

**SYNTHESE UND TESTUNG NEUARTIGER
PEPTIDOMIMETISCHER, SELEKTIVER INHIBITOREN PARASITÄRER
CYSTEIN-PROTEASEN**



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

vorgelegt von

DIPLOM-CHEMIKERIN CAROLINE SCHAD

aus Fulda

WÜRZBURG 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

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 Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister in der Zeit von April 2009 bis April 2013 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich herzlich Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die hochinteressante und interdisziplinäre Themenstellung in einem praxisnahen Forschungsgebiet. Weiterhin danke ich ihr für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre, die Ermöglichung eines Forschungsaufenthalts in Florida sowie die Möglichkeit, die Promotion in Würzburg abzuschließen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Jürgen Seibel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt ferner folgenden Kooperationspartnern:

- Dr. Uta Schurigt, Iris Gonzales Leal, Ulrike Baum, Benjamin Frank, Katja Thomale und Christin Glowa, AK Prof. Dr. Dr. Heidrun Moll, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Untersuchung der antileishmanialen Aktivität und die Bestimmung der Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen
- Dr. Uta Schurigt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Conor Caffrey, California Institute for Quantitative Biosciences/Department of Pathology der University of California, San Francisco (USA), für das *In-vitro*-Screening an Schistosomen
- Prof. Dr. Alicia Ponte-Sucre, Laboratory of Molecular Physiology, Universidad Central de Venezuela, Caracas, für die Charakterisierung der leishmaniziden Wirksamkeit
- Uwe Dietzel, AK Prof. Dr. Caroline Kisker, Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg, für die Exprimierung von Rhodesain und LmjcatB sowie die Kristallisation eines Rhodesain-Inhibitor-Komplexes
- Dr. Martin Stemka, AK Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Exprimierung von Falcipain-2
- Prof. Dr. Jeremy Mottram, Wellcome Center for Molecular Parasitology, University of Glasgow (UK), für die Überlassung der LmCPB2.8
- Priv.-Doz. Dr. Paul M. Selzer, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen, für die Überlassung von Cruzain
- Prof. Dr. August Stich, Missionsärztliche Klinik Würzburg, für die Bestimmung der anti-trypanosomalen Aktivität
- Priv.-Doz. Dr. Gabriele Pradel, Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen, für die Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität
- Prof. Dr. Matthias Leippe, Zoologisches Institut/Abteilung Zoophysiologie, Universität Kiel, für die Testungen an *Plasmodium falciparum*
- Dr. Ann-Kristin Müller, Department für Infektiologie/Parasitologie des Universitätsklinikums Heidelberg für die Testungen an *Plasmodium berghei* infizierten humanen Hepatomzellen

- Prof. Dr. Michael Steinert, Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig, für die Testungen an *Trypanosoma brucei gambiense* im Blut-Hirn-Schranke-modell
- Prof. Dr. Kirkwood Land, Department of Biological Sciences, University of the Pacific, Stockton (California, USA), für das *In-vitro*-Screening an *Trichomonas vaginalis*
- Prof. Dr. Antonia Tavares do Amaral, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (Brasilien), für die Dockingstudien an Cruzain
- Prof. Dr. Ben M. Dunn, University of Florida, Gainesville (USA), für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und damit die Möglichkeit der Testungen an Aspartatproteasen; diesbezüglich danke ich dem Bayerisch-Kalifornischen Hochschulzentrum (BaCaTec = Bavaria California Technology Center) für die finanzielle Förderung

Weiterhin danke ich Conny Heindl und Anna Kucharski für die Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays, Roswitha Scheblein für die Unterstützung im Labor, Monika Herb und Philipp Fey für die Messung von NMR-Spektren sowie Armin Welker und Swarna Oli für die LC-MS-Messungen.

Meinen Mitstreitern in der Praktikumsbetreuung des zweiten Semesters Dr. Thomas Schneider, Dr. Martin Stempka, Simon Vogel und Benjamin Merget sowie Dr. Jens Schmitz danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Dank geht ebenfalls an die Instituts-Werkstatt, die immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Sämtlichen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des AK Schirmeister danke ich für die tolle Zeit: Dr. Verena Buback, Dr. Christian Büchold, Philipp Fey, Amelie Gutmann, Conny Heindl, Dr. Monika Herb, Steven Holloway, Ferdinand Matz, Christoph Menrath, Swarna Oli, Dr. Thomas Pfeuffer, Matthias Rappold, Roswitha Scheblein, Dr. Markus Schiller, Magdalena Schneider, Dr. Thomas Schneider, Dr. Martin Stempka, Dr. Paula Tabares, Dr. Radim Vicik, Simon Vogel, Thilo Waag, Dr. Constanze Waltenberger, Armin Welker, Hongmei Wu. Besonders hervorzuheben sind natürlich meine Box-Kollegen Maggie und Philipp. Ein großes Dankeschön geht an Moni und Markus fürs Korrekturlesen und an Christian für die Formatierungshilfe.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden für die phantastische Wü-Zeit!

Und zum Schluss danke ich ganz besonders Christian und meiner Familie, natürlich auch namentlich den Kindern Fabio und Lena, weil ihr einfach die Besten seid!

Ergebnisse aus dem Rahmen dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht^[1-3] und/oder waren Gegenstand von Posterpräsentationen oder Vorträgen.

CHRISTIAN
UND MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL.....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Proteaseinhibitoren in der Arzneimittelentwicklung	1
1.2 Klassifizierung von Proteasen	4
1.3 Cystein-Proteasen	5
1.3.1 Hydrolysemechanismus von Cystein-Proteasen der Papain-Familie.....	6
1.3.2 Vorkommen humaner und parasitärer Cystein-Proteasen der Papain-Familie.....	8
1.3.2.1 Parasitär verursachte Infektionskrankheiten	12
1.3.2.1.1 Leishmaniose.....	13
1.3.2.1.2 Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas-Krankheit, Malaria und Schistosomiasis.....	15
1.3.3 Struktur und Substratspezifität von Cystein-Proteasen der Papain-Familie	16
1.4 Inhibitoren von Cystein-Proteasen.....	19
1.4.1 Irreversible Inhibitoren: Epoxid-basierte Inhibitoren der Papain-Familie	20
1.4.2 Irreversible Inhibitoren: Aziridin-basierte Inhibitoren der Papain-Familie.....	21
1.4.3 Irreversible Inhibitoren: Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren der Papain-Familie	22
2 Zielsetzung	24
3 Synthesen.....	27
3.1 Peptidkupplungen	27
3.2 Synthese der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren	32
3.2.1 Synthese der <i>trans</i> -konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate.....	32
3.2.2 Synthese der Di- und Tripeptide als Bausteine der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren.....	35
3.2.3 Synthese der <i>N</i> -acylierten <i>trans</i> -konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate	38
3.2.3.1 Synthese des bromierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitors.....	44
3.2.3.2 Synthese der Biotin-markierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren.....	47
3.2.3.3 Synthese von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren.....	51
3.3 Synthese der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren	59
3.4 Synthese der Michael-Akzeptor-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren	62
4 Biochemische und biologische Untersuchungen.....	71
4.1 Enzymassays.....	71
4.1.1 Enzymkinetik: Einführung.....	71
4.1.2 Enzymkinetik: Charakterisierung irreversibler Hemmung	73
4.1.2.1 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson.....	78
4.1.2.2 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou.....	79
4.1.3 Durchführung und Ergebnisse der fluorimetrischen Enzymassays an Cystein-Proteasen	79

4.1.4	Durchführung und Ergebnisse der photometrischen Enzymassays an Aspartat-Proteasen	86
4.2	Infektionsbiologische Testungen	88
4.2.1	Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität.....	88
4.2.1.1	Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität der Leitstrukturen RV122C und RV212C	93
4.2.1.1.1	Antileishmaniale Aktivität von RV122C, RV212C.....	93
4.2.1.2	Antileishmaniale Aktivität von CS09	97
4.2.2	Weitere antiparasitäre Testungen.....	98
5	LC-MS-Untersuchung zur Aufklärung des Hemmmechanismus.....	102
6	Aufklärung der Bindungsmodi	104
6.1	Dockingstudien	104
6.2	Röntgenstrukturanalyse	106
7	Diskussion der Ergebnisse.....	109
7.1	Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Verbindungen.....	109
7.2	Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Verbindungen.....	116
7.3	Michael-Akzeptor-basierte Verbindungen	116
8	Zusammenfassung.....	118
9	Summary	123
EXPERIMENTALTEIL		127
10	Allgemeine Vorbemerkungen	127
10.1	Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden.....	127
10.2	Verwendete Chemikalien	132
10.3	Arbeitsmethoden.....	132
10.4	Enzymassays.....	133
10.4.1	Fluorimetrische Enzymassays.....	133
10.4.2	Photometrische Enzymassays.....	135
10.4.3	In Enzymassays verwendete Reagenzien	136
11	Allgemeine synthetische Methoden	138
11.1	Schutzgruppen.....	138
11.1.1	Schutzgruppen der Aminofunktion.....	138
11.1.2	Schutzgruppen der Carboxylfunktion.....	139
11.2	Peptidkupplungen	139
11.3	Darstellung von <i>trans</i> -konfigurierten Aziridinen: Aziridin-2,3-dicarboxylat.....	143
11.4	Darstellung von <i>trans</i> -konfigurierten Epoxiden: Diethyloxiran-2,3-dicarboxylat.....	144
11.5	Darstellung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen	145
11.6	Diverse Synthesen	146
12	Synthetisierte Verbindungen	147
12.1	Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren.....	147
12.2	Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren.....	230
12.3	Michael-Akzeptor-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren.....	238
APPENDIX		260

13	Formelregister.....	261
14	Abkürzungsverzeichnis	262
15	Literaturverzeichnis.....	265

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

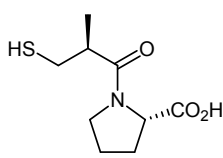
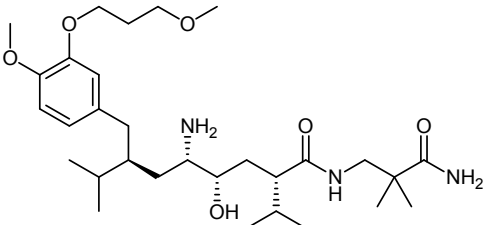
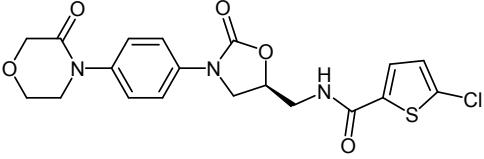
1.1 Proteaseinhibitoren in der Arzneimittelentwicklung

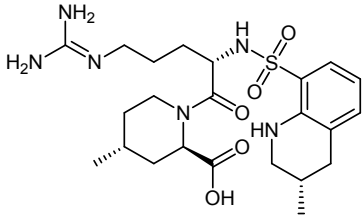
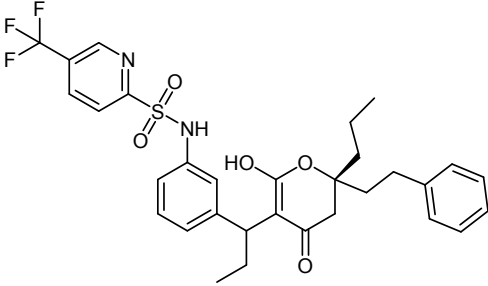
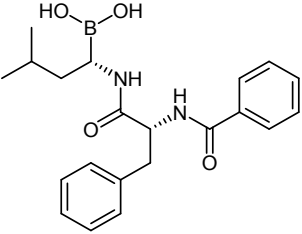
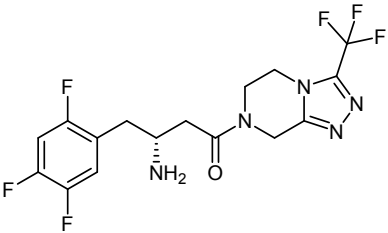
Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren und somit Proteine und Peptide spalten. In der Medizin, der Biologie und der Biotechnologie sind sie von großer Bedeutung. Dies erschließt sich durch ihre Abundanz, denn durch Analyse von sequenzierten Genomen wurde deutlich, dass ~ 2 % aller Gene für proteolytische Enzyme codieren.^[4,5] Neben ihrer Funktion als Protein-degradierende Enzyme sind sie auch wichtige Signalmoleküle, die in zahlreichen vitalen Prozessen involviert sind. Durch Proteinspaltung sind Proteasen an der Kontrolle physiologischer Schlüsselprozesse wie Zellzyklusprogression, Zellproliferation und Zelltod, DNA-Replikation, Gewebe-Remodeling (Gewebe-Umbau), Hämostase (Blutgerinnung), Wundheilung und Immunantwort beteiligt. Dadurch sind sie involviert in die Entstehung und den Verlauf verschiedener Krankheiten und stellen Angriffspunkte für Therapeutika dar. Dazu müssen allerdings die komplexen biologischen Prozesse, an denen sie beteiligt sind, die Mechanismen der Aktivierung und Regulierung sowie die Funktionen der Proteasen aufgeklärt sein. Weiterhin muss bekannt sein, wie diese Eigenschaften im Krankheitsfall modifiziert sind.^[6] Als effektive Therapeutika müssen Proteaseinhibitoren sehr stark und hochselektiv an die entsprechende Protease/entsprechenden Proteasen binden, um Krankheitsverläufe zu verlangsamen oder zu stoppen. Potentielle Arzneistoffe müssen auch geeignete pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften aufweisen. Proteaseinhibitoren sollten daher über möglichst geringen Peptidcharakter, hohe Stabilität gegenüber nichtselektiver Degradation, gute Membranpermeabilität, lange Lebensdauer in Blut und Zellen und gute Bioverfügbarkeit (vorzugsweise bei oraler Gabe) verfügen, um effektive Arzneistoffe zu sein.^[7] Die physikochemischen Eigenschaften, die notwendig sind zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit, werden beschrieben durch Lipinskis „rule-of-five“. Demnach wird orale Bioverfügbarkeit weniger wahrscheinlich, wenn mehr als fünf Wasserstoffbrückendonoren und zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren vorliegen, das Molekulargewicht größer als 500 Da ist und die Lipophilie hoch ist, ausgedrückt durch den berechneten log P-Wert, der nicht größer als 5 sein sollte. Diese Regeln gelten nicht, wenn andere Transportmechanismen vorliegen oder wenn es sich um Arzneistoffe handelt, die sich von Naturstoffen ableiten.^[8]

Laut Schätzungen sind 5 – 10 % aller pharmazeutischen Targets der Arzneistoffentwicklung Proteasen.^[9] Gestörte Regulation von Proteasen kann zu unangemessener Proteolyse führen, die wiederum eine wichtige Rolle einnimmt im Zusammenhang mit Krebs, kardiovaskulären, inflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen. Auch stellen

Proteasen Angriffspunkte zur Behandlung bakterieller, viraler und parasitärer Krankheiten dar. Aktuell finden Proteaseinhibitoren als Arzneistoffe Anwendung in der Behandlung von Bluthochdruck, Blutgerinnungsstörungen, HIV, Krebs und Diabetes. Die bedeutendste Erfolgsgeschichte handelt dabei von den ACE-Inhibitoren (ACE = angiotensin-coverting enzyme) zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz und zur Herzinfarkt-Prophylaxe mit einem jährlichen Umsatz von ca. 6 Mrd. US-Dollar. ACE-Inhibitoren sind seit 20 Jahren auf dem Markt, im klinischen Einsatz befinden sich 13 Vertreter, z. B. Captopril, weitere sind in klinischen Phasen. Weitere zur Therapie von Bluthochdruck eingesetzte Wirkstoffe sind Renininhibitoren, beispielsweise Aliskiren. Im Zusammenhang mit Blutgerinnungsstörungen sind die Targets Faktor Xa oder Thrombin und eingesetzte Arzneistoffe sind z. B. Rivaroxaban und Argatroban. Seit Mitte der 1990er werden Inhibitoren der HIV-Protease (HIV = human immunodeficiency virus), wie z. B. Ritonavir oder Tipranavir, zur Behandlung von HIV-Infektionen eingesetzt. Angriffspunkt zur Behandlung des Multiplen Myeloms mithilfe des Proteaseinhibitors Bortezomib ist das Proteasom und zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 wurden ein DPPIV-Inhibitoren (DPP = dipeptidyl peptidase), z. B. Sitagliptin, zugelassen. Tabelle 1.1 bietet eine Übersicht der eingesetzten Arzneistoffe mit je einem Vertreter pro Angriffspunkt (Klassifizierung von Proteasen siehe Kap. 1.2).^[6,9]

Tab. 1-1: Beispiele von Proteaseinhibitoren, die als Arzneistoffe zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden.

Erkrankung	Protease (Familie)	Arzneistoff (Typ)	Struktur	Markteinführung
Bluthochdruck	ACE (Metalloprotease)	Captopril (peptidisch)		1981
Bluthochdruck	Renin (Aspartatprotease)	Aliskiren (nicht-peptidisch)		2007
Blutgerinnungsstörung	Faktor Xa (Serinprotease)	Rivaroxaban (nicht-peptidisch)		2008

Blutgerinnungsstörung	Thrombin (Serinprotease)	Argatroban (nicht-peptidisch)		2000
HIV/AIDS	HIV-Protease (Aspartatprotease)	Tipranavir (nicht-peptidisch)		2005
Krebs	Proteasom (Threoninprotease)	Bortezomib (peptidisch)		2003
Diabetes mellitus Typ 2	DPPIV (Serinprotease)	Sitagliptin (nicht-peptidisch)		2006

In klinischen Studien befinden sich Proteaseinhibitoren zur Behandlung von Entzündungs-, Immun-, Atemwegserkrankungen, kardiovaskulären und degenerativen Erkrankungen einschließlich der Alzheimer-Krankheit.^[6,10]

Dennoch ist es noch immer eine Herausforderung, Proteaseinhibitoren als Arzneistoffe zu entwickeln, die neue Targetproteasen anvisieren. Viele potentielle Substanzen schlugen in der klinischen Entwicklung fehl und die limitierte Anzahl neuer Proteaseinhibitoren der letzten Jahrzehnte zeigt, dass neue Ansätze notwendig sind. Hauptprobleme sind fehlende Selektivität von Hemmstoffen sowie begrenztes Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen und der multiplen biologischen Funktionen der Targetproteasen. Neben der Adressierung der aktiven Zentren, besteht alternativ die Möglichkeit, allosterische oder exosite-adressierende Inhibitoren zu entwickeln.^[9] Weiterhin wird diskutiert, ob *in-vivo*-Studien zu einem früheren Zeitpunkt des Arzneimittelentwicklungsprozesses stattfinden sollten, denn oft sind *in vitro* entwickelte, potente Inhibitoren *in vivo* nicht ausreichend spezifisch und/oder effektiv, was u. a. auf mangelnde Stabilität oder Zellpermeabilität

zurückzuführen ist.^[11] Schließlich ist von Fall zu Fall abzuwiegen, ob reversible oder irreversible Inhibitoren zu favorisieren sind.^[9,12]

1.2 Klassifizierung von Proteasen

Nach der Einteilung des EC-Systems durch das NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), welches Enzyme aufgrund von Reaktionstypen klassifiziert, gehören Proteasen der Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4) an. Proteasen werden weiter eingeteilt in Exo- (EC 3.4.11-19) und Endoproteasen (EC 3.4.21-99), abhängig von der Spaltstelle innerhalb der Polypeptidkette. Exoproteasen werden unterteilt in Amino- und Carboxyproteasen, entsprechend der Spaltung vom *N*- oder vom *C*-Terminus beginnend, während Endoproteasen meist an sehr spezifischen Stellen innerhalb der Polypeptidkette spalten. Eine weitere Einteilung ordnet Untergruppen den unterschiedlichen Katalysemechanismen, wie z. B. Cystein-Proteasen (EC 3.4.22), zu.^[13,14]

Proteasen werden im MEROPS-System bezüglich des Aufbaus des aktiven Zentrums und des damit verbundenen Katalysemechanismus klassifiziert. Die Einteilung erfolgt danach in Aspartat- (A), Cystein- (C), Glutamat- (G), Metallo- (M), Serin- (S), Threonin-Proteasen (T) sowie unbekannte (U) und gemischt katalytische (C, S, T) Proteasen. Unlängst wurde eine siebte Hauptgruppe entdeckt, die Asparaginlyasen (N), beinhaltet.^[15] Interessant ist dabei, dass es sich bei dieser Gruppe nicht um Proteasen, sondern um Lyasen (EC 4), genauer um Amidinlyasen (EC 4.3) handelt. Nicht alle proteolytischen Enzyme sind daher Proteasen, die Substrate durch Hydrolyse spalten und die Begriffe sollten nicht synonym verwendet werden. Lyasen spalten C–C-, C–O- und C–N-Bindungen durch Eliminierungen.^[16] Die genannten Katalysertypen umfassen jeweils Clans, die wiederum eine oder mehrere Familien enthalten. Dabei gehen die Mitglieder eines Clans aus einem evolutionären Ursprung hervor und Familien weisen eine evolutionäre Verwandtschaft entweder aufgrund einer ähnlichen Tertiärstruktur oder aufgrund der für die katalytische Aktivität verantwortlichen Sequenz auf.^[17]

Die fünf Klassen der Proteasen, die in Säugetieren vorkommen (Glutamatproteasen wurden bislang nur in Pilzen, Bakterien und Viren identifiziert) bedienen sich zwei fundamental unterschiedlicher Katalysemechanismen zur Stabilisierung des tetraedrischen Intermediats während der Hydrolyse. Serin-, Cystein- und Threoninproteasen nutzen kovalente Katalyse durch katalytisch wirksame Reste der aktiven Zentren, die als Nucleophile agieren, während in Aspartat- und Metalloproteasen die Hydrolyse ohne kovalente Beteiligung, sondern durch Generierung eines hochreaktiven Wassermoleküls, verläuft (nicht-kovalente Katalyse).^[6,9] Asparaginlyasen wurden bislang lediglich in Viren und Bakterien entdeckt, sie sind sich

selbst-spaltende Lyasen. Als Nucleophil fungiert der Asparaginrest des aktiven Zentrums (kovalente Katalyse), der durch Angriff der γ -Amidgruppe an dem eigenen Asparagin-Carbonylkohlenstoff einen stabilen, fünfgliedrigen Succinimidring bildet, was in der Folge unter bestimmten Umständen zur Spaltung der eigenen Peptidbindung führt.^[16]

Proteasen binden ihre Substrate im aktiven Zentrum über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, was letztlich die Substratspezifität bestimmt. Liganden können hierbei die natürlichen Substrate, Substratanaloga, peptidische und nicht-peptidische Inhibitoren sein. Substrate für Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen teilen eine allgemeine konformative Voraussetzung zur Erkennung, sie binden mit wenigen Ausnahmen in einer gestreckten β -Faltblattstruktur in der *active site cleft* (von außen zugängliche Spalte, die das aktive Zentrum des Enzyms enthält). Diese konformative Selektion begründet die Resistenz gefalteter oder andersartig strukturierter Regionen von Proteinen gegenüber proteolytischer Degradation, die Empfindlichkeit denaturierter Proteine gegenüber Prozessierung sowie die höhere Affinität von Proteasen für konformativ gehinderte, „gestreckte“ Inhibitoren/Substrate.^[10,18] Nach der für Proteasen und ihre Substrate üblichen Nomenklatur nach Berger und Schechter (Abb. 1.1) werden Substrat- bzw. Inhibitorreste ausgehend von der Spaltstelle in Richtung *N*-Terminus mit P_1 bis P_n (*non-primed site*) und in Richtung *C*-Terminus mit P_1' bis P_n' (*primed site*) bezeichnet. Analog dazu erhalten die Bindungstaschen im Enzym die entsprechenden Bezeichnungen S_1 bis S_n und S_1' bis S_n' .^[19]

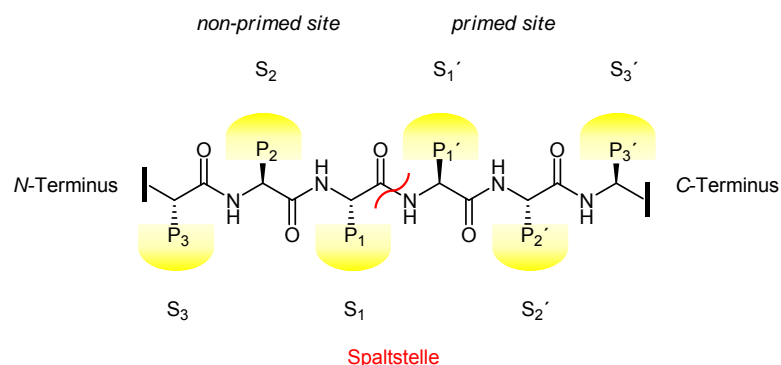


Abb. 1-1: Nomenklatur von Substrat und Protease nach Berger und Schechter.

1.3 Cystein-Proteasen

Cystein-Proteasen stehen im Fokus dieser Arbeit. Ihre Einteilung erfolgt nach dem MEROPS-System in neun Clans (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP) und 59 Familien und weitere 20 Subfamilien, wobei einige Familien nicht zu Clans zugeordnet sind. Sie wurden in Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilzen, Würmern, Viren, Pflanzen und Säugetieren identifiziert. Der Papain-Clan CA umfasst alle Familien, deren Proteasen

strukturelle Ähnlichkeit zu Papain aufweisen, so u. a. die Papain-Familie (C1), die Calpain-Familie (C2) und die Streptopain-Familie (C10), um nur einige der 30 Familien zu nennen. Aus pharmazeutischer Sicht beinhaltet Clan CA die meisten interessanten Proteasen zur Wirkstoffentwicklung.^[15] Der Namensgeber Papain (EC 3.4.22.2) wurde als erstes entdeckt und gilt als die am besten untersuchte pflanzliche Protease. Papain kann aus der Papayafrucht isoliert werden.^[13] Die enzymatische Aktivität des Papaya-Fruchtsafts wurde bereits 1878 entdeckt.^[15,20] Die Papain-Familie (C1) enthält zahlreiche Endoproteasen und einige Exoproteasen, wovon viele potentielle Targets darstellen, wie die lysosomalen Proteasen von Eukaroyten, die Cathepsine, die zu den wichtigsten Cystein-Proteasen von Säugetieren zählen sowie Proteasen der Verdauungsvakuolen von Protozoen. Die einzelnen Proteasen unterscheiden sich trotz struktureller Verwandtschaft in ihrer Substratspezifität.^[13,15] Clan CD enthält auch einige medizinisch interessante Targets, so in der Legumain-Familie (C13), deren Enzyme z. B. an der Antigen-Präsentation beteiligt sind und in der Caspase-Familie (C14), deren Vertreter wie Caspasen und Metacaspasen in Zusammenhang mit der Auslösung von Apoptose stehen. Auch finden sich Caspaseinhibitoren in klinischen Phasen zur Behandlung von Arthritis, Schuppenflechte, Lebererkrankungen, Asthma und akutem Herzinfarkt.^[15,21] Beispiele von gemischt katalytischen (C, S, T) viralen Proteasen mit Katalysemechanismen der Cystein-Proteasen sind in Clan PA vertreten. Repräsentative Vertreter sind Poliovirus-type Picornain 3C (PA, C3A) der Picornain-Familie (C3) von Rhinoviren (Erreger von Erkältungen) und die SARS-CoV-Hauptprotease (M^{pro}) (PA, C30) von Coronaviren (z. B. SARS = Severe Acute Respiratory Syndrome, Schweres Akutes Atemwegssyndrom). Gemischt katalytische virale Proteasen mit katalytischer Aktivität der Serinproteasen sind z. B. Flavivirin (= NS3 Protease; PA, S7) von Flaviviren (z. B. Denguefieber, Gelbfieber, West-Nil-Fieber) und Hepacivirin (= NS3 Protease, NS3/4a Protease; PA, S29) von Hepaciviren (z. B. Hepatitis C). Auch diese Proteasen stellen Zielstrukturen für Virustatika dar, im Falle von Hepatitis C befinden sich mehrere Hemmstoffe in der klinischen Entwicklung oder bereits auf dem Markt.^[15,22,23]

1.3.1 Hydrolysemechanismus von Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Der Katalysemechanismus von Cystein-Proteasen geht mithilfe einer nucleophilen Gruppe und einem Protonendonator von statten, die in allen Cystein-Proteasen durch Cystein und Histidin repräsentiert werden. Einige Cystein-Proteasen benötigen einen dritten katalytisch wirksamen Rest, der für die korrekte räumliche Ausrichtung des Imidazolrings des Histidinrests Sorge trägt.^[15] Das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1) ist hoch konserviert und wird in Papain von der katalytischen Triade bestehend aus Cys²⁵, His¹⁵⁹ und Asn¹⁷⁵ gebildet. Der Asparaginrest ist nicht direkt an der Katalyse beteiligt,

sondern er positioniert und stabilisiert durch eine Wasserstoffbrückenbindung zum Histidinrest das vorliegende präkatalytische Ionenpaar, bestehend aus Cys²⁵ und His¹⁵⁹. Das Cystein-Thiol weist eine ungewöhnlich hohe Acidität auf ($pK_a = 4$). Der nucleophile Angriff des Thiolats des Cysteinrests am Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung führt zu einem negativ geladenen tetraedrischen Intermediat, das durch die Oxyanionentasche (*oxyanion hole*) des Enzyms stabilisiert wird. Die Stabilisierung erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen zur NH₂-Funktion der Seitenkette von Gln¹⁹ und zur backbone-NH-Funktion von Cys²⁵. Die Eliminierung des Amins führt zu einem acylierten Enzym, das im Anschluss durch Wasser über ein zweites tetraedrisches Zwischenprodukt zum freien Enzym und der Carbonsäure hydrolysiert wird (Abb. 1.2, **A-D**).^[13,24]

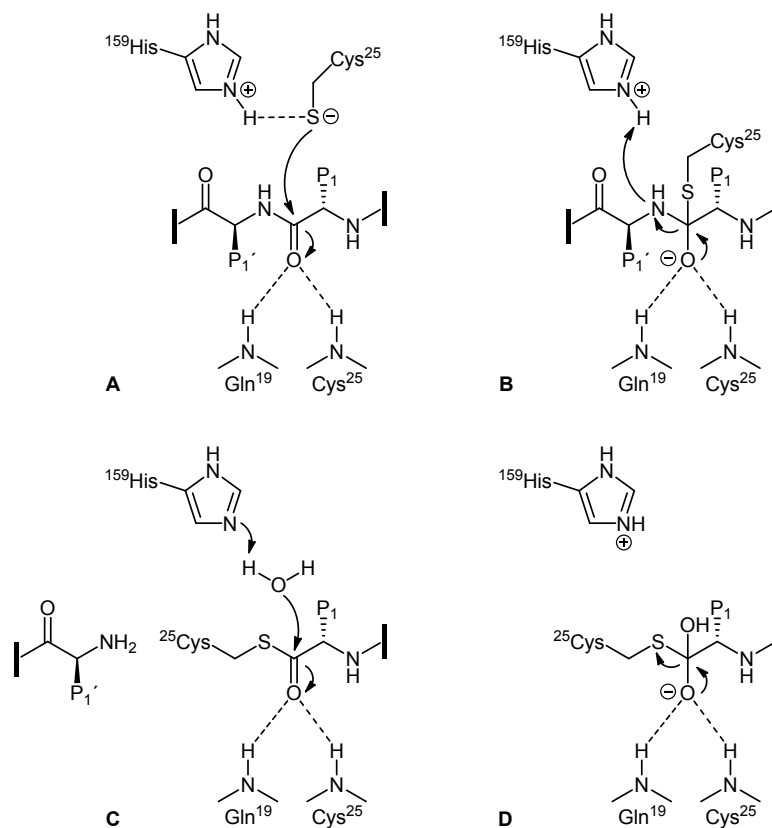


Abb. 1-2: Katalysemechanismus der Hydrolyse am Beispiel von Papain; **A** Nucleophiler Angriff des Thiolats am zu spaltenden Substrat; **B** Bildung des ersten tetraedrischen Intermediats; **C** Eliminierung des C-terminalen Bruchstücks unter gleichzeitiger Bildung des acylierten Enzyms nach Rotation des Histidinrests zum Protonentransfer; **D** Bildung des zweiten tetraedrischen Intermediats durch Angriff von Wasser, anschließende Freisetzung des N-terminalen Bruchstücks und des Enzyms.

Der Mechanismus der Peptidhydrolyse von Serinproteasen verläuft analog. Anstelle des Cysteinrests fungiert ein Serinrest als Nucleophil, dessen Hydroxylgruppe jedoch nicht deprotoniert vorliegt. Dementsprechend ist die Nucleophilie des aktiven Zentrums in Serinproteasen geringer als in Cystein-Proteasen, was zur Entwicklung selektiver Hemmstoffe ausgenutzt werden kann.^[13]

Zur Beleuchtung des Mechanismus der irreversiblen Alkylierung durch einen dreigliedrigen Ring während der Inhibition einer Cystein-Protease wurden in der Arbeitsgruppe Engels, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Würzburg, QM/MM-Berechnungen durchgeführt. Der Mechanismus wurde hinsichtlich der Beteiligung des Histidinrests des aktiven Zentrums betrachtet.^[25] Es wird angenommen, dass die resultierenden Produkte nach der Ringöffnung durch das Thiolat protoniert vorliegen. Die Herkunft des Protons wird dabei noch debatiert. Ergebnisse der QM/MM-Studie an theoretischen Modellsystemen schlagen vor, dass dieses Proton vom protonierten Histidinrest des aktiven Zentrums stammt und über ein Wasserstoffbrückennetzwerk über Wassermoleküle auf den Inhibitor übertragen wird. Dabei wird das Energieprofil der Reaktion beeinflusst. Die Berechnungen schlagen ferner vor, dass die Protonierung des Aziridinrings bereits vor Bildung des Übergangszustands erfolgt, zur Aktivierung im Hinblick auf die Ringöffnung. Folglich sind kinetische und thermodynamische Aspekte beeinflusst. Im Fall von Epoxid-basierten Inhibitoren ist die Protonierung laut der Berechnungen nach der Bildung des Übergangszustands günstiger, sodass lediglich die Thermodynamik der Reaktion beeinflusst wird. Die Rolle des Histidinrests als Protonenquelle wird durch Röntgenstrukturanalysen von Varughese *et al.* untermauert, da der Abstand des Histidinrests für eine direkte Protonenübertragung zu weit entfernt ist.^[26,27]

1.3.2 Vorkommen humaner und parasitärer Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1) stellen die größte und am besten charakterisierte Familie dar. Neben den Caspasen sind die wichtigsten menschlichen Cystein-Proteasen, die der Papain-Familie (CAC1) angehören, die lysosomalen Cathepsine, auch Cystein-Cathepsine genannt, die verschiedenartige und hoch spezifische Funktionen erfüllen. Ihre Anzahl beläuft sich auf elf (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und W). Daneben gibt es innerhalb der Gruppe der Cathepsine Proteasen, die den Serinproteasen (Cathepsin A und G) und den Aspartat-Proteasen (Cathepsin D und E) angehören. Außer Cathepsin E und G befinden sich alle Cathepsine hauptsächlich in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten, weswegen sie als lysosomale Cathepsine bezeichnet werden.^[13,28,29] Das endosomale/lysosomale System und das Ubiquitin-Proteasom-System stellen die beiden Hauptsysteme zur intrazellulären Proteindegradation dar. Das endosomale/lysosomale System begleitet zahlreiche Funktionen in normalen und pathologischen Prozessen. Neben Proteasen enthalten Lysosomen weitere Hydrolasen, Amylasen, Lipasen und Nucleasen. Die meisten Cathepsine erreichen ihre optimale Aktivität in reduzierendem und leicht saurem Milieu, was ihnen volle Aktivität im Lysosom erlaubt (pH-Wert im Lysosom ist ca. 5), wohingegen sie bei neutralem pH-Wert instabil sind. Eine Ausnahme ist

Cathepsin S, welches in neutralem und leicht basischem Milieu stabil ist.^[13,28] Die Mehrzahl der Cathepsine, wie Cathepsin B, H, L, C, X, F, O und V, ist überall in menschlichem Gewebe exprimiert, was darauf schließen lässt, dass sie im normalen zellulären Proteinumsatz involviert sind. Im Gegensatz dazu zeigen Cathepsin K, W und S eine begrenzte Zell- oder Gewebe-spezifische Verteilung, was auf spezifischere Funktionen hindeutet. Cathepsin K ist beispielsweise vorwiegend exprimiert in Osteoklasten (knochenabbauende Zellen), in vielen Epithelzellen und Fibroblasten der Gelenkinnenhaut, Cathepsin W in CD8⁺-Lymphozyten und NK-Zellen und Cathepsin S in Antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, B-Lymphozyten).^[28] Lediglich zwei seltene Krankheiten lassen sich auf Mangel an Proteasen zurückführen. Ein genetisch bedingtes Cathepsin K-Defizit verursacht Pyknodysostose, eine sehr seltene Knochenkrankheit, die zu den Lysosomalen Speicherkrankheiten zählt.^[29] Cathepsin C-Defizit verursacht durch eine Mutation im entsprechenden Gen das Papillon-Lefèvre-Syndrom, was zu übermäßiger Verhornung von Händen und Füßen und parodontalen Destruktionen führt. Die meisten Krankheiten werden durch Überexpression der entsprechenden Proteasen ausgelöst und Cathepsine spielen hier eine Rolle im Zusammenhang mit Krebs, degenerativen, Entzündungs- und Immunerkrankungen.^[24] In der rheumatoiden Arthritis sind z. B. Cathepsine durch Spaltung von Kollagen direkt involviert in die Zerstörung von Gelenken sowie indirekt durch Modulation der Immunantwort, was durch *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien gezeigt werden konnte. Demnach sind Cathepsin K und S attraktive Zielstrukturen zur Wirkstoffentwicklung.^[29] Da Cathepsin K in Osteoklasten hauptsächlich an der Knochenresorption beteiligt ist, befinden sich reversible Inhibitoren des Enzyms zur Behandlung von Osteoporose in der klinischen Entwicklung.^[6] In Tumoren sind Cystein-Cathepsine sowie auch MMPs (*matrix metalloproteinases*) und Serinproteasen hochreguliert. Bislang erwies sich allerdings noch kein Ansatz zur Hemmstoffentwicklung als zielführend.^[6,30]

Protozoen weisen eine Vielzahl von Proteasen auf, unter ihnen Serinproteasen, Metalloproteasen, Aspartat-Proteasen und Cystein-Proteasen, die die größte Gruppe darstellen. Parasitären Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1) kommen Schlüsselfunktionen im Lebenszyklus von protozoischen Parasiten oder in der Pathogenese der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten zu. Diese schließen Veränderungen von Oberflächenproteinen zur Invasion von Wirtszellen, Verdauung von Wirtspoteinen zur Ernährung und Modulation der Immunantwort des Wirts ein. Sie sind folglich Ziel der Entwicklung antiparasitärer Antiinfektiva. Im Gegensatz zu viralen Proteasen existieren zu den parasitären Proteasen homologe humane Proteasen. Ziel des Inhibitor-Designs ist somit, sehr potente und hoch selektive Inhibitoren zu identifizieren, die ähnliche Proteasen des Wirts nicht inhibieren. Während die humanen Proteasen der Papain-Familie (CAC1) vorwiegend intrazellulär sind, erfüllen die parasitären Homologe hauptsächlich extra-, aber auch

intrazelluläre Funktionen. Dies ist in Übereinstimmung mit ihrem pH-Optimum, das bei den meisten im neutralen oder schwach basischen Bereich liegt.^[13,24,31,32] Vielversprechende Studien mit selektiven Cystein-Protease-Inhibitoren validierten diese Proteasen bereits als Targets.^[24,33] Tabelle 1.2: gibt eine Übersicht der Cystein-Proteasen (CAC1) von Infektionserregern, bei denen es sich um Leishmanien (Leishmaniose), Trypanosomen (Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas-Krankheit), Plasmodien (Malaria) und Schistosomen (Schistosomiasis = Bilharziose) handelt.^[15,22,24,34,35]

Tab. 1-2: Proteasen der Papain-Familie (CAC1) von parasitären Erregern, deren Funktion und die hervorgerufene Krankheit.

Erreger	Proteasen	Klasse: Clan/Familie (Subfamilie)	Bedeutung	Krankheit
Leishmanien	CPA (CL-ähnlich)	CA/C1 (A)	Wachstum, Entwicklung, Wirt-Parasit-Interaktion	Leishmaniose
	CPB (CL-ähnlich)			
	CPC (CB-ähnlich)			
Trypanosomen	Rhodesain, Brucipain (CL-ähnlich)	CA/C1 (A)	nicht geklärt, ob essentiell, ZNS-Stadium des Erregers	Afrikanische Schlafkrankheit
	TbCatB (CB-ähnlich)		essentielle Protease in allen Stadien	
	Cruzain (= Cruzipain, CL-ähnlich)	CA/C1 (A)	essentielle Protease in allen Stadien	Chagas- Krankheit
Plasmodien	Falcipain-2, 2', 3 (CL-ähnlich)	CA/C1 (A)	Hämoglobinabbau in der Nahrungsvakuole, Wirt- Parasit-Interaktion	Malaria
Schistosomen	SmCB1 (= Sm31, CB-ähnlich)	CA/C1 (A)	Hämoglobinabbau, Wirt- Parasit-Interaktion, Umgehen der Immunantwort des Wirts	Schistosomiasis
	SmCL1 (CF-ähnlich)			
	SmCL2 (CL-ähnlich)			
	Sm/SjCC (CC-ähnlich)			

CB = Cathepsin B, CC = Cathepsin C, CF = Cathepsin F, CL = Cathepsin L, Sm = *S. mansoni*, Sj = *S. japonicum*

Leishmanien exprimieren eine Vielzahl von Cystein-Proteasen, die essentiell sind für Wachstum, Differenzierung, Pathogenität und Virulenz des Parasiten.^[36-38] Das Genom von *Leishmania major* z. B. codiert für 65 Cystein-Proteasen, die in vier Clans (CA, CD, CF, PC(C)) und 13 Familien gruppiert werden.^[37] Davon sind CPA, CPB und CPC der Papain-Familie (CAC1) die am besten charakterisierten, sie sind lokalisiert in Megasomen (große lysosomale Organelle). Gezielte Ausschaltung der codierenden Gene (*knock-out*) für CPA und CPB von *L. mexicana* resultierte in einer Reduktion der Virulenz in infizierten Mäusen und führte zu einer Verschiebung von einer die Infektion begünstigenden Th2- zu einer

protektiven Th1-Immunantwort des Wirts.^[39] Ausschaltung des CPC-Gens zeigte *in vivo* geringe Effekte, *in vitro* war die Infektion von Makrophagen mittels der mutierten Promastigoten allerdings stark beeinträchtigt, was darauf schließen lässt, dass die Hauptrolle von CPC in der Invasion von Promastigoten liegt.^[40,41] Im Tierversuch zeigten sich Cystein-Protease-Inhibitoren als wirksam, ohne jedoch eine vollständige Heilung zu erzielen und ohne in den verwendeten Dosen toxisch zu sein.^[42]

Der Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit beim Menschen ist *Trypanosoma brucei rhodesiense*, er exprimiert zwei Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1), Rhodesain (Brucipain im tierpathogenen *T. brucei brucei*) und TbCatB. Die Rolle von Rhodesain ist strittig. Rhodesain wurde viele Jahre als hauptverantwortlich für die proteolytische Aktivität des Erregers gehalten, die es zu hemmen galt. Neuere Studien zeigen jedoch, dass TbCatB von essentiellerer Natur ist, auch wenn Rhodesain reichlicher vorhanden ist. Ausschaltung der TbCatB-Expression durch RNA-Interferenz (RNA_i) resultiert in *In-vitro*-Studien in Anschwellung endosomaler Kompartimente, Stopp der Trypanosomenreplikation und schließlich deren Absterben. Im Gegensatz dazu ruft Ausschaltung von Rhodesain keine Veränderung des Phänotyps hervor. Im Tiermodell konnte die *T. brucei brucei* Infektion durch Ausschalten von TbCatB geheilt werden, während die Infektion bei Ausschaltung von Brucipain keine Heilung, allerdings eine Verlängerung des Überlebens der Hälfte der infizierten Mäusen bewirkte. Weiterführende Experimente bringen Brucipain mit der Ermöglichung der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke für den Parasiten in Verbindung.^[43-45] Neueste *In-vitro*-Studien mit Cathepsin-L-selektiven und Cathepsin-B-selektiven Cystein-Protease-Inhibitoren sehen Rhodesain nun wieder von essentiellerer Natur für das Überleben des Parasiten als TbCatB.^[46] Auch erwiesen sich Cystein-Protease-Inhibitoren *in vivo* als wirksam.^[43-45]

Die zweite von Trypanosomen verursachte Infektionskrankheit ist die Chagas-Krankheit, hervorgerufen durch den Parasiten *T. cruzi*. Schlüsselenzym in allen Stadien des Lebenszyklus des Erregers ist Cruzain. Auch in diesem Fall sind Cystein-Protease-Inhibitoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirksam und zudem in der Lage, die Krankheit zu heilen. Es befindet sich sogar ein Wirkstoff in späten Stadien präklinischer Entwicklung und weitere Nachfolgesubstanzen befinden sich in präklinischen Studien.^[47-49]

Der virulenteste Erreger unter den Plasmodien ist *Plasmodium falciparum*. Bereits validierte Targets zur Wirkstofffindung sind die Cystein-Proteasen Falcipain-2, -2' und -3 (Falcipain-2' ist ein Isoenzym von Falcipain-2). Sie sind vornehmlich lokalisiert in den sauren Nahrungsvakuolen der Parasiten, was im Einklang steht mit ihrer Funktion des Hämoglobinverdaus. Tierversuche mit infizierten Mäusen lieferten zudem erfolgversprechende Ergebnisse im Hinblick auf deren Heilung.^[50,51]

Die Forschung an Schistosomen fokussiert sich hauptsächlich auf den Erreger *Schistosoma mansoni*. Die Cystein-Protease SmCB1 der Papain-Familie (CAC1) ist von besonderem Interesse als mögliche Zielstruktur für Arzneistoffe. SmCB1 ist eine Darm-assoziierte Protease, die Proteine aus dem Blut des Wirts zur Ernährung verdaut.^[52]

Ein weiteres Ziel innerhalb der Arzneimittelentwicklung und Diagnostik ist die Identifizierung von Biomarkern, wozu auch Cystein-Proteasen herangezogen werden können. Cystein-Cathepsine wurden beispielsweise als Biomarker für Krebs vorgeschlagen und Cathepsin B für Arthritis. Auch Cruzain wird in dieser Hinsicht als interessant erachtet.^[6]

1.3.2.1 Parasitär verursachte Infektionskrankheiten

Von Parasiten verursachte Infektionskrankheiten betreffen mehrere hundert Millionen Menschen und resultieren in signifikanter Mortalität und verheerenden sozialen und ökonomischen Konsequenzen (Tab. 1-3). Dennoch wurde der Entwicklung von Medikamenten und Impfstoffen vonseiten der pharmazeutischen Industrie nicht viel Aufmerksamkeit zuteil. Hauptsächlich betroffen sind arme Regionen in Afrika, Asien und Lateinamerika, sodass der Hauptgrund für die Vernachlässigung in der Ökonomie begründet liegt. Verfügbare Medikamente sind Jahrzehnte alt und haben viele Einschränkungen, wie z. B. starke Nebenwirkungen und die Entwicklung von Resistenzen.^[32,53]

Tab. 1-3: Parasitäre Infektionskrankheiten, deren Erreger und geschätzte Anzahl an Infektionen.

Krankheit	Erreger	Umfang in Zahlen
Malaria	<i>Plasmodium</i> spp.	500 Mio Ansteckungen jährlich
Leishmaniose	<i>Leishmania</i> spp.	2 Mio Ansteckungen jährlich
Afrikanische Schlafkrankheit	<i>Trypanosoma brucei</i>	300 000 Fälle jährlich
Chagas-Krankheit	<i>Trypanosoma cruzi</i>	16 Mio existierende Infektionen
Schistosomiasis	<i>Schistosoma</i> spp.	> 200 Mio existierende Infektionen

spp. = *species pluralis*

Die WHO (World Health Organization) benennt 17 NTDs (*neglected tropical diseases*), wobei von den in Tabelle 1-3 genannten Malaria nicht darunter fällt. Unter ihnen gibt es die Gruppe der „*most neglected diseases*“, bestehend aus Leishmaniose, der Afrikanische Schlafkrankheit und der Chagas-Krankheit, da sie diejenigen Infektionserkrankungen mit den höchsten Todesraten sind.^[53]

1.3.2.1.1 Leishmaniose

Hauptsächlich von Leishmaniose betroffen sind Entwicklungsländer. Durch Tourismus und globale Klimaerwärmung tritt sie jedoch auch zunehmend in Industriestaaten, wie z. B. den Mittelmeer-Anrainerstaaten auf. Hervorgerufen wird die Krankheit durch mehr als 20 Spezies der protozoischen Parasiten der Gattung *Leishmania*, die weiter aufgegliedert werden kann in zwei Subgattungen, *Viannia* und *Leishmania*. Als Vektoren dienen ca. 30 Spezies der weiblichen Sandmücke der Gattungen *Phlebotomus* (in der „Alten Welt“ = Afrika, Asien, Europa) und *Lutzomyia* (in der „Neuen Welt“ = Amerika). Das klinische Bild ist abhängig von komplexen Interaktionen der Virulenz der infizierenden Spezies und der Immunantwort des Wirts und reicht von lokal bis diffus. Übergänge zwischen den Verlaufsformen sind möglich. So kann eine Spezies mehr als eine klinische Erscheinungsform generieren sowie eine klinische Erscheinungsform kann von mehreren Spezies hervorgerufen werden. Die drei Hauptkrankheitsformen sind kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniose. Kutane Leishmaniose (lat. cutis = Haut, Synonym: Orientbeule) befällt die Haut, an der Stichstelle entsteht eine papulöse Entzündung, die zur entzündlichen Geschwürbildung führt. Nach Monaten bis hin zu Jahren tritt Selbstheilung auf, zurück bleiben Narben. Hervorgerufen wird die kutane Leishmaniose meist durch *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* in der „Alten Welt“ und *L. braziliensis*, *L. mexicana* und verwandte Spezies in der „Neuen Welt“. Der Erreger der mukokutanen Leishmaniose (lat. mucus = Schleim, Synonym: Espundia) ist meist *L. braziliensis*. Läsionen verursachen Entzündungen der Nasenschleimhaut, was fortschreitend zur Zerstörung der Schleimhaut sowie der Bindegewebe- und Knorpelstrukturen von Nasen-Rachen-Raum, der Nase und der Lippen führt. Diese Verlaufsform ist nicht selbstheilend. Die gefährlichste und schwerste Form ist die viszerale Leishmaniose (lat. viscera = Eingeweide, Synonyme: Kala Azar, Dum-Dum-Fieber, Kalkuttafieber), da die inneren Organe befallen werden. In erster Linie sind Lymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark betroffen. Es kommt zu Fieber und Schwellung der Milz, der Leber und den Lymphknoten. Unbehandelt tritt der Tod bei mehr als 90 % der Patienten nach sechs Monaten bis zwei Jahren ein. Die Hauptgründe sind Blutungen, Anämie und Sekundärinfektionen. In den meisten Fällen sind die Erreger *L. donovani* und *L. infantum*.^[54-56]

Eine besondere Risikogruppe stellen HIV-Infizierte dar, da sie immunsupprimiert sind. Die Mortalitätsrate von Patienten koinfiziert mit viszeraler Leishmaniose ist deutlich höher als bei alleiniger Infektion mit Leishmaniose. Auch sind antileishmaniale Therapien weniger effektiv.^[57]

Im Lebenszyklus des Parasiten nimmt dieser zwei unterschiedliche Formen an. Im Vektor liegt er extrazellulär in begeißelter Form (Promastigot) vor und im Wirt in unbegeißelter Form (Amastigot), die sich intrazellulär entwickelt. Im Vektor leben die Promastigoten zunächst im

Darm. Durch einen Stich werden sie durch den Speichelapparat in die Haut des Wirts übertragen, wo sie von Makrophagen aufgenommen werden. Sie reifen zu Amastigoten, vermehren sich in Phago lysosomen, zerstören die Wirtszelle und infizieren weitere phagozytische Zellen. Dies findet bei kutaner und mukokutaner Leishmaniose im Bereich der Einstichstelle statt, bei viszeraler Leishmaniose in lokalen Lymphknoten. Durch das lymphatische und vaskuläre System können sich die Amastigoten verbreiten und in Knochenmark, Leber und Milz eindringen. Bei erneutem Stich des Wirts durch eine nicht infizierte Sandmücke werden die Amastigoten aufgenommen, differenzieren im Darm zur infektiösen promastigoten Form, wandern zum Speichelapparat und können bei der nächsten Blutmahlzeit übertragen werden.^[55,56,58] Leishmanien haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um die Immunabwehr des Wirts zu unterlaufen. So erreichen sie die Makrophagen mit der Strategie des „Trojanischen Pferds“, indem sie die Immunantwort des Wirts von der Th1-Antwort (zuständig für zellvermittelte Abwehr des erworbenen Immunsystems, erfolgt hauptsächlich über T-Lymphozyten und Makrophagen) in die Th2-Antwort (humorale Immunantwort, Abwehr von Krankheitserregern, die in die Körperflüssigkeiten Blut und Lymphe eindringen) ändern, die nicht in der Lage ist, die Parasiten zu bekämpfen. In diesem Zusammenhang spielt die Ausschüttung von Zytokinen (Botenstoffen) eine Rolle, die Konzentrationen von Interleukin-4 (IL-4, Interleukine sind Peptidhormone) und IL-10 nehmen zu, während die von IL-12, Interferon- γ (IFN- γ , Glykoprotein) und Stickstoffmonoxid abnehmen.^[59]

Konventionell eingesetzte Medikamente zur Behandlung sind die fünfwertigen Antimonverbindungen Glucantime[®] und Pentostam[®], Amphotericin B (z. B. AmBisome[®], liposomal formuliertes Amphotericin B), Pentamidin (Pentacarinat[®]), Miltefoson (Impavido[®]), welches oral bioverfügbar ist und Paromomycin. Einige weitere Substanzen befinden sich in klinischer Entwicklung. Die Einschränkungen dieser Therapien sind nach wie vor Toxizität, lange Einnahmedauer, oft parenterale Verabreichung, hohe Kosten und die Entwicklung von Resistenzen. Daher ist es nicht nur wichtig Kombinationen von eingesetzten Mitteln zu erproben, um Resistenzen zu vermeiden, sondern auch neue Antiinfektiva mit neuen Wirkmechanismen sowie Impfungsstrategien zu entwickeln.^[60-62]

1.3.2.1.2 Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas-Krankheit, Malaria und Schistosomiasis

Die Afrikanische Schlafkrankheit (humane afrikanische Trypanosomiasis = HAT) wird von infizierten Tsetsefliegen (*Glossina* ssp.) auf den Menschen übertragen. Der für den Menschen pathogene Erreger ist *T. brucei*. Nach Infektion vermehren sich die Parasiten in Lymphknoten und Blut, verursachen Fieberschübe, Schwäche, Kopf- und Gelenkschmerzen.

Nach Wochen bis hin zu Monaten durchdringen sie die Blut-Hirn-Schranke und invadieren das Zentralnervensystem, wo sie schwere neurologische und psychiatrische Störungen hervorrufen. Das Endstadium ist die charakteristische Erscheinung des apathischen Patienten. Im Menschen tritt die HAT in Abhängigkeit von der infizierenden Subspezies in zwei Krankheitsbildern auf, *T. brucei rhodesiense* verursacht die ostafrikanische Schlafkrankheit (akuter Verlauf) und *T. brucei gambiense* die westafrikanische Schlafkrankheit (chronischer Verlauf). Beide Verlaufsformen führen unbehandelt zum Tod.^[53,63]

Der Auslöser der Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomiasis) ist der Parasit *T. cruzi*, der durch nachtaktive, blutsaugende Raubwanzen der Familie *Reduviidae* oder auch oft über kontaminiertes Essen, Bluttransfusionen oder Organtransplantationen übertragen wird. Der Parasit lebt im Wirt intrazellulär im Zytoplasma und kann eine systemische oder eine akute Infektion auslösen. Während der akuten Phase können potentiell alle Zellen infiziert werden. Betroffen sind Herz, Verdauungsorgane und Nervensystem. Patienten sterben meist durch Herzrhythmusstörungen, ausgelöst durch persistierende Parasiten.^[41,53]

Malaria ist die wichtigste tropische Infektionskrankheit mit der größten Anzahl Infizierter und der höchsten Sterblichkeit. Hervorgerufen durch fünf für den Menschen pathogene Spezies des Parasiten der Gattung *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*) ist nahezu ausschließlich *P. falciparum* für die potentiell tödlich verlaufende Malaria tropica verantwortlich. Überträger sind infizierte, weibliche Mosquitos der Gattung *Anopheles*. Nach dem Stich gelangen die Erreger in die menschliche Blutbahn, von wo aus sie zunächst Leberzellen befallen und sich dort vermehren. Noch verspürt der Infizierte nichts und eine Diagnose ist noch nicht möglich. Nach einigen Tagen platzt die Leberzelle und entlässt die Merozoiten in die Blutbahn, wo diese sodann Erythrozyten befallen, sich vermehren und auch diese zum Platzen bringen. Tage später entstehen außerdem Gametozyten, die zurück im Mosquito die sexuelle Vermehrung ermöglichen. Die zyklische Vermehrung von Parasiten in den Erythrozyten, die die Zerstörung der Wirtszelle mit sich bringt, führt im Patienten zu den typischen Fieberschüben. Das klinische Bild der Malaria tropica äußert sich in hohem, meist unregelmäßigem Fieber, heftigen Kopf- und Gliederschmerzen, rascher Verschlechterung des Allgemeinzustands und auch ein Multiorganversagen ist möglich. Zur Behandlung wird u. a. Chloroquin eingesetzt, auch findet medikamentöse Prophylaxe Anwendung.^[64,65]

Die Erreger der Schistosomiasis (Bilharziose) sind Pärchenegel der fünf Spezies *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* und *S. mekongi*. Der Mensch kann sich mit den im Süßwasser lebenden Larven (Zerkarien) infizieren, die durch die Haut eindringen. Zunächst kann es zu einem juckenden Hautausschlag, der Zerkariendermatitis, kommen. Die Zerkarien wachsen zu jungen Würmern heran (Schistosomula) und wandern

durch die Blutbahn zu Lunge und Leber. Die erwachsenen Würmer (Schistosomen, 1-2 cm Größe) leben dann als Pärchenegel in den Blutgefäßen besonders des Darms und der Harnblase. Zwei bis drei Wochen nach der Zerkariendermatitis kann es zu Fieber, Schüttelfrost, Entzündungen des Nervensystems, Husten und Durchfall kommen. Mehrere Wochen später folgen Bauchschmerzen und blutige Durchfälle (Darm-Bilharziose) oder Blasenentzündungen und Blut im Urin (Urogenital-Bilharziose). Zur Therapie wird der Arzneistoff Praziquantel eingesetzt. Die Eier von Schistosomen gelangen in Urin und Stuhl, wo sie einerseits diagnostiziert werden können, andererseits können sie so in Gewässer gelangen. Dort schlüpfen Wimpernlarven (Mirazidium), die bestimmte Süßwasserschnecken infizieren und als Zwischenwirte nutzen. Sie reifen zu Zerkarien, vermehren sich und gelangen aus der Schnecke zurück ins Wasser, wo sie Säugetiere infizieren können.^[53]

1.3.3 Struktur und Substratspezifität von Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Strukturell fallen Cystein-Proteasen in drei Hauptkategorien: Picorna-viral (Chymotrypsin-ähnlich, anstelle von Ser ist Cys im aktiven Zentrum), Papain-ähnlich und Caspase-ähnlich. Bei den meisten Cystein-Proteasen ist das aktive Zentrum relativ flach und *solvent-exposed*.^[10] Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1) weisen ähnliche Aminosäuresequenzen und Faltungen auf. Sie werden zunächst als Präproenzyme hergestellt, bestehend aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und der katalytischen Domäne. Im Falle der Cystein-Cathepsine wird nach der Abspaltung des Signalpeptids während des Durchgangs zum Endoplasmatischen Retikulum glykolisiertes Propeptid durch proteolytische Prozessierung im endosomalen/lysosomalen System zur aktiven Form gespalten. Die Prodomäne erfüllt drei Funktionen, sie sorgt für die richtige Lokalisation und Faltung und fungiert als hochaffiner, reversibler Inhibitor, um vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Die Aktivierung erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Proteasen. Im inaktivierten Zustand des Enzyms bindet das Propeptid im aktiven Zentrum in gestreckter Konformation in umgekehrter Richtung als das Substrat. Nach der Abspaltung des Propeptids dissoziiert es vom Enzym und wird von anderen Proteasen degradiert. Die katalytische Domäne ist die am höchsten konservierte der drei Domänen. Ähnlich zur konservierten Sequenz in der Nachbarschaft des katalytisch aktiven Cysteinrestes sind auch die Regionen des Histidin- und des Asparaginrests hoch konserviert.^[24,66]

Auch die dreidimensionale Faltung ist hoch konserviert, bestehend aus einer L- (left) und einer R-Domäne (right) ähnlicher Größe, ähnlich der Struktur von Papain (Abb. 1-3, **A**). Der Cysteinrest des aktiven Zentrums befindet sich in einer strukturell konservierten und zentralen α -Helix in der L-Domäne, wohingegen der Histidinrest in der β -Faltblatt-Struktur der

R-Domäne lokalisiert ist. Die beiden katalytischen Reste bilden das Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar in der Mitte der *active site cleft*.^[24,66]

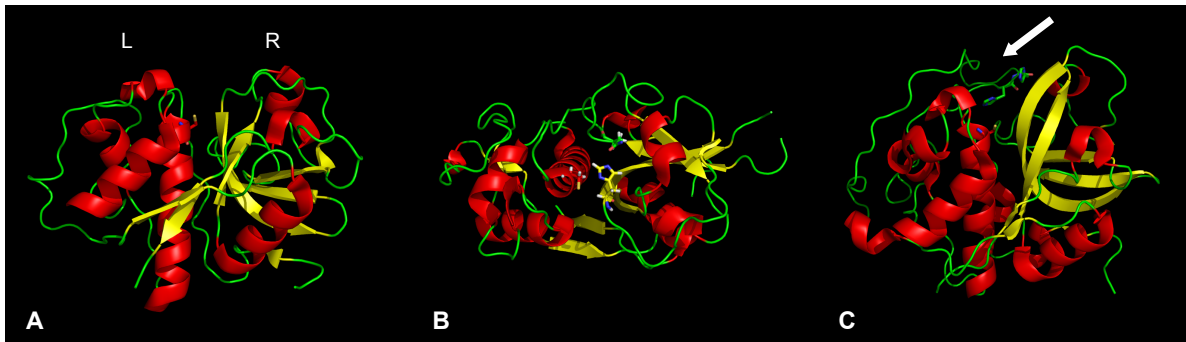


Abb. 1-3: **A** Struktur von Papain, bestehend aus einer L- und einer R-Domäne (1cvz^[67]), gekennzeichnet ist Cys²⁵ des aktiven Zentrums; **B** Struktur von humanem Cathepsin L (2yj8^[68]), gekennzeichnet sind Cys²⁵, His¹⁶³ und Asn¹⁸⁷ der katalytischen Triade; **C** Struktur von humanem Cathepsin B (1gmy^[69]), der Pfeil markiert die *occluding loop*, weiterhin sind Cys²⁹ des aktiven Zentrums und His¹¹⁰ und His¹¹¹ des *occluding loop* gekennzeichnet (Strukturen sind der PDB^[70] entnommen und mit PyMOL^[71] generiert).

Innerhalb der Papain-Familie kann man humane und parasitäre Cystein-Proteasen aufgrund Ähnlichkeiten der Sequenzen der katalytischen Domänen in drei Subfamilien gliedern: Cathepsin-L-, Cathepsin-B- und Cathepsin-F-ähnlich. Cathepsin B (Abb. 1-3, **C**) verfügt zusätzlich im Vergleich zu Cathepsin L (Abb. 1-3, **B**) und F über Exoproteaseaktivität. Während sich in Endoproteasen die *active site cleft* über die ganze Länge der Schnittstelle der beiden Domänen (*inter-domainal interface*) erstreckt, ist die Zahl der Bindungsstellen bei den Exoproteasen reduziert.^[24,66] In Cathepsin B geschieht dies durch den *occluding loop*, der Teile der *primed site* verdeckt. Der für die Carboxyprotease-Aktivität verantwortliche *occluding loop* ist eine Sequenz aus 18 Aminosäuren, innerhalb derer zwei benachbarte, positiv geladene Histidinreste (His¹¹⁰ und His¹¹¹, Cathepsin-B-Nummerierung) für die Positionierung der C-terminalen Carboxylgruppe in P₂'-Position des Substrats zuständig sind, um die proteolytische Abspaltung eines C-terminalen Dipeptids zu ermöglichen. Aus diesem Grund ist die Endoproteaseaktivität relativ gesehen geringer.^[72,73] Unterschiede treten bei verschiedenen pH-Werten auf, bei niedrigem pH-Wert agiert Cathepsin B als Exoprotease (*occluding loop* bindet an *primed site*), bei neutralem pH-Wert als Endoprotease.^[74]

Die Substratspezifität ist abhängig von der Beschaffenheit der Bindungstaschen der Enzyme. Die Bindungstaschen der *non-primed site* (S₁,...) binden den N-Terminus eines Substrats und die Bindungstaschen der *primed site* (S₁',...) den C-Terminus. Die Spezifität von Cathepsin L ist bestimmt durch Aminosäuren mit großer, hydrophober Seitenketten in P₂-Position,^[75] in P₁'-Position sind kleine, oder lange, aber unverzweigte Reste bevorzugt.^[76] Cathepsin B weist eine relativ breite Spezifität auf mit Präferenz für basische Reste oder Phenylalanin in P₂-Position,^[72] während in P₁'-Position große, hydrophobe Reste bevorzugt werden.^[76] Bei AMC-Substraten, die standardmäßig in fluorimetrischen Enzymassays verwendet werden

und bei denen AMC als fluoreszierende Abgangsgruppe fungiert, besteht ein Unterschied zwischen Cathepsin L und Cathepsin B in der P₂-Präferenz. Cathepsin B ist in der Lage Z-Phe-Arg-AMC und Z-Arg-Arg-AMC zu spalten, wohingegen Cathepsin L lediglich Z-Phe-Arg-AMC hydrolysiert.

Wie in Kapitel 1.3.2 (Tab. 1-2) bereits erwähnt, weisen parasitäre Cystein-Proteasen der Papain-Familie (CAC1) strukturelle Ähnlichkeiten zu Cystein-Cathepsinen auf und werden daher u. a. als Cathepsin-L-ähnlich und Cathepsin-B-ähnlich eingestuft. So sind CPA und CPB von Leishmanien, Rhodesain und Cruzain von Trypanosomen und Falcipain-2 von Plasmodien Cathepsin-L-ähnlich und teilen auch die Substratspezifität für Z-Phe-Arg-AMC, CPC von Leishmanien und TbCatB von Trypanosomen sind Cathepsin-B-ähnlich. Obwohl Cruzain Cathepsin-L-ähnlich ist, ist es ebenso in der Lage, Z-Arg-Arg-AMC zu spalten.^[77] Dagegen hydrolysiert CPC von *L. major* (LmajcatB) trotz struktureller Homologie zu Cathepsin B nicht Z-Arg-Arg-AMC, sondern lediglich Z-Phe-Arg-AMC und weist somit die P₂-Spezifität von Cathepsin L auf. Zurückzuführen ist dies laut computergestützten Homologiemodellen auf einen Glutamatrest in der S₂-Bindungstasche, an dessen Stelle sich in LmajcatB ein Glycinrest befindetet, welcher im Vergleich zu Cathepsin B eine größere und hydrophobere Tasche bildet.^[78] Abbildung 1-5 zeigt den hohen Grad der Homologie der Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Proteasen Rhodesain, Cruzain und Falcipain-2 durch Überlagerung mit Cathepsin L (Abb. 1-4, **A**) und der Cathepsin-B-ähnlichen Protease TbCatB durch Überlagerung mit Cathepsin B (Abb. 1-4, **B**).

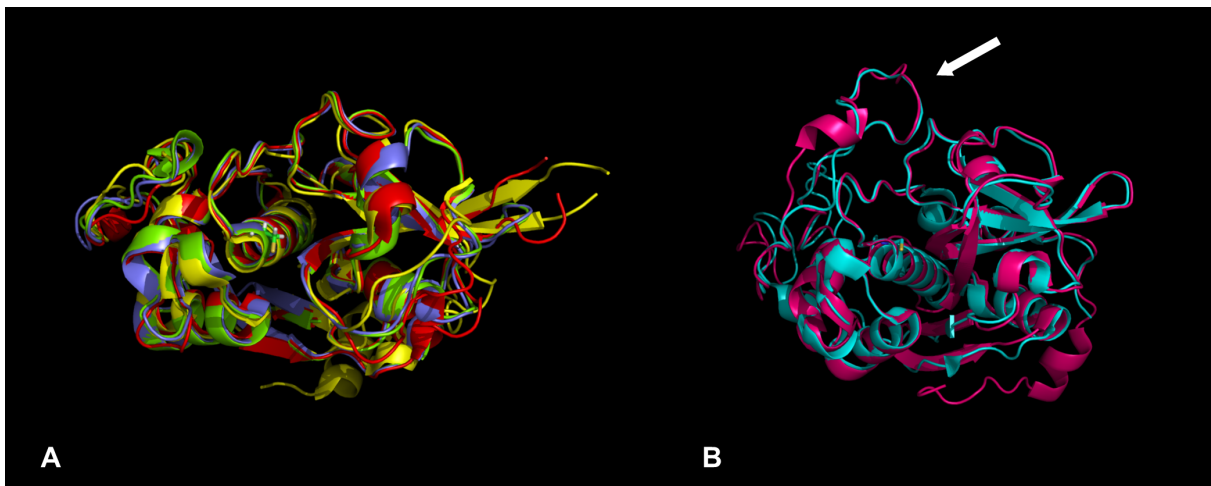


Abb. 1-4: **A** Überlagerung der Strukturen Cathepsin-L-ähnlicher Cystein-Proteasen des Clans CA, Familie C1: humanes Cathepsin L (rot, 2yj8^[68], gekennzeichnet ist Cys²⁵ des aktiven Zentrums), Rhodesain (grün, 2p7u^[79], Cruzain (hellblau, 3i06^[80]), Falcipain-2 (gelb, 3bpf^[81]); **B** Überlagerung der Cathepsin-B-ähnlichen Cystein-Protease TbCatB (lila, 3hhi^[82]) mit humanem Cathepsin B (türkis, 1gmy^[69], der Pfeil markiert den *occluding loop*, gekennzeichnet ist Cys²⁹ des aktiven Zentrums) des Clans CA, Familie C1 (Strukturen sind der PDB^[70] entnommen und mit PyMOL^[71] generiert).

Von den *Leishmania*-Proteasen CPA, CPB und CPC existieren noch keine Kristallstrukturen, allerdings sagen Homologiemodelle von CPB und CPC von *L. major* eine ähnliche Struktur der CPB mit Cathepsin L und der CPC mit Cathepsin B voraus.^[83]

1.4 Inhibitoren von Cystein-Proteasen

Die Klassifizierung von Inhibitoren basiert auf dem Unterschied, ob das aktive Zentrum (*active site directed*, kompetitive Inhibitoren) oder eine allosterische Stelle (allosterische Inhibitoren) des Enzyms adressiert wird. Weiterführend werden kompetitive Inhibitoren eingeteilt in kovalent/nicht kovalent und reversibel/irreversibel.^[13] Die pharmazeutische Industrie favorisiert reversible Inhibitoren aufgrund möglicher, starker Nebenwirkungen irreversibler Inhibitoren, insbesondere bei Langzeitanwendung. Jedoch bieten irreversible Inhibitoren großes Potential, wenn sie in angemessenen therapeutischem Kontext eingesetzt werden, z. B. in der kurzzeitigen Anwendung zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Bei der Entwicklung irreversibler Inhibitoren ist Nutzen gegen Risiko abzuwägen und die Wirksamkeit und Sicherheit muss gewährleistet sein, um Vorteile gegenüber reversiblen Inhibitoren zu bieten.^[9,12]

Da bei den meisten Cystein-Proteasen das aktive Zentrum relativ flach und *solvent-exposed* ist, sind die meisten peptidischen Inhibitoren zwei bis vier Aminosäuren lang, nicht peptidische Inhibitoren dementsprechend. Sie interagieren meist mit der *non-primed site*.^[10] Peptidische und peptidomimetische Cystein-Protease-Inhibitoren bestehen grundsätzlich aus einer Peptiderkennungssequenz, die für gute Affinität zwei oder mehr Aminosäuren enthält und einer reaktiven Gruppe, die mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums in Reaktion tritt. Die Literatur beschreibt als reversible Inhibitoren u. a. Aldehyde, Semicarbazone, Trifluormethylketone, α -Ketoamide und Nitrile. Sie sind Übergangszustandsanaloge und bilden mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums ein tetraedrisches Zwischenprodukt.^[13] Irreversible Inhibitoren verfügen über einen *warhead*, der irreversibel an den katalytisch aktiven Cysteinrest der Protease bindet. Unterschieden werden Alkylierungs- und Acylierungsreagenzien. Der Kategorie der Alkylierungsreagenzien gehören Halomethylketone, Diazomethylketone, Acyloxymethylketone, Methylsulfoniumsalze, Azodicarboxamide, Vinylsulfone, Epoxide, α,β -ungesättigte Ketone und Aziridine an. Die Gruppe der Acylierungsreagenzien umfasst Azapeptide, Acylhydroxamate, β -Lactame sowie einige Heterozyklen-basierte Verbindungen.^[13,84]

Peptidomimetika enthalten isostere Baugruppen, um die unerwünschten Eigenschaften von Peptiden, wie schlechte Absorption, proteolytischer Abbau und zu schnelle Ausscheidung zu

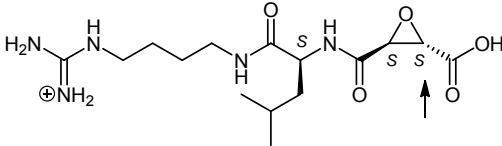
reduzieren. Erreicht wird dies z. B. durch Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren oder durch Rigidisierung der Konformation durch Einbau von Cyclen.^[85]

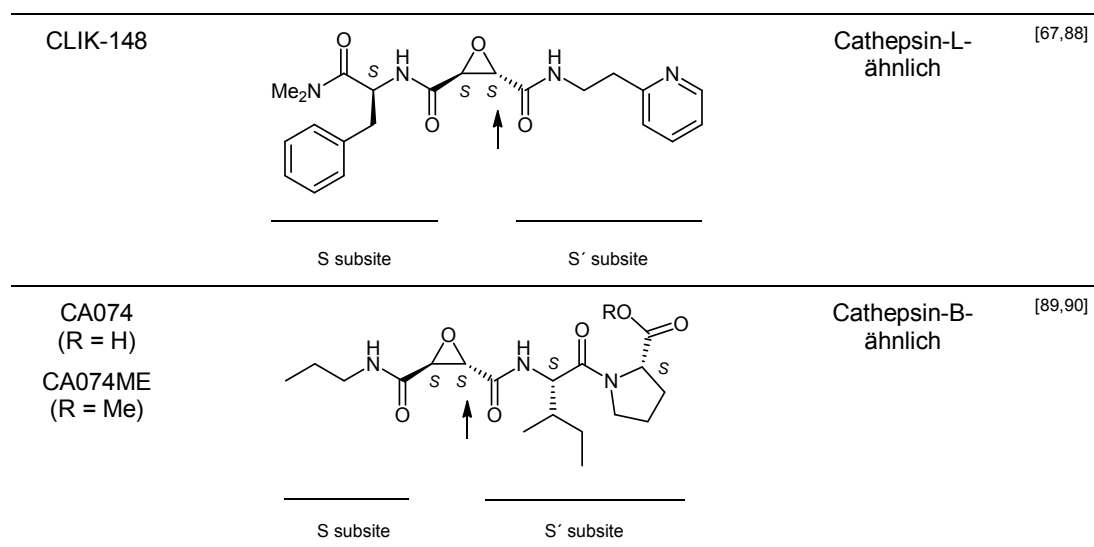
Es gibt zwei wesentliche Strategien zur Entwicklung neuer Proteaseinhibitoren. Die erste umfasst das Screening, auch HTS (*high-throughput screening*, Hochdurchsatzscreening) von Substanzbibliotheken. Der zweite Ansatz geht aus von Struktur-basierter Entwicklung unter Nutzung der Erkenntnisse der Röntgenstrukturanalysen der Proteasen. Zum Einsatz kommen hierbei theoretische Methoden zur computergestützten Entwicklung.^[85]

1.4.1 Irreversible Inhibitoren: Epoxid-basierte Inhibitoren der Papain-Familie

Eine Gruppe irreversibler Inhibitoren enthält als elektrophilen Baustein dreigliedrige Ringe, die für die Inaktivierung des Enzyms durch kovalente Modifizierung nach Ringöffnung verantwortlich sind. Der erste Epoxid-basierte Inhibitor E-64 mit *trans*-konfiguriertem Epoxidring wurde 1978 als Naturstoff aus dem Pilz *Aspergillus japonicus* isoliert.^[86] E-64 und seine Derivate hemmen selektiv Cystein-Proteasen der Papain-Superfamilie, allerdings ohne Selektivität innerhalb dieses Clans. Zur Erzielung von Selektivität innerhalb der Familie wurden weitere Epoxid-basierte Inhibitoren entwickelt, die selektiv Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie und der Cathepsin-B-Subfamilie hemmen (Tab. 1-4).^[84,87] E-64 bindet an die *non-primed site*. Cathepsin-L-Selektivität wird durch sterisch anspruchsvolle Reste in der *primed site* erreicht, die zu sperrig für Cathepsin B sind. Selektivität für Cathepsin B wird durch Bindung an die *primed site* erzielt, die aufgrund des *occluding loop* anders beschaffen ist als in Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen, zudem kann die Carboxylgruppe von CA074 ionische Wechselwirkungen zu den Histidinresten His¹¹⁰ und His¹¹¹ des *occluding loop* ausbilden.

Tab. 1-4: Strukturen der Epoxid-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren E-64, CLIK-148, CA074 und CA074ME und deren Selektivität innerhalb der Papain-Familie des Clans CA; die Pfeile markieren das Kohlenstoffatom, welches vom Cysteinrest des aktiven Zentrums angegriffen wird; der Zuordnung der Bindungstaschen liegen die Kristallstrukturen von E-64 in Papain, CLIK-148 in Papain und CA074 in Cathepsin B zugrunde.

Inhibitor	Struktur	Selektivität	Lit.
E-64	 <p style="text-align: center;">S subsite</p>	Papain-Familie	[26]



Die genannten Inhibitoren und ihre Derivate werden oft als Standardinhibitoren und diagnostische Reagenzien zur Identifizierung von Cystein-Proteasen eingesetzt.^[84] Es wurde eine Vielzahl Epoxid-basierter Inhibitoren von Cystein-Proteasen entwickelt. Struktur-Aktivitäts-Studien verdeutlichten, dass *trans*-konfigurierte Oxiran-2,3-dicarboxylate mit (S,S)-Konfiguration eine bessere Hemmwirkung erzielen als (R,R)-konfigurierte.^[84] Vertreter dieser Substanzklasse befanden sich bereits in klinischer Entwicklung zur Behandlung von Muskeldystrophie und Krebs, konnten jedoch keine Zulassung erlangen.^[22,87]

1.4.2 Irreversible Inhibitoren: Aziridin-basierte Inhibitoren der Papain-Familie

Aziridine bieten im Gegensatz zu Epoxiden eine zusätzliche Möglichkeit zur Derivatisierung am Ring-Stickstoffatom. Bei gleicher Peptidsequenz sind Aziridine mit unsubstituiertem Stickstoffatom schwächere Inhibitoren als die entsprechenden Epoxide. Jedoch ist deren Aktivität stark pH-abhängig. Das Aktivitätsmaximum wird bei Epoxiden bei pH 6-7 erreicht, wohingegen die Ringöffnung von Aziridinen bei pH 4 vergleichbar schnell wird, was zunächst experimentell^[91] und später theoretisch^[92,93] von den Arbeitsgruppen Schirmeister und Engels bestätigt wurde. Eine Beschleunigung der Ringöffnungsreaktion in neutralem Milieu kann durch stark elektronenziehende Substituenten am Aziridin-Stickstoffatom erzielt werden, da diese die Reaktionsbarrieren im Vergleich zu Verbindungen mit unsubstituiertem Aziridin-Stickstoffatom absenken. Auch dies konnte experimentell und theoretisch nachgewiesen werden.^[94,95] Die Unterschiede zwischen Aziridinen und Epoxiden können zum Teil durch strukturelle Gegebenheiten erklärt werden, denn der Aziridinring weist geringere Ringspannung, erhöhte Basizität und Wasserstoffbrückendonorfähigkeit auf. Die schwächere Reaktivität im Vergleich zu Epoxiden in neutralem Milieu kann als Vorteil in verbesserter Selektivität bestehen.

Naturstoffe basierend auf *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten konnten sowohl in (*S,S*)-Konfiguration (1975)^[96] als auch in (*R,R*)-Konfiguration (2000)^[97] isoliert werden, wobei der zweitgenannte Vertreter, Miraziridine A, als potenter Inhibitor von Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen identifiziert wurde.^[97,98]

Nachdem 1992 das Potential von Aziridin-2-carbonsäure als Papain-Inhibitor entdeckt wurde,^[99] etablierten Schirmeister *et al.* ab 1996 irreversible, selektive Cystein-Protease-Inhibitoren mit *trans*-konfiguriertem Aziridin-2,3-dicarboxylat als elektrophilen Baustein (substituierte und unsubstituierte Aziridinstickstoffatome), zunächst als Inhibitoren von Papain, Cathepsin L und Cathepsin B.^[100-103] Im Folgenden wurden zahlreiche Aziridin-basierte Inhibitoren entwickelt. Essentielle Strukturelemente sind Aziridin-2,2-dicarboxylate, Aziridin-2-carboxylate, Aziridin-2,3-dicarboxylate (Abb. 1-5, **A-C**). Darunter findet sich eine Vielzahl an Inhibitoren von parasitären Cystein-Proteasen, die auch *in vitro* Wirksamkeit zeigen.^[25,92-95,104-114] Bisher ist es nicht gelungen, eine genügend aufgelöste Röntgenstruktur eines Aziridin-basierten Inhibitors im Komplex mit einer Protease zu generieren. Die erste Röntgenstruktur eines Peptids, welches Aziridin-2,3-dicarboxylat als elektrophilen Baustein enthält, weist eine lineare Konformation auf (Abb. 1-5, **D**). Unter Einbeziehung theoretischer Berechnungen wird eine relativ lineare Orientierung innerhalb der *active site cleft* vorgeschlagen, die der von E-64-Derivaten ähnlich sei.^[115] Unveröffentlichte Arbeiten mit Rhodesain und einem Aziridin-2,3-dicarboxylat scheinen aber die mit Hilfe von Molecular Modeling erhaltenen Bindungsmodi zu untermauern.

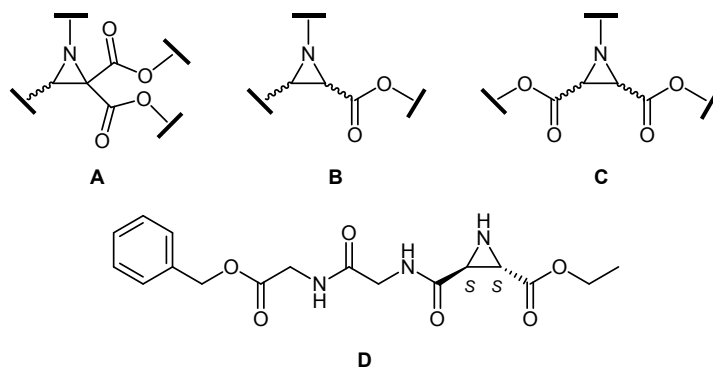


Abb. 1-5: **A-C** Schematische Repräsentation von Aziridin-2,2-dicarboxylaten (**A**), Aziridin-2-carboxylaten (**B**) und Aziridin-2,3-dicarboxylaten (**C**); **D** Struktur von (2*S*,3*S*)-Ethyl-3-((2-((2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)carbamoyl)aziridin-2-carboxylat.

1.4.3 Irreversible Inhibitoren: Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren der Papain-Familie

Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren umfassen α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen und Vinylsulfone und hemmen ebenfalls spezifisch Cystein-Proteasen. Sie reagieren durch

Michael-Addition irreversibel mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums. Einer der ersten Inhibitoren, Dc-11 (Abb. 1-6), war 1982 das Fumarat-Derivat von E-64c, welches sich als potenter, irreversibler Inhibitor von Cathepsin B, L und H erwies.^[116] Im Arbeitskreis Schirmeister wurden α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen entwickelt, die selektive Hemmung parasitärer Cystein-Proteasen sowie antiparasitäre Aktivität aufweisen.^[3,117]

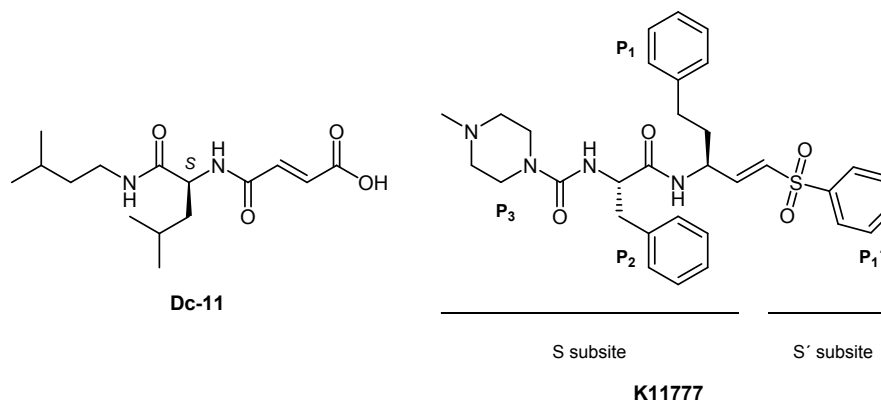


Abb. 1-6: Strukturen von Dc-11 und K11777 (inklusive Bindungsmodus von K11777 im aktiven Zentrum von Cruzain, Rhodesain und Falcipain-3^[79]).

