-198.
38. M.M. Santos, R. Moreira, *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 10, 1040-1050.
39. R.P. Hanzlik, S.A. Thompson, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 6, 711-712.
40. S.A. Thompson, P.R. Andrews, R.P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1, 104-111.
41. S. Liu, R.P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 6, 1067-1075.
42. E. Wiczerzak, P. Drabik, L. Lankiewicz, S. Oldziej, Z. Grzonka, M. Abrahamson, A. Grubb, D. Bromme, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 19, 4202-4211.
43. S.H. Verhelst, M.D. Witte, S. Arastu-Kapur, M. Fonovic, M. Bogoyo, *Chem. Biochem.* **2006**, *7*, 6, 943-950.
44. S. Venkatraman, J. Kong, S. Nimkar, Q.M. Wang, J. Aube, R.P. Hanzlik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 4, 577-580.
45. K.E. James, M.G. Gotz, C.R. Caffrey, E. Hansell, W. Carter, A.J. Barrett, J.H. McKerrow, J.C. Powers, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 12, 1613-1618.

46. O.D. Ekici, M.G. Gotz, K.E. James, Z.Z. Li, B.J. Rukamp, J.L. Asgian, C.R. Caffrey, E. Hansell, J. Dvorak, J.H. McKerrow, J. Potempa, J. Travis, J. Mikolajczyk, G.S. Salvesen, J.C. Powers, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 8, 1889-1892.
47. M.G. Gotz, K.E. James, E. Hansell, J. Dvorak, A. Seshadri, D. Sojka, P. Kopacek, J.H. McKerrow, C.R. Caffrey, J.C. Powers, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 9, 2816-2832.
48. C. Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, M. Rao, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *38*, 2, 89-119.
49. B.M. Dunn, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 12, 4431-4458.
50. N.D. Rawlings, A.J. Barrett, *Methods Enzymol.* **1995**, *248*, 105-120.
51. D.R. Davies, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **1990**, *19*, 189-215.
52. E.T. Baldwin, T.N. Bhat, S. Gulnik, M.V. Hosur, R.C. Sowder, 2nd, R.E. Cachau, J. Collins, A.M. Silva, J.W. Erickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 14, 6796-6800.
53. C. Abad-Zapatero, R. Goldman, S.W. Muchmore, C. Hutchins, K. Stewart, J. Navaza, C.D. Payne, T.L. Ray, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 4, 640-652.
54. J.T. Nguyen, Y. Hamada, T. Kimura, Y. Kiso, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2008**, *341*, 9, 523-535.
55. A.K. Ghosh, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 8, 2163-2176.
56. E. Vieira, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, R. Güller, G. Hirth, H.P. Märki, M. Müller, C. Oefner, M. Scalone, H. Stadler, M. Wilhelm, W. Wostl, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 10, 1397-1402.
57. R. Güller, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, G. Hirth, C. Jenny, M. Kansy, F. Montavon, M. Müller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, H.P. Märki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 10, 1403-1408.
58. A. Pakyz, D. Israel, *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash.)* **1997**, *NS37*, 5, 543-551.
59. A.K. Patick, K.E. Potts, *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 4, 614-627.
60. D.J. Kempf, H.L. Sham, *Curr. Pharm. Design* **1996**, *2*, 2, 225-246.
61. J. Tang, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 14, 4510-4517.
62. T.D. Meek, B.D. Dayton, B.W. Metcalf, G.B. Dreyer, J.E. Strickler, J.G. Gorniak, M. Rosenberg, M.L. Moore, V.W. Magaard, C. Debouck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6, 1841-1845.
63. Z. Yu, P. Caldera, F. McPhee, J.J. De Voss, P.R. Jones, A.L. Burlingame, I.D. Kuntz, C.S. Craik, P.R.O. de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 25, 5846-5856.
64. S.K. Grant, M.L. Moore, S.A. Fakhoury, T.A. Tomaszek Jr., T.D. Meek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 11, 1441-1445.