Vinylsulfone wurden erstmals 1995 von Palmer *et al.* als Cystein-Protease-Inhibitoren der Papain-Familie (CAC1) beschrieben.^[118] Ein Vertreter dieser Strukturklasse, K11777 (= K777 oder APC3316; Abb. 1-7), befindet sich aktuell in späten Stadien der präklinischen Entwicklung zur Behandlung der Chagas-Krankheit (vgl. Kap. 1.3.2). K11777 inhibiert parasitäre Cystein-Proteasen von Trypanosomen im nanomolaren Bereich,^[119] zeigt Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo*,^[47-49] ist oral bioverfügbar und nicht zytotoxisch.^[77] Zudem ist der Wirkstoff wirksam gegen Schistosomen, sowohl als Inhibitor ihrer Cystein-Proteasen,^[52] als auch *in vitro* und *in vivo*.^[120] Auch zeigt er *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit gegen Hakenwürmer der Spezies *Ancylostoma ceylanicum*. Im Hamstermodell konnte die Infektion bereits nach zweifacher Gabe innerhalb eines Tages nahezu geheilt werden (> 90 %), wobei als Targets Cystein-Proteasen identifiziert wurden.^[121] Neuere Studien verfolgen den Ansatz zur Entwicklung kovalent reversibler, nicht-peptidischer Inhibitoren.^[80,122] Auch befinden sich Vinylsulfone als kovalent reversible Inhibitoren in der Entwicklung.^[123]

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Testung von kompetitiven, irreversiblen, peptidomimetischen Inhibitoren parasitärer Cystein-Proteasen. Im Fokus stand dabei die Weiterentwicklung und Verbesserung von Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten sowie Michael-Akzeptor-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren. Als Leitstrukturen der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren dienten die Verbindungen RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) und RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂). RV122C und RV212C wurden in Vorarbeiten als Inhibitoren von Cathepsin L und Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Proteasen identifiziert (Tab. 2-1), die zudem antiparasitäre Aktivität aufweisen, ohne in den verwendeten Konzentrationen toxisch zu sein (Tab. 2-2).

Tab. 2-1: K_i -Werte von **RV122C** und **RV212C** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, Rhodesain, Cruzain, Falcipain-2 und Falcipain-3.

K_i [μ M]							
Verb.	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	Rhodesain	Cruzain	FP-2	FP-3
RV122C	6.0 ^[105]	ni ^[105]	1.7	1.2 ^[107]	0.91	209 ^[108]	149 ^[108]
RV212C	4.0 ^[105]	ni ^[105]	2.1	1.1 ^[107]	0.79	135 ^[108]	75.6 ^[108]

FP-2 = Falcipain-2; FP-3 = Falcipain-3; ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu$ M; nd = not determined

Tab. 2-2: IC_{50} -Werte der Testungen von RV122C und RV212C an *L. major* Promastigoten (*L. m.* (p)) und Amastigoten (*L. m.* (a)), *T. brucei brucei* (*T. b. b.*), *P. falciparum* (*P. falc.*) und an Makrophagen (Zelllinie J774.1, Bestimmung der Cytotoxizität).

IC_{50} [μ M]					
Verb.	<i>L. m.</i> (p)	<i>L. m.</i> (a)	<i>T. b. b.</i>	<i>P. falc.</i>	J774.1
RV122C	39.6 ^[106]	2.7	31.4 ^[107]	16.2/17.5 ^[108]	> 100 ^[106,107]
RV212C	35.4 ^[106]	5.0	28.3 ^[107]	16.7 ^[108]	> 100 ^[106,107]

Eine neue Serie Aziridin-basierter Inhibitoren, deren Leitstrukturen RV122C und RV212C waren, enthielt Stereoisomere, Konstitutionsisomere und Derivate mit Ethylesterresten. Innerhalb dieser Serie zeichnet sich ein Derivat, **CS09** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂, Abb. 2-1), durch selektive Hemmung der parasitären Cystein-Proteasen aus, während humanes Cathepsin L nicht gehemmt wird. Außerdem weist **CS09** antiparasitäre Aktivität auf.

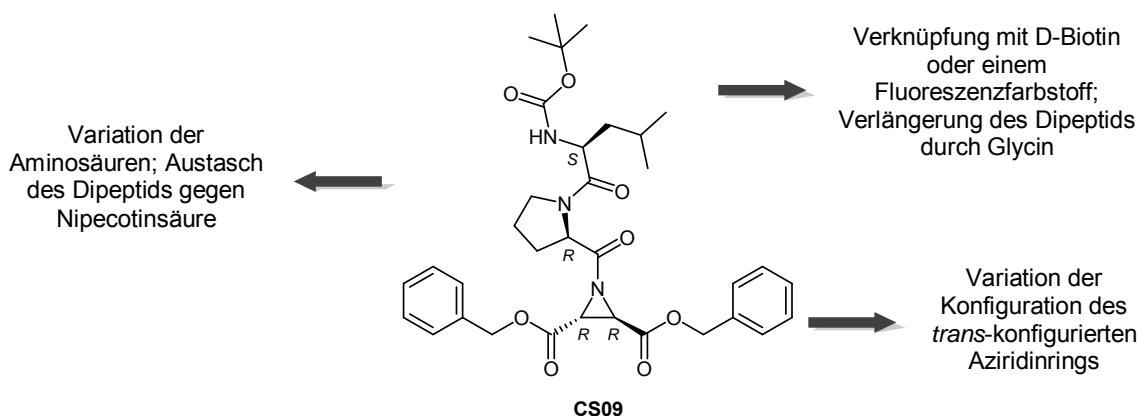


Abb. 2-1: Struktur von **CS09** und Variationen zur Strukturoptimierung.

Ausgehend von **CS09** als neue Leitstruktur sollte eine weitere Serie Aziridin-basierter Verbindungen synthetisiert werden, um Selektivität, Affinität und Hydrolysestabilität weiter zu verbessern. Zur Optimierung der Struktur von **CS09** sollte die Aminosäuresequenz variiert werden. So sollten Leucin und Prolin durch andere lipophile und/oder nicht-proteinogene Aminosäuren ersetzt werden. Zur selektiven Hemmung von Cathepsin B und Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen sollte die Aminosäuresequenz durch Nipecotinsäure ersetzt werden, wobei ein Derivat mit (S,S)-konfiguriertem Aziridinring dargestellt werden sollte. Weiterhin sollten Derivate von RV122C und **CS09** synthetisiert werden, die mit D-Biotin oder einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft sind, um zelluläre Effekte zu studieren und Targets zu identifizieren. Mithilfe eines Derivats mit bromierten Benzylesterresten sollte die Kristallisation mit Rhodesain zur Erhaltung einer Röntgenstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes realisiert werden.

Als Leitstruktur zur Optimierung von Michael-Akzeptor-basierten Verbindungen diene der *trans*-konfigurierte vinyloge Dipeptidester 16a (Boc-(S)-Phg-(S)-vGln(Trt)-OEt, Abb. 2-2). Verbindung 16a wurde ursprünglich als Inhibitor viraler Proteasen entwickelt, konnte jedoch als irreversibler, kompetitiver Falcipain- und Rhodesain-Inhibitor mit anti-parasitärer Aktivität identifiziert werden (Tab. 2-3). Die Strukturoptimierung von 16a sollte durch Variation der Konfigurationen der Aminosäuren und durch Variation der Schutzgruppe der Amidfunktion der Seitenkette von Glutamin erfolgen.

Tab. 2-3: K_i -Werte von 16a an Falcipain-2, Falcipain-3 und Rhodesain sowie IC_{50} -Werte der Testungen von 16a an *P. falciparum* (*P. falc.*), *T. brucei brucei* (*T. b. b.*) und Makrophagen (Zelllinie J774.1, Bestimmung der Cytotoxizität).

Verb.	Falcipain-2 K_i [μ M]	Falcipain-3 K_i [μ M]	Rhodesain K_i [μ M]	<i>P. falc.</i> IC_{50} [μ M]	<i>T. b. b.</i> IC_{50} [μ M]	J774.1 IC_{50} [μ M]
16a	0.45 ^[3]	1.4 ^[3]	0.47 ^[3]	3.9 ^[3]	31.0 ^[3]	30

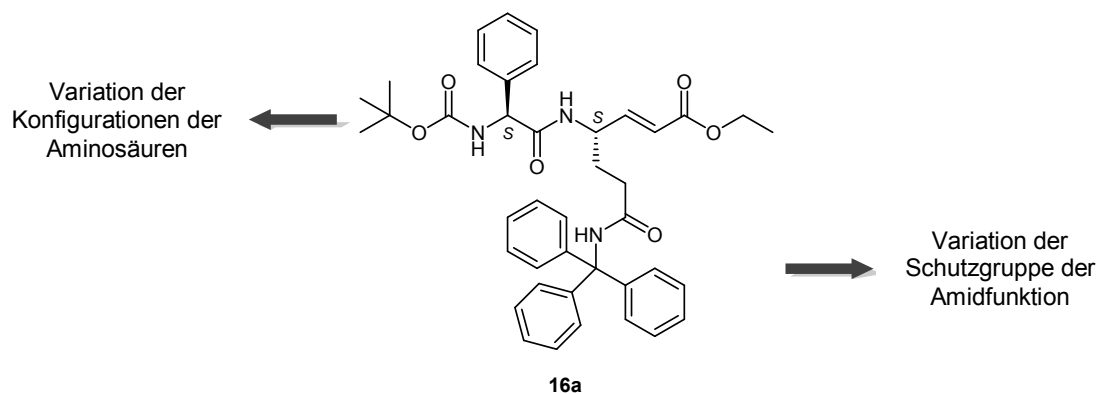


Abb. 2-2: Struktur von 16a und Variationen zur Strukturoptimierung.

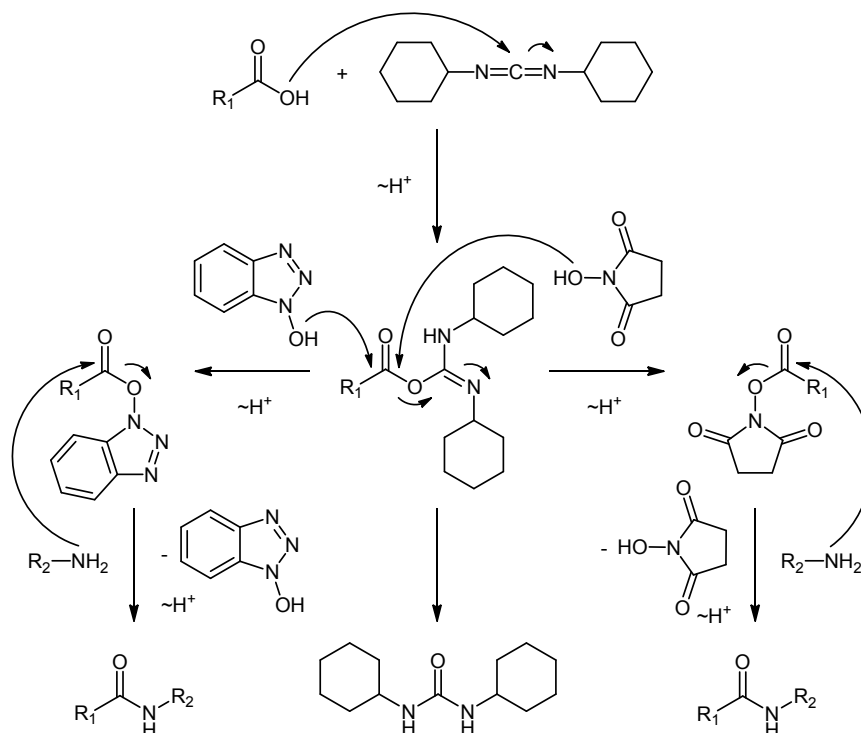
Um Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der Hemmstärke und Selektivität der synthetisierten Verbindungen ableiten zu können, sollten diese an Cystein-Proteasen der Papain-Familie sowie einige Verbindungen an Aspartat-Proteasen getestet werden. Von Verbindungen, die sich im Enzymassay als aktiv erweisen, sollte *in vitro* die Wirksamkeit an den entsprechenden Parasiten sowie deren Cytotoxizität bestimmt werden. Im Zuge dessen sollte zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Aziridinylpeptide durch *In-vitro*-Testungen der Standardinhibitor CLIK-148 (Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierter Inhibitor, Hemmung Cathepsin-L-ähnlicher Proteasen) als Vergleichssubstanz synthetisiert werden.

3 Synthesen

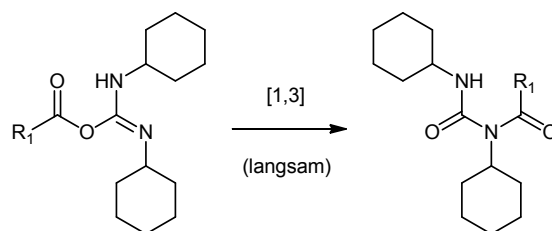
3.1 Peptidkupplungen

Da Methoden der Peptidkupplung Anwendung in der Synthese aller Produkte finden, werden sie im Folgenden detailliert betrachtet. Reagenzien zur Peptidkupplung können aufgrund struktureller Ähnlichkeit in acht Gruppen eingeteilt werden: Carbodiimid-, Phosphonium-, Uronium-, Immonium-, Imidazolium-, Organophosphor- sowie halogenierende und andere Kupplungsreagenzien. Es ist von Bedeutung, Racemisierung und die Bildung von Nebenprodukten zu unterdrücken, was durch geeignete Racemisierungssuppressoren, Schutzgruppenwahl und Reaktionsbedingungen erreicht werden kann. Zudem werden oft nicht-nucleophile Basen, häufig tertiäre Amine wie NEt_3 , NMM oder DIPEA zugesetzt. Der entscheidende Punkt ist die Aktivierung einer Carboxylgruppe mittels eines Carboxyl-Substituenten, der hinreichend aktiviert, aber nicht zu stark acidifiziert.^[124] Da SPPS (solid-phase peptide synthesis) sowie mikrowellen-assistierte Kupplungen in dieser Arbeit keine Anwendung finden, wird im Folgenden darauf nicht eingegangen.

Zur Gruppe der Carbodiimidreagenzien gehören beispielsweise DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) und EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), die zusammen mit Additiven wie z. B. HOBt (1-Hydroxybenzotriazol), mit Aktivatoren wie z. B. HOSu (*N*-Hydroxysuccinimid) oder mit katalytisch wirksamem DMAP (*para*-Dimethylaminopyridin) eingesetzt werden. Bei der Aktivierung mittels DCC und HOBt oder HOSu erfolgt zunächst die Bildung eines DCC-Addukts, eines hochreaktiven *O*-Acylisoharnstoffs. Wird nun kein weiteres Reagenz zugegeben, verläuft die Gesamtreaktion in schlechten Ausbeuten, da *O*-Acylisoharnstoffe bei Anwesenheit schlechter Nucleophile in einer Nebenreaktion langsam zu unreaktiven *N*-Acylharnstoffen umlagern (Schema 3-2). Bei Zugabe von HOBt bzw. HOSu wird das DCC-Addukt zu einem Oxybenzotriazolester, bzw. einem *N*-Hydroxysuccinimidester umacyliert. Der als Nebenprodukt ausfallende *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff beschleunigt die Reaktion. Im finalen Schritt führt der nucleophile Angriff einer Aminogruppe am Aktivester zur Ausbildung der Amidbindung. Das eingesetzte Additiv, bzw. der Aktivator wird regeneriert und liegt dadurch im Überschuss vor. Im Fall von eingesetztem *N*-Hydroxysuccinimid wird der Aktivester isoliert, bevor er in einer nachfolgenden Reaktion mit einem Amin zur Reaktion gebracht wird (Schema 3-1).^[125,126]

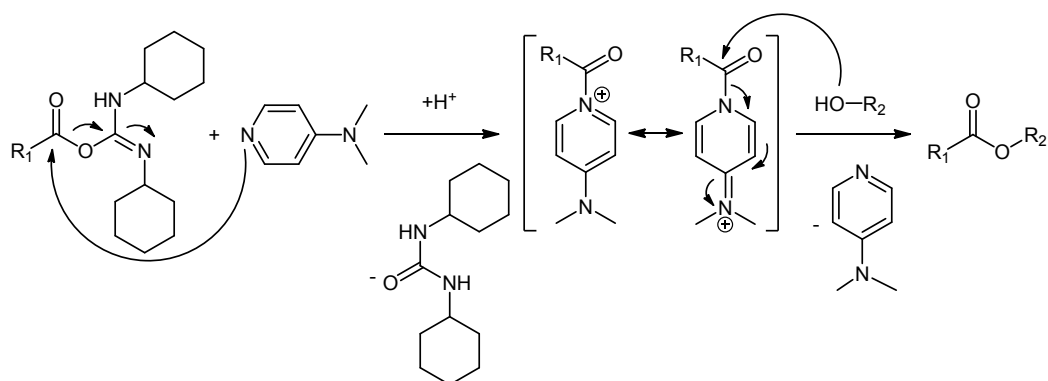


Schema 3-1: Mechanismus der Peptidkupplung mittels DCC/HOBt (links) und DCC/HOSuc (rechts).



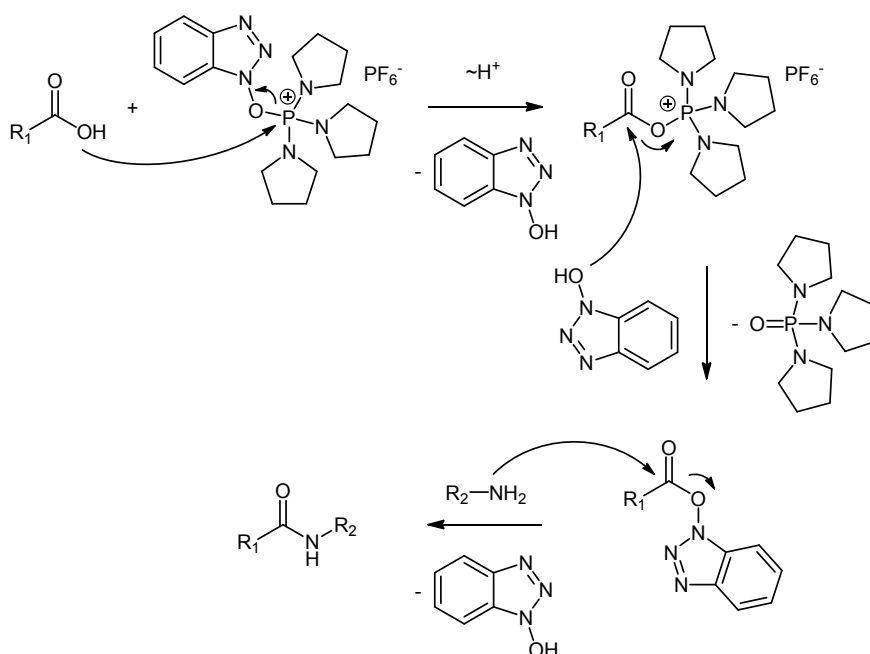
Schema 3-2: Nebenreaktion: [1,3]-Umlagerung von O-Acylisoharnstoff zu N-Acylharnstoff bei Anwesenheit schlechter Nucleophile.

Bei Kombination von DCC mit katalytischen Mengen DMAP verläuft der Reaktionsmechanismus prinzipiell analog. Wird als Nucleophil kein Amin, sondern ein Alkohol eingesetzt, handelt es sich um die Steglich-Veresterung (Schema 3-3). Dabei entsteht im ersten Schritt auch ein hochreaktiver O-Acylisoharnstoff. DMAP fungiert als Acylgruppen-Überträger, an dem schließlich die Hydroxylgruppe eines Alkohols nucleophil angreift und als Produkt der entsprechende Ester gebildet wird.^[127]



Schema 3-3: Mechanismus der Steglich-Veresterung.

Ein Vertreter der Phosphonium-Kupplungsreagenzien ist PyBOP (1-Benzotriazoloxyl-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat),^[128] hervorgegangen aus Vorläufern wie CloP (Chlorotris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat)^[129] und BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat).^[130] Bei Ersetzen der Dimethylaminogruppe gegen Pyrrolidin in PyBOP wird das giftige Nebenprodukt HMPA (Hexamethylphosphoramid) vermieden. Die Peptidkupplung mittels PyBOP verläuft im ersten Schritt über die Bildung eines Acyloxyphosphoniumsalz-Intermediats unter Abspaltung von HOBT, welches im nächsten Schritt nucleophil angreift und einen Benzotriazol-Aktivester liefert. Dabei wird Tripyrrolidinphosphinoxid abgespalten. Aminolyse dieses Aktivesters resultiert in der Bildung des entsprechenden Amids unter Regeneration von HOBT (Schema 3-4).^[128]



Schema 3-4: Mechanismus der Peptidkupplung mittels PyBOP.

Die Gruppe der Uroniumreagenzien umfasst z. B. HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) und HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra-

methyluroniumhexafluorophosphat) sowie auch Thiuroniumreagenzien wie z. B. HODT (S-(1-Oxido-2-pyridinyl)-1,3-dimethyl-1,3-trimethylthiuroniumhexafluorophosphat). Die genannten Reagenzien weisen als Gegenion Hexafluorophosphat auf, eingesetzt werden sie auch mit dem Gegenion Tetrafluoroborat, dann handelt es sich um TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat), TATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) und TODT (S-(1-Oxido-2-pyridinyl)-1,3-dimethyl-1,3-trimethylthiuroniumtetrafluoroborat). Dabei hat das Gegenion keinen signifikanten Einfluss auf Geschwindigkeit und Racemisierung beim Vergleich von HBTU und TBTU.^[124] Carpino *et al.* konnten durch Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie (flüssig und fest) zeigen, dass HBTU nicht, wie zuvor angenommen als Uroniumsalz (O-Form), sondern als Guanidiniumsalz (N-Form) vorliegt (Abb. 3-1). Die O-Form kann erhalten werden bei schneller Aufarbeitung und unter striktem Ausschluss von tertiären Aminen. Dies ist von Bedeutung, da die O-Isomere O-HBTU und O-HATU effizientere Kupplungsreagenzien sind als ihre entsprechenden N-Isomere.^[131]

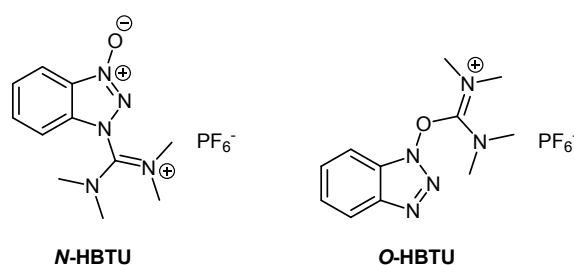
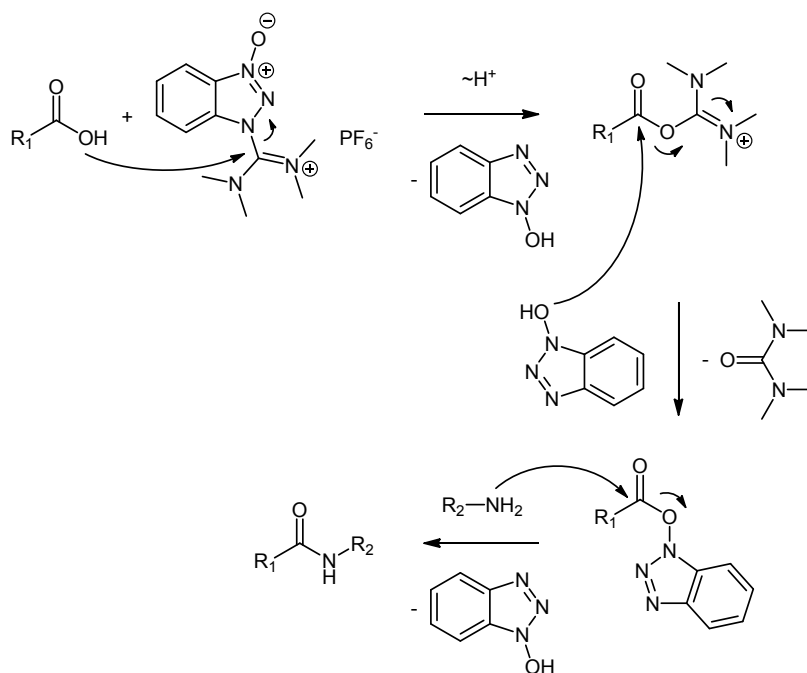


Abb. 3-1: Struktur von HBTU in der Guanidinium-Form (links) und in der Uronium-Form (rechts). O-HBTU ist die reaktivere Spezies.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe mittels HBTU beginnt mit dem nucleophilen Angriff der Carboxylgruppe unter Freisetzung von HOBT. Durch nucleophilen Angriff des zuvor abgespaltenen HOBT geschieht die Umacylierung zum Benzotriazol-Aktivester, welcher mit dem eingesetzten Amin zum gewünschten Produkt reagiert (Schema 3-5).^[126,132]

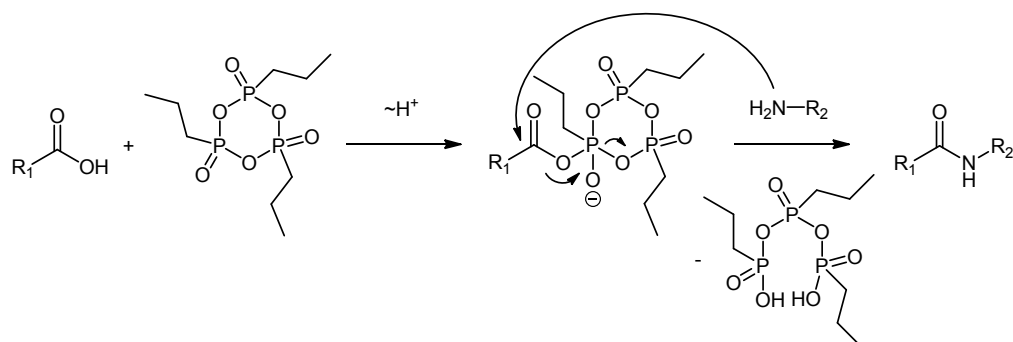


Schema 3-5: Mechanismus der Peptidkupplung mittels HBTU.

Immonium-Kupplungsreagenzien entstanden durch Modifikation bekannter Uroniumreagenzien. Ein Vertreter dieser Klasse ist BOMI (Benzotriazol-1-yloxy-*N,N*-dimethyl-methaniminiumhexachloroantimonat). Auch bei dieser Verbindung konnten Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass das Guanidinium-Derivat vorliegt.^[124,133]

Der bekannteste Vertreter der Imidazolium-Kupplungsreagenzien ist CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol). Der Mechanismus verläuft über einen Imidazolid-Aktivester.^[124,134]

Die große Gruppe der Organophosphor-Kupplungsreagenzien umfasst Phosphorsäure-, Phosphinsäure- und Phosphonsäurederivate. Ausgehend von dem ersten Phosphorsäurereagenz DPPA (Diphenylphosphorylazid)^[135] wurden verschiedenste Organophosphorreagenzien entwickelt. Ein Beispiel für ein Phosphinsäurederivat ist DPP-Cl (Diphenylphosphinicchlorid).^[124] In dieser Arbeit von besonderem Interesse ist das Phosphonsäurederivat PPA (Propylphosphonsäureanhydrid). Die aktive Spezies ist nach nucleophilem Angriff der Carboxylgruppe ein gemischtes Carbonsäure-Phosphonsäureanhydrid. Nach Reaktion mit einem Amin resultiert das entsprechende Produkt (Schema 3-6). Der Vorteil dieser Methode ist die Wasserlöslichkeit der entstehenden Propylphosphonsäure, welche durch Extraktion mit Wasser leicht entfernt werden kann.^[136]



Schema 3-6: Mechanismus der Peptidkupplung mittels PPA.

Die Verwendung von halogenierenden Reagenzien beschränkt sich auf Kupplung von sterisch extrem gehinderten Aminosäuren. Zum Einsatz kommen beispielsweise IBCF (Isobutylchloroformiat), Thionylchloridin in Pyridin oder CDMT (2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin).^[124]

Der letzten Gruppe gehören verschiedenste Reagenzien an. Beispiele dafür sind EEDQ (1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolon), das *in situ* über ein unsymmetrisches Anhydrid reagiert, oder Ethylpropiolat, das technisch in einer Ein-Topf-2-Schritte-Synthese Einsatz findet.^[124]

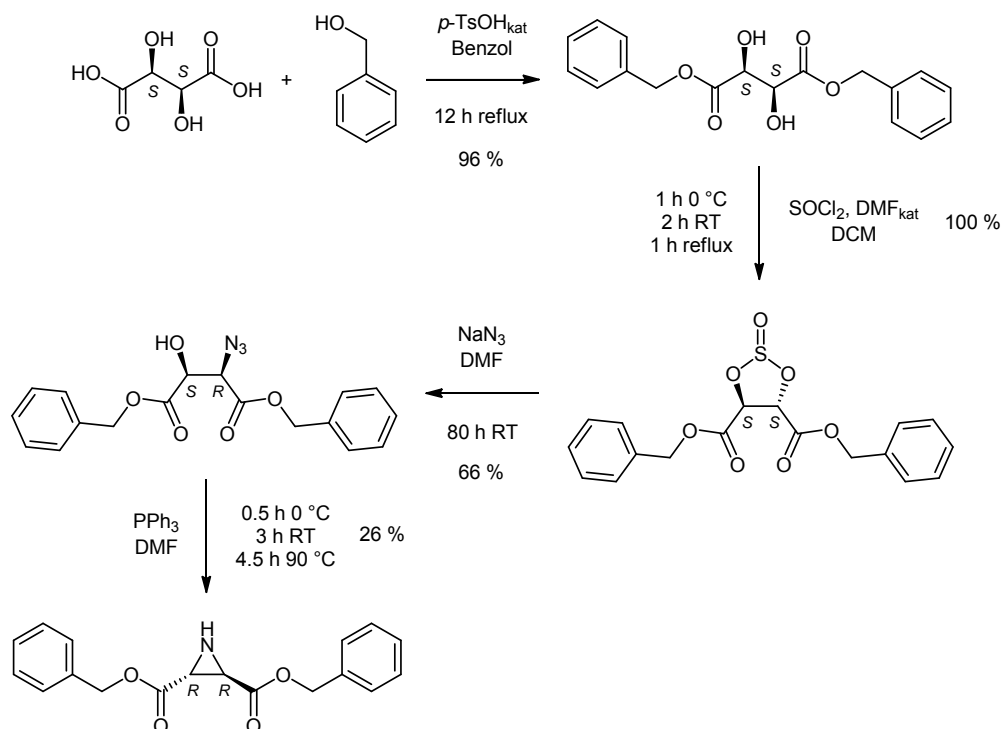
3.2 Synthese der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

Zur Darstellung der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren werden zunächst die *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate synthetisiert und im Folgenden an entsprechende Verbindungen mit freier Carboxylgruppe gekuppelt.

3.2.1 Synthese der *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate

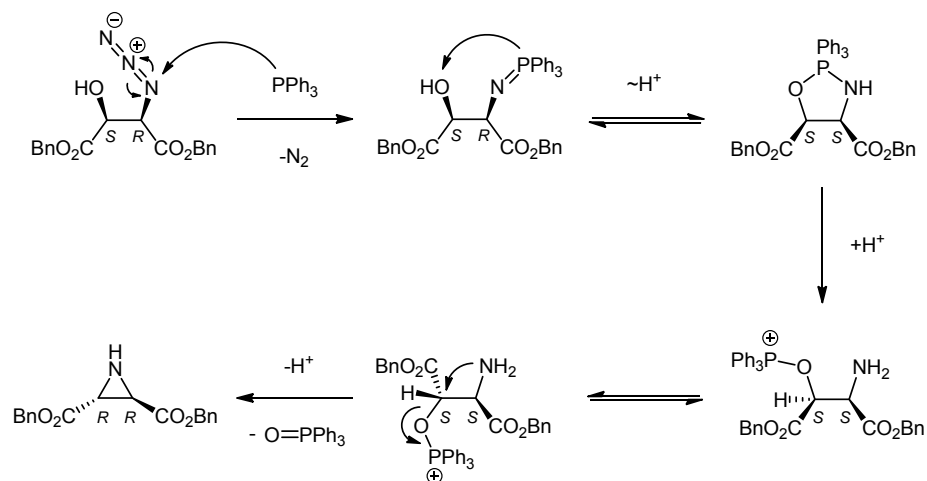
Die Synthese der *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate erfolgt über eine stereoselektive Syntheseroute. Die vierstufige Synthese wird exemplarisch an der Darstellung des Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylats aufgezeigt (Schema 3-7). Im ersten Schritt wird (2*S*,3*S*)-(-)-Weinsäure mit einem Überschuss Benzylalkohol und unter Katalyse von *para*-Toluolsulfonsäure verestert.^[137] Das entstehende (2*S*,3*S*)-Dibenzyltartrat wird sodann unter DMF-Katalyse mit Thionylchlorid umgesetzt, woraufhin das cyclische Sulfit (4*S*,5*S*)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat generiert wird. Im nächsten Schritt wird dieses mit Natriumazid versetzt. Unter Schwefeldioxid-Freisetzung entsteht der Azidoalkohol (2*S*,3*R*)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat. Durch Reaktion mit Triphenyl-

phosphin wird schließlich durch intramolekularen Ringschluss in einer Staudinger-Reaktion das Produkt Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat gebildet.^[138]



Schema 3-7: Stereoselektive Synthese von Dibenzyl-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat.

Die Staudinger-Reaktion stellt eine Spezialform der Mukaiyama-Redoxkondensation dar, welche eine milde und stereoselektive Methode zur Umwandlung von Alkoholen ist.^[125] Zunächst greift das Phosphoratom von Triphenylphosphin an der Azidfunktion des Azidoalkohols an, wobei N₂ abgespalten wird und (2*S*,3*R*)-Dibenzyl-2-hydroxy-3-((triphenylphosphoranylid)amino)succinat entsteht. Durch intramolekularen Angriff des Phosphoratoms am Sauerstoff bildet sich als Intermediat ein 1,3,2-λ⁵-Oxazaphospholidin. Die nach dem Bruch der P–N-Bindung des Heterocyclus auftretende Zwischenstufe cyclisiert unter Inversion der Konfiguration am C-Atom zum Dreiring (Schema 3-8). Die Triebkraft dieser Reaktion sind die Freisetzung von N₂ und die Nucleophilie sowie die Oxophilie des Phosphoratoms, welches im Laufe der Reaktion von der dreiwertigen zur fünfwertigen Oxidationsstufe oxidiert wird. Die Cyclisierung liefert selektiv das *trans*-konfigurierte Aziridin.^[139]



Schema 3-8: Mechanismus der Staudinger-Reaktion: Bildung des Dibenzylaziridin-(2S,3S)-dicarboxylats aus (2S,3R)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat.

Nach diesem Reaktionsschema werden Dibenzyl-(2R,3R)-dicarboxylat ausgehend von (2S,3S)-(-)-Weinsäure und Dibenzyl-(2S,3S)-dicarboxylat ausgehend von (2R,3R)-(+)-Weinsäure synthetisiert. Dabei verlaufen die ersten drei Schritte in reproduzierbaren, quantitativen bis guten Ausbeuten, der letzte Schritt – die Staudinger-Reaktion – jedoch nicht. In Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen werden unterschiedliche Ausbeuten, die auch im Gegensatz zu Literaturausbeuten stehen, erhalten. In der folgenden Tabelle 3-1 sind die Reaktionsbedingungen und Ausbeuten verschiedener Ansätze der Staudinger-Reaktion aufgelistet. Die Reaktionsbedingungen beziehen sich jeweils auf 1.0 eingesetztes Äquivalent des entsprechenden Azidoalkohols in DMF als Lösungsmittel.

Tab. 3-1: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der Staudinger-Reaktion, bezogen auf 1.0 Äq. des entsprechenden Azidoalkohols in DMF.

	Reaktionsbedingungen	Ausbeute	Literaturausbeute
(S,S)-Azi(OBn) ₂	1.8 Äq. PPh ₃ , AcOH _{kat} ; 0.5 h 0 °C, 4.5 h 80 °C	1 %	38 % ^[138]
	1.1 Äq. PPh ₃ ; 1.5 h 0 °C, 1.5 h RT, 4.5 h 80 °C	0	-
	1.1 Äq. PPh ₃ ; 0.75 h 0 °C, 4 h 75 °C	0	-
	1.1 Äq. PPh ₃ ; 1.5 h 0 °C, 1.5 h RT, 4.5 h 70 °C	0	-
	1.8 Äq. PPh ₃ ; 0.5 h 0 °C, 2.5 h RT, 4 h 90 °C	3 %	-
	1.1 Äq. PPh ₃ ; 0.5 h 0 °C, 1.5 h RT, 4.5 h 90 °C	12 %	-

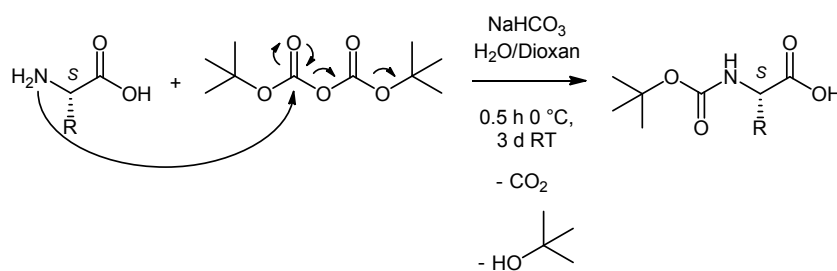
(R,R)-Azi(OBn)₂	1.8 Äq. PPh ₃ , AcOH _{kat} ; 0.5 h 0 °C, 4.5 h 90 °C	8 %	35 % ^{[138]*}
	1.1 Äq. PPh ₃ ; 0.5 h 0 °C, 3 h RT; 4.5 h 90 °C	26 %	-

*4.5 h 80 °C anstatt 90 °C.

Die Literaturlausbeute konnte unter keinen Bedingungen erreicht werden. Bei Temperaturen von unter 90 °C kann entgegen der Literatur kein sauberes Produkt erhalten werden, sondern es liegt lediglich in Spuren vor. Auch zeigt die Säurekatalyse keine Steigerung der Ausbeute. Die beste Ausbeute kann bei Reaktionszeiten und Temperaturen von 30 min bei 0 °C während der Zugabe von Triphenylphosphin, 3 h bei Raumtemperatur und schließlich 4.5 h 90 °C erzielt werden. Die schlechten Ausbeuten lassen sich auf die Bildung vieler Nebenprodukte, u. a. der Bildung des Enamins, zurückführen.

3.2.2 Synthese der Di- und Tripeptide als Bausteine der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

Die Synthese der Peptide, welche als Bausteine der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren fungieren, erfolgt über die in Kapitel 3.1 beschriebenen Peptidkupplungsmethoden aus den entsprechenden Aminosäuren. Die Peptide enthalten am *N*-Terminus die Boc-Schutzgruppe. Die Aminosäuren mit Boc-geschütztem *N*-Terminus, die kommerziell nicht erwerblich waren, werden synthetisiert. Dabei wird die entsprechende Aminosäure in H₂O/Dioxan unter basischen Bedingungen mittels NaHCO₃ mit Di-*tert*-butyldicarbonat zur Reaktion gebracht. Bei diesem Additions-Eliminierungs-Mechanismus werden CO₂ und Isopropanol frei (Schema 3-9).^[126,140]



Schema 3-9: Mechanismus der Einführung der Boc-Schutzgruppe an einer (*S*)-konfigurierten Aminosäure.

Tabelle 3-2 enthält die Ausbeuten der jeweiligen Einführungen der Boc-Schutzgruppe an den *N*-Termini der Aminosäuren.

Tab. 3-2: Erhaltene Ausbeuten bei der Einführung der Boc-Schutzgruppe.

Aminosäure	Ausbeute
Boc-Cha-OH	92 %
Boc-hPhe-OH	99 %
Boc-Trp-OH	96 %

Die Mehrzahl der synthetisierten Peptide enthalten die Aminosäure (*R*)-Prolinbenzylester ((*R*)-Pro-OBn). Diese Verbindung wird aus der Aminosäure (*R*)-Prolin und Benzylalkohol unter Säurekatalyse mit *para*-Toluolsulfonsäure in einer Ausbeute von 65 % hergestellt, indem das Reaktionsgemisch mithilfe eines Wasserabscheiders refluxiert wird (Schema 3-10).^[126,140]

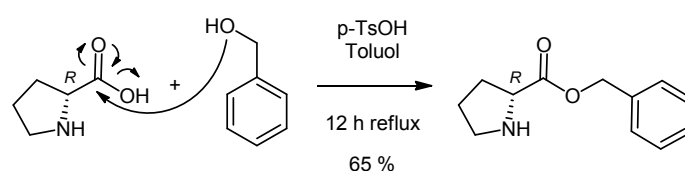
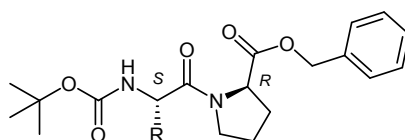
**Schema 3-10:** Mechanismus der säurekatalysierten Veresterung von (*R*)-Pro zu (*R*)-Pro-OBn.

Tabelle 3-3 fasst die synthetisierten Dipeptide, die angewendete Kupplungsmethode sowie die erhaltenen Ausbeuten zusammen. Eine allgemeine Struktur eines Dipeptids bestehend aus einer Stellvertreteraminosäure in (*S*)-Konfiguration und (*R*)-Pro-OBn ist in Abbildung 3-2 darstellt.

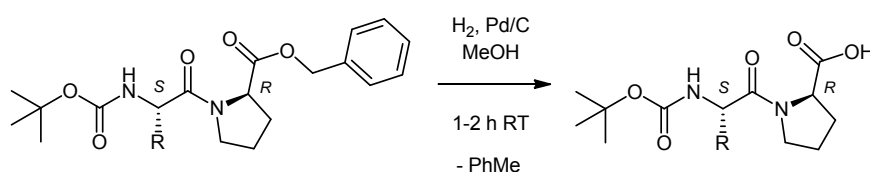
**Abb. 3-2:** Struktur eines Dipeptids bestehend aus einer Stellvertreteraminosäure in (*S*)-Konfiguration und (*R*)-Pro-OBn.**Tab. 3-3:** Synthetisierte Dipeptide, verwendete Kupplungsmethoden und erzielte Ausbeuten.

Peptid	Kupplungsmethode	Ausbeute
Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro-OBn	HBTU	54 %
Boc-(<i>S</i>)-Pro-(<i>R</i>)-Leu-OBn	HBTU	97 %
Boc-(<i>R</i>)-Pro-(<i>S</i>)-Leu-OBn	HBTU	46 %
Boc-Gly-(<i>R</i>)-Pro-OBn	HBTU	68 %
Boc-β-Ala-(<i>R</i>)-Pro-OBn	DCC/HOBt	45 %
Boc-Aib-(<i>R</i>)-Pro-OBn	PyBOP	46 %
Boc-(<i>S</i>)-Ala-(<i>R</i>)-Pro-OBn	PyBOP	30 %
Boc-(<i>S</i>)-Val-(<i>R</i>)-Pro-OBn	DCC/HOBt	51 %

Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	60 %
Boc-(S)-Nva-(R)-Pro-OBn	HBTU	83 %
Boc-(S)-Nle-(R)-Pro-OBn	PyBOP	62 %
Boc-(S)-Chg-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	54 %
Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	48 %
Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	42 %
Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	66 %
Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-OBn	DCC/HOBt	62 %
Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-OBn	HBTU	25 %
Boc-(S)-Leu-(R)-Orn(Boc)-OH	DCC/HOSu	75 %
Boc-(S)-Leu-(R)-Arg(NO ₂)-OH	DCC/HOSu	64 %

Die erzielten Ausbeuten liegen im zu erwartenden Bereich bei Kupplung zweier Aminosäuren mit unterschiedlicher Konfiguration. Es fallen sowohl Ausreißer nach oben (97 %) sowie nach unten (25 %) auf. Die beiden letzten Dipeptide der Tabelle 3-3, Boc-(S)-Leu-(R)-Orn(Boc)-OH und Boc-(S)-Leu-(R)-Arg(NO₂)-OH, werden aus dem zuvor hergestellten Leucin-Aktivester (S)-2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanoat (Boc-(S)-Leu-OSu) und (R)-2-Amino-5((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentansäure ((R)-Orn(Boc)-OH), bzw. (R)-Amino-5-(3-nitroguanidino)pentansäure ((R)-Arg(NO₂)-OH) in einem H₂O/Dioxan-Gemisch unter Anwesenheit von NaHCO₃ dargestellt. Der Aktivester Boc-(S)-Leu-OSu wird im vorhergehenden Schritt in einer DCC/HOSu-Kupplung in einer Ausbeute von 91 % isoliert.

Zur Kupplung der Peptide an die *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate werden im folgenden Syntheseschritt die Benzylesterschutzgruppen hydrogenolytisch abgespalten. Dazu wird das jeweilige Peptid in Methanol gelöst und im Autoklaven bei 10-15 bar H₂ mit Pd/C (10 %) als Katalysator hydrogenolysiert (Schema 3-11).^[141]



Schema 3.11: Hydrogenolyse der Benzylesterschutzgruppe mittels H₂ an Pd/C eines Dipeptids bestehend aus einer Stellvertreteraminosäure in (S)-Konfiguration und (R)-Pro-OBn.

Die nachfolgende Tabelle 3-4 listet die Di- und Tripeptide auf, die der Hydrogenolyse zur Abspaltung der Benzylschutzgruppe unterzogen wurden, sowie die erzielten Ausbeuten.

Tab. 3-4: Peptide, die der Hydrogenolyse unterzogen wurden und die dabei erreichten Ausbeuten.

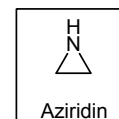
Peptid	Ausbeute
Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH	100 %
Boc-Gly-(S)-Leu-(R)-Pro-OH	100 %
Boc-(S)-Pro-(R)-Leu-OH	92 %
Boc-(R)-Pro-(S)-Leu-OH	87 %
Boc-Gly-(R)-Pro-OH	96 %
Boc-β-Ala-(R)-Pro-OH	90 %
Boc-Aib-(R)-Pro-OH	98 %
Boc-(S)-Ala-(R)-Pro-OH	94 %
Boc-(S)-Val-(R)-Pro-OH	93 %
Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-OH	97 %
Boc-(S)-Nva-(R)-Pro-OH	94 %
Boc-(S)-Nle-(R)-Pro-OH	88 %
Boc-(S)-Chg-(R)-Pro-OH	93 %
Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-OH	97 %
Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-OH	93 %
Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-OH	99 %
Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-OH	96 %
Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-OH	98 %

Die hydrogenolytischen Entschützungen der Benzylester liefern sehr gute Ausbeuten, die von 87 % im schlechtesten Fall bis zu quantitativem Umsatz reichen.

3.2.3 Synthese der *N*-acylierten *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate

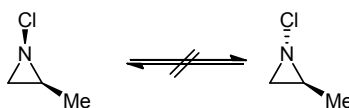
Die Kupplung der entschützten Di- und Tripeptide (Kap. 3.2.2) erfolgt mittels Fragmentkupplung an die jeweiligen *trans*-konfigurierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate (Kap. 3.2.1) mit dem Kupplungsreagenz PPA (Kap. 3.1, Schema 3-6). Dabei nimmt die *N*-Acylierung der Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate eine Sonderstellung ein, verglichen mit anderen sekundären Aminen.

Aziridin weist eine geringere Basizität auf als Alkylamine, aber eine stärkere als Arylamine. So hat das Aziridiniumion einen pK_a -Wert von 7.98. Es unterscheidet sich jedoch auch von anderen sekundären Aminen.^[142] Die Basizität ist z. B.



geringer als die von Pyrrolidin (pK_a -Wert = 11.3) und Piperidin (pK_a -Wert = 11.2).^[143] Grund hierfür sind die geometrischen Besonderheiten des dreigliedrigen Aziridinrings. Der Bindungswinkel beträgt im Dreiring 60° , was durch die Abweichung vom optimalen Bindungswinkel der sp^3 -Hybridisierung von 109.5° zu einer Ringspannung führt. Daher

weisen die C–N-Bindungen des Aziridins mehr p-Charakter auf, während das freie Elektronenpaar des Stickstoffs außerhalb des Rings mehr s-Charakter aufweist. Die C–N-Bindungen sind 148.2 pm und die C–C-Bindung ist 149.1 pm lang^[144] und ist somit kürzer als eine kovalente, nichtcyclische C–C-Bindung, die 154 pm beträgt.^[145] Diese Bindungssituation ist vergleichbar mit der in Cyclopropan und wird mit dem sog. „*banana bond*-Modell“ erklärt. So entspricht die Basizität eher der einesamins mit sp^2 -hybridisiertem Stickstoffatom. Die geometrischen Bedingungen sorgen auch dafür, dass die Inversion sehr langsam wird. Sie ist mit der von Phosphan vergleichbar, welches ein freies Elektronenpaar in einem s-Orbital trägt.^[143] Und auch die Aktivierungsenthalpie der *N*-Inversion von 2-Methylaziridin ist mit ca. 70 kJ/mol beträchtlich höher als die von typischen sekundären Aminen, allerdings nicht hoch genug, um Racemisierung bei Raumtemperatur zu vermeiden. Befindet sich jedoch ein elektronegativer Substituent am Stickstoff, erhöht sich die Inversionsbarriere deutlich. So z. B. bei 1-Chloro-2-methylaziridin (Schema 3-12), wo die Aktivierungsenthalpie 112 kJ/mol beträgt. In diesem Fall können bei Raumtemperatur die Diastereomere getrennt und isoliert werden. Die Inversion würde das freie Elektronenpaar in ein p-Orbital zwingen, was zu energiereich wäre.^[142]

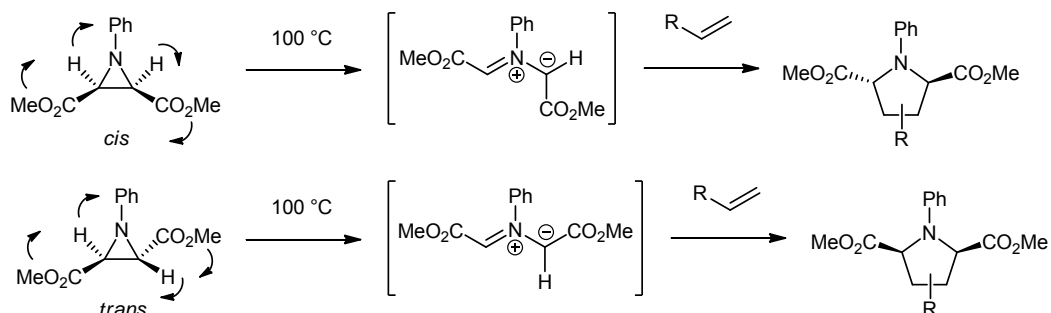


Schema 3-12: Diastereomere von 1-Chloro-2-methylaziridin, die sich bei RT nicht durch Inversion des Stickstoffatoms ineinander umwandeln, die Invertomere sind isolierbar.

Das Dipolmoment von Aziridin ist mit 1.89 D fast genau so groß wie das des Oxirans und die Ionisierungsenergie wurde zu 9.8 eV ermittelt. Das abgespaltene Elektron stammt dabei aus dem nichtbindenden Elektronenpaar des Stickstoffatoms.^[144]

Die Kombination von Baeyer-Spannung (beträgt in Aziridin ca. 111 kJ/mol und ist vergleichbar mit der von Oxiran) und die Elektronegativität des Stickstoff-Heteroatoms sorgt dafür, dass Aziridine schon bei relativ milden Bedingungen Ringöffnungsreaktionen eingehen. So ist der Aziridinring in saurem Milieu durch Protonierung destabilisiert und erliegt u. U. der Ringöffnung. Aziridin selbst reagiert mit Säuren explosionsartig zu polymeren Produkten. Ebenso findet bei einem Aziridinring mit elektronenziehenden Substituenten bei höheren Temperaturen eine konrotatorische Ringöffnung zum Azomethinylid statt. Gezeigt sei dies am Beispiel von *cis*-konfigurierten (2*S*,3*R*)-Dimethyl-1-phenylaziridin-2,3-dicarboxylat (Schema 3-13, oben) und *trans*-konfiguriertem (2*S*,3*R*)-Dimethyl-1-phenylaziridin-2,3-dicarboxylat (Schema 3-13, unten). Die bei der stereospezifischen konrotatorischen Ringöffnung gebildeten 1,3-Dipole werden *in situ* mit Dipolarophilen

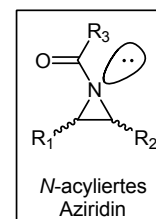
abgefangen und ergeben substituierte Pyrrolidine. *Cis*-Aziridine liefern *trans*-2,5-substituierte Pyrrolidine, während *trans*-Aziridine *cis*-2,5-substituierte Pyrrolidine generieren.^[142]



Schema 3-13: Konrotatorische Ringöffnung von (2*S*,3*R*)-Dimethyl-1-phenylaziridin-2,3-dicarboxylat (oben) und (2*S*,3*R*)-Dimethyl-1-phenylaziridin-2,3-dicarboxylat (unten) und anschließendes Abfangen mit einem Dipolarophil zum entsprechenden 2,5-substituierten Pyrrolidin.

Die aufgrund des erhöhten *s*-Charakters des freien Elektronenpares des Stickstoffs verminderte Basizität korreliert mit der Nucleophilie. Somit ist auch die Reaktivität im Vergleich zu anderen sekundären Aminen reduziert. Durch elektronenziehende Gruppen an C-2 und C-3 wird die Nucleophilie des Stickstoffatoms noch weiter herab gesetzt, da diese zusätzlich Elektronendichte abziehen.^[143]

In *N*-substituierten Aziridinen sollte der *N*-Substituent den Aziridinring aktivieren, indem er bei Ringöffnung durch ein Nucleophil das resultierende Amidanion stabilisiert. Bei Anwesenheit nicht-basischer Nucleophile kann Protonierung die Aktivierung erfüllen. Dementsprechend sind Aziridine klassifiziert als „aktiviert“ und „nicht-aktiviert“.^[146] Die Aktivierung aufgrund des



N-Substituenten ist bei *N*-acylierten Aziridinen gegeben. Aufgrund der Ringspannung liegt zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms und der Carbonylgruppe nur eine geringe Resonanzstabilisierung vor. Daraus folgt, dass die kinetische Aktivierung des Acylsubstituenten auf induktiven Effekten beruht. Die thermodynamische Aktivierung geschieht durch Resonanzstabilisierung des Amidanions nach erfolgter Ringöffnung. Neben der Ringöffnung durch Nucleophile kann auch ein Transfer der Acylgruppe auftreten.^[142] In *N*-acylierten Aziridinen konnte zudem nachgewiesen werden, dass das Stickstoffatom pyramidal angeordnet und nicht wie bei reiner sp^2 -Hybridisierung planar ist, was auch die geringere Resonanzstabilisierung im Vergleich zu anderen Amiden nach sich zieht. Auch ist die C=O-Schwingung (1706 cm^{-1}) in der IR-Spektroskopie der eines Ketons (1710 cm^{-1}) ähnlicher als der eines Amids (1650 cm^{-1}).^[143]

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten *N*-acylierten Aziridine sollen nach erfolgter Ringöffnung nach nucleophilem Angriff des Thiols des aktiven Zentrums der Cystein-Protease durch den Acylsubstituenten stabilisiert werden.

Aufgrund der vergleichsweise geringen Nucleophilie des Aziridinstickstoffatoms der Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate kommen zur *N*-Acylierung nur solche Peptidkupplungsmethoden in Frage, die über hochreaktive Zwischenstufen verlaufen. Bisher gelang die *N*-Acylierung mit Dipeptiden lediglich über unsymmetrische Anhydride mittels EEDQ.^[147] Die Weiterentwicklung und Verbesserung zur Fragmentkupplung von Dipeptiden und Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat gelang mittels PPA.^[148] Auch im Folgenden wird zur Knüpfung der Aziridin-N-CO-Bindung das Kupplungsreagenz PPA (50 % in Ethylacetat; Kap. 3.1, Schema 3-6) eingesetzt. Nach 1 h bei 0 °C wird das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Um die Ausbeute zu verbessern, werden die eingesetzten Äquivalente an Peptid mit freier Carboxylfunktion und PPA variiert. Tabelle 3-5 enthält eine Zusammenstellung der auf diese Weise synthetisierten *N*-acylierten Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylate, jeweils bezogen auf 1.0 Äq. eingesetztes Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat in Ethylacetat und der dabei erzielten Ausbeuten. Die zugehörigen Strukturen sind im Formelregister (Kap. 13) dargestellt. Abbildung 3-3 zeigt eine allgemeine Struktur der *N*-acylierten Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylate.

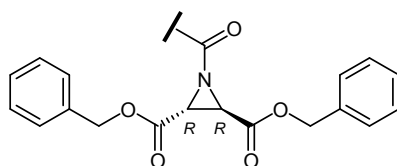


Abb. 3-3: Schematische Repräsentation der *N*-acylierten Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylate.

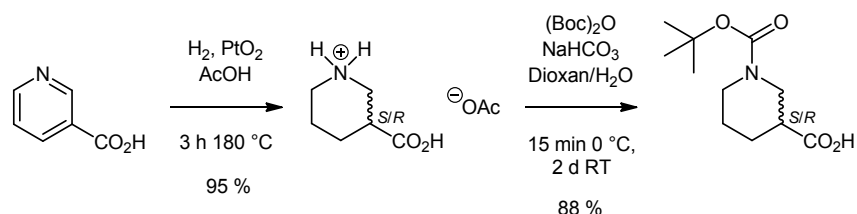
Tab. 3-5: Synthetisierte *N*-acylierte Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylate, Reaktionsbedingungen (bezogen auf 1.0 Äq. Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat in Ethylacetat) und erzielte Ausbeuten.

	Verbindung	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
CS09	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	5 %
CS15	Boc-Gly-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	25 %
CS16	Boc-(<i>S</i>)-Pro-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	18 %
CS17	Boc-(<i>R</i>)-Pro-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	20 %
CS18	Boc-(<i>S</i>)-Pro-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	24 %
CS19	Boc-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.05 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	7 %
CS20	Boc-Gly-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	23 %
CS21	Boc-β-Ala-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	55 %
CS22	Boc-Aib-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	17 %
CS23	Boc-(<i>S</i>)-Ala-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.5 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	12 %
CS24	Boc-(<i>S</i>)-Val-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	22 %
CS25	Boc-(<i>S</i>)-Ile-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	2.0 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	14 %
CS26	Boc-(<i>S</i>)-Nva-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.5 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	10 %
CS27	Boc-(<i>S</i>)-Nle-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	24 %
CS28	Boc-(<i>S</i>)-Chg-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	27 %

CS29	Boc-(<i>S</i>)-Cha-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 3.1 Äq. PPA	18 %
CS30*	Boc-(<i>S</i>)-Phg-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.5 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	23 %
CS31	Boc-(<i>S</i>)-Phe-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.5 Äq. Peptid, 4.0 Äq. PPA	22 %
CS32	Boc-(<i>S</i>)-hPhe-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.5 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	24 %
CS33	Boc-(<i>S</i>)-Trp-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	23 %
CS34	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Orn(Boc)-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.06 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	10 %
CS35	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Arg(NO ₂)-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Peptid, 2.0 Äq. PPA	30 %

* Diastereomerenverhältnis: 1:0.59 (bestimmt über ¹H-NMR)

Ebenso werden zwei Derivate synthetisiert, die anstelle des Peptids den *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotylrest enthalten. Dazu wird *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotinsäure ausgehend von Nicotinsäure dargestellt. Nicotinsäure wird hydrogenolytisch bei 40 bar H₂ mikrowellen-assistiert in 95 %-iger Ausbeute zu (*S/R*)-Nipecotinsäure umgesetzt. Die Hydrogenolyse verläuft in 0.25 M Essigsäure unter Katalyse von PtO₂.^[2] Anschließende Einführung der Boc-Schutzgruppe (88 % Ausbeute) liefert *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotinsäure (Schema 3-14).



Schema 3-14: Synthese von *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotinsäure.

Schließlich werden Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat und Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat mittels PPA in Ethylacetat (Kap. 3.1, Schema 3-6) an *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotinsäure gekuppelt. Die Strukturen sind in Abbildung 3-4 und die eingesetzten Äquivalente an Säure und PPA (bezogen auf 1.0 Äq. eingesetztes Dibenzylaziridin-(2,3)-dicarboxylat) sowie die erhaltenen Ausbeuten in Tabelle 3-6 zu finden.

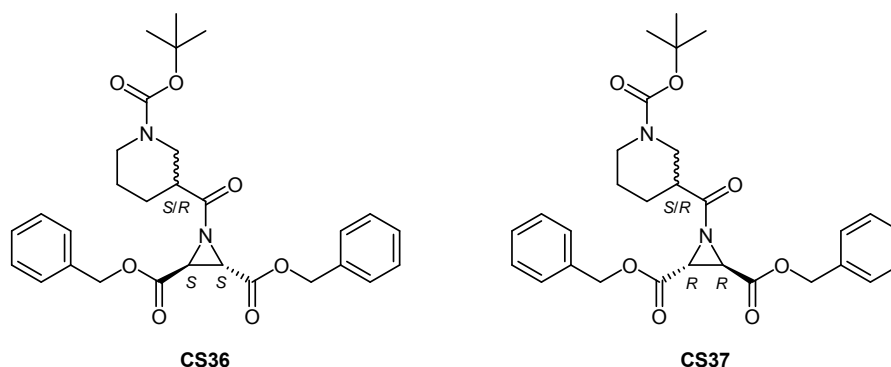


Abb. 3-4: Strukturen der Verbindungen **CS36** und **CS37**.

Tab. 3-6: Synthetisierte Verbindungen **CS36** und **CS37**, Reaktionsbedingungen (bezogen auf 1.0 Äq. Dibenzylaziridin-(2,3)-dicarboxylat in Ethylacetat) und erzielte Ausbeuten.

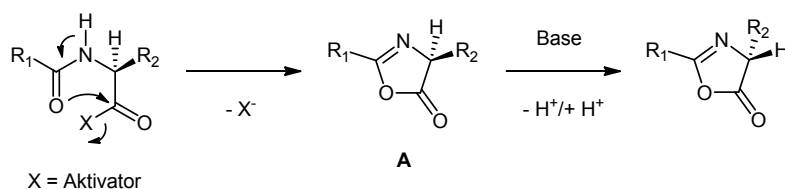
	Verbindung	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
CS36*	Boc-(<i>S/R</i>)-Nip-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	1.25 Äq. Boc-(<i>S/R</i>)-Nip-OH, 2.0 Äq. PPA	25 %
CS37**	Boc-(<i>S/R</i>)-Nip-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	1.0 Äq. Boc-(<i>S/R</i>)-Nip-OH, 2.0 Äq. PPA	13 %

* Diastereomerenverhältnis: 1:0.59 (bestimmt über ¹H-NMR)

** Diastereomerenverhältnis: 1:0.55 (bestimmt über ¹H-NMR)

Im Durchschnitt liegt die erzielte Ausbeute bei der PPA-vermittelten Kupplung der Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate an Verbindungen mit freier Carboxylgruppe bei 20 %, wobei sich das Maximum bei 55 % und das Minimum bei 5 % befinden. Dabei zeigt die Erhöhung der eingesetzten PPA-Äquivalente von 2.0 auf maximal 4.0 Äquivalente keinen verbessernden Effekt auf die Ausbeute sowie auch der Einsatz von Base. Ebenso führt die Erhöhung der Äquivalente an eingesetzter Verbindung mit freier Carboxylfunktion von 1.25 auf maximal 2.0 Äquivalente zu keiner Ausbeutesteigerung. Im Gegensatz dazu führt die Verringerung auf minimal 1.0 Äquivalent eingesetzter Verbindung mit freier Carboxylfunktion zu Ausbeuteverlusten. Die besten Ausbeuten werden durchschnittlich bei Einsatz von 2.0 Äquivalenten PPA und 1.25 Äquivalenten Verbindung mit freier Carboxylfunktion erzielt. Diese relativ schlechten Ausbeuten sind zum einen bedingt durch die vergleichsweise geringe Nucleophilie des Aziridinstickstoffatoms, zum anderen ist der sterische Anspruch der eingesetzten Verbindung mit freier Carboxylfunktion von entscheidender Bedeutung (nähere Erläuterung siehe Kap. 3.2.3.2).

Ein wichtiger Punkt bei Peptidkupplungsreaktionen ist Racemisierung, die trotz des Einsatzes von Racemisierungssuppressoren auftreten kann. Grundsätzlich werden zwei Racemisierungsmechanismen unterschieden, einerseits die direkte Abspaltung des α -Protons und andererseits die Bildung eines Oxazolone-Intermediats (Azalacton-Intermediat, Schema 3-15, **A**). Beide Mechanismen sind basenkatalysiert und finden während der Kupplungsreaktion an der C-terminalen Aminosäure statt. Bei Aminosäuren mit Aminoschutzgruppen des Urethantyps ereignet sich meist die Abspaltung des α -Protons, während bei Anwesenheit von Acyltyp-Schutzgruppen meist der Mechanismus der Oxazolone-Bildung auftritt. Der Grad der Racemisierung ist abhängig von mehreren Faktoren, wie induktive und mesomere Effekte der Seitenketten von Aminosäuren, die Art des Kupplungsreagenzes, bzw. des Aktivators, die Basizität der eingesetzten tertiären Amine, die Reaktionsdauer, die Temperatur und der Synthesemodus, ob konventionell oder mikrowellen-assistiert.^[124,126,149]

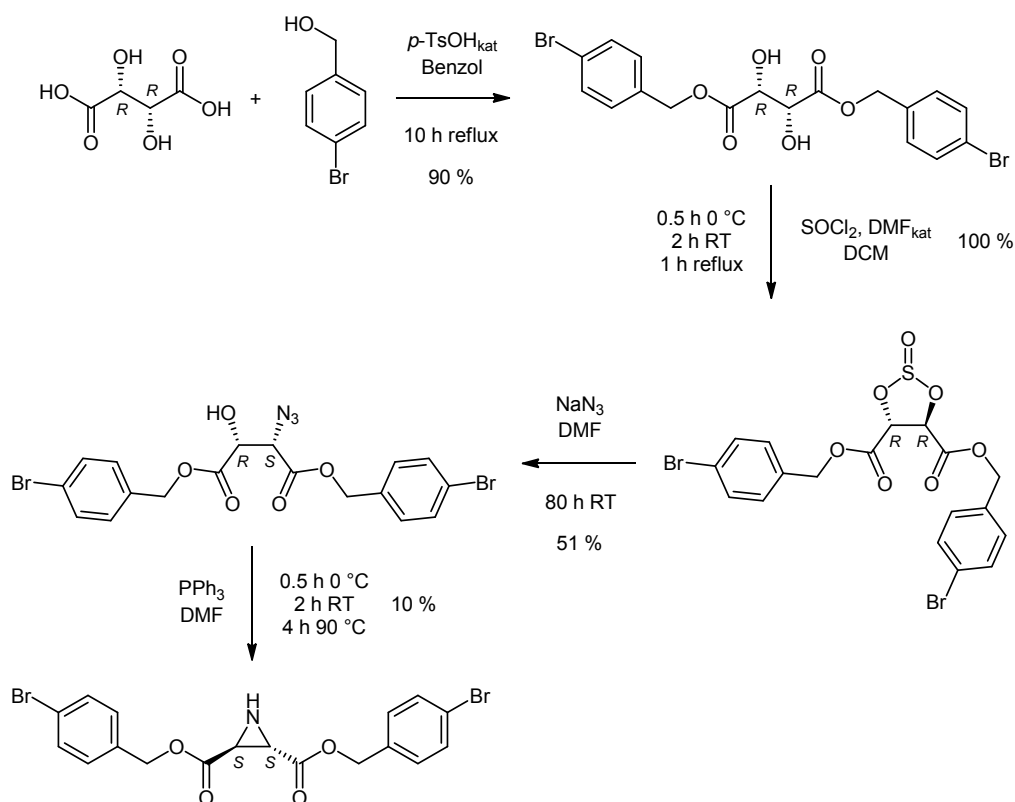


Schema 3-15: Mechanismus der Racemisierung über die Bildung eines Oxazolone-Intermediats **A**.

Eine Aminosäure, die bei Kupplung zu Racemisierung neigt, ist Phenylglycin. Dies geschieht durch Abstraktion des α -Protons, das durch den $-I$ -Effekt des Phenylrings acide wird.^[124,126,149] So fällt Verbindung **CS30**, die Phenylglycin enthält, als Diastereomerenmischung an. Epimerisierung am Phenylglycin-Rest erfolgt im letzten Schritt, der PPA-vermittelten *N*-Acylierung des Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylats (Tab. 3-5). Cyclische Aminosäuren, wie in dieser Arbeit das häufig eingesetzte Prolin, sind hauptsächlich aufgrund ihrer Rigidität relativ beständig gegen Racemisierung, sie besitzen chirale Stabilität.^[126]

3.2.3.1 Synthese des bromierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitors

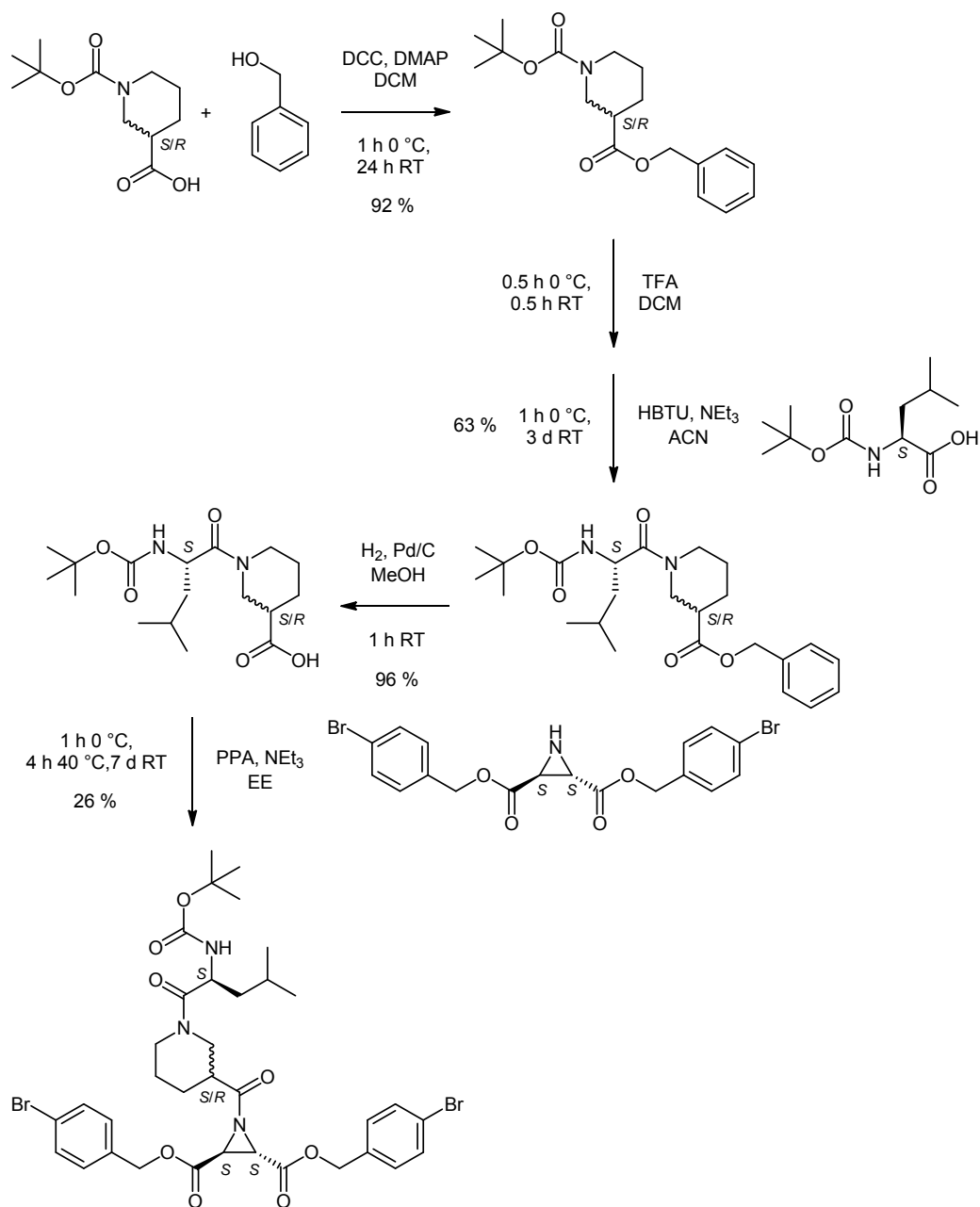
Für Kristallisationsversuche mit Rhodesain wird ein bromiertes Derivat von RV134C (Boc-(*S*)-Leu-(*S*/*R*)-Nip-(*S*,*S*)-Azi(OBn)₂)^[105,147] dargestellt. Die Phenylringe werden dabei durch *para*-Bromphenylringe substituiert. Die Synthese des bromierten Aziridins als Baustein für die Fragmentkupplung mit dem Dipeptid erfolgt analog zur Synthese von Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat (Schema 3-16). (2*R*,3*R*)-(+)-Weinsäure wird mit *para*-Brombenzylalkohol säurekatalysiert zu (2*R*,3*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-2,3-dihydroxysuccinat verestert.^[136] Dieses wird sodann unter DMF-Katalyse mit Thionylchlorid quantitativ zu (4*R*,5*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-1,3,2-Dioxathiolan-4,5-dicarboxylat-2-oxid umgesetzt. Nach nucleophilem Angriff von Azid wird unter SO₂-Freisetzung der Azidoalkohol (2*S*,3*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-2-azido-3-hydroxysuccinat generiert. Im letzten Schritt findet durch Triphenylphosphin die Cyclisierung zu (2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat in einer Staudinger-Reaktion statt.^[138] Das Aziridin wird in einer Ausbeute von 10 % erhalten.



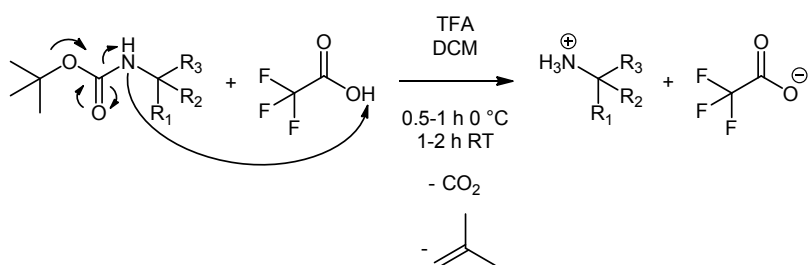
Schema 3-16: Synthese von (2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat.

Die Ringschlussreaktion erfolgt in noch schlechterer Ausbeute als im Falle der nicht-bromierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate. Bei Änderung der Reaktionsbedingungen (0.5 h 0 °C, 4 h RT, 3.5 h 90 °C) wurde ebenfalls lediglich eine Ausbeute von 9 % erzielt.

Das Dipeptid, das für die Fragmentkupplung mit (2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat herangezogen wird, wird aus *N*-*tert*-Butoxycarbonylleucin und (*S*/*R*)-Nipecotinsäurebenzylester mittels HBTU-Kupplung (Kap. 3.1, Schema 3-5) dargestellt. (*S*/*R*)-Nipecotinsäurebenzylester wird dazu zunächst aus *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-(*S*/*R*)-nipecotinsäure durch eine Steglich-Veresterung (Kap. 3.1, Schema 3-3) mit Benzylalkohol zur Verfügung gestellt. Die Boc-Schutzgruppe wird vor der nachfolgenden Kupplung mittels TFA (Trifluoressigsäure) abgespalten.^[150] Dabei bewirkt TFA die Spaltung der *tert*-Butylgruppe und eine anschließende Decarboxylierung der entstandenen Carbaminsäure (Schema 3-18). Die PPA-Kupplung (Kap. 3.1, Schema 3-6) liefert das Produkt **CS38** ((2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)1-(1-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanoyl)piperidin-3-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Leu-(*S*/*R*)-Nip-(*S*,*S*)-Azi(*p*BrBn)₂) in 26 % Ausbeute (Schema 3-17).



Schema 3-17: Synthese von **CS38**.

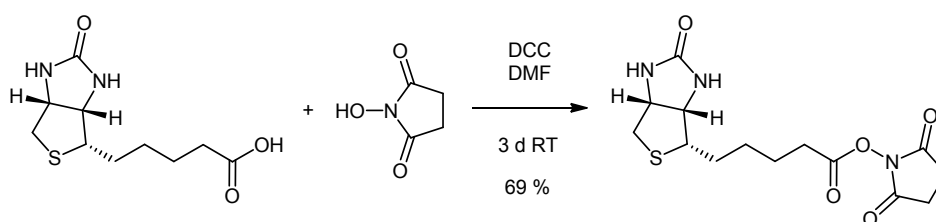


Schema 3-18: Mechanismus der TFA-vermittelten Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

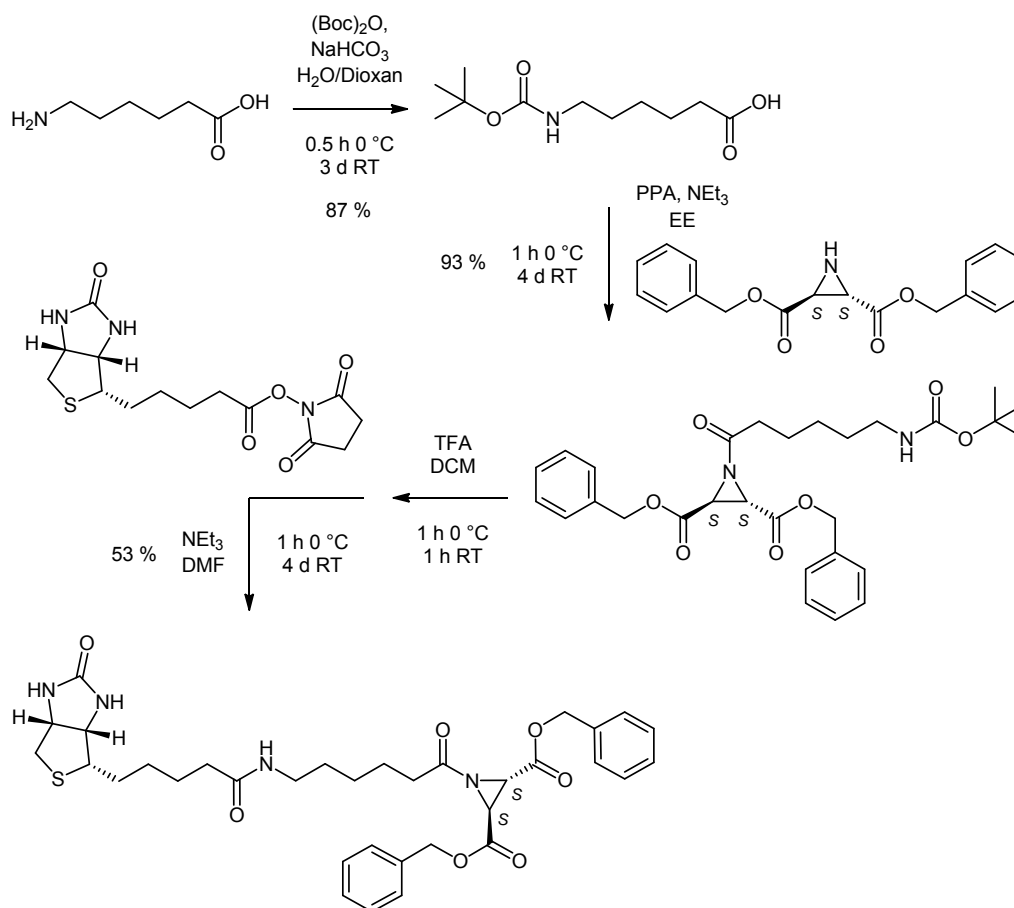
3.2.3.2 Synthese der Biotin-markierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

Biotinylierte Verbindungen finden *in vitro* Anwendung im *active-site labeling*. Da Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren irreversibel das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen alkylieren, ergibt sich durch biotinylierte, selektive Inhibitoren die Möglichkeit, die entsprechenden Enzyme zu markieren.^[151]

In der vorliegenden Arbeit war zunächst geplant, drei Biotin-markierte Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren darzustellen. Bei der ersten Biotin-markierten Verbindung handelt es sich um den literaturbekannten Inhibitor bADA.^[105,110,147] Die Synthese (Schema 3-20) wird mittels eines anderen Kupplungsreagenzes als in der Literatur vollzogen. Nachdem die Aminofunktion von Aminohexansäure durch die Boc-Schutzgruppe in einer Ausbeute von 87 % geschützt wird (Kap. 3.2.2, Schema 3-9), findet die *N*-Acylierung des Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylats mittels PPA in Ethylacetat unter Anwesenheit von Triethylamin statt. Das Produkt (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-[*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexanoyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (Boc-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂) kann in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden. Dies macht deutlich, dass bei Kupplung der Di- und Tripeptide sowie von *N-tert*-Butoxycarbonyl-(*S/R*)-nipecotinsäure (Kap. 3.2.3) der sterische Anspruch der entscheidende Punkt für die schlechten Ausbeuten (im Durchschnitt 20 %) ist. Die Zielverbindung kann durch TFA-vermittelte Boc-Entschützung (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) von Boc-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ *in situ* und Umsetzung mit zuvor aus D-Biotin und DCC/HOSu (Kap. 3.1, Schema 3-1) dargestelltem D-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat (Schema 3-19) und unter basischen Bedingungen in einer Ausbeute von 53 % erhalten werden. Die Gesamtausbeute über diese drei Schritte liegt somit bei 49 % und ist höher als die Literaturausbeute von 39 %.^[105,147]



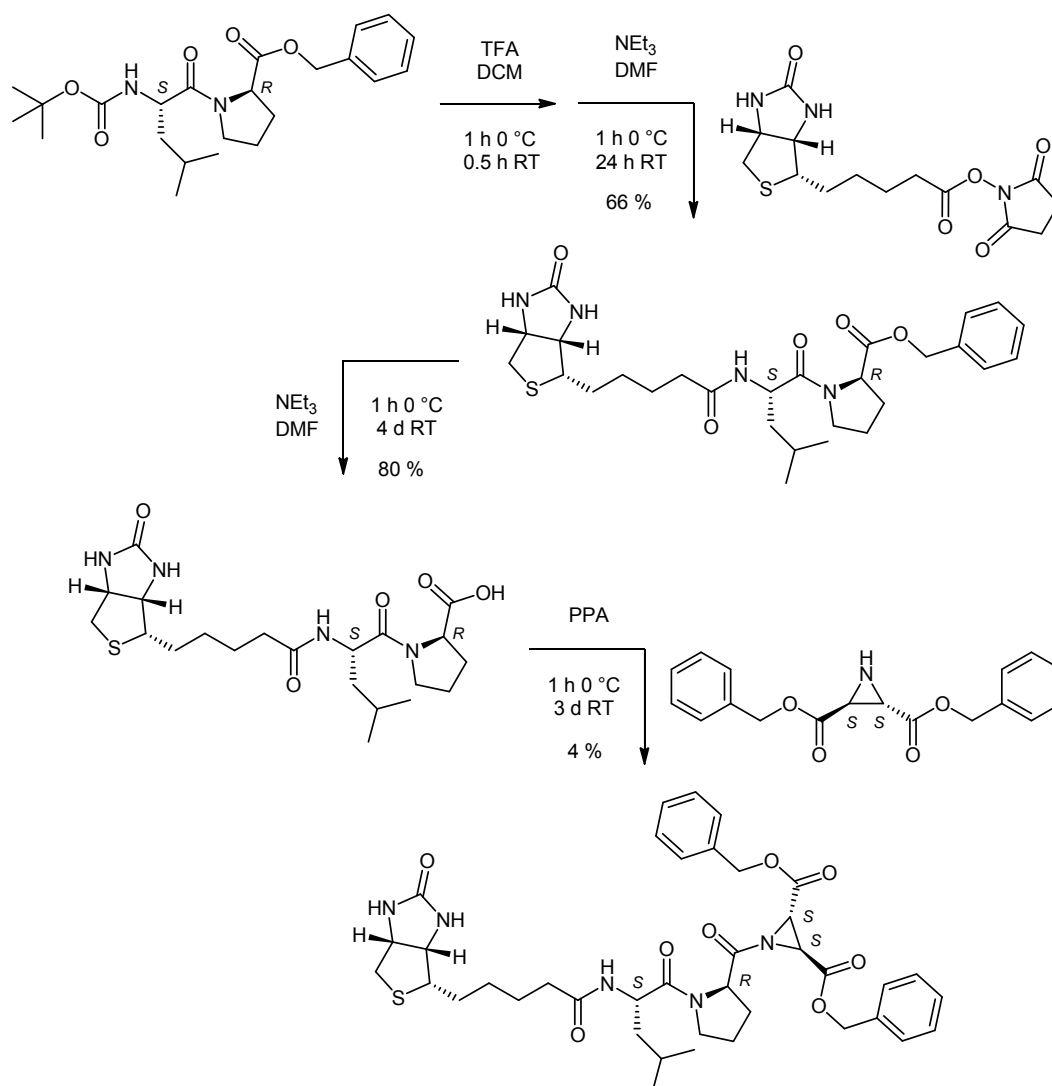
Schema 3-19: Synthese von D-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat.



Scheme 3-20: Synthese von bADA.