65. B. Degel, P. Staib, S. Rohrer, J. Scheiber, E. Martina, C. Buchold, K. Baumann, J. Morschhauser, T. Schirmeister, *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 2, 302-315.
66. C. Büchold, *Synthese und Testung cis-konfigurierter Aziridine als pseudo-irreversible Inhibitoren der sekretorischen Aspartatproteasen von Candida Albicans*. **2009**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
67. J.J. De Voss, Z. Sui, D.L. DeCamp, R. Salto, L.M. Babe, C.S. Craik, P.R. Ortiz de Montellano, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 5, 665-673.
68. R. Salto, L.M. Babe, J. Li, J.R. Rose, Z. Yu, A. Burlingame, J.J. De Voss, Z. Sui, P. Ortiz de Montellano, C.S. Craik, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14, 10691-10698.
69. J. Gante, R. Weitzel, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 4, 349-350.
70. A. Fassler, G. Bold, H.G. Capraro, R. Cozens, J. Mestan, B. Poncioni, J. Rosel, M. Tintelnot-Blomley, M. Lang, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 16, 3203-3216.
71. N. Gianotti, A. Soria, A. Lazzarin, *New Microbiol.* **2007**, 30, 2, 79-88.
72. S. Jiang, S.T. Prigge, L. Wei, Y. Gao, T.H. Hudson, L. Gerena, J.B. Dame, D.E. Kyle, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 9, 2577-2584.
73. C.A. Whitesitt, R.L. Simon, J.K. Reel, S.K. Sigmund, M.L. Phillips, J.K. Shadle, L.J. Heinz, G.A. Koppel, D.C. Hunden, S.L. Lifer, D. Berry, J. Ray, S.P. Little, X. Liu, W.S. Marshall, J.A. Panetta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 18, 2157-2162.
74. T. Luksch, N.S. Chan, S. Brass, C.A. Sottriffer, G. Klebe, W.E. Diederich, *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 9, 1323-1336.
75. A. Zega, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 5, 589-597.
76. J. Gante, *Synthesis* **1989**, 6, 405-413.
77. M. Thorman, H.-J. Hofmann, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, 469, 1-3, 63-76.
78. J. Gante, *Chem. Ber.* **1965**, 98, 2, 540-547.
79. T.S. Koritsanszky, P. Coppens, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 6, 1583-1627.
80. P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **1964**, 136, 3B, B864-B871.
81. N.K. Hansen, P. Coppens, *Acta Crystallogr., Sect. A* **1978**, 34, 6, 909-921.
82. P. Luger, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 16, 2529-2540.
83. R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules - A Quantum Theory*, **1990 und 1994**, Oxford, UK, Clarendon Press.
84. R.F.W. Bader, *The Quantum Theory of Atoms in Molecules*, ed. C.F.M.u.R.J. Boyd, **2007**, Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
85. T. Schirmeister, A. Klockow, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 6, 585-596.
86. *Aziridines and Epoxides in Organic Synthesis*, ed. A.K. Yudin, **2006**, Weinheim, Germany, WILEY-VCH Verlag.
87. P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre, *Tetrahedron* **2001**, 57, 9, 1801-1812.

88. P. Davoli, I. Moretti, F. Prati, H. Alper, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2, 518-521.
89. K. Harada, I. Nakamura, *J. Chem. Soc.: Chem. Commun.* **1978**, 13, 522-523.
90. P. DeShong, D.A. Kell, D.R. Sidler, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 13, 2309-2315.
91. S.N. Filigheddu, *Tetrahedron: Letters* **1999**, *40*, 35, 6503-6506.
92. G. Cardillo, L. Gentilucci, C. Tomasini, M.P.V. Castejon-Bordas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 3, 755-762.
93. A.V. Eremeev, O.N. Krutius, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1982**, *18*, 12, 1254-1257.
94. K.D. Berlin, L.G. Williams, O.C. Dermer, *Tetrahedron: Letters* **1968**, *9*, 7, 873-876.
95. V.I. Markov, A.V. Prosyaniuk, S.V. Bondarenko, A.I. Mishchenko, S.V. Loban, V.A. Zdesenko, *Zh. Org. Khim.* **1981**, *17*, 6, 1180-1183.
96. M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1993**, 23, 3041-3045.
97. H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 1, 635-646.
98. P. Pöchlauser, E.P. Müller, P. Peringer, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 5, 1238-1247.
99. F. Calderon, E.G. Doyaguez, A. Fernandez-Mayoralas, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 16, 6258-6261.
100. Y. Gao, C.M. Zepp, *Tetrahedron: Letters* **1991**, *32*, 27, 3155-3158.
101. L. He, H.-S. Byun, R. Bittman, *Tetrahedron: Letters* **1998**, *39*, 15, 2071-2074.
102. K. Metz, M. Honda, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, *1*, 55-60.
103. G.V. Shustov, A.V. Kachanov, V.A. Korneev, R.G. Kostyanovsky, A. Rauk, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 22, 10267-10274.
104. S.-K. Kang, D.-C. Park, H.-S. Rho, S.-H. Yoon, J.-S. Shin, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1994**, *24*, 3513-3514.
105. B.B. Lohray, J.R. Ahuja, *J. Chem. Soc.: Chem. Commun.* **1991**, 2, 95-97.
106. N. Furukawa, S. Oae, T. Yoshimura, *Synthesis* **1976**, 30-32.
107. T. Schirmeister, M. Peric, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 6, 1281-1291.
108. T. Schirmeister, *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, *9*, 1895-1899.
109. Beyer-Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*. 23. Auflage ed, **1998**, Stuttgart, Leipzig, S. Hirzel Verlag
110. T. Katsuki, K.B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 18, 5974-5976.
111. T. Katsuki, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *140*, 189-214.
112. K. Mori, H. Iwasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1, 87-90.
113. S. Saito, K. Komada, T. Moriwake, *Org. Synth.* **1998**, *73*, 184.
114. S. Saito, K. Komada, T. Moriwake, *Org. Synth.* **1998**, *9*, 220.
115. A. Foucaud, M. Bakouetila, *Synthesis* **1987**, *9*, 854-856.
116. W.J. Linn, O.W. Webster, R.E. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 16, 3651-3656.