Um einen selektiveren Biotin-markierten Inhibitor zu erhalten, wird eine Verbindung mit der Peptidsequenz (S)-Leu-(R)-Pro anstelle des Aminohexanspacers synthetisiert. Bei Verbindung **CS39** ((2S,3S)-Dibenzyl-1-((R)-1-((S)-4-methyl-2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat = Bio-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) handelt es sich um ein Biotin-markiertes Derivat von **RV122C**. Zur Darstellung von **CS39** existieren grundsätzlich zwei erfolgversprechende Syntheserouten. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die Darstellung nicht ausgehend von (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂ = **CS09**) nach TFA-vermittelter Entfernung der Boc-Schutzgruppe und Umsetzung mit D-Biotin-N-hydroxy-succinimidat gelingt. Unter den sauren Bedingungen der Boc-Entschützung ist Verbindung **CS09** nicht stabil und zerfällt. Ebenso schlug die Syntheseroute ausgehend von (R)-Benzyl-1-((S)-4-methyl-2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure (Bio-(S)-Leu-(R)-Pro-OH) und Dibenzylaziridin-(2S,3S)-dicarboxylat über das Kupplungsreagenz EEDQ fehl.^[148] Die Synthese gelingt nachfolgend jedoch über Fragmentkupplung von Bio-(S)-Leu-(R)-Pro-OH an Dibenzylaziridin-(2S,3S)-dicarboxylat mittels PPA-Aktivierung, allerdings lediglich in einer Ausbeute

von 4 % (Schema 3-21). Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn wird dazu ausgehend von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucinyl-(*R*)-prolinbenzylester (Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn) (Kap. 3.2.2, Tab. 3-3) nach TFA-vermittelter Boc-Entschützung *in situ* (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) und anschließender Reaktion mit D-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat (Schema 3-19) unter Anwesenheit von NEt₃ in einer Ausbeute von 66 % erhalten. Während dieser beiden Reaktionsschritte tritt Epimerisierung auf, sodass Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn als Diastereomergemisch mit einem Diastereomerenverhältnis von 1:0.6 anfällt. Nach Hydrogenolyse der Benzylesterschutzgruppe wird (*R*)-Benzyl-1-((*S*)-4-methyl-2-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexa-hydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure (Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH) in 80 % Ausbeute generiert (Diastereomerenverhältnis 1:1) und in einer Kuppelungsreaktion mittels PPA (Kap. 3.1, Schema 3-6) mit Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat in DMF zur Reaktion gebracht, welche das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 4 % liefert.



Schema 3-21: Synthese von CS39.

Die *N*-Acylierung verläuft in diesem Fall in einer sehr schlechten Ausbeute. Grund hierfür könnte z. B. die konformative Flexibilität von Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH durch die vier Methyleinheiten des D-Biotins sein. Der sterische Anspruch erhöht sich und evtl. könnte sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylatfunktion des Prolins und einem Imid-NH des Biotins ausbilden. Dies würde eine verringerte Reaktivität des Carboxylats gegenüber PPA zur Folge haben. Die Reaktionszeit ist mit drei Tagen länger gewählt als bei der Darstellung der *N*-acylierten Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate in Kapitel 3.2.3, da nach kürzerer Reaktionszeit per DC kaum Umsatz erkennbar war.

Als dritter Biotin-markierter Inhibitor war ein markiertes Derivat von **CS09** ((2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-((*R*)-1-((*S*)-4-methyl-2-(6-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Bio-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂, Abb. 3-5) geplant, die Synthese wurde jedoch nicht bis zum Ende verfolgt. Zwischen D-Biotin und der Peptidsequenz bestehend aus (*S*)-Leu-(*R*)-Pro wird zusätzlich ein Aminohexanspacer eingeführt, damit der Biotin-Rest bei erfolgtem *active-site labeling* weiter vom aktiven Zentrum der Protease entfernt wäre.

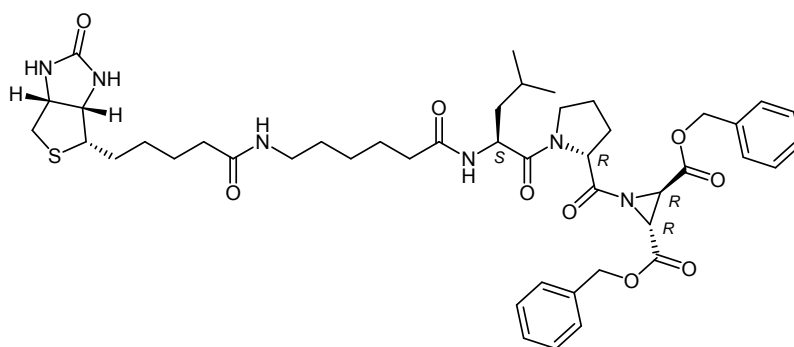
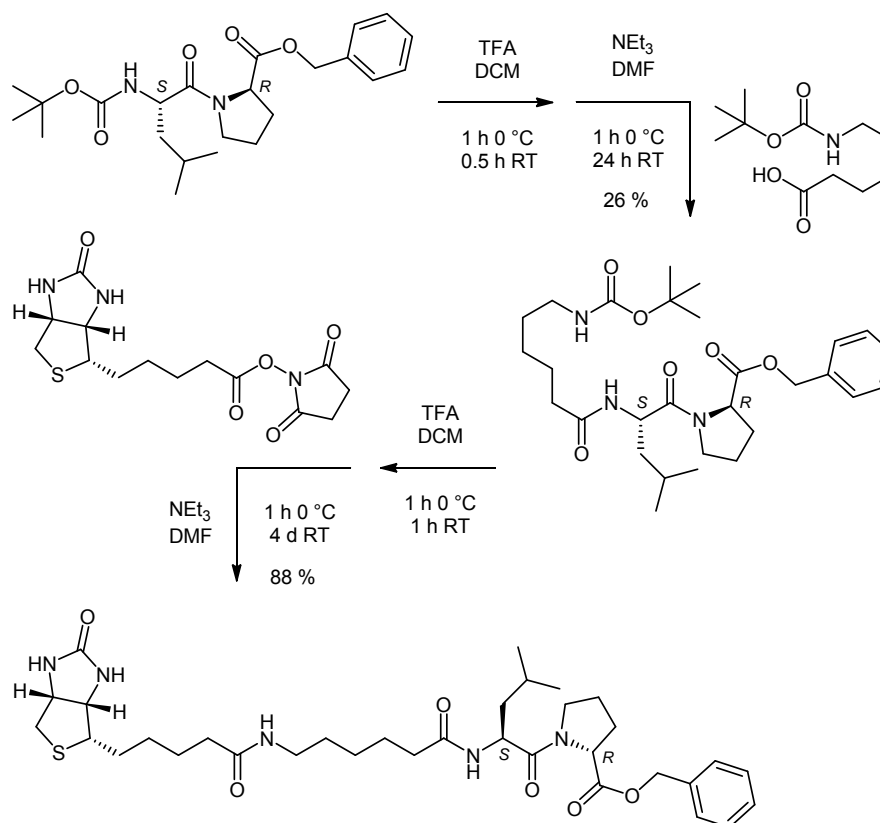


Abb. 3-5: Struktur der dritten geplanten, biotinylierten Verbindung Bio-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂.

Die Synthese erfolgt bis zur Darstellung von (*R*)-Benzyl-1-((*S*)-4-methyl-2-(6-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat (Bio-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn) (Schema 3-22). Erneut ausgehend von Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn (Kap. 3.2.2, Tab. 3-3) wird zunächst die Boc-Schutzgruppe mittels TFA abgespalten (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18). Das so generierte Amin wird mittels DCC/HOBt (Kap. 3.1, Schema 3-1) an *N-tert*-Butoxycarbonylaminohexansäure (Schema 3-20, erste Reaktion) gekuppelt. Das resultierende Zwischenprodukt (*R*)-Benzyl-1-((*S*)-2-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexan-amido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat (Boc-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn) wird in einer Ausbeute von 26 % erhalten. Nach wiederum TFA-vermittelter Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) wird im darauffolgenden Schritt D-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat (Schema 3-19) bei Zugabe von NEt₃ an das freigesetzte Amin gekuppelt. Diese Reaktion liefert das vorläufige Produkt

Bio-Ahx-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn in einer Ausbeute von 88 %. Auch bei dieser Verbindung tritt Epimerisierung auf, so fällt Bio-Ahx-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn mit einem Diastereomerenverhältnis von 1:0.75 an. Vermutlich findet die Epimerisierung während der sauren Bedingungen der TFA-vermittelten Boc-Entschützung statt.



Schema 3-22: Synthese von Bio-Ahx-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn.

An diesem Punkt wurde die Darstellung der anfänglich geplanten Verbindung abgebrochen. Erfahrungsgemäß funktioniert die *N*-Acylierung von Dibenzylaziridin-(2,3)-dicarboxylaten mit biotinylierten Peptiden wenn überhaupt nur in schlechten Ausbeuten. Zudem wurde vom Konzept des *active-site labeling* mit D-Biotin Abstand genommen. Stattdessen wird, wie im folgenden Kapitel (Kap. 3.2.3.3) beschrieben, die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff vorgenommen.

3.2.3.3 Synthese von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren bieten die Möglichkeit, Proteasen, die *in vitro* irreversibel von solchen Inhibitoren alkyliert wurden, mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Fluoreszenz *labeling* von Proteinen findet breite Anwendung zur Target-Identifizierung, wobei häufig Fluorescein-

isothiocyanat-,^[152] Tetramethylrhodaminisothiocyanat-^[153] oder 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäurekonjugate^[154] eingesetzt werden.

Dazu wird vorerst der Versuch unternommen, ein Konjugat eines Aziridin-2,3-dicarboxylats und Fluorescein-5(6)-isothiocyanat (5(6)-FITC, Abb. 3-6) darzustellen.

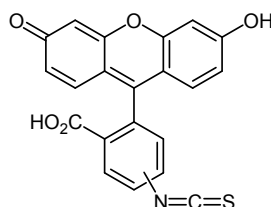
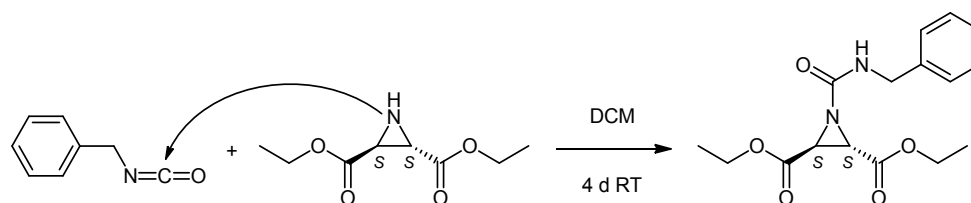


Abb. 3-6: Struktur von 5(6)-FITC.

Das Absorptionsmaximum von 5(6)-FITC befindet sich bei 495 nm und das Emissionsmaximum bei 525 nm.^[155] Die Emissionsfarbe liegt somit im grünen Spektralbereich des sichtbaren Lichts. Die Markierung erfolgt über eine Aminofunktion, welche nucleophil am Isothiocyanat-Kohlenstoffatom angreift und in der Bildung eines Thioharnstoffs resultiert. So geschieht die Markierung von Peptiden/Proteinen z. B. über eine freie ϵ -Aminofunktion der Seitenkette eines Lysinrests.^[156]

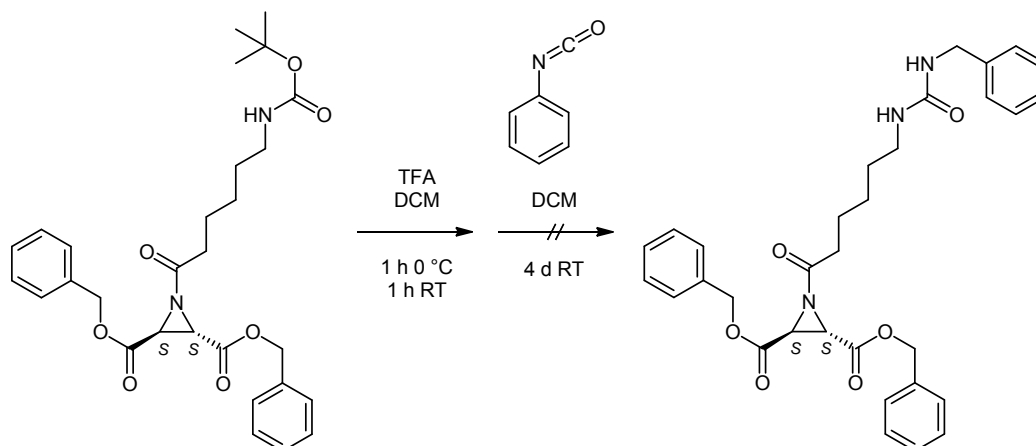
In Testreaktionen wird zunächst versucht, Benzylisocyanat als Modellverbindung mit Aminen zu den entsprechenden Harnstoffderivaten umzusetzen.^[157,158] Bei den dabei eingesetzten Aminen handelte es sich um Diethylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat^[148] und Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (Kap. 3.2.3.2, Schema 3-20). Diethylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat wird mit 1.1 Äquivalenten Benzylisocyanat versetzt (Schema 3-23). Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie und präparativer HPLC kann das Produkt (2*S*,3*S*)-Diethyl-1-(benzylcarbamoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat lediglich verunreinigt erhalten werden. Da es sich um eine Modellsubstanz handelt, werden keine weiteren Anstrengungen zur Reinigung unternommen. Allerdings wird belegt, dass die Möglichkeit besteht, Aziridin-2,3-dicarboxylate über das Aziridin-Stickstoffatom des Rings als Harnstoffderivate zu verknüpfen.



Schema 3-23: Synthese von (2*S*,3*S*)-Diethyl-1-(benzylcarbamoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (das Produkt wurde lediglich unsauber erhalten).

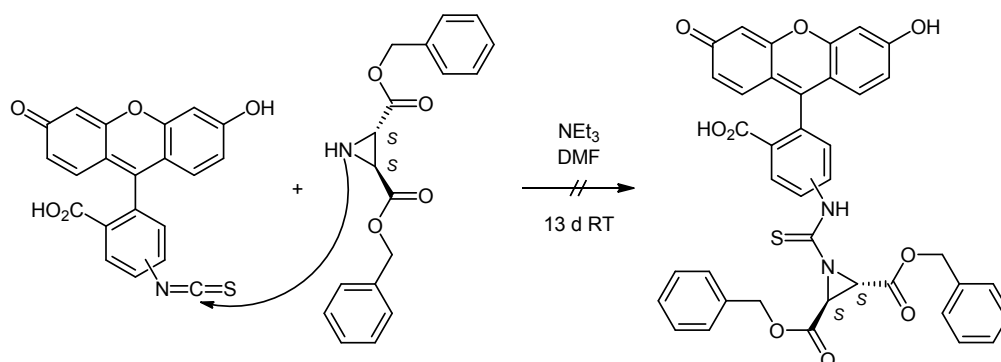
Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels TFA (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) von Boc-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ wird das so freigesetzte Amin ebenfalls mit 1.1 Äquivalenten

Benzylisocyanat umgesetzt, das Produkt (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-(6-(3-benzylureido)hexanoyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat kann nicht erhalten werden (Schema 3-24).

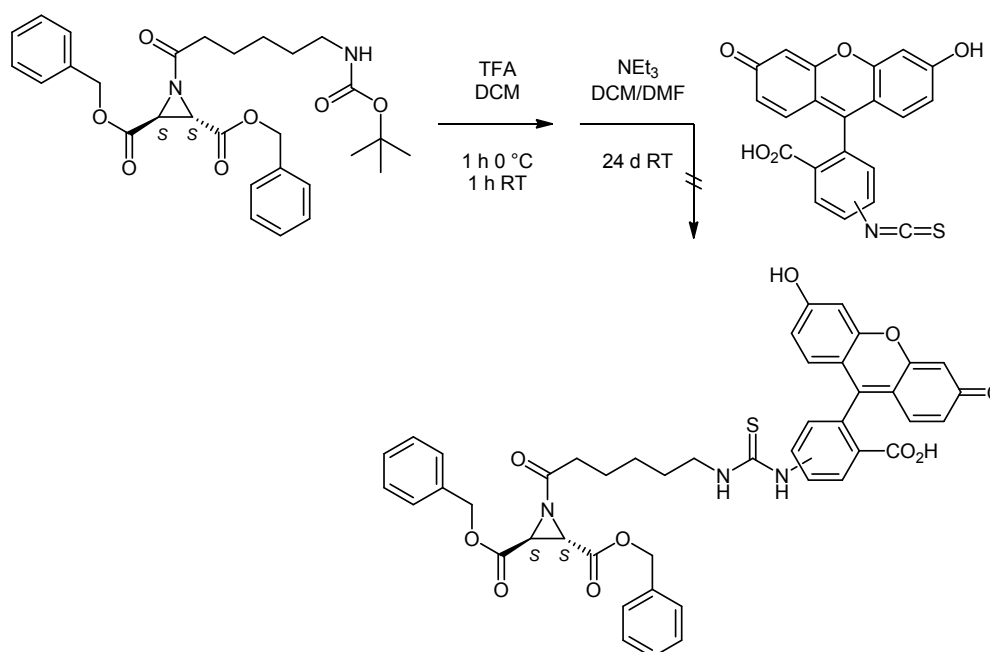


Schema 3-24: Versuchte Darstellung von (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-(6-(3-benzylureido)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, das Produkt wurde nicht erhalten.

Die Versuche, 5(6)-FITC über eine Thioharnstoff-Verknüpfung an Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylate zu knüpfen,^[159,160] misslingen. Dazu wurden erneut Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (Kap. 3.2.3.2, Schema 3-20) und Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat (Kap. 3.2.1, Tab. 3-1) herangezogen. Die jeweiligen FITC-gelabelten Produkte konnten unter den verwendeten Reaktionsbedingungen unter Anwesenheit von NEt₃ nicht erhalten werden (Schema 3-25 und 3-26).



Schema 3-25: Versuchte Darstellung von (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-(methylcarbamothioyl)aziridin-2,3-dicarboxylat-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoat, das Produkt wurde nicht erhalten.



Schema 3-26: Versuchte Darstellung von (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-(6-(3-methylthioureido)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoat, das Produkt wurde nicht erhalten.

Die Versuche zur Markierung mit 5(6)-FITC wurden aufgrund der schlechten synthetischen Zugänglichkeit und der für Praktikabilität der Fluoreszenzmikroskopie nicht optimalen Emissionswellenlängen von 5(6)-FITC-Derivaten eingestellt.

Stattdessen wird die Markierung mit 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure (AMCA, Abb. 3-7) vorgenommen.

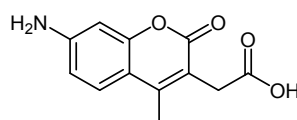


Abb. 3-7: Struktur von AMCA.

AMCA emittiert in der blauen Region des sichtbaren Lichts (440-460 nm) und das Absorptionsmaximum liegt bei 350 nm. Im Vergleich zu FITC bietet AMCA die Vorteile, dass die Konjugate photostabiler sind und der Stokes Shift größer ist (FITC: 30 nm, AMCA: 100 nm), was den Einsatz von Anregungs- und Emissionsfiltern einfacher macht. Anwendung als Fluoreszenzmarkierungsreagenz von z. B. Peptiden/Proteinen findet AMCA oft als *N*-Hydroxysuccinimidester, der unter milden Bedingungen beispielsweise an eine freie ϵ -Aminofunktion der Seitenkette eines Lysinrests gekuppelt wird. Ein weiterer Unterschied ist nach erfolgter Markierung der benötigte pH-Wert, der bei FITC-gelabelten Derivaten für maximale Fluoreszenz größer als acht sein muss, wohingegen der pH-Wert bei AMCA-gelabelten Derivaten im neutralen oder sauren Bereich optimal ist.^[154]

Ursprünglich war geplant, ein AMCA-markiertes Derivat von **CS09** darzustellen ((2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-((*R*)-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂, Abb. 3-8). Jedoch gestaltete sich erneut der letzte Schritt der Fragmentkupplung, die *N*-Acylierung, als nicht machbar. Die Synthese erfolgt bis zum Fragment (*R*)-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure (AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Leu-OH, Schema 3-29), welches im letzten Schritt nicht an Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat gekuppelt werden konnte.

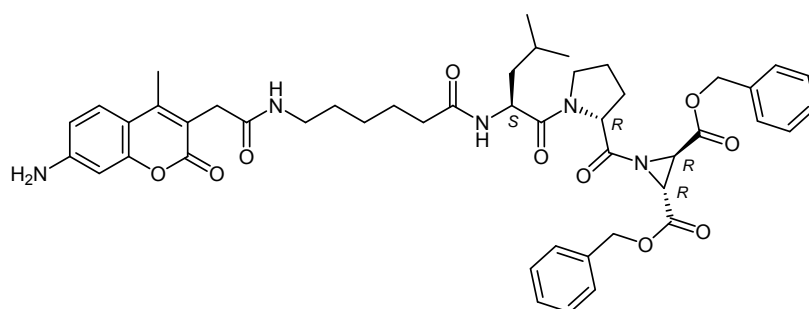
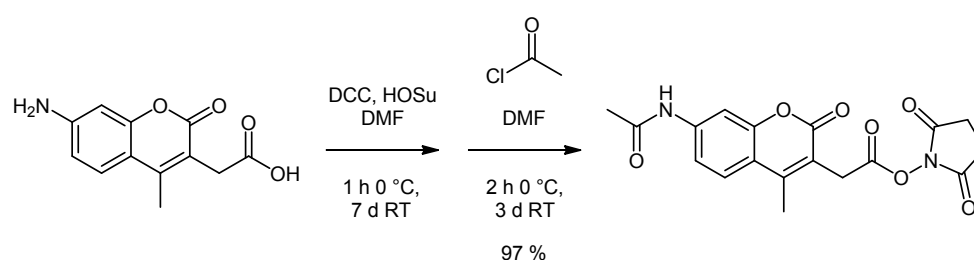


Abb. 3-8: Struktur der geplanten AMCA-markierten Verbindung AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂.

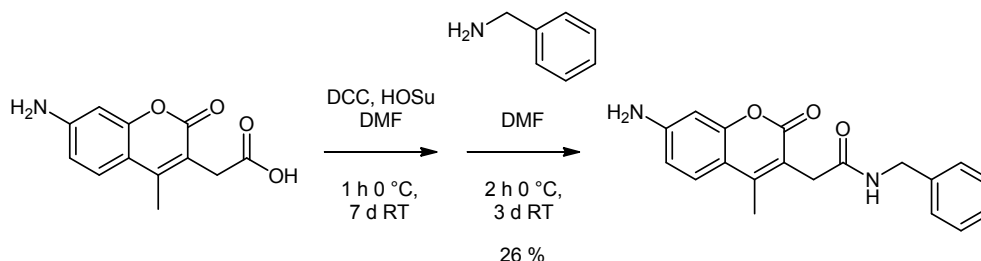
Ausgehend von AMCA beginnt die Synthese mit der Aktivierung der Carboxylfunktion mittels DCC/HOSu (Kap. 3.1, Schema 3-1). Da zur Schützung der Aminofunktion die Einführung der Boc-Schutzgruppe nicht gelingt, wird *in situ* mit Acetylchlorid acetyliert (Schema 3-27). Über beide Schritte kann das Produkt 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-acetamido-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat in 97 % Ausbeute erhalten werden.



Schema 3-27: Synthese von 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-acetamido-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat.

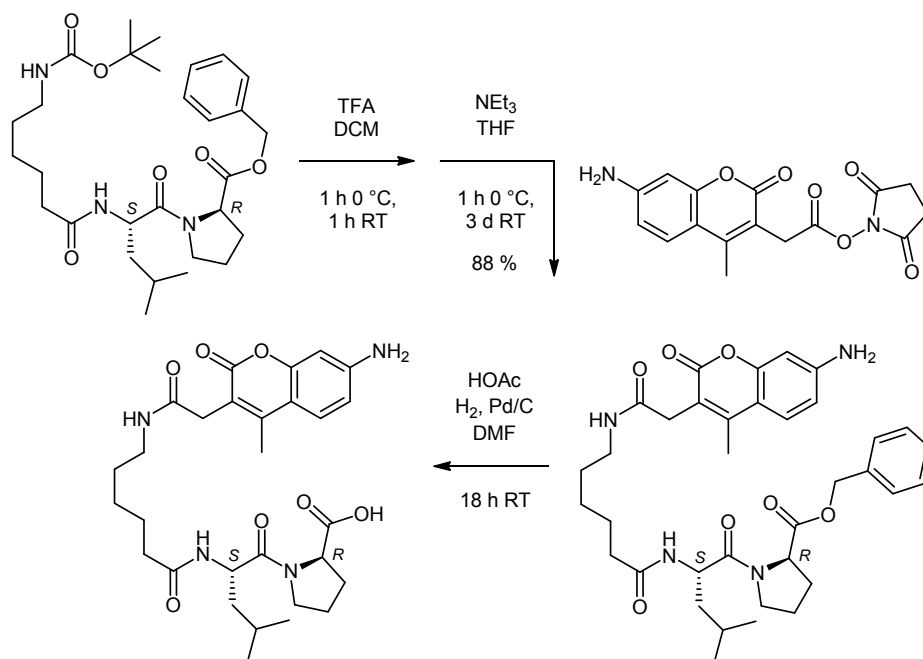
Die Synthese funktioniert im Testmaßstab bei Einsatz von 50 mg AMCA, im größeren Maßstab ist die Darstellung jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wird eine weitere Testreaktion durchgeführt, die zeigen soll, ob die Schützung der freien Aminofunktion notwendig ist. Dafür wird erneut der *N*-Hydroxysuccinimidaktivester von AMCA hergestellt und *in situ* mit einem Testamin, Benzylamin, umgesetzt, wobei das Produkt 2-(7-Amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-*N*-benzylacetamid in 26 % Ausbeute gebildet wird (Schema 3-28). Dabei treten als Nebenprodukte keine Verbindungen auf, die durch intermolekularen

Angriff der Aminogruppe des AMCAs verursacht würden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass das Schützen dieser Aminofunktion nicht nötig ist.



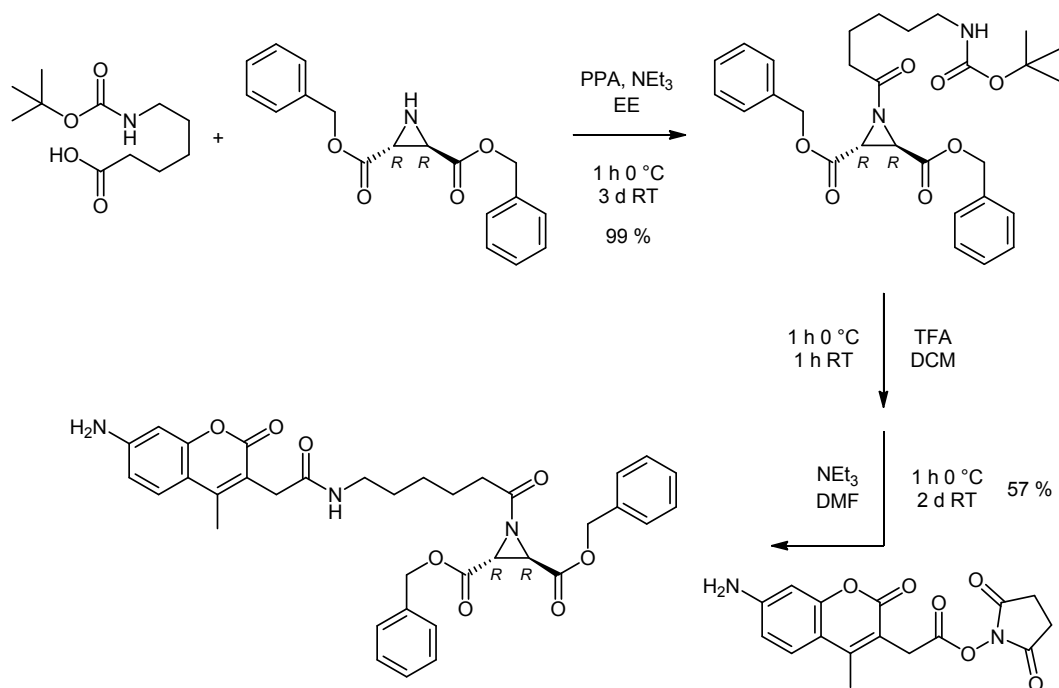
Schema 3-28: Synthese von 2-(7-Amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-N-benzylacetamid.

Zur Kupplung des zielführenden Amins wird der *N*-Hydroxysuccinimidaktivester von AMCA hergestellt und mit Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn (Kap. 3.2.3.2, Schema 3-22), welches zuvor *in situ* durch Boc-Entschützung (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) generiert wurde, zur Reaktion gebracht. Aus Gründen der Praktikabilität wird der Aktivester vor der weiteren Umsetzung nicht isoliert. Das Produkt (*R*)-Benzyl-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamido)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat (AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Leu-OBn) wird in einer Ausbeute von 88 % erhalten. Durch anschließende Hydrogenolyse in verdünnter Essigsäure wird die Benzylesterschutzgruppe abgespalten (Kap. 3.2.2, Schema 3-11). Das Produkt ((*R*)-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamido)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure, AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH, Schema 3-29) wird nach ^1H -spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt, das Lösungsmittel DMF wird dafür nicht komplett entfernt, da die folgende Reaktion ebenfalls in DMF stattfindet. Die PPA-vermittelte *N*-Acylierung liefert das gewünschte Produkt (Abb. 3-8) jedoch nicht.



Schema 3-29: Synthese von AMCA-Ahx-(S)-Leu-(R)-Pro-OH.

In Analogie zu bADA wird schließlich ein vereinfachtes AMCA-markiertes Aziridin dargestellt. Aus Boc-Aminohexansäure (Kap. 3.2.3.2, Schema 3-20) und Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat (Kap. 3.2.1, Schema 3-7, Tab. 3-1) wird (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (Boc-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂) in 99 %-iger Ausbeute synthetisiert. Die Ausbeute konnte im Vergleich zu Boc-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (Kap. 3.2.3.2, Schema 3-20, 93 % Ausbeute) nochmals gesteigert werden. Von Boc-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ wird TFA-vermittelt *in situ* die Boc-Schutzgruppe abgespalten (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) und mit zuvor dargestelltem, jedoch nicht isoliertem *N*-Hydroxysuccinimidaktivester von AMCA mittels PPA-Aktivierung (Kap. 3.1, Schema 3-6) zum Produkt **CS40** ((2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, AMCA-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂) verknüpft. Dieses wird in einer Ausbeute von 57 % erhalten (Schema 3-30).



Schema 3-30: Synthese von **CS40**.

Die Abbildungen 3-9 und 3-10 zeigen das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum von **CS40**. Das Absorptionsmaximum befindet sich bei 340.50 nm und das Emissionsmaximum bei 418.03 nm.

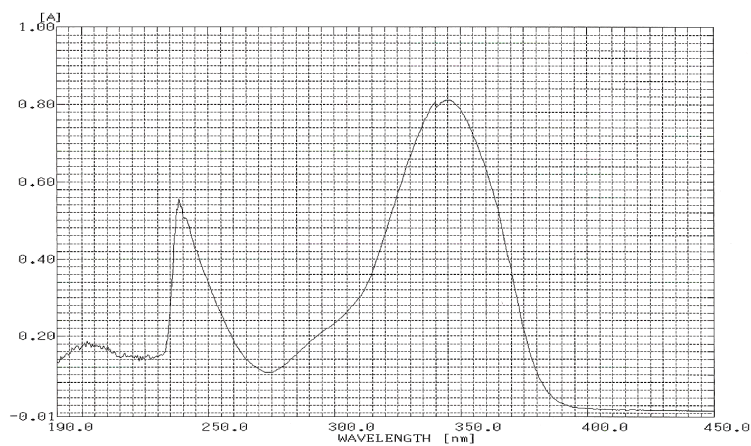


Abb. 3-9: Absorptionsspektrum von **CS40** ($c = 5.52 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

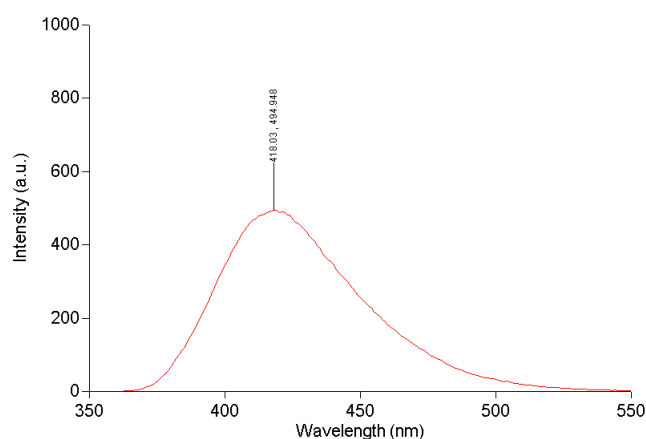
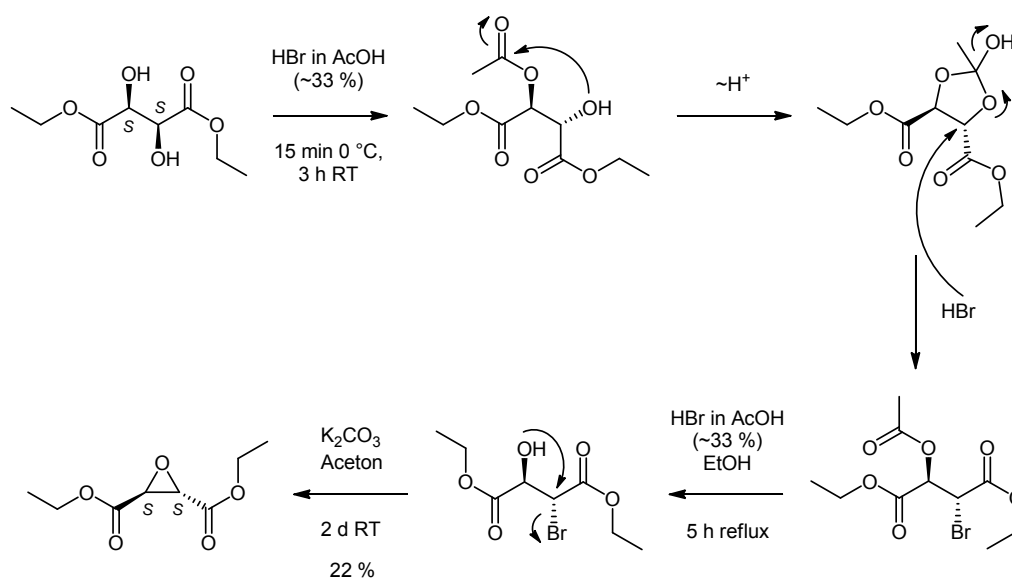


Abb. 3-10: Fluoreszenzspektrum von **CS40** ($c = 4.97 \cdot 10^{-7}$ mol/l).

3.3 Synthese der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

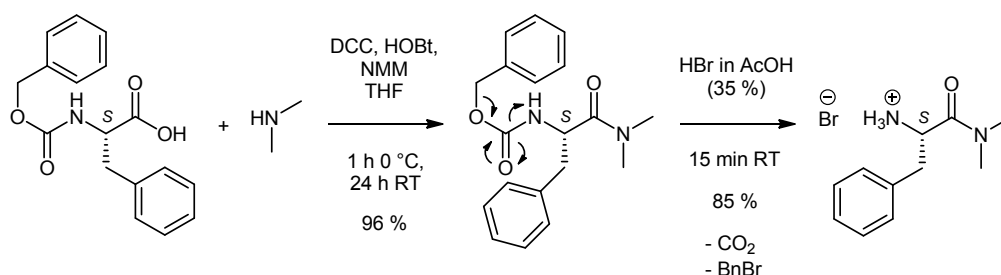
Zur Darstellung der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren werden die entsprechenden *trans*-konfigurierten Diethyloxiran-2,3-dicarboxylate nach Verseifung mit Aminen zur Reaktion gebracht. Auf diese Weise werden der literaturbekannte Inhibitor CLIK-148^[88] und ein Derivat mit (*R,R*)-konfiguriertem Epoxidring anstelle des (*S,S*)-konfigurierten Epoxidrings hergestellt.

Nachfolgend wird die stereoselektive Synthese von Diethyloxiran-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat aufgezeigt (Schema 3-31), die Darstellung von Diethyloxiran-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat erfolgt analog. Die Synthese geht aus von D-(-)-Diethyltartrat ((2*S*,3*S*)-Diethyl-2,3-dihydroxysuccinat), welches mit HBr in Essigsäure (~ 33 %) versetzt wird. Daraufhin wird zunächst eine der Hydroxylgruppen säurekatalysiert acetyliert, intermediär bildet sich ein 1,3-Dioxolan, welches sodann in einer S_N2 -Reaktion unter Inversion der Konfiguration am angegriffenen Kohlenstoffatom mit Bromid reagiert. Durch Refluxieren in Ethanol wird die Acetylgruppe säurekatalysiert abgespalten, es entsteht (2*R*,3*R*)-Diethyl-2-bromo-3-hydroxysuccinat. Schließlich erfolgt die Cyclisierung zum Epoxidring im basischen Milieu, wobei Bromid in einer zweiten S_N2 -Reaktion durch Angriff des Sauerstoffatoms unter Walden-Umkehr als Abgangsgruppe austritt. Diethyloxiran-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat wird in einer Ausbeute von 22 % erhalten^[161,162]. Aus L-(+)-Diethyltartrat ((2*R*,3*R*)-Diethyl-2,3-dihydroxysuccinat) wird in 35 % Ausbeute Diethyloxiran-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat erhalten.

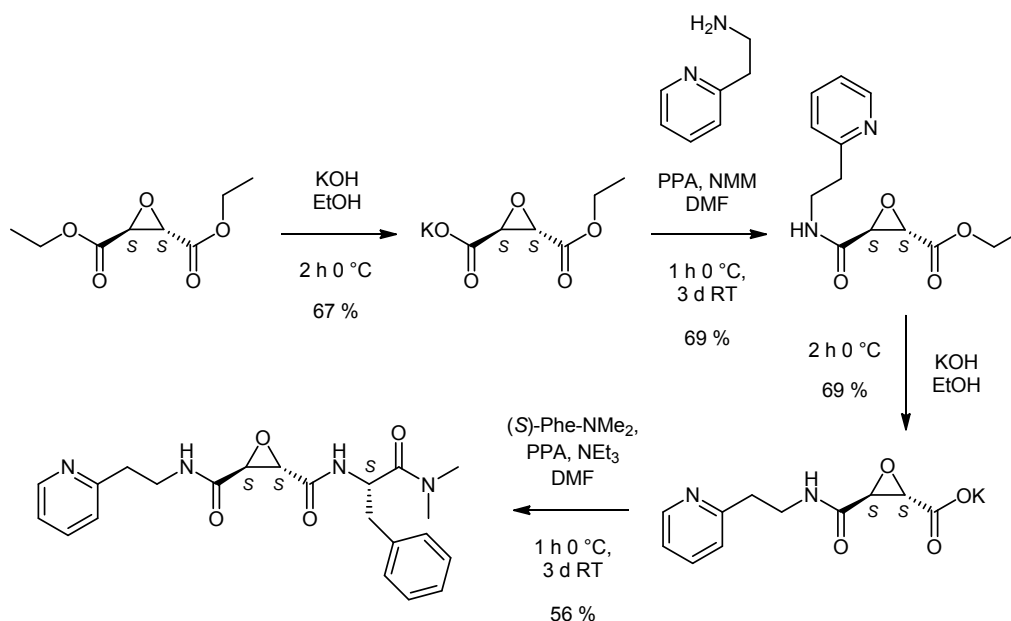


Schema 3-31: Synthese von Diethyloxiran-(2S,3S)-dicarboxylat.

Ausgehend von Diethyloxiran-(2S,3S)-dicarboxylat erfolgt die Darstellung von CLIK-148 (Schema 3-33). Durch Monohydrolyse mittels Kaliumhydroxid in Ethanol^[163,164] entsteht Kalium-(2S,3S)-2-ethyloxiran-3-carboxylat in 67 % Ausbeute, welches im Anschluss in einer PPA-vermittelten Kupplungsreaktion (Kap. 3.1, Schema 3-6) unter Anwesenheit von NMM an 2-(2-Aminoethyl)-pyridin gekuppelt wird. Die Reaktion liefert (2S,3S)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat in einer Ausbeute von 69 %. Als nächstes wird mittels Kaliumhydroxid in Ethanol auch der zweite Ethylester verseift,^[163,164] was das Zwischenprodukt Kalium-(2S,3S)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat in 69 % Ausbeute liefert. Im letzten Schritt wird PPA-vermittelt (Kap. 3.1, Schema 3-6) bei Anwesenheit von NMM (*S*)-2-Amino-*N,N*-dimethyl-3-phenylpropanamid ((*S*)-Phe-NMe₂) an das freie Carboxylat gekuppelt. Das finale Produkt (2S,3S)-*N*²-((*S*)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-*N*³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxiran-2,3-dicarboxamid (CLIK-148) wird in einer Ausbeute von 56 % erhalten. Dazu wird (*S*)-Phe-NMe₂ zuvor über zwei Stufen hergestellt (Schema 3-32). *N*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-phenylalanin (*Z*-(*S*)-Phe) wird in einer Kupplungsreaktion mittels DCC/HOBt und NMM (Kap. 3.1, Schema 3-1) an Dimethylamin in 96 % Ausbeute zu Benzyl-(*S*)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethylcarbammat (*Z*-(*S*)-Phe-NMe₂) gekuppelt. Nach Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe mittels HBr in Eisessig (35 %)^[165] kann das in 85 % Ausbeute erhaltene (*S*)-Phe-NMe₂ Hydrobromid der Kupplung an Kalium-(2S,3S)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat zugeführt werden.



Schema 3-32: Synthese von (*S*)-2-Amino-*N,N*-dimethyl-3-phenylpropanamid.



Schema 3-33: Synthese von CLIK-148.

Das CLIK-148-Derivat mit (*R,R*)-konfiguriertem Epoxidring wird in analoger Weise synthetisiert. Die Monohydrolyse von Diethylloxiran-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat liefert Kalium-(2*R*,3*R*)-2-ethylloxiran-3-carboxylat in 51 % Ausbeute. Die anschließende Kupplung an 2-(2-Aminoethyl)-pyridin mittels PPA und NEt_3 ergibt (2*R*,3*R*)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethyl-carbamoyl)oxiran-2-carboxylat in 56 % Ausbeute. Die Verseifung des zweiten Ethylesters zu Kalium-(2*R*,3*R*)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat geschieht in 60 % Ausbeute und das finale Kupplungsprodukt **CS41** ((2*R*,3*R*)-*N*²-((*S*)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-*N*³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxiran-2,3-dicarboxamid) (Abb. 3-11) wird durch Kupplung an (*S*)-2-Amino-*N,N*-dimethyl-3-phenylpropanamid mittels PPA und NMM in einer Ausbeute von 44 % erhalten.

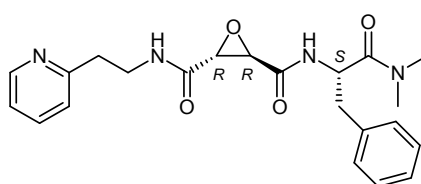


Abb. 3-11: Struktur von **CS41**.

3.4 Synthese der Michael-Akzeptor-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren

Abgeleitet von dem vinylogenen Dipeptidester (*S,E*)-Ethyl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat (= 16a, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)- ν Gln(Trt)-OEt)^[3] (Abb. 3-12) als Leitstruktur wurden Michael-Akzeptor-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren dargestellt.

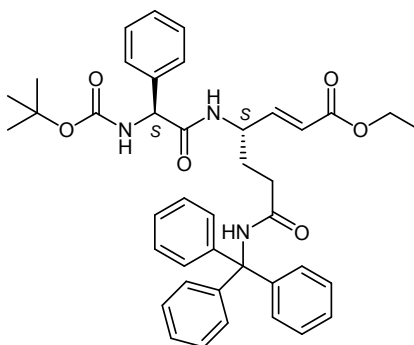
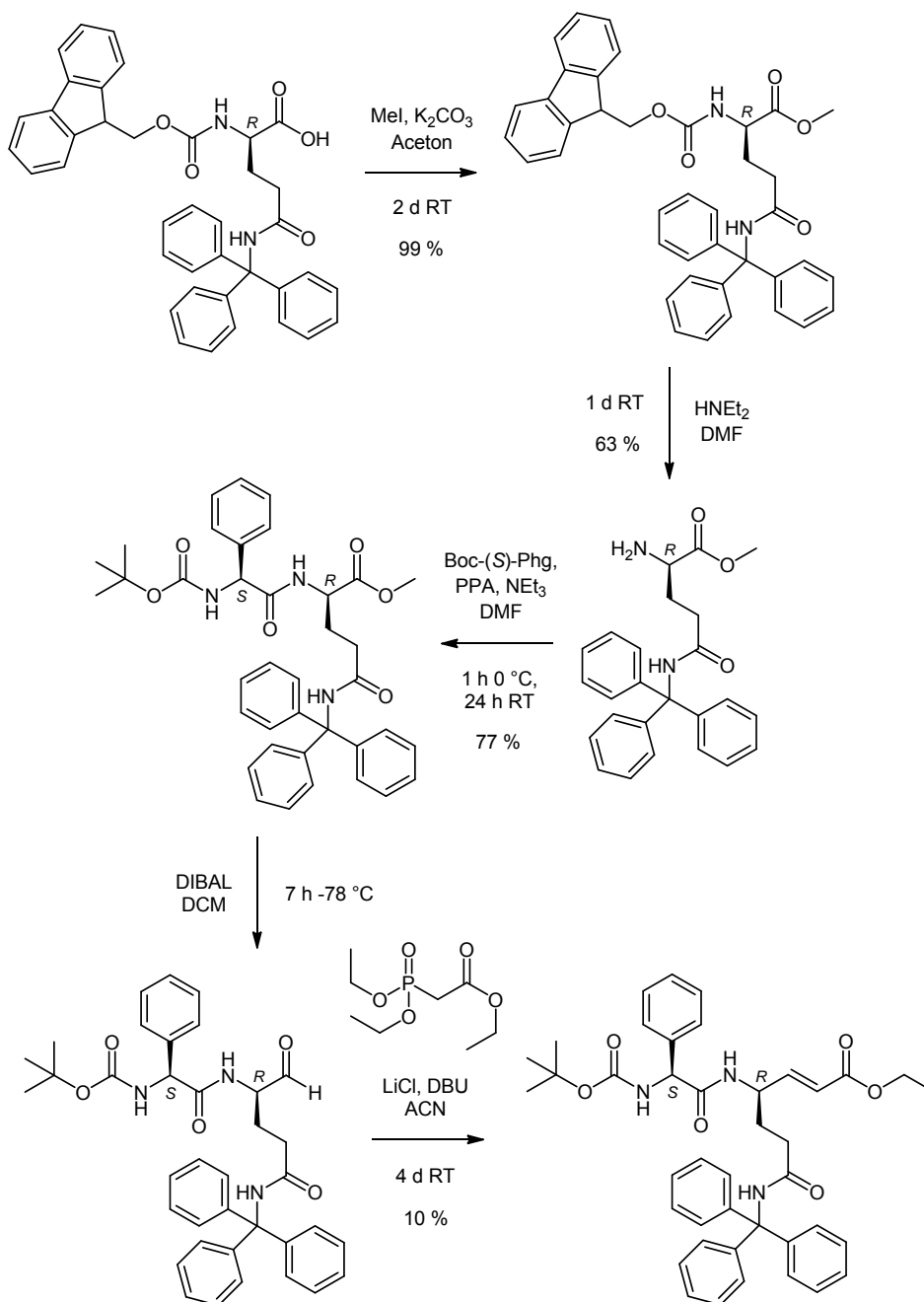


Abb. 3-12: Struktur von Boc-(*S*)-Phg-(*S*)- ν Gln(Trt)-OEt.

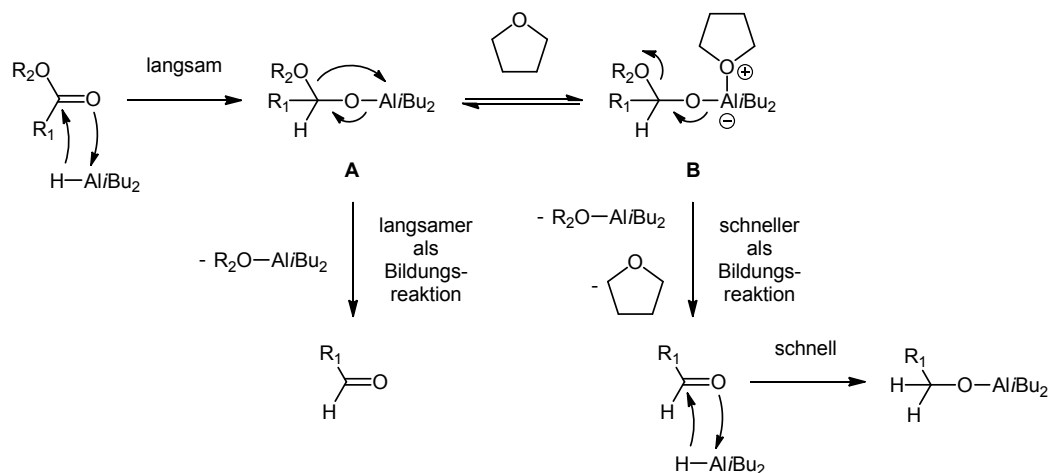
Zur Variation der Konfiguration des Glutamins wird **CS42** ((*R,E*)-Ethyl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*R*)- ν Gln(Trt)-OEt) synthetisiert (Schema 3-34). Beginnend mit (*R*)-2-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-oxo-5-(tritylamino)pentansäure führt Methylierung mittels Methyljodid in basischem Milieu^[166] in 99 % Ausbeute zu (*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester (Fmoc-(*R*)-Gln(Trt)-OMe). Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Diethylamin^[140] wird (*R*)-2-Amino-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester ((*R*)-Gln(Trt)-OMe) in 63 % Ausbeute erhalten. Im Anschluss wird dieser mittels PPA und NEt₃ (Kap 3.1, Schema 3-6) an Boc-(*S*)-Phg-OH gekuppelt. Das Dipeptid (*R*)-2-((*S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-phenylacetyl-amino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäure-methylester (Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-OMe) wird dabei in 77 % Ausbeute erhalten. Der Methylester wird mittels DIBAL in DCM zum entsprechenden Aldehyd *tert*-Butyl-((*S*)-2-(((*R*)-1,5-dioxo-5-(tritylamino)pentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenyl-ethyl)-carbammat (Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-H) reduziert (Mechanismus siehe Schema 3-35).^[3] Dieser wird ohne weitere Aufreinigung direkt in der Folgereaktion eingesetzt. Dazu wird er in einer Masamune-Reaktion mit Triethylphosphonoacetat unter Anwesenheit von Lithiumchlorid und DBU zum vinylogenen Dipeptidester **CS42** in 10 % Ausbeute umgesetzt (Mechanismus siehe Schema 3-37).^[3,167]



Scheme 3-34: Synthese von **CS42**.

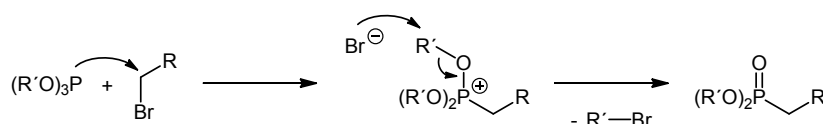
Der Mechanismus der DIBAL-Reduktion vom Carbonsäureester zum Aldehyd, bzw. zum Alkohol ist in Schema 3-35 aufgezeigt. Die Wahl des Lösungsmittels entscheidet, ob die Reduktion beim Aldehyd stehen bleibt oder bis zum Alkohol fortschreitet. Im ersten Schritt entsteht durch eine vermutlich einstufige Addition der Al-H-Bindung an die C=O-Bindung des Esters ein tetraedrisches Intermediat **A**. Bei tiefen Temperaturen und der Verwendung unpolarer Lösungsmittel wie Dichlormethan oder Toluol ist das Intermediat **A** stabil. Es wird bei wässriger Aufarbeitung protolytisch über das Halbacetal in den Aldehyd überführt. Bei der Verwendung polarer Lösungsmittel wie THF (Schema 3-35 erklärt den Lösungsmittel-effekt am Beispiel von THF) bildet das Tetraeder-Intermediat **A** mit dem Lösungsmittel einen

Lewis-Säure/Lewis-Base-Komplex und resultiert in dem Aluminat-Komplex **B**. **B** zerfällt und liefert den Aldehyd rascher als **A** aus DIBAL und dem Ester entsteht. Dieser intermediär auftretende Aldehyd konkurriert mit nicht umgesetztem Ester um das restliche DIBAL. Da der Aldehyd das stärkere Elektrophil ist, wird er bevorzugt zum Alkohol reduziert.^[125]



Schema 3-35: Mechanismus der DIBAL-Reduktion von Estern zu Aldehyden und weiter zu Alkoholen bei Anwesenheit unpolarer Lösungsmittel oder des polaren Lösungsmittels THF.

Die Masamune-Reaktion ist eine Spezialform der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion),^[168] die wiederum eine Ergänzung der Wittig-Reaktion^[169] darstellt. HWE-Reaktionen sind C,C-verknüpfende Olefinsynthesen zwischen dem Li-, Na- oder K-Salz eines β -Keto-, α -(Alkoxy-carbonyl)phosphonsäuredialkylesters oder eines anderen metallierten Phosphonsäuredialkylesters und einem Aldehyd. Die Produkte der beiden erstgenannten sind α,β -ungesättigte Ketone oder Ester. Im Allgemeinen wird das thermodynamisch favorisierte *trans*-Olefin, bzw. bei trisubstituierten C=C-Doppelbindungen das *E*-Olefin, gebildet. Außergewöhnlich hohe *trans*-Selektivität liegt bei Anwesenheit von stark koordinierenden Gegenionen wie Lithium vor. HWE-Reaktionen beschränken sich, außer in Ausnahmefällen, auf Phosphonate, die in β -Position einen Substituenten tragen, der das Carbanion stabilisiert (z. B. CO₂R, CN, Aryl, Vinyl, SO₂R, P(O)(OR₂), SR, OR, NR₂). Die wichtigste Synthesemöglichkeit zur Darstellung dieser HWE-Reagenzien ist die Arbusov-Reaktion (Schema 3-36).



Schema 3-36: Mechanismus der Arbusov-Reaktion.

Die so dargestellten Phosphonate werden durch Basen wie z. B. BuLi, NaH oder KO*t*Bu deprotoniert und mit Aldehyden zur Reaktion gebracht.^[125,170]

Die Masamune-Reaktion ist eine mildere Variante der HWE-Reaktion, die bei Base-sensitiven Aldehyden und Phosponaten zum Einsatz kommt und so auch Racemisierung vorbeugt. Eingesetzte Basen sind hierbei DBU oder DIPEA, außerdem wird Lithiumchlorid zugesetzt. Das eingesetzte Phosponat ist im Folgenden Triethylphosphonoacetat (Abb. 3-13, **A**, $pK_a = 18.6^{[171]}$ in DMSO). Lithiumkationen bilden mit dem daraus gebildeten Carbanion einen starken Komplex (Abb. 3-13, **B**), wodurch die Acidität des Triethylphosphonoacetats gesteigert wird und die Deprotonierung mit DBU ($pK_a = 11.6^{[172]}$ in H_2O) oder DIPEA ($pK_a \sim 10.5^{[173]}$ in H_2O) möglich wird.^[167]

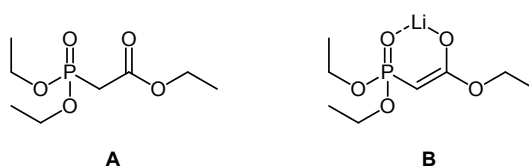
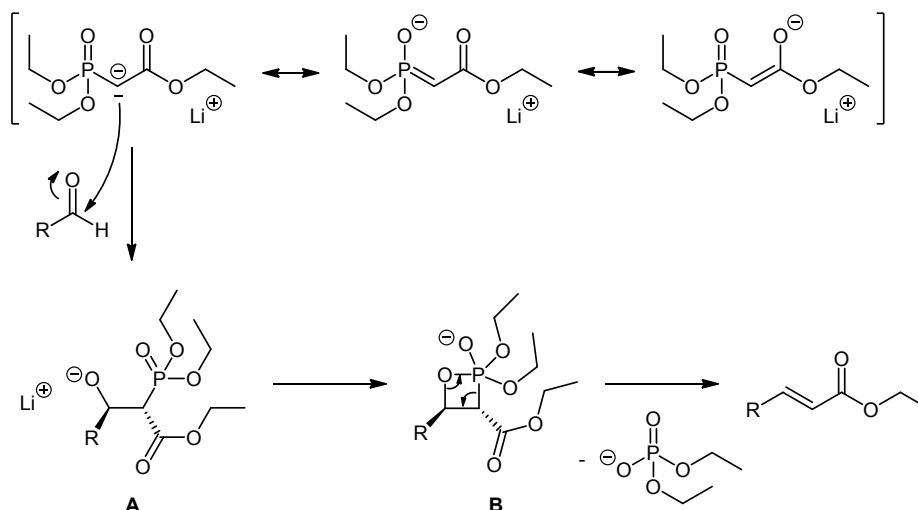


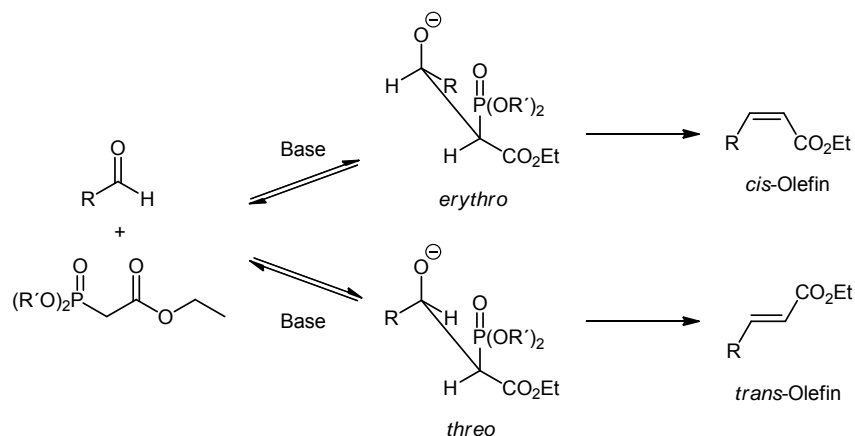
Abb. 3-13: Strukturen von Triethylphosphonoacetat (**A**) und Lithium-(*E*)-2-(diethoxyphosphoryl)-1-ethoxyethenolat (**B**).

Der Mechanismus der HWE-Reaktionen ist noch unbewiesen. Angenommen wird folgender Mechanismus (Schema 3-37): Das Carbanion des metallierten Triethylphosphonoacetats reagiert mit dem eingesetzten Aldehyd. Dabei ist ungewiss, ob das Oxaphosphetan **B** einstufig in einer [2+2]-Cycloaddition, oder zweistufig über das Alkoholat **A** gebildet wird. Die einstufige Reaktion entspräche dem Mechanismus der Wittig-Reaktion (Reagenzien sind Phosponiumsalze), wohingegen die zweistufige Reaktion dem Mechanismus der ähnlicheren Wittig-Horner-Reaktion (Reagenz ist dabei ein Alkyldiphenylphosphanoxid) entspräche. Das Alkoholat **A** würde in dem Fall zum Oxaphosphetan **B** cyclisieren. Auch ist nicht bekannt, ob die Bildung des Oxaphosphetans reversibel oder irreversibel stattfindet. Der Zerfall des Oxaphosphetans **B** ergibt das *trans*-Olefin. Warum *trans*-Selektivität auftritt, ist ebenfalls nicht bewiesen.^[125,170]



Schema 3-37: Angenommener Mechanismus der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion.

Die Stereochemie ist bestimmt durch eine Kombination der Stereoselektivität im ersten Schritt, die durch die Reste gegeben ist und eventuell durch reversible Bildung von Intermediaten. Es ist generell akzeptiert, dass sowohl kinetische als auch thermodynamische Kontrolle sowie reversible Bildung des *erythro*- und des *threo*-Addukts verantwortlich sind. Die *trans*-Selektivität kann erklärt werden durch die dominierende Bildung des thermodynamisch stabileren *threo*-Addukts, in dem die sterisch anspruchsvollen Reste maximal voneinander entfernt sind (Schema 3-38).^[174]



Schema 3-38: HWE-Reaktion: Bildung des *cis*-, bzw. *trans*-Olefins über die entsprechenden Übergangszustände.

Theoretische Betrachtungen der HWE-Reaktion des Lithiumenolats von Trimethylphosphonoacetat und Acetaldehyd kommen zum selben Ergebnis. In dieser Studie zeigt Ando durch *ab-initio*-Rechnungen in der Gasphase und bei Anwesenheit eines Moleküls Dimethylether, dass nach der Addition des Enolats an Acetaldehyd die Bildung des Oxaphosphetans der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wobei der Übergangszustand, der zum *trans*-Olefin führt, um 2.16 kcal/mol günstiger ist als derjenige, der zum *cis*-Olefin führt. Weitere Ergebnisse dieser Studie sind die Möglichkeit von Pseudorotation des Oxaphosphetans, auf die der Bruch der P–C-Bindung und anschließend der O–C-Bindung folgt.^[174]

Auch wurden Reagenzien entwickelt, die in HWE-Reaktionen selektiv *cis*-, bzw. *Z*-Olefine zugänglich machen. So entwickelten Still *et al.* 1983 Phosphonate, die anstelle der (H₃C-CH₂-O)-Gruppen (F₃C-CH₂-O)-Gruppen aufweisen (Still-Gennari-Variante)^[175] und Ando entwickelte 1995 Ethyl(diphenylphosphono)acetat als HWE-Reagenz (Ando-Variante).^[176] Ausgehend davon wurden *cis*-selektive Ethyl(diarylphosphono)acetate weiterentwickelt.^[177,178] Gemeinsam ist all diesen Phosphonaten, dass die Elektrophilie des Phosphoratoms in den intermediär gebildeten Addukten durch die elektronenziehenden Substituenten erhöht ist. Daher sollte die initiale Addition des Phosphonoenolats an den Aldehyd irreversibel werden und so die Stereochemie der Olefine bestimmen.^[174]

In einem analogen Syntheseweg zu **CS42** wird auch Verbindung **CS43** ((*S,E*)-Ethyl-4-((*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat, Boc-(*R*)-Phg-(*S*)- ν Gln(Trt)-OEt, Abb. 3-14) dargestellt.

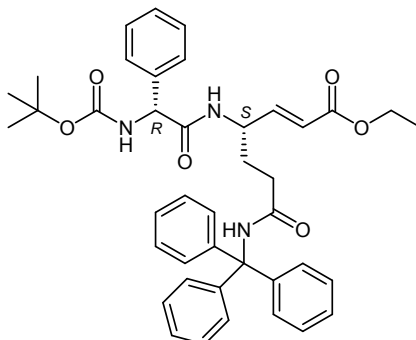
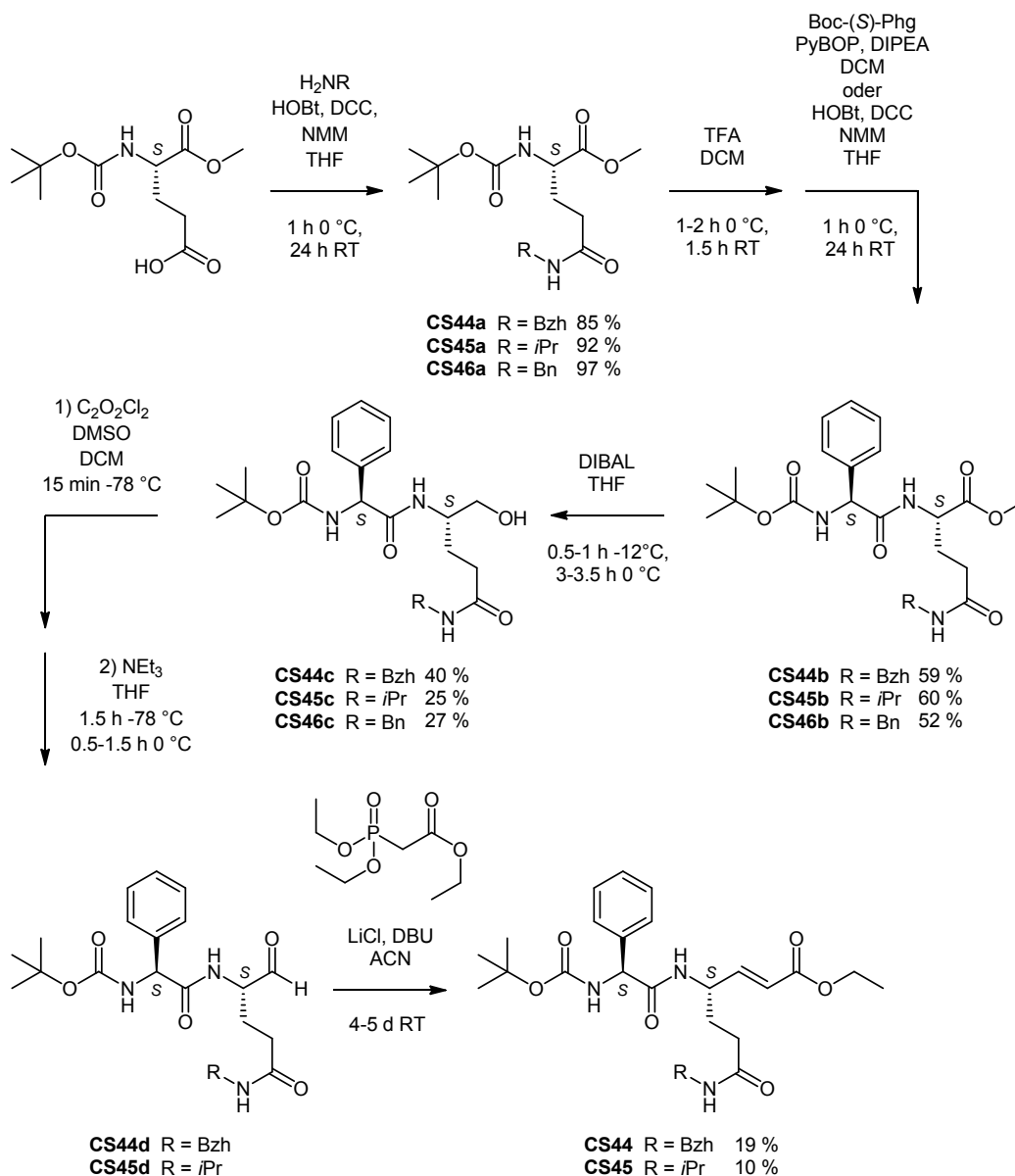


Abb. 3-14: Struktur von **CS43**.

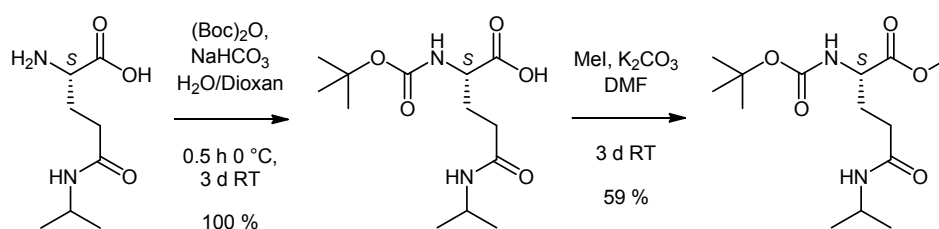
Im Gegensatz zu **CS42** verfügt das eingesetzte Phenylglycin über (*R*)-Konfiguration und das eingesetzte Glutamin über (*S*)-Konfiguration. (*R*)-Phenylglycin wird dazu mit der Boc-Schutzgruppe geschützt (55 % Ausbeute). (*S*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäure (Fmoc-(*S*)-Gln(Trt)-OH) wird mittels Methyljodid zu (*S*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester (Fmoc-(*S*)-Gln(Trt)-OMe) in 99 % Ausbeute verestert. Anschließende Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Diethylamin generiert (*S*)-2-Amino-4-(tritylcarbamoyl)butansäure-methylester ((*S*)-Gln(Trt)-OMe) in 67 % Ausbeute. Die PyBOP-vermittelte Kupplung (Kap. 3.1, Schema 3-4) unter Anwesenheit von DIPEA mit (*R*)-Phenylglycin liefert das Dipeptid (*S*)-2-((*R*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(tritylcarbamoyl)-butansäuremethylester (Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-OMe) in einer Ausbeute von 83 %. Nach Reduktion des Methylesters zum Aldehyd mittels DIBAL wird der entstandene Aldehyd *tert*-Butyl-((*S*)-2-(((*R*)-1,5-dioxo-5-(tritylamino)pentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamat (Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-H) in der Folgereaktion direkt in der Masamune-Reaktion mit Triethylphosphonoacetat zu **CS43** ((*S,E*)-Ethyl-4-((*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat, Boc-(*R*)-Phg-(*S*)- ν Gln(Trt)-OEt) umgesetzt. Das Produkt wird in einer Ausbeute von 12 % isoliert, allerdings wird ein Diastereomeren-gemisch erhalten.

Die nachfolgenden vinylogenen Dipeptidester enthalten sowohl die Aminosäure Phenylglycin, als auch die Aminosäure Glutamin in (*S*)-Konfiguration. Variationen treten in Form des Amids in δ -Position des Glutamins auf (Schema 3-39).



Schema 3-39: Synthese von **CS44**, **CS45** und **CS46c**.

Im ersten Schritt wird jeweils (*S*)-Glutamat eingesetzt und in DCC/HOBt vermittelten Kupplungsreaktionen (Kap. 3.1, Schema 3-1) mit α -Aminodiphenylmethan, *iso*-Propylamin und Benzylamin zu den Amiden **CS44a** (*tert*-Butyl-(*S*)-3-(benzhydrylcarbamoyl)-1-(methoxycarbonyl)propylcarbamate, Boc-(*S*)-Gln(CHPh₂)-OMe; 85 % Ausbeute), **CS45a** ((*S*)-Methyl-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-(isopropylamino)-5-oxopentanoat, Boc-(*S*)-Gln(*i*Pr)-OMe; 92 % Ausbeute) und **CS46a** (*tert*-Butyl-(*S*)-3-(benzylcarbamoyl)-1-(methoxycarbonyl)propylcarbamate, Boc-(*S*)-Gln(Bn)-OMe; 97 % Ausbeute) gekuppelt. Boc-(*S*)-Gln(*i*Pr)-OMe wird auch auf einem zweiten Syntheseweg zugänglich gemacht (Schema 3-40). Nach Einführung der Boc-Schutzgruppe (Kap. 3.2.2, Schema 3-9) in (*S*)-2-Amino-5-(isopropylamino)-5-oxopentansäure in quantitativer Ausbeute wird die Säurefunktion mittels Methyljodid unter basischen Bedingungen verestert,^[166] woraufhin bei der Produktbildung eine Ausbeute von 59 % erzielt wird.

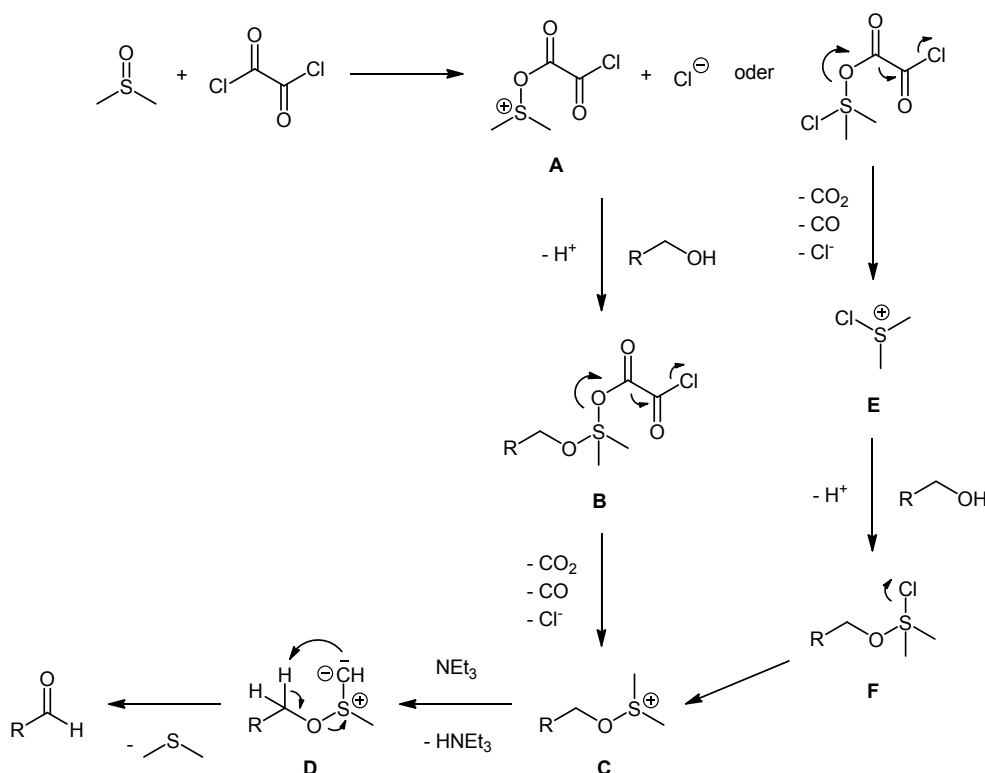


Schema 3-40: 2. Syntheseweg zur Darstellung von **CS45a**.

Mittels TFA wird von **CS44a**, **CS45a** und **CS46a** jeweils die Boc-Schutzgruppe abgespalten (Kap. 3.2.3.1, Schema 3-18) und unter Kupplungsbedingungen mit PyBOP (Kap. 3.1, Schema 3-4) oder DCC/HOBt (Kap. 3.1, Schema 3-1) mit Boc-(S)-Phg zur Reaktion gebracht. Die Kupplungsprodukte sind die Dipeptide **CS44b** ((S)-2-((S)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(benzhydrylcarbamoyl)-butansäure-methylester, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(CHPh₂)-OMe; 59 % Ausbeute), **CS45b** ((S)-Methyl-2-((S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-5-(isopropylamino)-5-oxopentanoat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-OMe; 60 % Ausbeute) und **CS46b** ((S)-2-((S)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(benzylcarbamoyl)-butan-säuremethylester, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(Bn)-OMe; 52 % Ausbeute). Da weder Verbindung **CS44b**, **CS45b** oder **CS46b** bei tieferen Temperaturen als 0 °C in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind, ist die Möglichkeit der Reduktion der Methylester zu den entsprechenden Aldehyden mittels DIBAL nicht gegeben. Aus diesem Grund werden in THF zunächst die entsprechenden Alkohole dargestellt (Schema 3-35),^[179,180] die anschließend in einer Swern-Oxidation (Mechanismus siehe Schema 3-41) zu den Aldehyden oxidiert werden.^[180,181] So werden die folgenden Alkohole **CS44c** (*tert*-Butyl-((S)-2-(((S)-5-(benzhydrylamino)-1-hydroxy-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(CHPh₂)-CH₂OH; 40 % Ausbeute), **CS45c** (*tert*-Butyl-((S)-2-(((S)-1-hydroxy-5-(isopropylamino)-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-CH₂OH; 25 % Ausbeute) und **CS46c** (*tert*-Butyl-((S)-2-(((S)-5-(benzylamino)-1-hydroxy-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(Bn)-CH₂OH; 27 % Ausbeute) erhalten. Ausgehend von den Alkoholen werden über eine Swern-Oxidation die entsprechenden Aldehyde **CS44d** (*tert*-Butyl-((S)-2-(((S)-5-(benzhydrylamino)-1,5-dioxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(CHPh₂)-H) und **CS45d** (*tert*-Butyl-((S)-2-(((S)-5-(isopropylamino)-1,5-dioxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-H) als Zwischenprodukte identifiziert, jedoch aus Gründen der Stabilität nicht aufgereinigt. Verbindung **CS44c** epimerisiert während dieser Reaktion zu **CS44d**, das Diastereomerenverhältnis wird mittels NMR-Spektroskopie zu 1:0.85 bestimmt. Aus Verbindung **CS46c** war es nicht möglich, den Aldehyd herzustellen. Ein erneuter Versuch der Darstellung wurde aufgrund der Testergebnisse der anderen Verbindungen dieser Serie an den Enzymen (Kap. 4.1.3) nicht angestrengt. Aus den Verbindungen **CS44d** und **CS45d** werden

jeweils in einer Masamune-Reaktion mit Triphenylphosphonoacetat die Produkte **CS44** ((*S,E*)-Ethyl-7-(benzhydrylamino)-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacet-amido)-7-oxohept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-vGln(CHPh₂)-OEt; 19 % Ausbeute) und **CS45** ((*S,E*)-Etyhl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-(isopropylamino)-7-oxohept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-vGln(*i*Pr)-OEt; 10 % Ausbeute) dargestellt.^[3,167] **CS44** fällt dabei als Diastereomeregemisch an.

Der Mechanismus der Swern-Oxidation, mit welcher sekundäre Alkohole zu Ketonen und primäre Alkohole zu Aldehyden oxidiert werden können, ist in Schema 3-41 gezeigt. DMSO wirkt als Oxidationsmittel, welches mit Oxalylchlorid aktiviert wird. Dabei liefern Oxalylchlorid und DMSO in einer heftigen und exothermen Reaktion die aktivierten Spezies **A** und/oder **E**. Die aktivierten Sulfonium-Ionen **A** und **E** werden durch Reaktion mit dem Alkohol in die Sulfurane **B** und **F** überführt. Aus Dissoziation von **B** und **F** entsteht das Sulfoniumsalz **C**. Dieses wird durch Zugabe von NEt₃ zum Sulfonium-Ylid **D** deprotoniert. Durch eine β-Eliminierung über einen fünfgliedrigen, cyclischen Übergangszustand entsteht schließlich die Zielverbindung unter Abspaltung von Dimethylsulfid. Die Oxidationsstufe des Schwefelatoms ändert sich während der Oxidation von 0 auf -2 und die Freisetzung von CO und CO₂ stellen die Triebkraft dar.^[125,182-184]



Schema 3-41: Mechanismus der Swern-Oxidation am Beispiel einer Oxidation eines primären Alkohols zu einem Aldehyd.

4 Biochemische und biologische Untersuchungen

4.1 Enzymassays

Enzymassays finden breite Anwendung zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren und zur Bestimmung von Hemmkonstanten. Sie basieren auf der Reaktion von Proteasen mit fluorogenen oder chromogenen Substraten. Diese Substrate enthalten ein Chromophor, dessen Fluoreszenz- oder Absorptionseigenschaften sich in Folge der Reaktion mit dem Enzym verändern. Das Messsignal steht dabei in direkter Beziehung zu der Enzym-katalysierten Reaktion.^[185] Das zugrunde liegende Prinzip von fluorimetrischen Enzymassays ist die Spaltung eines fluorogenen Substrats durch eine Protease, worauf eine Zunahme der Fluoreszenzintensität folgt. Die aus der Umsatz-Zeit-Kurve ablesbare Zunahme der Fluoreszenz entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. In Anwesenheit eines Inhibitors wird die Reaktionsgeschwindigkeit verringert, woraufhin die Umsatz-Zeit-Kurve eine geringere Zunahme der Fluoreszenz zeigt. Der Betrag der Reduktion der Fluoreszenzzunahme ist proportional zum Hemmvermögen des Inhibitors, welches auf die Reaktion eines Inhibitors mit dem aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen ist. Um falsch-positive Ergebnisse bei der Durchführung von Enzym-Assays zu vermeiden, ist es erforderlich, alternative Prozesse, Reaktionen oder Effekte, die ebenfalls zur Reduktion des Fluoreszenzsignals führen können, weitestgehend auszuschließen.^[186] Bei photometrischen Enzymassays finden chromogene Substrate Anwendung, deren Absorption im Wellenlängenbereich des ultravioletten bzw. sichtbaren Lichts erfasst werden kann und die in Folge der Enzym-katalysierten Spaltung eine veränderte Absorption - Zunahme oder Abnahme - zeigen.

4.1.1 Enzymkinetik: Einführung

Enzyme erhöhen als Katalysatoren die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion, indem sie die Herabsetzung der Aktivierungsenthalpie bewirken. Die Enzymkinetik befasst sich mit der Messung und der mathematischen Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit und der assoziierten Konstanten. Zur Bindung eines kompetitiven Inhibitors oder eines Substrats an das aktive Zentrum eines Enzyms existieren zwei Modellvorstellungen. Zum einen das Schlüssel-Schloss-Prinzip, 1890 postuliert von Emil Fischer und zum anderen das Modell des *induced fit* (induzierte Anpassung), nach welchem das Enzym seine Form während der Bindung des Liganden ändert und erst dann komplementär dazu ist (Postulierung 1958).^[187]

Für die kinetische Betrachtung der Enzymhemmung ist die Art der Bindung des Inhibitors an das Enzym von Bedeutung. Es werden reversible und irreversible Inhibitoren unterschieden, wobei zweitgenannte sich durch kovalente oder durch extrem starke nicht-kovalente Enzym-

Inhibitor-Bindung auszeichnen. Da sich im Falle von reversibler bzw. irreversibler Enzymhemmung verschiedenartige Abhängigkeiten ergeben, die in einer jeweils separaten kinetischen Betrachtung resultieren, ist es zunächst erforderlich, die Art der Hemmung zu charakterisieren. Meist ist bereits anhand der Struktur eines Inhibitors ersichtlich, ob eine kovalente Reaktion mit dem aktiven Zentrum chemisch möglich ist, zur Bestätigung eines reversiblen/irreversiblen Hemmmechanismus sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Eine einfache, aber nicht immer eindeutige Methode zur Unterscheidung zwischen reversibler und irreversibler Hemmung ist die Messung der Enzymaktivität vor und nach einer definierten Verdünnung. Bei irreversibler Hemmung reduziert sich die Aktivität um den Faktor der Verdünnung. Dagegen dissoziiert ein reversibler Inhibitor vom Enzym ab und die Aktivitätsabnahme ist größer als der Faktor der Verdünnung. Eine zuverlässigere Methode ist die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmung. Ein reversibler Inhibitor bewirkt unter *steady-state*-Bedingungen ($[S] \gg [E]$) gegenüber einem ungehemmten Enzym nach einer Phase der Gleichgewichtseinstellung eine Reduktion der Enzymaktivität auf einen bestimmten Wert, der sich zeitlich nicht mehr ändert (nicht-zeitabhängige Hemmung). Dagegen nimmt bei Zusatz eines irreversiblen Inhibitors die Enzymaktivität exponentiell ab (zeitabhängige Hemmung). So zeigen Umsatz-Zeit-Diagramme über einen längeren Zeitraum bei reversibler Hemmung lineare Geraden (Abb. 4-1, **A**) und bei irreversibler Hemmung exponentiell verlaufende Kurven (Abb. 4-1, **B**).

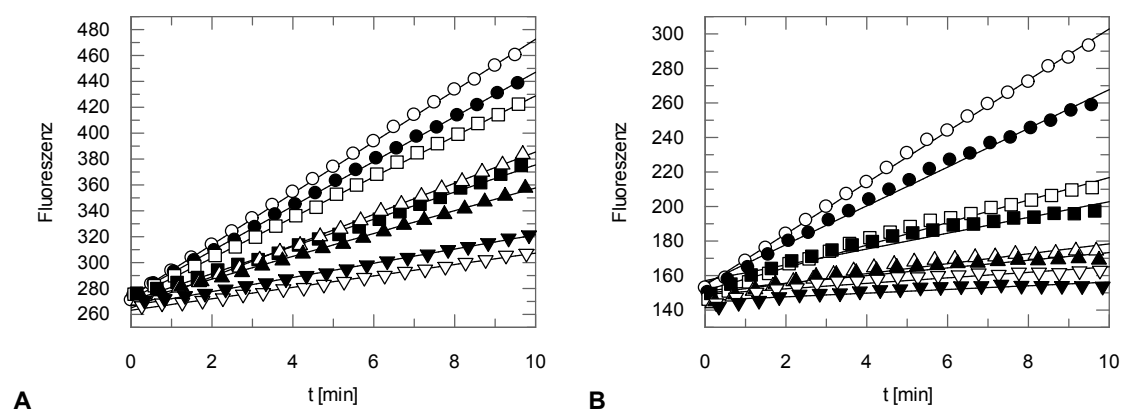


Abb. 4-1: Umsatz-Zeit-Diagramme fluorimetrischer Enzymassays ($[I] = 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 \mu\text{M}$) bei nicht-zeitabhängiger Enzymhemmung (**A** reversible Hemmung) und bei zeitabhängiger Enzymhemmung (**B** irreversible Hemmung).

Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte, Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte und Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren sollten aufgrund ihrer *warheads* zur Gruppe der irreversiblen Inhibitoren zählen.^[84] Es wurde gezeigt, dass der literaturbekannte Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Inhibitor CLIK-148 irreversibel an Cathepsin-L-ähnliche Proteasen der Papain-Familie bindet.^[67,88] In vorangegangenen Studien wurde belegt, dass Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren irreversibel an aktive Zentren verschiedener Proteasen binden,^[1,105,110,111]

Bindungsstelle im Enzym. Ebenfalls reversibel wird ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet, der in der Folge mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} (= Wechselzahl) zu freiem Enzym und Spaltprodukten (P) zerfällt. Stellt sich das vorgeschaltete Gleichgewicht im Vergleich zur Enzymkatalyse schnell ein ($k_1 \cdot \sim k_{-1} > k_{\text{cat}}$), bleibt die Konzentration des ES-Komplexes über einen längeren Zeitraum nahezu unverändert, was als *steady-state*-Phase (Fließgleichgewicht) bezeichnet wird. In dessen Folge beobachtet man eine lineare Substratabnahme und die Reaktion wird nullter Ordnung hinsichtlich des Substrats. Gleiche Überlegungen gelten für den EI-Komplex. Die Affinität des Substrats zum Enzym wird durch die Michaelis-Menten-Konstante K_m ausgedrückt. Charakteristische Konstanten für die Beschreibung der Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor sind die Hemmkonstanten k_i , K_i und $k_{2\text{nd}}$.

k_i [min^{-1}]: Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I.

K_i [M]: Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes EI mit $K_i = [\text{E}] \cdot [\text{I}] / [\text{EI}]$ bzw. $K_i = (k_{-1} + k_i) / k_1$; da der irreversible Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, vereinfacht sich die Gleichung zu $K_i = k_{-1} / k_1$.

$k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]: Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung mit $k_{2\text{nd}} = k_i / K_i$.

Eine hohe Affinität des Inhibitors zum Enzym (kleiner K_i -Wert) und eine schnelle Inaktivierung (großer k_i -Wert) resultieren in einem großen $k_{2\text{nd}}$ -Wert. Je größer der $k_{2\text{nd}}$ -Wert eines Inhibitors ist, desto größer ist seine inhibitorische Potenz.

Die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms $[\text{E}]_0$ setzt sich wie folgt zusammen:

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{E-I}] = [\text{E}]_a + [\text{E-I}] \quad (4.1)$$

$[\text{E}]$ und $[\text{EI}]$ werden als aktiviertes Enzym $[\text{E}]_a$ summiert, da bei Substratüberschuss der Inhibitor aus $[\text{EI}]$ verdrängt werden kann. Unter der Voraussetzung $[\text{I}] \gg [\text{E}]_0$ (Bedingungen pseudo-erster Ordnung) ist die zeitliche Bildung der inaktiven Form $[\text{E-I}]$ zur Konzentration des reversiblen $[\text{EI}]$ -Komplexes direkt proportional:

$$\frac{d[\text{E-I}]}{dt} = - \frac{d([\text{E}]_0 - [\text{E}]_a)}{dt} = k_i \cdot [\text{EI}] \quad (4.2)$$

Die Gesamtkonzentration $[\text{E}]_0$ bleibt konstant, d. h. $d[\text{E}]_0 / dt = 0$:

$$- \frac{d[\text{E}]_a}{dt} = k_i \cdot [\text{EI}] \quad (4.3)$$

Aus Gleichung (4.1) lässt sich $[\text{EI}]$ unter Berücksichtigung der Dissoziationskonstanten für die reversible Bindung des Inhibitors $K_i = [\text{E}] \cdot [\text{I}] / [\text{EI}]$ ersetzen:

$$[E] = \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (4.4)$$

Daraus ergibt sich für die Abnahme der Enzymaktivität aus (4.3):

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = \frac{k_i \cdot [E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (4.5)$$

Integration von $[E]_0$ zur Zeit $t = 0$ nach $[E]_a$ zur Zeit t $-\int_{[E]_0}^{[E]_a} \frac{d[E]_a}{[E]_a} = \int_{t=0}^t \frac{k_i \cdot dt}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$ ergibt:

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_i \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (4.6)$$

Die Abnahme der Enzymaktivität pro Zeiteinheit folgt unter *steady-state*-Bedingungen ($[S] \gg [E]_0$) einer Kinetik pseudo-erster Ordnung und man erhält die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} :

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -k_{\text{obs}} \cdot t \quad (4.7)$$

Bei Einsetzen von Gleichung (4.7) in (4.6) ergibt sich die hyperbolische Funktion:^[186-188]

$$-k_{\text{obs}} \cdot t = \frac{-k_i \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \rightarrow k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i + [I]} \quad (4.8)$$

Die Hemmkonstanten k_i und K_i werden mit Hilfe von nichtlinearer Regressionsanalyse durch Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ bestimmt (Abb. 4-2, **A**). Kann wegen schlechter Löslichkeit des Inhibitors, zu schneller Inaktivierungsreaktion oder aufgrund hoher Dissoziationskonstanten nicht unter Sättigungsbedingungen $[I] \gg K_i$, sondern nur mit relativ geringen Inhibitor-konzentrationen unterhalb des Wertes der Dissoziationskonstanten $[I] \ll K_i$ gearbeitet werden, erhält man aus Gleichung (4.8) vereinfacht:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i} \rightarrow k_{2\text{nd}} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{\text{obs}}}{[I]} \quad (4.9)$$

Die Hemmkonstanten k_i und K_i können nun nicht mehr einzeln bestimmt werden, stattdessen wird näherungsweise die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung $k_{2\text{nd}}$ über die Steigung der Geraden durch Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ bestimmt (Abb. 4-2, **B**).^[186,190]

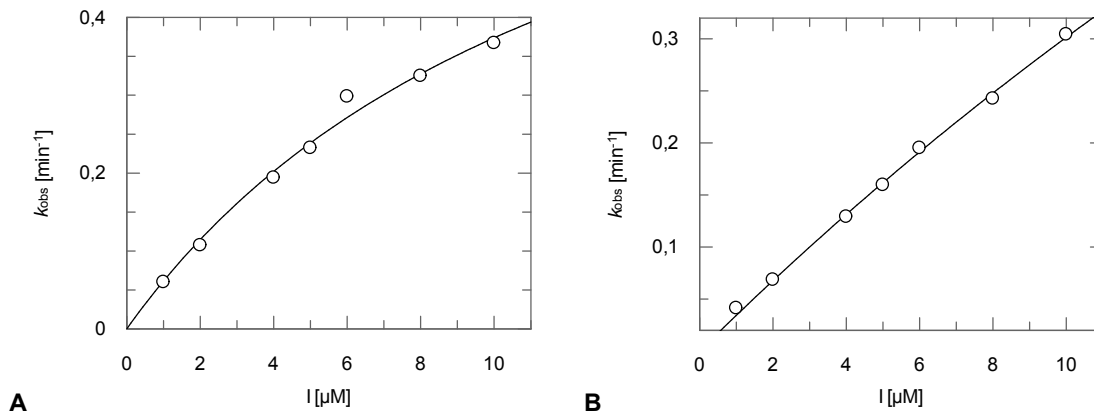


Abb. 4-2: Darstellungen der Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ zur Bestimmung von k_i und K_i (A) und zur nahrungswisen Bestimmung von k_{2nd} aus der Steigung der Geraden (B).

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten liefert die apparente Dissoziationskonstante K_i^{app} . Die Substratkonzentration $[S]$ sowie die Affinität des Substrats zum Enzym (K_m -Wert) müssen einbezogen werden, da Substrat und Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum konkurrieren. Ohne Korrektur können lediglich relative Hemmwirkungen von Verbindungen einer Serie, die unter den gleichen Bedingungen gemessen wurden, miteinander verglichen werden. Die Korrektur geschieht durch Division von K_i^{app} durch den Term $(1 + [S] / K_m)$ und liefert den wahren K_i -Wert:^[186]

$$K_i^{app} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \rightarrow K_i = \frac{K_i^{app}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (4.10)$$

Die Bestimmung des K_m -Werts erfolgt durch Messung der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Michaelis-Menten-Gleichung (4.11) liefert die die Parameter K_m und V_{max} nach linearer Regressionsanalyse, wie Abbildung 4-3 beispielhaft zeigt.

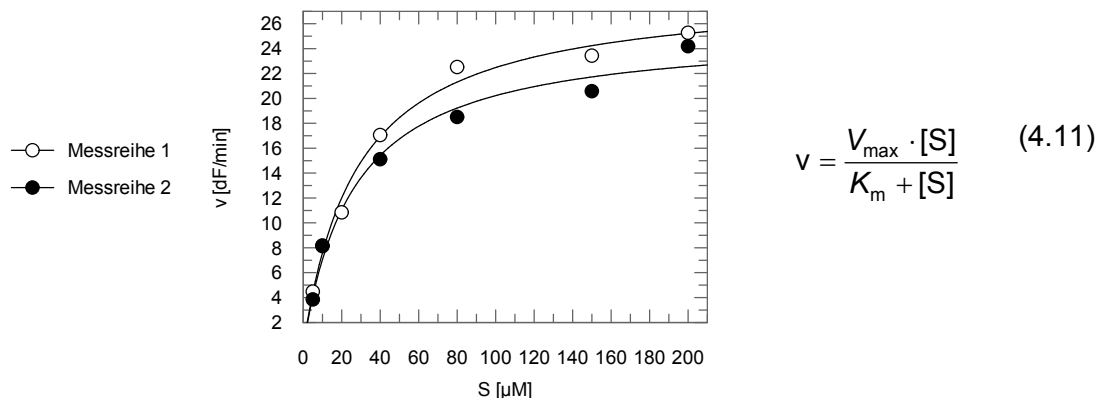


Abb. 4-3: Graphische Darstellung der Auftragung der Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven zweier Messreihen gegen verschiedene Substratkonzentrationen ($[S] = 5, 10, 20, 40, 80, 150, 200 \mu$ M) zur Ermittlung von K_m und V_{max} mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (4.11).

Bei sehr langsamer Inaktivierung des Enzyms durch einen Inhibitor verläuft die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu linear und man beobachtet eine nicht-zeitabhängige Hemmung. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ist dann nicht möglich, daher ermittelt man den K_i -Wert durch Bestimmung des IC_{50} -Werts wie bei reversibler Hemmung. Dazu können zur Auswertung verschiedene Gleichungen herangezogen werden, die sich in der Anzahl der Parameter unterscheiden. In jedem Fall ist zu entscheiden, welche Gleichung den besten Fit liefert. Die 4-Parameter-Gleichung liefert den IC_{50} -Wert durch folgende Gleichung (y [dF/min] = Substrathydrolyserate des Enzyms, gemessen in Fluoreszenzzunahme dF pro min; y_{min} = y-Achsen-Minimum; y_{max} = y-Achsen-Maximum; s = *slope factor* oder Hill-Koeffizient, beschreibt Steilheit der Kurve):

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{min} \quad (4.11)$$

Gleichung (4.12) stellt eine 3-Parameter-Logistik ($y_{min} = 0$) und Gleichung (4.13) eine 2-Parameter-Logistik ($y_{min} = 0$; $y_{max} - y_{min} = \text{range} = v_0$, $y_{max} = v_0$ ist Hydrolyserate bei null Inhibitorkonzentration) dar:

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad (4.12)$$

$$y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad (4.13)$$

Die Dixon-Gleichung (4.14) bietet eine 1-Parameter-Logistik unter optimalen Bedingungen ($s = 1$). Im Fall kompetitiver Inhibitoren entspricht der IC_{50} -Wert dem K_i^{app} , der unter Einbeziehung der Substratkonzentration und der Affinität des Substrats zum Enzym den K_i -Wert liefert (siehe 4.10).^[186,191]

$$y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{K_i^{app}}\right)} \quad (4.14)$$

Eine exemplarische graphische Darstellung der Auswertung durch nicht-lineare Regressionsanalyse ist in Abbildung 4-4 durch Auftragung der Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven gegen die Inhibitorkonzentration gezeigt.

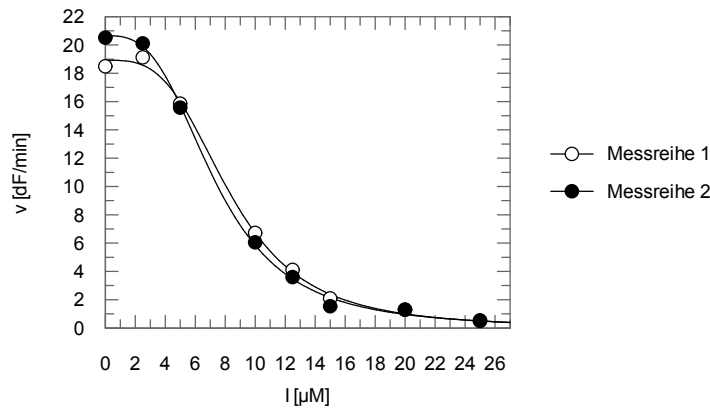


Abb. 4-4: Auftragung der Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven gegen verschiedene Inhibitorkonzentrationen ($[I] = 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 20, 25 \mu\text{M}$) zur Ermittlung des K_i^{app} -Werts unter Verwendung der 3-Parameter-Gleichung (Daten aus zwei Messreihen).

IC_{50} -Werte dienen dem Vergleich der relativen Hemmwirkung einer Serie von Inhibitoren, die unter identischen Bedingungen bestimmt wurden. Für einen aussagekräftigen Vergleich von Inhibitoren, die unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wurde, müssen die K_i -Werte herangezogen werden. Die Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren und von reversiblen Inhibitoren mit langsamer Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes (*tight binding*) über IC_{50} -Werte birgt eine Fehlerquelle, denn der IC_{50} -Wert ist nicht nur abhängig von der Natur und der Konzentration des Substrats, sondern auch von der Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe. Längere Inkubationszeiten führen zu kleineren IC_{50} -Werten, die Abhängigkeit folgt einem exponentiellen Abfall mit der Zeit.^[13,186]

Die Bestimmung der Hemmkonstanten erfolgt entweder durch den Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson (1962)^[192] oder durch den kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou (1982).^[193]

4.1.2.1 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson

Im Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson wird das Enzym mit einem Überschuss an Inhibitor ($[I] \gg [E]_0$) inkubiert, was Bedingungen pseudo-erster Ordnung gewährleistet. Nach bestimmten Zeitpunkten t_{inc} werden Aliquote entnommen und verdünnt (ca. 10- bis 40-fach), sodass das Gleichgewicht des EI-Komplexes auf die Seite von freiem Enzym und Inhibitor verschoben wird. So wird sichergestellt, dass lediglich die Hemmung der irreversibel blockierten Form E-I durch die anschließende Zugabe von Substrat gemessen wird. Die Auftragung der Restaktivitäten gegen die Inkubationszeiten t_{inc} liefert mit Gleichung (4.15) den k_{obs} -Wert (v_0 = Enzymaktivität ohne Inhibitor).

$$v_i = v_0 \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t_{\text{inc}}} + \text{offset} \quad (4.15)$$

Nach Wiederholung der Prozedur für verschiedene Inhibitorkonzentrationen liefert Gleichung (4.9) nach Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Inhibitorkonzentration die Hemmkonstanten k_i und K_i .^[186,192]

4.1.2.2 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou

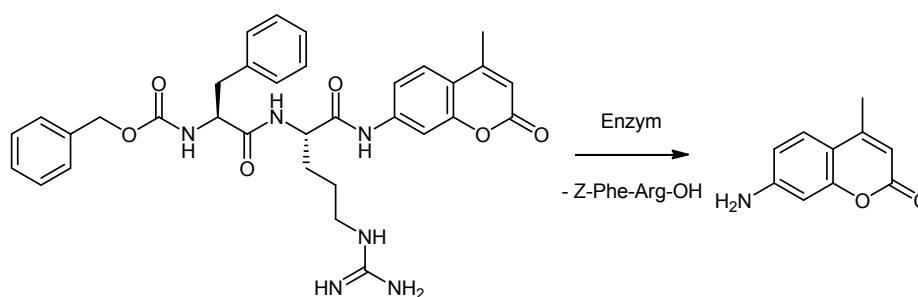
Im kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou wird die Produktzunahme pro Zeit aus einer Mischung aus Enzym, Substrat und Inhibitor bestimmt. Voraussetzung dafür sind *steady-state*-Bedingungen, welche durch den Einsatz von Substrat und Inhibitor im Überschuss ($[I] \gg [E]_0$, $[S] \gg [E]_0$) gewährleistet werden. Zur Auswertung werden die Umsatz-Zeit-Kurven für verschiedene Inhibitorkonzentrationen gegen die Exponentialfunktion (4.16) gefittet, um die Hemmkonstanten zu erhalten (F = Fluoreszenzintensität, proportional zur Produktkonzentration $[P]$; A = proportional zur Produktkonzentration, wenn sämtliches Enzym inaktiviert ist).

$$F = A \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) + \text{offset} \quad (4.16)$$

Für jede Inhibitorkonzentration wird ein Experiment zur Bestimmung von k_{obs} durchgeführt. Die Umsatz-Zeit-Kurve ohne Inhibitor muss über die gesamte Messzeit linear verlaufen. Ist dies nicht der Fall, ist der Abfall der Substrathydrolyse nicht nur auf irreversible Enzyminhibition, sondern auch auf Substraterschöpfung zurückzuführen. In dem Fall sollten zur Validierung der k_{obs} -Werte zusätzlich Verdünnungsassays durchgeführt werden.^[186,193]

4.1.3 Durchführung und Ergebnisse der fluorimetrischen Enzymassays an Cystein-Proteasen

Alle Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen wurden mittels des kontinuierlichen Assays nach Tian und Tsou^[193] bestimmt. Die Durchführung erfolgte an einem Fluoreszenzspektrometer mit temperierbarer Mikrotiter-Leseinheit in weißen 96-Well-Platten bei 25 °C. Als fluorogene Substrate fanden Z-Phe-Arg-AMC (Schema 4-2) in den Assays mit Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin K, LmCBP2.8, LmajcatB (= CPC), Rhodesain, Cruzain und Falcipain-2 und Z-Val-Val-Arg-AMC im Assay mit Cathepsin S Anwendung. Die Spaltung der Substrate erfolgt an der Amidbindung zwischen Arg und AMC, wobei in der Folge die Fluoreszenz des freigesetzten Aminomethylcoumarins erfasst wird.^[194] Die gemessene Fluoreszenzintensität über die Messzeit ist direkt proportional zur Konzentration des Spaltprodukts. Die Anregungswellenlänge betrug 380 nm und die Detektionswellenlänge 460 nm.



Schema 4-2: Enzymatische Hydrolyse des Substrats unter Freisetzung von fluoreszierendem 7-Amino-4-methylcoumarin.

Die verwendeten Substrat- und Inhibitorstammlösungen wurden in DMSO hergestellt. Sämtliche Versuche wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt inklusive einer Negativ-Kontrolle mit reinem DMSO. Eine Übersicht über die Assaybedingungen der Enzyme sowie die verwendeten Substratkonzentrationen und die K_m -Werte ist in Tabelle 4-1 gegeben. Die K_m -Werte der Substrate wurden – soweit bekannt – aus bereits etablierten Assay-Bedingungen entnommen. Für die Enzyme Cathepsin S und LmajcatB wurden eigene Experimente zur K_m -Wert Bestimmung durchgeführt.

Tab. 4-1: Bedingungen der fluorimetrischen Enzymassays.

Enzym	Puffer	[S]	K_m
Cathepsin L	Tris-Puffer (pH 6.5)	6.25 μM	6.5 μM
Cathepsin B	Tris-Puffer (pH 6.5)	100 μM	150 μM
Cathepsin K	Acetat-Puffer (pH 5.5)	40.0 μM	47.7 μM
Cathepsin S	Phosphat-Puffer (pH 6.5)	40.0 μM	27.1 μM
LmCPB2.8	Phosphat-Puffer (pH 6.5)	10.0 μM	5.0 μM
LmajcatB	Phosphat-Puffer (pH 6.5)	25.0 μM	7.0 μM
Rhodesain	Acetat-Puffer (pH 5.5)	10.0 μM	826.5 nM
Cruzain	Acetat-Puffer (pH 5.5)	5.0 μM	1.5 μM
Falcipain-2	Acetat-Puffer (pH 5.5)	25.0 μM	21.5 μM

Eine detaillierte Beschreibung der Assaybedingungen ist im Experimententeil (Kap. 10.4.1) zu finden. Die verwendeten Puffer enthalten EDTA, Dithiothreitol (DTT) und teilweise Brij 35. Dabei fungiert EDTA als Komplexbildner, um eine eventuelle Hemmung des Enzyms durch Schwermetallionen zu verhindern. DTT stellt reduktive Bedingungen sicher, indem eventuell vorhandene Disulfidbrücken reduktiv gespalten werden und Brij 35 verbessert als nichtionisches Tensid die Löslichkeit von Inhibitoren und Substrat. Zur Durchführung der Assays wurde zunächst der Assay-Puffer vorgelegt und nacheinander Enzymlösung (Enzym in Enzympuffer), Inhibitorlösung, bzw. bei der Negativkontrolle DMSO und Substratlösung

zupipettiert. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Enzymaktivität durch die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass ohne Inhibitorzugabe die lineare Zunahme der Fluoreszenz über die gesamte Messzeit $\sim 20 \Delta F/\text{min}$ betrug.

In einem Screening wurde zunächst die relative Hemmwirkung der synthetisierten Verbindungen an den Enzymen bestimmt. Die eingesetzte Konzentration der Verbindungen betrug dabei $20 \mu\text{M}$. Zur Klassifizierung des Inhibitorpotenzials der Verbindungen wurde festgelegt, dass Substanzen mit einem Screeningergebnis von $> 30\%$ Hemmung als „aktive“, andernfalls als inaktive Verbindungen, die keine Hemmwirkung ($n_i = \text{no inhibition}$) zeigen, bewertet werden. Für die aktiven Substanzen wurden im Anschluss im kontinuierlichen Assay die Hemmkonstanten bestimmt. Die dazu gemessenen Verdünnungsreihen umfassten neben der DMSO-Kontrolle sieben Konzentrationen der Inhibitoren (von $1 \mu\text{M}$ minimal bis maximal $100 \mu\text{M}$). Von allen Verbindungen, die aufgrund ihrer *warheads* irreversible Inhibitoren sein sollten, zeigte lediglich der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Inhibitor CLIK-148 an den Enzymen Cathepsin L, Rhodesain und LmCPB2.8 eine zeitabhängige Hemmung. Alle anderen Messungen der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierten, Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten und Michael-Akzeptor-basierten Inhibitoren zeigten lineare Umsatz-Zeit-Kurven, was durch langsame Alkylierungsreaktionen zu erklären ist. Aus diesem Grund wurden für diese Verbindungen die K_i -Werte über die IC_{50} -Wert-Bestimmung reversibler Inhibitoren (nicht-zeitabhängige Hemmung) ermittelt. Diese Art der Bestimmung ist für irreversible Inhibitoren generell möglich, wenn zur Auswertung lediglich die ersten Minuten der Umsatz-Zeit-Kurven mit linearem Verlauf herangezogen werden und Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe nicht inkubiert wurden.^[186] Die Auswertung der Messdaten wurde mittels linearer und nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Enzymkinetik-Programm GraFit® 5 vorgenommen.^[191] Die folgenden Tabellen enthalten die Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen für zeitabhängige Hemmung (Tab. 4-2) und für nicht-zeitabhängige Hemmung (Tab. 4-4). Zudem ist in Tabelle 4.3 die prozentuale Hemmung des Standardinhibitors CLIK-148 an den Cathepsinen L, B, S und K aufgeführt.

Tab. 4-2: Hemmkonstanten für zeitabhängige Hemmung der Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierten Inhibitoren an den Enzymen Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, Rhodesain und Falcipain-2.

Verb.	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	Rhodesain	Falcipain-2
CLIK-148	$k_i = 1.0 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ $k_{2\text{nd}} = 125259 \pm 6023 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ $K_i = 8.3 \pm 2.4 \mu\text{M}$	ni	$k_{2\text{nd}} = 83900 \pm 5727 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$	$k_{2\text{nd}} = 189283 \pm 8336 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$	$K_i = 83.9 \pm 14.6 \mu\text{M}$
CS41	ni	ni	ni	ni	ni

ni = no inhibition

Tab. 4.3: Prozentuale Hemmung des Standardinhibitors CLIK-148 an den Enzymen Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin S und Cathepsin K.^[195]

prozentuale Hemmung					
Verb.	Konz. (10^{-x} M)	Cath. L	Cath. B	Cath. S	Cath. K
CLIK-148	x = 6	100	0	30	0
CLIK-148	x = 7	63	0	0	0

Tab. 4-4: K_i -Werte für nicht-zeitabhängige Hemmung der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten und der Michael-Akzeptor-basierten Inhibitoren an Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin K, Cathepsin S, LmCPB2.8, LmajcatB (= CPC), Rhodesain, Cruzain und Falcipain-2.

		K_i-Werte [μM]								
Verb.		Cath. L	Cath. B	Cath. K	Cath. S	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain	Cruzain	Falcipain-2
Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren:										
CS01 ^[148]	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS02 ^[148]	Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS03 ^[148]	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS04 ^[148]	Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS05 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	15.2 ± 0.1	ni	ni	ni
CS06 ^[148]	Boc-(R)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS07 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(R)-Leu-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS08 ^[148]	Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni	ni	nd	ni	10.3 ± 0.3	ni	ni	ni
CS09 ^[148]	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	23.9 ± 1.7	3.8 ± 0.1 ^[148]	18.2 ± 0.3	1.7 ± 0.1	ni	ni
CS10 ^[148]	Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	nd	3.4 ± 0.2 ^[148]	ni	15.2 ± 1.9	30.9 ± 8.2	ni
CS11 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	nd	4.3 ± 0.1 ^[148]	0.69 ± 0.02	2.8 ± 0.3	4.6 ± 0.3 ^[148]	ni
CS12 ^[148]	Boc-(R)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	nd	4.1 ± 0.1 ^[148]	0.82 ± 0.08	1.7 ± 0.2	16.6 ± 0.9	ni
CS13 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(R)-Leu-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	nd	4.0 ± 0.01 ^[148]	0.72 ± 0.01	2.9 ± 1.4	20.8 ± 0.3	ni
CS14 ^[148]	Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	ni	nd	4.6 ± 0.1 ^[148]	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.5 ± 0.3 ^[148]	ni
CS15	Boc-Gly-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	26.4 ± 4.9	nd	nd	8.1 ± 1.5	4.8 ± 0.1	ni	ni	ni

Verb.		Cath. L	Cath. B	Cath. K	Cath. S	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain	Cruzain	Falcipain-2
CS16	Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OBn) ₂	14.2 ± 0.1	29.2 ± 1.1	nd	nd	2.6 ± 0.2	17.9 ± 7.7	0.50 ± 0.001	ni	ni
CS17	Boc-(R)-Pro-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OBn) ₂	19.7 ± 4.1	44.0 ± 2.1	nd	nd	2.9 ± 0.2	ni	0.51 ± 0.03	ni	ni
CS18	Boc-(S)-Pro-(R)-Leu-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	24.6 ± 7.9	nd	nd	3.1 ± 0.1	ni	0.57 ± 0.1	ni	ni
CS19	Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-(R,R)-Azi(OBn) ₂	70.9 ± 0.3	ni	nd	nd	4.6 ± 2.5	17.3 ± 1.1	0.87 ± 0.02	ni	ni
CS20	Boc-Gly-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	53.1 ± 8.7	ni	nd	nd	ni	7.0 ± 0.2	ni	ni	ni
CS21	Boc-β-Ala-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	ni	6.2 ± 0.2	ni	ni	ni
CS22	Boc-Aib-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS23	Boc-(S)-Ala-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	25.4 ± 1.6	ni	ni	ni	ni
CS24	Boc-(S)-Val-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	51.5 ± 1.6	54.6 ± 1.5	nd	3.5 ± 0.5	4.3 ± 0.3	ni	1.4 ± 0.004	ni	ni
CS25	Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	10.9 ± 0.7	ni	8.7 ± 0.2	ni	ni	ni
CS26	Boc-(S)-Nva-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS27	Boc-(S)-Nle-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	2.8 ± 0.04	ni	ni	ni	ni
CS28	Boc-(S)-Chg-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS29	Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS30	Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂ ^a	ni	ni	nd	nd	10.3 ± 0.6	20.6 ± 8.9	ni	ni	ni
CS31	Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	1.7 ± 0.1	ni	ni	ni	ni
CS32	Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	1.5 ± 0.5	ni	ni	ni	ni
CS33	Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	2.7 ± 0.4	ni	ni	ni	ni
CS34	Boc-(S)-Leu-(R)-Orn(Boc)-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni	nd	nd	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	ni	ni
CS35	Boc-(S)-Leu-(R)-Arg(NO ₂)-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	5.4 ± 0.1	nd	nd	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.5	ni	ni

Verb.		Cath. L	Cath. B	Cath. K	Cath. S	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain	Cruzain	Falcipain-2
CS36	Boc-(S/R)-Nip-(S,S)-Azi(OBn) ₂ ^b	ni	83.9 ± 28.2	ni	nd	1.5 ± 0.1	ni	5.5 ± 1.1	ni	ni
CS37	Boc-(S/R)-Nip-(R,R)-Azi(OBn) ₂ ^c	75.9 ± 8.7	80.3 ± 24.0	nd	nd	1.8 ± 0.4	ni	ni	ni	ni
CS38	Boc-(S)-Leu-(S/R)-Nip-(S,S)-Azi(O ρ Br-Bn) ₂	ni	21.2 ± 1.6	nd	nd	0.58 ± 0.02	67.0 ± 6.5	0.30 ± 0.04	7.0 ± 0.06	ni
CS39	Bio-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	19.5 ± 0.1	nd	nd	33.1 ± 1.7	nd	12.1 ± 0.8	nd	4.5 ± 0.6
CS40	AMCA-Ahx-(R,R)-Azi(OBn) ₂	1.8 ± 0.1	ni	nd	nd	1.3 ± 0.2	ni	0.35 ± 0.01	0.51 ± 0.04	6.8 ± 0.2
bADA	Bio-Ahx-(S,S)-Azi(OBn) ₂	1.4 ± 0.1 ^[110]	50.5 ± 6.0 ^{d[105]}	nd	nd	ni	2.2 ± 0.1	ni ^[147]	ni	6.6 ^[110]
Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren:										
CS42 (16b ^[3])	Boc-(S)-Phg-(R)-vGln(Trt)-OEt	ni	2.4 ± 0.1	nd	nd	0.62 ± 0.01	ni	0.14 ± 0.05 ^[3]	1.4 ± 0.1	0.49 ^[3]
CS43	Boc-(R)-Phg-(S)-vGln(Trt)-OEt	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1	nd	nd	1.3 ± 0.02	2.5 ± 0.1	0.43 ± 0.02	0.60 ± 0.03	20.0 ± 1.8
CS44	Boc-(S)-Phg-(R)-vGln(CHPh ₂)-OEt	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni
CS45	Boc-(S)-Phg-(R)-vGln(<i>t</i> Pr)-OEt	ni	ni	nd	nd	ni	ni	ni	ni	ni

^a $dr = 1:0.59$; ^b $dr = 1:0.59$; ^c $dr = 1:0.55$; ^d zeitabhängige Hemmung, $k_i = 0.036 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, $k_{2nd} = 720 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$; ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu\text{M}$; nd = not determined

Zusätzlich wurde für **RV122C** an Cathepsin S ein K_i -Wert von $6.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ bestimmt.

4.1.4 Durchführung und Ergebnisse der photometrischen Enzymassays an Aspartat-Proteasen

Im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsaufenthalts in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ben M. Dunn an der University of Florida in Gainesville, USA, wurden 74 synthetisierte Substanzen auf ihre Aktivität gegen die Aspartat-Proteasen Plasmeprin II^[196] und Plasmeprin IV^[197] getestet. Die Substanzen umfassten Vertreter unterschiedlichster Strukturklassen. Potentielle Plasmeprin-Inhibitoren waren Verbindungen, die antiplasmodiale Aktivität zeigten und/oder Aktivität gegen Aspartat-Proteasen aufwiesen.^[3,108,198-201] Zur Bestätigung der Selektivität für Cystein-Proteasen über Aspartat-Proteasen wurden ebenfalls einige Cystein-Protease-Inhibitoren getestet. Im Folgenden wird lediglich auf die Ergebnisse der selbst synthetisierten Verbindungen eingegangen.

Plasmeprine stellen potentielle Targets in der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria dar. Das Genom von *P. falciparum* codiert für zehn Plasmeprine.^[202] Vier von ihnen, Plasmeprin I, II und IV und HAP (= Histo-Aspartat-Protease, früher Plasmeprin III; alle Clan AA, Familie A1), sind an der Hämoglobin-Degradation in der Nahrungsvakuole der Parasiten während des Stadiums in Erythrocyten im parasitären Lebenszyklus beteiligt. Die Strukturen der vier Plasmeprine sind homolog und zeigen über 60 % Ähnlichkeit in der Aminosäurekette.^[203] Knock-out-Studien dieser Plasmeprine zeigten, dass die Parasiten überleben, auch wenn ihr Wachstum reduziert ist.^[204,205] Daher ist der Ansatz zur Wirkstoffentwicklung, möglichst viele Plasmeprine gleichzeitig zu hemmen.^[206-210]

Alle Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen wurden mittels des kontinuierlichen Assays nach Tian und Tsou^[193] bestimmt. Die Durchführung erfolgte an einem UV-Vis-Spektrophotometer mit Küvetteneinsatz bei 37 °C. Bei dem eingesetzten Substrat handelte es sich um das Oktapeptid Lys-Pro-Ile-Glu-Phe*Nph-Arg-Leu^[211] (der Stern markiert die Spaltstelle, Nph = *para*-Nitrophenylalanin). Spaltung des Substrats zwischen Phenylalanin und *para*-Nitrophenylalanin resultiert in einem Shift in dem UV-Absorptionsmaximum des *para*-Nitrophenylalanins, hervorgerufen durch die generierte NH₃⁺-Funktion. Die Substrat-hydrolyse wird spektrophotometrisch bei 300 nm verfolgt. Die gemessene Absorptionsintensität über die Messzeit ist direkt proportional zur Konzentration des Spaltprodukts. Bei Abwesenheit eines Inhibitors ist die gemessene Absorptionsintensität nahezu konstant, während bei Anwesenheit eines Inhibitors eine konzentrationsabhängige Abnahme der Absorptionsintensität mit der Zeit beobachtet wird. Die Enzyme werden vor der Messung bei 37 °C in Assaypuffer inkubiert. Die Vorinkubation gewährleistet die komplette Umwandlung der zymogenen Form in die aktive Form.^[197,212] Die verwendeten Substrat- und Inhibitorstammlösungen wurden in DMSO hergestellt. Sämtliche Versuche wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt inklusive einer Negativ-Kontrolle mit reinem DMSO. Eine

Übersicht über die Assaybedingungen der Enzyme sowie die verwendeten Substratkonzentrationen und die K_m -Werte ist in Tabelle 4-5 gegeben.

Tab. 4-5: Bedingungen der photometrischen Enzymassays.

Enzym	Puffer	Inkubationszeit	[S]	K_m
Plasmeypsin II	Acetat-Puffer (pH 4.5)	3 min (37 °C)	20.0 μ M	10.1 μ M
Plasmeypsin IV	Acetat-Puffer (pH 4.5)	5 min (37 °C)	20.0 μ M	33.1 μ M

Eine detaillierte Beschreibung der Assaybedingungen ist im Experimentalteil (Kap. 10.4.2) zu finden. Zur Durchführung der Assays wurde zunächst der Assay-Puffer vorgelegt und Enzymlösung (Enzym in Enzympuffer) zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C wurden nacheinander Inhibitorlösung, bzw. bei der Negativkontrolle DMSO und Substratlösung zupipettiert. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Enzymaktivität durch Messung der Absorptionsintensität über die Zeit gemessen.

Zunächst wurden die K_m -Werte des Substrats an den Enzymen bestimmt. Im Screening wurde die relative Hemmwirkung der synthetisierten Verbindungen an den Enzymen bestimmt. Die eingesetzte Konzentration der Verbindungen betrug dabei 20 μ M. Die Klassifizierung des Inhibitorpotenzials der Verbindungen erfolgte im Falle von Plasmeypsin II für Substanzen mit einem Screeningergebnis von > 30 % Hemmung und im Fall von Plasmeypsin IV von > 70 % Hemmung als „aktiv“. Für die aktiven Substanzen wurden im Anschluss im kontinuierlichen Assay die Hemmkonstanten bestimmt. Die dazu gemessenen Verdünnungsreihen umfassten neben der DMSO-Kontrolle sieben Konzentrationen der Inhibitoren (von 1 μ M minimal bis maximal 100 μ M). Alle Verbindungen zeigten lineare Umsatz-Zeit-Kurven. Daher wurden für diese Verbindungen die K_i -Werte über die IC_{50} -Wert-Bestimmung reversibler Inhibitoren (nicht-zeitabhängige Hemmung) ermittelt. Die Auswertung der Messdaten wurde mittels linearer und nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Enzymkinetik-Programm SigmaPlot™ 10 (Systat Software Inc.) vorgenommen. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte anhand der Dixon-Gleichung. Die folgende Tabelle 4-6 enthält die Hemmkonstanten der synthetisierten Verbindungen.

Tab. 4-6: Hemmkonstanten K_i an Plasmeypsin II und Plasmeypsin IV.

K_i -Werte [μ M]			
Verb.		Plasmeypsin II	Plasmeypsin IV
CS05 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OEt) ₂	ni	ni
CS10 ^[148]	Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	ni	ni
CS11 ^[148]	Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OBn) ₂	ni	ni

CS42 (16b^[3])	Boc-(S)-Phg-(R)- ν Gln(Trt)-OEt	ni	4.8 \pm 0.6
16a^[3]	Boc-(S)-Phg-(S)- ν Gln(Trt)-OEt	ni	4.3 \pm 3.3

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu\text{M}$

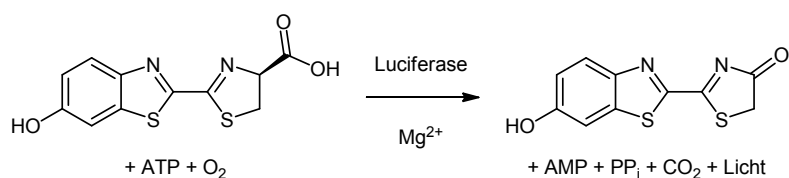
Die getesteten Verbindungen **CS05**, **CS10** und **CS11**, die als Cystein-Protease-Inhibitoren gelten, zeigen erwartungsgemäß keine Hemmwirkung an den Aspartat-Proteasen. Verbindung **CS42 (16b^[3])** und deren diastereomere Verbindung **16a^[3]** von Alexander Breuning hemmen Plasmeypsin IV im einstellig mikromolaren Bereich.

4.2 Infektionsbiologische Testungen

Die interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb des Sonderforschungsbereichs 630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“) der Universität Würzburg ermöglichte die Bestimmung der antiparasitären Aktivität sowie der Cytotoxizität der synthetisierten Inhibitoren. Die Testungen wurden nach SOPs (Standard Operating Procedures) des Sonderforschungsbereichs im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg und im Missionsärztlichen Institut Würzburg durchgeführt. Zudem wurden in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg weiterführende Testungen mit antiparasitär wirkenden Verbindungen zur Aufklärung des Hemmmechanismus angestrengt. Außerhalb des SFB 630 wurden Verbindungen in nationalen und internationalen Kooperationen auf ihre biologische Aktivität getestet. Die folgenden Kapitel beschreiben die Testsysteme und die erhaltenen Ergebnisse der getesteten Inhibitoren.

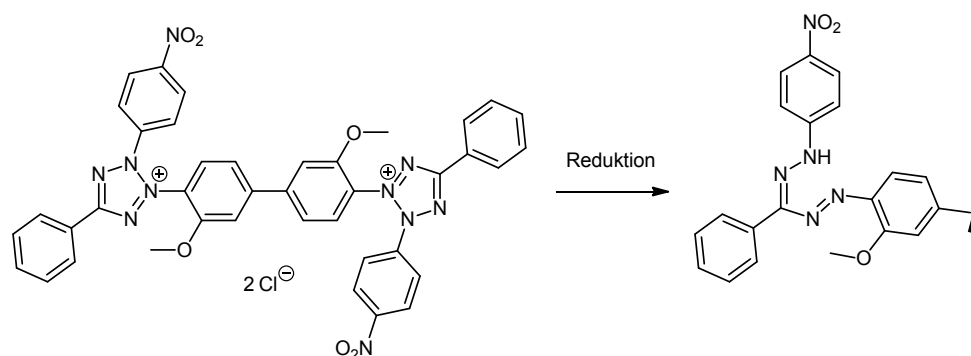
4.2.1 Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität

Zur Ermittlung der Cytotoxizität, der antitrypanosomalen sowie der antileishmanialen Aktivität an Promastigoten wurden die IC_{50} -Werte^[213] mittels des Alamar Blue[®]-Assays^[214,215] *in vitro* bestimmt. Der Alamar Blue[®]-Assay zählt zu den nicht-radioaktiven Assayformen und zeichnet sich durch eine einfache Anwendung aus. Das zugrunde liegende Prinzip ist die chemische Reduktion des wasserlöslichen, nicht-toxischen, blauen Farbstoffs Alamar Blue[®] (Resazurin). Dieser wird von Zellen aufgenommen und entsprechend ihrer proliferativen Aktivität unter Verbrauch von NADH/H^+ zu einem pinkfarbenen, fluoreszierenden Farbstoff (Resofurin) reduziert (Schema 4-3).



Schema 4-4: Biolumineszenzreaktion: Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin durch Luciferase.^[223]

Die Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität erfolgte mittels des Malstat-Assays.^[224,225] Der Malstat-Assay ist ein Viabilitätsassay und beruht auf dem Nachweis der Aktivität von Plasmodium-spezifischer Lactatdehydrogenase (pLDH). Die pLDH kann im Gegensatz zur humanen Lactatdehydrogenase (LDH), die die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺, bzw. dessen Rückreaktion katalysiert, 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD) als NAD-Analogon verwenden. Im Assay wird der pLDH der Plasmodien APAD zusammen mit Lactat angeboten und im Anschluss die Lactatgärung durch eine Farbreaktion mit Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT) quantifiziert (Schema 4-5). Bei dem eingesetzten Plasmodien-Stamm handelt es sich um den chloroquin-sensitiven Stamm 3D7 von *P. falciparum*. Die Inhibitoren werden in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die optische Dichte wird photometrisch gemessen. Jede Messung erfolgt als Dreifachbestimmung. Als Referenzsubstanz dient Chloroquin.^[226,227]



Schema 4-5: Reduktion von NBT (farblos) zum entsprechenden Formazan (blau).^[228]

Alternativ wurden mit einigen Verbindungen Viabilitätstests an *P. falciparum* des Stamms FCBR in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Leippe, Zoologisches Institut/Abteilung Zoophysiologie der Universität Kiel zur Bestimmung der anti-plasmodialen Aktivität durchgeführt. Die Bestimmung der Hemmung des Parasitenwachstums erfolgt dabei mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX[®] Green, basierend auf Quantifizierung parasitärer DNA mithilfe des Farbstoffs.^[229] Alle getesteten Verbindungen zeigten keine Hemmung des Parasitenwachstums. Somit erfolgte keine Bestimmung von IC₅₀-Werten.

Tabelle 4-7 enthält die ermittelten Daten zur antileishmanialen, antitrypanosomalen und antiplasmodialen Aktivität sowie zur Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen.

Tab. 4-7: Ergebnisse der Testungen an *L.-major*-Promastigoten (*L. m. (p)*) und *L.-major*-Amastigoten (*L. m. (a)*), *T. brucei brucei* (*T. b. b.*), *P. falciparum* (*P. falc.*) und Makrophagen (Zelllinie J774.1, Bestimmung der Cytotoxizität).

IC ₅₀ -Werte [µM]						
Verb.	<i>L. m. (p)</i>	<i>L. m. (a)</i>	<i>T. b. b.</i>		<i>P. falc.</i>	Cyt. (J774.4)
			48 h	72 h		
Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren:						
CS09	37.4	2.3 ± 0.6	29.5	> 40	ni ^a	68.2
CS10 ^[148]	95	nd	13.6	17.3	ni ^a	> 100
CS11 ^[148]	> 100	nd	9.7	16.4	ni ^a	87.1
CS12 ^[148]	> 100	nd	12.4	16.8	ni ^a	> 100
CS13 ^[148]	> 100	nd	9.5	16.4	ni ^a	88.9
CS14 ^[148]	> 100	nd	9.4	16.2	ni ^a	> 100
CS15	34.2	nd	25.2	> 40	nd	> 100
CS16	32.6	nd	13.7	17.7	nd	> 100
CS17	40.7	1.6 ± 0.3	16.4	18.0	nd	> 250
CS18	47.2	nd	11.2	17.7	nd	> 100
CS19	41.0	nd	17.9	17.7	nd	> 100
CS20	> 100	nd	> 40	> 40	nd	> 100
CS21	> 100	nd	> 40	> 40	nd	> 100
CS22	> 100	nd	> 40	> 40	nd	> 100
CS23	46.1	nd	21.8	> 40	nd	> 100
CS24	34.8	2.2 ± 0.6	15.8	nd	nd	> 250
CS25	9.8	2.0 ± 0.6	16.7	18.1	nd	> 250
CS26	nd* ^p	nd	20.6	> 40	nd	> 100
CS27	nd* ^p	nd	13.2	17.9	nd	> 100
CS28	31.3	nd	16.0	18.1	nd	> 100
CS29	nd* ^p	nd	4.2	13.3	nd	> 100
CS30	> 100	nd	17.1	19.1	nd	> 100
CS31	48.0	nd	23.1	> 40	nd	> 100
CS32	> 100	nd	17.7	17.4	nd	> 100
CS33	> 100	nd	13.4	18.0	nd	> 100
CS34	> 100	nd	12.9	16.8	nd	42.5
CS35	> 100	nd	16.7	31.0	nd	> 100
CS36	> 100	nd	25.4	> 40	nd	> 100

Verb.	<i>L. m.</i> (p)	<i>L. m.</i> (a)	<i>T. b. b.</i>		<i>P. falc.</i>	Cyt. (J774.4)
			48 h	72 h		
CS37	> 100	nd	> 40	> 40	nd	> 100
CS38	> 100	nd	3.4	4.0	nd	> 100
CS39	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CS40	> 100	nd	> 40	> 40	24.9 ± 15.6	> 100
Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Inhibitoren:						
CLIK-148	nd	>100	nd	nd	nd	nd
CS41	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren:						
CS42 (16b ^[3])	31.0	nd	3.5 ^[3]	-	0.9 ^{b[3]}	7.5
CS43	> 100	nd	1.6	2.9	3.6 ± 1.3	13
CS44	> 100	nd	7.1	15.2	nd	> 100
CS45	> 100	nd	> 40	> 40	nd	> 100

^a Stamm: FCBR, bestimmt mittels SYTOX[®] Green; ^b Stamm: FCBR; Standardabweichung; ni = no inhibition; nd = not determined

Die Aziridin-2,3-dicarboxylat-Inhibitoren erwiesen sich als nicht toxisch, lediglich Verbindung **CS34** weist einen IC₅₀-Wert von 42.5 µM an Makrophagen auf, der jedoch durch den Selektivitätsindex (SI) IC₅₀ J774.1/IC₅₀ *T. b. b.* = 3.3 (48 h), bzw. 2.5 (72 h) tolerierbar ist. Die IC₅₀-Werte an *L.-major*-Promastigoten liegen für die aktiven Aziridin-Derivate zwischen 9.8 und 48 µM. Von einigen Verbindungen wurden zusätzlich die IC₅₀-Werte an *L.-major*-Amastigoten bestimmt. Die Werte reichen von 1.6 bis 2.3 µM (**CS09**, **CS17**, **CS24**, **CS25**) und sind damit geringer als die Werte an Promastigoten. Dies erscheint folgerichtig, da im amastigoten Stadium mehr Cystein-Proteasen exprimiert sind, womit die Proteaseaktivität höher ist als im promastigoten Stadium.^[106,230,231] Die Selektivitätsindizes sind sehr gut bei den Verbindungen **CS09**, **CS17**, **CS24** und **CS25** (SI_{CS09} = 29.7, SI_{CS17} = 156, SI_{CS24} = 114, SI_{CS25} = 125). Die IC₅₀-Werte von **CS17**, **CS24** und **CS25** an Makrophagen wurden hierbei zu > 250 µM bestimmt. Im Hinblick auf die Hemmung des Wachstums von *T. brucei brucei* zeichnet sich Verbindung **CS38** besonders aus mit dem geringsten IC₅₀-Wert von 3.4 µM (48 h), bzw. 4.0 µM (72 h), wobei die meisten Aziridine antitrypasomale Aktivität aufweisen. **CS40** ist das einzige Aziridin-Derivat, das Falcipain-2 hemmt und mit einem IC₅₀-Wert von 24.9 µM antiplasmodiale Aktivität zeigt. Die Michael-Akzeptor-basierten Inhibitoren **CS42** und **CS43** hemmen das Wachstum von *T. brucei brucei* und *P. falciparum* im unteren mikromolaren-Bereich, weisen jedoch auch Cytotoxizität auf (SI_{CS42} = 2.1 (48 h) für IC₅₀ J774.1/IC₅₀ *T. b. b.* und SI_{CS42} = 8.3 für IC₅₀ J774.1/IC₅₀ *P. falc.*; SI_{CS43} = 8.1 (48 h), bzw. 4.5 (72 h) für IC₅₀ J774.1/IC₅₀ *T. b. b.* und SI_{CS43} = 3.6 für IC₅₀ J774.1/IC₅₀ *P. falc.*).

Interessant ist Verbindung **CS44** mit antitrypasomaler Aktivität ($IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$ (48 h), bzw. $15.2 \mu\text{M}$ (72 h), die unter den getesteten Bedingungen keine Cytotoxizität aufweist.

4.2.1.1 Antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität der Leitstrukturen RV122C und RV212C

Die Leitstrukturen RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) und RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) weisen neben der Hemmung der Proteasen Cathepsin L, Rhodesain, Cruzain und LmCPB2.8 antileishmaniale, antitrypanosomale und antiplasmodiale Aktivität auf, während sie keine Cytotoxizität zeigen (Tab. 4-8).

Tab. 4-8: IC_{50} -Werte von **RV122C** und **RV212C** an *L.-major*-Promastigoten (*L. m. (p)*) und *L.-major*-Amastigoten (*L. m. (a)*), *T. brucei brucei* (*T. b. b.*), *P. falciparum* (*P. falc.*) und Makrophagen (Zelllinie J774.1; Bestimmung der Cytotoxizität).

IC_{50} -Werte [μM]					
Verb.	<i>L. m. (p)</i>	<i>L. m. (a)</i>	<i>T. b. b.</i> 48 h	<i>P. falc.</i>	Cyt. (J774.4)
RV122C	$39.6 \pm 4.4^{[106]}$	2.2 ± 1.5	$31.4 \pm 1.2^{[107]}$	$16.2^a/17.5^{b[108]}$	$> 100^{[107]}$
RV212C	$35.4 \pm 2.4^{[106]}$	2.7 ± 0.7	$34.3 \pm 5.2^{[107]}$	$16.7^{c[108]}$	$> 100^{[107]}$

^a bestimmt mittels Durchflusszytometrie, Stamm W2; ^b bestimmt mit Hoechst-33258, Stamm FCBR; ^c bestimmt über Messung der LDH-Aktivität, Stamm FCBR.

Mit diesen Verbindungen wurden weiterführende Untersuchungen zur leishmaniziden Aktivität durchgeführt. Beide Inhibitoren sind in der Lage, die Infektionsrate von Makrophagen zu reduzieren und deren Cytokin- und NO-Produktion zu regulieren, was zur Ausbildung der Immunantwort der Makrophagen gegen den Erreger relevant ist. Auch sind sie in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch für NIH 3T3 Fibroblasten (Maus), dendritische Knochenmarkzellen (Maus) und Bauchfellmakrophagen (Maus).^[106]

4.2.1.1.1 Antileishmaniale Aktivität von RV122C, RV212C

In einer neueren Studie wurden von Dr. U. Schurig im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg mit den zwei aktivsten leishmanizid wirkenden Inhibitoren RV122C und RV212C^[148] die zellulären Effekte auf *L. major* im Detail untersucht. Zur Identifizierung der zellulären Targets wurden Fluoreszenz-Proteaseaktivitäts-Assays und *active-site labeling* an *L.-major*-Promastigoten durchgeführt. Zudem wurde die Art des Zelltods von Promastigoten, der durch die Inhibitoren verursacht wird, aufgeklärt.^[1]

Die antileishmaniale Aktivität von RV122C und RV212C ist vergleichbar mit der der therapeutisch eingesetzten Stoffe Miltefosin und Pentamidin. Sie ist zudem höher als die *in-vitro*-Aktivität von Paromomycin und wird nur von Amphotericin B übertroffen. Die Epoxid-basierten Standardinhibitoren E-64, E-64d, CA074 und CA074ME zeigen keinerlei antileishmaniale Aktivität (Tab. 4-9). Dies könnte auf die größere Lipophilie und die damit erhöhte Zellpermeabilität der Aziridin-basierten Inhibitoren zurückzuführen sein.

Tab. 4-9: IC₅₀-Werte an *L.-major* Promastigoten (*L. m. (p)*, Zellkonzentration = $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$)

Verbindung	IC ₅₀ [µM] <i>L. m. (p)</i>
RV122C	33.4 ± 2.5
RV212C	47.0 ± 11.8
E-64	> 100
E-64d	> 100
CA074	> 100
CA074ME	> 100
Amphotericin B	2.0 ± 0.7
Pentamidin	35.9 ± 4.4
Miltefosin	31.9 ± 100.4
Paraomomycin	> 100

Dieser Sachverhalt lässt sich auch mikroskopisch verfolgen. Während bei Inkubation von Promastigoten mit DMSO (Kontrollprobe), E-64, E-64d und CA074^[148] keine morphologischen Veränderungen zu beobachten sind, zeigen die Parasiten bei Inkubation mit RV122C und RV212C eine für Apoptose-ähnlichen Zelltod charakteristische Zellschrumpfung. Weitere Hinweise auf einen Apoptose-ähnlichen Zelltod waren die lange Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität, der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, die DNA-Fragmentierung und leichte Chromatinkondensation. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten bei Promastigoten nach Behandlung mit den Inhibitoren RV122C und VR212C bereits nach 30 min Akkumulation unverdauten Materials in Lysosom-ähnlichen Vakuolen. Aufnahmen nach 1, 2 und 10 h zeigten, dass die Vakuolen größer werden und aufbrechen. Mit zunehmender Inkubationszeit schreitet die intrazelluläre Zerstörung fort und es sind stark zerstörte Zellkerne mit beschädigten Zellmembranen sowie das Verschwinden intrazellulärer Organellen zu beobachten. Nach 10 h Inkubationszeit scheinen die Promastigoten leer zu sein, wobei die Plasmamembranen noch intakt und die Geißel verkürzt ist (Abb. 4-5, **A**, **B**, **C**). Amastigoten, die in Makrophagen residieren, wurden nach 1 h Inkubationszeit mit den Inhibitoren elektronenmikroskopisch aufgenommen, wobei ebenso Akkumulation unverdauten Materials

in Lysosom-ähnlichen Vakuolen zu beobachten ist (Abb. 4-5, **D**, **E**). Interessanterweise waren manche Amastigoten zu diesem Zeitpunkt bereits zerstört und zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wie er bei Promastigoten nach zehn Stunden Inkubation auftrat. Somit induzieren die Inhibitoren nach Aufbrechen der Membranen der Lysosom-ähnlichen Organellen die Freisetzung verdauender Enzyme ins Cytoplasma, woraufhin alle intrazellulären Kompartimente verdaut werden.

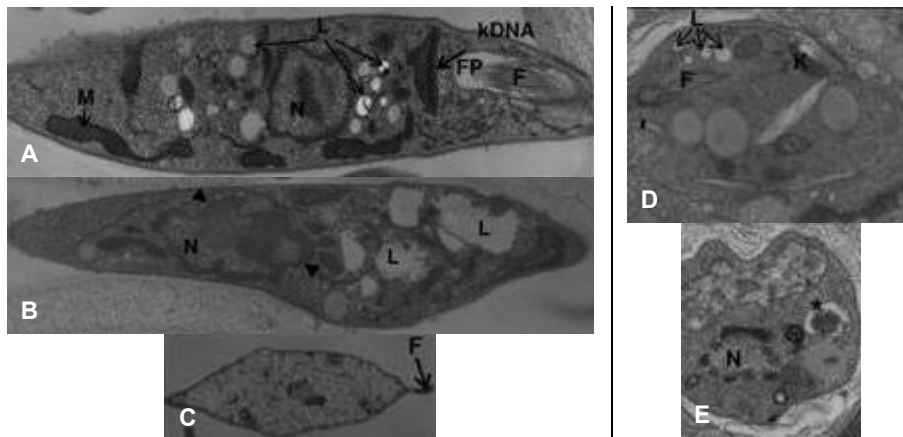


Abb. 4-5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *L.-major*-Promastigoten (**A**, **B**, **C**) und *L.-major*-Amastigoten (**D**, **E**); **A** Kontroll-Kultur, 30 min Inkubation mit DMSO-enhaltenem RPMI-Medium; **B** 1 h Inkubation mit 100 μ M RV122C; **C** 10 h Inkubation mit 100 μ M RV122C; **D** Kontroll-Kultur, 1 h Inkubation mit DMSO-enhaltenem RPMI-Medium; **E** 1 h Inkubation mit 100 μ M RV122C (F, flagellum; FP, flagellar pocket; K, kinetoplast; kDNA, kinetoplast DNA; L, lysosome-like vacuoles; M mitochondrion; N, nucleus; die Aufnahmen stammen von Dr. U. Schurig des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg).^{Copyright ©}

American Society for Microbiology, [Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54, 5028-5041, doi:10.1128/AAC.00327-10]

Anhand der Daten kann gefolgert werden, dass die Inhibitoren RV122C und RV212C einen Apoptose-ähnlichen Zelltod induzieren, der sich von dem Apoptosemechanismus von Säugetieren unterscheidet. Dies steht in Übereinstimmung mit der Hypothese von Zangger *et al.*,^[232] die vorschlagen, dass sich in Leishmanien eine besondere Art des Zelltods entwickelt hat, die während einer Infektion keine Immunantwort des Wirts hervorruft.

Die Beobachtung von unverdaulichem Material in Lysosom-ähnlichen Kompartimenten korrespondiert mit der Hemmung der Cystein-Cathepsine durch die Inhibitoren RV122C und RV212C. Dazu wurden in Form von Fluoreszenz-Proteaseaktivitäts-Assays weitere Untersuchungen vorgenommen. Proteinlysate von *L.-major*-Promastigoten wurden in zwei Schritten inkubiert, um im Anschluss die Proteaseaktivität mittels des Cathepsin-L- und Cathepsin-B-spezifischen Substrats Z-Phe-Arg-AMC zu bestimmen. Zur Unterscheidung der Proteaseaktivität von Cathepsin-L-ähnlichen und Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen wurden die Standardinhibitoren E-64 (spezifische Hemmung von Cystein-Proteasen CAC1: Leishmania CPA, CPB, CPC) und CA074 (selektive Hemmung von Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen: Leishmania CPC) eingesetzt. Aus den erhaltenen Daten resultiert, dass RV122C

und RV212C genauso wie CA074 die Cathepsin-B-ähnliche Protease CPC von *L. major* (LmajcatB) hemmen. Bestätigt wird dies durch *active-site labeling* (Abb. 4-7) mit Verbindung **CS39**, die ein biotinyliertes Derivat von RV122C darstellt. Zur Diskriminierung zwischen Cathepsin-L-ähnlichen und Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen wurden erneut E-64 und CA074 sowie die biotinylierten Verbindungen bADA (Kap. 3.2.3.2) und E-64d-B (biotinyliertes Derivat von E-64d, Abb. 4-6) von PD Dr. N. Schaschke, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, eingesetzt.

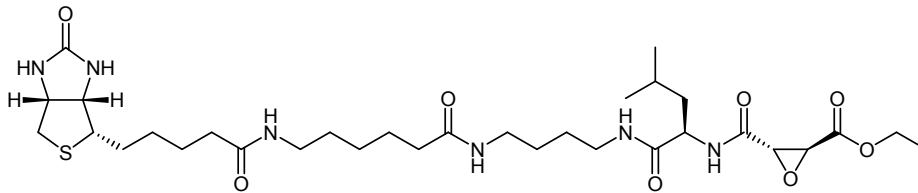


Abb. 4-6: Struktur von E-64d-B.

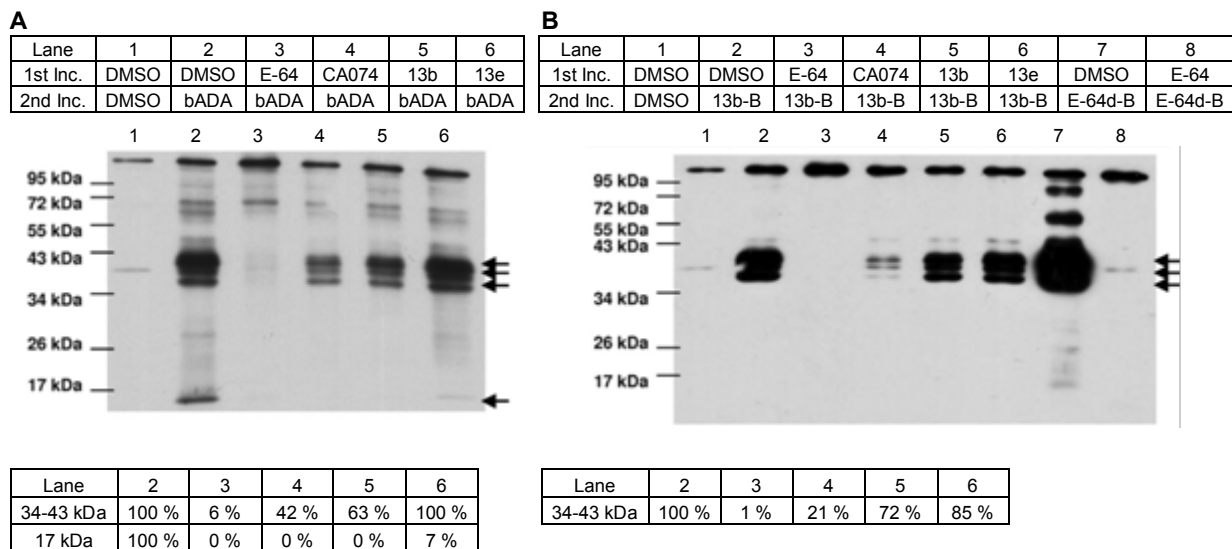


Abb. 4-7: *Active-site labeling*: Proteinlysate von *L. major*-Promastigoten wurden in einem ersten Inkubationsschritt (1st Inc.) mit DMSO, 100 μ M E-64, 50 μ M CA074, 200 μ M RV122C (= 13b) oder 200 μ M RV212C (= 13e) vorinkubiert und in einem zweiten Inkubationsschritt (2nd Inc.) mit den Biotin-markierten Verbindungen bADA (200 μ M, **A**), **CS39** (= 13b-B, 200 μ M, **B**) oder E-64d-B (2 μ M, **B**) inkubiert; bei den Kontrollen ohne Biotin-Markierung wurde in beiden Schritten mit DMSO inkubiert; die Pfeile markieren die Cystein-Protease-spezifischen Banden zwischen 34 und 43 kDa und 17 kDa; die Intensität der Banden wurde densitrometrisch bestimmt, wobei die Intensität nach Zweitinkubation mit bADA (**A**) und 13b-B (**B**) nach Vorinkubation mit DMSO zu 100 % gesetzt wurde (die Aufnahmen stammen von Dr. U. Schurig des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg). Copyright © American Society for Microbiology, [*Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 5028-5041, doi:10.1128/AAC.00327-10]

Das Prinzip des *active-site labeling* beruht auf der hochspezifischen und sehr starken Bindung von Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) an Biotin.^[151,233] Die Affinitätskonstante ist eine der höchsten bekannten einer nicht-kovalenten Bindung, die damit auch unempfindlich gegenüber den verschiedensten physikochemischen Einflüssen ist.^[234,235] Der

warhead der biotinylierten, irreversiblen Inhibitoren bindet an die entsprechende(n) Cystein-Protease(n), woraufhin Streptavidin zur Bindung an Biotin zugegeben wird. Durch Kopplung von z. B. Meerrettichperoxidase^[236] (horseredish peroxidase, HRP) an Streptavidin ist durch eine Peroxidase-induzierte Farbreaktion die Bindung visualisierbar. Dabei katalysiert HRP bei Zugabe von H₂O₂ die Oxidation von beispielsweise Substraten, die im oxidierten Zustand chemilumineszieren, was als Messsignal quantifiziert wird.^[237]

In einer *In-vivo*-Studie einer *L.-major*-Infektion im BALB/c Mausmodell wurde durch tägliche Gabe von RV122C für sechs Wochen (0.25 mg/d) eine infektionsförende Wirkung nachgewiesen. Ein erhöhter IL-4-Spiegel führte zu einer Potenzierung der infektionsförenden Th2-Immunantwort der Mäuse, welche vermutlich durch die Hemmung von murinem Cathepsin L in dendritischen Zellen hervorgerufen wurde (unveröfentlichte Ergebnisse von Dr. U. Schurig, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg).

4.2.1.2 Antileishmaniale Aktivität von CS09

Neben der Selektivität für parasitäre, Cathepsin-L-ähnliche Cystein-Proteasen über Cathepsin L verfügt Verbindung **CS09** über leishmanizide Aktivität (IC₅₀ *L. m.* (p) = 37.4 µM, IC₅₀ *L. m.* (a) = 2.3 µM, Kap. 4.2.1). Auch die Proteaseaktivität von Proteinlysaten aus *L.-major*-Promastigoten wird durch **CS09** gehemmt, wie Fluoreszenz-Proteaseaktivitätsassays, durchgeführt von U. Baum und Dr. U. Schurig des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC zeigen. Dabei ruft **CS09** eine stärkere Hemmung hervor als RV122C und RV212C. Zudem wurden die Restaktivitäten nach Inkubation mit E-64 (spezifische Hemmung von Cystein-Proteasen CAC1: *Leishmania* CPA, CPB, CPC), CA074 (selektive Hemmung von Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen: *Leishmania* CPC) und CLIK-148 (selektive Hemmung von Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen: *Leishmania* CPA, CPB; Kap. 3.3) bestimmt (Abb. 4-8, **A**). Zur Analyse der Selektivität von **CS09** wurden die Proteinlysate mit E-64 und CA074 vorinkubiert und in einem zweiten Inkubationsschritt wurde RV122C, RV212C oder **CS09** zugegeben. Während die Zweitinkubation mit RV122C und RV212C keinen zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität der Cystein-Proteasen hat, ist bei Zweitinkubation mit **CS09** in beiden Fällen ein signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 4-8, **B**). Da RV122C und RV212C keinen zusätzlichen, hemmenden Effekt aufweisen, wenn die Aktivität der Cystein-Cathepsine bereits durch E-64 oder die Aktivität des Cathepsin-B-ähnlichen Enzyms bereits durch CA074 inhibiert wurde, sind sie - wie CA074 - selektive Inhibitoren für die *Leishmania*-CPC (vgl. Kap. 4.2.1.1.1). Im Gegensatz dazu senkt **CS09** die Enzymaktivität nach Vorinkubation mit CA074, d. h. Cathepsin-L-ähnliche Enzyme werden gehemmt. Da die hemmende Wirkung von **CS09**

ähnlich stark wie die von E-64 ist, ist außerdem gezeigt, dass **CS09** nicht nur die Aktivität der Cathepsin-L-ähnlichen, sondern ebenfalls die des Cathepsin-B-ähnlichen Enzyms beeinflusst. Bei **CS09** handelt es sich somit, ähnlich wie im Falle von E-64, um einen nicht selektiven, aber für Cystein-Proteasen spezifischen Inhibitor.

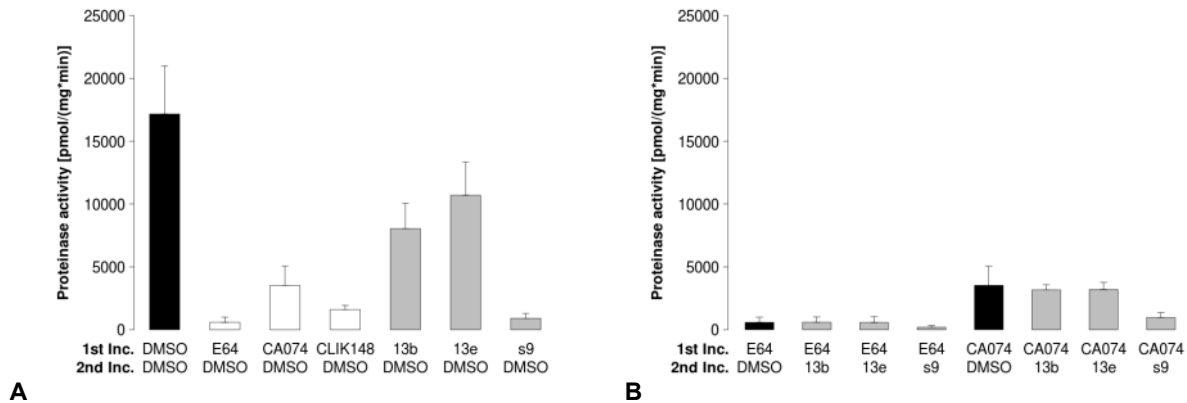


Abb. 4.8: Fluoreszenz-Proteaseaktivitätsassays: **A** Proteinlysate von *L.-major*-Promastigoten wurden in einem ersten Inkubationsschritt (1st Inc.) mit DMSO, E-64, CA074, CLIK-148, RV122C (= 13b), RV212C (= 13e) oder **CS09** (= s9) (jeweils 200 μ M) vorinkubiert und in einem zweiten Inkubationsschritt (2nd Inc.) mit DMSO inkubiert; **B** Proteinlysate von *L.-major*-Promastigoten wurden in einem ersten Inkubationsschritt (1st Inc.) mit E-64 oder CA074 (jeweils 200 μ M) vorinkubiert und in einem zweiten Inkubationsschritt (2nd Inc.) mit DMSO, RV122C (13b), RV212C (13e) oder **CS09** (jeweils 200 μ M) inkubiert; die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (25 μ M) (Diagramme wurden von U. Baum und Dr. U. Schurig des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt).

4.2.2 Weitere antiparasitäre Testungen

Im Arbeitskreis von Dr. Ann-Kristin Müller, Department für Infektiologie/Parasitologie des Universitätsklinikums Heidelberg wurde die antiplasmodiale Verbindung **CS42** an *Plasmodium berghei* infizierten humanen Hepatomzellen (Zelllinie HuH7) auf ihren Effekt auf das Parasitenwachstum in Leberstadien getestet.^[238] Dabei zeigte **CS42** keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum.

Die antitypanosomal wirkenden Verbindungen **CS12** und **CS13** wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Steinert, Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig in dem ECV304-C6 Blut-Hirn-Schrankmodell auf ihre Fähigkeit untersucht, die Transmigration von *Trypanosoma brucei gambiense* STIB930 zu unterbinden.^[239] Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führten die Inhibitoren zu einer signifikanten Verringerung der Transmigration. Nach der Inkubationszeit waren im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle keine lebenden Trypanosomen zu erkennen. Eine vollständige Hemmung der Transmission konnte nicht beobachtet werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Inhibitoren entweder nicht effektiv genug wirken oder dass es neben Brucipain weitere Faktoren gibt, die die

Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen und die nicht von den Cystein-Protease-Inhibitoren beeinflusst werden. Die trypanozide Wirkung könnte auf eine zu hoch gewählte Konzentration zurückzuführen sein.^[240]

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kirkwood Land, Department of Biological Sciences, University of the Pacific in Stockton (California, USA) wurden einzelne Verbindungen auf ihre inhibitorische Wirkung auf den Parasiten *Trichomonas vaginalis* getestet.^[241] Dieser Erreger ist der Auslöser der Trichomoniasis, wobei es sich um eine sexuell übertragbare Erkrankung handelt. Alle getesteten Verbindungen (**CS04**,^[148] **CS09**, **CS10**, **CS11**, **CS12**, **CS13**, **CS14**) riefen keine Hemmung des Parasitenwachstums im *In-vitro*-Screening hervor.

In Kooperation mit Dr. Uta Schurigt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg und Prof. Dr. Conor Caffrey, California Institute for Quantitative Biosciences, Department of Pathology der University of California in San Francisco (USA) wurden Verbindungen, die zuvor als Cystein-Protease-Inhibitoren identifiziert wurden, auf ihre Wirksamkeit bezüglich des Wachstums von *Schistosoma mansoni* getestet. Im diesem Rahmen wurde in San Francisco ein visuelles Screening durch Behandlung mit den Substanzen an der jungen Form (Schistosomula) und der adulten Form (Schistosomen) durchgeführt.^[242] Das Screening zur Identifizierung antischistosomal wirkender Substanzen erfolgt ohne Kenntnis der Targets. Die Bereitstellung von Schistosomula erfolgt in wässrigem Medium über Schnecken (*Biomphalaria glabrata*), die als Zwischenwirte fungieren. Sie nehmen die zuvor aus Eiern geschlüpften Wimpernlarven (Mirazidien) auf, welche zu Zerkarien heranreifen und dann wieder freigesetzt werden. Die Zerkarien werden mechanisch zu Schistosomula transformiert und den *In-vitro*-Testungen zugeführt. Für das Screening an adulten Würmern dienen Hamster (*Mesocricetus auratus*) als Zwischenwirte. Diese werden mit Zerkarien infiziert und nach einer bestimmten Zeit geopfert, um die Schistosomen zur *In-vitro*-Testung zu isolieren.^[243] Zunächst wurde das Screening an den Schistosomula durchgeführt. Einige der dort aktiven Verbindungen wurden anschließend an den adulten Parasiten getestet. Die Wirkung der Substanzen wurde durch mikroskopische Beobachtung von Veränderungen des Phänotyps der Parasiten bis hin zu deren Absterben beurteilt. Der Bewertung der Phänotyp-Veränderungen liegen laborinterne Klassifikationskriterien zugrunde. Die Konzentration der Substanzen, gelöst in DMSO, betrug bei Behandlung der Schistosomula 5 µM und bei Behandlung der Schistosomen 12 µM. Die Beobachtung der Phänotypen erfolgte im Fall des Schistosomula-Screenings nach 24 h, 2 d und 3 d nach Zugabe der Substanzen. Im Fall der adulten Parasiten wurde die Beobachtung der Phänotypen nach 2 h, 24 h, 2 d und 3 d durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Praziquantel. Tabelle 4-10 enthält die Verbindungen, die dem *In-vitro*-Screening an

Schistosomula und an Schistosomen unterzogen wurden sowie eine hervorgerufene Veränderungen des Phänotyps.

Tab. 4-10: Ergebnisse der *in-vitro*-Screenings von Cystein-Protease-Inhibitoren an Schistosomula und Schistosomen des Parasiten *S. mansoni*.

Verb.	Schistosomula Veränderung des Phänotyps	Schistosomen Veränderung des Phänotyps
CS03	ja	nd
CS09	nein	nd
CS10	ja	nd
CS11	ja	nein
CS12	ja	nein
CS13	ja	nd
CS14	ja	nd
CS15	ja	nd
CS16	ja	nd
CS17	ja	nd
CS18	ja	nein
CS19	ja	nd
CS20	ja	nd
CS21	ja	nd
CS22	ja	nd
CS23	ja	nd
CS24	ja	nd
CS25	ja	nd
CS26	ja	nd
CS27	ja	nd
CS28	ja	nd
CS29	ja	nein
CS30	ja	nd
CS31	ja	nein
CS32	ja	nd
CS33	ja	nd
CS34	ja	nd
CS35	ja	nd

CS36	ja	nd
CS37	ja	nd
CS38	ja	nd
CS42	ja	nein

nd = not determined

Außer Verbindung **CS09** riefen alle getesteten Verbindungen eine Veränderung des Phänotyps der Schistosomula hervor. Im Screening an Schistosomen zeigte jedoch keine der getesteten Verbindungen antischistosomale Aktivität. Der nächste Schritt für Substanzen, die wirksam gegen die adulte Form des Parasiten sind, ist eine *In-vivo*-Studie am Mausmodell.

5 LC-MS-Untersuchung zur Aufklärung des Hemmmechanismus

Zur Aufklärung des Hemmmechanismus von Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren an Rhodensain wurde eine LC-MS-Analyse durchgeführt. *Active-site labeling*^[1,110,111] und ein Dialyse-Assay^[110] bewiesen bei den eingesetzten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren kovalente und irreversible Hemmung. Zur Bestätigung der Hypothese des irreversiblen Hemmmechanismus von Verbindung **CS09** wurden nach Inkubation mit Rhodensain bei 25 °C nach unterschiedlichen Zeitpunkten LC-MS-Untersuchungen ausgeführt. Ziel war, durch LC-MS-Untersuchungen zu beweisen, dass der Aziridinring durch Angriff des Cysteinrests der Protease gespalten wird, wobei der Peptidrest auf den Cysteinrest übertragen wird. Durch $[I] \gg [E]_0$ und $[S] \gg [E]_0$ wurden Bedingungen pseudoerster Ordnung und *steady-state*-Bedingungen sichergestellt. Die erste Messung erfolgte ohne Enzym (statt dessen Zugabe von 30 µl Puffer). Die Inkubationszeiten mit Enzym betragen 5 min, 15 min, 30 min, 1 h und 2 h. Das Gesamtvolumen des Assays betrug 600 µl, bestehend aus 525 µl Acetatpuffer (pH 5.5, Kap. 10.4.1), 30 µl Enzym (Aktivität ~ 20 ΔF/min) und 30 µl Inhibitorlösung (gelöst in DMSO, c = 2 mM). Somit betrug die Endkonzentration an Inhibitor im Assay 100 µM. Puffer und Enzymlösung wurden vorgelegt, die Inkubationszeit startete bei der Zugabe der Inhibitorlösung. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 1.2 ml Acetonitril gestoppt. Im Anschluss wurde die Lösung mittels LC-MS untersucht. Die Aufnahme der UV-Chromatogramme erfolgte bei 213-217 nm sowie bei 246-262 nm. Abbildung 5-1 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm ohne Zugabe von Enzym (Abb. 5-1, **A**) und ein Chromatogramm nach der Inkubationszeit von 1 h mit Enzym (Abb. 5-1, **B**), jeweils gemessen bei 213-217 nm. Die UV-Chromatogramme nach verschiedenen Inkubationszeiten von Inhibitor und Enzym zeigen keine Veränderung gegenüber dem UV-Chromatogramm ohne Zugabe von Enzym. Es treten weder Spaltprodukte auf, noch verringert sich die Peakfläche (Peak 1) des Inhibitors **CS09** nach den verschiedenen Inkubationszeiten.

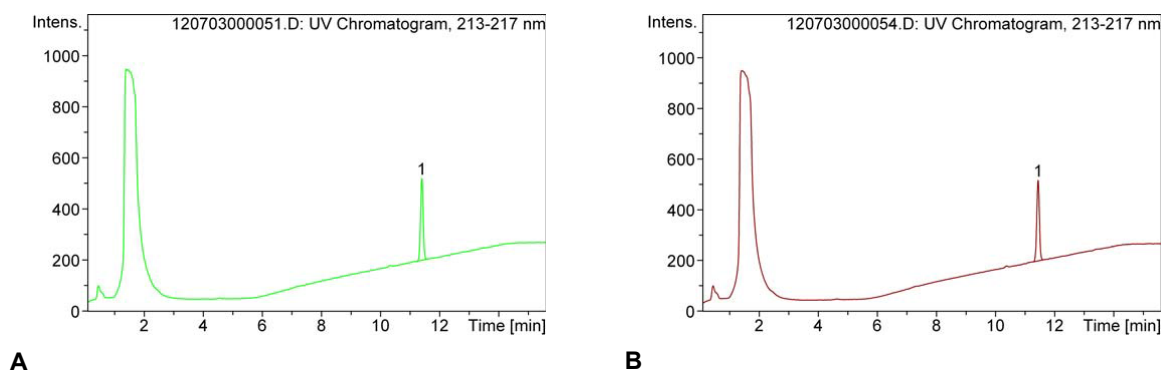


Abb. 5-1: Chromatogramme bei 213-217 nm der LC-MS-Analyse der Assays von **CS09** mit Rhodensain zur Aufklärung des Hemmmechanismus; **A** ohne Zugabe von Rhodensain; **B** 1 h Inkubation mit Rhodensain.

Die Inhibitorkonzentration konnte weder höher noch niedriger gewählt werden, um sinnvolle Ergebnisse zu erhalten. Bei niedrigerer Konzentration war keine Detektion mittels LC möglich. Bei höherer Konzentration fiel der Inhibitor in der Assay-Lösung aus. Die LC-MS-Analyse liefert somit keine Bestätigung, aber auch keine Widerlegung des kovalenten und irreversiblen Hemmmechanismus.

6 Aufklärung der Bindungsmodi

6.1 Dockingstudien

Zur Aufklärung des Bindungsmodus von Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren in der Bindetasche von Cruzain^[244] wurden Dockingstudien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Antonia Tavares do Amaral, Instituto de Química, Universidade de São Paulo in Brasilien realisiert. Dazu fand das Programm GOLD^[245] Anwendung. Das aktive Zentrum von Cruzain ist dem anderer Cystein-Proteasen der Papain-Familie ähnlich. Es weist sieben Substratbindungsstellen (S_4 , S_3 , S_2 , S_1 , S_1' , S_2' , S_3') auf. In der Mitte der *active site cleft* zwischen den beiden Dömanen befindet sich die katalytische Triade, die aus Cys²⁵, His¹⁵⁹ und Asn¹⁷⁵ gebildet wird.^[246] Das Docking erfolgte mit den Substanzen RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂), RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂), **CS11** (Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(S,S)-Azi(OBn)₂) und **CS14** (Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-(S,S)-Azi(OBn)₂). Abbildung 6-1 zeigt alle vier Verbindungen simultan in der Enzymtasche, um einen Vergleich der verschiedenen Dockingposen ziehen zu können. Die am besten bewertete Position kennzeichnet sich bei allen Verbindungen durch einen Benzylrest in der hydrophoben S_2 -Tasche aus. Die elektrophilen Kohlenstoffatome der Aziridinringe zeigen in allen Posen eine Nähe zum Schwefelatom des Cysteinrests im aktiven Zentrum (Cys²⁵) (RV122C: 3.58 Å, RV212C: 3.21 Å, CS11: 3.01 Å, CS14: 2.18 Å).

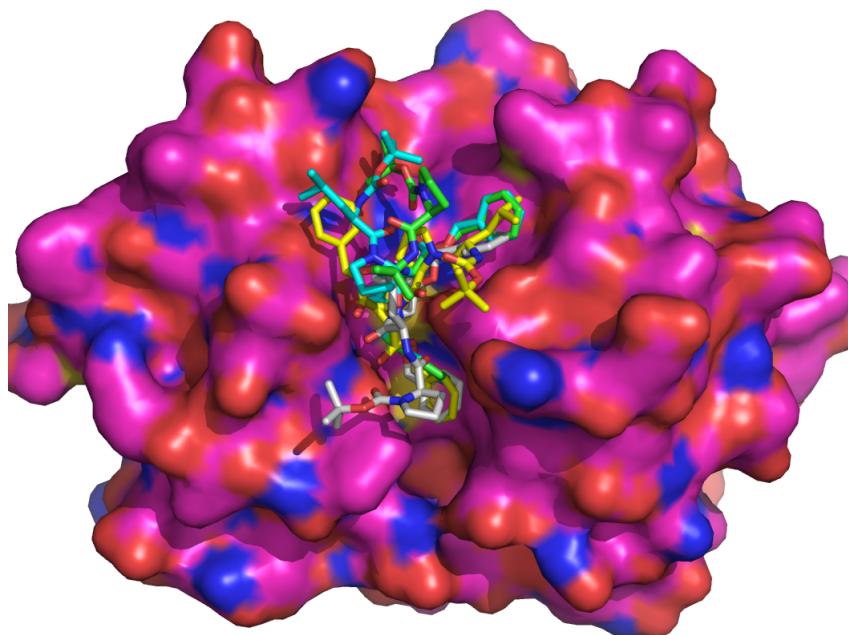


Abb. 6-1: Überlagerte Darstellung des Dockingergebnisses von **RV122C**, **RV212C**, **CS11** und **CS14** im aktiven Zentrum von Cruzain (1me4^[247], die Struktur ist der PDB^[70] entnommen; Darstellung mit PyMOL^[71]; zur Verfügung gestellt von A. Tavares do Amaral).

Bei RV122C bindet ein Benzylrest in die S_2 -Tasche und der Leucinrest in die S_1' -Tasche. Der zweite Benzylrest ist *solvent exposed* in der S_1 -Tasche (Abb. 6-2, **A**). RV212C (Abb. 6-2,

B) und **CS11** (Abb. 6-2, **C**) liefern eine ähnliche Dockingpose, die Benzylreste adressieren die S_2 - und die S_1' -Tasche, der Leucinrest ragt in die S_2' -Tasche. Bei **CS14** (Abb. 6-2, **D**) befinden sich ebenfalls die Benzylreste in der S_2 - und der S_1' -Tasche, der Leucinrest hingegen ist in der S_3 -Tasche platziert.

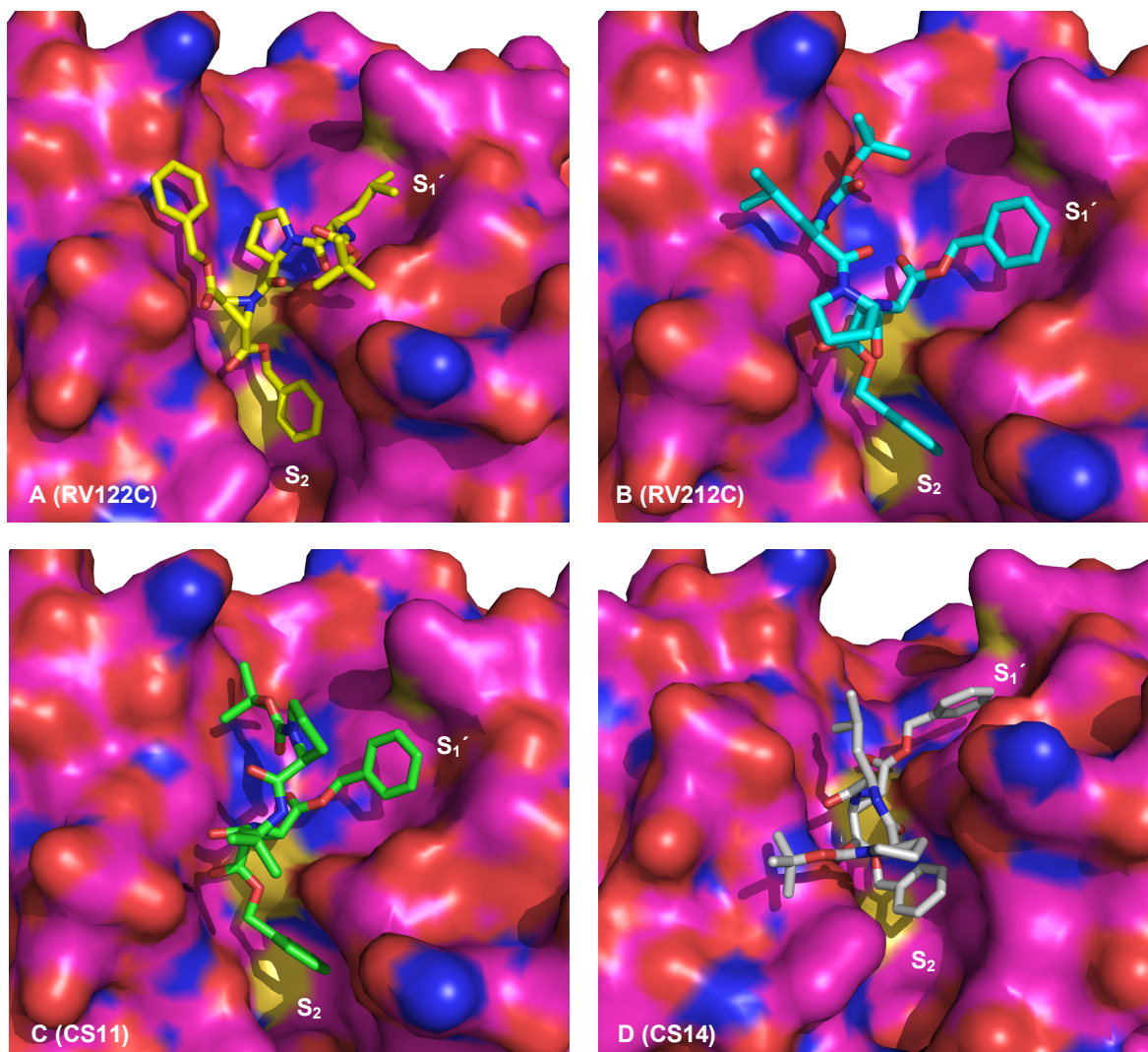


Abb. 6-2: Docking von **RV122C** (**A**), **RV212C** (**B**), **CS11** (**C**), **CS14** (**D**) in das aktive Zentrum von Cruzain (1me4^[247]); dargestellt sind jeweils die Bindemodi, die die beste *scoring function* lieferten (die Struktur ist der PDB^[70] entnommen; Darstellung mit PyMOL^[71]; zur Verfügung gestellt von A. Tavares do Amaral).