117. K. Tanaka, X. Chen, T. Kimura, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1, 60-69.
118. S. Borg, G. Estenne-Bouhtou, K. Luthman, I. Csoeregh, W. Hesselink, U. Hacksell, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 10, 3112-3120.
119. J. Bondebjerg, H. Fuglsang, K.R. Valeur, D.W. Kaznelson, J.A. Hansen, R.O. Pedersen, B.O. Krogh, B.S. Jensen, C. Lauritzen, G. Petersen, J. Pedersen, L. Naerum, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 14, 4408-4424.
120. J.L. Asgian, K.E. James, Z.Z. Li, W. Carter, A.J. Barrett, J. Mikolajczyk, G.S. Salvesen, J.C. Powers, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 23, 4958-4960.
121. N. Merkley, J. Warkentin, *Can. J. Chem.* **2000**, 78, 7, 942-949.
122. M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, **1984**, Berlin, Springer-Verlag.
123. Y.S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* **1972**, 9, 453-463.
124. V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 7, 572-575.
125. R.J.W. Cremlyn, *Aust. J. Chem.* **1973**, 26, 7, 1591-1593.
126. J. Glauder, *Speciality Chemicals Magazine* **2004**, 24, 3, 30-31.
127. S.A. Carvalho, E.F. da Silva, M.V. de Souza, M.C. Lourenco, F.R. Vicente, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2, 538-541.
128. H.G.O. Becker, W. Berger, G. Domschke, *Organikum*. 20. ed, **1999**, Weinheim, Wiley-VCH.
129. E. Barbayianni, I. Fotakopoulou, M. Schmidt, V. Constantinou-Kokotou, U.T. Bornscheuer, G. Kokotos, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 22, 8730-8733.
130. S.M. Schmitt, D.B.R. Johnston, B.G. Christensen, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 6, 1142-1148.
131. R. Kitz, I.B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3245-3249.
132. W.X. Tian, C.L. Tsou, *Biochem.* **1982**, 21, 5, 1028-1032.
133. H. Bisswanger, *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*. 3rd ed, **2000**, Weinheim, Wiley-VCH.
134. T. Sasaki, M. Kishi, M. Saito, T. Tanaka, N. Higuchi, E. Kominami, N. Katunuma, T. Murachi, *J. Enzyme Inhib.* **1990**, 3, 3, 195-201.
135. B.T. Burlingham, T.S. Widlanski, *J. Chem. Edu.* **2003**, 80, 2, 214-218.
136. S. Ludewig, M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann, T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, accepted.
137. V. Martichonok, C. Plouffe, A.C. Storer, R. Menard, J.B. Jones, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 16, 3078-3085.
138. M. Mladenovic, K. Ansorg, R.F. Fink, W. Thiel, T. Schirmeister, B. Engels, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 37, 11798-11808.

139. N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, D. Turk, L. Moroder, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 9, 1789-1797.
140. V. Schellenberger, K. Braune, H.J. Hofmann, H.D. Jakubke, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 3, 623-636.
141. V. Schellenberger, U. Schellenberger, H.D. Jakubke, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 11B, 2884-2889.
142. J.P. Meara, D.H. Rich, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 17, 3357-3366.
143. M. Tamai, K. Matsumoto, S. Omura, I. Koyama, Y. Ozawa, K. Hanada, *J. Pharmacobiodyn.* **1986**, *9*, 8, 672-677.
144. G. Fenteany, R.F. Standaert, W.S. Lane, S. Choi, E.J. Corey, S.L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 5211, 726-731.
145. M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1987**, *35*, 3, 1098-1104.
146. S. Hashida, T. Towatari, E. Kominami, N. Katunuma, *J. Biochem.* **1980**, *88*, 6, 1805-1811.
147. D. Steverding, *Parasit Vectors* **2008**, *1*, 1, 3.
148. P. Desjeux, J. Alvar, *Ann. Trop. Med. Parasitol* **2003**, *97 Suppl. 1*, 3-15.
149. D.E. McRee, *Pract. Protein Crystallogr.* **1993**, Academic Press, San Diego, 1-23.
150. G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear* **1993**, Academic Press, San Diego, 8-10, 29-38.
151. W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*. 5th ed, **2007**, Vieweg+Teubner.
152. S. Grabowsky, *Dissertation*. **2009**, Freie Universität Berlin.
153. S. Grabowsky, T. Pfeuffer, L. Chęcińska, M. Weber, W. Morgenroth, P. Luger, T. Schirmeister, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *17*, 2759-2768.
154. S. Grabowsky, T. Pfeuffer, W. Morgenroth, C. Paulmann, T. Schirmeister, P. Luger, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 13, 2295-2307.
155. P. Luger, M. Messerschmidt, S. Scheins, A. Wagner, *Acta Crystallogr. A* **2004**, *60*, Pt 5, 390-396.
156. C.B. Hübschle, P. Luger, *J. Appl. Cryst.* **2006**, *39*, 901-904.
157. A. Paasche, M. Arnone, R.F. Fink, T. Schirmeister, B. Engels, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 15, 5244-5249.
158. A. Korn, S. Rudolph-Böhner, L. Moroder, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6, 1717-1730.
159. B.J. Balcom, N.O. Petersen, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 8, 1922-1927.
160. S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11, 2447-2467.
161. H. Wissmann, H.-J. Kleiner, *Angew. Chem. Intern. Ed.* **1980**, *19*, 2, 133-134.
162. R.T. Shuman, P.L. Ornstein, J.W. Paschal, P.D. Gesellchen, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2, 738-741.

163. J. Legters, L. Thijs, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 28, 5287-5294.
164. S. Saito, T. Ishikawa, A. Kuroda, K. Koga, T. Moriwake, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 20, 4067-4086.
165. E. Martina, N. Stiefl, B. Degel, F. Schulz, A. Breuning, M. Schiller, R. Vicik, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 24, 5365-5369.
166. M.W. Miller, *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 233-237.
167. N. Furukawa, T. Yoshimura, M. Ohtsu, T. Akasaka, S. Oae, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1, 73-80.
168. J.M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 13, 4669-4675.
169. T.D. Harris, S.P. Robinson, R.R. Cesati, P. Yalamanchili, *PCT Int. Appl.*, **2007**, *WO 2007005491 A1 20070111*.
170. M. Jansen, H. Rabe, A. Strehle, S. Dieler, F. Debus, G. Dannhardt, M.H. Akabas, H. Luddens, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 15, 4430-4448.
171. H. Niedrich, C. Oehme, *J. Prakt. Chem.* **1972**, *314*, 5-6, 759-768.
172. W.R. Roush, A.A. Hernandez, J.H. McKerrow, P.M. Selzer, E. Hansell, J.C. Engel, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 50, 9747-9762.
173. S.L. Harbeson, D.H. Rich, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 6, 1378-1392.
174. D. Mitra, A. Sengupta, K. Biradha, A. Basak, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 23, 2678-2681.
175. R. Adams, J.B. Segur, *J. Am. Chem. Soc.* **1923**, *45*, 3, 785-790.
176. R. Oda, M. Miyanoki, M. Okano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, *35*, 8, 1309-1312.
177. A.F. Andrews, D.M. Smith, H.F. Hodson, P.B. Thorogood, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1982**, 2995-3006.
178. K. Tsujihara, N. Furukawa, K. Oae, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 9, 2631-2635.
179. T. Yoshimura, T. Omata, N. Furukawa, S. Oae, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 10, 1728-1733.
180. W. Lossen, E. Mendthal, *Liebigs Ann. Chem.* **1906**, *348*, 3, 304.
181. L. McMaster, F.B. Langreck, *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 6, 970-973.
182. S.D. Sharma, S. Kanwar, S. Rajpoot, *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 1, 11-19.
183. J.E. Gurst, C.M. Dellinger, J. Jacobus, *J. Chem. Edu.* **1985**, *62*, 10, 871-873.
184. C.J. Devlin, B.J. Walker, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1972**, 9-10, 1249-1253.
185. E. Larsson, *Org. Magn. Reson.* **1974**, *6*, 6, 103-105.
186. A.J. Speziale, C.C. Tung, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 5, 1353-1357.
187. W.P. Malachowski, C. Tie, K. Wang, R.L. Broadrup, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 25, 8962-8969.