Die möglichen Bindungsmodi der Inhibitoren, die durch das Docking vorgeschlagen werden, haben gemeinsam, dass die S_2 - und die S_1' -Tasche von relativ großen hydrophoben Resten besetzt werden. Die S_2 -Tasche von Cruzain ist relativ tief und hydrophob, woraus eine starke Präferenz für große hydrophobe Reste in P_2 -Position resultiert. Sie ist gesäumt von Leu⁶⁷, Ala¹³³ und Leu¹⁵⁷. Die S_1' -Tasche wird durch die Reste Gln¹⁹, Ala¹³⁶, Asp¹⁵⁸, His¹⁵⁹ und Trp¹⁷⁷ gebildet. Auch sie hat eine Präferenz für hydrophobe Reste. Trp¹⁷⁷ ist innerhalb der Papain-Superfamilie weithin konserviert. Es wird angenommen, dass Trp¹⁷⁷ eine wichtige Rolle bei der Orientierung der katalytischen Triade einnimmt. Demnach hilft der Indolring des

Tryptophanrests bei der Positionierung des Asparaginrests, der wiederum für die Orientierung des Histidinrests Sorge trägt. Die S_1 -Tasche ist im Fall von Cruzain eine lose definierte, flache Bindungstasche. In publizierten Kristallstrukturen sind die Reste in P_1 -Position *solvent exposed* und weisen keine Interaktionen mit der Bindungstasche auf.^[79,80,122,246] Die S_2' -Tasche von Cathepsin L ist relativ flach und weit offen für Lösungsmittel. In Cathepsin B wird die S_2' -Tasche durch den *occluding loop* begrenzt und somit verkürzt.^[90] Die S_3 -Bindungstasche von Cathepsin L ist ebenfalls an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert, was eine polarere Umgebung darstellt.^[68] Wichtig scheint bei der Bindung der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren an Cruzain die Interaktion von zwei relativ großen, hydrophoben Resten in die S_2 - und die S_1' -Bindungstasche zu sein, während die anderen Reste weitgehend *solvent exposed* sind. Je nach Konfiguration der Stereozentren können zwei der drei hydrophoben Reste (zwei Benzylreste und ein Leucinrest) in diese Taschen binden, wobei Prolin die relative Lage dieser Gruppen zueinander bestimmt. Die Reste, die *solvent exposed* sind (Boc-Gruppe und der zweite Benzylrest), sind für eine gute Affinität nicht notwendig. Die Flexibilität der Inhibitoren in Abhängigkeit von den Konfigurationen der Stereozentren erklärt das Ergebnis, dass verschiedene Bindungsmodi möglich sind (unveröffentlichte Ergebnisse von Prof. Dr. A. Tavares do Amaral, Instituto de Química, Universidade de São Paulo).

6.2 Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallisationsversuche von Inhibitoren mit Rhodesain zur Röntgenstrukturanalyse wurden von Uwe Dietzel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Caroline Kisker des Rudolf-Virchow-Zentrums der Universität Würzburg durchgeführt. Rhodesain weist als Cathepsin-L-ähnliche Protease eine ähnliche Substratspezifität auf wie Cathepsin L und somit, wie auch Cruzain, eine ausgeprägte Präferenz für große hydrophobe Reste von Liganden in der S_2 -Bindungstasche.^[79] Bislang konnte keine Röntgenstruktur eines Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitors im Komplex mit Rhodesain komplett aufgelöst werden. Eine vorläufige Annahme einer Röntgenstruktur liefert erste Hinweise auf die Orientierung des Inhibitors RV134C (Boc-(S)-Leu-(S/R)-Nip-(S,S)-Azi(OBn)₂) in der *active site cleft* von Rhodesain (Abb. 6-3). Demnach adressiert der Leucinrest die S_2 -Tasche und einer der beiden Benzylesterreste die S_1' -Tasche. Dieser Bindungsmodus wurde bereits in früheren Dockingstudien mit Cathepsin L vorgeschlagen^[105] und korreliert mit den Ergebnissen der Dockingstudien an Cruzain, die ebenso vorschlagen, dass zwei hydrophobe Reste in die S_2 - und die S_1' -Tasche binden.

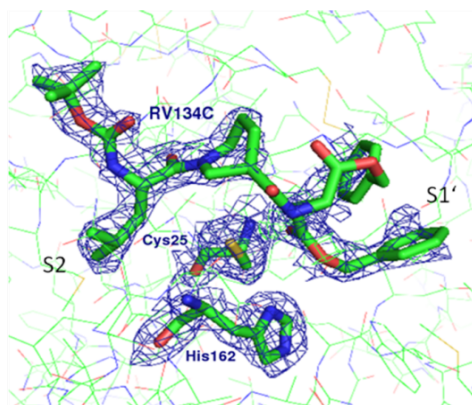


Abb. 6-3: Vorläufige Röntgenstruktur des Komplexes von Rhodesain mit RV134C (zur Verfügung gestellt von U. Dietzel).

Zur Verbesserung der Röntgenstruktur wurde ein Derivat von RV134C synthetisiert, welches an den Phenylringen Bromsubstituenten trägt. Die Struktur von **CS38** (Kap. 3.2.3.1) ist in Abbildung 6-4 zu finden. Die signifikante Elektronendichte der Bromsubstituenten soll die Wiederfindung des Inhibitors im Komplex mit Rhodesain im Beugungsmuster der Röntgenstruktur erleichtern.

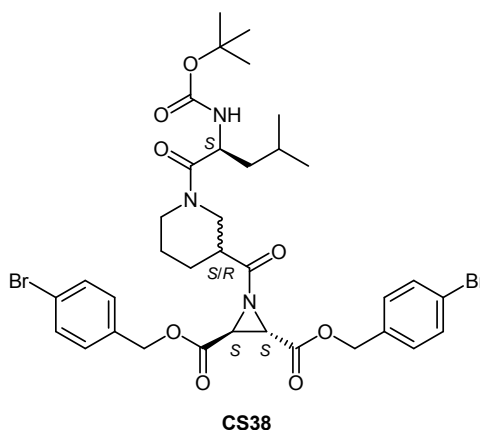


Abb. 6-4: Struktur von **CS38**.

Es gelang jedoch nicht, eine Röntgenstruktur von **CS38** in Rhodesain zu erhalten. In der Elektronendichteverteilung ist lediglich erkennbar, dass die hydrophobe S_2 -Bindungstasche belegt ist und eine unklare Elektronendichte am Cysteinrest des aktiven Zentrums vorhanden ist. Dies liefert einen Hinweis auf kovalente Bindung des Inhibitors. Durch Soaking war es nicht möglich, RV134C oder **CS38** in Rhodesain zu kristallisieren. Die Co-Kristallisation von Inhibitor und Enzym, als Alternative zum Soaking, lieferte im Falle der beiden Inhibitoren bislang nicht die gewünschten Ergebnisse.

Mit dem vinylogenen Dipeptidester **CS42** (Abb. 6-5) wurden ebenfalls Kristallisationsversuche mit Rhodesain unternommen. Doch auch in diesem Fall konnte keine Röntgenstruktur generiert werden.

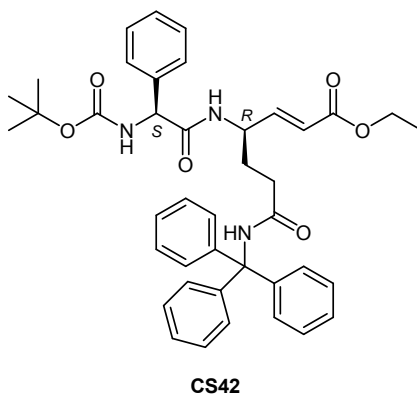


Abb. 6-5: Struktur von **CS42**.

Die Elektronendichteverteilung zeigt einen ähnlichen Zustand wie bei RV134C. Die Boc-Gruppe und der Phenylglycin-Rest sind gebunden und am Cysteinrest des aktiven Zentrums ist Elektronendichte vorhanden, wobei der Abstand zum Cystein in dem Bereich liegt, der eine kovalente Bindung an das Michael-System vermuten lässt. Die Ergebnisse liefern somit ebenfalls erste Hinweise zur Orientierung des Inhibitors im aktiven Zentrum von Rhodocollin. Möglich ist in allen Fällen, dass es bei den Kristallisationsversuchen zur Degradation der Inhibitoren kommt und lediglich Spaltprodukte an die Protease binden (unveröffentlichte Ergebnisse von U. Dietzel, Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg).

7 Diskussion der Ergebnisse

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Synthese irreversibler und selektiver Inhibitoren von parasitären Cystein-Proteasen. Dazu wurden potentielle Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-, Oxiran-2,3-dicarboxamid- sowie Michael-Akzeptor-Baustein synthetisiert und in Enzymassays getestet. Die synthetisierten Verbindungen beruhen auf Variationen von Leitstrukturen, die bereits als antiparasitär wirkende Cystein-Protease-Inhibitoren identifiziert wurden und stellen eine Weiterentwicklung derer dar.

7.1 Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Verbindungen

Im Fall der Aziridinylpeptide konnte, verglichen mit den Leitstrukturen RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) und RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂), eine deutlich bessere Selektivität erzielt werden. Die Verbindungen **CS09–CS14** stellen Stereoisomere und Konstitutionsisomere von RV122C und RV212C dar. Während RV122C und RV212C Inhibitoren der Cathepsin-L-Subfamilie sind, hemmen Verbindungen der zweiten Serie selektiv parasitäre Cystein-Proteasen. Keine der Verbindungen zeigt Hemmung an den humanen Enzymen Cathepsin L, Cathepsin B und Cathepsin K sowie an Falcipain-2. Dahingegen wird die Cathepsin-L-ähnlich Protease LmCPB2.8 von allen Verbindungen im gleichen, niederen mikromolaren Bereich gehemmt. Eine ähnliche Hemmwirkung zeigen **CS09** und **CS11–CS14** an Rhodesain und die Verbindungen **CS11** und **CS14** an Cruzain. Alle Verbindungen mit Ethylesterresten (**CS01–CS08**) inhibieren weder Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin K, LmCPB2.8, Rhodesain, Cruzain noch Falcipain-2. Dies ist in Übereinstimmung mit den vorgeschlagenen Bindungsmodi der Dockingstudien (Kap. 6.1), nach denen zwei relativ große hydrophobe Reste in die S2- und die S1'-Tasche von Cruzain als Prototyp einer Cathepsin-L-ähnlichen Protease binden. Die erhaltenen Daten der Verbindungen **CS09–CS14** lassen keine Präferenzen hinsichtlich der Konfiguration oder Konstitution erkennen. Hervorzuheben ist, dass sich innerhalb der Cathepsin-L-Subfamilie Selektivität erzielen lässt.^[148] Die Daten des *active-site-labeling* und die Ergebnisse der Proteaseaktivitätsassays von RV122C und RV212C an Promastigotenlysaten von *L. major* beweisen, dass die Targetenzyme im Parasiten Cathepsin-B-ähnlich sind (Kap. 4.2.1.1.1). Aus diesem Grund wurde LmajcatB (= CPC, Cathepsin-B-ähnliche Leishmania-Protease) in der Arbeitsgruppe Kisker, Universität Würzburg, rekombinant exprimiert und für Enzymassays zur Verfügung gestellt. An LmajcatB zeigen zwei Derivate mit Ethylesterresten (**CS05**, **CS08**) sowie **CS09** moderate Hemmung, während die Verbindungen **CS11–CS14** eine sehr gute Hemmwirkung aufweisen (Tab. 7-1).

Tab. 7-1: K_i -Werte von **CS05**, **CS08**, **CS09**, **CS11-CS14** an LmajcatB.

	CS05	CS08	CS09	CS11	CS12	CS13	CS14
LmajcatB, K_i [μM]	15.2	10.3	18.2	0.69	0.82	0.72	1.5

Die Verbindungen **CS09** und **CS11–CS14** hemmen sowohl die leishmaniale Cathepsin-L-ähnliche sowie die Cathepsin-B-ähnliche Protease. Bestätigt wird dieses Ergebnis mit **CS09** auch durch Fluoreszenz-Proteaseaktivitätsassays mit Proteinlysaten von *L.-major*-Promastigoten, wonach **CS09** sowohl Cathepsin-L-ähnliche als auch Cathepsin-B-ähnliche Proteasen hemmt (Kap. 4.2.1.2). *In vitro* wirkt lediglich **CS09** aus der Gruppe der Verbindungen **CS09–CS14** leishmanizid (an Promastigoten: $IC_{50} = 37.4 \mu\text{M}$; an Amastigoten: $IC_{50} = 2.3 \mu\text{M}$) bei akzeptabler Cytotoxizität ($IC_{50} = 68.2 \mu\text{M}$).

CS09 wurde fortan als neue Leitstruktur gewählt. Durch Verlängerung des Peptids durch die zusätzliche Aminosäure Glycin wurde mit Verbindung **CS15** ein erster Hinweis geliefert, dass die Boc-Schutzgruppe in der Enzymtasche *solvent exposed* ist. **CS15** zeigt selektive Hemmung von Cathepsin B ($K_i = 26.4 \mu\text{M}$), LmCPB2.8 ($K_i = 8.1 \mu\text{M}$) und LmajcatB ($K_i = 4.8 \mu\text{M}$) sowie antileishmaniale Aktivität ($IC_{50} = 34.2 \mu\text{M}$) ohne cytotoxisch zu sein. **CS16-CS19** stellen Konstitutionsisomere von **CS09** dar, bei denen die Aminosäuresequenz bestehend aus L-Leu/D-Leu und L-Pro/D-Leu variiert wurde (Tab. 7-2).

Tab. 7-2: K_i -Werte von **CS05**, **CS08**, **CS09**, **CS11-CS14** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB und Rhodesain.

Boc-Xaa-Caa-(R,R)-Azi(OBn)₂							
K_i [μM]							
Verb.	Xaa	Caa	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain
CS16	(S)-Pro	(S)-Leu	14.2	29.2	2.6	17.9	0.50
CS17	(R)-Pro	(S)-Leu	19.7	44.0	2.9	ni	0.51
CS18	(S)-Pro	(R)-Leu	ni	24.6	3.1	ni	0.57
CS19	(R)-Pro	(R)-Leu	70.9	ni	4.6	17.3	0.87

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu\text{M}$

Am interessantesten erscheint Verbindung **CS19** aufgrund der selektiven Hemmung der parasitären Proteasen. Alle vier Verbindungen zeichnen sich durch eine sehr gute Hemmung von Rhodesain aus, während Cruzain von keiner der Verbindungen gehemmt wird. Zudem wirken sie antileishmanial und antitrypanosomal und sind in den verwendeten Dosen nicht toxisch.

Unter Beibehaltung der (*R,R*)-Konfiguration am Aziridinring, der Benzylesterreste und des D-Prolins, welches an den Aziridinring acyliert ist, wurde der L-Leucinrest von **CS09** durch andere proteinogene und nicht-proteinogene, lipophile Aminosäuren substituiert (Tab. 7-3). Verbindungen mit Aib (**CS22**), L-Nva (**CS26**), L-Chg (**CS28**) oder L-Cha (**CS29**) anstelle von L-Leu zeigten an keiner der getesteten Proteasen inhibitorische Aktivität. Weiterhin hemmte keine der Substanzen Cruzain.

Tab. 7-3: K_i -Werte von **CS20**, **CS21**, **CS23**, **CS24**, **CS25**, **CS27**, **CS30**, **CS31**, **CS32**, **CS33** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB und Rhodesain.

Boc-Xaa-(<i>R</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂						
K_i [μ M]						
Verb.	Xaa	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain
CS20	Gly	53.1	ni	ni	7.0	ni
CS21	β -Ala	ni	ni	ni	6.2	ni
CS23	(<i>S</i>)-Ala	ni	ni	25.4	ni	ni
CS24	(<i>S</i>)-Val	51.5	54.6	4.3	ni	1.4
CS25	(<i>S</i>)-Ile	ni	ni	ni	8.7	ni
CS27	(<i>S</i>)-Nle	ni	ni	2.8	ni	ni
CS30	(<i>S</i>)-Phg	ni	ni	10.3	20.6	ni
CS31	(<i>S</i>)-Phe	ni	ni	1.7	ni	ni
CS32	(<i>S</i>)-hPhe	ni	ni	1.5	ni	ni
CS33	(<i>S</i>)-Trp	ni	ni	2.7	ni	ni

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu$ M

CS20, **CS21** und **CS25** zeichnen sich durch selektive Hemmung der Cathepsin-B-ähnlichen LmajcatB aus, wohingegen **CS30** sowohl LmCPB2.8 und LmajcatB hemmt. **CS24** weist eine schwache Hemmung der humanen Cathesine L und B auf sowie eine sehr gute inhibitorische Aktivität an den Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen LmCPB2.8 und Rhodesain. Die Verbindungen **CS27**, **CS31–CS33** sind selektive Inhibitoren der LmCPB2.8. Daraus lässt sich die Struktur-Wirkungsbeziehung ableiten, dass sterisch relativ anspruchsvolle Reste anstelle des Leucins essentiell sind für die selektive Hemmung der LmCPB2.8. Kleinere und nicht aromatische Reste (Gly, β -Ala, Aib, Nva, Chg, Cha) führen nicht zur Hemmung durch den entsprechenden Inhibitor. Leishmanizide Aktivität zeigen **CS23**, **CS24**, **CS25**, **CS28** und **CS31**, wobei von **CS24** und **CS25** zusätzlich die Wirksamkeit an Amastigoten bestätigt wurde. Von besonderem Interesse ist **CS25**, sich auszeichnend durch selektive Inhibition von LmajcatB bei sehr guter leishmanizider Aktivität (IC_{50} (*L. m.* (p)) = 9.8 μ M, IC_{50}

(*L. m.* (a)) = 2.0 μM). In den Fällen von **CS23** (Ala), **CS24** (Val), **CS25** (Ile) und **CS31** (Phe) korrelieren enzymatische Hemmung mit leishmanizider Aktivität. Ähnlich wie im Falle von RV122C, RV212C und **CS09** kann vermutet werden, dass die antileishmaniale Wirksamkeit auf Hemmung der entsprechenden parasitären Enzyme zurückzuführen ist. **CS28** scheint sich eines anderen Hemmmechanismus zu bedienen, denn bei guter antileishmanialen Aktivität weist **CS28** keine Hemmung der leishmanialen Enzyme LmCPB2.8 und LmajcatB auf. Anti-trypanosomale Aktivität weisen die Verbindungen **CS23**, **CS24**, **CS25**, **CS26**, **CS27**, **CS28**, **CS30**, **CS31**, **CS32**, **CS33** und **CS29**, welches die beste Wirksamkeit erzielte, auf. Alle Derivate sind an der Makrophagenzelllinie J774.1 nicht toxisch.

Eine weitere Variation der Leitstruktur **CS09** stellte die Variation des D-Prolinrests unter Beibehaltung der (*R,R*)-Konfiguration am Aziridinring, der Benzylesterreste und des L-Leucinrests dar. Dazu wurde in Analogie zu den Substraten Z-Phe-Arg-AMC und Z-Arg-Arg-AMC der Proteasen der Papain-Familie der D-Prolinrest gegen D-Orn(Boc) (**CS34**) und D-Arg(NO₂) (**CS35**) substituiert (Tab. 7-4). **CS34** und **CS35** riefen weder eine Hemmung von Cruzain noch von Falcipain-2 hervor.

Tab. 7-4: K_i -Werte von **CS34**, **CS35** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB und Rhodesain.

Boc-(S)-Leu-Caa-(R,R)-Azi(OBn) ₂						
K_i [μM]						
Verb.	Xaa	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rhodesain
CS34	(<i>R</i>)-Orn(Boc)	ni	ni	2.7	1.5	1.6
CS35	(<i>R</i>)-Arg(NO ₂)	ni	5.4	2.2	1.1	1.2

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu\text{M}$

CS34 hemmt selektiv die parasitären Cystein-Proteasen, während **CS35** zusätzlich Cathepsin B hemmt. Beide Verbindungen wirken nicht leishmanizid, jedoch anti-trypanosomal. **CS34** weist dabei einen Selektivitätsindex von 2.9 mit einem IC₅₀-Wert von 42.5 μM an Makrophagen auf. Bei **CS35** beträgt der Selektivitätsindex 4.2 bei einem IC₅₀-Wert > 100 μM an der Makrophagenzelllinie J774.1. Als neue Leitstrukturen für trypanozide Substanzen sind beide Derivate nicht optimal.

Mit dem Ziel der selektiven Hemmung von Cathepsin B über Cathepsin L wurde Verbindung RV034A (Boc-(*S/R*)-Nip-(*S,S*)-Azi(OEt)₂) als Leitstruktur gewählt. RV034A ist der einzige Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitor, der selektiv Cathepsin B ($K_i = 61.1 \mu\text{M}$) und nicht Cathepsin L sowie die Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen Falcipain-2 und Rhodesain inhibiert.^[147] Zur Verbesserung der Hemmwirkung wurden die Ethylesterreste gegen Benzylesterreste ausgetauscht. Zudem ist aus Vorarbeiten bekannt, dass Derivate mit

Benzylesterreste Zellmembranen aufgrund ihrer höheren Lipophilie durchdringen können, wohingegen Diethylester-Derivate dazu nicht in der Lage sind.^[110] Der Aziridinring enthielt dabei entweder (*S,S*)-Konfiguration (**CS36**) oder (*R,R*)-Konfiguration (**CS37**) (Tab. 7-5). Ein weiteres Derivat, bei welchem Nipicotinsäure an einen *trans*-konfigurierten Aziridinring acyliert ist, wurde mit Verbindung **CS38** realisiert. In Anlehnung an Verbindung RV134C (Boc-(*S*)-Leu-(*S/R*)-Nip-(*S,S*)-Azi(OBn)₂)^[105] wurde ein Aziridinylpeptid dargestellt, welches anstelle der Benzylesterreste jeweils einen *para*-Brombenzylesterrest trägt, mit dem Bestreben eine aufgelöste Röntgenstruktur von **CS38** im Komplex mit Rhodesain zu erhalten (Tab. 7-5). Die Bromsubstituenten sollten dabei für eine höhere lokale Elektronendichte sorgen.

Tab. 7-5: K_i -Werte von **CS36**, **CS37** und **CS38** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB, Rhodesain (= Rho) und Cruzain (= Cru); Kon. = Konfiguration am Aziridinring.

Boc-Xaa-(<i>S/R</i>)-Nip-Azi(OR) ₂									
K_i [μ M]									
Verb.	Xaa	Kon.	R	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rho	Cru
CS36	-	<i>S,S</i>	Bn	ni	83.9	1.5	ni	5.5	ni
CS37	-	<i>R,R</i>	Bn	75.9	80.3	1.8	ni	ni	ni
CS38	(<i>S</i>)-Leu	<i>S,S</i>	<i>p</i> -Br-Bn	ni	21.2	0.58	67.0	0.30	7.0

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu$ M

Sowohl **CS36** als auch **CS37** und **CS38** hemmen die Cathepsin-L-ähnliche Protease LmCPB2.8 stark, die Cathepsin-B-ähnliche Protease LmajcatB wird von keiner der drei Verbindungen signifikant inhibiert. **CS38** stellt den bisher aktivsten Inhibitor an Rhodesain dar, allerdings weist die Verbindung auch eine moderate Hemmung an Cathepsin B auf. Mit der Inhibition von Rhodesain korreliert eine sehr gute trypanozide Wirkung ($IC_{50} = 3.7 \mu$ M). Zudem inhibiert **CS38** Cruzain. **CS36** hemmt Rhodesain im Gegensatz zu **CS37**. Keine der Verbindungen wirkt leishmanizid oder trypanozid und keine erwies sich als cytotoxisch an Makrophagen.

Zur Untersuchung der Inhibitoren hinsichtlich ihrer Effekte auf zellulärer Ebene wurden Aziridine mittels D-Biotin oder dem Fluoreszenzfarbstoffs Aminomethylcoumarinessigsäure gelabelt. Ein Derivat von RV122C, **CS39**, wurde mit D-Biotin verknüpft und zum *active-site-labeling* von Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen in Lysaten von *L.-major*-Promastigoten verwendet (Kap. 4.2.1.1.1). Bei den Verbindungen **CS40** und dem literaturbekannten Inhibitor bADA^[105,110] sind der Fluoreszenzfarbstoff und D-Biotin jeweils über einen

Aminohexanspacer an den entsprechenden *trans*-konfigurierten Aziridinring gekuppelt (Tab. 7-6).

Tab. 7-6: K_i -Werte von **CS39**, **CS40** und **bADA** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB, Rhodesain (= Rho), Cruzain (= Cru) und Falcipain-2 (= FP-2); Kon. = Konfiguration am Aziridinring.

R-Azi(OBn) ₂									
K_i [μ M]									
Verb.	R	Kon.	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rho	Cru	FP-2
CS39 (13b-B ^[1])	Bio-(S)-Leu-(R)-Pro	S,S	ni	19.5	33.1	nd	12.1	nd	4.5
CS40	AMCA-Ahx	R,R	1.8	ni	1.3	ni	0.35	0.51	6.8
bADA	Bio-Ahx	S,S	1.4 ^[110]	50.5 ^[105]	ni	2.2	ni ^[147]	ni	6.6 ^[110]

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu$ M; nd = not determined

CS39 konnte als Inhibitor von humanem Cathepsin B, LmCPB2.8, Rhodesain und Falcipain-2 identifiziert werden. Die Ergebnisse an der Cathepsin-B-ähnlichen LmajcatB liegen nicht vor, so dass die Hypothese des *active-site labeling*, dass die Cathepsin-B-ähnliche Protease gehemmt wird, nicht bestätigt werden kann. Diese Testung konnte nicht durchgeführt werden, da weder Reste von **CS39** noch von der Protease LmajcatB vorlagen. Die Fluoreszenzfarbstoff-markierte Verbindung **CS40** ist ein starker Inhibitor von Cathepsin L sowie von den Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen LmCPB2.8, Rhodesain, Cruzain und auch Falcipain-2. Für *In-vitro*-Untersuchungen an Leishmanien und Trypanosomen ist **CS40** allerdings ungeeignet, da keine leishmanizide und trypanozide Wirkung festgestellt werden konnte. Bei keiner nachweisbaren Toxizität an Makrophagen hemmt **CS40** aber das Wachstum von *P. falciparum* mit einem IC_{50} -Wert von 24.9μ M. Neben den bekannten Hemmeigenschaften von bADA konnte zusätzlich zur Inhibition von Cathepsin L, Cathepsin B und Falcipain-2 die Hemmwirkung auf LmajcatB festgestellt werden.

Dockingstudien schlagen verschiedene Bindungsmodi an Cruzain vor, von denen angenommen werden kann, dass sie aufgrund der ähnlichen Beschaffenheit der aktiven Zentren bei anderen Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen ebenso zutreffen. Demnach adressieren zwei relativ große, lipophile Reste die S_2 - und die S_1' -Bindungstaschen, während die anderen Reste weitgehend *solvent exposed* sind und somit nicht nötig für eine gute Affinität sind (Kap. 6.1). Im Fall der Ethylester-Derivate gibt es nur einen hydrophoben Rest, der die S_2 - oder die S_1' -Taschen besetzen kann. Dies erklärt die Inaktivität der Verbindungen an den Proteasen. Bei Betrachtung der Inaktivierungsdaten an der Cathepsin-L-ähnlichen LmCPB2.8 fällt auf, dass die Hemmung stärker wird, je sperriger eine

Aminosäure ist, die anstelle von L-Leucin im Molekül vertreten ist. Auch diese Erkenntnis korreliert mit den Vorschlägen des Dockings.

Die Struktur von LmajcatB ist zu 54 % homolog zu humanem Cathepsin B. Die Substratspezifität entspricht allerdings der von Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen. Eine Studie von Chan *et al.* lieferte aus theoretischen und experimentellen Daten das Resultat, dass Lmajcat P₂-Spezifität von Cathepsin L aufweist, obschon strukturelle Homologie zu Cathepsin B vorliegt. Zurückzuführen ist die Substratspezifität auf eine Veränderung innerhalb der S₂-Tasche. Durch Austausch eines Glutaminsäurerests gegen einen Glycinrest (Gly²³⁴) wird die S₂-Bindungstasche tiefer und hydrophober im Vergleich zu Cathepsin B.^[78] Die aktivsten Verbindungen an LmajcatB sind **CS11–CS14** (Konstitutionsisomere von **CS09**: Boc-Pro-Leu-(S,S)-Azi(OBn)₂), **CS34** (Boc-(S)-Leu-(R)-Orn(Boc)-(R,R)-Azi(OBn)₂) und **CS35** (Boc-(S)-Leu-(R)-Arg(NO₂)-(R,R)-Azi(OBn)₂). Grundsätzlich sind die gleichen Bindungsmodi denkbar, die an Cruzain vorgeschlagen wurden, abhängig von den Konfigurationen der Stereozentren von **CS11–CS14**. Die Verbindungen **CS34** und **CS35** lassen die Vermutung zu, dass der D-Ornithinrest, bzw. der D-Argininrest in eine der beiden hydrophoben Taschen bindet, da Verbindungen mit sterisch weniger anspruchsvollen Resten zu keiner oder einer schlechteren Inhibition der Protease führen.

Im BALB/c-Mausmodell führte die Gebe von RV122C zu einer Verschlimmerung der *L.-major*-Infektion. Zurückzuführen ist dies vermeintlich u. a. auf die Hemmung von murinem Cathepsin L in dendritischen Zellen. Zur Evaluierung der Selektivität und möglicher Nebenwirkungen im Tierversuch wurden einige Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung an Cathepsin S untersucht (Tab. 7-7). Da Cathepsin S vornehmlich in antigen-präsentierenden Zellen exprimiert ist, spielt es eine Rolle bei der Immunantwort des Wirts.^[28]

Tab. 7-7: K_i-Werte von **RV122C**, **CS09**, **CS24** und **CS25** an Cathepsin S; Kon. = Konfiguration am Aziridinring.

Boc-Xaa-(R)-Pro-Azi(OBn)₂			
K_i [μM]			
Verb.	Xaa	Kon.	Cath. S
RV122C	(S)-Leu	S,S	6.3
CS09	(S)-Leu	R,R	23.9
CS24	(S)-Val	R,R	3.5
CS25	(S)-Ile	R,R	10.9

CS09 ist im Vergleich zu RV122C ein schwächerer Inhibitor von Cathepsin S, welches von **CS09** um den Faktor 6 schlechter gehemmt wird als LmCPB2.8. **CS24** zeigt neben hervorragender Hemmung von LmCPB2.8 und Rhodesain die beste Hemmung an

Cathepsin S. **CS25** schließlich weist neben selektiver Hemmung von LmajcatB Hemmung von Cathepsin S im gleichen Bereich auf. Mit Spannung zu erwarten sind die Ergebnisse einer zweiten Tierstudie, bei der in Zukunft die Wirkung von **CS09** *in vivo* eruiert werden soll.

7.2 Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Verbindungen

Der literaturbekannte Inhibitor CLIK-148^[88] ist ein potenter, irreversibler und selektiver Inhibitor von Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen. Ein nucleophiler Angriff des Thiolats der Protease führt durch Ringöffnung des Epoxidrings zur irreversiblen Alkylierung. Zur Untersuchung der zellulären Effekte der Aziridinylpeptide auf *L. major* diente CLIK-148 als Vergleichssubstanz, um zwischen Cathepsin-L- und Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen diskriminieren zu können. Zudem wurde gezeigt, dass CLIK-148 nicht leishmanizid wirkt. Mithilfe eines CLIK-148-Derivats mit (*R,R*)-konfiguriertem Epoxidring (**CS41**) konnte bestätigt werden, dass lediglich Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Verbindungen mit (*S,S*)-konfiguriertem Epoxidring zur Hemmung der Cathepsin-L-ähnlichen Enzyme befähigt sind.^[84]

7.3 Michael-Akzeptor-basierte Verbindungen

Verbindung **CS42** (Boc-(*S*)-Phg-(*R*)- ν Gln(Trt)-OEt, 16b^[3]) wurde ursprünglich als Inhibitor viraler Proteasen konzipiert, konnte jedoch als potenter Rhodesain- und Falcipain-2-Inhibitor identifiziert werden. Daher diente **CS42** als Leitstruktur für Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren parasitärer Cystein-Proteasen. Durch Variation der Konfigurationen und der Schutzgruppen der Seitenkettenamidfunktion des Glutaminrests wurden weitere vinyloge Dipeptidester dargestellt (Tab. 7-8).

Tab. 7-8: K_i -Werte von **CS42**, **CS43**, **CS44** und **CS45** an Cathepsin L, Cathepsin B, LmCPB2.8, LmajcatB, Rhodesain (= Rho), Cruzain (= Cru) und Falcipain-2 (= FP-2).

Boc-Xaa-Caa-OEt									
K_i [μ M]									
Verb.	Xaa	Caa	Cath. L	Cath. B	LmCPB2.8	LmajcatB	Rho	Cru	FP-2
CS42 (16b ^[3])	(<i>S</i>)-Phg	(<i>R</i>)- ν Gln(Trt)	ni	2.4	0.62	ni	0.14 ^[3]	1.4	0.49 ^[3]
CS43	(<i>R</i>)-Phg	(<i>S</i>)- ν Gln(Trt)	3.3	3.4	1.3	2.5	0.43	0.60	20.0
CS44	(<i>S</i>)-Phg	(<i>R</i>)- ν Gln(CHPh ₂)	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
CS45	(<i>S</i>)-Phg	(<i>R</i>)- ν Gln(<i>Pr</i>)	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni

ni = no inhibition, $K_i > 100 \mu$ M; nd = not determined

Neben Rhodesain und Falcipain-2 werden auch Cathepsin B, LmCPB2.8 und Cruzain von **CS42** stark inhibiert. Zudem inhibiert **CS42** die Aspartat-Protease Plamepsin IV mit einem K_i -Wert von 4.8 μM . Neben antiplasmodialer und antitypanosomaler Aktivität weist der vinyloge Dipeptidester antileishmaniale Aktivität und auch Cytotoxizität an der Makrophagenzelllinie J774.1 auf. Durch die Hemmung von humanem Cathepsin B ist die selektive Hemmung parasitärer Cystein-Protease-Inhibitoren nicht gegeben. **CS43** hemmt unspezifisch alle getesteten Enzyme. Weiterhin zeigt **CS43** Wirksamkeit gegen Trypanosomen und Plasmodien sowie Cytotoxizität. Lediglich das Wachstum von Leishmanien wird nicht inhibiert. Die Derivate **CS44** und **CS45**, die im Vergleich zu **CS42** weniger sperrige Schutzgruppen an der Seitenkette des Glutamins tragen, inhibieren keine der getesteten Proteasen. Daher ist die Schlussfolgerung zulässig, dass der Tritylrest essentiell für die Bindung an die aktiven Zentren der Enzyme ist. Interessant ist, dass Verbindung **CS44** *in vitro* wirksam gegen Trypanosomen ist, nicht allerdings gegen Leishmanien, Plasmodien und Makrophagen. Es handelt sich um eine trypanozid wirkende Substanz mit unbekanntem Target und Wirkmechanismus. **CS45** zeigt keine *In-vitro*-Aktivität gegen Erreger und keine Cytotoxizität.

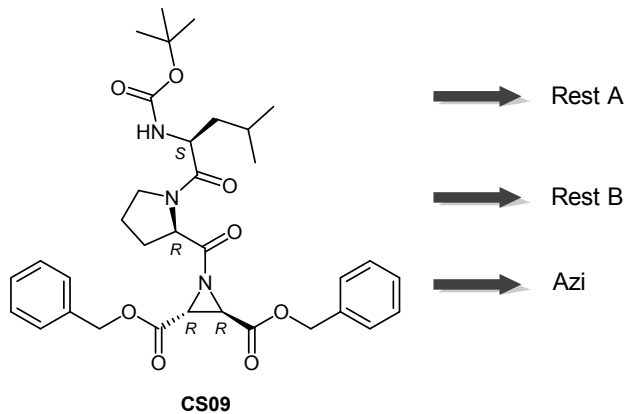
8 Zusammenfassung

Parasitäre Protozoen wie Leishmanien, Trypanosomen und Plasmodien weisen eine Vielzahl von Cystein-Proteasen der Papainfamilie (CAC1) auf, welche als Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren identifiziert werden konnten. Die aktuell eingesetzten Medikamente zur Behandlung der von diesen Parasiten hervorgerufenen Infektionskrankheiten (Leishmaniose, Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas-Krankheit, Malaria) sind aufgrund von Nebenwirkungen, hohen Kosten und sich entwickelnden Resistenzen suboptimal. Die parasitären Cystein-Proteasen stellen daher potentielle Targets zur Entwicklung neuer Therapieansätze dar. Das angestrebte Ergebnis der Entwicklung ist es, selektive Inhibitoren der parasitären Proteasen zu entwickeln, während die Wirt-Proteasen unbeeinflusst bleiben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der literaturbekannten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) und RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) sowie des Michael-Akzeptor-basierten Inhibitors 16a (Boc-(S)-Phg-(S)-vGln(Trt)-OEt) hinsichtlich ihrer selektiven inhibitorischen Aktivität an parasitären Cystein-Proteasen. Bei allen synthetisierten Verbindungen handelt es sich um potenziell irreversible, kovalente und kompetitive Inhibitoren. Der Aziridinring und das Michael-System stellen elektrophile Bausteine dar, die von dem nucleophilen Thiolatrest des aktiven Zentrums einer Cystein-Protease angegriffen werden und in der irreversiblen Alkylierung des aktiven Zentrums resultieren. Die Testung der synthetisierten Verbindungen erfolgte mittels fluorimetrischer und photometrischer Enzymassays. Zur Evaluierung der biologischen Aktivitäten wurden ggf. weitere biologische Testungen durchgeführt.

Die Leitstrukturen RV122C und RV212C der Aziridinylpeptide wurden als Inhibitoren von Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie identifiziert.^[105-108] Eine zweite Serie von Stereo- und Konstitutionsisomeren von RV122C und RV212C brachte ein Derivat hervor, **CS09** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂), welches selektive Inhibition von parasitären Cystein-Proteasen aufwies, ohne humanes Cathepsin L zu hemmen.^[148] Neben leishmanizider Aktivität weisen sowohl RV122C und RV212C als auch **CS09** keine Toxizität an den eingesetzten Zelllinien auf. Daher erfolgte die Fokussierung auf Untersuchungen in *Leishmania major* zur detaillierten Aufklärung zellulärer Effekte *in vitro* und *in vivo*. Der ausgelöste Zelltod wurde als Apoptose-ähnlich charakterisiert, welcher durch unvollständige Verdauung in Lysosom-ähnlichen Vakuolen hervorgerufen wurde.^[1] *In-vivo*-Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass es das Ziel sein muss, Inhibitoren mit Selektivität insbesondere für die Cathepsin-B-ähnliche LmajcatB zu entwickeln. Ausgehend von **CS09** als neue Leitstruktur wurden verschiedene Variationen zur Strukturoptimierung vorgenommen (Tab. 8-1), um im Anschluss Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten zu können.

Tab. 8-1: Strukturvariationen der Leitstruktur CS09.



Rest A	Rest B	Azi

Die Synthese erfolgte mittels Fragmentkupplung der zuvor stereoselektiv dargestellten Aziridin-Bausteine und der durch Standard-Peptidkupplungsreagenzien erhaltenen Amino-

säure-/Peptidbausteine. Die *N*-Acylierung wurde mittels des Kupplungsreagenzes PPA optimiert. Schließlich wurden die Verbindungen an den Cystein-Proteasen Cathepsin L, Cathepsin B, Cathepsin K, Cathepsin S, LmCPB2.8, LmajcatB, Rhodesain, Cruzain und Falcipain-2 auf ihre inhibitorische Aktivität getestet. Weiterhin wurden die Verbindungen im Rahmen der interdisziplinären Zusammenarbeit innerhalb des Sonderforschungsbereichs 630 auf ihre antiparasitäre Aktivität an Leishmanien, Trypanosomen und Plasmodien sowie auf ihre Cytotoxizität an der Makrophagenzelllinie J774.1 getestet. Vertreter dieser Serie erwiesen sich, ebenso wie **CS09**, als selektive Inhibitoren parasitärer, Cathepsin-L-ähnlicher Proteasen (LmCPB2.8, Rhodesain, Cruzain) und der Cathepsin-B-ähnlichen Protease (LmajcatB). Sehr gute Hemmung der Cathepsin-L-ähnlichen Protease LmCPB2.8 riefen Stereo- und Konstitutionsisomere von **CS09** hervor, als auch Derivate, bei denen der Leucinrest gegen andere lipophile Reste mit ähnlichem oder größerem sterischen Anspruch substituiert ist. Die beste Inhibition des Cathepsin-B-ähnlichen Enzyms erfolgte durch Konstitutionsisomere von **CS09** und durch Aziridinylpeptide, deren Prolinrest gegen einen Ornithin- oder einen Argininrest ersetzt wurde. Besonders hervor sticht **CS25** (Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂), sich auszeichnend durch selektive Inhibition der LmajcatB (neben Cathepsin S) bei sehr guter leishmanizider Aktivität. Auch zeigen einige Vertreter selektive Hemmung von Rhodesain und/oder Cruzain. Mithilfe eines synthetisierten Aziridinylpeptids, welches bromierte Benzylesterreste trägt und sehr gute Hemmeigenschaften an parasitären Cystein-Proteasen aufweist (**CS38**), sollte die Kristallisation mit Rhodesain erfolgen, um die erste Röntgenstruktur eines Enzym-Aziridin-Inhibitor-Komplexes zu erhalten. Dieses Ziel konnte jedoch nicht realisiert werden. Aufgrund fehlender Röntgenstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen ist die Bindung der synthetisierten Inhibitoren noch immer spekulativ. Dockingstudien an Cruzain schlagen verschiedene Bindemodi vor, bei denen zwei von drei lipophilen Resten die hydrophoben S₂- und S₁'-Bindungstaschen adressieren. Die Mehrzahl der Aziridin-basierten Verbindungen konnte als leishmanizide und/oder trypanozide Verbindungen identifiziert werden. Mithilfe eines Biotin-markierten Derivats von RV122C (**CS39**) konnte durch *active-site labeling* nachgewiesen werden, dass Cystein-Proteasen von *L.-major*-Promastigoten die Targets des Inhibitors sind. *Active-site-labeling* und Untersuchungen durch Fluoreszenzaktivitätsassays mit *L.-major*-Promastigotenlysaten machten deutlich, dass bei Einsatz von RV122C und RV212C Cathepsin-B-ähnliche Proteasen beeinflusst werden.^[1] **CS09** wies einen anderen Wirkmechanismus – ähnlich dem von E-64 – auf, wie Fluoreszenzaktivitätsassays zeigten. Hinsichtlich der Aufklärung dieser zellulären Effekte und zur Identifizierung weiterer möglicher Targets wurde ein Fluoreszenzfarbstoff-markierter Aziridin-Inhibitor (**CS40**) dargestellt. **CS40** wies hervorragende Hemmeigenschaften an den isolierten Enzymen auf, war jedoch für *In-vitro*-Untersuchungen ungeeignet, da weder leishmanizide noch trypano-

zide Aktivität vorlagen. Durch antiplasmodiale Wirkung ist **CS40** lediglich zu *In-vitro*-Studien an Plasmodien einsetzbar.

Für *In-vitro*-Studien wurde zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren der literaturbekannte, für Cathepsin-L-ähnliche Enzyme selektive, Epoxid-basierte Standardinhibitor CLIK-148^[88] als Vergleichssubstanz dargestellt. Zum Beweis der Inaktivität des Diastereomers von CLIK-148 mit (*R,R*)-konfiguriertem Epoxidring wurde zudem das Derivat **CS41** synthetisiert (Abb. 8-1).

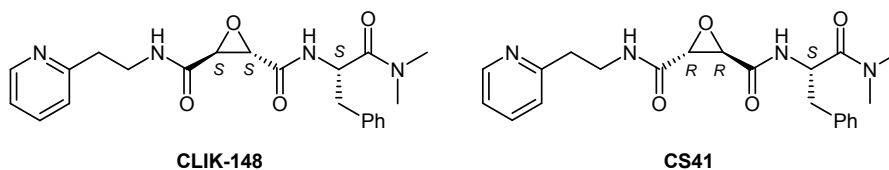


Abb. 8-1: Strukturen von CLIK-148 und **CS41**.

Die Synthese hierzu erfolgte zunächst über die stereoselektive Darstellung der *trans*-konfigurierten Diethyloxiran-2,3-dicarboxylate, die nach Verseifung der Ethylesterfunktionen mittels Peptidkupplungsreagenzien mit den entsprechenden Aminen gekuppelt wurden.

Zur Ableitung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Michael-Akzeptor-basierten Verbindungen wurde die Leitstruktur 16a^[3] durch Variation der Konfigurationen sowie durch Substitution der Trityl-Schutzgruppe der Glutaminseitenkette durch sterisch weniger anspruchsvolle Schutzgruppen verändert (Abb. 8-2). Die Synthese erfolgte ausgehend von der Darstellung des entsprechenden Dipeptids mit Methylesterschutzgruppen. Ausgehend davon wurden die Methylsterreste entweder mit DIBAL zum entsprechenden Aldehyd reduziert oder aus Gründen der Praktikabilität zum entsprechenden Alkohol reduziert, um anschließend in einer Swern-Oxidation den Aldehyd zu liefern. Die Aldehyde wurden im finalen Schritt in einer Masamune-Reaktion mit Triethylphosphonoacetat zu den vinylogenen Dipeptidestern umgesetzt.

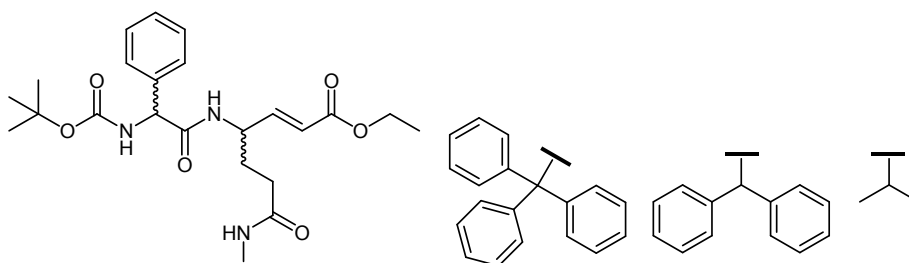


Abb. 8-2: Strukturvariationen der Leitstruktur 16a.

Die Stereoisomere **CS42** und **CS43** mit Tritylresten an der Glutaminseitenkette sind unspezifische, starke Inhibitoren humaner und parasitärer Enzyme. *In vitro* zeigten sie starke

Hemmung des Parasiten-Wachstums als auch Cytotoxizität an Makrophagen. Die Verbindungen ohne Tritylrest (**CS44**, **CS45**) erwiesen sich weder als Proteaseinhibitoren, noch *in vitro* als wirksam.

Ferner wurden mit den synthetisierten Verbindungen in interdisziplinären Kooperationen weitere biologische Testungen durchgeführt. In Selektivitätsstudien an den Aspartat-Proteasen Plasmepsin II und IV erwiesen sich die getesteten *trans*-konfigurierten Aziridin-basierten Inhibitoren als inaktiv, während die Leitstruktur der Michael-Akzeptor-basierten Inhibitoren 16a sowie deren Distereomer **CS42** (= 16b) als Inhibitoren von Plasmepsin IV identifiziert werden konnten. Weder in Testungen an *Plasmodium berghei* infizierten humanen Hepatomzellen in Leberstadien, noch im Blut-Hirn-Schrankenmodell einer *Trypanosoma-brucei-gambiense*-Infektion sowie im *In-vitro*-Screening an *Trichomonas vaginalis* zeigten die jeweils getesteten Verbindungen Aktivität. Allein die Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cystein-Protease-Inhibitoren wiesen Wirksamkeit bezüglich des Wachstums von *Schistosoma mansoni* auf. In einem visuellen Phänotyp-Screening inhibierte eine Vielzahl der getesteten Verbindungen das Wachstum der jungen Form (Schistosomula), im zweiten Schritts des *In-vitro*-Screenings zeigte sich jedoch keine Verbindung aktiv an der adulten Form (Schistosomen) des Parasiten.

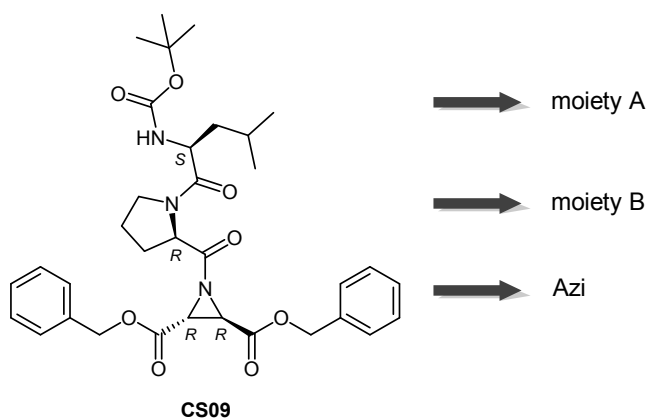
9 Summary

Protozoan parasites contain an abundance of cysteine proteases of the papain family (CAC1), which are essential for parasite growth, differentiation, pathogenicity and virulence. Therefore they are attractive targets for the development of new, affordable, alternative drugs, because current therapy for infectious diseases like leishmaniasis, African trypanosiasis, Chagas disease or malaria is suboptimal due to toxicity of available therapeutic agents and the emergence of drug resistance. Protease inhibitors have to be selective inactivators of parasitic proteases, while not affecting mammalian proteases in order to become an antiparasitic drug.

The main goal of this work was the optimization of the aziridine based inhibitors RV122C (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) and RV212C (Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) and of the Michael acceptor based inhibitor 16a (Boc-(S)-Phg-(S)-vGln(Trt)-OEt), regarding their ability of selective inhibition of parasitic proteases. All synthesized substances are designed as irreversible, covalent, and competitive inhibitors, in which the aziridine ring and the Michael system represent electrophilic building blocks. The reaction of the electrophilic moieties with the nucleophilic thiolate of the active site results in the irreversible alkylation of the protease. The synthesized compounds were subsequently tested in fluorimetric or photometric enzyme assays, in some cases followed by further biological evaluation.

The aziridines RV122C and RV212C could be identified as inhibitors of the cathepsin L subfamily.^[105-108] Starting from RV122C and RV212C as lead structures, a new series containing structural isomers, stereoisomers and derivatives with ethyl esters was synthesized. The most promising candidate of this series was **CS09** (BOC-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂), showing selective inhibition of the parasitic cysteine proteases, while not affecting mammalian cathepsin L.^[148] Besides antileishmanial activity, RV122C and RV212C as well as **CS09** do not exhibit cytotoxicity against host cells. Therefore, in further investigations the mode of action of these inhibitors was characterized in *Leishmania major*. An apoptosis-like cell death was induced, which was caused by incomplete digestion in autophagy-related lysosome-like vacuoles.^[1] *In vivo* a mouse model of *Leishmania* infection showed, that the cathepsin-B-like enzyme LmajcatB should be targeted by the inhibitors in further investigations. Based on **CS09** as a new lead structure, further derivatives were synthesized with structural modifications for structure-activity relationship (SAR) studies (Table 9-1).

Tab. 9-1: Structural variations of the lead structure CS09.



moiety A	moiety B	Azi

The syntheses were achieved via fragment coupling of the prior stereoselectively synthesized aziridine-2,3-dicarboxylates with the appropriate aminoacids/peptids. PPA was

used as coupling reagent of the *N*-acylation. Subsequently the compounds were tested for inhibition of cathepsin L, cathepsin B, cathepsin K, cathepsin S, LmCPB2.8, LmajcatB, rhodesain, cruzain and falcipain-2. Within the Collaborative Research Center 630 of the University of Würzburg the compounds were tested in regard of their antiparasitic activity and cytotoxicity. Compounds out of this series showed selective inhibition of parasitic cathepsin-L-like proteases (LmCPB2.8, rhodesain, cruzain) and cathepsin-B-like proteases (LmajcatB). Best inhibitors of LmCPB2.8 are the structural isomers and stereoisomers of **CS09** and derivatives with other, sterically hindered, lipophilic moieties instead of the leucine moiety. LmajcatB was best inhibited by structural isomers of **CS09** and by derivatives with ornithine or arginine moieties attached to the proline moiety. **CS25** (Boc-(*S*)-Ile-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂) should be highlighted, because of selective inhibition of LmajcatB (besides Cathepsin S) and outstanding antileishmanial activity. Some compounds showed selective inhibition of rhodesain and/or cruzain. In order to obtain the first X-ray structure of an enzyme-aziridine-inhibitor-complex, an aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitor with brominated benzyl esters was synthesized (**CS38**). **CS38** displayed excellent inhibition of cysteine proteases, but the crystallisation with rhodesain failed. Because of missing X-ray structure investigations, the binding mode of the aziridine-based inhibitors is still unclear. Docking studies suggested several binding modes, where three out of two lipophilic residues address the hydrophobic S₂ and the S₁' binding pockets. The majority of the aziridine based inhibitors could be identified as antileishmanial and/or antitrypanosomal agents. As shown by fluorescence proteinase activity assays and active-site labeling in lysates of promastigotes with the biotin-tagged derivate of RV122C, **CS36**, RV122C and RV212C both targeted leishmanial cathepsin-B-like LmajcatB.^[1] By contrast, **CS09** caused a different outcome in fluorescence proteinase activity assays, similar to the outcome observed with E-64. With respect to elucidate further cellular effects and to determine potential further targets via fluorescence microscopy, an aziridine was labeled with a fluorescent dye (**CS40**). **CS40** showed very good inhibition of the cysteine proteases, but was not useful for *in-vitro*-investigations, because of missing antileishmanial and also antitrypanosomal activity. Because of antiplasmodial activity, **CS40** can be used *in vitro* with Plasmodia.

The literature known cathepsin-L-selective, oxirane-based inhibitor CLIK-148^[88] was synthesized in order to use it in comparison to the aziridine-based inhibitors *in vitro*. The derivative of CLIK-148 with (*R,R*)-configured oxirane ring (**CS41**) was also synthesized (Fig. 9-1). As expected from literature data, **CS41** did not show inhibition of any enzyme tested.

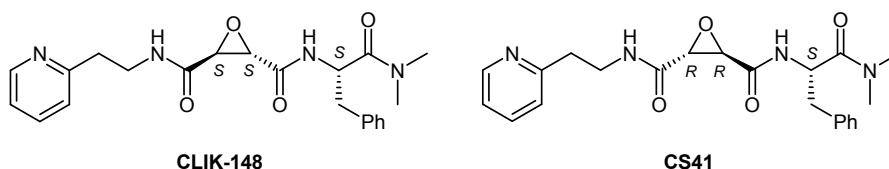


Fig. 9-1: Structures of CLIK-148 und **CS41**.

The *trans*-konfigured diethyl oxirane-2,3-dicarboxylates were stereoselectively synthesized and in the following steps after alkaline hydrolysis brought to reaction with the corresponding amines.

To investigate SAR of Michael acceptor based inhibitors, the lead structure 16a^[3] was modified structurally (Fig. 9-2). Synthesis started with preparing the methyl ester dipeptides via peptide coupling methods. Subsequently the aldehyds were synthesized either via DIBAL reduction directly to the aldehyde or via DIBAL reduction to the alcohol, followed by Swern oxidation to the corresponding aldehyde. The last step led to the products via a Masamune reaction with triethylphosphono acetate.

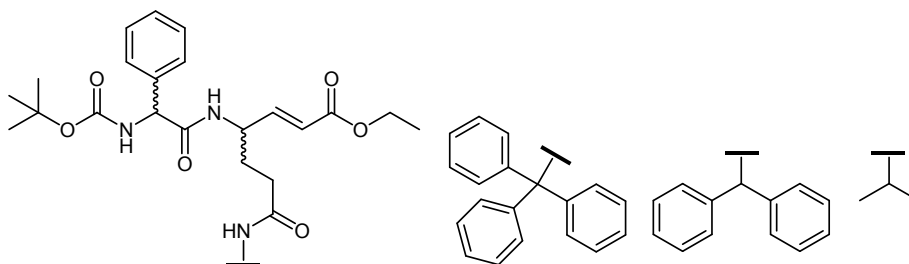


Fig. 9-2: Structural variations of the Michael acceptor based compounds.

Michael acceptors containing a trityl group in the side chain of the glutamine residue are strong and unspecific inhibitors of human and parasitic proteases (**CS42**, **CS43**). Furthermore they are active against parasites *in vitro*, but they are also cytotoxic. Michael acceptors containing a benzhydryl group or an isopropyl group instead of the trityl group didn't show inhibitory potency against the enzymes tested and parasite growth (**CS44**, **CS45**).

Further biological tests were performed with the synthesized compounds. In contrast to the Michael acceptor based compounds **CS42** and **CS43** non of the aziridine based inhibitors showed inhibition of the aspartic proteases plasmepsin II and IV. No activity could be detected in tests concerning liver-stage development of *Plasmodium berghei*, a model of a blood-brain barrier of infection with *Trypanosoma brucei gambiense*, nor in an *in vitro* screening with *Trichomonas vaginalis*. In a phenotypic screening with *Schistosoma mansoni*, aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitors showed inhibition of the juvenile parasites

(schistosomula). In the second step, they were screened *in vitro* against adult parasites, but no inhibitor was active in that assay.

EXPERIMENTALTEIL

10 Allgemeine Vorbemerkungen

10.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden

Säulenchromatographie (SC):

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzung für DC und SC sind in Volumenprozent angegeben. Je nach Trennproblem wurden Säulen verschiedener Durchmesser und Länge verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ bzw. Kieselgel RP C18 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 Ioddampf, *Ehrlich's Reagenz* (Amine) und *Ninhydrin-Lösung* (AS, Peptide).

Analytische bzw. semipräparative HPLC:

Die HPLC-Analytik wurde an einer Anlage der Firma *Varian* des Typs ProStar durchgeführt, bestehend aus einem analytischen/präparativen Linear Upscale HPLC-System (0.05 – 50 ml/min bei 275 bar Gegendruck mit ScaleUp-Mast), einem präparativen Autosampler und einem 2-Kanal UV-Detektor. Die Detektion erfolgte bei 220 nm und bei 254 nm. Die analytische HPLC erfolgte mittels einer Microsorb 60-8 C18 Säule (250 mm × 4.6 mm) mit 60 Å Porengröße und 8 µm Partikelgröße. Bei der präparativen Säule handelte es sich um *Varian Dynamax* (250 mm × 21.4 mm) Microsorb 60-8 C18. Die Methoden der analytischen Analysen sind in Tabelle 1-1 und die der präparativen Analysen in Tabelle 1-2 aufgeführt. Verwendete Fließmittel: A = Millipore-Wasser + 0.1 % Ameisensäure und B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure.

Tab. 10-1: Verwendete Methoden für die analytische HPLC.

	Gradient:	t [min]	B [%]	Flow [ml/min]
Methode I a		0	40	1.5
		30	95	1.5
		40	95	1.5
Methode II a		0	40	1.5

	25	95	1.5
	40	95	1.5
Methode III a	0	40	1.0
	30	60	1.0
	40	80	1.0

Tab. 10-2: Verwendete Methoden für die präparative HPLC.

	Gradient:	t [min]	B [%]	Flow [ml/min]
Methode I p		0	60	7.0
		15	95	7.0
		30	95	7.0
Methode II p		0	80	7.0
		5	95	7.0
		25	95	7.0
Methode III p		0	60	7.0
		15	95	7.0
		35	95	7.0
Methode IV p		0	60	7.0
		15	95	7.0
		25	95	7.0
Methode V p		0	100	7.0
		30	100	7.0
Methode VI p		0	60	7.0
		15	95	7.0
		33	95	7.0
Methode VII p		0	40	31.5
		30	95	31.5
		40	95	31.5
Methode VIII p		0	40	20.0
		30	95	20.0
		40	95	20.0
Methode IX p		0	40	20.0
		35	95	20.0
		40	95	20.0
Methode X p		0	40	8.0
		35	95	8.0
		50	95	8.0
Methode XI p		0	40	8.0
		35	95	8.0
		40	95	8.0

Methode XII p	0	40	7.0
	30	60	7.0
	40	80	7.0
	50	80	7.0

Schmelzpunkte (Smp.):

Die Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare an einem Schmelzpunktgerät FP5 der Firma *Mettler* (Gerät 1, Bezeichnung: Smp.) oder an einem Schmelzpunktgerät SMP3 der Firma *Stuart* (Gerät 2, Bezeichnung: Smp.#) bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Polarimetrie:

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$ wurden an einem Polarimeter des Typs 241 der Firma *Perkin-Elmer* ermittelt (Natrium-D-Linie: $\lambda = 589\text{ nm}$). Die Angabe der Konzentrationen erfolgt in g/100 ml Lösungsmittel.

UV/VIS-Spektroskopie:

Die UV/VIS-Spektren wurden an einem UV/VIS-Spektrophotometer des Typs UV_{mini}-1240 der Firma *Shimadzu* aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie:

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem Fluorimeter des Typs CARY Eclipse der Firma *Varian* mit Küvetteneinsatz aufgenommen.

Massenspektrometrie (LC-ESI-MS):

Die Aufnahmen der ESI-Massenspektren und der LC-MS-Spektren erfolgten an einer *Agilent* 1100 LC/MSD-Trap ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von *Agilent* (Gerät 1, Bezeichnung: ESI-MS). Die Detektion erfolgte bei 215 nm und 254 nm mittels UV-Detektor. Die Kapillarspannung betrug dabei standardmäßig 2.6 kV und als Trockengas diente N₂. Die Verbindungen wurden im positiven oder negativen Modus vermessen. Angegeben werden die bei der LC-MS-Analyse erhaltenen Retentionszeiten (R_t) in min. Die verwendeten Gradienten, der Fluss der Lösungsmittelgemische sowie die verwendeten Säulen sind in Tabelle 1-3 aufgeführt. Verwendete Fließmittel: A = Millipore-Wasser + 0.1 % Ameisensäure und B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure oder Methanol + 0.1 % Ameisensäure.

Tab. 10-3: Verwendete Methoden der LC-MS-Analytik.

		Gradient:	t [min]	B [%]	Flow [ml/min]
Methode I (B = MeOH)	Phenomenex Gemini*		1.0	65	0.3
			10.0	100	0.3
			13.0	100	0.3
			14.5	50	0.45
			15.0	65	0.3
Methode II (B = MeOH)	Phenomenex Gemini*		1.0	50	0.3
			15.0	100	0.3
			18.0	100	0.3
			18.5	30	0.45
			20.0	50	0.3
Methode III (B = MeOH)	Phenomenex Gemini*		5.0	100	0.4
			8.0	100	0.4
			8.1	30	0.6
			9.5	30	0.6
			9.6	60	0.6
			11.0	60	0.4
Methode IV (B = ACN)	Phenomenex Jupiter**		1.0	40	0.3
			4.0	100	0.3
			9.0	100	0.3
			9.2	40	0.3
			16.0	40	0.3
Methode V (B = MeOH)	Phenomenex Gemini*		1.0	30	0.3
			15.0	100	0.3
			18.0	100	0.3
			18.5	10	0.45
			20.0	30	0.3
			20.5	30	0.3

*Phenomenex Gemini 5 μ C18 110³ (150 \times 2.00 mm, 5 micron)

**Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C18 (150 \times 2.00 mm, 4 micron)

Massenspektrometrie (ESI-MS[#]):

Als zweites Gerät zur Aufnahme der ESI-Massenspektren diente ein ESI Micromass LCT-Spektrometer der Firma *Micromass* (Gerät 2, Bezeichnung: ESI-MS[#]).

Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR, ¹³C-NMR):

Die NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer der Firma *Bruker*, Typ Avance 400 bei 300 K aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben und die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der deuterierten Lösungsmittel. Verwendete Lösungsmittel:

- Aceton-d₆: ¹H-Resonanzsignal ($\delta = 2.04$ ppm), ¹³C-Resonanzsignal ($\delta = 29.80$ ppm);
- CDCl₃: ¹H-Resonanzsignal ($\delta = 7.25$ ppm), ¹³C-Resonanzsignal ($\delta = 77.00$ ppm);
- DMSO-d₆: ¹H-Resonanzsignal ($\delta = 2.49$ ppm), ¹³C-Resonanzsignal ($\delta = 39.50$ ppm);
- D₂O: ¹H-Resonanzsignal ($\delta = 4.75$ ppm);
- MeOD: ¹H-Resonanzsignal ($\delta = 3.30$ ppm), ¹³C-Resonanzsignal ($\delta = 49.00$ ppm).

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, dd = Duplett von Duplett, ddd = Duplett von Duplett von Duplett, t = Triplett, dt = Duplett von Triplett, td = Triplett von Duplett, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett, m = Multipllett, b = breit, „dd“ = pseudo-Duplett von Duplett, „t“ = pseudo-Triplett. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte über DEPT135-Spektren und 2D-Korrelationsspektren (COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren). Mit „*“ gekennzeichnete chemische Verschiebungen stellen die chemischen Verschiebungen eines entsprechenden Diastereomers dar, wenn eine dazugehörige Kopplungskonstante J^* angegeben wird. Die Reinheit der Endprodukte wurde, falls nicht explizit erwähnt, mittels ¹H-NMR zu > 95 % bestimmt.

Infrarotspektroskopie (IR):

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte unverdünnt (neat) an einem FT/IR-6100 Spektrometer der Firma JASCO (Gerät 1, Bezeichnung: FT-IR) oder an einem PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer der Firma Bio-Rad (Gerät 2, Bezeichnung: FT-IR[#]) jeweils mittels einer ATR-Einheit. Die angegebenen Werte sind Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm⁻¹. Die Kennzeichnung der Intensitäten erfolgt mit den Abkürzungen w (weak), m (middle) und s (strong).

Hydrogenolyse unter Mikrowelleneinstrahlung:

Die Hydrogenolysen unter Mikrowelleneinstrahlung fanden in einem synthWAVE Microwave Reactor System der Firma MLS GmbH statt.

10.2 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Acros, Alfa Aesar, AllessaChemie, Bachem, Iris Biotech, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Ehrlich's Reagenz: Hellgelbes Sprühreagenz aus 1 g *para*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/Methanol (1:1); Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

Ninhydrin-Lösung: Hellgelbes Sprühreagenz aus 0.3 g Ninhydrin und 3 ml Eisessig in 100 ml *iso*-Propanol; Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

10.3 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt und getrocknet (KOH, Molekularsieb 4Å, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂CO₃). Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmitteln (Natrium, P₄O₁₀, K₂CO₃, KOH, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 3 Å und 4 Å, KOH oder Natrium aufbewahrt. Als Schutzgas wurde Argon verwendet.

10.4 Enzymassays

10.4.1 Fluorimetrische Enzymassays

Die fluorimetrischen Enzymassays wurden an einem Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian* mit einer Mikrotiterplatten-Leseinheit und einem Heizelement bei 25 °C durchgeführt. Es wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc* verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei 380 nm, die Detektionswellenlänge bei 460 nm und es wurde jeweils 5 min im Screening und 10 min im Fall von Verdünnungsreihen gemessen. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 200 µl. Das Screening an den Enzymen erfolgte mit einer Inhibitor-Konzentration von jeweils 20 µM, wobei jede Inhibitor-Konzentration doppelt vermessen wurde. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor. Die Steigung der Geraden (Fluoreszenzzunahme pro Zeit) dieser Messung entspricht 100 % Enzymaktivität. Die Steigungen der Geraden der Messungen mit Inhibitoren (jeweils Doppelbestimmung) entsprechen den Restenzymaktivitäten. Die folgende Tabelle 1-4 fasst die Assaybedingungen der Screenings und der kontinuierlichen Assays zusammen. Verwendete Abkürzungen: E = Enzym gelöst in Enzympuffer, I = Inhibitor gelöst in DMSO, P = Assaypuffer, S = Substrat gelöst in DMSO, [S] = Substratkonzentration im Assay.

Tab. 10-4: Assaybedingungen der Screenings und der Verdünnungsreihen der fluorimetrischen Enzymassays.

	Cathepsin L
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 6.25 µM, K_m = 6.5 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT
Assaypuffer:	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
	Cathepsin B
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 100 µM, K_m = 150 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT
Assaypuffer:	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
	Cathepsin K
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 40.0 µM, K_m = 47.7 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
	Cathepsin S
Substrat:	Z-Val-Val-Arg-AMC · HCl, [S] = 40.0 µM, K_m = 27.1 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5): 50 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.01 % Triton X-100®

Assaypuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5):
Screening:	50 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.01 % Triton X-100 [®] 180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
LmCPB2.8 (aus <i>Leishmania mexicana</i>)	
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 10.0 µM, K_m = 5.0 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH ₂ PO ₄ wfr., 5 mM EDTA, 5 mM DTT; Lösung 2: 50 mM Na ₂ HPO ₄ wfr., 5 mM EDTA, 5 mM DTT
Assaypuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH ₂ PO ₄ wfr., 5 mM EDTA; Lösung 2: 50 mM Na ₂ HPO ₄ wfr., 5 mM EDTA
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
LmajcatB (= CPC, aus <i>Leishmania major</i>)	
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 25.0 µM, K_m = 7.0 µM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH ₂ PO ₄ wfr., 5 mM EDTA, 5 mM DTT; Lösung 2: 50 mM Na ₂ HPO ₄ wfr., 5 mM EDTA, 5 mM DTT
Assaypuffer:	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH ₂ PO ₄ wfr., 5 mM EDTA; Lösung 2: 50 mM Na ₂ HPO ₄ wfr., 5 mM EDTA
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
Rhodesain (aus <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 10.0 µM, K_m = 826.5 nM
Temperatur:	25 °C
Enzympuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl

	Cruzain (aus <i>Trypanosoma cruzi</i>)
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 5.0 µM, K_m = 1.5 µM
Temperatur:	25 °C
Enzypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DTT
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl
	Falcipain-2 (aus <i>Plasmodium falciparum</i>)
Substrat:	Z-Phe-Arg-AMC · HCl, [S] = 25.0 µM, K_m = 21.5 µM
Temperatur:	25 °C
Enzypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DTT
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Screening:	180 µl P, 5 µl E, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl S, Σ 200 µl
Korrekturmessung:	185 µl P, 10 µl DMSO bzw. I (400 µM), 5 µl AMC (40 µM), Σ 200 µl
Verdünnungsreihe:	185 µl P, 5 µl E, 5 µl DMSO bzw. I, 5 µl S, Σ 200 µl

10.4.2 Photometrische Enzymassays

Die photometrischen Enzymassays wurden an einem Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer der Firma *Varian* mit einem 18-Zellen Küvetteneinsatz bei 37 °C durchgeführt. Die Hydrolyse des Substrates wurde spektrophotometrisch bei 300 nm verfolgt. Im Screening betrug die Messzeit 5 min und im Fall von Verdünnungsreihen 10 min. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 250 µl. Das Screening an den Enzymen erfolgte mit einer Inhibitor-Konzentration von jeweils 20 µM, wobei jede Inhibitor-Konzentration doppelt vermessen wurde. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor. Die Steigung der Geraden dieser Messung entspricht 100 % Enzymaktivität. Die Steigungen der Geraden der Messungen mit Inhibitoren (Absorptionsabnahme pro Zeit) entsprechen den Restenzymaktivitäten. Die Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Enzyme wurden zur Aktivierung vorab in Assaypuffer inkubiert. Die Inkubationszeit von Plasmepsin II betrug 3 min bei 37 °C und die von Plasmepsin IV betrug 5 min bei 37 °C. Die folgende Tabelle 1-5 fasst die Assaybedingungen der Screenings und der kontinuierlichen Assays zusammen. Verwendete Abkürzungen: E = Enzym gelöst in Enzypuffer, I = Inhibitor gelöst in DMSO, P = Assaypuffer, S = Substrat gelöst in DMSO, [S] = Substratkonzentration im Assay, W = Wasser.

Tab. 10-5: Assaybedingungen der Screenings und der Verdünnungsreihen der photometrischen Enzymassays.

	Plasmeptin II
Substrat:	Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu (RS6), [S] = 20.0 μ M, K_m = 10.1 μ M
Temperatur:	37 °C
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 4.5): 100 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl
Screening:	125 μ l P, 20 μ l E, 75 μ l W, 10 μ l DMSO bzw. I (500 μ M), 20 μ l S, Σ 250 μ l
Verdünnungsreihe:	125 μ l P, 20 μ l E, 75 μ l W, 10 μ l DMSO bzw. I, 20 μ l S, Σ 250 μ l
	Plasmeptin IV
Substrat:	Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu (RS6), [S] = 20.0 μ M, K_m = 33.1 μ M
Temperatur:	37 °C
Assaypuffer:	Acetat-Puffer (pH 4.5): 100 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl
Screening:	125 μ l P, 2 μ l E, 93 μ l W, 10 μ l DMSO bzw. I (500 μ M), 20 μ l S, Σ 250 μ l
Verdünnungsreihe:	125 μ l P, 2 μ l E, 93 μ l W, 10 μ l DMSO bzw. I, 20 μ l S, Σ 250 μ l

10.4.3 In Enzymassays verwendete Reagenzien

Die verwendeten Enzyme sowie das Substrat sind in Tabelle 1-6 aufgelistet.

Tab. 10-6: Verwendete Enzyme und Substrate.

Cathepsin L (<i>Paramecium tetraurelia</i>)	Calbiochem
Cathepsin B (human)	Calbiochem
Cathepsin K (human)	Enzo Life Sciences
Cathepsin S (human)	Enzo Life Sciences
LmCPB2.8 (<i>Leishmania mexicana</i>)	Prof. Dr. J. Mottram, University of Glasgow, UK
LmajcatB (= CPC , <i>Leishmania major</i>)	U. Dietzel, AK Kisker, Universität Würzburg
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	U. Dietzel, AK Kisker, Universität Würzburg
Cruzain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Dr. P. Selzer, Universität Tübingen
Falcipain-2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	M. Stempka, AK Schirmeister, Universität Würzburg
Plasmeptin II (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Prof. Dr. B. Dunn, University of Florida, USA
Plasmeptin IV (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Prof. Dr. B. Dunn, University of Florida, USA
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem
Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu	Prof. Dr. B. Dunn, University of Florida, USA

11 Allgemeine synthetische Methoden

11.1 Schutzgruppen

11.1.1 Schutzgruppen der Aminofunktion

Methode A1: Einführung der Boc-Schutzgruppe bei Amininen

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids mit freier Aminofunktion und 2.2 Äq. NaHCO_3 werden in einem H_2O /Dioxan-Gemisch gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 1.1 Äq. Boc_2O in Dioxan versetzt. Nach 30 min Rühren bei 0 °C und 3 d Rühren bei RT wird das Reaktionsgemisch mit verd. HCl neutralisiert und 3 × mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Solvens wird i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A2: Entfernung der Boc-Schutzgruppe bei Amininen

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids mit Boc-geschützter Aminfunktion wird in DCM bei 0 °C vorgelegt und langsam mit 10.0 Äq. TFA versetzt. Das Reaktionsgemisch wird zunächst bei 0 °C und anschließend bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Zur azeotropen Entfernung der restlichen TFA wird der Rückstand mehrmals in DCM aufgenommen und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A3: Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe

Zu einer Lösung der der Aminosäure/des Peptids in DMF wird Diethylamin im Überschuss zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 250 ml gekühltem Diethylether aufgenommen, wobei das Produkt beginnt als Feststoff auszufallen. Zur vollständigen Fällung wird das Gemisch über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wird der Feststoff abgesaugt und im Exsikkator getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A4: Entfernung der Cbz-Schutzgruppe

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids wird in Eisessig gelöst und mit HBr in Eisessig (35 %) versetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wird Diethylether zugegeben, wobei das Produkt als Feststoff ausfällt und anschließend abgesaugt wird. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

11.1.2 Schutzgruppen der Carboxylfunktion

Methode A5a: Einführung der Benzylesterschutzgruppe bei Carbonsäuren (säurekatalytisch)

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids mit freier Carboxylfunktion wird mit 1.02 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure und 3.9 Äq. Benzylalkohol in Toluol vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wird mithilfe eines Wasserabscheiders so lange refluxiert, bis kein Wasser mehr entsteht. Nach der Zugabe von Diethylether scheidet sich das Rohprodukt als hellgelbes Öl ab, welches mit Cyclohexan extrahiert wird. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und zur Entfernung des überschüssigen Benzylalkohols wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Methode A5b: Einführung der Benzylesterschutzgruppe bei Carbonsäuren: Steglich-Veresterung

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids mit freier Carboxylfunktion wird mit 1.0 Äq. Benzylalkohol in DCM vorgelegt. Bei 0 °C erfolgt die Zugabe von 1.05 Äq. DCC und 0.1 Äq. DMAP. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C und anschließend 24 h bei RT gerührt. Der ausgefallene farblose *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und der Rückstand wird mit jeweils halbges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode A6a: Entfernung der Benzylesterschutzgruppe von Carbonsäuren

Eine Lösung von 1.0 Äq. Aminosäure/Peptid mit Benzyl-geschützter Carboxylfunktion in Methanol wird mit 50 mg/mmol Pd/C (10 %) (in Spezialfällen wird mehr Pd/C eingesetzt) im Autoklaven versetzt. Nach Spülung des Reaktionsgefäßes mit Argon wird das Reaktionsgemisch unter kräftigem Rühren bei 10–15 bar H₂ hydrogenolysiert. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A6b: Entfernung der Benzylesterschutzgruppe von AMC-Ahx-(S)-Leu-(R)-Leu-OBn

Eine Lösung von 1.0 Äq. AMC-Ahx-(S)-Leu-(R)-Leu-OBn in Ethylacetat wird mit 1.2 Äq. Eisessig und mit 211 mg/mmol Pd/C (10 %) im Autoklaven versetzt. Nach Spülung des Reaktionsgefäßes mit Argon wird das Reaktionsgemisch unter kräftigem Rühren 18 h bei 10 bar H₂ hydrogenolysiert. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A7: Einführung der Methylesterschutzgruppe: Veresterung mittels Methylodid

1.0 Äq. der Aminosäure/des Peptids mit freier Carboxylfunktion wird in Aceton gelöst und mit 2.77 Äq. K_2CO_3 versetzt und zum Aufschlännen 1.5 h bei RT gerührt. Daraufhin werden 0.95 Äq. MeI in Aceton zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 2 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und es werden Ethylacetat und Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wird 2 × mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen werden jeweils 1 × mit halbges. $NaHCO_3$ -Lösung und halbges. NH_4Cl -Lösung und 2 × mit halbges. $NaCl$ -Lösung extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode A8: Entfernung der Ethylesterschutzgruppe: Monohydrolyse des Diethyloxiran-2,3-dicarboxylats mittels Kaliumhydroxid

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. des Diethyloxiran-2,3-dicarboxylats in Ethanol werden bei 0 °C 0.95 Äq. Kaliumhydroxid in Ethanol zugetropft. Nachdem die Reaktionslösung 2 h bei 0 °C gerührt wurde, wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether als farbloser Feststoff ausgefällt und anschließend abfiltriert und i. Vak. getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

11.2 Peptidkupplungen

Methode B1a: Darstellung des Aktivesters mittels DCC/N-Hydroxysuccinimid

1.0 Äq. einer Verbindung mit freier Carboxylfunktion wird in DMF gelöst und mit 1.3 Äq. *N*-Hydroxysuccinimid versetzt. Bei 0 °C wird portionsweise 1.0 Äq. DCC zugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wird das Reaktionsgemisch 2–7 d bei RT gerührt. Im Anschluss wird der ausgefallene farblose *N,N*-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Rückstand wird in Ethylacetat und H_2O aufgenommen. Die wässrige Phase wird 3 × mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden 3 × mit halbges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der entstandene Aktivester kann ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden. Im Falle der Aktivester der 7-Amino-4-methyl-3-coumarin-Derivate wird wegen größerer Verluste auf die wässrige Aufarbeitung verzichtet und der Aktivester wird direkt in DMF weiter umgesetzt.

Methode B1b: Darstellung des Aktivesters von D-Biotin mittels DCC/N-Hydroxysuccinimid

1.0 Äq. D-Biotin wird bei 80 °C in DMF gelöst. Nach dem Abkühlen auf RT werden 1.3 Äq. *N*-Hydroxysuccinimid und 1.0 Äq. DCC zugegeben und es wird 12 h bei RT gerührt. Der

ausgefallene farblose *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rest wird in siedendem *iso*-Propanol aufgenommen. Beim Abkühlen fällt das Produkt als farbloser Feststoff aus, welcher abgesaugt und im Exsikkator getrocknet wird.

Methode B1c: Kupplung mit N-Hydroxysuccinimidaktivestern

1.0 Äq. einer Verbindung mit freier Aminofunktion wird in DMF gelöst und bei 0 °C mit 1.0 Äq. des zuvor hergestellten *N*-Hydroxysuccinimidaktivesters versetzt (bei eingesetzten TFA-Salzen werden 2.0–4.0 Äq. NEt_3 zugegeben). Nach 1 h bei 0 °C und 2–4 d Rühren bei RT werden Chloroform und H_2O zugegeben. Die wässrige Phase wird 3 × mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden 3 × mit H_2O gewaschen. Anschließend wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B1d: Kupplung mit N-Hydroxysuccinimidaktivestern in H_2O /Dioxan

1.0 Äq. einer Aminosäure mit freier Amino- und Carboxylfunktion wird in einem H_2O /Dioxan-Gemisch gelöst und bei RT mit 1.6 Äq. NaHCO_3 und mit 1.0 Äq. des zuvor hergestellten *N*-Hydroxysuccinimidaktivesters versetzt und 6 d bei RT gerührt. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 4 mit verd. HCl wird 3 × mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B2: Kupplung mittels DCC/HOBt

Zu 1.0 Äq. einer *N*-geschützten Aminosäure/Peptid in THF werden bei 0 °C 1.0 Äq. NMM, 1.0 Äq. einer *C*-geschützten Aminosäure/Peptid und 1.0 Äq. HOBt gegeben (im Falle eines Tosylates der *C*-geschützten Verbindung werden 2.0 Äq. NMM zugegeben). Dann werden portionsweise 1.05 Äq. DCC zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur und 24 h bei RT gerührt. Im Anschluss wird der ausgefallene farblose *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat und H_2O aufgenommen. Es wird 3 × mit Ethylacetat extrahiert und jeweils mit halbges. NH_4Cl -, NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B3: Kupplung mittels PyBOP

Zu 1.0 Äq. einer *N*-geschützten Aminosäure/Peptid in DCM werden bei 0 °C 1.0 Äq. DIPEA und 1.0 Äq. einer *C*-geschützten Aminosäure/Peptid gegeben (im Falle eines Tosylates der

C-geschützten Verbindung werden 2.0 Äq. DIPEA zugegeben). Dann werden portionsweise 1.05 Äq. PyBOP zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur und 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O wird die wässrige Phase mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden jeweils mit halbges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B4: Kupplung mittels HBTU

Zu 1.0 Äq. einer N-geschützten Aminosäure/Peptid in ACN werden bei 0 °C 1.0 Äq. NEt₃ und 1.0 Äq. einer C-geschützten Aminosäure/Peptid gegeben (im Falle eines Tosylates der C-geschützten Verbindung werden 2.0 Äq. NEt₃ zugegeben). Dann werden portionsweise 1.04 Äq. HBTU zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur und 24 h bei RT gerührt. Daraufhin wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand wird in Ethylacetat und H₂O aufgenommen. Es wird 3 × mit Ethylacetat extrahiert und jeweils mit halbges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B5a: Kupplung mittels PPA

Zu 1.0 Äq. einer N-geschützten Aminosäure/Peptid in Ethylacetat oder DMF werden bei 0 °C 1.0 Äq. NMM oder NEt₃ und 1.0 Äq. einer C-geschützten Aminosäure/Peptid gegeben (im Falle eines Tosylates der C-geschützten Verbindung werden 2.0 Äq. Base zugegeben). Dann werden 3.0–4.0 Äq. PPA (50 % in DMF oder Ethylacetat) zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur und 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat und H₂O wird die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden jeweils mit halbges. NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Methode B5b: Kupplung mittels PPA zur Darstellung der N-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylate

1.0 Äq. Aziridin-2,3-dicarboxylat und 1.0–1.5 Äq. einer Aminosäure/eines Peptid mit freier Carboxylfunktion werden in Ethylacetat vorgelegt. Bei 0 °C werden 2.0–4.0 Äq. PPA (50 % in Ethylacetat) zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur und 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat und H₂O wird die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden 3 × mit halbges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt.

Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie und anschließender präparativer HPLC gereinigt.

Methode B5c: Kupplung mittels PPA zur Darstellung des N-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylats Boc-(S)-Leu-(S/R)-Nip-(S,S)-Azi(pBrBn)₂

Zu 1.0 Äq. (2S,3S)-Bis(4-bromobenzyl)aziridin-2,3-dicarboxylat werden in Ethylacetat bei 0 °C 2.0 Äq. NEt₃ und 1.25 Äq. Boc-(S)-Leu-(S/R)-Nip-OH gegeben. Dann werden 2.0 Äq. PPA (50 % in Ethylacetat) zugegeben, es wird 1 h bei dieser Temperatur, 4 h bei 40 °C und weitere 7 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat und H₂O wird die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden 3 × mit halbges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie und anschließender präparativer HPLC gereinigt.

11.3 Darstellung von *trans*-konfigurierten Aziridinen: Aziridin-2,3-dicarboxylat

Methode C1: Darstellung von Dibenzytartrat

1.0 Äq. Weinsäure werden mit 2.5 Äq. Benzylalkohol und 0.1 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure in Benzol vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wird mithilfe eines Wasserabscheiders so lange refluxiert, bis kein Wasser mehr entsteht. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wird in Cyclohexan gegossen, wobei das Produkt als farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Methode C2: Darstellung des Dioxathiolans aus Dibenzytartrat

1.0 Äq. Dibenzytartrat wird in DCM im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.0268 Äq. DMF_{abs} versetzt. Unter Rühren werden 1.1 Äq. Thionylchlorid langsam zugetropft. Durch die Reaktionsmischung wird zur Entfernung der entstehenden Salzsäure Stickstoff geleitet. Nach 1 h wird das Eisbad entfernt und die grüne Lösung wird 2 h bei RT und anschließend 1 h bei 50 °C gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid und das Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Das zähflüssige Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode C3: Darstellung des Azidoalkohols aus dem Dioxathiolan

Es werden 1.0 Äq. des Dioxathiolans und 2.0 Äq. Natriumazid in DMF_{abs} suspendiert, wobei eine Rotfärbung zu beobachten ist. Das Reaktionsgemisch wird 20 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende werden Ethylacetat und Wasser im Verhältnis 2:1 zugegeben und es wird erneut bei RT gerührt. Nach 60 h wird die wässrige Phase 3 × mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen 3 × mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über

Na₂SO₄ getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wird der orange-gelbe Azidoalkohol erhalten, welcher mittels Säulenchromatographie gereinigt wird.