15. Veröffentlichungen

Posterpräsentationen:

Tanja Schirmeister, Thomas Pfeuffer, Simon Grabowsky, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Peter Luger; *Synthesis, crystallization and electron density determination of electrophilic building blocks as model compounds for protease inhibitors*; DPhG-Jahrestagung, Joint Meeting with the Czech Pharmaceutical Society and the Hungarian Society for Pharmaceutical Sciences **2006**, Marburg.

Thomas Pfeuffer, Tanja Schirmeister, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Simon Grabowsky, Peter Luger; *Synthesis, crystallization and electron density determination of electrophilic building blocks as model compounds for protease inhibitors*; 5th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS) **2007**, Patras, Griechenland.

Thomas Pfeuffer, Tanja Schirmeister, *Azapeptides as protease inhibitors*, Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), **2007**, Würzburg.

Peter Luger, Simon Grabowsky, Thomas Pfeuffer, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Wolfgang Morgenroth, Tanja Schirmeister; *Application of ED, ELF and ELI to a Protease Inhibitor Model Compound: Preliminary Results*, DGK AK14 Workshop **2007**, Aachen.

Simon Grabowsky, Peter Luger, Thomas Pfeuffer, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Wolfgang Morgenroth, Tanja Schirmeister; *Elektronendichte und Drug Design: Protease-Inhibitor-Modellverbindungen*, 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie (DGK), **2007**, Bremen.

Simon Grabowsky, Peter Luger, Thomas Pfeuffer, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Wolfgang Morgenroth, Tanja Schirmeister; *Correlation of Molecular Properties from Experimentally Derived Electron Density with Biological Activity: A Protease Inhibitor Model Compound*; Frontiers in Medicinal Chemistry, Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry. **2007**, Berlin.

Simon Grabowsky, Thomas Pfeuffer, Wolfgang Morgenroth, Carsten Paulmann, Tanja Schirmeister, Peter Luger; *An Experimental Electron Density and ELF Study of Protease Inhibitor Model Compounds*; Gordon Research Conference on Electron Distribution and Chemical Bonding: Dynamics and Densities, **2007**, Mount Holyoke College, South Hadley, MA, USA.

Thomas Pfeuffer, Tanja Schirmeister; *Azaeptides as Protease Inhibitors*, 4th Summer School of Medicinal Chemistry **2008**, Regensburg.

Thomas Pfeuffer, Tanja Schirmeister, *Azaeptides as protease inhibitors*, Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), **2008**, Würzburg.

Thomas Pfeuffer, Tanja Schirmeister; *Azaeptides as Protease Inhibitors*, 4th Joint Ph.D. Student Meeting (SFB 630, 544, 766) **2008**, Bronnbach (Bronze Medal Poster Prize).

Vorträge:

Synthese, Kristallisation und Elektronendichtebestimmung von elektrophilen Bausteinen als Modellverbindungen für Protease-Inhibitoren, Doktorandenseminar, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Juli **2006**, Würzburg.

Synthesis, crystallization and electron density determination of electrophilic building blocks as model compounds for protease inhibitors; DPhG-Doktorandentagung, September **2006**, Heroldsberg

Azaeptide als Protease-Inhibitoren, Doktorandenseminar, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, November **2008**, Würzburg.

Synthese und Testung von Aza-Peptiden als Cystein- und Aspartat-Protease Inhibitoren sowie Kristallisation und Elektronendichtebestimmung von Aziridin-, Epoxid- und Michael-Akzeptor substituierten Bausteinen, Doktorandenseminar, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Juni **2009**, Würzburg.

Publikationen:

Simon Grabowsky, Thomas Pfeuffer, Lilianna Chęcińska, Manuela Weber, Wolfgang Morgenroth, Peter Luger, and Tanja Schirmeister. Electron-Density Determination of Electrophilic Building Blocks as Model Compounds for Protease Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *17*, 2759-2768.

S. Grabowsky, T. Pfeuffer, W. Morgenroth, C. Paulmann, T. Schirmeister, P. Luger. A comparative study on the experimentally derived electron density of three protease inhibitor model compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2295-2307.