Methode C4: Darstellung des Aziridin-2,3-dicarboxalats aus dem Azidoalkohol: Staudinger-Reaktion

1.0 Äq. des Azidoalkohols wird in DMF_{abs} gelöst, auf 0 °C abgekühlt und in kleinen Portionen mit insgesamt 1.1 Äq. Triphenylphosphan versetzt. Die Reaktionsmischung wird zunächst 30 min bei 0 °C, anschließend 3 h bei RT und schließlich 4.5 h bei 90 °C gerührt (N₂-Entwicklung). Nach Erreichen des Reaktionsendes wird Ethylacetat zugegeben und mit halbges. NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird 3 × mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen 3 × mit halbgesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nachdem die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet wurde, wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das erhaltene dunkelbraune, zähflüssige Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

11.4 Darstellung von *trans*-konfigurierten Epoxiden: Diethyloxiran-2,3-dicarboxylat

Methode D1: Darstellung des Diethyl-2-bromo-3-hydroxysuccinats

Diethyltartrat wird bei 0 °C vorgelegt und tropfenweise mit einer Lösung von HBr in Eisessig (~ 33 %) versetzt. Die Reaktionslösung wird 15 min bei 0 °C und 4 h bei RT gerührt und anschließend in H₂O gegeben. Die wässrige Phase wird 4 × mit Diethylether, die vereinigten organischen Phasen werden 1 × mit ges. NaCl-Lösung und 2 × mit H₂O extrahiert. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Ethanol aufgenommen und erneut mit HBr in Eisessig (~ 33 %) versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch 5 h unter Rückfluss erhitzt wurde, wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methode D2: Darstellung des Diethyloxiran-2,3-dicarboxylats

Bei 0 °C wird Diethyl-2-bromo-3-hydroxysuccinat in Aceton vorgelegt und mit K₂CO₃ versetzt, bis die Reaktionslösung basisch reagiert. Nach 2 h Rühren bei RT wird der Rückstand abfiltriert und das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt. Es wird Ethylacetat und H₂O zugegeben, die wässrige Phase wird 2 × mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Zur Aufreinigung wird der Rückstand einer Destillation unterzogen.

11.5 Darstellung von α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

Methode E1: Reduktion vom Methylester zum Aldehyd mittels DIBAL

1.0 Äq. des Methylesters wird in DCM_{abs} gelöst. Unter Argonatmosphäre werden bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ über ein Septum langsam 10.0 Äq. DIBAL (1.0 M in Cyclohexan) zugetropft. Nach 7 h Rühren bei dieser Temperatur wird die Reaktion durch Zugabe von Methanol gequencht und das Reaktionsgemisch wird auf RT erwärmt. Anschließend werden gesättigte K-Na-Tartrat-Lösung sowie Ethylacetat zugefügt und das Gemisch wird 30 min gerührt bis wieder eine klare Lösung entsteht. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase 5 \times mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen jeweils 1 \times mit halbges. NaHCO_3^- , NH_4Cl - und NaCl -Lösung extrahiert. Der Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 schließt sich die Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. an. Der erhaltene, instabile Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung nach $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Untersuchung weiter umgesetzt.

Methode E2: Reduktion vom Methylester zum Alkohol mittels DIBAL

1.0 Äq. des Methylesters wird in THF_{abs} gelöst. Unter Argonatmosphäre werden bei $-12\text{ }^\circ\text{C}$ über ein Septum langsam 3.0 Äq. DIBAL (1.0 M in Hexan) zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wird das Reaktionsgemisch auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und 3 h gerührt. Durch Zugabe von Methanol wird die Reaktion gequencht, das Reaktionsgemisch wird in ges. K-Na-Tartrat-Lösung gegossen und nach Zugabe von H_2O und Ethylacetat wird 30 min kräftig gerührt bis eine klare Lösung vorliegt. Im Anschluss wird die wässrige Phase 3 \times mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit jeweils halbges. NaHCO_3^- , NH_4Cl - und NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.

Methode E3: Oxidation vom Alkohol zum Aldehyd: Swern-Oxidation

1.25 Äq. Oxalylchlorid werden bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in DCM_{abs} vorgelegt. Unter Argonatmosphäre werden über ein Septum langsam 2.5 Äq. DMSO_{abs} zugetropft und das Reaktionsgemisch wird 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird langsam 1.0 Äq. des Alkohols in THF_{abs} zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h gerührt wurde, werden 3.75 Äq. NEt_3 zugegeben und es wird weitere 30 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und 1.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von H_2O gequencht, wobei die hellgelbe, trübe Lösung klar wird. Nach Zugabe von Ethylacetat und H_2O wird die wässrige Phase 3 \times mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden jeweils mit halbges. NH_4Cl -, NaHCO_3^- und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das

Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der erhaltene, instabile Aldehyd wird ohne weitere Aufreinigung nach $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Untersuchung weiter umgesetzt.

Methode E4: Masamune-Reaktion vom Aldehyd zum Michael-System

Unter Argon-Atmosphäre werden 1.2 Äq. LiCl zunächst i. Vak. getrocknet und dann bei RT in ACN_{abs} suspendiert. Anschließend werden 1.2 Äq. Phosphonoessigsäuretriethylester, 1.0 Äq. DBU sowie 1.0 Äq. des zuvor synthetisierten Aldehyds in ACN_{abs} zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 4 d bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird zunächst NaCl-Lösung zugegeben, die wässrige Phase wird 5 × mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen je 1 × mit halbges. NaHCO_3 -Lösung, NH_4Cl - und NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Produkt wird mittels Säulenchromatographie und präparativer HPLC gereinigt.

11.6 Diverse Synthesen

Methode F1: Acetylierung mittels Acetylchlorid

1.0 Äq. 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat wird in DMF vorgelegt und bei 0 °C erfolgt langsam die Zugabe von 1.1 Äq. Acetylchlorid. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C und 3 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat und H_2O wird die wässrige Phase 3 × mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden 3 × mit halbges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung sauber erhalten.

Methode F2: Hydrogenolyse von Nicotinsäure in der Mikrowelle

Eine Lösung von 1.0 Äq. Nicotinsäure in Essigsäure (0.25 mol/l) wird mit 0.1 Äq. PtO_2 versetzt. Das Reaktionsgemisch wird im synthWAVE Microwave Reactor System unter kräftigem Rühren 3 h bei 40 bar H_2 bei 180 °C hydrogenolysiert. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

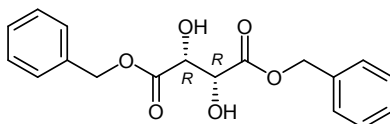
12 Synthetisierte Verbindungen

12.1 Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren

12.1.1 Aziridin-2,3-dicarboxylate

12.1.1.1 Dibenzylaziridin-(2S,3S)-dicarboxylat

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-2,3-dihydroxysuccinat



Methode: C1.

Ansatz: 25.0 g, 167 mmol (1.0 Äq.) (2*R*,3*R*)-Weinsäure;
45.0 g, 416 mmol (2.5 Äq.) Benzylalkohol;
3.17 g, 16.7 mmol (0.1 Äq.) *p*TsOH · H₂O;
100 ml Benzol, Reaktionszeit: 12 h refluxieren.

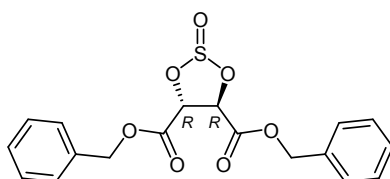
R_f: 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 43.7 g, 132 mmol, 79 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.30 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.29, 5.25 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²*J* = 12.05 Hz), 4.60 (s, 2H, 2 × CHOH), 3.13 (bs, 2H, 2 × OH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[137]

(4*R*,5*R*)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat



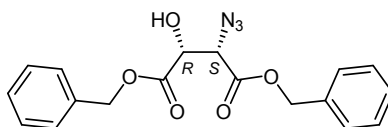
Methode: C2.

Ansatz: 36.0 g, 109 mmol (1.0 Äq.) (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-2,3-dihydroxysuccinat;
14.3 g, 120 mmol, 8.75 ml (1.1 Äq.) Thionylchlorid;
210 mg, 2.92 mmol, 220 µl (0.0268 Äq.) DMF;
50 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h refluxieren.

Ausbeute: Quantitativ, 41.0 g, 109 mmol, 100 %, hellbraune hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.42–7.31 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.76 (d, 1H, CH, ³*J* = 4.40 Hz), 5.30–5.24 (m, 5H, 2 × CO₂CH₂Ph, CH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

(2*S*,3*R*)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat

Methode: C3.

Ansatz: 41.0 g, 109 mmol (1.0 Äq.) (4*R*,5*R*)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat;
14.2 g, 218 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid;
80 ml DMF, Reaktionszeit: 20 h RT, Zugabe von 200 ml Ethylacetat und 100 ml H₂O, 60 h RT.

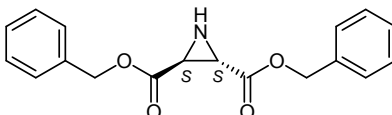
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

R_f: 0.49 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 22.5 g, 63.3 mmol, 58 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.39–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.16–5.01 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.67 (d, 1H, N-CH, ³J = 2.70 Hz), 4.36 (d, 1H, O-CH, ³J = 2.70 Hz), 3.27 (bs, 1H, OH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

Dibenzylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat

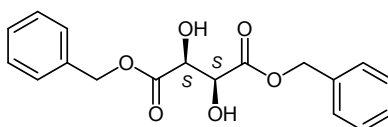
Methode: C4.

Ansatz: 22.4 g, 63.0 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*R*)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat
29.7 g, 113 mmol (1.8 Äq.) Triphenylphosphan;
30 ml DMF, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 2.5 h RT, 4 h 90 °C.

Ausbeute: 678 mg, 2.18 mmol, 3 %, hellgelber Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.32 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.22, 5.16 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.25 Hz), 2.94 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 1.76 (bs, 1H, NH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

12.1.1.2 Dibenzylaziridin-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat**(2*S*,3*S*)-Dibenzyl-2,3-dihydroxysuccinat**

Methode: C1.

Ansatz: 25.0 g, 167 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*S*)-Weinsäure;
45.0 g, 416 mmol (2.5 Äq.) Benzylalkohol;
3.17 g, 16.7 mmol (0.1 Äq.) *p*TsOH · H₂O;
100 ml Benzol, Reaktionszeit: 12 h refluxieren.

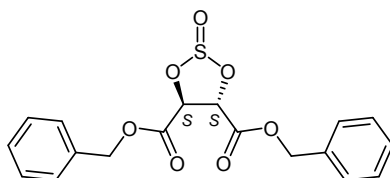
R_f: 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 53.2 g, 161 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.29, 5.25 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.15 Hz), 4.60 (d, 2H, 2 × CHOH, ³J = 6.40 Hz), 3.14 (d, 2H, 2 × OH, ³J = 6.40 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[137]

(4*S*,5*S*)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat



Methode: C2.

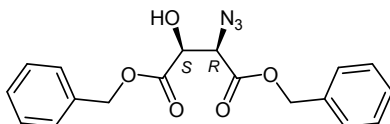
Ansatz: 53.2 g, 161 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*S*)-Dibenzyl-2,3-dihydroxysuccinat;
21.1 g, 177.1 mmol, 12.9 ml (1.1 Äq.) Thionylchlorid;
320 mg, 4.31 mmol, 340 µl (0.0268 Äq.) DMF;
100 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h refluxieren.

Ausbeute: Quantitativ, 60.6.0 g, 161 mmol, 100 %, hellbraune hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.31 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.76 (d, 1H, CH, ³J = 4.30 Hz), 5.31–5.22 (m, 5H, 2 × CO₂CH₂Ph, CH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

(2*S*,3*R*)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat



Methode: C3.

Ansatz: 60.6 g, 161 mmol (1.0 Äq.) (4*S*,5*S*)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat;
20.9 g, 322 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid;
80 ml DMF, Reaktionszeit: 20 h RT, Zugabe von 200 ml Ethylacetat und 100 ml H₂O, 60 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

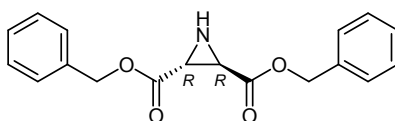
R_f: 0.55 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 38.0 g, 107 mmol, 66 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.23 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.16–5.00 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.67 (bs, 1H, N-CH), 4.36 (d, 1H, O-CH, ³J = 2.70 Hz), 3.27 (bs, 1H, OH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

Dibenzylaziridin-(2S,3S)-dicarboxylat



Methode: C4.

Ansatz: 10.0 g, 28.0 mmol (1.0 Äq.) (2S,3R)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat;
8.11 g, 30.9 mmol (1.1 Äq.) Triphenylphosphan;
40 ml DMF, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 h RT, 4.5 h 90 °C.

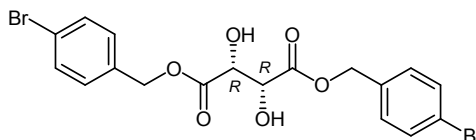
Ausbeute: 2.35 g, 7.56 mmol, 26 %, hellgelber Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.31 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.22, 5.16 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.20 Hz), 2.94 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 1.78 (bs, 1H, NH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[138]

12.1.1.3 (2S,3S)-Bis(4-bromobenzyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

(2R,3R)-Bis(4-bromobenzyl)-2,3-dihydroxysuccinat



Methode: C1.

Ansatz: 16.0 g, 107 mmol (1.0 Äq.) (2R,3R)-Weinsäure;
50.0 g, 267 mmol (2.5 Äq.) *para*-Brombenzylalkohol;
2.03 g, 10.7 mmol (0.1 Äq.) *p*TsOH · H₂O;
100 ml Benzol, Reaktionszeit: 10 h refluxieren.

Ausbeute: 47.4 g, 97.2 mmol, 90 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 152.2 °C.

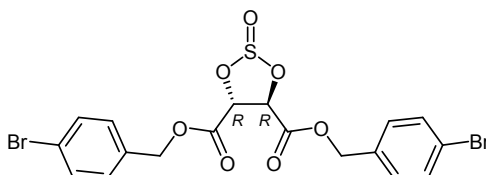
[α]_D^{20 °C}: –8.8 ° (c = 1.14, CHCl₃).

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.54 (d, 4H, 4 × Ph-ortho-CH, ³J = 8.35 Hz),

7.34 (d, 4H, 4 × Ph-*meta*-CH, $^3J = 8.35$ Hz), 5.68 (bs, 2H, 2 × OH), 5.13 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂), 4.55 (s, 2H, 2 × CHOH).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.07 (2 × CO₂), 135.38 (2 × Ph-C_q-CH₂), 131.28 (4 × Ph-*ortho*-CH), 129.89 (4 × Ph-*meta*-CH), 121.16 (2 × Ph-C_q-Br), 72.54 (2 × CHOH), 65.15 (2 × CO₂CH₂).

(4*R*,5*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-1,3,2-Dioxathiolan-4,5-dicarboxylat-2-oxid



Methode: C2.

Ansatz: 24.7 g, 50.6 mmol (1.0 Äq.) (2*R*,3*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-2,3-dihydroxysuccinat;
6.62 g, 55.7 mmol, 4.06 ml (1.1 Äq.) Thionylchlorid;
0.10 g, 1.36 mmol, 0.11 ml (0.0268 Äq.) DMF;
200 ml DCM, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 2 h RT, 1 h refluxieren.

Ausbeute: Quantitativ, 27.0 g, 50.6 mmol, 100 %, hellgelber Feststoff.

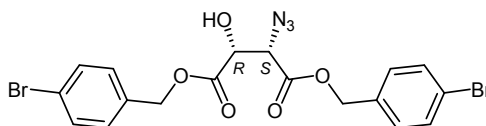
Smp.: 121.2 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -48.7 ° (c = 1.10, CHCl₃).

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.58–7.53 (m, 4H, 4 × Ph-*ortho*-CH), 7.38–7.31 (m, 4H, 4 × Ph-*meta*-CH), 6.05 (d, 1H, CHOSO, $^3J = 3.40$ Hz), 5.94 (d, 1H, CHOSO, $^3J = 3.40$ Hz), 5.29–5.07 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 166.40, 166.30 (2 × CO₂), 134.40 (2 × Ph-C_q-CH₂), 131.37, 131.31 (4 × Ph-*ortho*-CH), 130.30, 130.14 (4 × Ph-*meta*-CH), 121.63 (2 × Ph-C_q-Br), 79.44, 79.27 (2 × CHOSO), 66.82, 66.74 (2 × CO₂CH₂).

(2*S*,3*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-2-azido-3-hydroxysuccinat



Methode: C3.

Ansatz: 27.0 g, 50.6 mmol (1.0 Äq.) (4*R*,5*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-1,3,2-dioxathiolan-4,5-dicarboxylat-2-oxid;
6.58 g, 101 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid;
80 ml DMF, Reaktionszeit: 20 h RT, Zugabe von 200 ml Ethylacetat und 100 ml H₂O, 60 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

R_f: 0.49 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 13.4 g, 26.0 mmol, 51 %, farbloser Feststoff.

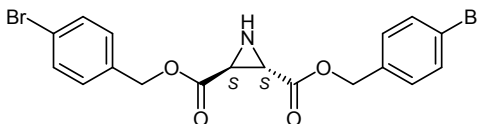
Smp.: 79.3 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +23.7 ° (c = 1.20, MeOH).

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.50–7.40 (m, 4H, 4 × Ph-*ortho*-CH), 7.16–7.09 (m, 4H, 4 × Ph-*meta*-CH), 5.07, 5.02 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂, ²J = 12.75 Hz), 4.67 (dd, 1H, CHOH, ³J = 4.95 Hz, ³J = 2.70 Hz), 4.36 (d, 1H, CHN₃, ³J = 2.70 Hz), 3.29 (d, 1H, OH, ³J = 4.95 Hz).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 170.41 (CO-CHOH), 166.68 (CO-CHN₃), 133.39, 133.21 (2 × Ph-C_q-CH₂), 131.82 (4 × Ph-*ortho*-CH), 130.17 (4 × Ph-*meta*-CH), 122.97, 122.90 (2 × Ph-C_q-Br), 72.01 (CHOH), 67.52, 67.20 (2 × CO₂CH₂), 64.38 (CHN₃).

(2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat



Methode: C4.

Ansatz: 6.0 g, 11.7 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*R*)-Bis(4-bromobenzyl)-2-azido-3-hydroxy-succinat;

3.38 g, 12.9 mmol (1.1 Äq.) Triphenylphosphan;

50 ml DMF, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 4 h RT, 3.5 h 90 °C.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

R_f: 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 499 mg, 1.06 mmol, 9 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 124.8 °C.

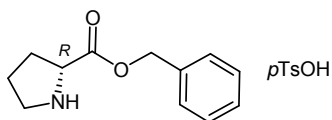
$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +32.1 ° (c = 1.16, CHCl₃).

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.65–7.43 (m, 4H, 4 × Ph-*ortho*-CH), 7.35–7.16 (m, 4H, 4 × Ph-*meta*-CH), 5.29–5.03 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂), 2.91 (bs, 2H, 2 × Azi-CH), 1.90–1.75 (m, 1H, NH).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 170.18, 168.29 (2 × CO₂), 133.98, 133.57 (2 × Ph-C_q-CH₂), 131.88, 131.82, 131.57 (4 × Ph-*ortho*-CH), 130.16, 130.10 (4 × Ph-*meta*-CH), 122.92, 122.69 (2 × Ph-C_q-Br), 67.22, 66.55 (2 × CO₂CH₂), 36.22, 35.29 (2 × Azi-CH).

12.1.2 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-isoleucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS09)

(*R*)-Benzylpyrrolidin-2-carboxylat, (*R*)-Prolinbenzylester, (*R*)-Pro-OBn *p*TsOH



Methode: A5a.

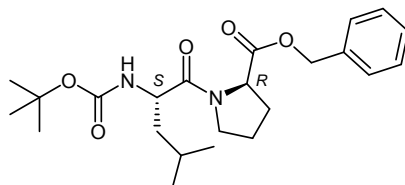
Ansatz: 10.0 g, 86.8 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Prolin;
 16.8 g, 88.5 mmol (1.02 Äq.) *p*TsOH · H₂O;
 36.6 g, 338.5 mmol, 35.2 ml (3.9 Äq.) Benzylalkohol;
 100 ml Toluol, Reaktionszeit: 10 h refluxieren.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1] → Ethylacetat.

Ausbeute: 21.4 g, 56.6 mmol, 65 %, hellgelbe hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.53, 8.78 (je bs, 2H, ⁺NH₂), 7.73 (d, 2H, 2 × Tos-Ph-*ortho*-CH, ³J = 8.10 Hz), 7.35–7.21 (m, 5H, 5 × Ph-CH Pro), 7.12 (d, 2H, 2 × Tos-Ph-*meta*-CH, ³J = 7.90 Hz), 5.16, 5.07 (je d („dd“), 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.20 Hz), 4.60–4.38 (m, 1H, Pro-α CH), 3.60–3.34 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.33 (s, 3H, Tos-CH₃), 2.12–1.77 (m, 4H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucinyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 2.45 g, 10.6 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu;
 4.0 g, 10.6 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · *p*TsOH;
 4.18 g, 11.0 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
 3.16 g, 21.2 mmol, 2.82 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1].

R_f: 0.42 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

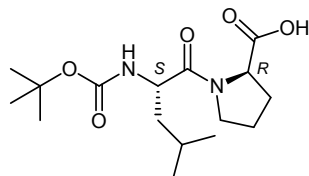
Ausbeute: 2.43 g, 5.79 mmol, 54 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.39–7.26 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.25–5.03 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.61–4.48 (m, 1H, Pro-α CH), 4.48–4.38 (m, 1H, Leu-α CH), 3.89–3.77 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.65–3.39 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.34–1.92 (m, 4H,

Pro- β $\underline{CH_2}$, Pro- γ $\underline{CH_2}$, Leu- γ \underline{CH}), 1.74–1.57 (m, 1H, Pro- γ' $\underline{CH_2}$), 1.57–1.25 (m, 11H, C($\underline{CH_3}$)₃, Leu- β $\underline{CH_2}$), 0.98 (d, 3H, Leu- δ $\underline{CH_3}$, $^3J = 6.50$ Hz), 0.92 (d, 3H, Leu- δ' $\underline{CH_3}$, $^3J = 6.60$ Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[148]

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucinyl-(*R*)-prolin, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

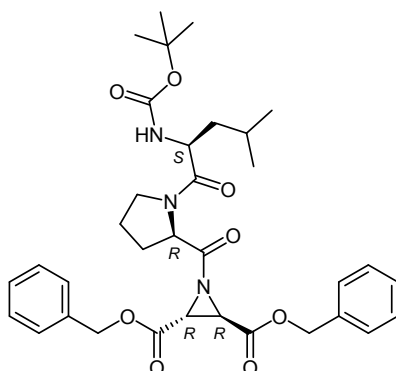
Ansatz: 1.10 g, 2.62 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn;
270 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 2 h 15 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 865 g, 2.62 mmol, 100 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.28 (d, 1H, \underline{NH} , $^3J = 8.80$ Hz), 4.61–4.39 (m, 2H, Pro- α \underline{CH} , Leu- α \underline{CH}), 3.95–3.78 (m, 1H, Pro- δ $\underline{CH_2}$), 3.62–3.36 (m, 1H, Pro- δ' $\underline{CH_2}$), 2.39–2.18 (m, 1H, Pro- β $\underline{CH_2}$), 2.18–1.83 (m, 3H, Pro- β' $\underline{CH_2}$, Pro- γ $\underline{CH_2}$), 1.81–1.59 (m, 1H, Leu- γ \underline{CH}), 1.59–1.46 (m, 1H, Leu- β $\underline{CH_2}$), 1.40 (bs, 10H, C($\underline{CH_3}$)₃, Leu- β' $\underline{CH_2}$), 0.95 (d, 3H, Leu- δ $\underline{CH_3}$, $^3J = 6.40$ Hz), 0.91 (d, 3H, Leu- δ' $\underline{CH_3}$, $^3J = 6.50$ Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[147]

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-isoleucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Ile-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS09**, CS128^{LJ}, CS333^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 1.02 g, 3.09 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
770 mg, 2.47 mmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
4.94 g, 3.14 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);

5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [5/1] → [2/1].

R_f: 0.41 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 25.0 min (Methode I p).

Ausbeute: 102 mg, 164 μmol, 5 %, hellgelber Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: +14.9 ° (c = 0.85, CHCl₃).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, 621.31 [M]; gef.: 622.2 [M+H]⁺, 644.6 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 11.4 min (Methode I).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.42–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.22, 5.17 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.25 Hz), 5.12 (d, 1H, NH, ³J = 9.10 Hz), 4.77–4.65 (m, 1H, Pro-α CH), 4.52–4.39 (m, 1H, Leu-α CH), 3.79–3.67 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.62 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.60–3.51 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.30–2.18 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.18–2.04 (m, 1H, Pro-β' CH₂), 2.04–1.87 (m, 2H, Pro-γ CH₂), 1.84–1.63 (m, 1H, Leu-γ CH), 1.54–1.34 (m, 11H, C(CH₃)₃, Leu-β CH₂), 0.96 (d, 3H, Leu-δ CH₃, ³J = 6.60 Hz), 0.91 (d, 3H, Leu-δ' CH₃, ³J = 6.70 Hz).

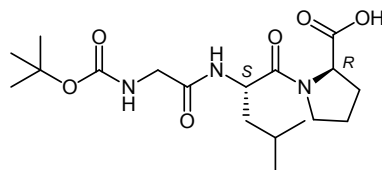
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.23 (NCO Pro), 172.12 (NCO Leu), 165.91 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.63 (CO₂C(CH₃)₃), 134.82 (2 × Ph-C_q), 128.62, 128.52 (10 × Ph-CH), 79.45 (CO₂C(CH₃)₃), 67.84 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.25 (Pro-α CH), 50.19 (Leu-α CH), 46.69 (Pro-δ CH₂), 42.21 (Leu-β CH₂), 40.41 (2 × Azi-CH), 28.66 (Pro-β CH₂), 28.36 (C(CH₃)₃), 24.70 (Pro-γ CH₂), 24.53 (Leu-γ CH), 23.36 (Leu-δ CH₃), 21.74 (Leu-δ' CH₃).

FT-IR[#]: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2959 (w), 1707 (s), 1645 (m), 1499 (w), 1450 (m), 1367 (w), 1325 (w), 1252 (m), 1170 (s), 1123 (m), 1021 (w), 748 (m), 697 (m).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[148]

12.1.3 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS15)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-glycyl-(S)-leucyl-(R)-prolin, Boc-Gly-(S)-Leu-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.26 g, 2.65 mmol (1.0 Äq.) Boc-Gly-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn;
132 mg Pd/C (10 %);

40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.03 g, 2.67 mmol, 100 %, farbloser Feststoff.

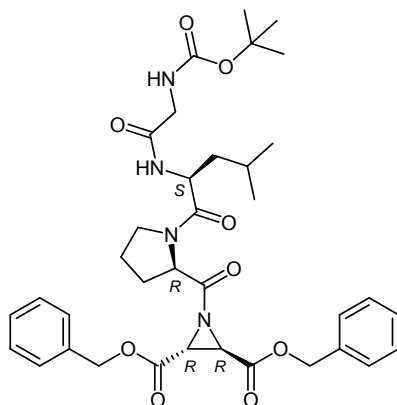
Smp.: 60.5 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +11.3 ° (c = 1.12, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.29 (d, 1H, NH Leu, ³J = 8.00 Hz), 5.64 (s, 1H, NH Gly), 4.97–4.78 (m, 1H, Leu-α CH), 4.43–4.22 (m, 1H, Pro-α CH), 4.20–4.03 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 3.95–3.74 (m, 1H, Gly-α CH₂), 3.71–3.50 (m, 2H, Pro-δ' CH₂, Gly-α CH₂), 2.33–2.06 (m, 3H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂), 2.02–1.89 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.76–1.55 (m, 2H, Leu-γ CH, Leu-β CH₂), 1.55–1.43 (m, 1H, Leu-β' CH₂), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.91 (d, 6H, Leu-δ CH₃, ³J = 6.30 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.49 (CO₂H), 172.38 (NCO Leu), 168.44 (NCO Gly), 156.71 (CO₂C(CH₃)₃), 80.47 (CO₂C(CH₃)₃), 59.63 (Pro-α CH), 48.91 (Leu-α CH), 47.54 (Pro-δ CH₂), 42.83 (Gly-α CH₂), 41.47 (Leu-β CH), 28.90 (Pro-β CH₂), 28.28 (C(CH₃)₃), 24.77 (Pro-γ CH₂), 24.61 (Leu-γ CH), 23.17 (Leu-δ CH₃), 22.02 (Leu-δ' CH₃).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-glycyl-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-Gly-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS15**, CS329^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 464 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-Gly-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;

300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;

1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);

10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [20/1] → [10/1].

R_f: 0.18 (Chloroform/Ethylacetat [1/1]).

HPLC (p): R_t = 19.5 min (Methode I p).

Ausbeute: 208 mg, 306 μmol, 25 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +12.4 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9$, 678.33 [M]; gef.: 679.8 [M+H]⁺.

LC-MS: R_{t} = 15.5 min (Methode II).

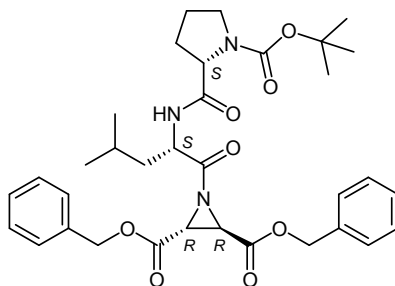
¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.48–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.55 (d, 1H, NH Leu, ³J=8.30 Hz), 5.23–5.18 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 5.12–4.98 (m, 1H, NH Gly), 4.94–4.77 (m, 1H, Leu-α CH), 4.65–4.56 (m, 1H, Pro-α CH), 3.92–3.74 (m, 1H, Gly-α CH₂), 3.74–3.57 (m, 2H, Gly-α' CH₂, Pro-δ CH₂), 3.51 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.48–3.35 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.41–2.13 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.13–1.97 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 1.97–1.80 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.80–1.53 (m, 3H, Pro-β' CH₂, Leu-γ CH, Leu-β CH₂), 1.53–1.45 (m, 1H, Leu-β' CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.98 (d, 3H, Leu-δ CH₃, ³J=6.60 Hz), 0.90 (d, 3H, Leu-δ' CH₃, ³J=6.70 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.49 (NCO Pro), 170.99 (NCO Leu), 168.83 (NCO Gly), 165.59 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.71 (CO₂C(CH₃)₃), 134.64 (2 × Ph-C_q), 128.81, 128.61, 128.47, 126.92 (10 × Ph-CH), 79.92 (CO₂C(CH₃)₃), 68.05 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.71 (Pro-α CH), 48.80 (Leu-α CH), 46.74 (Pro-δ CH₂), 43.94 (Gly-α CH₂), 42.30 (Leu-β CH₂), 39.60 (2 × Azi-CH), 28.94 (Pro-β CH₂), 28.23 (C(CH₃)₃), 24.55 (Leu-γ CH), 24.43 (Pro-γ CH₂), 23.41 (Leu-δ CH₃), 21.96 (Leu-δ' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3302 (w), 3034 (w), 2957 (m), 2929 (w), 2871 (w), 2156 (w), 1968 (w), 1739 (m), 1713 (s), 1674 (m), 1632 (s), 1498 (m), 1453 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1249 (m), 1171 (s), 1125 (m), 1081 (w), 1049 (w), 1025 (w), 946 (w), 909 (w), 864 (w), 750 (m), 697 (m).

12.1.4 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-prolinyl-(S)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS16)

(2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-prolinyl-(S)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OBn)₂ (CS16, CS357^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 395 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(S)-Pro-(S)-Leu-OH;

300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
 1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
 5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] → [2/1].

R_f: 0.47 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 24.9 min (Methode I p).

Ausbeute: 110 mg, 177 μmol , 18 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -37.5 ° (c = 1.16, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, 621.31 [M]; gef.: 620.5 [M-H]⁺, 666.4 [M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 15.9 min (Methode II).

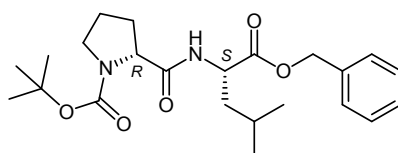
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.23–5.10 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.77–4.54 (m, 1H, Leu- α CH), 4.36–4.14 (m, 1H, Pro- α CH), 3.58 (s, 1H, Azi-CH), 3.53 (s, 1H, Azi-CH), 3.50–3.17 (m, 2H, Pro- δ CH₂), 2.30–1.98 (m, 1H, Pro- β CH₂), 1.98–1.79 (m, 3H, Pro- β' CH₂, Pro- γ CH₂), 1.79–1.65 (m, 1H, Leu- β CH₂), 1.65–1.51 (m, 2H, Leu- β' CH₂, Leu- γ CH), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.02–0.89 (m, 3H, Leu- δ CH₃), 0.89–0.70 (m, 3H, Leu- δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.76 (NCO Leu), 171.58 (NCO Pro), 165.88 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.80 (CO₂C(CH₃)₃), 134.59 (2 × Ph-C_q), 128.72, 128.66, 128.64, 128.61, 128.58, 128.49 (10 × Ph-CH), 80.52 (CO₂C(CH₃)₃), 68.00 (2 × CO₂CH₂Ph), 59.67 (Pro- α CH), 51.80 (Leu- α CH), 47.10, 47.00 (Pro- δ CH₂), 42.91 (Pro- β CH₂), 41.67 (Leu- β CH₂), 40.12, 40.00 (2 × Azi-CH), 29.64 (Pro- γ CH₂), 28.27 (C(CH₃)₃), 24.60 (Leu- γ CH), 23.05, 21.60 (Leu- δ CH₃, Leu- δ' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3364 (w), 3035 (w), 2957 (m), 2931 (m), 2872 (w), 1738 (s), 1683 (s), 1520 (w), 1499 (w), 1455 (w), 1384 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1292 (m), 1260 (m), 1172 (s), 1119 (m), 1025 (w), 978 (w), 909 (w), 850 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.5 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*R*)-prolinyl]-(*S*)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS17)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-prolinyl-(*S*)-leucinbenzylester, Boc-(*R*)-Pro-(*S*)-Leu-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 3.0 g, 13.9 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*R*)-Pro;

5.47 g, 13.9 mmol (1.0 Äq.) (*S*)-Leu-OBn · *p*TsOH;

5.48 g, 14.5 mmol, (1.04 Äq.) HBTU;
 4.15 g, 27.8 mmol, 3.70 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 30 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1] → [5/1].

R_f: 0.47 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

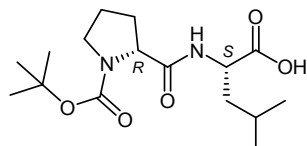
Ausbeute: 2.70 g, 6.44 mmol, 46 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +38.2 ° (c = 1.08, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.32–7.14 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.48–6.27 (m, 1H, NH), 5.07, 4.99 (je d („dd“), 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.45 Hz), 4.70–4.40 (m, 1H, Leu-α CH), 4.30–4.04 (m, 1H, Pro-α CH), 3.45–3.15 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.08–1.87 (m, 1H, Pro-β CH₂), 1.87–1.63 (m, 3H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂), 1.63–1.41 (m, 3H, Leu-β CH₂, Leu-γ CH), 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.82 (bs, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.09 (CO₂CH₂Ph, NCO Pro), 154.40 (CO₂C(CH₃)₃), 135.08 (Ph-C_q), 128.18, 128.15, 127.82 (5 × Ph-CH), 80.02 (CO₂C(CH₃)₃), 66.44 (CO₂CH₂Ph), 60.57 (Pro-α CH), 50.19 (Leu-α CH), 46.71 (Pro-δ CH₂), 40.71 (Leu-β CH₂), 30.78 (Pro-β CH₂), 27.91 (C(CH₃)₃), 26.51 (Pro-γ CH₂), 24.33 (Leu-γ CH), 22.53, 21.44 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-prolinyl-(*S*)-leucin, Boc-(*R*)-Pro-(*S*)-Leu-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 2.0 g, 4.77 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*R*)-Pro-(*S*)-Leu-OBn;
 238 mg Pd/C (10 %);
 40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.37 g, 4.16 mmol, 87 %, dunkelbrauner Feststoff.

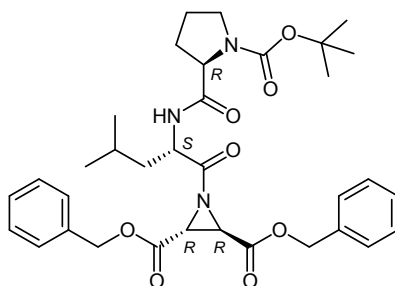
Smp.: 59.7 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +41.5 ° (c = 1.00, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.05–6.83 (bs, 1H, NH), 4.75–4.43 (m, 1H, Leu-α CH), 4.43–4.15 (m, 1H, Pro-α CH), 3.58–3.16 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.31–2.02 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.02–1.75 (m, 3H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂), 1.75–1.49 (m, 3H, Leu-β CH₂, Leu-γ CH), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.04–0.70 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.86 ($\underline{\text{CO}}_2\text{H}$), 172.08 ($\underline{\text{NCO}}$ Pro), 155.18 ($\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80.45 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 60.82 (Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 50.04 (Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 46.76 (Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 41.00 (Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 30.71 (Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 27.91 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 24.71 (Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 24.33 (Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 22.50, 21.41 (Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*R*)-prolinyl]-(*S*)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*R*)-Pro-(*S*)-Leu-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS17**, CS355^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 395 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*R*)-Pro-(*S*)-Leu-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.38 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 24.9 min (Methode I p).

Ausbeute: 124 mg, 199 μmol , 20 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +19.3 ° (c = 0.98, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, 621.31 [M]; gef.: 620.5 [M-H]⁺.

LC-MS: R_t = 16.1 min (Methode II).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.23 (m, 10H, 10 \times Ph- $\underline{\text{CH}}$), 5.18 (s, 4H, 2 \times $\underline{\text{CO}}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.77–4.57 (m, 1H, Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 4.40–4.22 (m, 1H, Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 3.51 (s, 2H, 2 \times Azi- $\underline{\text{CH}}$), 3.48–3.23 (m, 2H, Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 2.37–2.18 (m, 1H, Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.97–1.72 (m, 4H, Pro- β' $\underline{\text{CH}}_2$, Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$, Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.72–1.61 (m, 1H, Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 1.61–1.50 (m, 1H, Leu- β' $\underline{\text{CH}}_2$), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 0.88 (d, 3H, Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J = 6.60$ Hz), 0.85 (d, 3H, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J = 6.30$ Hz).

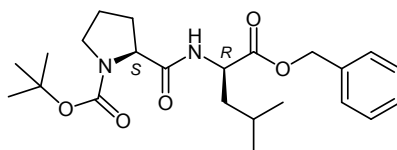
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.05 ($\underline{\text{NCO}}$ Leu), 172.19 ($\underline{\text{NCO}}$ Pro), 165.77 (2 \times $\underline{\text{CO}}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.75 ($\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.55 (2 \times Ph- $\underline{\text{C}}_{\text{q}}$), 128.57, 128.48 (10 \times Ph- $\underline{\text{CH}}$), 80.61 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 68.04 (2 \times $\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$), 60.66 (Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 52.04 (Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 47.16 (Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 40.99 (Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 40.80 (Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 40.22 (2 \times Azi- $\underline{\text{CH}}$), 28.26 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 24.66 (Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 24.35 (Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 22.96,

21.48 (Leu- δ $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3367 (w), 3289 (w), 3064 (w), 3035 (w), 2957 (m), 2931 (w), 2872 (w), 2158 (w), 1975 (w), 1738 (s), 1680 (s), 1520 (w), 1499 (w), 1455 (w), 1385 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1294 (m), 1261 (m), 1172 (s), 1118 (m), 1087 (w), 1024 (w), 979 (w), 908 (w), 850 (w), 775 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.6 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-prolinyl-(*R*)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS18)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-prolinyl-(*R*)-leucinbenzylester, Boc-(*S*)-Pro-(*R*)-Leu-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 0.90 g, 4.19 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Pro;
 1.65 g, 4.19 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Leu-OBn · *p*TsOH;
 1.65 g, 4.36 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
 1.25 g, 8.38 mmol, 1.12 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 5 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1].

R_f: 0.72 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

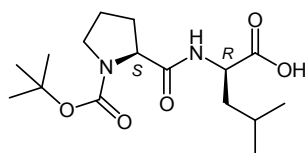
Ausbeute: 1.71 g, 4.07 mmol, 97 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 67.3 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -22.1 ° (c = 1.14, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.26 (m, 5H, 5 × Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 6.46–6.20 (m, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$), 5.14, 5.06 (je d („dd“), 2H, CO₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Ph, ²J = 12.30 Hz), 4.74–4.53 (m, 1H, Leu- α $\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.39–4.10 (m, 1H, Pro- α $\underline{\text{C}}\text{H}$), 3.50–3.19 (m, 2H, Pro- δ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.36–1.92 (m, 2H, Pro- β $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.91–1.71 (m, 2H, Pro- γ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.71–1.58 (m, 2H, Leu- β $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Leu- γ $\underline{\text{C}}\text{H}$), 1.58–1.47 (m, 1H, Leu- β' $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.41 (s, 9H, C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃), 0.88 (m, 6H, Leu- δ $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.46 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 171.74 ($\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\text{O}$ Pro), 154.83 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 135.30 (Ph- $\underline{\text{C}}_{\text{q}}$), 128.48, 128.38 128.29, 128.13 (5 × Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 80.45 (CO₂ $\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 66.89 (CO₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 61.20 (Pro- α $\underline{\text{C}}\text{H}$), 50.45 (Leu- α $\underline{\text{C}}\text{H}$), 47.03 (Pro- δ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 41.24 (Leu- β $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.61 (Pro- β $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.21 (C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃), 24.63 (Pro- γ $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 23.42 (Leu- γ $\underline{\text{C}}\text{H}$), 22.80, 21.54 (Leu- δ $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-prolinyl-(*R*)-leucin, Boc-(*S*)-Pro-(*R*)-Leu-OH

Methode: A6a.

Ansatz: 1.40 g, 3.34 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Pro-(*R*)-Leu-OBn;
167 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.02 g, 3.10 mmol, 92 %, hellgelber Feststoff.

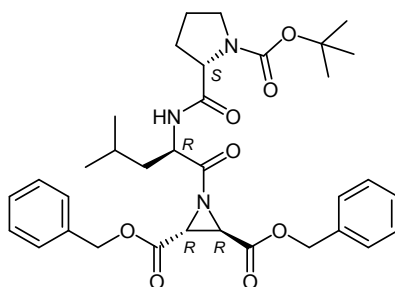
Smp.: 59 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -38.0 ° (c = 1.06, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.88 (bs, CO₂H), 7.20–7.02 (bs, 1H, NH), 4.78–4.53 (m, 1H, Leu-α CH), 4.53–4.20 (m, 1H, Pro-α CH), 3.59–3.25 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.27–1.92 (m, 1H, Pro-β CH₂), 1.92–1.76 (m, 2H, Pro-γ CH₂), 1.76–1.60 (m, 2H, Leu-β CH₂, Leu-γ CH), 1.60–1.49 (m, 1H, Leu-β' CH₂), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.08–0.72 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 175.45 (CO₂H), 172.42 (NCO Pro), 155.79 (CO₂C(CH₃)₃), 80.44 (CO₂C(CH₃)₃), 61.24 (Pro-α CH), 50.26 (Leu-α CH), 47.04 (Pro-δ CH₂), 41.46 (Leu-β CH₂), 31.16 (Pro-β CH₂), 28.26 (C(CH₃)₃), 24.68 (Leu-γ CH), 22.80 (Pro-γ CH₂), 22.95, 21.62 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-prolinyl-(*R*)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Pro-(*R*)-Leu-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS18**, CS367^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 395 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Pro-(*R*)-Leu-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] → [1/1].

R_f: 0.51 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): $R_t = 24.4$ min (Methode I p).

Ausbeute: 144 mg, 232 μmol , 24 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -38.1 ° ($c = 1.08$, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, 621.31 [M]; gef.: 644.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: $R_t = 16.2$ min (Methode II).

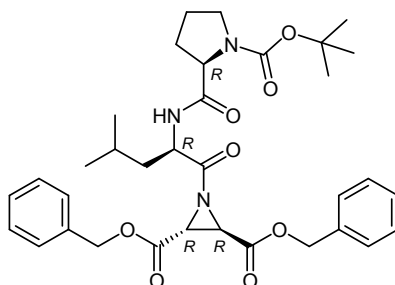
¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.43–7.26 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.23–5.13 (m, 4H, 2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.74–4.55 (m, 1H, Leu- α CH), 4.33–4.12 (m, 1H, Pro- α CH), 3.59 (s, 1H, Azi-CH), 3.53 (s, 1H, Azi-CH), 3.50–3.18 (m, 2H, Pro- δ CH_2), 2.34–2.07 (m, 1H, Pro- β CH_2), 1.96–1.78 (m, 3H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2 , Leu- β CH_2), 1.78–1.64 (m, 1H, Pro- γ' CH_2), 1.64–1.50 (m, 2H, Leu- β' CH_2 , Leu- γ CH), 1.45 (s, 9H, C(CH_3)₃), 1.02–0.90 (m, 3H, Leu- δ CH_3), 0.90–0.76 (m, 3H, Leu- δ' CH_3).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.73 (NCO Leu), 171.50 (NCO Pro), 165.87 (2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 154.88 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.47 (2 × Ph- C_q), 128.71, 128.65, 128.63, 128.60, 128.57 (10 × Ph-CH), 80.49 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.99 (2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.60 (Pro- α CH), 51.78 (Leu- α CH), 47.09 (Pro- δ CH_2), 42.91 (Pro- β CH_2), 41.68 (Leu- β CH_2), 40.12, 39.99 (2 × Azi-CH), 28.26 (C(CH_3)₃), 24.60 (Pro- γ CH_2), 24.53 (Leu- γ CH), 23.05, 21.59 (Leu- δ CH_3 , Leu- δ' CH_3).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3365 (w), 3302 (w), 3035 (w), 2957 (m), 2932 (m), 2872 (w), 2156 (w), 1969 (w), 1738 (s), 1682 (s), 1587 (w), 1518 (w), 1499 (w), 1455 (m), 1383 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1291 (m), 1260 (m), 1173 (s), 1118 (m), 1024 (w), 978 (w), 907 (w), 849 (w), 774 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.7 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-prolinyl-(R)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS19)

(2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-prolinyl-(R)-leucyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-(R,R)-Azi(OBn)₂ (CS19, CS368^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 337 mg, 1.02 mmol (1.05 Äq.) Boc-(R)-Pro-(R)-Leu-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (R,R)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);

5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] → [2/1].

R_f: 0.55 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 24.4 min (Methode I p).

Ausbeute: 46 mg, 74.0 μmol, 7 %, farbloser Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: +17.6° (c = 1.02, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, 621.31 [M]; gef.: 620.4 [M-H]⁺, 644.5 [M+Na]⁺, 666.4 [M+2Na-H]⁺.

LC-MS: R_t = 16.2 min (Methode II).

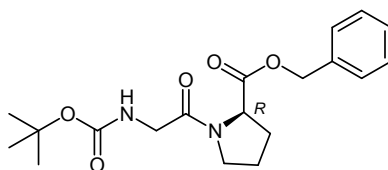
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.27 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.18 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.80–4.58 (m, 1H, Leu-α CH), 4.40–4.22 (m, 1H, Pro-α CH), 3.51 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.49–3.18 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.34–1.96 (m, 1H, Pro-β CH₂), 1.96–1.72 (m, 4H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂, Leu-β CH₂), 1.72–1.61 (m, 1H, Leu-γ CH), 1.61–1.49 (m, 1H, Leu-β' CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.88 (d, 3H, Leu-δ CH₃, ³J = 6.50 Hz), 0.85 (d, 3H, Leu-δ' CH₃, ³J = 6.40 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.76 (NCO Leu), 172.21 (NCO Pro), 165.78 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.72 (CO₂C(CH₃)₃), 134.57 (2 × Ph-C_q), 128.63, 128.59, 128.50 (10 × Ph-CH), 80.64 (CO₂C(CH₃)₃), 68.07 (2 × CO₂CH₂Ph), 61.22 (Pro-α CH), 52.07 (Leu-α CH), 47.19 (Pro-δ CH₂), 41.16 (Pro-β CH₂), 40.99 (Leu-β CH₂), 40.24 (2 × Azi-CH), 29.66 (Pro-γ CH₂), 28.28 (C(CH₃)₃), 24.37 (Leu-γ CH), 22.97, 21.51 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3358 (w), 3294 (w), 3065 (w), 3035 (w), 2956 (m), 2929 (m), 2871 (w), 2354 (w), 2160 (w), 1966 (w), 1738 (s), 1680 (s), 1521 (w), 1499 (w), 1455 (m), 1385 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1260 (m), 1172 (s), 1118 (m), 1025 (w), 979 (w), 908 (w), 850 (w), 775 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.8 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glyciny]-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS20)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-glyciny]-(R)-prolinbenzylester, Boc-Gly-(R)-Pro-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 1.39 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) Boc-Gly;

3.0 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;

3.14 g, 8.27 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
 2.37 g, 15.9 mmol, 2.12 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 30 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform → Chloroform/Ethylacetat [10/1].

R_f: 0.41 (Chloroform/Ethylacetat [3/1]).

Ausbeute: 1.98 g, 5.45 mmol, 68 %, farbloser Feststoff.

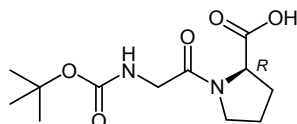
Smp.: 176.4 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +78.0 ° (c = 1.22, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.26 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.41 (bs, 1H, NH), 5.16, 5.11 (je d („dd“), 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.86 Hz), 4.58–4.50 (m, 1H, Pro-α CH), 4.00–3.81 (m, 2H, Gly-α CH₂), 3.65–3.49 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.47–3.34 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.29–2.08 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.08–1.81 (m, 3H, Pro-γ CH₂, Pro-β' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.57 (CO₂CH₂Ph), 167.30 (NCO Gly), 155.69 (CO₂C(CH₃)₃), 135.48 (Ph-C_q), 128.47, 127.95 (5 × Ph-CH), 79.48 (CO₂C(CH₃)₃), 66.81 (CO₂CH₂Ph), 58.87 (Pro-α CH), 45.74 (Pro-δ CH₂), 42.91 (Gly-α CH₂), 28.84 (Pro-β CH₂), 28.24 (C(CH₃)₃), 24.51 (Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-glyciny-(*R*)-prolin, Boc-Gly-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.50 g, 4.14 mmol (1.0 Äq.) Boc-Gly-(*R*)-Pro-OBn;
 430 mg Pd/C (10 %);
 40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

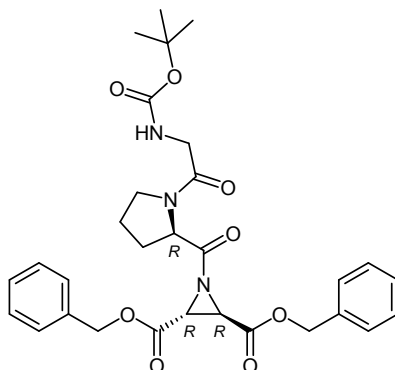
Ausbeute: 1.08 g, 3.98 mmol, 96 %, dunkelbrauner Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +78.8 ° (c = 1.12, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.42 (bs, 1H, NH), 4.71–4.45 (m, 1H, Pro-α CH), 4.18–3.81 (m, 2H, Gly-α CH₂), 3.67–3.30 (m, 2H, Pro-δ CH₂), 2.47–1.75 (m, 4H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂), 1.43 (bs, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.17 (CO₂H), 167.41 (NCO Gly), 155.71 (CO₂C(CH₃)₃), 79.48 (CO₂C(CH₃)₃), 58.72 (Pro-α CH), 45.76 (Pro-δ CH₂), 42.81 (Gly-α CH₂), 28.85 (Pro-β CH₂), 28.13 (C(CH₃)₃), 24.48 (Pro-γ CH₂).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-glyciny]-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat,
Boc-Gly-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS20**, CS349^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 327 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-Gly-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] → Diethylether.

R_f: 0.24 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 19.5 min (Methode I p).

Ausbeute: 125 mg, 221 μ mol, 23 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20 \text{ °C}}$: +19.2 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₀H₃₅N₃O₈, 565.24 [M]; gef.: 566.3 [M+H]⁺, 588.4 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 14.3 min (Methode II).

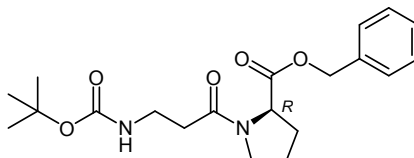
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.46–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.37 (bs, 1H, NH), 5.20 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.72–4.60 (m, 1H, Pro- α CH), 4.00–3.88 (m, 1H, Gly- α CH₂), 3.85–3.71 (m, 1H, Gly- α' CH₂), 3.53 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.51–3.34 (m, 2H, Pro- δ CH₂), 2.30–2.17 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.14–1.77 (m, 3H, Pro- β' CH₂, Pro- γ CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.83 (NCO Pro), 167.75 (NCO Gly), 165.56 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.74 (CO₂C(CH₃)₃), 134.61 (2 × Ph-C_q), 128.67, 128.62 (10 × Ph-CH), 79.56 (CO₂C(CH₃)₃), 68.06 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.70 (Pro- α CH), 45.73 (Pro- δ CH₂), 42.94 (Gly- α CH₂), 39.54 (2 × Azi-CH), 29.18 (Pro- β CH₂), 28.32 (C(CH₃)₃), 24.36 (Pro- γ CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3419 (w), 3034 (w), 2974 (w), 2929 (w), 2360 (w), 2333 (w), 2157 (w), 1968 (w), 1739 (s), 1706 (s), 1654 (s), 1498 (m), 1454 (m), 1431 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1248 (m), 1166 (s), 1127 (m), 1082 (w), 1056 (w), 1025 (w), 910 (w), 862 (w), 781 (w), 748 (m), 697 (m).

12.1.9 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)- β -alanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS21)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)- β -alanyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc- β -Ala-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 1.60 g, 8.46 mmol (1.0 Äq.) Boc- β -Ala;
 3.19 g, 8.46 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · *p*TsOH;
 1.30 g, 4.46 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
 1.84 g, 8.88 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 2.52 g, 16.9 mmol, 2.25 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1].

R_f: 0.27 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

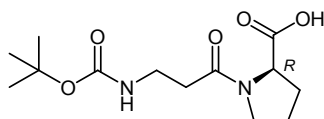
Ausbeute: 1.43 g, 3.81 mmol, 45 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +55.0 ° (c = 1.06, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.33–7.15 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.47 (bs, 1H, NH), 5.12, 5.03 (je d, 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.40 Hz), 4.50–4.38 (m, 1H, Pro- α CH), 3.59–3.43 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.43–3.26 (m, 3H, Pro- δ' CH₂, NCH₂ β -Ala), 2.50–2.34 (m, 2H, CH₂CO β -Ala), 2.22–2.00 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.00–1.80 (m, 3H, Pro- γ CH₂, Pro- β' CH₂), 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.41 (CO₂CH₂Ph), 170.01 (NCO β -Ala), 155.41 (CO₂C(CH₃)₃), 135.18 (Ph-C_q), 128.07, 127.92, 127.50, 127.35 (5 × Ph-CH), 78.16 (CO₂C(CH₃)₃), 66.03 (CO₂CH₂Ph), 58.12 (Pro- α CH), 46.35 (Pro- δ CH₂), 35.57 (NCH₂ β -Ala), 33.89 (CH₂CO β -Ala), 28.53 (Pro- β CH₂), 27.81 (C(CH₃)₃), 24.07 (Pro- γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)- β -alanyl-(*R*)-prolin, Boc- β -Ala-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.10 mg, 2.92 mmol (1.0 Äq.) Boc- β -Ala-(*R*)-Pro-OBn;
 146 mg Pd/C (10 %);

40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

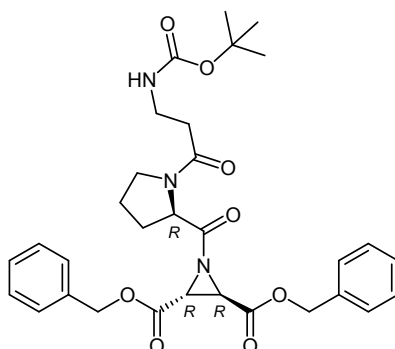
Ausbeute: 0.76 mg, 2.65 mmol, 90 %, brauner Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +43.8 ° (c = 1.16, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.74 (bs, 1H, CO₂H), 5.44 (bs, 1H, NH), 4.62–4.40 (m, 1H, Pro-α CH), 3.66–3.51 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.51–3.24 (m, 3H, Pro-δ' CH₂, NCH₂ β-Ala), 2.70–2.30 (m, 2H, CH₂CO β-Ala), 2.30–1.76 (m, 4H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂), 1.38 (bs, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.74, 171.73 (CO₂H, NCO β-Ala), 155.82 (CO₂C(CH₃)₃), 78.83 (CO₂C(CH₃)₃), 58.84 (Pro-α CH), 47.05 (Pro-δ CH₂), 35.69 (NCH₂ β-Ala), 34.23 (CH₂CO β-Ala), 28.30 (Pro-β CH₂), 28.00 (C(CH₃)₃), 24.23 (Pro-γ CH₂).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-β-alanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-β-Ala-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS21**, CS350^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 344 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-β-Ala-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [2/1] → Diethylether.

R_f: 0.32 (Chloroform/Ethylacetat [2/1]).

HPLC (p): R_t = 19.6 min (Methode I p).

Ausbeute: 309 mg, 533 μmol, 55 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +34.1 ° (c = 1.22, CHCl₃).

ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₇N₃O₈, 579.26 [M]; gef.: 580.3 [M+H]⁺, 602.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 14.5 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.27 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.34 (bs, 1H, NH), 5.22, 5.18 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.09 Hz), 4.72–4.60 (m,

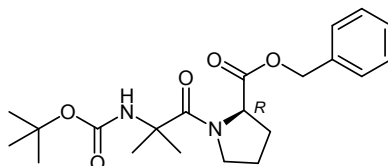
1H, Pro- α \underline{CH}), 3.52 (s, 2H, 2 \times Azi- \underline{CH}), 3.43–3.27 (m, 4H, Pro- δ \underline{CH}_2 , N \underline{CH}_2 β -Ala), 2.47–2.26 (m, 2H, \underline{CH}_2 CO β -Ala), 2.26–2.09 (m, 1H, Pro- β \underline{CH}_2), 2.09–1.77 (m, 3H, Pro- β' \underline{CH}_2 , Pro- γ \underline{CH}_2), 1.41 (s, 9H, C(\underline{CH}_3) $_3$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.06 (N \underline{CO} Pro), 171.01 (N \underline{CO} β -Ala), 165.59 (2 \times $\underline{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.94 ($\underline{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.61 (2 \times Ph- \underline{C}_q), 128.89, 128.63, 128.53 (10 \times Ph- \underline{CH}), 79.93 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.98 (2 \times $\text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 60.32 (Pro- α \underline{CH}), 46.84 (Pro- δ \underline{CH}_2), 39.51 (2 \times Azi- \underline{CH}), 35.94 (N \underline{CH}_2 β -Ala), 34.40 (\underline{CH}_2 CO β -Ala), 29.17 (Pro- β \underline{CH}_2), 28.37 (C(\underline{CH}_3) $_3$), 24.48 (Pro- γ \underline{CH}_2).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3426 (w), 3034 (w), 2875 (w), 2883 (w), 1740 (s), 1702 (s), 1639 (s), 1498 (m), 1433 (m), 1380 (w), 1365 (m), 1324 (m), 1270 (m), 1249 (m), 1168 (s), 1128 (m), 1075 (w), 1001 (w), 969 (w), 909 (w), 862 (w), 781 (w), 750 (m), 697 (m).

12.1.10 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)- α -methylalanyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS22)

N-(tert-Butoxycarbonyl)- α -methylalanyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-Aib-(R)-Pro-OBn



Methode: B3.

Ansatz: 1.62 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) Boc-Aib;
3.0 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn \cdot *p*TsOH;
4.34 g, 8.35 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;
2.06 g, 15.9 mmol, 2.70 ml (2.0 Äq.) DIPEA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1] \rightarrow [4/1].

R_f: 0.42 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 1.43 g, 3.66 mmol, 46 %, farbloser Feststoff.

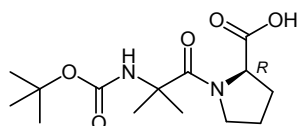
Smp.: 127.7 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +60.6 ° (c = 1.14, MeOH).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.34–7.10 (m, 5H, 5 \times Ph- \underline{CH}), 5.26 (bs, 1H, N \underline{H}), 5.13, 5.00 (je d, 2H, $\text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$, $^2J = 12.30$ Hz), 4.59–4.39 (m, 1H, Pro- α \underline{CH}), 3.78–3.64 (m, 1H, Pro- δ \underline{CH}_2), 3.63–3.49 (m, 1H, Pro- δ' \underline{CH}_2), 2.06–1.87 (m, 2H, Pro- β \underline{CH}_2 , Pro- γ \underline{CH}_2), 1.87–1.70 (m, 2H, Pro- β' \underline{CH}_2 , Pro- γ' \underline{CH}_2), 1.55–1.39 (bs, 3H, Aib- β \underline{CH}_3), 1.39–1.22 (bs, 12H, Aib- β' \underline{CH}_3 , C(\underline{CH}_3) $_3$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.17 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, NCO Aib), 153.70 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 135.63 (Ph-C_q), 128.22, 127.83 ($5 \times \text{Ph-CH}$), 79.03 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.28 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 60.62 ($\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 56.19 ($\text{Aib-}\alpha \text{ C}_q$), 47.61 ($\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 28.04 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.85 ($\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$), 25.65 ($\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$), 24.92 ($\text{Aib-}\beta \text{ CH}_3$), 24.33 ($\text{Aib-}\beta' \text{ CH}_3$).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)- α -methylalanyl-(*R*)-prolin, Boc-Aib-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.15 mg, 2.95 mmol (1.0 Äq.) Boc- β -Aib-(*R*)-Pro-OBn;
147 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H_2 bei RT.

Ausbeute: 869 mg, 2.89 mmol, 98 %, hellbrauner Feststoff.

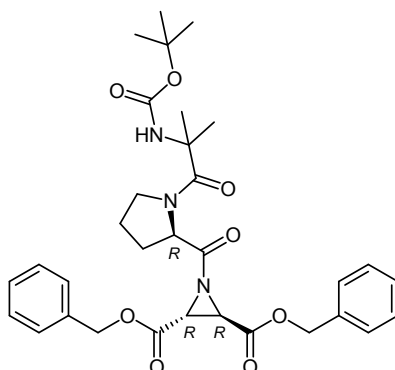
Smp.: 71.9 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +55.0 ° ($c = 1.12$, MeOH).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.21 (bs, 1H, NH), 4.70–4.36 (m, 1H, $\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 3.82–3.54 (m, 1H, $\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 3.54–3.28 (m, 1H, $\text{Pro-}\delta' \text{ CH}_2$), 2.24–1.76 (m, 4H, $\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$, $\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$), 1.66–1.24 (m, 15H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{Aib-}\beta \text{ CH}_3$, $\text{Aib-}\beta' \text{ CH}_3$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.85 (CO_2H), 172.00 (NCO Aib), 154.22 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.92 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 61.07 ($\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 56.27 ($\text{Aib-}\alpha \text{ C}_q$), 47.86 ($\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 27.85 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.13 ($\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$), 25.57 ($\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$), 24.95 ($\text{Aib-}\beta \text{ CH}_3$), 24.62 ($\text{Aib-}\beta' \text{ CH}_3$).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)- α -methylalanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-Aib-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn) $_2$ (**CS22**, CS351^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 360 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-Aib-(*R*)-Pro-OH;

300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
 1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
 5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [2/1] → [1/1].

R_f: 0.33 (Chloroform/Ethylacetat [5/1]).

HPLC (p): R_t = 20.9 min (Methode I p).

Ausbeute: 101 mg, 170 μmol , 17 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -15.4 ° (c = 1.14, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₉N₃O₈, 593.27 [M]; gef.: 594.4 [M+H]⁺, 616.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 14.5 min (Methode II).

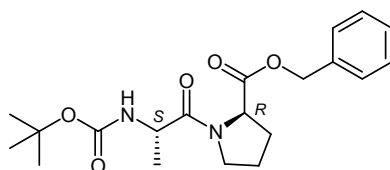
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.44–7.26 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.21, 5.16 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 11.90 Hz), 5.10–4.99 (m, 1H, NH), 4.88–4.65 (m, 1H, Pro- α CH), 3.80–3.58 (m, 4H, Pro- δ CH₂, 2 × Azi-CH), 2.22–2.06 (m, 2H, Pro- β CH₂, Pro- γ CH₂), 2.02–1.83 (m, 1H, Pro- β' CH₂, Pro- γ' CH₂), 1.60–1.47 (bs, 3H, Aib- β CH₃), 1.47–1.33 (bs, 12H, Aib- β' CH₃, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.01 (NCO Pro), 171.88 (NCO Aib), 165.92 (2 × CO₂CH₂Ph), 153.82 (CO₂C(CH₃)₃), 134.92 (2 × Ph-C_q), 128.74, 128.56, 128.50, 128.38 (10 × Ph-CH), 79.54 (CO₂C(CH₃)₃), 67.66 (2 × CO₂CH₂Ph), 62.23 (Pro- α CH), 56.45 (Aib- α C_q), 47.71 (Pro- δ CH₂), 40.15 (2 × Azi-CH), 28.26 (C(CH₃)₃), 27.59 (Pro- β CH₂), 25.67 (Pro- γ CH₂), 25.27 (Aib- β CH₃), 24.74 (Aib- β' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3364 (w), 3034 (w), 2976 (m), 2933 (w), 1969 (w), 1739 (s), 1709 (s), 1632 (m), 1498 (w), 1455 (m), 1392 (m), 1364 (m), 1325 (m), 1270 (m), 1251 (m), 1172 (s), 1126 (m), 1075 (m), 1017 (w), 966 (w), 909 (w), 851 (w), 785 (w), 738 (m), 697 (m).

12.1.11 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)]-(*S*)-alanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS23)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)]-(*S*)-alanyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Ala-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B3.

Ansatz: 1.75 g, 9.27 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Ala;

3.50 g, 9.27 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · pTsOH;

5.06 g, 9.73 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;
 1.20 g, 9.27 mmol, 1.58 ml (1.0 Äq.) DIPEA;
 20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [15/1].

R_f: 0.45 (Chloroform/Ethylacetat [3/1]).

Ausbeute: 1.05 g, 2.78 mmol, 30 %, farbloser Feststoff.

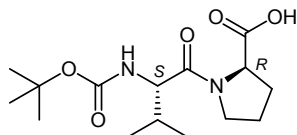
Smp.: 84.5 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +25.9 ° (c = 1.12, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.26 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.43 (d, 1H, NH, ³J = 7.60 Hz), 5.21–5.08 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.56–4.43 (m, 2H, Pro-α CH, Ala-α CH), 3.85–3.66 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.63–3.40 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.25–2.16 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.12–1.92 (m, 2H, Pro-γ CH₂, Pro-β' CH₂), 1.92–1.74 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.31 (d, 3H, Ala-β CH₃, ³J = 6.70 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.32, 171.09 (CO₂CH₂Ph, NCO Ala), 154.60 (CO₂C(CH₃)₃), 135.32 (Ph-C_q), 128.21, 127.72 (5 × Ph-CH), 79.11 (CO₂C(CH₃)₃), 66.48 (CO₂CH₂Ph), 58.81 (Pro-α CH), 47.59 (Ala-α CH), 46.49 (Pro-δ CH₂), 28.69 (Pro-β CH₂), 28.02 (C(CH₃)₃), 24.33 (Pro-γ CH₂), 18.45 (Ala-β CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-alanyl-(R)-prolin, Boc-(S)-Ala-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 800 mg, 2.13 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Val-(R)-Pro-OBn;
 219 mg Pd/C (10 %);
 40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 15 bar H₂ bei RT.

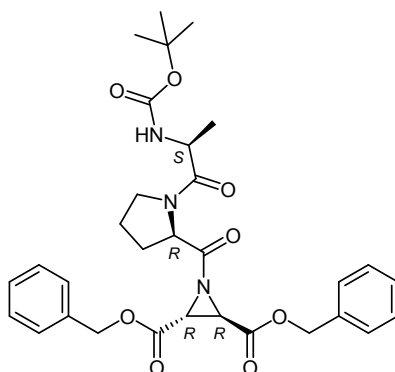
Ausbeute: 578 mg, 2.02 mmol, 94 %, brauner Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +32.7 ° (c = 1.02, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.55 (bs, 1H, NH), 4.65–4.14 (m, 2H, Pro-α CH, Ala-α CH), 3.92–3.59 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.59–3.27 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.40–1.67 (m, 3H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂), 1.92–1.74 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.35 (bs, 12H, C(CH₃)₃, Ala-β CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.08 (CO₂H), 171.55 (NCO Ala), 154.91 (CO₂C(CH₃)₃), 79.40 (CO₂C(CH₃)₃), 58.84 (Pro-α CH), 47.64 (Ala-α CH), 46.63 (Pro-δ CH₂), 28.81 (Pro-β CH₂), 28.07 (C(CH₃)₃), 24.41 (Pro-γ CH₂), 18.27 (Ala-β CH₃).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-alanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat,
Boc-(*S*)-Ala-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS23**, CS325^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 414 mg, 1.45 mmol (1.5 Äq.) Boc-(*S*)-Ala-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [1/1].

R_f: 0.37 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 20.8 min (Methode I p).

Ausbeute: 68.0 mg, 117 μ mol, 12 %, hellgelber Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: -54.3 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₇N₃O₈, 579.26 [M]; gef.: 580.3 [M+H]⁺, 602.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 14.7 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.43–7.28 (m, 10H, 10 \times Ph-CH), 5.36 (d, 1H, NH, ³J = 8.10 Hz), 5.21, 5.17 (je d („dd“), 4H, 2 \times CO₂CH₂Ph, ²J = 12.19 Hz), 4.78–4.70 (m, 1H, Pro- α CH), 4.53–4.37 (m, 1H, Ala- α CH), 3.70–3.62 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.60 (s, 2H, 2 \times Azi-CH), 3.62–3.49 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 2.38–2.21 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.21–2.04 (m, 1H, Pro- γ CH₂), 2.04–1.84 (m, 2H, Pro- β' CH₂, Pro- γ' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.28 (d, 3H, Ala- β CH₃, ³J = 6.90 Hz).

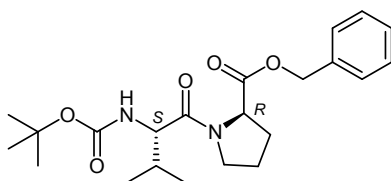
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.11 (NCO Pro), 171.97 (NCO Ala), 165.95 (2 \times CO₂CH₂Ph), 155.11 (CO₂C(CH₃)₃), 134.75 (2 \times Ph-C_q), 128.62, 128.54 (4 \times Ph-ortho-CH, 4 \times Ph-meta-CH), 126.95 (2 \times Ph-para-CH), 79.48 (CO₂C(CH₃)₃), 67.88 (2 \times CO₂CH₂Ph), 60.28 (Pro- α CH), 47.60 (Ala- α CH), 46.62 (Pro- δ CH₂), 40.41 (2 \times Azi-CH), 28.46 (Pro- β CH₂), 28.36 (C(CH₃)₃), 24.62 (Pro- γ CH₂), 18.60 (Ala- β CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3415 (w), 3034 (w), 2975 (w), 2928 (w), 1959 (w), 1739 (s), 1707 (s), 1645 (s), 1498 (m), 1449 (m), 1428 (m), 1366 (m), 1325 (m), 1284 (m), 1263 (m),

1247 (m), 1171 (s), 1129 (m), 1091 (w), 1063 (w), 1020 (w), 907 (w), 865 (w),
844 (w), 782 (w), 740 (w), 697 (m).

12.1.12 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-valinyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS24)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-valinyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Val-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 1.15 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Val;
2.0 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · *p*TsOH;
0.81 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.15 g, 5.57 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.54 g, 5.30 mmol, 0.58 ml (1.0 Äq.) NMM;
20 ml DCM, 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [13/1], dann [5/1].

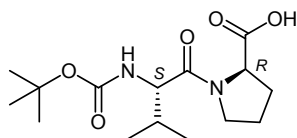
R_f: 0.34 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 1.11 g, 2.75 mmol, 51 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: +32.1 ° (c = 1.16, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.27 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.21–5.08 (m, 3H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.52–4.41 (m, 1H, Pro-α CH), 4.32 (dd, 1H, Val-α CH, ³J = 9.25 Hz, ³J = 6.25 Hz), 3.87–3.82 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.57–3.51 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.21–2.10 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.10–1.86 (m, 4H, Pro-γ CH₂, Pro-β' CH₂, Val-β CH), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95 (d, 3H, Val-γ CH₃, ³J = 6.80 Hz), 0.90 (d, 3H, Val-γ' CH₃, ³J = 6.80 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.62 (CO₂CH₂Ph), 170.88 (NCO Val), 155.69 (CO₂C(CH₃)₃), 135.68 (Ph-C_q), 128.48, 127.99 (5 × Ph-CH), 79.34 (CO₂C(CH₃)₃), 66.68 (CO₂CH₂Ph), 58.93 (Pro-α CH), 56.81 (Val-α CH), 47.07 (Pro-δ CH₂), 31.46 (Val-β CH), 29.07 (Pro-β CH₂), 28.29 (C(CH₃)₃), 24.58 (Pro-γ CH₂), 19.53, 17.35 (Val-γ CH₃, Val-γ' CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-valinyl-(*R*)-prolin, Boc-(*S*)-Val-(*R*)-Pro-OH

Methode: A6a.

Ansatz: 860 mg, 2.13 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Val-(*R*)-Pro-OBn;
219 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 15 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 625 mg, 1.99 mmol, 93 %, hellgelber Feststoff.

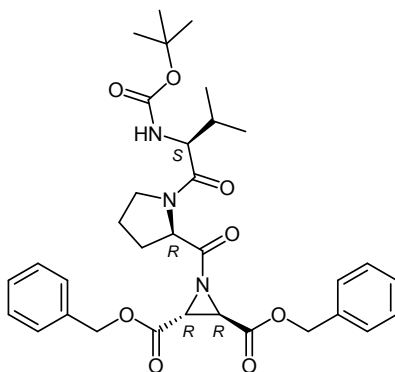
Smp.: 84.6 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +8.1 ° (c = 1.14, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.50 (bs, 1H, CO₂H), 5.24 (d, 1H, NH, ³J = 8.90 Hz), 4.51 (bs, 1H, Pro-α CH), 4.28–4.24 (m, 1H, Val-α CH), 3.89 (bs, 1H, Pro-δ CH₂), 3.56–3.51 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.32 (bs, 1H, Pro-β CH₂), 2.14–1.85 (m, 4H, Pro-γ CH₂, Pro-β' CH₂, Val-β CH), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.94 (d, 6H, Val-γ CH₃, Val-γ' CH₃, ³J = 6.50 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.24 (CO₂H, NCO Val), 155.86 (CO₂C(CH₃)₃), 79.88 (CO₂C(CH₃)₃), 59.70 (Pro-α CH), 57.25 (Val-α CH), 47.68 (Pro-δ CH₂), 31.11 (Val-β CH), 28.25 (C(CH₃)₃), 28.17 (Pro-β CH₂), 24.57 (Pro-γ CH₂), 19.37, 17.73 (Val-γ CH₃, Val-γ' CH₃).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-valinyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Val-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS24**, CS319^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 379 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Val-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, 1 h 0 °C, 24 h RT.

R_f: 0.22 (Petrolether/Diethylether [1/1]).

HPLC (p): $R_t = 22.4$ min (Methode I p).

Ausbeute: 107 mg, 176 μmol , 22 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +7.7 $^\circ$ ($c = 1.04$, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$, 607.29 [M]; gef.: 608.4 [M+H]⁺, 630.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: $R_t = 15.7$ min (Methode II).

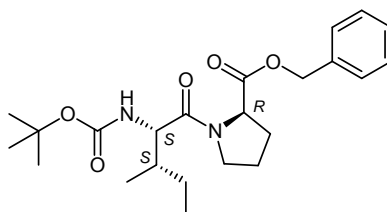
¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.27 (m, 10H, 10 \times Ph-CH), 5.32–5.07 (m, 5H, 2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, NH), 4.66–4.51 (m, 1H, Pro- α CH), 4.32 (dd, 1H, Val- α CH, $^3J = 9.15$ Hz, $^3J = 6.05$ Hz), 3.69–3.78 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.57–3.45 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 3.51 (s, 2H, 2 \times Azi-CH), 2.27–2.10 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.10–1.99 (m, 1H, Pro- γ CH₂), 1.99–1.83 (m, 3H, Pro- γ' CH₂, Pro- β' CH₂, Val- β CH), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95 (d, 3H, Val- γ CH₃, $^3J = 6.80$ Hz), 0.89 (d, 3H, Val- γ' CH₃, $^3J = 6.80$ Hz).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.50 (NCO Pro), 170.81 (NCO Val), 165.60 (2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.71 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.72 (2 \times Ph-C_q), 128.73, 128.66, 128.54 (10 \times Ph-CH), 79.32 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.02 (2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 60.47 (Pro- α CH), 56.76 (Val- α CH), 46.88 (Pro- δ CH₂), 39.59 (2 \times Azi-CH), 31.52 (Val- β CH), 28.87 (Pro- β CH₂), 28.34 (C(CH₃)₃), 24.53 (Pro- γ CH₂), 19.70, 17.28 (Val- γ CH₃, Val- γ' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3386 (w), 3034 (w), 2965 (m), 2931 (w), 2875 (w), 1738 (s), 1707 (s), 1642 (s), 1498 (m), 1454 (m), 1430 (m), 1383 (w), 1366 (m), 1324 (m), 1257 (m), 1171 (s), 1124 (m), 1090 (w), 1041 (w), 1012 (m), 909 (w), 881 (w), 846 (w), 814 (w), 739 (m), 697 (m).

12.1.13 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS25)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 2.0 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Ile;
3.26 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
1.32 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.88 g, 9.08 mmol (1.05 Äq.) DCC;

1.75 g, 17.3 mmol, 1.91 ml (2.0 Äq.) NMM;
20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [5/1].

R_f: 0.76 (Chloroform/Ethylacetat [3/1]).

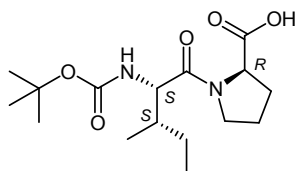
Ausbeute: 2.20 g, 5.25 mmol, 60 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +24.1 ° (c = 1.24, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.35–7.24 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.18–5.07 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.47–4.44 (m, 1H, Pro-α CH), 4.34–4.28 (m, 1H, Ile-α CH), 3.91–3.84 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.58–3.50 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.47–2.43 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 2.25–1.85 (m, 3H, Pro-β CH₂, Pro-γ' CH₂), 1.70–1.66 (m, 1H, Ile-β CH₂), 1.56–1.48 (m, 1H, Ile-γ CH₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.15–1.06 (m, 1H, Ile-γ' CH₂), 0.90 (d, 3H, Ile-ε CH₃, ³J = 6.70 Hz), 0.85 (t, 3H, Ile-δ CH₃, ³J = 7.40 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.53 (CO₂CH₂Ph), 171.04 (NCO Ile), 155.59 (CO₂C(CH₃)₃), 135.66 (Ph-C_q), 128.43, 127.90 (5 × Ph-CH), 79.32 (CO₂C(CH₃)₃), 66.59 (CO₂CH₂Ph), 58.86 (Pro-α CH), 56.18 (Ile-α CH), 47.11 (Pro-δ CH₂), 37.91 (Ile-β CH), 29.03 (Pro-β CH₂), 28.23 (C(CH₃)₃), 24.52 (Pro-γ CH₂), 24.00 (Ile-γ CH₂), 15.56 (Ile-ε CH₃), 11.21 (Ile-δ CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolin, Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.50 g, 3.58 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Ile-(R)-Pro-OBn;
369 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 15 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.15 g, 3.50 mmol, 97 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 144.6 °C.

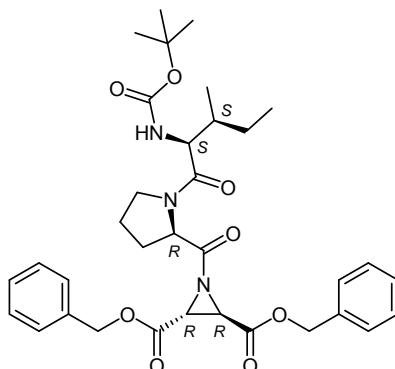
$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +63.8° (c = 1.18, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 10.16–9.60 (bs, 1H, CO₂H), 5.32 (d, 1H, NH, ³J = 8.00 Hz), 4.50–4.40 (m, 1H, Pro-α CH), 4.37–4.19 (m, 1H, Ile-α CH), 3.99–3.77 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.60–3.44 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.34–2.16 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 2.11–1.99 (m, 2H, Pro-β CH₂), 1.99–1.77 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.77–1.62 (m, 1H, Ile-β CH₂), 1.62–1.48 (m, 1H, Ile-γ CH₂), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.18–0.98 (m, 1H, Ile-γ' CH₂), 0.86 (t, 3H, Ile-δ CH₃, ³J = 6.50 Hz), 0.82 (d, 3H, Ile-ε CH₃,

$^3J = 4.80$ Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.76 (CO_2H), 172.83 (NCO Ile), 155.81 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.68 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.47 (Pro- α CH), 56.39 (Ile- α CH), 47.58 (Pro- δ CH_2), 37.42 (Ile- β CH), 28.41 (Pro- β CH_2), 28.21 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.49 (Pro- γ CH_2), 24.20 (Ile- γ CH_2), 15.41 (Ile- ε CH_3), 11.02 (Ile- δ CH_3).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-isoleucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Ile-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS25**, CS301^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 633 mg, 1.93 mmol (2.0 Äq.) Boc-(*S*)-Ile-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

R_f : 0.27 (Petrolether/Diethylether [1/1]).

HPLC (p): $R_t = 24.5$ min (Methode I p).

Ausbeute: 88.0 mg, 142 μmol , 14 %, hellgelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +6.4° (c = 1.12, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, 621.31 [M]; gef.: 622.4 [M+H]⁺, 644.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: $R_t = 15.7$ min (Methode II).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.28 (m, 10H, 10 × Ph- CH), 5.23–5.17 (m, 5H, 2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, NH), 4.62–4.57 (m, 1H, Pro- α CH), 4.40–4.30 (m, 1H, Ile- α CH), 3.71–3.47 (m, 2H, Pro- δ CH_2), 3.51 (s, 2H, 2 × Azi- CH), 2.18–2.09 (m, 1H, Pro- β CH_2), 2.09–1.81 (m, 3H, Pro- γ CH_2 , Pro- β' CH_2), 1.79–1.48 (m, 2H, Ile- β CH_2 , Ile- γ CH_2), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.21–1.05 (m, 1H, Ile- γ' CH_2), 0.92 (d, 3H, Ile- ε CH_3 , $^3J = 6.80$ Hz), 0.88 (t, 3H, Ile- δ CH_3 , $^3J = 7.40$ Hz).

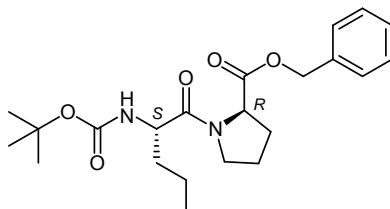
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.43 (NCO Pro), 170.98 (NCO Ile), 165.61 (2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.66 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.72 (2 × Ph- C_q), 128.65, 128.53, 128.23 (10 × Ph- CH), 79.36 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.02 (2 × $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 60.42 (Pro- α

$\underline{\text{CH}}$), 56.26 (Ile- α $\underline{\text{CH}}$), 46.97 (Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 39.67, 39.61 (2 \times Azi- $\underline{\text{CH}}$), 38.14 (Ile- β $\underline{\text{CH}}$), 28.84 (Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 28.34 (C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$), 24.53 (Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 23.95 (Ile- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 15.78 (Ile- ϵ $\underline{\text{CH}}_3$), 11.39 (Ile- δ $\underline{\text{CH}}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3365 (w), 3315 (w), 2965 (m), 2931 (m), 2876 (w), 1739 (s), 1706 (s), 1639 (s), 1498 (m), 1455 (m), 1432 (m), 1381 (w), 1366 (m), 1323 (m), 1249 (m), 1166 (s), 1124 (m), 1042 (w), 1016 (m), 910 (w), 854 (w), 811 (w), 739 (m), 697 (m).

12.1.14 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-norvalinyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS26)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-norvalinyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Nva-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 1.78 g, 8.21 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Nva;
3.10 g, 8.21 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · *p*TsOH;
3.24 g, 8.54 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
2.45 g, 16.4 mmol, 2.19 ml (2.0 Äq.) NEt $_3$;
30 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

SC: Chloroform.

R $_f$: 0.72 (Chloroform/Ethylacetat [5/1]).

Ausbeute: 2.76 g, 6.82 mmol, 83 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 226.1 °C.

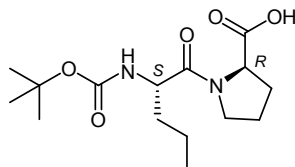
$[\alpha]_D^{20 \text{ °C}}$: +25.4 ° (c = 1.04, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl $_3$, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.35–7.22 (m, 5H, 5 \times Ph- $\underline{\text{CH}}$), 5.29 (d, 1H, $\underline{\text{NH}}$, $^3J = 8.70$ Hz), 5.18–5.04 (m, 2H, CO $_2$ $\underline{\text{CH}}_2$ Ph), 4.54–4.39 (m, 2H, Pro- α $\underline{\text{CH}}$, Nva- α $\underline{\text{CH}}$), 3.86–3.69 (m, 1H, Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 3.64–3.36 (m, 1H, Pro- δ' $\underline{\text{CH}}_2$), 2.25–2.08 (m, 1H, Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 2.08–1.99 (m, 1H, Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 1.99–1.80 (m, 2H, Pro- β' $\underline{\text{CH}}_2$, Pro- γ' $\underline{\text{CH}}_2$), 1.72–1.57 (m, 1H, Nva- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.57–1.46 (m, 1H, Nva- β' $\underline{\text{CH}}_2$), 1.46–1.26 (m, 11H, C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$, Nva- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 0.89 (t, 3H, Nva- δ $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J = 7.50$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl $_3$, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.53 ($\underline{\text{CO}}_2$ $\underline{\text{CH}}_2$ Ph), 171.04 ($\underline{\text{NCO}}$ Nva), 155.24 ($\underline{\text{CO}}_2$ C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$), 135.56 (Ph- $\underline{\text{C}}_q$), 128.40, 128.27, 128.17, 128.06, 127.88 (2 \times Ph-*ortho*- $\underline{\text{CH}}$, 2 \times Ph-*meta*- $\underline{\text{CH}}$), 127.20, 126.74 (Ph-*para*- $\underline{\text{CH}}$), 79.26 (CO $_2$ $\underline{\text{C}}$ ($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$),

66.61 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 58.95 (Pro- α CH), 51.57 (Nva- α CH), 46.76 (Pro- δ CH_2), 35.29 (Nva- β CH_2), 28.92 (Pro- β CH_2), 28.21 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.52 (Pro- γ CH_2), 18.39 (Nva- γ CH_2), 13.76 (Nva- δ CH_3).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-norvalinyl-(*R*)-prolin, Boc-(*S*)-Nva-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.50 g, 3.71 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Nva-(*R*)-Pro-OBn;
185 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H_2 bei RT.

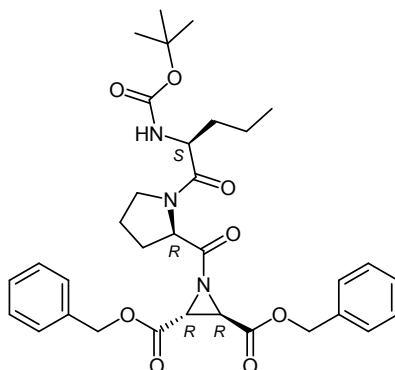
Ausbeute: 1.10 g, 3.49 mmol, 94 %, brauner Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +18.6 ° ($c = 1.06$, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.37 (bs, 1H, CO_2H), 5.40 (bs, 1H, NH), 4.62–4.30 (m, 2H, Pro- α CH , Nva- α CH), 3.97–3.76 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.65–3.40 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.37–2.17 (m, 1H, Pro- β CH_2), 2.17–2.03 (m, 2H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2), 2.02–1.79 (m, 1H, Pro- γ' CH_2), 1.73–1.48 (m, 2H, Nva- β CH_2), 1.48–1.13 (m, 11H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Nva- γ CH_2), 0.90 (t, 3H, Nva- δ CH_3 , $^3J = 7.20$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.59, 172.26 (CO_2H , NCO Nva), 155.26 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.42 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.34 (Pro- α CH), 51.49 (Nva- α CH), 46.94 (Pro- δ CH_2), 34.50 (Nva- β CH_2), 28.13 (Pro- β CH_2), 27.93 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.25 (Pro- γ CH_2), 18.25 (Nva- γ CH_2), 13.45 (Nva- δ CH_3).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-norvalinyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Nva-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn) $_2$ (**CS26**, CS343^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 454 mg, 1.45 mmol (1.5 Äq.) Boc-(*S*)-Nva-(*R*)-Pro-OH;

300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
 1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
 5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [4/1] → [2/1].

R_f: 0.49 (Chloroform/Ethylacetat [5/1]).

HPLC (p): R_t = 23.8 min (Methode I p).

Ausbeute: 59.0 mg, 97.0 μmol , 10 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -43.8 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₃H₄₁N₃O₈, 607.29 [M]; gef.: 608.4 [M+H]⁺, 630.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 15.8 min (Methode II).

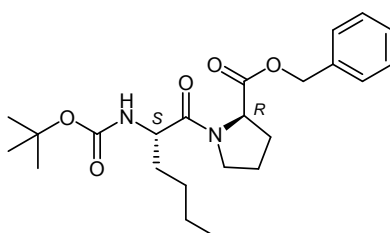
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.48–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.32–5.09 (m, 5H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.80–4.62 (m, 1H, Pro- α CH), 4.52–4.32 (m, 1H, Nva- α CH), 3.81–3.66 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.62 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.66–3.48 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 2.33–2.18 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.18–2.04 (m, 1H, Pro- γ CH₂), 2.04–1.89 (m, 2H, Pro- β' CH₂, Pro- γ' CH₂), 1.78–1.56 (m, 1H, Nva- β CH₂), 1.56–1.40 (m, 1H, Nva- β' CH₂), 1.40–1.29 (m, 11H, C(CH₃)₃, Nva- γ CH₂), 0.90 (t, 3H, Nva- δ CH₃, ³J = 7.30 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.24 (NCO Pro), 171.74 (NCO Nva), 165.93 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.53 (CO₂C(CH₃)₃), 134.82 (2 × Ph-C_q), 128.68, 128.62, 128.52 (10 × Ph-CH), 79.43 (CO₂C(CH₃)₃), 67.83 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.23 (Pro- α CH), 51.44 (Nva- α CH), 46.81 (Pro- δ CH₂), 40.46 (2 × Azi-CH), 35.25 (Nva- β CH₂), 28.57 (Pro- β CH₂), 28.36 (C(CH₃)₃), 24.72 (Pro- γ CH₂), 18.36 (Nva- γ CH₂), 13.83 (Nva- δ CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3402 (w), 3034 (w), 2960 (m), 2931 (m), 2873 (m), 2360 (w), 2342 (w), 1740 (s), 1707 (s), 1644 (s), 1498 (m), 1455 (m), 1428 (m), 1366 (m), 1325 (m), 1249 (m), 1172 (s), 1128 (m), 1060 (w), 1016 (w), 906 (w), 870 (w), 848 (w), 739 (m), 697 (m).

12.1.15 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-norleuciny]-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS27)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-norleuciny]-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Nle-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B3.

Ansatz: 1.84 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Nle;
3.0 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
4.34 g, 8.35 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;
2.06 g, 15.9 mmol, 2.70 ml (2.0 Äq.) DIPEA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1].

R_f: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

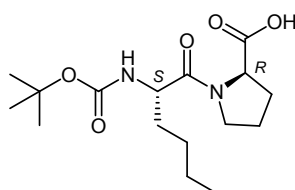
Ausbeute: 2.08 g, 4.96 mmol, 62 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +22.5 ° (c = 1.02, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.20 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.31 (d, 1H, NH, ³J = 8.70 Hz), 5.15–5.00 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.52–4.34 (m, 2H, Pro-α CH, Nle-α CH), 3.83–3.66 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.59–3.35 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.17–2.02 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.02–1.83 (m, 3H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂), 1.72–1.56 (m, 1H, Nle-β CH₂), 1.56–1.46 (m, 1H, Nle-β' CH₂), 1.45–1.30 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.30–0.99 (m, 4H, Nle-γ CH₂, Nle-δ CH₂), 0.82 (t, 3H, Nle-ε CH₃, ³J = 6.90 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.22 (CO₂CH₂Ph), 170.71 (NCO Nle), 154.94 (CO₂C(CH₃)₃), 135.35 (Ph-C_q), 128.23, 128.10, 127.75, 127.56 (5 × Ph-CH), 78.86 (CO₂C(CH₃)₃), 66.24 (CO₂CH₂Ph), 58.68 (Pro-α CH), 51.45 (Nle-α CH), 46.49 (Pro-δ CH₂), 32.43 (Nle-β CH₂), 28.63 (Pro-β CH₂), 27.93 (C(CH₃)₃), 26.91 (Nle-γ CH₂), 24.26 (Pro-γ CH₂), 22.10 (Nle-δ CH₂), 13.55 (Nle-ε CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-norleucinyI-(R)-prolin, Boc-(S)-Nle-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.70 g, 4.06 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Nle-(R)-Pro-OBn;
203 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.18 g, 3.59 mmol, 88 %, brauner Feststoff.

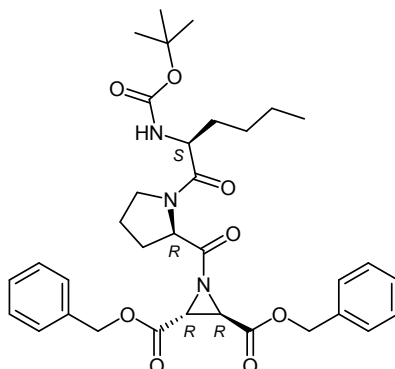
$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +32.0 ° (c = 1.06, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.34 (bs, 1H, NH), 4.65–4.29 (m, 2H, Pro-α CH, Nle-α CH), 3.95–3.75 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.65–3.35 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.42–2.20 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.20–1.80 (m, 3H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂), 1.50–1.09

(m, 11H, Nle- β \underline{CH}_2 , C(\underline{CH}_3)₃), 0.87 (bs, 3H, Nle- ϵ \underline{CH}_3).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.53, 172.17 (\underline{CO}_2 H, N \underline{CO} Nle), 155.45 (\underline{CO}_2 C(\underline{CH}_3)₃), 79.61 (CO₂ \underline{C} (\underline{CH}_3)₃), 58.86 (Pro- α \underline{CH}), 52.05 (Nle- α \underline{CH}), 47.19 (Pro- δ \underline{CH}_2), 32.30 (Nle- β \underline{CH}_2), 28.28 (Pro- β \underline{CH}_2), 28.14 (C(\underline{CH}_3)₃), 27.23 (Nle- γ \underline{CH}_2), 24.50 (Pro- γ \underline{CH}_2), 22.29 (Nle- δ \underline{CH}_2), 13.73 (Nle- ϵ \underline{CH}_3).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-norleucinyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Nle-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS27**, CS348^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 396 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Trp-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.54 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 25.4 min (Methode I p).

Ausbeute: 148 mg, 238 μ mol, 24 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -38.5° (c = 1.20, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, 621.31 [M]; gef.: 622.4 [M+H]⁺, 644.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 16.3 min (Methode II).

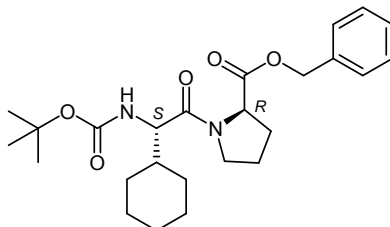
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.28 (m, 10H, 10 \times Ph- \underline{CH}), 5.24 (d, 1H, N \underline{H} , ³J = 8.90 Hz), 5.21, 5.17 (je d („dd“), 4H, 2 \times CO₂ \underline{CH}_2 Ph, ²J = 12.30 Hz), 4.75–4.64 (m, 1H, Pro- α \underline{CH}), 4.50–4.34 (m, 1H, Nle- α \underline{CH}), 3.75–3.67 (m, 1H, Pro- δ \underline{CH}_2), 3.63 (s, 2H, 2 \times Azi- \underline{CH}), 3.63–3.50 (m, 1H, Pro- δ' \underline{CH}_2), 2.35–2.17 (m, 1H, Pro- β \underline{CH}_2), 2.17–2.03 (m, 1H, Pro- γ \underline{CH}_2), 2.03–1.88 (m, 2H, Pro- β' \underline{CH}_2 , Pro- γ' \underline{CH}_2), 1.80–1.64 (m, 1H, Nle- β \underline{CH}_2), 1.64–1.47 (m, 1H, Nle- β' \underline{CH}_2), 1.42 (s, 9H, C(\underline{CH}_3)₃), 1.39–1.20 (m, 4H, Nle- γ \underline{CH}_2 , Nle- δ \underline{CH}_2), 0.87 (t, 3H, Nle- ϵ \underline{CH}_3 , ³J = 7.10 Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.23 (NCO Pro), 171.65 (NCO Nle), 165.86 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.48 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.79 ($2 \times \text{Ph-C}_q$), 128.58, 128.48 ($10 \times \text{Ph-CH}$), 79.38 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.78 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 60.19 (Pro- α CH), 51.60 (Nle- α CH), 46.79 (Pro- δ CH_2), 40.40 ($2 \times \text{Azi-CH}$), 32.74 (Nle- β CH_2), 28.60 (Pro- β CH_2), 28.33 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.06 (Nle- γ CH_2), 24.70 (Pro- γ CH_2), 22.41 (Nle- δ CH_2), 13.88 (Nle- ϵ CH_3).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3408 (w), 3034 (w), 2958 (m), 2932 (m), 2872 (w), 1741 (s), 1707 (s), 1644 (s), 1498 (m), 1455 (m), 1428 (m), 1366 (m), 1325 (m), 1247 (m), 1172 (s), 1128 (m), 1044 (w), 1019 (w), 909 (w), 867 (w), 781 (w), 747 (m), 697 (m).

12.1.16 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-cyclohexylglycyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS28)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-cyclohexylglycyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-Chg-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 1.36 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Chg;
2.0 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Pro-OBn · *p*TsOH;
0.81 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.15 g, 5.57 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.54 g, 5.30 mmol, 0.58 ml (1.0 Äq.) NMM;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 4 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1] → [5/1].

R_f: 0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

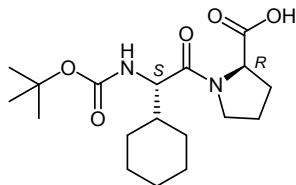
Ausbeute: 1.27 g, 2.87 mmol, 54 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +36.8 (c = 1.06, CHCl_3).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.37–7.23 (m, 5H, $5 \times \text{Ph-CH}$), 5.20–5.09 (m, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, NH), 4.47–4.45 (m, 1H, Pro- α CH), 4.31 (dd, 1H, Chg- α CH , $^3J = 9.25$ Hz, $^3J = 6.85$ Hz), 3.89–3.83 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.59–3.51 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.28–2.09 (m, 1H, Pro- γ CH_2), 2.09–1.83 (m, 3H, Pro- β CH_2 , Pro- γ' CH_2), 1.83–1.53 (m, 6H, Cy-1- CH , Cy-2- CH_2 , Cy-3- CH_2 , Cy-4- CH_2 , Cy-5- CH_2 , Cy-6- CH_2 Chg), 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.30–0.92 (m, 5H, Cy-2'- CH_2 , Cy-3'- CH_2 , Cy-4'- CH_2 , Cy-5'- CH_2 , Cy-6'- CH_2 Chg).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.60 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 170.85 (NCO Chg), 155.63 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 135.70 (Ph-C_q), 128.61, 128.47, 128.12, 127.96 ($5 \times \text{Ph-CH}$), 79.33 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.65 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 58.87 ($\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 56.43 ($\text{Chg-}\alpha \text{ CH}$), 47.14 ($\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 41.14 (Cy-1-CH Chg), 28.84 ($\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$), 29.09, 27.96 (Cy-2-CH_2 , $\text{Cy-6-CH}_2 \text{ Chg}$), 28.30 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.08, 26.03 (Cy-3-CH_2 , $\text{Cy-5-CH}_2 \text{ Chg}$), 25.90 ($\text{Cy-4-CH}_2 \text{ Chg}$), 24.57 ($\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-cyclohexylglycyl-(*R*)-prolin, Boc-(*S*)-Chg-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 920 mg, 2.07 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Chg-(*R*)-Pro-OBn;
213 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 15 bar H_2 bei RT.

Ausbeute: 684 mg, 1.93 mmol, 93 %, hellbrauner Feststoff.

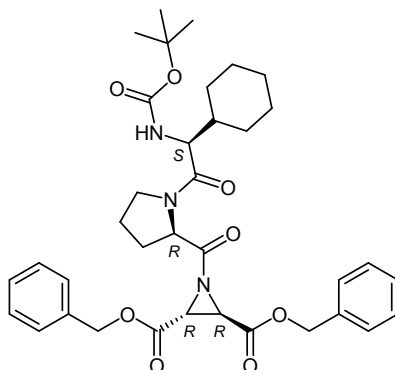
Smp.: 112.0 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +18.4 ($c = 1.10$, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.29 (bs, 1H, CO_2H), 5.20 (d, 1H, NH , $^3J = 6.80$ Hz), 4.51 (bs, 1H, $\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 4.27 (bs, 1H, $\text{Chg-}\alpha \text{ CH}$), 3.90 (bs, 1H, $\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 3.67–3.31 (m, 1H, $\text{Pro-}\delta' \text{ CH}_2$), 2.34 (bs, 1H, $\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$), 2.25–1.86 (m, 3H, $\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$, $\text{Pro-}\gamma' \text{ CH}_2$), 1.86–1.53 (m, 6H, Cy-1-CH , Cy-2-CH_2 , Cy-3-CH_2 , Cy-4-CH_2 , Cy-5-CH_2 , $\text{Cy-6-CH}_2 \text{ Chg}$), 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.31–0.81 (m, 5H, $\text{Cy-2}'\text{-CH}_2$, $\text{Cy-3}'\text{-CH}_2$, $\text{Cy-4}'\text{-CH}_2$, $\text{Cy-5}'\text{-CH}_2$, $\text{Cy-6}'\text{-CH}_2 \text{ Chg}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.34, 172.97 (CO_2H , NCO Chg), 155.79 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.84 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.69 ($\text{Pro-}\alpha \text{ CH}$), 56.76 ($\text{Chg-}\alpha \text{ CH}$), 47.79 ($\text{Pro-}\delta \text{ CH}_2$), 40.75 (Cy-1-CH Chg), 29.68 ($\text{Pro-}\beta \text{ CH}_2$), 28.33, 28.13 (Cy-2-CH_2 , $\text{Cy-6-CH}_2 \text{ Chg}$), 28.24 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.00, 25.89 (Cy-3-CH_2 , $\text{Cy-5-CH}_2 \text{ Chg}$), 25.76 ($\text{Cy-4-CH}_2 \text{ Chg}$), 24.55 ($\text{Pro-}\gamma \text{ CH}_2$).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-cyclohexylglycyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Chg-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS28**, CS316^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 425 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Chg-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 d RT.

R_f: 0.17 (Petrolether/Diethylether [1/1]).

HPLC (p): R_t = 17.5 min (Methode II p).

Ausbeute: 169 mg, 261 μ mol, 27 %, hellgelber Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +11.3 (c = 0.98, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₆H₄₅N₃O₈, 647.32 [M]; gef.: 670.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 16.7 min (Methode II).

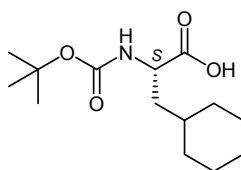
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.30 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.25–5.15 (m, 5H, 2 × CO₂CH₂Ph, NH), 4.66–4.53 (m, 1H, Pro- α CH), 4.30 (dd, 1H, Chg- α CH, ³J = 9.20 Hz, ³J = 6.70 Hz), 3.73–3.60 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.59–3.41 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 3.51 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 2.18–2.11 (m, 1H, Pro- β CH₂), 2.11–1.97 (m, 2H, Pro- β' CH₂, Pro- γ CH₂), 1.97–1.85 (m, 1H, Pro- γ' CH₂), 1.85–1.53 (m, 6H, Cy-1-CH, Cy-2-CH₂, Cy-3-CH₂, Cy-4-CH₂, Cy-5-CH₂, Cy-6-CH₂ Chg), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.28–0.89 (m, 5H, Cy-2'-CH₂, Cy-3'-CH₂, Cy-4'-CH₂, Cy-5'-CH₂, Cy-6'-CH₂ Chg).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.46 (NCO Pro), 170.77 (NCO Chg), 165.61 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.65 (CO₂C(CH₃)₃), 134.71 (2 × Ph-C_q), 128.71, 128.66, 128.53 (10 × Ph-CH), 79.32 (CO₂C(CH₃)₃), 68.04 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.39 (Pro- α CH), 56.43 (Chg- α CH), 46.98 (Pro- δ CH₂), 41.45 (Cy-1-CH Chg), 39.61 (2 × Azi-CH), 30.01 (Pro- β CH₂), 28.84, 27.88 (Cy-2-CH₂, Cy-6-CH₂ Chg), 28.37 (C(CH₃)₃), 26.25, 26.13, 25.98 (Cy-3-CH₂, Cy-5-CH₂, Cy-4-CH₂ Chg), 24.53 (Pro- γ CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3363 (w), 3299 (w), 3034 (w), 2927 (m), 2853 (w), 1738 (s), 1706 (s), 1643 (s), 1498 (m), 1448 (m), 1430 (m), 1366 (m), 1323 (m), 1247 (m), 1170 (s), 1123 (m), 1079 (w), 1059 (w), 1014 (w), 970 (w), 906 (w), 869 (w), 813 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.17 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-cyclohexylalanyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS29)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-cyclohexylalanin, Boc-(S)-Cha



Methode: A1.

Ansatz: 2.12 g, 12.4 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Cha;
2.98 g, 13.6 mmol (1.1 Äq.) (Boc)₂O;
2.29 g, 27.3 mmol (2.2 Äq.) NaHCO₃;
60 ml H₂O/Dioxan, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 d RT.

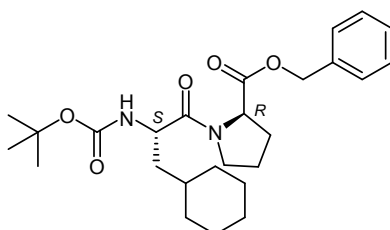
Ausbeute: 3.12 g, 11.5 mmol, 92 %, farblose hochviskose Flüssigkeit.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -8.7 ° (c = 1.10, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.99–4.78 (m, 1H, NH), 4.42–4.24 (m, 1H, Cha- α CH), 1.87–1.57 (m, 6H, Cy-1-CH, Cy-2-CH₂, Cy-3-CH₂, Cy-4-CH₂, Cy-5-CH₂, Cy-6-CH₂ Cha), 1.57–1.47 (m, 1H, Cha- β CH₂), 1.50–1.27 (m, 10H, C(CH₃)₃, Cha- β' CH₂), 1.32–1.04 (m, 3H, Cy-3'-CH₂, Cy-4'-CH₂, Cy-5'-CH₂ Cha), 1.04–0.79 (m, 2H, Cy-2'-CH₂, Cy-6'-CH₂ Cha).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.40 (CO₂H), 155.65 (CO₂C(CH₃)₃), 80.12 (CO₂C(CH₃)₃), 51.40 (Cha- α CH), 40.04 (Cha- β CH₂), 34.02 (Cy-1-CH Cha), 33.53, 32.39 (Cy-2-CH₂, Cy-6-CH₂ Cha), 28.27 (C(CH₃)₃), 26.36, 26.15, 25.98 (Cy-3-CH₂, Cy-4-CH₂, Cy-5-CH₂ Cha).

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-cyclohexylalanyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 2.16 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Cha;
 3.0 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
 1.22 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
 1.73 g, 8.35 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 2.37 g, 15.9 mmol, 2.12 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1] → [5/1].

R_f: 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

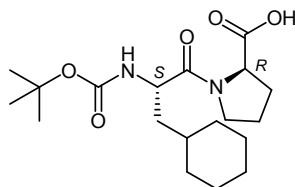
Ausbeute: 1.77 g, 3.87 mmol, 48 %, farbloser Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: +31.1 (c = 1.06, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.36–7.22 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.20–5.06 (m, 3H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.55 (dt, 1H, Cha-α CH, ³J = 7.30 Hz), 4.49–4.39 (m, 1H, Pro-α CH), 3.91–3.74 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.58–3.43 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.28–2.09 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.09–2.00 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 2.00–1.91 (m, 2H, Pro-β' CH₂, Pro-γ' CH₂), 1.90–1.50 (m, 6H, Cy-1-CH, Cy-2-CH₂, Cy-3-CH₂, Cy-4-CH₂, Cy-5-CH₂, Cy-6-CH₂ Cha), 1.50–1.27 (m, 11H, C(CH₃)₃, Cha-β CH₂), 1.27–1.01 (m, 3H, Cy-3'-CH₂, Cy-4'-CH₂, Cy-5'-CH₂ Cha), 1.01–0.72 (m, 2H, Cy-2'-CH₂, Cy-6'-CH₂ Cha).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.40 (CO₂CH₂Ph), 171.56 (NCO Cha), 155.31 (CO₂C(CH₃)₃), 135.63 (Ph-C_q), 128.58, 128.44, 128.35, 128.17, 128.09, 127.93 (5 × Ph-CH), 79.30 (CO₂C(CH₃)₃), 66.55 (CO₂CH₂Ph), 59.00 (Pro-α CH), 49.61 (Cha-α CH), 46.71 (Pro-δ CH₂), 41.18 (Cha-β CH₂), 34.01, 32.61 (Cy-2-CH₂, Cy-6-CH₂ Cha), 33.79 (Cy-1-CH Cha), 28.99 (Pro-β CH₂), 28.22 (C(CH₃)₃), 26.37, 26.23, 26.03 (Cy-3-CH₂, Cy-4-CH₂, Cy-5-CH₂ Cha), 24.59 (Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-cyclohexylalanyl-(R)-prolin, Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.0 mg, 2.18 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Cha-(R)-Pro-OBn;
 109 mg Pd/C (10 %);
 40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 783 mg, mmol, 97 %, hellbrauner Feststoff.

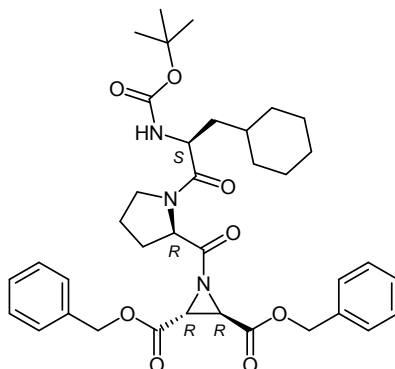
Smp.: 107.9 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +26.6 ° (c = 1.06, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.24 (bs, 1H, NH), 4.69–4.38 (m, 2H, Pro- α CH , Cha- α CH), 3.95–3.77 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.62–3.27 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.40–2.17 (m, 1H, Pro- β CH_2), 2.13–1.94 (m, 3H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2), 1.94–1.53 (m, 7H, Cha- β CH_2 , Cy-1- CH , Cy-2- CH_2 , Cy-3- CH_2 , Cy-4- CH_2 , Cy-5- CH_2 , Cy-6- CH_2 Cha), 1.53–1.27 (bs, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Cha- β' CH_2), 1.27–1.02 (m, 3H, Cy-3'- CH_2 , Cy-4'- CH_2 , Cy-5'- CH_2 Cha), 1.02–0.70 (m, 2H, Cy-2'- CH_2 , Cy-6'- CH_2 Cha).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.83 (CO_2H), 172.86 (NCO Cha), 155.63 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.85 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.80 (Pro- α CH), 49.91 (Cha- α CH), 47.28 (Pro- δ CH_2), 40.40 (Cha- β CH_2), 34.07, 32.59 (Cy-2- CH_2 , Cy-6- CH_2 Cha), 33.91 (Cy-1 CH Cha), 28.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.14 (Pro- β CH_2), 26.39, 26.26, 26.05 (Cy-3- CH_2 , Cy-4- CH_2 , Cy-5- CH_2 Cha), 24.66 (Pro- γ CH_2).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-cyclohexylalanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Cha-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS29**, CS346^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 444 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Cha-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.93 g, 3.03 mmol (3.1 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1].

R_f: 0.57 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 29.0 min (Methode III p).

Ausbeute: 116 mg, 175 μmol , 18 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: -37.6 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_8$, 661.34 [M]; gef.: 662.5 [M+H]⁺, 684.6 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 17.3 min (Methode II).

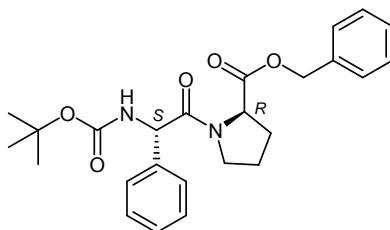
$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.28 (m, 10H, $10 \times \text{Ph-CH}$), 5.21, 5.17 (je d („dd“), 4H, $2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, $^2J = 12.20$ Hz), 5.10 (d, 1H, NH , $^3J = 9.20$ Hz), 4.76–4.64 (m, 1H, Pro- α CH), 4.56–4.42 (m, 1H, Cha- α CH), 3.79–3.66 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.62 (s, 2H, $2 \times \text{Azi-CH}$), 3.60–3.49 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.35–2.18 (m, 1H, Pro- β CH_2), 2.18–2.05 (m, 1H, Pro- γ CH_2), 2.05–1.85 (m, 2H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ' CH_2), 1.79–1.53 (m, 6H, Cy-1- CH , Cy-2- CH_2 , Cy-3- CH_2 , Cy-4- CH_2 , Cy-5- CH_2 , Cy-6- CH_2 Cha), 1.52–1.30 (m, 11H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Cha- β CH_2), 1.30–1.04 (m, 3H, Cy-3'- CH_2 , Cy-4'- CH_2 , Cy-5'- CH_2 Cha), 1.03–0.73 (m, 2H, Cy-2'- CH_2 , Cy-6'- CH_2 Cha).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.24 (NCO Pro), 172.16 (NCO Cha), 165.87 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.60 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.81 ($2 \times \text{Ph-C}_q$), 128.60, 128.50 ($10 \times \text{Ph-CH}$), 79.42 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.80 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 60.22 (Pro- α CH), 49.51 (Cha- α CH), 46.67 (Pro- δ CH_2), 40.69 (Cha- β CH_2), 40.37 ($2 \times \text{Azi-CH}$), 34.03, 32.41 (Cy-2- CH_2 , Cy-6- CH_2 Cha), 33.81 (Cy-1- CH Cha), 28.69 (Pro- β CH_2), 28.33 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.43, 26.28, 26.08 (Cy-3- CH_2 , Cy-4- CH_2 , Cy-5- CH_2 Cha), 24.68 (Pro- γ CH_2).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3407 (w), 3063 (w), 3033 (w), 2923 (m), 2850 (m), 1741 (s), 1707 (s), 1644 (s), 1498 (m), 1447 (m), 1428 (m), 1366 (m), 1325 (m), 1273 (m), 1250 (m), 1170 (s), 1128 (m), 1045 (w), 1022 (w), 965 (w), 909 (w), 862 (w), 780 (w), 749 (m), 697 (m).

12.1.18 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-phenylglycinyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS30)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-phenylglycinyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 1.33 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg;
 2.0 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · *p*TsOH;
 0.81 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
 1.15 g, 5.57 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 0.54 g, 5.30 mmol, 0.58 ml (1.0 Äq.) NMM;
 20 ml DCM, 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

R_f: 0.68 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 2.07 g, 3.39 mmol, 42 %, farbloser Feststoff.

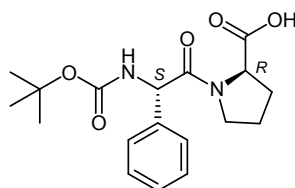
Smp.: 151.1 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +120.6 (c = 1.14, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.25 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.11 (d, 1H, NH, ³J = 7.20 Hz), 5.42 (d, 1H, Phg-α CH, ³J = 7.20 Hz), 5.24–5.13 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.53–4.44 (m, 1H, Pro-α CH), 3.81–3.65 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.22–3.03 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.13–1.85 (m, 3H, Pro-β CH₂, Pro-γ CH₂), 1.85–1.68 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.61 (CO₂CH₂Ph), 168.84 (NCO Phg), 154.77 (CO₂C(CH₃)₃), 137.72 (Ph-C_q Phg), 135.68 (Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 128.89, 128.56, 128.52, 128.36, 128.26, 128.09, 127.94, 127.84 (10 × Ph-CH), 79.57 (CO₂C(CH₃)₃), 66.90 (CO₂CH₂Ph), 59.39 (Pro-α CH), 56.62 (Phg-α CH), 46.72 (Pro-δ CH₂), 28.90 (Pro-β CH₂), 28.34 (C(CH₃)₃), 24.48 (Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-phenylglycinyI-(R)-prolin, Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.50 g, 3.42 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg-(R)-Pro-OBn;
352 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 2 h 15 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 1.18 mg, 3.40 mmol, 93 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 172.6 °C.

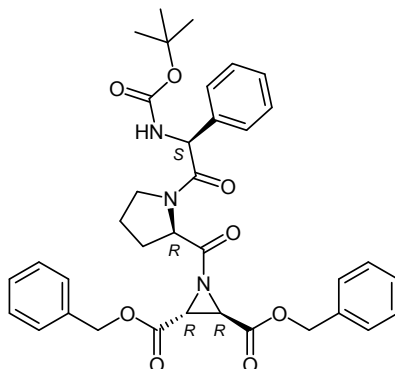
$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +123.3 ° (c = 1.10, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.41 (bs, 1H, CO₂H), 7.45–7.22 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.05 (d, 1H, NH, ³J = 7.20 Hz), 5.44 (d, 1H, Phg-α CH, ³J = 7.50 Hz), 4.55–4.35 (m, 1H, Pro-α CH), 3.83–3.64 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.25–2.99 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.20–2.09 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.09–1.86 (m, 2H, Pro-γ CH₂, Pro-β' CH₂), 1.86–1.70 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 174.43 (CO₂H), 170.03 (NCO Phg), 154.95 (CO₂C(CH₃)₃), 128.97, 128.36, 127.88 (5 × Ph-CH), 79.90 (CO₂C(CH₃)₃), 59.73 (Pro-α CH), 56.64 (Phg-α CH), 46.98 (Pro-δ CH₂), 28.47 (Pro-β CH₂), 28.27

(C(CH₃)₃), 24.45 (Pro-γ CH₂).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-phenylglyciny]-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS30**, CS321^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 504 mg, 1.45 mmol (1.5 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, 1 h 0 °C, 24 h RT.

R_f: 0.30 (Petrolether/Diethylether [1/1]).

HPLC (p): R_t = 23.0 min (Methode I p).

Ausbeute: 148 mg, 231 μmol, 23 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 59.9 °C.

[α]_D^{20 °C}: +38.5 ° (c = 1.08, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₆H₃₉N₃O₈, 641.27 [M]; gef.: 664.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 15.7 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.53–7.27 (m, 15H, 15 × Ph-CH), 6.13 (d, 1H, NH, ³J = 7.10 Hz), 5.44, 5.37 (je d, 1H, Phg-α CH, ³J = 8.10 Hz, ³J = 7.10 Hz), 5.31–5.11 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.66–4.52 (m, 1H, Pro-α CH), 3.59–3.44 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.55, 3.50 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.22–2.98 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.24–2.02 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.02–1.78 (m, 2H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂), 1.78–1.60 (m, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.40, 1.38 (je s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.55, 177.22 (NCO Pro), 168.87, 168.71 (NCO Phg), 165.54 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.19, 154.72 (CO₂C(CH₃)₃), 137.61, 137.08 (Ph-C_q Phg), 134.69, 134.56 (2 × Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 128.86, 128.62, 128.16, 127.92 (10 × Ph-CH), 79.62, 79.48 (CO₂C(CH₃)₃), 68.05 (2 × CO₂CH₂Ph), 61.02, 60.05 (Pro-α CH), 56.60, 56.30 (Phg-α CH), 46.61, 46.47 (Pro-δ CH₂), 39.65, 39.55 (2 × Azi-CH), 28.95, 28.45 (Pro-β CH₂), 28.30

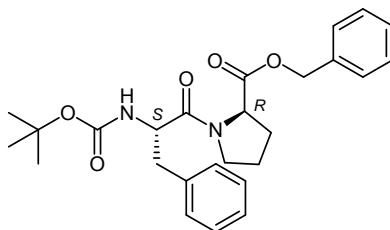
(C(CH₃)₃), 24.76, 24.29 (Pro-γ CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3466 (w), 3359 (w), 3303 (w), 3034 (w), 2974 (w), 2931 (w), 1738 (m), 1706 (s), 1648 (s), 1495 (m), 1455 (m), 1426 (m), 1366 (m), 1323 (m), 1259 (m), 1171 (s), 1125 (m), 1078 (w), 1054 (w), 1023 (w), 892 (w), 849 (w), 753 (w), 697 (m).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.59 (bestimmt über ¹H-NMR an Phg-α CH), Epimerisierung an Phg-α CH.

12.1.19 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS31)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-OBn



Methode: B2.

Ansatz: 1.41 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phe;
2.0 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
0.81 g, 5.30 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.15 g, 5.57 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.54 g, 5.30 mmol, 0.58 ml (1.0 Äq.) NMM;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [10/1].

R_f: 0.80 (Chloroform/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 1.59 g, 3.52 mmol, 66 %, farbloser Feststoff.

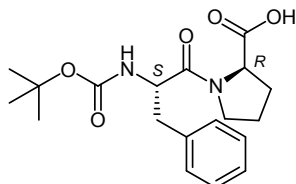
[α]_D^{20 °C}: +55.2 ° (c = 0.98, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.37–7.30 (m, 5H, 5 × Ph-CH CO₂CH₂Ph), 7.27–7.18 (m, 5H, 5 × Ph-CH Phe), 5.36 (d, 1H, NHCO₂C(CH₃)₃, ³J = 8.60 Hz), 5.20–5.07 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.65–4.60 (m, 1H, Phe-α CH), 4.35–4.32 (m, 1H, Pro-α CH), 3.53–3.47 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.05 (dd, 1H, Phe-cis-β CH₂, ²J = 12.85 Hz, ³J = 5.50 Hz), 2.92 (dd, 1H, Phe-trans-β' CH₂, ²J = 12.85 Hz, ³J = 9.40 Hz), 2.64–2.58 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 1.92–1.74 (m, 3H, Pro-γ CH₂, Pro-β CH₂), 1.52–1.46 (m, 1H, Pro-β' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.56 (CO₂CH₂Ph), 170.19 (NCO Phe), 154.92 (CO₂C(CH₃)₃), 136.51 (Ph-C_q Phe), 135.65 (Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 129.50 (2 × Ph-

meta-CH Phe), 128.52 (2 × Ph-*ortho*-CH Phe), 128.20, 128.03 (5 × Ph-CH CO₂CH₂Ph), 126.87 (Ph-*para*-CH Phe), 79.62 (CO₂C(CH₃)₃), 66.75 (CO₂CH₂Ph), 58.80 (Pro-α CH), 53.62 (Phe-α CH), 46.74 (Pro-δ CH₂), 40.45 (Phe-β CH₂), 28.89 (Pro-β CH₂), 28.34 (C(CH₃)₃), 24.36 (Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(R)-prolin, Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 1.0 g, 2.21 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phe-(R)-Pro-OBn;
228 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 15 bar H₂ bei RT.

Ausbeute: 0.79 g, 2.19 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

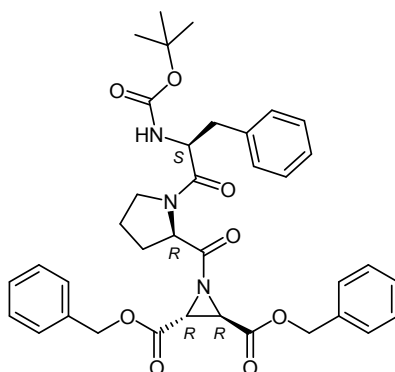
Smp.: 168.6 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +83.4° (c = 1.06, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.28–7.10 (m, 5H, 5 × Ph-CH Phe), 5.47 (bs, 1H, NHCO₂C(CH₃)₃), 4.62 (bs, 1H, Phe-α CH), 4.33 (bs, 1H, Pro-α CH), 3.53 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.15–2.98 (m, 1H, Phe-β CH₂), 2.98–2.84 (m, 1H, Phe-β' CH₂), 2.68–2.50 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.19–2.05 (m, 1H, Pro-γ CH₂), 1.81 (bs, 1H, Pro-γ' CH₂), 1.69 (bs, 1H, Pro-β CH₂), 1.53 (bs, 1H, Pro-β' CH₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 207.06 (CO₂H), 172.31 (NCO Phe), 155.15 (CO₂C(CH₃)₃), 136.06 (Ph-C_q Phe), 129.36 (2 × Ph-*meta*-CH Phe), 128.49 (2 × Ph-*ortho*-CH Phe), 127.10 (Ph-*para*-CH Phe), 80.06 (CO₂C(CH₃)₃), 59.58 (Pro-α CH), 53.84 (Phe-α CH), 47.29 (Pro-δ CH₂), 39.76 (Phe-β CH₂), 28.28 (C(CH₃)₃), 27.88 (Pro-γ CH₂), 24.28 (Pro-β CH₂).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-phenylalanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Phe-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS31**, CS310^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 524 mg, 1.45 mmol (1.5 Äq.) Boc-(*S*)-Phe-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
2.45 g, 3.85 mmol (4.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

R_f: 0.13 (Petrolether/Diethylether [1/1]).

HPLC (p): R_t = 23.5 min (Methode I p).

Ausbeute: 140 mg, 213 μ mol, 22 %, hellgelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +20.1° (c = 1.00, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₇H₄₁N₃O₈, 655.29 [M]; gef.: 656.4 [M+H]⁺, 678.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 16.2 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.47–7.29 (m, 10H, 10 × Ph-CH CO₂CH₂Ph), 7.27–7.15 (m, 5H, 5 × Ph-CH Phe), 5.40 (d, 1H, NH, ³J = 8.00 Hz), 5.25–5.15 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.72–4.55 (m, 1H, Pro- α CH), 4.55–4.41 (m, 1H, Phe- α CH), 3.51 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.37–3.21 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.15–2.96 (m, 1H, Phe- β CH₂), 2.96–2.76 (m, 1H, Phe- β' CH₂), 2.60–2.45 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 2.24–1.97 (m, 2H, Pro- γ CH₂, Pro- β CH₂), 1.97–1.82 (m, 1H, Pro- β' CH₂), 1.82–1.65 (m, 1H, Pro- γ' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

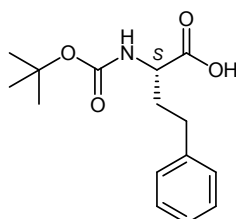
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.48 (NCO Pro), 170.31 (NCO Phe), 165.54 (2 × CO₂CH₂Ph), 154.86 (CO₂C(CH₃)₃), 136.52 (Ph-C_q Phe), 134.66 (2 × Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 129.74 (2 × Ph-*meta*-CH Phe), 129.47 (2 × Ph-*ortho*-CH Phe), 128.59, 128.35, 126.84 (10 × Ph-CH CO₂CH₂Ph), 126.68 (Ph-*para*-CH Phe), 79.56 (CO₂C(CH₃)₃), 67.98 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.42 (Phe- α CH), 53.61 (Pro- α CH), 46.47 (Pro- δ CH₂), 40.47 (Phe- β CH₂), 39.56 (2 × Azi-CH), 28.68 (Pro- β CH₂), 28.31 (C(CH₃)₃), 24.09 (Pro- γ CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3407 (w), 3031 (w), 2975 (w), 2928 (w), 1739 (s), 1705 (s), 1644 (s),

1497 (m), 1444 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1248 (m), 1169 (s), 1125 (m), 1079 (w),
1055 (w), 1020 (w), 909 (w), 867 (w), 748 (m), 697 (m).

12.1.20 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-homophenylalanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS32)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-homophenylalanin, Boc-(*S*)-hPhe



Methode: A1.

Ansatz: 1.0 g, 5.58 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-hPhe;
1.34 g, 6.14 mmol (1.1 Äq.) (Boc)₂O;
1.03 g, 12.3 mmol (2.2 Äq.) NaHCO₃;
200 ml H₂O/Dioxan, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 d RT.

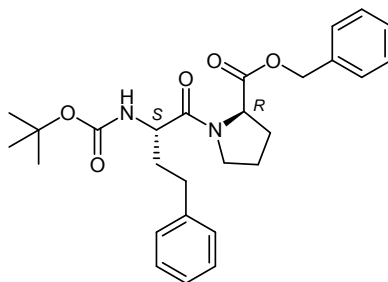
Ausbeute: 1.54 g, 5.52 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: -2.2 ° (c = 1.22, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.35–7.12 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.10–4.95 (m, 1H, NH), 4.44–4.25 (m, 1H, hPhe-α CH), 2.71 (t, 2H, hPhe-γ CH₂, ³J = 8.10 Hz), 2.29–2.11 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.09–1.89 (m, 1H, hPhe-β' CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 176.48 (CO₂H), 155.54 (CO₂C(CH₃)₃), 140.69 (Ph-C_q), 128.42, 128.36, (2 × Ph-ortho-CH, 2 × Ph-meta-CH), 126.09 (Ph-para-CH), 80.12 (CO₂C(CH₃)₃), 53.11 (hPhe-α CH), 34.09 (hPhe-β CH₂), 31.57 (hPhe-γ CH₂), 28.25 (C(CH₃)₃).

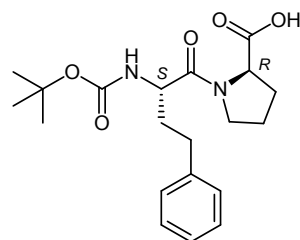
N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-homophenylalanyl-(*R*)-prolinbenzylester, Boc-(*S*)-hPhe-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B2.

- Ansatz: 2.0 g, 7.16 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-hPhe;
 2.70 g, 7.16 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
 1.10 g, 7.16 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
 1.55 g, 7.52 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 2.14 g, 14.3 mmol, 1.91 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1] → [4/1].
- R_f: 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).
- Ausbeute: 2.09 g, 4.47 mmol, 62 %, farbloser Feststoff.
- $[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +20.9 ° (c = 1.02, MeOH).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.35–7.21 (m, 5H, 5 × Ph-CH CO₂CH₂Ph), 7.20–7.08 (m, 5H, 5 × Ph-CH hPhe), 5.39 (d, 1H, NH, ³J = 8.60 Hz), 5.18, 5.10 (je d („dd“), 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 11.90 Hz), 4.60–4.46 (m, 1H, hPhe-α CH), 4.46–4.35 (m, 1H, Pro-α CH), 3.70–3.47 (m, 1H, Pro-δ CH₂), 3.35–3.18 (m, 1H, Pro-δ' CH₂), 2.68 (t, 2H, hPhe-γ CH₂, ³J = 7.85 Hz), 2.22–2.03 (m, 1H, Pro-β CH₂), 2.02–1.74 (m, 5H, Pro-β' CH₂, Pro-γ CH₂, hPhe-β CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.47 (CO₂CH₂Ph), 170.56 (NCO hPhe), 155.25 (CO₂C(CH₃)₃), 141.11 (Ph-C_q hPhe), 135.56 (Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 128.52, 128.42, 128.32, 127.91 (9 × Ph-CH), 126.91 (Ph-para-CH CO₂CH₂Ph), 79.42 (CO₂C(CH₃)₃), 66.63 (2 × CO₂CH₂Ph), 58.94 (Pro-α CH), 51.33 (hPhe-α CH), 46.58 (Pro-δ CH₂), 34.72 (hPhe-β CH₂), 31.26 (hPhe-γ CH₂), 28.87 (Pro-β CH₂), 28.23 (C(CH₃)₃), 24.46 (Pro-γ CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-homophenylalanyl-(R)-prolin, Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-OH

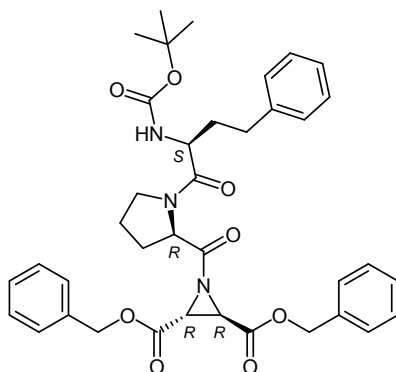


- Methode: A6a.
- Ansatz: 1.50 g, 3.21 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-OBn;
 160 mg Pd/C (10 %);
 40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.
- Ausbeute: 1.17 g, 3.11 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.
- Smp.: 42.8 °C.
- $[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +11.1 ° (c = 1.06, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.20 (bs, 1H, CO_2H), 7.20–7.09 (m, 5H, $5 \times \text{Ph-CH}$), 5.49 (d, 1H, NH , $^3J = 8.10$ Hz), 4.57–4.44 (m, 1H, hPhe- α CH), 4.44–4.33 (m, 1H, Pro- α CH), 3.76–3.49 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.32–3.07 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.83–2.52 (m, 2H, hPhe- γ CH_2), 2.30–2.09 (m, 1H, Pro- β CH_2), 2.09–1.76 (m, 5H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2 , hPhe- β CH_2), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.80 (CO_2H), 172.47 (NCO hPhe), 155.56 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 140.84 (Ph-C_q), 128.41, 128.28, 126.14 ($5 \times \text{Ph-CH}$), 79.92 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.69 (Pro- α CH), 51.47 (hPhe- α CH), 47.09 (Pro- δ CH_2), 34.21 (hPhe- β CH_2), 31.43 (hPhe- γ CH_2), 28.28 (Pro- β CH_2 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.52 (Pro- γ CH_2).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-homophenylalanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-hPhe-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS32**, CS340^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 544 mg, 1.45 mmol (1.5 Äq.) Boc-(*S*)-hPhe-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [4/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.40 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 24.4 min (Methode I p).

Ausbeute: 241 mg, 360 μmol , 24 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +10.5 ° (c = 1.04, MeOH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, 669.31 [M]; gef.: 670.5 [M+H]⁺, 692.5 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 16.4 min (Methode II).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.35–7.19 (m, 10H, $10 \times \text{Ph-CH}$ $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 7.19–6.98 (m, 5H, $5 \times \text{Ph-CH}$ hPhe), 5.33 (d, 1H, NH , $^3J = 8.70$ Hz), 5.20–5.04 (m, 4H, $2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.50–4.33 (m, 2H, Pro- α CH , hPhe- α CH), 3.59–3.35

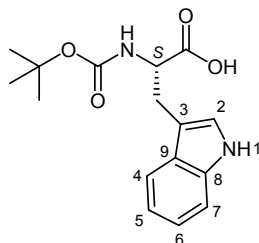
(m, 1H, Pro- δ $\underline{\text{CH}_2}$), 3.41 (s, 2H, 2 \times Azi- $\underline{\text{CH}}$), 3.22–3.08 (m, 1H, Pro- δ' $\underline{\text{CH}_2}$), 2.58 (t, 2H, hPhe- γ $\underline{\text{CH}_2}$, $^3J = 7.90$ Hz), 2.16–1.96 (m, 1H, Pro- β $\underline{\text{CH}_2}$), 1.96–1.83 (m, 3H, Pro- β' $\underline{\text{CH}_2}$, Pro- γ $\underline{\text{CH}_2}$, hPhe- β $\underline{\text{CH}_2}$), 1.83–1.62 (m, 2H, hPhe- β' $\underline{\text{CH}_2}$, Pro- γ' $\underline{\text{CH}_2}$), 1.34 (s, 9H, C($\underline{\text{CH}_3}$) $_3$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.48 ($\underline{\text{NCO}}$ Pro), 170.58 ($\underline{\text{NCO}}$ hPhe), 165.58 (2 \times $\underline{\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}}$), 155.34 ($\underline{\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 141.30 (Ph- $\underline{\text{C}_q}$ hPhe), 134.66 (2 \times Ph- $\underline{\text{C}_q}$ $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 128.69, 128.62, 128.36 (6 \times Ph-*meta*- $\underline{\text{CH}}$, 6 \times Ph-*ortho*- $\underline{\text{CH}}$ hPhe, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 125.98 (2 \times Ph-*para*- $\underline{\text{CH}}$ $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 125.61 (Ph-*para*- $\underline{\text{CH}}$ hPhe), 79.50 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 68.02 (2 \times $\text{CO}_2\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$), 60.55 (Phe- α $\underline{\text{CH}}$), 51.48 (Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 46.46 (Pro- δ $\underline{\text{CH}_2}$), 39.61 (2 \times Azi- $\underline{\text{CH}}$), 34.88 (hPhe- β $\underline{\text{CH}_2}$), 31.36 (hPhe- γ $\underline{\text{CH}_2}$), 28.75 (Pro- β $\underline{\text{CH}_2}$), 28.33 (C($\underline{\text{CH}_3}$) $_3$), 24.44 (Pro- γ $\underline{\text{CH}_2}$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3397 (w), 3030 (w), 2975 (w), 2930 (w), 1967 (w), 1738 (s), 1704 (s), 1644 (s), 1497 (m), 1454 (m), 1431 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1248 (m), 1167 (s), 1124 (m), 1081 (w), 1047 (w), 1023 (w), 907 (w), 868 (w), 748 (m), 697 (m).

12.1.21 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-tryptophanyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS33)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-tryptophan



Methode: A1.

Ansatz: 5.0 g, 24.5 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Trp;
5.88 g, 27.0 mmol (1.1 Äq.) (Boc) $_2$ O;
4.53 g, 53.9 mmol (2.2 Äq.) NaHCO_3 ;
60 ml H_2O /Dioxan, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 d RT.

Ausbeute: 7.20 g, 23.7 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 143.6 °C.

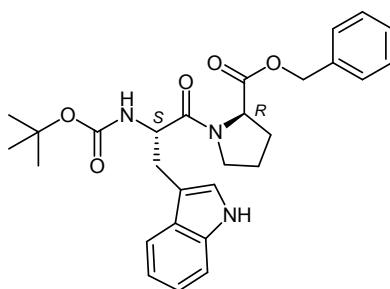
$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +0.10 ° (c = 1.02, MeOH).

^1H -NMR: (Aceton- d_6 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 10.04 (s, 1H, Indol- $\underline{\text{NH}}$), 7.62 (d, 1H, Indol-4- $\underline{\text{CH}}$, $^3J = 7.70$ Hz), 7.37 (d, 1H, Indol-7- $\underline{\text{CH}}$, $^3J = 8.00$ Hz), 7.22 (s, 1H, Indol-2- $\underline{\text{CH}}$), 7.10 (dd („t“), 1H, Indol-5- $\underline{\text{CH}}$, $^3J = 7.10$ Hz), 7.02 (dd („t“), 1H, Indol-6- $\underline{\text{CH}}$, $^3J = 7.10$ Hz), 5.90 (d, 1H, $\underline{\text{NH}}$ Trp, $^3J = 7.80$ Hz), 4.60–4.5 (m, 1H, Trp- α $\underline{\text{CH}}$),

3.36 (dd, 1H, Trp-*cis*- β $\underline{\text{CH}}_2$, $^2J = 14.70$ Hz, $^3J = 4.90$ Hz), 3.22 (dd, 1H, Trp-*trans*- β' $\underline{\text{CH}}_2$, $^2J = 14.70$ Hz, $^3J = 7.70$ Hz), 1.37 (s, 9H, C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$).

^{13}C -NMR: (Aceton- d_6 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.99 ($\underline{\text{CO}}_2\text{H}$), 156.22 ($\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 137.52 (Indol-8- $\underline{\text{C}}_q$), 128.70 (Indol-9- $\underline{\text{C}}_q$), 124.31 (Indol-2- $\underline{\text{CH}}$), 122.12 (Indol-5- $\underline{\text{CH}}$), 119.55 (Indol-6- $\underline{\text{CH}}$), 119.25 (Indol-4- $\underline{\text{CH}}$), 112.14 (Indol-7- $\underline{\text{CH}}$), 111.07 (Indol-3- $\underline{\text{C}}_q$), 79.24 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 55.16 (Trp- α $\underline{\text{CH}}$), 28.51 (C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$), 28.24 (Trp- β $\underline{\text{CH}}_2$).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-tryptophanyl-(R)-prolinbenzylester, Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-OBn



Methode: B4.

Ansatz: 2.42 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Trp;
3.0 g, 7.95 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn · pTsOH;
3.14 g, 8.27 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
2.37 g, 15.9 mmol, 2.12 ml (2.0 Äq.) NEt_3 ;
40 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 6 d RT.

SC: Chloroform.

R_f: 0.28 (Chloroform/Ethylacetat [4/1]).

Ausbeute: 1.0 g, 2.04 mmol, 25 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 37.5 °C.

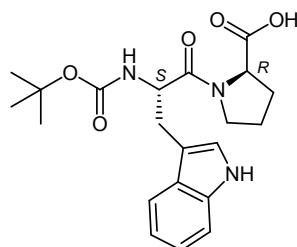
$[\alpha]_D^{20}$: +66.4 ° (c = 1.00, MeOH).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, Indol-NH Trp), 7.60 (d, 1H, Indol-4- $\underline{\text{CH}}$ Trp, $^3J = 7.80$ Hz), 7.42–7.26 (m, 6H, Indol-7- $\underline{\text{CH}}$ Trp, 5 × Ph- $\underline{\text{CH}}$ $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 7.23–7.00 (m, 3H, Indol-2- $\underline{\text{CH}}$, -5- $\underline{\text{CH}}$, -6- $\underline{\text{CH}}$ Trp), 5.51 (d, 1H, NH Trp, $^3J = 8.30$ Hz), 5.18, 5.06 (je d, 2H, $\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$, $^2J = 12.40$ Hz), 4.72–4.63 (m, 1H, Trp- α $\underline{\text{CH}}$), 4.29–4.16 (m, 1H, Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 3.43–3.31 (m, 1H, Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 3.26 (dd, 1H, Trp-*cis*- β $\underline{\text{CH}}_2$, $^2J = 13.95$ Hz, $^3J = 4.80$ Hz), 3.15 (dd, 1H, Trp-*trans*- β' $\underline{\text{CH}}_2$, $^2J = 13.95$ Hz, $^3J = 9.80$ Hz), 2.56–2.36 (m, 1H, Pro- δ' $\underline{\text{CH}}_2$), 1.93–1.70 (m, 1H, Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.70–1.55 (m, 2H, Pro- β' $\underline{\text{CH}}_2$, Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 1.45 (s, 9H, C($\underline{\text{CH}}_3$) $_3$), 1.18–0.97 (m, 1H, Pro- γ' $\underline{\text{CH}}_2$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.69 ($\underline{\text{CO}}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 170.84 ($\underline{\text{NCO}}$ Trp), 155.07

($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 135.94 (Ph- C_q $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 135.66 (Indol-8- C_q), 128.51, 128.18, 128.04 ($5 \times$ Ph- CH $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 127.59 (Indol-9- C_q Trp), 123.00 (Indol-2- CH Trp), 122.14 (Indol-5- CH Trp), 119.55 (Indol-6- CH Trp), 118.83 (Indol-4- CH Trp), 111.03 (Indol-7- CH Trp), 110.97 (Indol-3- C_q Trp), 79.54 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.70 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.01 (Pro- α CH), 53.41 (Trp- α CH), 46.61 (Pro- δ CH_2), 30.09 (Trp- β CH_2), 28.67 (Pro- β CH_2), 28.39 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.10 (Pro- γ CH_2).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-tryptophanyl-(R)-prolin, Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 850 mg, 1.73 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Trp-(R)-Pro-OBn;
167 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 12 h 10 bar H_2 bei RT.

Ausbeute: 688 mg, 1.71 mmol, 98 %, rostroter Feststoff.

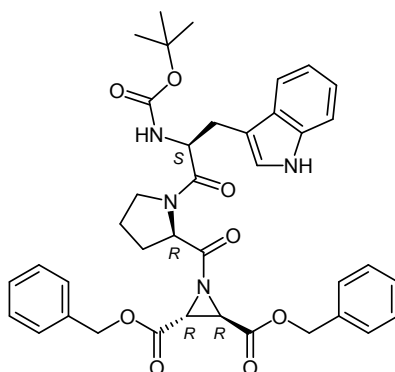
Smp.: 150.5 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +44.5 ° (c = 1.08, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.72 (s, 1H, Indol-NH Trp), 7.56 (d, 1H, Indol-4- CH Trp, $^3J = 7.60$ Hz), 7.30 (d, 1H, Indol-7- CH Trp, $^3J = 8.00$ Hz), 7.20–6.91 (m, 3H, Indol-2- CH , -5- CH , -6- CH Trp), 5.68 (d, 1H, NH Trp, $^3J = 8.10$ Hz), 4.75–4.62 (m, 1H, Trp- α CH), 4.31–4.08 (m, 1H, Pro- α CH), 3.49–3.31 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.31–2.95 (m, 2H, Trp- β CH_2), 2.51–2.41 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 2.01–1.75 (m, 1H, Pro- β CH_2), 1.75–1.51 (m, 1H, Pro- γ CH_2), 1.51–1.29 (m, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Pro- β' CH_2), 1.22–1.04 (m, 1H, Pro- γ' CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 174.02 (CO_2H), 172.53 (NCO Trp), 155.32 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 136.00 (Indol-8- C_q Trp), 127.40 (Indol-9- C_q Trp), 123.54 (Indol-2- CH Trp), 122.00 (Indol-5- CH Trp), 119.39 (Indol-6- CH Trp), 118.39 (Indol-4- CH Trp), 111.31 (Indol-7- CH Trp), 109.87 (Indol-3- C_q Trp), 79.94 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 60.04 (Pro- α CH), 53.47 (Trp- α CH), 47.14 (Pro- δ CH_2), 29.31 (Trp- β CH_2), 28.30 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.18 (Pro- β CH_2), 24.09 (Pro- γ CH_2).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-tryptophanyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Trp-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS33**, CS347^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 484 mg, 1.20 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Trp-(*R*)-Pro-OH;
300 mg, 964 μ mol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.23 g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [1/1].

R_f: 0.31 (Chloroform/Ethylacetat [5/1]).

HPLC (p): R_t = 21.9 min (Methode I p).

Ausbeute: 154 mg, 222 μ mol, 23 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +44.5 ° (c = 1.08, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₉H₄₂N₄O₈, 694.30 [M]; gef.: 693.2 [M-H]⁺.

LC-MS: R_t = 15.8 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.18 (s, 1H, Indol-NH Trp), 7.59 (d, 1H, Indol-4-CH Trp, ³J = 7.90 Hz), 7.47–7.27 (m, 11H, Indol-7-CH Trp, 10 \times Ph-CH CO₂CH₂Ph), 7.20–7.09 (m, 1H, Indol-5-CH Trp), 7.09–6.95 (m, 2H, Indol-2-CH, -6-CH Trp), 5.52 (d, 1H, NH Trp, ³J = 8.40 Hz), 5.20 (s, 4H, 2 \times CO₂CH₂Ph), 4.71–4.61 (m, 1H, Trp- α CH), 4.36–4.26 (m, 1H, Pro- α CH), 3.49 (s, 2H, 2 \times Azi-CH), 3.26 (dd, 1H, Trp-*cis*- β CH₂, ²J = 13.80 Hz, ³J = 4.70 Hz), 3.20–3.05 (m, 2H, Trp- β' CH₂, Pro- δ CH₂), 2.45–2.33 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 1.94–1.68 (m, 1H, Pro- β CH₂), 1.65–1.50 (m, 1H, Pro- γ CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.27–1.12 (m, 1H, Pro- β' CH₂), 1.09–0.93 (m, 1H, Pro- γ' CH₂).

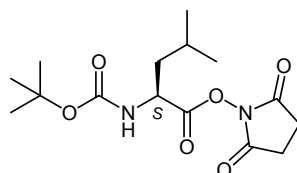
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 177.75 (NCO Pro), 171.03 (NCO Trp), 165.58 (2 \times CO₂CH₂Ph), 155.04 (CO₂C(CH₃)₃), 135.94 (Indol-8-C_q), 134.74 (2 \times Ph-C_q CO₂CH₂Ph), 128.78, 128.62 (10 \times Ph-CH CO₂CH₂Ph), 127.56 (Indol-9-C_q Trp), 123.01 (Indol-2-CH Trp), 122.21 (Indol-5-CH Trp), 119.53 (Indol-6-CH Trp), 118.88 (Indol-4-CH Trp), 111.03 (Indol-7-CH Trp), 110.95 (Indol-3-C_q Trp), 79.50

(CO₂C(CH₃)₃), 67.97 (2 × CO₂CH₂Ph), 60.77 (Pro-α CH), 53.36 (Trp-α CH), 46.37 (Pro-δ CH₂), 39.54 (2 × Azi-CH), 30.21 (Trp-β CH₂), 28.52 (Pro-β CH₂), 28.40 (C(CH₃)₃), 23.89 (Pro-γ CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3398 (w), 3035 (w), 2974 (w), 2156 (w), 1739 (s), 1702 (s), 1637 (s), 1497 (m), 1443 (m), 1366 (m), 1324 (m), 1256 (m), 1169 (s), 1125 (m), 1093 (w), 1010 (w), 866 (w), 794 (w), 740 (m), 697 (m).

12.1.22 (2R,3R)-Dibenzyl-1-((R)-5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanamido)pentanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (CS34)

(S)-2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanoat, Boc-(S)-Leu-OSu



Methode: B1a.

Ansatz: 5.0 g, 20.1 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-OH · H₂O;
3.0 g, 26.1 mmol (1.3 Äq.) N-Hydroxysuccinimid;
4.15 g, 20.1 mmol (1.0 Äq.) DCC;
50 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 d RT.

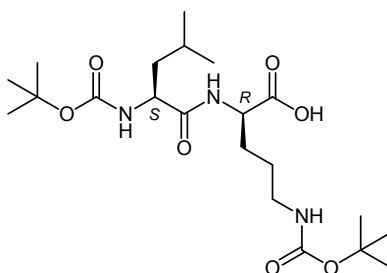
Ausbeute: 6.04 g, 18.4 mmol, 91 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -24.0 ° (c = 1.22, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.00–4.79 (m, 1H, NH), 4.75–4.53 (m, 1H, Leu-α CH), 2.81 (s, 4H, CO(CH₂)₂CO), 1.94–1.71 (m, 2H, Leu-β CH₂, Leu-γ CH), 1.71–1.55 (m, 1H, Leu-β' CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.06–0.86 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 168.95 (CO Leu), 168.59 (CO(CH₂)₂CO), 154.84 (CO₂C(CH₃)₃), 80.44 (CO₂C(CH₃)₃), 50.53 (Leu-α CH), 41.68 (Leu-β CH₂), 28.22 (C(CH₃)₃), 25.56 (CO(CH₂)₂CO), 24.67 (Leu-γ CH), 22.72, 21.72 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

(*R*)-5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanamido)pentansäure, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Orn(Boc)-OH



Methode: B1d.

Ansatz: 707 mg, 2.15 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-OSu;
500 mg, 2.15 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Orn(Boc);
289 mg, 3.44 mmol (1.6 Äq.) NaHCO₃;
10 ml H₂O, 20 ml Dioxan, Reaktionszeit: 6 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

R_f: 0.74 (Ethylacetat/Methanol [1/1]).

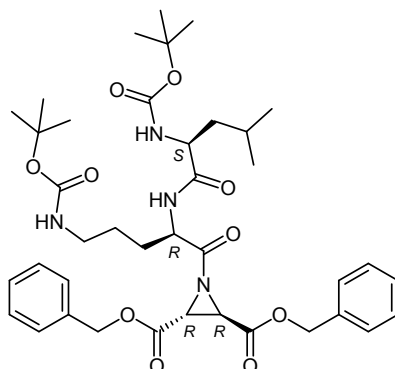
Ausbeute: 726 mg, 1.63 mmol, 75 %, farbloser Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: -17.4 ° (c = 1.04, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.24–7.10 (m, 1H, NH Orn), 5.49–5.28 (bs, 1H, Boc-NH Orn), 4.93–4.76 (bs, 1H, Boc-NH Leu), 4.64–4.48 (m, 1H, Orn-α CH), 4.47–4.21 (m, 1H, Leu-α CH), 3.25–2.97 (m, 2H, Orn-δ CH₂), 2.02–1.80 (m, 1H, Orn-β CH₂), 1.80–1.60 (m, 2H, Orn-β' CH₂, Leu-β CH₂), 1.60–1.47 (m, 4H, Leu-β' CH₂, Leu-γ CH, Orn-γ CH₂), 1.47–1.28 (m, 18H, 2 × C(CH₃)₃), 1.03–0.78 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 174.43 (CO₂H), 173.02 (NCO Leu), 156.08 (2 × CO₂C(CH₃)₃), 80.37, 79.33 (2 × CO₂C(CH₃)₃), 52.82 (Leu-α CH), 51.78 (Orn-α CH), 41.59 (Leu-β CH₂), 39.93 (Orn-δ CH₂), 29.42 (Orn-β CH₂), 28.36, 28.25 (2 × C(CH₃)₃), 25.83 (Orn-γ CH₂), 24.73 (Leu-γ CH), 22.92, 21.86 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-((*R*)-5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanamido)pentanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Orn(Boc)-(*R*,*R*)-Azi(OBn)₂ (**CS34**, CS384^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 427 mg, 958 μmol (1.06 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Orn(Boc)-OH;
280 mg, 899 μmol (1.0 Äq.) (*R*,*R*)-Azi(OBn)₂;
1.14 g, 1.80 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
10 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 d RT.

SC: Petrolether/Diethylether [2/1].

R_f: 0.24 (Chloroform/Ethylacetat [6/1]).

HPLC (p): R_t = 24.5 min (Methode I p).

Ausbeute: 68.0 mg, 92.0 μmol , 10 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -6.9 ° (c = 1.10, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₉H₅₄N₄O₁₀, 738.38 [M]; gef.: 761.5 [M+Na]⁺, 685.5 [M-Ph+Na]⁺, 609.5 [M-2Ph+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 11.8 min (Methode I).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.74 (d, 1H, NH Orn, ³J = 8.40 Hz), 5.22–5.12 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.81–4.66 (bs, 1H, Boc-NH Leu), 4.66–4.52 (m, 2H, Orn- α CH, Boc-NH Orn), 4.20–4.02 (m, 1H, Leu- α CH), 3.52 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.27–2.95 (m, 2H, Orn- δ CH₂), 2.11–1.89 (m, 1H, Orn- β CH₂), 1.84–1.60 (m, 3H, Orn- β' CH₂, Leu- β CH₂, Leu- γ CH), 1.60–1.48 (m, 2H, Orn- γ CH₂), 1.48–1.28 (m, 19H, Leu- β' CH₂, 2 × C(CH₃)₃), 0.92 (d, 6H, Leu- δ CH₃, Leu- δ' CH₃, ³J = 5.90 Hz).

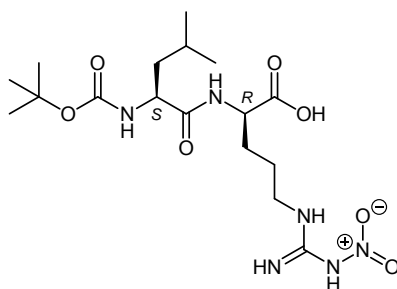
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.67 (NCO Orn), 171.98 (NCO Leu), 165.83 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.95 (2 × CO₂C(CH₃)₃), 134.41 (2 × Ph-C_q), 128.80, 128.72, 128.66 (10 × Ph-CH), 80.26, 79.05 (2 × CO₂C(CH₃)₃), 68.31 (2 × CO₂CH₂Ph), 53.31 (Orn- α CH, Leu- α CH), 40.97 (Leu- β CH₂), 40.05 (2 × Azi-CH), 39.84 (Orn- δ CH₂), 30.55 (Orn- β CH₂), 28.40, 28.25 (2 × C(CH₃)₃), 25.60 (Orn- γ CH₂), 24.78

(Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 23.07, 21.63 (Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3346 (m), 3034 (w), 2957 (m), 2929 (m), 2869 (w), 2159 (w), 1967 (w), 1743 (m), 1713 (m), 1685 (s), 1653 (s), 1516 (s), 1454 (w), 1386 (w), 1365 (m), 1327 (w), 1267 (m), 1249 (m), 1166 (s), 1095 (w), 1020 (w), 962 (w), 905 (w), 872 (w), 781 (w), 749 (w), 730 (w), 696 (w).

12.1.23 (2R,3R)-Dibenzyl-1-((R)-2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentan-amido)-5-(3-nitroguanidino)pentanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (CS35)

(R)-2-((S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-5-(3-nitroguanidino)pentansäure, Boc-(S)-Leu-(R)-Arg(NO₂)-OH



Methode: B1d.

Ansatz: 1.50 g, 4.56 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-OSu (Kap. 12.1.22);
1.0 g, 4.56 mmol (1.0 Äq.) (R)-Arg(NO₂);
289 mg, 3.44 mmol (1.6 Äq.) NaHCO₃;
15 ml H₂O, 25 ml Dioxan, Reaktionszeit: 2 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

R_f: 0.61 (Ethylacetat/Methanol [1/1]).

Ausbeute: 1.27 g, 2.94 mmol, 64 %, farbloser Feststoff.

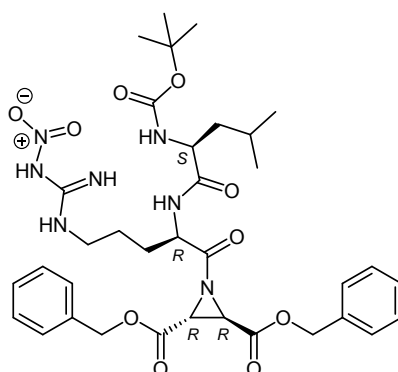
Smp.: 129.2 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -14.4 ° (c = 1.10, MeOH).

¹H-NMR: (MeOD, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.27–4.16 (m, 1H, Arg- α $\underline{\text{CH}}$), 4.10–4.00 (m, 1H, Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 3.29–3.15 (m, 2H, Arg- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 1.99–1.80 (m, 1H, Arg- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.74–1.54 (m, 4H, Arg- β' $\underline{\text{CH}}_2$, Leu- γ $\underline{\text{CH}}$, Arg- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 1.54–1.44 (m, 2H, Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 1.39 (s, 9H, C($\underline{\text{CH}}_3$)₃), 0.97–0.80 (m, 6H, Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

¹³C-NMR: (MeOD, 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.95 ($\underline{\text{CO}}_2\text{H}$), 175.39 (N $\underline{\text{CO}}$ Leu), 160.82 ($\underline{\text{C}}=\text{NH}$), 157.86 ($\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80.76 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 55.11 (Arg- α $\underline{\text{CH}}$), 54.89 (Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 42.20 (Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 41.89 (Arg- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 30.67 (Arg- β $\underline{\text{CH}}_2$), 28.72 (C($\underline{\text{CH}}_3$)₃), 26.11 (Arg- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 25.98 (Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 23.49, 21.84 (Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-((*R*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanamido)-5-(3-nitroguanidino)pentanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Arg(NO₂)-(R,R)-Azi(OBn)₂ (**CS35**, CS385^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 484 mg, 1.12 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Arg(NO₂)-OH;
280 mg, 899 µmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.14 g, 1.80 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
30 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [10/1] → [2/1].

R_f: 0.34 (Chloroform/Ethylacetat [1/2]).

HPLC (p): R_t = 18.4 min (Methode IV p).

Ausbeute: 245 mg, 338 µmol, 30 %, farbloser Feststoff.

[α]_D^{20 °C}: -11.6 ° (c = 1.16, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₃₅H₄₇N₇O₁₀, 725.34 [M]; gef.: 748.4 [M+Na]⁺, 672.4 [M-Ph+Na]⁺, 596.4 [M-2Ph+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 10.2 min (Methode I).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 7.08–6.99 (m, 1H, NH Arg), 5.20, 5.15 (je d („dd“), 4H, 2 × CO₂CH₂Ph, ²J = 12.45 Hz), 4.97–4.82 (bs, 1H, Boc-NH Leu), 4.75–4.58, 4.58–4.45 (je m, 1H, Arg-α CH), 4.24–4.03 (m, 1H, Leu-α CH), 3.54, 3.53 (je s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.47–3.29 (m, 1H, Arg-δ CH₂), 3.29–2.91 (m, 1H, Arg-δ' CH₂), 2.19–1.90 (m, 1H, Arg-β CH₂), 1.83–1.50 (m, 6H, Arg-β' CH₂, Arg-γ CH₂, Leu-γ CH, Leu-β CH₂), 1.42, 1.38 (je s, 9H, C(CH₃)₃), 1.00–0.80 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.58 (NCO Arg), 173.57 (NCO Leu), 165.80, 165.65 (2 × CO₂CH₂Ph), 159.36, 159.25 (C=NH), 155.93 (CO₂C(CH₃)₃), 134.34, 134.23 (2 × Ph-C_q), 128.89, 128.83, 128.74, 128.70, 128.68 (10 × Ph-CH), 80.65 (CO₂C(CH₃)₃), 68.45, 68.37 (2 × CO₂CH₂Ph), 53.68 (Leu-α CH), 52.72, 52.29 (Arg-α CH), 40.78 (Leu-β CH₂), 40.41 (Arg-δ CH₂), 40.26, 40.07 (2 × Azi-CH),

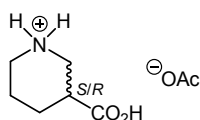
29.78 (Arg- β $\underline{\text{CH}}_2$), 28.20, 28.16 (C($\underline{\text{CH}}_3$)₃), 24.80, 24.64 (Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 24.21, 24.04 (Arg- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 22.99, 21.51 (Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3307 (m), 2958 (m), 2931 (m), 2871 (w), 1737 (m), 1708 (m), 1662 (m), 1625 (m), 1599 (m), 1522 (m), 1499 (m), 1455 (m), 1379 (m), 1366 (m), 1325 (m), 1254 (s), 1159 (s), 1109 (m), 1046 (w), 1022 (w), 906 (w), 873 (w), 847 (w), 784 (w), 749 (m), 696 (m).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.76 (bestimmt über $^1\text{H-NMR}$ an an Arg- α $\underline{\text{CH}}$), Epimerisierung an Arg- α $\underline{\text{CH}}$.

12.1.24 (2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-tert-butoxycarbonyl-(S/R)-nipecoty]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS36)

(S/R)-Nipecotinsäure (3-Piperidincarbonsäure)



Methode: F2.

Ansatz: 2.0 g, 16.2 mmol (1.0 Äq.) Nicotinsäure;
368 mg, 1.62 mmol (0.1 Äq.) PtO_2 ;
300 ml Essigsäure (0.25 M), Reaktionszeit: 3 h 40 bar H_2 bei 180 °C.

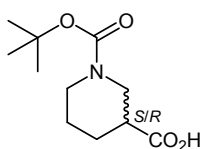
Ausbeute: 2.92 g, 15.5 mmol, 95 %, farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (MeOD, 400.13 MHz), δ [ppm] = 3.22–3.16 (m, 2H, Nip-2- $\underline{\text{CH}}_2$), 3.15–3.06 (m, 2H, Nip-6- $\underline{\text{CH}}_2$), 2.59–2.50 (m, 1H, Nip-3- $\underline{\text{CH}}$), 2.00–1.77 (m, 2H, Nip-4- $\underline{\text{CH}}_2$), 1.77–1.65 (m, 2H, Nip-5'- $\underline{\text{CH}}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (MeOD, 100.62 MHz), δ [ppm] = 179.75 ($\underline{\text{CO}}_2\text{H}$), 47.62 (Nip-2- $\underline{\text{CH}}_2$), 45.27 (Nip-6- $\underline{\text{CH}}_2$), 41.81 (Nip-3- $\underline{\text{CH}}$), 27.17 (Nip-4- $\underline{\text{CH}}_2$), 23.79 (Nip-5- $\underline{\text{CH}}_2$).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[248]

N-tert-Butoxycarbonyl-(S/R)-nipecotinsäure, Boc-(S/R)-Nip



Methode: A1.

Ansatz: 0.75 g, 5.81 mmol (1.0 Äq.) Nipecotinsäure;
1.39 g, 6.39 mmol (1.1 Äq.) $(\text{Boc})_2\text{O}$ in 10 ml Dioxan;
1.07 g, 12.8 mmol (2.2 Äq.) NaHCO_3 ;
10 ml H_2O , Reaktionszeit: 15 min 0 °C, 2 d RT.

Ausbeute: 1.17 g, 5.10 mmol, 88 %, farbloser Feststoff.

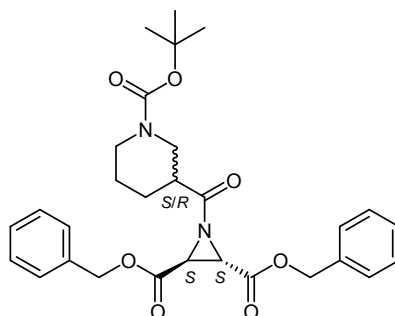
Smp.: 160 °C, Lit.: 155–157°C.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.10 (bs, 1H, Nip-2-CH₂), 3.92–3.80 (m, 1H, Nip-6-CH₂), 3.04 (bs, 1H, Nip-2'-CH₂), 2.85 (dt, 1H, Nip-6'-CH₂, ²J = 10.60 Hz, ³J = 3.0 Hz), 2.54–2.43 (m, 1H, Nip-3-CH), 2.08–2.04 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.74–1.59 (m, 2H, Nip-4'-CH₂, Nip-5-CH₂), 1.52–1.41 (m, 10H, Nip-5'-CH₂, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.97 (CO₂H), 154.72 (COC(CH₃)₃), 79.92 (C(CH₃)₃), 45.49 (Nip-2-CH₂), 44.04 (Nip-6-CH₂), 41.08 (Nip-3-CH), 27.13 (Nip-4-CH₂), 24.09 (Nip-5-CH₂).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[147]

(2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-[*N*-*tert*-butoxycarbonyl-(*S*/*R*)-nipecotyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat,
Boc-(*S*/*R*)-Nip-(*S*,*S*)-Azi(OBn)₂ (**CS36**, CS371^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 230 mg, 1.0 mmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*/*R*)-Nip;
250 mg, 803 µmol (1.0 Äq.) (*S*,*S*)-Azi(OBn)₂;
1.02 g, 1.61 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 4 d RT.

SC: Petrolether/Diethylether [2/1].

R_f: 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

HPLC (p): R_t = 24.4 min (Methode I p).

Ausbeute: 107 mg, 205 µmol, 25 %, hellgelber Feststoff.

ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₄N₂O₇, 522.24 [M]; gef.: 545.4 [M+Na]⁺.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.33 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.19 (m, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.28–4.13 (bs, 1H, Nip-2-CH₂), 4.10–3.88 (m, 1H, Nip-6-CH₂), 3.52, 3.51 (je s („d“), 2H, 2 × Azi-CH), 2.83 (bs, 1H, Nip-2'-CH₂), 2.74–2.61 (m, 1H, Nip-6'-CH₂), 2.37–2.22 (m, 1H, Nip-3-CH), 2.14–2.03 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.72–1.52 (m, 3H, Nip-4'-CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.36–1.20 (m, 1H, Nip-5-CH₂).

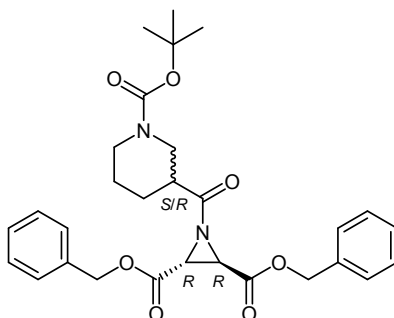
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.81 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{O}$ Nip), 166.16 ($2 \times \text{C}\underline{\text{O}}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 154.61, 154.54 ($\text{C}\underline{\text{O}}\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 134.51 ($2 \times \text{Ph}\text{-}\underline{\text{C}}_q$), 128.68, 128.61 ($10 \times \text{Ph}\text{-}\underline{\text{C}}_H$), 79.71 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.03 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 46.49 (Nip-2- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 45.25 (Nip-6- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 43.10 (Nip-3- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 39.92 ($2 \times \text{Azi}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 28.43 ($\text{C}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$), 26.48 (Nip-4- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 24.40 (Nip-5- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3033 (w), 2935 (w), 2860 (w), 1737 (s), 1686 (s), 1497 (w), 1455 (w), 1420 (m), 1381 (w), 1365 (m), 1323 (m), 1254 (m), 1176 (s), 1144 (s), 1025 (w), 1000 (w), 906 (w), 856 (w), 823 (w), 749 (m), 697 (m).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.95 (bestimmt über ^1H -NMR an Azi-CH).

12.1.25 (2R,3R)-Dibenzyl-1-[*N*-*tert*-butoxycarbonyl-(*S*/*R*)-nipecotyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat (CS37)

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-*tert*-butoxycarbonyl-(*S*/*R*)-nipecotyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*/*R*)-Nip-(*R*,*R*)-Azi(OBn)₂ (CS37, CS369)



Methode: B5b.

Ansatz: 275 mg, 1.20 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*/*R*)-Nip (Kap. 12.1.24);
300 mg, 964 μmol (1.0 Äq.) (*R*,*R*)-Azi(OBn)₂;
1.23g, 1.93 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.72 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 24.8 min (Methode I p).

Ausbeute: 66.0 mg, 126 μmol , 13 %, hellgelber Feststoff.

ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₄N₂O₇, 522.24 [M]; gef.: 545.3 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 6.9 min (Methode III).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.30 (m, 10H, $10 \times \text{Ph}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 5.25–5.16 (m, 4H, $2 \times \text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 4.23 (bs, 1H, Nip-2- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.09–3.88 (m, 1H, Nip-6- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.52, 3.50 (je s („d“), 2H, $2 \times \text{Azi}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 2.83 (bs, 1H, Nip-2'- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.76–2.59 (m, 1H, Nip-6'- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.40–2.22 (m, 1H, Nip-3- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 1.97–1.80 (m, 1H, Nip-4- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$),

1.75–1.51 (m, 3H, Nip-4'-CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.36–1.16 (m, 1H, Nip-5-CH₂).

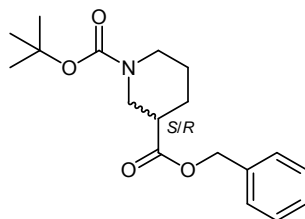
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.81 (NCO Nip), 166.12 (2 × CO₂CH₂Ph), 154.50 (COC(CH₃)₃), 134.49 (2 × Ph-C_q), 128.69, 128.62 (10 × Ph-CH), 79.72 (C(CH₃)₃), 68.09 (2 × CO₂CH₂Ph), 46.37 (Nip-2-CH₂), 45.29 (Nip-6-CH₂), 44.11 (Nip-3-CH₂), 39.92 (2 × Azi-CH), 28.36 (C(CH₃)₃), 26.48 (Nip-4-CH₂), 24.09 (Nip-5-CH₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3063 (w), 3033 (w), 2970 (w), 2934 (w), 2860 (w), 2158 (w), 1962 (w), 1737 (s), 1686 (s), 1497 (w), 1455 (m), 1420 (m), 1381 (m), 1365 (m), 1322 (m), 1255 (m), 1175 (s), 1144 (s), 1025 (w), 1000 (w), 906 (w), 855 (w), 823 (w), 808 (w), 748 (m), 697 (m).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.55 (bestimmt über ¹H-NMR an Azi-CH).

12.1.26 (2S,3S)-Bis(4-bromobenzyl)1-(1-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanoyl)piperidin-3-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (CS38)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S/R)-nipecotinsäurebenzylester, Boc-(S/R)-Nip-OBn



Methode: A5b.

Ansatz: 1.56 g, 6.80 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S/R)-Nip (Kap. 12.1.24);
0.74 g, 6.80 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol;
1.47 g, 7.14 mmol (1.05 Äq.) DCC;
83.0 mg, 0.68 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

R_f: 0.64 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

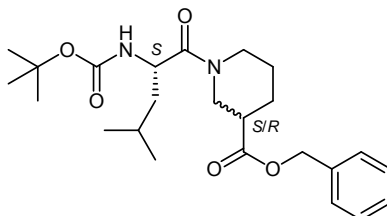
Ausbeute: 2.01 g, 6.29 mmol, 92 %, farblose hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.26 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.11 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.16 (bs, 1H, Nip-2-CH₂), 3.91 (d, 1H, Nip-6-CH₂, ²J = 12.75 Hz), 2.98 (bs, 1H, Nip-2'-CH₂), 2.78 (dt, 1H, Nip-6'-CH₂, ²J = 12.75 Hz, ³J = 3.00 Hz), 2.59–2.38 (m, 1H, Nip-3-CH), 2.16–1.96 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.80–1.53 (m, 2H, Nip-4'-CH₂, Nip-5-CH₂), 1.53–1.40 (m, 10H, Nip-5'-CH₂, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.89 (CO₂CH₂Ph), 154.33 (CO₂C(CH₃)₃),

135.53 (Ph-C_q), 128.24, 127.90 128.29, 127.72 (5 × Ph-CH), 79.37 (CO₂C(CH₃)₃), 65.95 (CO₂CH₂Ph), 45.33 (Nip-2-CH₂), 43.64 (Nip-6-CH₂), 41.13 (Nip-3-CH), 28.07 (C(CH₃)₃), 27.05 (Nip-4-CH₂), 23.95 (Nip-5-CH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-leucinyI-(S/R)-nipecotinsäurebenzylester, Boc-(S)-Leu-(S/R)-Nip-OBn



Methode: A2.

Ansatz: 1.98 g, 6.20 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S/R)-Nip-OBn;
7.07 g, 62.0 mmol, 4.78 ml (10.0 Äq.) TFA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 0.5 h RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B4.

Ansatz: 1.55 g, 6.20 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu · H₂O;
2.45 g, 6.45 mmol (1.04 Äq.) HBTU;
1.85 g, 12.4 mmol, 1.65 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
30 ml ACN, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

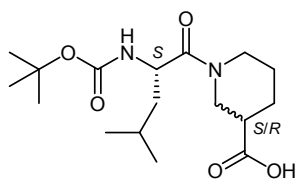
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1] → [5/1].

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

Ausbeute: 1.71 g, 3.96 mmol, 63 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.26 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.41–5.20 (m, 1H, NH), 5.19–5.03 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.78–4.57 (m, 1H, Leu-α CH), 4.30–3.90 (m, 1H, Nip-6-CH₂), 3.87–3.73 (m, 1H, Nip-2-CH₂), 3.39–3.14 (m, 1H, Nip-6'-CH₂), 3.14–3.02 (m, 1H, Nip-2'-CH₂), 2.69–2.36 (m, 1H, Nip-3-CH), 2.24–1.97 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.89–1.59 (m, 3H, Nip-4'-CH₂, Nip-5-CH₂, Leu-γ CH), 1.59–1.15 (m, 12H, Nip-5'-CH₂, Leu-β CH₂, C(CH₃)₃), 1.05–0.80 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.76 (CO₂CH₂Ph), 171.49 (NCO Leu), 155.52 (CO₂C(CH₃)₃), 135.67, 135.64 (Ph-C_q), 128.53, 128.43 128.36, 128.28, 128.23, 128.20, 128.15, 128.11, 128.07 (5 × Ph-CH), 79.39 (CO₂C(CH₃)₃), 66.67, 66.35 (CO₂CH₂Ph), 48.44 (Leu-α CH), 47.12 (Nip-6-CH₂), 43.99 (Nip-2-CH₂), 42.70 (Leu-β CH₂), 41.01 (Nip-3-CH), 28.29 (C(CH₃)₃), 27.28 (Nip-4-CH₂), 24.84 (Nip-5-CH₂), 24.55 (Leu-γ CH), 23.34, 21.66 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucinyl-(*S/R*)-nipecotinsäure, Boc-(*S*)-Leu-(*S/R*)-Nip-OH

Methode: A6a.

Ansatz: 1.20 g, 2.77 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*S/R*)-Nip-OBn;
139 mg Pd/C (10 %);
40 ml Methanol, Reaktionszeit: 1 h 10 bar H₂ bei RT.

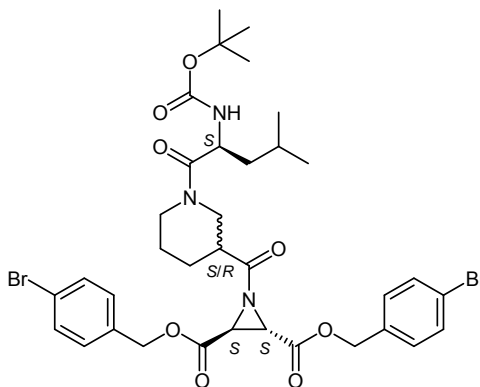
Ausbeute: 911 mg, 2.66 mmol, 96 %, hellbrauner Feststoff.

Smp.: 90.0 °C.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.87 (bs, 1H, CO₂H), 5.65–5.35 (m, 1H, NH), 4.90–4.71 (m, 1H, Leu-α CH), 4.71–3.92 (m, 2H, Nip-2-CH₂), 3.92–3.76 (m, 1H, Nip-6-CH₂), 3.35–2.80 (m, 1H, Nip-6'-CH₂), 2.66–2.32 (m, 1H, Nip-3-CH), 2.26–1.94 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.94–1.60 (m, 3H, Nip-4'-CH₂, Nip-5-CH₂, Leu-γ CH), 1.60–1.14 (m, 12H, Nip-5'-CH₂, Leu-β CH₂, C(CH₃)₃), 1.05–0.80 (m, 6H, Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.80 (CO₂H, NCO Leu), 155.68 (CO₂C(CH₃)₃), 79.91, 79.53 (CO₂C(CH₃)₃), 48.61 (Leu-α CH), 47.15, 46.09 (Nip-6-CH₂), 43.14, 42.98 (Nip-2-CH₂), 42.72 (Leu-β CH₂), 41.64 (Nip-3-CH), 28.31 (C(CH₃)₃), 27.23 (Nip-4-CH₂), 26.95 (Nip-5-CH₂), 24.58 (Leu-γ CH), 23.35, 21.83 (Leu-δ CH₃, Leu-δ' CH₃).

(2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)1-(1-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-methylpentanoyl)piperidin-3-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-(*S*)-Leu-(*S/R*)-Nip-(*S,S*)-Azi(*p*BrBn)₂ (CS38, CS365^{LJ})



Methode: B5c.

Ansatz: 228 mg, 666 μmol (1.25 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*S/R*)-Nip-OH;
250 mg, 533 μmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*S*)-Bis(4-bromobenzyl)aziridin-2,3-dicarboxylat;

678 mg, 1.07 mmol (2.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
160 mg, 1.07 mmol, 140 μ l (2.0 Äq.) NEt_3 ;
15 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 4 h 40 °C, 7 d RT.

SC: Petrolether/Diethylether [3/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.45 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

HPLC (p): R_t = 15.4 min (Methode V p).

R_t = 29.9 min (Methode VI p).

Ausbeute: 112 mg, 141 μ mol, 26 %, farbloser Feststoff.

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_8$, 791.14 [M]; gef.: 690.6 [M-Boc+H]⁺, 634.4 [M-2Br+H]⁺, 615.4 [M-Boc-Br+H]⁺, 559.3 [M-Boc-2Br+H]⁺.

LC-MS: R_t = 11.8 min (Methode II).

¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.52–7.45 (m, 4H, 4 \times Ph-ortho-CH), 7.32–7.12 (m, 4H, 4 \times Ph-meta-CH), 5.27 (d, 1H, NH, ³J = 8.80 Hz), 5.25–5.03 (m, 4H, 2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{PhBr}$), 4.78–4.33 (m, 2H, Leu- α CH, Nip-2-CH₂), 3.95–3.73 (m, 1H, Nip-6-CH₂), 3.60–3.45 (m, 2H, 2 \times Azi-CH), 3.20–2.92 (m, 1H, Nip-2'-CH₂), 2.84–2.47 (m, 1H, Nip-6'-CH₂), 2.46–2.03 (m, 1H, Nip-3-CH), 1.99–1.84 (m, 1H, Nip-4-CH₂), 1.83–1.62 (m, 3H, Nip-4'-CH₂, Nip-5-CH₂, Leu- γ CH), 1.57–1.17 (m, 12H, Nip-5'-CH₂, Leu- β CH₂, C(CH₃)₃), 1.09–0.80 (m, 6H, Leu- δ CH₃, Leu- δ' CH₃).

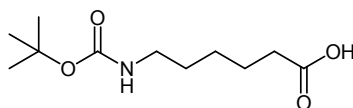
¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.41, 179.68 (NCO Nip), 171.92, 171.48 (NCO Leu), 165.94 (2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{PhBr}$), 155.66, 155.47 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 133.45 (2 \times CH₂-Ph-C_q), 131.93, 131.86 (je 2 \times Ph-2-CH, Ph-6-CH), 130.43, 130.36, 130.22 (je 2 \times Ph-3-CH, Ph-5-CH), 122.94 (2 \times Br-Ph-C_q), 79.50, 79.28 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.50, 67.31 (2 \times $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{PhBr}$), 48.51, 48.35 (Leu- α CH), 45.97, 45.53 (Nip-2-CH₂), 44.35, 43.27 (Nip-6-CH₂), 43.91, 43.71 (Nip-3-CH), 42.88, 42.82 (Leu- β CH₂), 39.94, 39.88 (2 \times Azi-CH), 28.36, 28.32 (C(CH₃)₃), 26.73, 26.45 (Nip-4-CH₂), 25.27, 24.67 (Nip-5-CH₂), 24.59, 24.56 (Leu- γ CH), 23.49, 23.37, 21.89, 21.70 (Leu- δ CH₃, Leu- δ' CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3411 (w), 2955 (m), 2930 (m), 2867 (w), 1739 (s), 1703 (s), 1640 (s), 1595 (w), 1489 (m), 1443 (m), 1407 (w), 1366 (m), 1324 (m), 1245 (m), 1171 (s), 1070 (m), 1046 (w), 1011 (m), 845 (w), 801 (m), 754 (w).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.73 (bestimmt über ¹H-NMR an Azi-CH).

12.1.27 (2S,3S)-Dibenzyl-1-[biotinyl-6-aminohexanoyl]-aziridine-2,3-dicarboxylat (bADA)

N-tert-Butoxycarbonylaminohexansäure, Boc-Ahx



Methode: A1.

Ansatz: 5.0 g, 38.1 mmol (1.0 Äq.) Aminohexansäure;
9.15 g, 41.9 mmol (1.1 Äq.) (Boc)₂O in 10 ml Dioxan;
7.04 g, 83.8 mmol (2.2 Äq.) NaHCO₃;
50 ml H₂O, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 d RT.

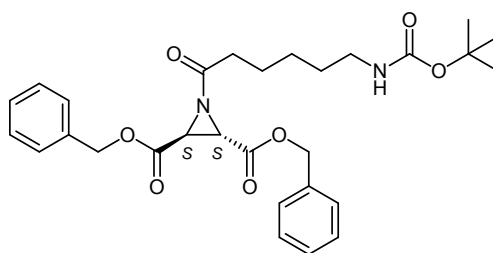
Ausbeute: 7.70 g, 33.3 mmol, 87 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.55 (bs, 1H, NH), 3.19–2.97 (m, 2H, Ahx-6-CH₂), 2.33 (t, 2H, Ahx-2-CH₂, ³J = 7.40 Hz), 1.64 (tt, 2H, Ahx-3-CH₂, ³J = 7.70 Hz, ³J = 7.50 Hz), 1.56–1.39 (m, 11H, Ahx-5-CH₂, C(CH₃)₃), 1.39–1.29 (m, 2H, Ahx-4-CH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.81 (CO₂H), 156.03 (CO₂C(CH₃)₃), 78.18 (C(CH₃)₃), 40.33 (Ahx-6-CH₂), 33.84 (Ahx-2-CH₂), 29.68 (Ahx-5-CH₂), 28.39 (C(CH₃)₃), 26.19 (Ahx-4-CH₂), 24.31 (Ahx-3-CH₂).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[249]

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexanoyl]-aziridine-2,3-dicarboxylat,
Boc-Ahx-(S,S)-Azi(OBn)₂



Methode: B5a.

Ansatz: 282 mg, 1.22 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx;
380 mg, 1.22 mmol (1.0 Äq.) (S,S)-Azi(OBn)₂;
2.33 g, 3.66 mmol (3.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
180 mg, 1.22 mmol, 160 µl (1.0 Äq.) NEt₃;
Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 4 d RT.

SC: Chloroform/Methanol [20/1].

R_f: 0.95 (Chloroform/Methanol [10/1]).

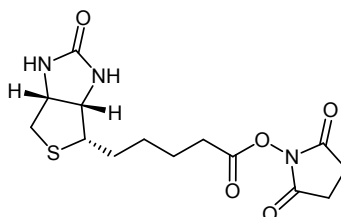
Ausbeute: 593 mg, 1.13 mmol, 93 %, hellgelbe hochviskose Flüssigkeit.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +12.3 ° (c = 1.08, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.32 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 5.19 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.51 (bs, 1H, NH), 3.47 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.09–3.06 (m, 2H, Ahx-6-CH₂), 2.37–2.30 (m, 1H, Ahx-2-CH₂), 2.22–2.15 (m, 1H, Ahx-2'-CH₂), 1.66–1.55 (m, 2H, Ahx-3-CH₂), 1.43 (s, 11H, Ahx-5-CH₂, C(CH₃)₃), 1.30–1.23 (m, 2H, Ahx-4-CH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.10 (Azi-NCO), 166.22 (2 × CO₂CH₂Ph), 155.94 (CO₂C(CH₃)₃), 134.47 (2 × Ph-C_q), 128.77, 128.68, 128.64, 128.60, 128.56, 128.52, 128.47, 128.42, 128.15, 127.54, 126.94 (10 × Ph-CH), 78.07 (C(CH₃)₃), 68.07 (CO₂CH₂Ph), 40.31 (Ahx-6-CH₂), 39.93 (2 × Azi-CH), 36.51 (Ahx-2-CH₂), 29.61 (Ahx-5-CH₂), 28.37 (C(CH₃)₃), 26.12 (Ahx-4-CH₂), 23.92 (Ahx-3-CH₂).

Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat



Methode: B1b.

Ansatz: 3.0 g, 12.3 mmol (1.0 Äq.) D-Biotin;

1.84 g, 16.0 mmol (1.3 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid;

2.54 g, 12.3 mmol (1.0 Äq.) DCC;

50 ml DMF, Reaktionszeit: 3 d RT, Ausfällen des Produkts in 200 ml siedendem Isopropanol.

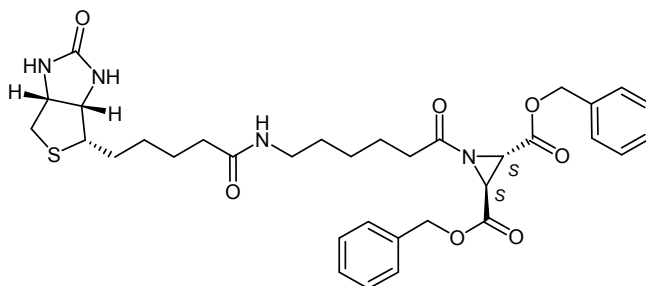
Ausbeute: 2.91 g, 8.54 mmol, 69 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 208 °C, Lit.: 208–210 °C.

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 6.40 (bs, 1H, Bio-8-NH), 6.34 (bs, 1H, Bio-10-NH), 4.32–4.28 (m, 1H, Bio-11-CH), 4.15–4.13 (m, 1H, Bio-7-CH), 3.43–3.38 (m, 1H, Bio-6-CH), 3.12–3.09 (m, 1H, Bio-*trans*-12-CH₂), 2.84–2.80 (m, 5H, Bio-*cis*-12-CH₂, COCH₂CH₂CO), 2.65 (t, 2H, Bio-2-CH₂, ³J = 7.35 Hz), 1.67–1.60 (m, 2H, Bio-3-CH₂), 1.47–1.35 (m, 4H, Bio-4-CH₂, Bio-5-CH₂).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[250]

(2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-[biotinyl-6-aminohexanoyl]-aziridine-2,3-dicarboxylat,
Bio-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (bADA, CS195^{LJ})



Methode: A2.

Ansatz: 346 mg, 0.66 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂;
750 mg, 6.60 mmol, 0.51 ml (10.0 Äq.) TFA;
5 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1 h RT.

Methode: B1c.

Ansatz: 355 mg, 0.66 mmol (1.0 Äq.) Ahx-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ · TFA;
187 mg, 0.66 mmol (1.0 Äq.) Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat;
197 mg, 1.32 mmol, 0.18 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
10 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 4 d RT.

SC: Chloroform → Chloroform/Methanol [20/1].

R_f: 0.33 (Chloroform/Methanol [10/1]).

Ausbeute: 228 mg, 0.35 mmol, 53 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 96.2 °C.

[α]_D^{20 °C}: +17.4 ° (c = 1.06, CHCl₃).

ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₂N₄O₇S, 650.28 [M]; gef.: 650.3 [M]⁺.

LC-MS: R_t = 9.1 min (Methode IV).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.39–7.33 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.34 (s, 1H, Bio-8-NH), 6.16 (t, 1H, NH Ahx, ³J = 5.50 Hz), 5.47 (s, 1H, Bio-10-NH), 5.18 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.48–4.45 (m, 1H, Bio-11-CH), 4.28–4.25 (m, 1H, Bio-7-CH), 3.46 (s, 2H, 2 × Azi-CH), 3.23–3.17 (m, 1H, Bio-6-CH), 3.14–3.09 (m, 2H, Ahx-6-CH₂), 2.88 (dd, 1H, Bio-*trans*-12-CH₂, ²J = 12.78 Hz, ³J = 5.00 Hz), 2.70 (d, 1H, Bio-*cis*-12-CH₂, ²J = 12.78 Hz), 2.39–2.29 (m, 1H, Ahx-2-CH₂), 2.24–2.15 (m, 3H, Ahx-2'-CH₂, Bio-2-CH₂), 1.74–1.51 (m, 6H, Bio-3-CH₂, Bio-5-CH₂, Ahx-3-CH₂), 1.47–1.39 (m, 4H, Bio-4-CH₂, Ahx-5-CH₂), 1.36–1.26 (m, 2H, Ahx-4-CH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.83 (Azi-NCO), 173.12 (Bio-1-CO), 166.25 (2 × CO₂CH₂Ph), 163.82 (Bio-9-CO), 134.47 (2 × Ph-C_q), 128.81, 128.60 (10 × Ph-CH), 68.13 (2 × CO₂CH₂Ph), 61.74 (Bio-7-CH), 60.14 (Bio-11-CH), 55.59 (Bio-6-CH), 40.50 (Bio-12-CH₂), 39.96 (2 × Azi-CH), 39.11 (Ahx-6-CH₂),

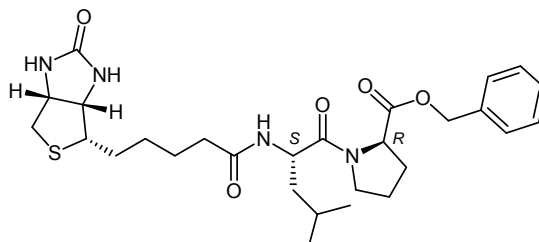
36.45 (Ahx-2- $\underline{\text{CH}}_2$), 35.98 (Bio-2- $\underline{\text{CH}}_2$), 29.10 (Ahx-5- $\underline{\text{CH}}_2$), 28.16 (Bio-5- $\underline{\text{CH}}_2$),
28.03 (Bio-3- $\underline{\text{CH}}_2$), 26.20 (Bio-4- $\underline{\text{CH}}_2$), 25.65 (Ahx-4- $\underline{\text{CH}}_2$), 23.88 (Ahx-3- $\underline{\text{CH}}_2$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3230 (m), 3066 (w), 2928 (m), 2856 (w), 1736 (m), 1698 (s), 1640 (m),
1547 (w), 1498 (w), 1455 (m), 1378 (w), 1325 (m), 1265 (m), 1185 (m), 1129 (w),
1016 (w), 907 (w), 735 (w), 696 (m).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[105]

12.1.28 (2S,3S)-Dibenzyl-1-((R)-1-((S)-4-methyl-2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (CS39)

(R)-Benzyl-1-((S)-4-methyl-2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat, Bio-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn



Methode: A2.

Ansatz: 1.0 g, 2.38 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn;
2.71 g, 23.8 mmol, 1.83 ml (10.0 Äq.) TFA;
20 ml DCM, 1 h 0 °C, 0.5 h RT.

Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B1c.

Ansatz: 1.03 g, 2.38 mmol (1.0 Äq.) (S)-Leu-(R)-Pro-OBn · TFA;
812 mg, 2.38 mmol (1.0 Äq.) D-Biotin-N-hydroxysuccinimidat (Kap 12.1.27);
710 mg, 4.76 mmol, 980 μl (2.0 Äq.) NEt_3 ;
10 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform \rightarrow Chloroform/Methanol [10/1].

R_f: 0.65 (Chloroform/Methanol [5/1]).

Ausbeute: 850 mg, 1.56 mmol, 66 %, farbloser kristalliner Feststoff.

Smp.#: 73.2 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +41.0 ° (c = 0.79, MeOH).

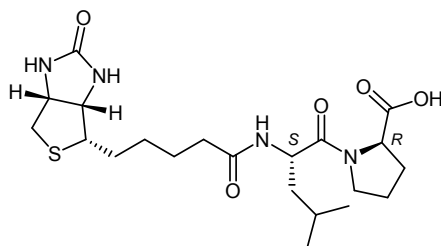
$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.42–7.24 (m, 5H, 5 \times Ph- $\underline{\text{CH}}$), 7.10 (d, 1H, $\underline{\text{NH}}$ Leu, $^3J = 9.00$ Hz), 6.64 (s, 1H, Bio-8- $\underline{\text{NH}}$), 6.00 (s, 1H, Bio-10- $\underline{\text{NH}}$), 5.22–5.06 (m, 2H, $\text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 4.96–4.85 (m, 1H, Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 4.52–4.38 (m, 2H, Pro- α $\underline{\text{CH}}$),

Bio-11-CH), 4.36–4.22 (m, 1H, Bio-7-CH), 4.03–3.90 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.65–3.43 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 3.16–3.02 (m, 1H, Bio-6-CH), 2.87 (dd, 1H, Bio-*trans*-12-CH₂, $^2J = 12.88$ Hz, $^3J = 5.05$ Hz), 2.74 (dd, 1H, Bio-*cis*-12'-CH₂, $^2J = 12.88$ Hz, $^3J = 3.75$ Hz), 2.37–2.09 (m, 4H, Bio-2-CH₂, Pro- β CH₂), 2.09–1.92 (m, 1H, Pro- γ CH₂), 1.80–1.51 (m, 7H, Pro- γ' CH₂, Leu- γ CH, Leu- β CH₂, Bio-3-CH₂, Bio-5-CH₂), 1.51–1.18 (m, 3H, Leu- β' CH₂, Bio-4-CH₂), 0.94, 0.87 (je d, 3H, Leu- δ CH₃, $^3J = 6.55$ Hz), 0.92, 0.74 (je d, 3H, Leu- δ' CH₃, $^3J = 6.55$ Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.77 (Bio-1-CO), 173.11, 172.91 (CO₂CH₂Ph), 172.02, 171.53 (NCO Leu), 164.60, 164.51 (Bio-9-CO), 135.67, 135.14 (Ph-C_q), 128.50, 128.45, 128.19, 128.12, 127.95, 127.80 (5 \times Ph-CH), 67.13, 66.60 (CO₂CH₂Ph), 62.07, 61.92 (Bio-7-CH), 60.21 (Bio-11-CH), 59.51, 59.17 (Pro- α CH), 55.71, 55.65 (Bio-6-CH), 49.17, 48.47 (Leu- α CH), 47.03, 46.54 (Pro- δ CH₂), 41.62 (Leu- β CH₂), 40.41, 39.87 (Bio-12-CH₂), 35.51, 35.19 (Bio-2-CH₂), 29.09 (Pro- β CH₂), 28.16, 28.08, 27.56, 27.40 (Bio-3-CH₂, Bio-5-CH₂), 25.40 (Bio-4-CH₂), 24.71 (Leu- γ CH), 24.60 (Pro- γ CH₂), 23.31 (Leu- δ CH₃), 22.00 (Leu- δ' CH₃).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.6 (bestimmt über ^1H -NMR an Leu- δ CH₃ und Leu- δ' CH₃).

(*R*)-Benzyl-1-((*S*)-4-methyl-2-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure, Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH



Methode: A6a.

Ansatz: 150 mg, 284 μmol (1.0 Äq.) Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn;
300 mg Pd/C;
40 ml MeOH, Reaktionszeit: 16 h bei 10 bar H_2 .

Ausbeute: 100 mg, 228 μmol , 80 %, farbloser kristalliner Feststoff.

Smp.#: 88.6 $^\circ\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +44.4 $^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS#: ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$: 454.22 [M]; gef: 477.25 [M+Na] $^+$, 931.52 [2M+Na] $^+$.

LC-MS: $R_t = 11.5$ min (Methode V).

^1H -NMR: (MeOD, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.83–4.67 (m, 1H, Leu- α CH), 4.65–4.54 (m, 1H, Bio-11-CH), 4.54–4.35 (m, 1H, Pro- α CH), 4.29–4.20 (m, 1H, Bio-7-CH),

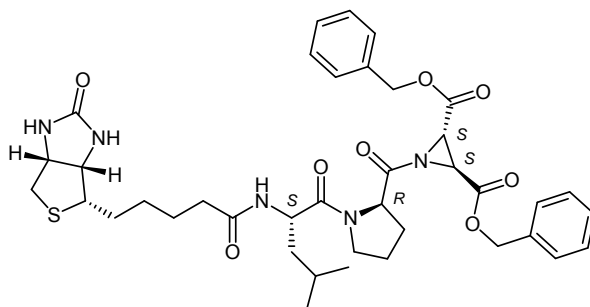
3.82–3.68 (m, 1H, Pro- δ CH_2), 3.55–3.45 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 3.18–3.07 (m, 1H, Bio-6- CH), 2.91–2.75 (m, 1H, Bio-*trans*-12- CH_2), 2.63 (d, 1H, Bio-*cis*-12'- CH_2 , $^2J = 12.80$ Hz), 2.27–2.05 (m, 3H, Bio-2- CH_2 , Pro- β CH_2), 2.05–1.74 (m, 3H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2), 1.74–1.46 (m, 7H, Leu- γ CH , Leu- β CH_2 , Bio-3- CH_2 , Bio-5- CH_2), 1.46–1.24 (m, 2H, Bio-4- CH_2), 0.90, 0.86 (je d, 3H, Leu- δ CH_3 , $^3J = 6.40$ Hz), 0.89, 0.82 (je d, 3H, Leu- δ' CH_3 , $^3J = 6.20$ Hz).

^{13}C -NMR: (MeOD, 100.62 MHz), δ [ppm] = 178.18, 177.80 (CO_2H), 175.84, 175.48 (Bio-1- CO), 173.89, 172.55 (NCO Leu), 166.10, 163.78 (Bio-9- CO), 63.25, 63.13 (Bio-11- CH), 61.65, 61.61 (Bio-7- CH), 60.40, 60.37 (Pro- α CH), 56.96, 56.80 (Bio-6- CH), 50.93, 50.64 (Leu- α CH), 47.90 (Pro- δ CH_2), 41.04, 41.02 (Leu- β CH_2), 40.53 (Bio-12- CH_2), 36.44, 36.16 (Bio-2- CH_2), 30.57 (Pro- β CH_2), 29.54, 29.35, 29.23 (Bio-3- CH_2 , Bio-5- CH_2), 26.75 (Bio-4- CH_2), 25.93, 25.72 (Leu- γ CH), 25.62 (Pro- γ CH_2), 22.12 (Leu- δ CH_3), 21.50 (Leu- δ' CH_3).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3261 (m), 2929 (m), 2868 (w), 1687 (m), 1619 (s), 1450 (m), 1397 (w), 1331 (w), 1261 (w), 1193 (w), 1166 (w), 1122 (w), 1078 (w), 1024 (w), 851 (w), 758 (w), 724 (w), 673 (w).

Diastereomerenverhältnis: 1:1 (bestimmt über ^1H -NMR an Leu- δ CH_3 und Leu- δ' CH_3).

(2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-((*R*)-1-((*S*)-4-methyl-2-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carbonyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)-Azi(OBn) $_2$ (**CS39**, CS163c^{LJ})



Methode: B5b.

Ansatz: 100 mg, 220 μmol (1.0 Äq.) Bio-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;

68.5 mg, 220 μmol (1.0 Äq.) (*S,S*)-Azi(OBn) $_2$;

700 mg, 1.10 mmol (5.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);

Reaktionszeit: 3 d bei RT.

HPLC (a): $R_t = 15.1$ min (Methode I a).

HPLC (p): $R_t = 13.5$ min (Methode VII p).

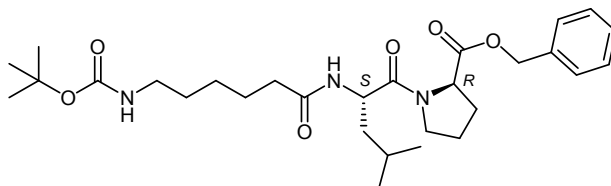
Ausbeute: 6.89 mg, 9.21 μmol , 4 %, hellgelber Feststoff.

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$, 747.33 [M]; gef.: 747.7 [M] $^+$.

LC-MS: $R_t = 8.7$ min (Methode IV; Reinheit: > 70 %).

12.1.29 (R)-Benzyl-1-((S)-4-methyl-2-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat

(R)-Benzyl-1-((S)-2-(6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat, Boc-Ahx-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn



Methode: A2.

Ansatz: 3.63 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn (Kap. 12.1.2);
9.86 g, 86.5 mmol, 6.66 ml (10.0 Äq.) TFA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1 h RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B2.

Ansatz: 3.74 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) (S)-Leu-(R)-Pro-OBn · TFA;
2.0 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.), Boc-Ahx (Kap. 12.1.27);
1.32 g, 8.65 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.87 g, 9.08 mmol (1.05 Äq.) DCC;
1.75 g, 17.3 mmol, 1.91 ml (2.0 Äq.) NMM;
20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

R_f : 0.28 (Ethylacetat/Cyclohexan [2/1]).

Ausbeute: 1.23 g, 2.32 mmol, 26 %, farbloser Feststoff.

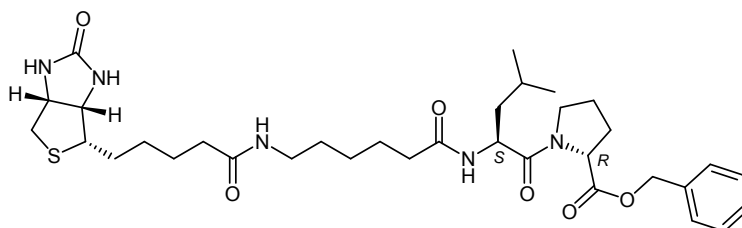
$[\alpha]_D^{20}$: +6.9 ° (c = 1.12, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.24 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.32 (d, 1H, NH Leu, ³J = 8.80 Hz), 5.21–5.03 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.97–4.80 (m, 1H, Leu- α CH), 4.80–4.58 (m, 1H, NH Ahx), 4.49–4.38 (m, 1H, Pro- α CH), 3.93–3.79 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.55–3.38 (m, 1H, Pro- δ' CH₂), 3.15–2.90 (m, 2H, Ahx-6-CH₂), 2.29–2.06 (m, 3H, Ahx-2-CH₂, Pro- β CH₂), 2.06–1.72 (m, 3H, Pro- β' CH₂, Pro- γ CH₂), 1.72–1.52 (m, 3H, Ahx-3-CH₂, Leu- γ CH), 1.52–1.33 (m, 13H, Ahx-5-CH₂, Leu- β CH₂, C(CH₃)₃), 1.33–1.22 (m, 2H, Ahx-4-CH₂), 0.95 (d, 3H, Leu- δ CH₃, ³J = 6.60 Hz), 0.89 (d, 3H, Leu- δ' CH₃, ³J = 6.60 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.02 (Ahx-1-CO), 172.36 (NCO Leu), 171.47

($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 155.92 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 135.55 (Ph-C_q), 128.59, 128.47, 128.16, 127.89 ($5 \times \text{Ph-CH}$), 78.86 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.71 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.01 (Pro- α CH), 48.68 (Leu- α CH), 46.90 (Pro- δ CH_2), 42.27 (Leu- β CH_2), 40.32 (Ahx-6- CH_2), 36.19 (Ahx-2- CH_2), 29.63 (Ahx-5- CH_2), 29.01 (Pro- β CH_2), 28.34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.24 (Ahx-4- CH_2), 25.09 (Ahx-3- CH_2), 24.62 (Leu- γ CH), 24.52 (Pro- γ CH_2), 23.24 (Leu- δ CH_3), 22.02 (Leu- δ' CH_3).

(*R*)-Benzyl-1-((*S*)-4-methyl-2-(6-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)pentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat, Bio-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn



Methode: A2.

Ansatz: 1.11 g, 2.13 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn;
2.43 g, 21.3 mmol, 1.64 ml (10.0 Äq.) TFA;
30 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1 h RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B1c.

Ansatz: 1.16 g, 2.13 mmol (1.0 Äq.) Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn · TFA;
727 mg, 2.13 mmol (1.0 Äq.) D-Biotin-*N*-hydroxysuccinimidat (Kap. 12.1.27);
636 mg, 4.26 mmol, 567 μl (2.0 Äq.) NEt_3 ;
30 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform \rightarrow Chloroform/Methanol [10/1].

R_f : 0.10 (Chloroform/Methanol [10/1]).

Ausbeute: 1.24 g, 1.89 mmol, 88 %, hellgelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: +34.3 ° ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS[#]: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$: 657.36 [M]; gef: 658.41 [M+H]⁺, 680.40 [M+Na]⁺, 696.38 [M+K]⁺, 1337.83 [2M+Na]⁺, 1353.80 [2M+K]⁺.

LC-MS: $R_t = 14.6$ min (Methode V).

¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.51–7.24 (m, 5H, $5 \times \text{Ph-CH}$), 7.01 (d, 1H, NH Leu, $^3J = 8.60$ Hz), 6.48 (s, 1H, Bio-8- NH), 5.94 (s, 1H, Bio-10- NH), 5.26–5.00 (m, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.94–4.76 (m, 1H, Leu- α CH), 4.59–4.40 (m, 2H, Pro- α CH , NH Ahx), 4.40–4.20 (m, 2H, Bio-11- CH , Bio-7- CH), 4.02–3.82 (m, 1H, Pro- δ

CH_2), 3.66–3.39 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 3.39–2.98 (m, 4H, Bio-6- CH , Bio-*trans*-12- CH_2 , Ahx-6- CH_2), 2.95–2.79 (m, 1H, Bio-*cis*-12'- CH_2), 2.79–2.49 (m, 2H, Bio-2- CH_2), 2.46–2.09 (m, 3H, Ahx-2- CH_2 , Pro- β CH_2), 2.09–1.80 (m, 3H, Pro- β' CH_2 , Pro- γ CH_2), 1.79–1.12 (m, 15H, Ahx-3- CH_2 , Leu- γ CH , Leu- β CH_2 , Ahx-5- CH_2 , Ahx-4- CH_2 , Bio-3- CH_2 , Bio-5- CH_2 , Bio-4- CH_2), 0.94, 0.84 (je d, 3H, Leu- δ CH_3 , $^3J = 6.50$ Hz), 0.90, 0.73 (je d, 3H, Leu- δ' CH_3 , $^3J = 6.50$ Hz).

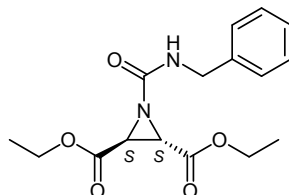
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 174.64, 174.26 (Ahx-1- CO), 173.26, 173.07 (Bio-1- CO), 172.01 (NCO Leu), 171.49 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 164.30, 164.28 (Bio-9- CO), 135.52, 135.02 (Ph- C_q), 128.66, 128.56, 128.24, 127.85 ($5 \times$ Ph- CH), 67.25, 66.74 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 62.12, 61.91 (Bio-7- CH), 60.17, 60.03 (Bio-11- CH), 59.62, 59.14 (Pro- α CH), 56.07, 55.69 (Bio-6- CH), 49.69, 48.91 (Leu- α CH), 47.01, 46.82 (Pro- δ CH_2), 41.73 (Leu- β CH_2), 40.64, 40.51 (Bio-2- CH_2), 39.71 (Bio-12- CH_2), 39.16, 38.95 (Ahx-6- CH_2), 35.84, 35.66 (Ahx-2- CH_2), 29.64 (Ahx-5- CH_2), 29.10, 28.84 (Pro- β CH_2), 28.06, 27.92, 27.83, 27.73 (Bio-3- CH_2 , Bio-5- CH_2), 26.21, 25.96 (Ahx-4- CH_2), 25.42, 25.36 (Bio-4- CH_2), 25.05, 24.88 (Ahx-3- CH_2), 24.72 (Pro- γ CH_2), 24.54, 24.47 (Leu- γ CH), 23.31 (Leu- δ CH_3), 21.94 (Leu- δ' CH_3).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3281 (m), 3087 (w), 2926 (m), 2865 (m), 1699 (s), 1628 (s), 1541 (m), 1452 (m), 1382 (w), 1365 (w), 1337 (w), 1265 (w), 1212 (w), 1166 (m), 1091 (w), 1045 (w), 998 (w), 918 (w), 871 (w), 747 (w), 697 (w).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.75 (bestimmt über ^1H -NMR an Leu- δ CH_3 und Leu- δ' CH_3).

12.1.30 (2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat (CS40)

Modellreaktion: (2*S*,3*S*)-Diethyl-1-(benzylcarbamoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat



Ansatz: 150 mg, 801 μmol (1.0 Äq.) (*S,S*)-Azi(OEt)₂;
117 mg, 881 μmol , 108 μl (1.1 Äq.) Benzylisocyanat;
10 ml DCM_{abs} , Reaktionszeit: 4 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

R_f: 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

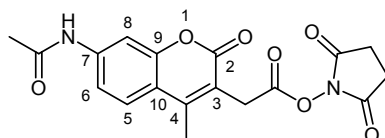
HPLC (a): R_t = 15.9 min (Methode III a).

HPLC (p): R_t = 34.2 min (Methode XII p).

Ausbeute: 39 mg, 122 μmol , 15 %, hellgelber Feststoff, Produkt ist verunreinigt.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.14 (m, 5H, 5 \times Ph- CH), 4.40 (d, 2H, NHCH_2Ph , $^3J = 6.10$ Hz), 4.22 (q, 4H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J = 7.10$ Hz), 3.43 (s, 2H, 2 \times Azi- CH), 1.29 (t, 6H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J = 7.15$ Hz).

Modellreaktion: 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-acetamido-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-acetat



Methode: B1a.

Ansatz: 50.0 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) 7-Amino-4-methyl-3-coumarinylessigsäure;
32.1 mg, 279 μmol (1.3 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid;
44.3 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) DCC;
5 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 7 d RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: F1.

Ansatz: 70.8 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat;
18.5 mg, 236 μmol (1.1 Äq.) Acetylchlorid;
5 ml DMF, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, 3 d RT.

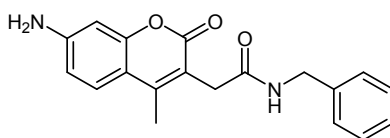
R_f : 0.56 (Ethylacetat).

Ausbeute: 80.0 mg, 210 μmol , 97 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 214.3 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 10.39 (s, 1H, AMC-7- $\text{C}_q\text{-NH}$), 7.80 (d, 1H, AMC-5- CH , $^3J = 8.78$ Hz), 7.77 (d, 1H, AMC-8- CH , $^4J = 2.08$ Hz), 7.47 (dd, 1H, AMC-6- CH , $^3J = 8.78$ Hz, $^4J = 2.08$ Hz), 4.06 (s, 2H, AMC-3- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{CONH}$), 2.78 (s, 4H, $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$), 2.42 (s, 3H, AMC-4- $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 2.09 (s, 3H, AMC-7- $\text{C}_q\text{-NHCOCH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 170.02 ($\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$), 169.17 (AMC-3- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{CO}_2$), 166.37 (AMC-7- $\text{C}_q\text{-NHCOCH}_3$), 160.44 (AMC-2- CO), 156.63 (AMC-7- C_q), 152.51 (AMC-9- C_q), 150.66 (AMC-4- C_q), 126.39 (AMC-5- CH), 115.30 (AMC-6- CH), 114.86, 114.71 (AMC-3- C_q , AMC-10- C_q), 105.20 (AMC-8- CH), 29.64 (AMC-3- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{CO}_2$), 25.43 ($\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$), 24.18 (AMC-7- $\text{C}_q\text{-NHCOCH}_3$), 15.08 (AMC-4- $\text{C}_q\text{-CH}_3$).

2-(7-Amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-*N*-benzylacetamid

Methode: B1a.

Ansatz: 50.0 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) 7-Amino-4-methyl-3-coumarinylessigsäure;
32.1 mg, 279 μmol (1.3 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid;
44.3 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) DCC;
5 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 7 d RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B1c.

Ansatz: 70.8 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat;
23.0 mg, 215 μmol (1.0 Äq.) Benzylamin;
8 ml DMF, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, 3 d RT.

R_f: 0.50 (Ethylacetat).

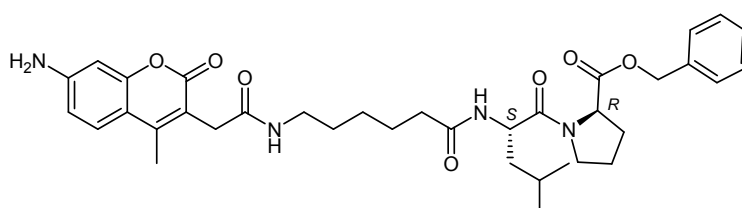
Ausbeute: 18.0 mg, 55.8 μmol , 26 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 226.8 °C (Zersetzung).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.34 (t, 1H, NHCH₂Ph, ³*J* = 5.90 Hz), 7.44 (d, 1H, AMC-5-CH, ³*J* = 8.65 Hz), 7.38–7.16 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.56 (dd, 1H, AMC-6-CH, ³*J* = 8.65 Hz, ⁴*J* = 2.20 Hz), 6.40 (d, 1H, AMC-8-CH, ⁴*J* = 2.20 Hz), 6.00 (s, 2H, NH₂), 4.25 (d, 2H, CONHCH₂Ph, ³*J* = 5.90 Hz), 3.46 (s, 2H, AMC-3-C_q-CH₂CONH), 2.25 (s, 3H, AMC-4-C_q-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 169.34 (CONHCH₂Ph), 161.60 (AMC-2-CO), 154.08 (AMC-7-C_q), 152.31 (AMC-9-C_q), 149.87 (AMC-4-C_q), 139.62 (Ph-C_q), 128.16 (2 × Ph-meta-CH), 127.03 (2 × Ph-ortho-CH), 126.61 (Ph-para-CH), 126.24 (AMC-5-CH), 113.37 (AMC-3-C_q), 111.25 (AMC-6-CH), 109.40 (AMC-10-C_q), 98.36 (AMC-8-CH), 42.18 (CONHCH₂Ph), 33.81 (AMC-3-C_q-CH₂CONH), 14.88 (AMC-4-C_q-CH₃).

(*R*)-Benzyl-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanami-
do)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carboxylat, AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn



Methode: B1a.

Ansatz: 264 mg, 1.13 mmol (1.0 Äq.) 7-Amino-4-methyl-3-coumarinylessigsäure;
169 mg, 1.47 μ mol (1.3 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid;
233 mg, 1.13 μ mol (1.0 Äq.) DCC;
5 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: A2.

Ansatz: 600 g, 1.13 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn (Kap. 3.1.29);
1.29 g, 11.3 mmol, 0.87 ml (10.0 Äq.) TFA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1 h RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B1c.

Ansatz: 620 mg, 1.13 mmol (1.0 Äq.) Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn · TFA;
373 mg, 1.13 mmol (1.0 Äq.) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat;
674 mg, 4.52 mmol, 602 μ l (4.0 Äq.) NEt₃;
20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [2/1] → Ethylacetat.

R_f: 0.12 (Ethylacetat).

Ausbeute: 647 mg, 1.0 mmol, 88 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 134.7 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +20.4 ° (c = 1.28, CHCl₃).

ESI-MS[#]: ber. f. C₃₆H₄₆N₄O₇: 646.34 [M]; gef: 647.40 [M+H]⁺, 669.38 [M+Na]⁺, 685.36 [M+K]⁺, 1315.79 [2M+Na]⁺, 1331.76 [2M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 18.9 min (Methode V).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38 (d, 1H, AMC-5-CH, ³J = 8.59 Hz), 7.36–7.28 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.73–6.68 (m, 1H, Ahx NH), 6.58 (dd, 1H, AMC-6-CH, ³J = 8.59 Hz, ⁴J = 2.25 Hz), 6.54 (d, 1H, AMC-8-CH, ⁴J = 2.25 Hz), 6.30 (d, 1H, Leu NH, ³J = 8.89 Hz), 5.21–5.06 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.86 (td, 1H, Leu- α CH, ³J = 8.89 Hz, ³J = 4.66 Hz), 4.51–4.36 (m, 1H, Pro- α CH), 3.93–3.79 (m, 1H, Pro- δ CH₂), 3.62–3.42 (m, 3H, Pro- δ' CH₂, AMC-3-C_q-CH₂CONH), 3.17 (td, 1H, Ahx-6-CH₂, ²J = 13.25 Hz, ³J = 6.86 Hz), 3.08 (td, 1H, Ahx-6'-CH₂, ²J = 13.25 Hz, ³J = 6.86 Hz), 2.46 (s, 3H, AMC-4-C_q-CH₃), 2.32–2.10 (m, 2H, Ahx-2-CH₂), 2.09–1.92 (m, 2H, Pro- β CH₂, Pro- γ CH₂), 2.06–1.52 (m, 5H, Ahx-3-CH₂, Pro- β' CH₂, Pro- γ' CH₂, Leu- γ CH), 1.50–1.32 (m, 4H, Ahx-5-CH₂, Leu- β CH₂), 1.32–1.13 (m, 2H, Ahx-4-CH₂), 0.95, 0.82* (je d, 3H, Leu- δ CH₃, ³J = 6.40 Hz, ³J* = 6.50 Hz),

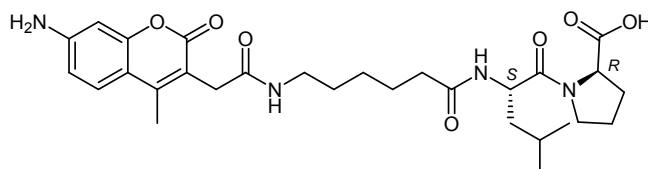
0.89, 0.75* (je d, 3H, Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J = 6.70$ Hz, $^3J^* = 6.50$ Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.57 (Ahx-1- $\underline{\text{CO}}$), 172.18, 172.01 ($\underline{\text{CO}}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 171.54, 171.42 ($\underline{\text{NCO}}$ Leu), 170.17 (AMC-3- C_q - $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{CONH}}$), 161.60 (AMC-2- $\underline{\text{CO}}$), 153.99, 153.97 (AMC-7- $\underline{\text{C}}_q$, AMC-9- $\underline{\text{C}}_q$), 150.42 (AMC-4- $\underline{\text{C}}_q$), 135.46, 134.99 (Ph- $\underline{\text{C}}_q$), 128.54, 128.43, 128.12, 128.09, 127.82 ($5 \times$ Ph- $\underline{\text{CH}}$), 126.02 (AMC-5- $\underline{\text{CH}}$), 114.76 (AMC-3- $\underline{\text{C}}_q$), 111.98 (AMC-6- $\underline{\text{CH}}$), 111.45 (AMC-10- $\underline{\text{C}}_q$), 100.38 (AMC-8- $\underline{\text{CH}}$), 66.08, 66.66 ($\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$), 59.32, 59.01 (Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 49.01, 48.68 (Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 46.88, 46.45 (Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$), 41.99 (Leu- β $\underline{\text{CH}}_2$), 39.25, 39.20 (Ahx-6- $\underline{\text{CH}}_2$), 36.07 (Ahx-2- $\underline{\text{CH}}_2$), 35.36 (AMC-3- C_q - $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{CONH}}$), 28.96, 28.88 (Ahx-5- $\underline{\text{CH}}_2$, Pro- β $\underline{\text{CH}}_2$), 26.19, 26.14 (Ahx-4- $\underline{\text{CH}}_2$), 24.98, 24.90 (Ahx-3- $\underline{\text{CH}}_2$), 24.55 (Leu- γ $\underline{\text{CH}}$), 24.51 (Pro- γ $\underline{\text{CH}}_2$), 23.19 (Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$), 21.91 (Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$), 15.28 (AMC-4- C_q - $\underline{\text{CH}}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3460 (m), 3357 (m), 3298 (m), 2952 (w), 2932 (w), 2866 (w), 2131 (w), 1741 (w), 1684 (m), 1632 (s), 1615 (s), 1597 (s), 1538 (m), 1434 (m), 1396 (w), 1352 (m), 1260 (w), 1233 (w), 1167 (m), 1092 (w), 971 (w), 941 (w), 855 (w), 807 (w), 780 (w), 736 (w), 697 (w).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.4 (bestimmt über ^1H -NMR an Leu- δ $\underline{\text{CH}}_3$ und Leu- δ' $\underline{\text{CH}}_3$).

(*R*)-1-((*S*)-2-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanamido)-4-methylpentanoyl)pyrrolidin-2-carbonsäure, AMCA-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Leu-OH



Methode: A6b.

Ansatz: 379 mg, 586 μmol (1.0 Äq.) AMC-Ahx-(*S*)-Leu-(*R*)-Leu-OBn;

124 mg Pd/C (10 %);

44.5 mg, 742 μmol , 42.4 μl (1.2 Äq.) Essigsäure;

20 ml Ethylacetat, 5 ml DMF, Reaktionszeit: 18 h 10 bar H_2 bei RT.

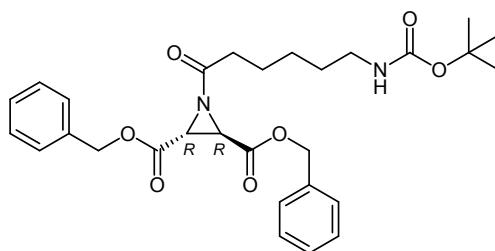
Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung und ohne vollständige Entfernung des Lösungsmittels DMF nach ^1H -spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 326 mg, 586 μmol , „100 %“ Rohausbeute, hellgelbe Lösung in DMF.

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.92 (s, DMF $\underline{\text{CHO}}$), 7.38–7.29 (m, 1H, AMC-5- $\underline{\text{CH}}$), 6.76–6.62 (m, 1H, Ahx $\underline{\text{NH}}$), 6.53 (d, 1H, AMC-6- $\underline{\text{CH}}$, $^3J = 8.60$ Hz), 6.46 (d, 1H, AMC-8- $\underline{\text{CH}}$, $^4J = 2.80$ Hz), 6.43–6.29 (m, 1H, Leu $\underline{\text{NH}}$), 4.84–4.66 (m, 1H, Leu- α $\underline{\text{CH}}$), 4.42–4.28 (m, 1H, Pro- α $\underline{\text{CH}}$), 4.13–3.93 (m, 3H, Pro- δ $\underline{\text{CH}}_2$, AMC-3-

C_q - CH_2CONH), 3.91–3.74 (m, 1H, Pro- δ' CH_2), 3.56–2.28 (m, 5H, Ahx-6- CH_2 , AMC-4- C_q - CH_3 , Überlagerung mit DMF-Signal $2 \times CH_3$), 2.17–2.00 (m, 2H, Ahx-2- CH_2), 2.01–1.07 (m, 13H, Pro- β CH_2 , Pro- γ CH_2 , Ahx-3- CH_2 , Leu- γ CH , Ahx-5- CH_2 , Leu- β CH_2 , Ahx-4- CH_2), 0.96–0.68 (m, 6H, Leu- δ CH_3 , Leu- δ' CH_3).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexanoyl)aziridin-2,3-dicarboxylat, Boc-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂



Methode: B5a.

Ansatz: 275 mg, 1.19 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx (Kap. 12.1.27);
 370 mg, 1.19 mmol (1.0 Äq.) (*R,R*)-Azi(OBn)₂;
 3.78 g, 5.95 mmol (5.0 Äq.) PPA (50 % in Ethylacetat);
 178 mg, 1.19 mmol, 159 μ l (1.0 Äq.) NEt₃;
 5 ml Ethylacetat, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

R_f: 0.57 (Chloroform/Ethylacetat [10/1]).

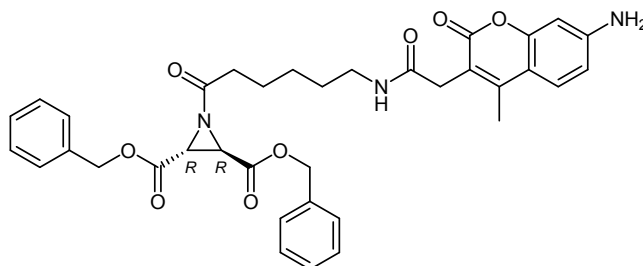
Ausbeute: 620 mg, 1.18 mmol, 99 %, hellgelbe hochviskose Flüssigkeit.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -22.0 ° (c = 1.24, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.29 (m, 10H, 10 \times Ph- CH), 5.19 (s, 4H, 2 \times CO₂ CH_2 Ph), 4.61–4.49 (bs, 1H, NH), 3.47 (s, 2H, 2 \times Azi- CH), 3.07 (d, 2H, Ahx-6- CH_2 , ³J = 5.90 Hz), 2.43–2.26 (m, 1H, Ahx-2- CH_2), 2.25–2.12 (m, 1H, Ahx-2'- CH_2), 1.60–1.50 (m, 2H, Ahx-3- CH_2), 1.50–1.34 (m, 11H, C(CH₃)₃, Ahx-5- CH_2), 1.34–1.21 (m, 2H, Ahx-4- CH_2).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.02 (Azi-NCO), 166.20 (2 \times CO₂CH₂Ph), 155.89 (CO₂C(CH₃)₃), 134.47 (2 \times Ph- C_q), 128.76 (2 \times Ph-*para*-CH), 128.66 (4 \times Ph-*meta*-CH), 128.59 (4 \times Ph-*ortho*-CH), 78.96 (C(CH₃)₃), 68.04 (2 \times CO₂CH₂Ph), 40.29 (Ahx-6- CH_2), 39.92 (2 \times Azi- CH), 36.50 (Ahx-2- CH_2), 29.64 (Ahx-5- CH_2), 28.37 (C(CH₃)₃), 26.12 (Ahx-4- CH_2), 23.92 (Ahx-3- CH_2).

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-(6-(2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetamido)hexanoyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat, AMCA-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (**CS40**, CS412^{LJ})



Methode: B1a.

Ansatz: 319 mg, 1.37 mmol (1.0 Äq.) 7-Amino-4-methyl-3-coumarinylelessigsäure;
205 mg, 1.78 μ mol (1.3 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid;
283 mg, 1.37 μ mol (1.0 Äq.) DCC;
20 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 8 d RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: A2.

Ansatz: 610 g, 1.16 mmol (1.0 Äq.) Boc-Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂;
1.32 g, 11.6 mmol, 894 μ l (10.0 Äq.) TFA;
10 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h bei 0 °C, 1 h bei RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B1c.

Ansatz: 620 mg, 1.16 mmol (1.0 Äq.) Ahx-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ · TFA;
452 mg, 1.37 mmol (1.18 Äq.) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetat;
346 mg, 2.32 mmol, 309 μ l (2.0 Äq.) NEt₃;
10 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 d RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [2/1] → Chloroform/Ethylacetat [1/1].

R_f: 0.58 (Ethylacetat).

Ausbeute: 425 mg, 664 μ mol, 57 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 159.6 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -16.8 ° (c = 1.06, CHCl₃).

λ_{abs} : 340.50 nm (c = 5.52 · 10⁻⁵ mol/l).

λ_{em} : 418.03 nm (c = 4.97 · 10⁻⁷ mol/l).

ESI-MS[#]: ber. f. C₃₆H₃₇N₃O₈: 639.26 [M]; gef: 640.32 [M+H]⁺, 662.30 [M+Na]⁺, 678.28 [M+K]⁺, 1301.63 [2M+Na]⁺, 1317.61 [2M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 15.6 min (Methode V).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.39 (d, 1H, AMC-5-CH, ³J = 8.63 Hz), 7.37–

7.28 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.56 (dd, 1H, AMC-6-CH, $^3J = 8.63$ Hz, $^4J = 2.23$ Hz), 6.52 (d, 1H, AMC-8-CH, $^4J = 2.23$ Hz), 6.39 (t, 1H, NH Ahx, $^3J = 5.50$ Hz), 5.18 (s, 4H, 2 × CO₂CH₂Ph), 4.18 (bs, 2H, NH₂), 3.50 (s, 2H, AMC-3-C_q-CH₂CONH), 3.45 (s, 2 × Azi-CH), 3.14 (dt, 2H, Ahx-6-CH₂, $^3J = 6.58$ Hz, $^3J = 6.67$ Hz), 2.47 (s, 3H, AMC-4-C_q-CH₃), 2.36–2.23 (m, 1H, Ahx-2-CH₂), 2.21–2.09 (m, 1H, Ahx-2'-CH₂), 1.55–1.66 (m, 2H, Ahx-3-CH₂), 1.48–1.34 (m, 2H, Ahx-5-CH₂), 1.30'–1.17 (m, 2H, Ahx-4-CH₂).

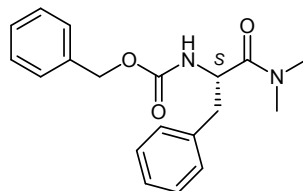
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 180.05 (Ahx-1-CO), 170.02 (AMC-3-C_q-CH₂CONH), 166.24 (2 × CO₂CH₂Ph), 163.35 (AMC-2-CO), 154.12 (AMC-7-C_q), 150.36, 149.99 (AMC-4-C_q, AMC-9-C_q), 134.52 (2 × Ph-C_q), 128.78 (2 × Ph-*para*-CH), 128.70 (4 × Ph-*meta*-CH), 128.63 (4 × Ph-*ortho*-CH), 126.28 (AMC-5-CH), 115.23 (AMC-3-C_q), 112.12 (AMC-6-CH), 111.93 (AMC-10-C_q), 100.77 (AMC-8-CH), 68.07 (2 × CO₂CH₂Ph), 39.92 (2 × Azi-CH), 39.30 (Ahx-6-CH₂), 36.49 (Ahx-2-CH₂), 35.79 (AMC-3-C_q-CH₂CONH), 29.10 (Ahx-5-CH₂), 26.20 (Ahx-4-CH₂), 23.89 (Ahx-3-CH₂), 15.41 (AMC-4-C_q-CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3465 (m), 3359 (m), 3302 (w), 3065 (w), 3040 (w), 2927 (w), 2865 (w), 2157 (w), 1968 (w), 1707 (m), 1684 (s), 1648 (s), 1614 (m), 1596 (s), 1550 (m), 1497 (w), 1455 (w), 1386 (w), 1354 (w), 1327 (m), 1278 (w), 1235 (w), 1184 (s), 1118 (w), 1073 (w), 1013 (w), 970 (w), 941 (w), 920 (w), 898 (w), 853 (w), 810 (w), 794 (w), 754 (w), 698 (w), 672 (w).

12.2 Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren

12.2.1 (2S,3S)-N²-((S)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-N³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)-oxiran-2,3-dicarboxamid (CLIK-148)

Benzyl-(S)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethylcarbammat



Methode: B2.

Ansatz: 3.0 g, 10.0 mmol (1.0 Äq.) *N*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-phenylalanin;
 10.0 mmol, 5.0 ml (1.0 Äq.) Dimethylamin in THF (2 M);
 1.53 g, 10.0 mmol (1.0 Äq.) HOBt·H₂O;
 1.11 g, 11.0 mmol, 1.21 ml (1.1 Äq.) NMM;
 2.17 g, 10.5 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Ethylacetat/Cyclohexan [3.5/1].

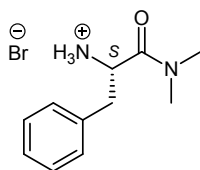
R_f: 0.18 (Ethylacetat/Cyclohexan [1/1]).

Ausbeute: 3.13 g, 9.60 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +19.0 ° (c = 1.06, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.45–7.41 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 7.35–7.30 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 5.80 (d, 1H, NH, ³J = 8.30 Hz), 5.19, 5.15 (je d („dd“), 2H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.30 Hz), 4.99–4.94 (m, 1H, Phe-α CH), 3.12–3.04 (m, 1H, Phe-β CH₂), 2.94 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)), 2.70 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)).

(S)-2-Amino-N,N-dimethyl-3-phenylpropanamid Hydrobromid



Methode: A4.

Ansatz: 1.12 g, 3.44 mmol (1.0 Äq.) Benzyl-(S)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl-carbammat;

15 ml HBr in Eisessig (35 %);

Reaktionszeit: 15 min RT.

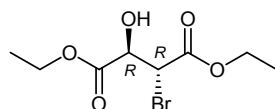
Ausbeute: 0.80 g, 2.91 mmol, 85 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 254.5 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +60.4 ° (c = 1.12, MeOH).

¹H-NMR: (D₂O, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.37–7.33 (m, 3H, 3 × Ph-CH), 7.22–7.18 (m, 2H, 2 × Ph-CH), 4.64 (t, 1H, Phe-α CH, ³J = 7.20 Hz), 3.10 (d, 2H, Phe-β CH₂, ³J = 7.20 Hz), 2.82 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)), 2.67 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)).

(2R,3R)-Diethyl-2-bromo-3-hydroxysuccinat



Methode: D1.

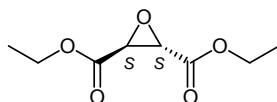
Ansatz: 1. Schritt: 15.0 g, 72.7 mmol, 12.4 ml (S,S)-Diethyltartrat (Diethyl-D(-)-tartrat);
45.0 ml HBr in Eisessig (~ 33 %), Reaktionszeit: 15 min 0 °C, 3 h RT.

2. Schritt: 4.0 ml HBr in Eisessig (~ 33 %);

150 ml Ethanol, Reaktionszeit: 5 h refluxieren.

Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

R_f: 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Diethyloxiran-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat

Methode: D2.

Ansatz: 19.7 g, 72.7 mmol Diethyl-(2*R*)-bromo-(3*S*)-hydroxysuccinat;
65.0 g K_2CO_3 ;
150 ml Aceton, Reaktionszeit: 2 d RT.

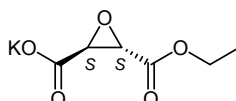
R_f : 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 2.94 g, 15.6 mmol, 22 %, farblose Flüssigkeit.

Sdp.: 89 °C (1.0 mbar), Lit.: 98–99 °C (4.0 mbar).

1H -NMR: ($CDCl_3$, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.26 (q, 4H, $2 \times CO_2CH_2CH_3$, $^3J = 7.10$ Hz), 3.65 (s, 2H, $2 \times$ Epo- \underline{CH}), 1.31 (t, 6H, $2 \times CO_2CH_2CH_3$, $^3J = 7.10$ Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[161]

Kalium-(2*S*,3*S*)-2-ethyloxiran-3-carboxylat

Methode: A8.

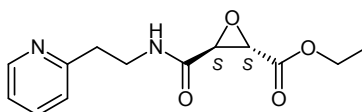
Ansatz: 2.93 g, 15.6 mmol (1.0 Äq.) Diethyloxiran-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat;
0.83 g, 14.8 mmol (0.95 Äq.) KOH;
30 ml Ethanol, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, Ausfällen des Produkts in 200 ml Diethyl-
ether.

Ausbeute: 2.09 g, 10.5 mmol, 67 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 132 °C (Zersetzung).

1H -NMR: (D_2O , 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.28 (q, 2H, $CO_2CH_2CH_3$, $^3J = 7.10$ Hz), 3.62 (d, 1H, Epo- $\underline{CH}CO_2K$, $^3J = 1.90$ Hz), 3.52 (d, 1H, Epo- $\underline{CH}CO_2Et$, $^3J = 1.90$ Hz), 1.29 (t, 3H, $CO_2CH_2CH_3$, $^3J = 7.10$ Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[163]

(2*S*,3*S*)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat

Methode: B5a.

Ansatz: 1.50 g, 7.57 mmol (1.0 Äq.) Kalium-(2*S*,3*S*)-2-ethyloxiran-3-carboxylat;
0.92 g, 7.57 mmol, 0.90 ml (1.0 Äq.) 2-(2-Aminoethyl)-pyridin;

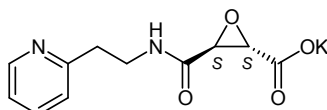
14.4 g, 22.7 mmol, 13.2 ml (3.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);
 0.77 g, 7.57 mmol, 0.84 ml (1.0 Äq.) NMM;
 30 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

R_f: 0.15 (Ethylacetat/Cyclohexan [2/1]).

Ausbeute: 1.38 mg, 5.22 mmol, 69 %, hellbraune hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.52 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.10 Hz), 7.65–7.56 (m, 1H, Pyr-4-CH), 7.15–7.12 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 4.28–4.18 (m, 2H, CO₂CH₂CH₃), 3.72–3.65 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.62 (s, 1H, Epo-CHCONH), 3.41 (s, 1H, Epo-CHCO₂), 2.99–2.95 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 1.28 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.10 Hz).

Kalium-(2S,3S)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat



Methode: A8.

Ansatz: 1.38 g, 2.38 mmol (1.0 Äq.) (2S,3S)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat;
 0.13 g, 2.26 mmol (0.95 Äq.) KOH;
 15 ml Ethanol, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, Ausfällen des Produkts in 200 ml Diethylether.

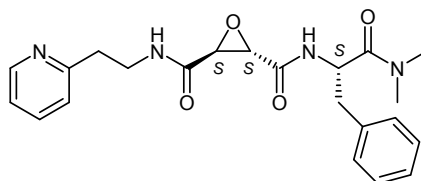
Ausbeute: 950 mg, 3.46 mmol, 69 %, gelber Feststoff.

Smp.: 127.5 °C.

[α]_D^{20 °C}: +4.1 ° (c = 1.02, H₂O).

¹H-NMR: (D₂O, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.45 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.30 Hz), 7.81 (dd („t“), 1H, Pyr-4-CH, ³J = 6.60 Hz), 7.35–7.28 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 3.62–3.54 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.40 (d, 1H, Epo-CHCONH, ³J = 1.75 Hz), 3.26 (d, 1H, Epo-CHCO₂K, ³J = 1.75 Hz), 2.97 (t, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH, ³J = 6.60 Hz).

(2S,3S)-N²-((S)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-N³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxiran-2,3-dicarboxamid (CLIK-148, CS180^{LJ})



Methode: B5a.

Ansatz: 0.45 g, 1.64 mmol (1.0 Äq.) Kalium-(2S,3S)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxi-

ran-2-carboxylat;

0.45 g, 1.64 mmol (1.0 Äq.) (S)-2-Amino-*N,N*-dimethyl-3-phenylpropanamid Hydrobromid;

3.13 g, 4.92 mmol, 2.87 ml (3.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);

0.49 g, 3.28 mmol, 0.44 ml (2.0 Äq.) NEt_3 ;

10 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 3 d RT.

SC: Dichlormethan/Methanol [20/1]).

R_f : 0.70 (Dichlormethan/Methanol [10/1]).

HPLC (a): $R_t = 2.7$ min (Methode I a).

HPLC (p): $R_t = 2.8$ min (Methode VIII p).

Ausbeute: 379 mg, 0.92 mmol, 56 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 74.5 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: +4.9 ° (c = 1.10, CHCl_3).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$, 410.20 [M]; gef.: 411.0 [M+H]⁺.

LC-MS: $R_t = 2.0$ min (Methode IV).

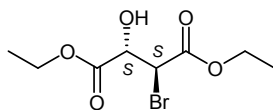
¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.51 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.30 Hz), 7.60 (ddd, 1H, Pyr-4-CH, ³J = 7.73 Hz, ³J = 7.73 Hz, ⁴J = 1.73 Hz), 7.29–7.20 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 7.16–7.09 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 7.09–7.05 (m, 1H, NH(CH_2)₂-Pyr), 6.91 (d, 1H, NH Phe, ³J = 8.30 Hz), 5.12–5.05 (m, 1H, Phe- α CH), 3.72–3.58 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.35 (d, 1H, Epo-CHCONH(CH_2)₂-Pyr, ³J = 2.00 Hz), 3.27 (d, 1H, Epo-CHCONH-Phe, ³J = 2.00 Hz), 3.00–2.94 (m, 4H, Pyr- CH_2 -CH₂NH, Phe- β CH₂), 2.87 (s, 3H, CON(CH₃CH₃)), 2.68 (s, 3H, CON(CH₃CH₃)₂).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 170.40 (CON(CH_3)₂), 165.17 (Epo-CONH-Phe), 159.07 (Epo-CONH(CH_2)₂-Pyr), 149.22 (Pyr-6-CH), 136.67 (Pyr-4-CH), 135.64 (Ph-C_q), 129.34 (2 × Ph-*ortho*-CH), 128.52 (2 × Ph-*meta*-CH), 127.24 (Ph-*para*-CH), 123.40, 121.72 (Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 54.77 (Epo-CHCONH-Phe), 54.63 (Epo-CHCONH(CH_2)₂-Pyr), 49.43 (Phe- α CH), 39.32 (NHCH₂CH₂Pyr), 38.05 (NHCH₂CH₂Pyr), 36.86 (CON(CH₃)₂), 36.82 (Phe- β CH₂), 35.61 (CON(CH₃)₂).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3281 (m), 3062 (w), 2936 (w), 1628 (s), 1594 (m), 1505 (m), 1454 (w), 1437 (w), 1419 (w), 1402 (w), 1369 (w), 1345 (w), 1305 (w), 1257 (w), 1217 (w), 1148 (w), 1081 (w), 1002 (w), 749 (w), 700 (w), 664 (w).

12.2.2 (2*R*,3*R*)-*N*²-((*S*)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-*N*³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)-oxiran-2,3-dicarboxamid (CS41)

(2*S*,3*S*)-Diethyl-2-bromo-3-hydroxysuccinat

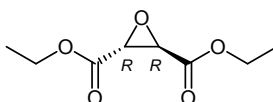


Methode: D1.

Ansatz: 1. Schritt: 15.0 g, 72.7 mmol, 12.4 ml (*R,R*)-Diethyltartrat;
44.0 ml HBr in Eisessig (~ 33 %), Reaktionszeit: 15 min 0 °C, 4 h RT.
2. Schritt: 6.0 ml HBr in Eisessig (~ 33 %);
150 ml Ethanol, Reaktionszeit: 5 h refluxieren.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

R_f: 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Diethyloxiran-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat



Methode: D2.

Ansatz: 19.7 g, 72.7 mmol Diethyl-(2*R*)-bromo-(3*S*)-hydroxysuccinat;
60.0 g K₂CO₃;
150 ml Aceton, Reaktionszeit: 3 d RT.

R_f: 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

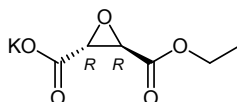
Ausbeute: 4.77 g, 25.3 mmol, 35 %, farblose hochviskose Flüssigkeit.

Sdp.: 103 °C (7.6 mbar).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.25 (q, 4H, 2 × CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.20 Hz), 3.65 (s, 2H, 2 × Epo-CH), 1.31 (t, 6H, 2 × CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.20 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[161]

Kalium-(2*R*,3*R*)-2-ethyloxiran-3-carboxylat



Methode: A8.

Ansatz: 4.76 g, 25.3 mmol (1.0 Äq.) Diethyloxiran-(2*R*,3*R*)-dicarboxylat;
1.35 g, 24.0 mmol (0.95 Äq.) KOH;
55 ml Ethanol, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, Ausfällen des Produkts in 200 ml Diethyl-
ether.

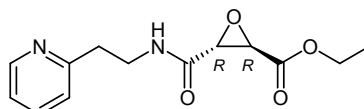
Ausbeute: 2.56 g, 12.9 mmol, 51 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 132.5 °C.

¹H-NMR: (D₂O, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.20 (q, 2H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.15 Hz), 3.53 (d, 1H, Epo-CHCO₂K, ³J = 1.95 Hz), 3.44 (d, 1H, Epo-CHCO₂Et, ³J = 1.95 Hz), 1.21 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.15 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[163]

(2*R*,3*R*)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat



Methode: B5a.

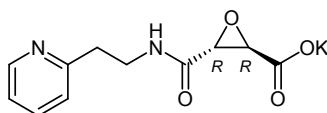
Ansatz: 2.00 g, 10.1 mmol (1.0 Äq.) Kalium-(2*R*,3*R*)-2-ethyloxiran-3-carboxylat;
1.23 g, 10.1 mmol, 1.20 ml (1.0 Äq.) 2-(2-Aminoethyl)-pyridin;
19.3 g, 30.3 mmol, 17.7 ml (3.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);
1.02 g, 110.1 mmol, 1.11 ml (1.0 Äq.) NEt₃;
30 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

R_f: 0.07 (Ethylacetat/Cyclohexan [2/1]).

Ausbeute: 1.50 g, 5.68 mmol, 56 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.52 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.80 Hz), 7.61 (ddd, 1H, Pyr-4-CH, ³J = 7.70 Hz, ³J = 7.70 Hz, ⁴J = 1.80 Hz), 7.16–7.12 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 4.29–4.18 (m, 2H, CO₂CH₂CH₃), 3.76–3.65 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.63 (d, 1H, Epo-CHCONH, ³J = 1.75 Hz), 3.42 (d, 1H, Epo-CHCO₂, ³J = 1.75 Hz), 2.97 (t, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH, ³J = 6.30 Hz), 1.29 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.20 Hz).

Kalium-(2*R*,3*R*)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat



Methode: A8.

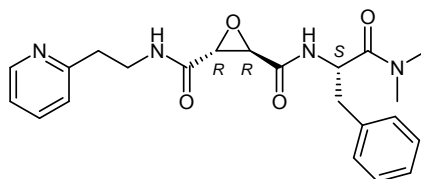
Ansatz: 1.50 g, 5.68 mmol (1.0 Äq.) (2*R*,3*R*)-Ethyl-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat;
0.30 g, 5.40 mmol (0.95 Äq.) KOH;
20 ml Ethanol, Reaktionszeit: 2 h 0 °C, Ausfällen des Produkts in 200 ml Diethylether.

Ausbeute: 941 mg, 3.43 mmol, 60 %, gelber Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +10.5 ° (c = 1.18, H₂O).

¹H-NMR: (D₂O, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.43 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.30 Hz), 7.80 (dd („t“), 1H, Pyr-4-CH, ³J = 7.70 Hz), 7.34–7.31 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 3.66–3.54 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.40 (s, 1H, Epo-CHCONH), 3.26 (s, 1H, Epo-CHCO₂K), 2.97 (t, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH, ³J = 6.70 Hz).

(2*R*,3*R*)-*N*²-((*S*)-1-(dimethylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-*N*³-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxiran-2,3-dicarboxamid (**CS41**, CS175^{LJ})



Methode: B5a.

Ansatz: 0.45 g, 1.64 mmol (1.0 Äq.) Kalium-(2*R*,3*R*)-3-(2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl)oxiran-2-carboxylat;

0.32 g, 1.64 mmol (1.0 Äq.) (*S*)-2-Amino-*N,N*-dimethyl-3-phenylpropanamid;

3.13 g, 4.92 mmol, 2.87 ml (3.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);

0.33 g, 3.28 mmol, 0.36 ml (2.0 Äq.) NMM;

10 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Dichlormethan/Methanol [20/1].

R_f: 0.38 (Dichlormethan/Methanol [10/1]).

Ausbeute: 296 mg, 0.72 mmol, 44 %, hellgelber Feststoff.

Smp.#: 57.2 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +2.2 ° (c = 1.25, CHCl₃).

ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₆N₄O₄, 410.20 [M]; gef.: 411.2 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 2.4 min (Methode IV).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.52 (d, 1H, Pyr-6-CH, ³J = 4.80 Hz), 7.65–7.56 (m, 1H, Pyr-4-CH), 7.29–7.21 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 7.17–7.10 (m, 2H, Pyr-3-CH, Pyr-5-CH), 7.07 (bs, 1H, NH(CH₂)₂-Pyr), 6.85 (d, 1H, NH Phe, ³J = 8.45 Hz), 5.07 (dt, 1H, Phe-α CH, ³J = 5.80 Hz, ³J = 8.45 Hz), 3.74–3.61 (m, 2H, Pyr-CH₂CH₂NH), 3.45 (s, 1H, Epo-CHCONH(CH₂)₂-Pyr), 3.40 (s, 1H, Epo-CHCONH-Phe), 3.04–2.93 (m, 4H, Pyr-CH₂CH₂NH, Phe-β CH₂), 2.83 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)), 2.56 (s, 3H, C(O)N(CH₃CH₃)₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 170.51 (CON(CH₃)₂), 165.28 (Epo-CONH-Phe), 158.90 (Epo-CONH(CH₂)₂-Pyr), 149.04 (Pyr-6-CH), 136.82 (Pyr-4-CH), 135.73 (Ph-C_q), 129.29 (2 × Ph-ortho-CH), 128.47 (2 × Ph-meta-CH), 127.14 (Ph-para-

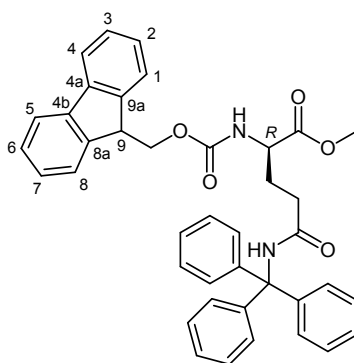
$\underline{\text{CH}}$), 123.48, 121.76 (Pyr-3- $\underline{\text{CH}}$, Pyr-5- $\underline{\text{CH}}$), 54.55 (Epo- $\underline{\text{CHCONH}}$ -Phe), 54.38 (Epo- $\underline{\text{CHCONH}}(\text{CH}_2)_2$ -Pyr), 49.81 (Phe- α $\underline{\text{CH}}$), 39.51 ($\text{NH}\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$ Pyr), 38.23 ($\text{NHCH}_2\underline{\text{CH}_2}$ Pyr), 36.76 ($\text{CON}(\underline{\text{CH}_3})_2$), 36.38 (Phe- β $\underline{\text{CH}_2}$), 35.54 ($\text{CON}(\underline{\text{CH}_3})_2$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3281 (m), 3062 (w), 2929 (w), 1630 (s), 1506 (m), 1454 (w), 1437 (w), 1402 (w), 1366 (w), 1255 (w), 1149 (w), 1097 (w), 895 (w), 751 (w), 700 (w).

12.3 Michael-Akzeptor-basierte Cystein-Protease-Inhibitoren

12.3.1 (*R,E*)-Ethyl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat (CS42)

(*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester, Fmoc-(*R*)-Gln(Trt)-OMe



Methode: A7.

Ansatz: 5.0 g, 8.19 mmol (1.0 Äq.) Fmoc-(*R*)-Gln(Trt)-OH;
1.37 g, 22.7 mmol (2.77 Äq.) K_2CO_3 ;
1.10 g, 7.78 mmol, 0.48 ml (0.95 Äq.) MeI in 25 ml Aceton;
25 ml Aceton, Reaktionszeit: 2 d RT.

R_f : 0.26 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 5.07 g, 8.11 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

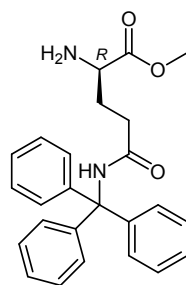
Smp.#: 115 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.74 (d, 2H, 4- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, 5- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, $^3J = 7.50$ Hz), 7.57 (d, 2H, 1- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, 8- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, $^3J = 7.30$ Hz), 7.41–7.34 (m, 2H, 3- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, 6- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren), 7.29–7.18 (m, 17H, 2- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, 7- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, 15 \times Ph- $\underline{\text{CH}}$), 6.82 (s, 1H, $\text{NH}(\text{Trt})$), 5.52 (d, 1H, Gln- α $\underline{\text{NH}}$, $^3J = 7.80$ Hz), 4.44–4.40 (m, 1H, Gln- α $\underline{\text{CH}}$), 4.38–4.34 (m, 2H, Fluoren- $\underline{\text{CH}_2}$ - CO_2 -Gln), 4.20 (t, 1H, 9- $\underline{\text{CH}}$ Fluoren, $^3J = 6.80$ Hz), 3.71 (s, 3H, $\text{CO}_2\underline{\text{CH}_3}$), 2.38–2.29 (m, 2H, Gln- γ $\underline{\text{CH}_2}$), 2.27–2.10 (m, 1H, Gln- β $\underline{\text{CH}_2}$), 1.99–1.84 (m, 1H, Gln- β' $\underline{\text{CH}_2}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.62 ($\underline{\text{CO}_2\text{CH}_3}$), 170.89 ($\underline{\text{CONH}}(\text{Trt})$), 156.20

(CO Fmoc), 144.27 (3 × Ph-C_q), 143.65 (8a-C_q Fluoren, 9a-C_q Fluoren), 141.00 (4a-C_q Fluoren, 4b-C_q Fluoren), 128.37, 127.62, 127.38, 127.76 (15 × Ph-CH, 2-CH Fluoren, 7-CH Fluoren), 126.71 (3-CH Fluoren, 6-CH Fluoren), 124.78 (1-CH Fluoren, 8-CH Fluoren), 119.64 (4-CH Fluoren, 5-CH Fluoren), 70.37 (CPh₃), 66.66 (Fluoren-CH₂-CO₂-Gln), 53.33 (Gln-α CH), 52.22 (CO₂CH₃), 46.91 (9-CH Fluoren), 33.18 (Gln-γ CH₂), 28.55 (Gln-β CH₂).

(*R*)-2-Amino-4-(tritylcarbamoyl)-butansäuremethylester, (*R*)-Gln(Trt)-OMe



Methode: A3.

Ansatz: 5.07 g, 8.11 mmol (1.0 Äq.) Fmoc-(*R*)-Gln(Trt)-OMe;

8.0 ml Diethylamin;

8.0 ml DMF, Reaktionszeit: 1 d RT, Ausfällen des Produkts in 250 ml Diethylether.

Ausbeute: 2.04 g, 5.07 mmol, 63 %, farbloser Feststoff.

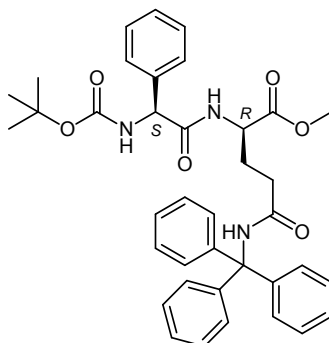
Smp.#: 119–120 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +1.4 ° (c = 1.18, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.29–7.19 (m, 15H, 15 × Ph-CH), 6.96 (s, 1H, NH(Trt)), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.44–4.40 (m, 1H, Gln-α CH), 2.50–2.37 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.12–2.06 (m, 1H, Gln-β CH₂), 1.85–1.79 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.46 (bs, 2H, NH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 176.02 (CO₂CH₃), 170.89 (CONH(Trt)), 144.70 (3 × Ph-C_q), 128.66, 127.88 (15 × Ph-CH), 70.47 (CPh₃), 53.65 (Gln-α CH), 52.06 (CO₂CH₃), 33.77 (Gln-γ CH₂), 29.96 (Gln-β CH₂).

(*R*)-2-((*S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(tritylcarbamoyl)-butansäuremethylester, Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-OMe



Methode: B5a.

Ansatz: 1.06 g, 4.22 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-OH;
 1.70 g, 4.22 mmol (1.0 Äq.) (*R*)-Gln(Trt)-OMe;
 10.7 g, 16.9 mmol, 9.85 ml (4.0 Äq.) PPA (50 % in DMF);
 1.26 g, 8.44 mmol, 1.13 ml (2.0 Äq.) NEt₃;
 20 ml DMF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [2/1].

R_f: 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 2.06 g, 3.23 mmol, 77 %, hellgelber Feststoff.

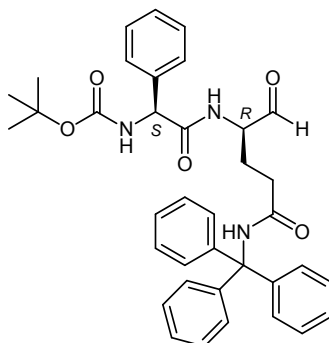
Smp.#: 207–208 °C.

[α]_D^{20 °C}: +36.1 ° (c = 1.28, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.32–7.15 (m, 20H, 20 × Ph-CH), 6.82 (d, 1H, NH Gln, ³J = 5.50 Hz), 6.68 (s, 1H, NH(Trt)), 5.56 (s, 1H, NH Phg), 5.06 (s, 1H, Phg-α CH), 4.57–4.46 (m, 1H, Gln-α CH), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.25–2.05 (m, 3H, Gln-γ CH₂, Gln-β CH₂), 1.86–1.72 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.96 (CO₂CH₃), 171.09 (NCO Phg), 170.62 (CONH(Trt)), 154.17 (CO₂C(CH₃)₃), 144.52 (4 × Ph-C_q), 128.93, 128.68, 128.36, 127.88, 127.21, 127.00 (20 × Ph-CH), 80.10 (CO₂C(CH₃)₃), 70.58 (CPh₃), 58.51 (Phg-α CH), 52.51 (CO₂CH₃), 51.67 (Gln-α CH), 32.47 (Gln-γ CH₂), 28.23 (C(CH₃)₃), 27.53 (Gln-β CH₂).

tert-Butyl-((*S*)-2-(((*R*)-1,5-dioxo-5-(tritylamino)pentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-H



Methode: E1.

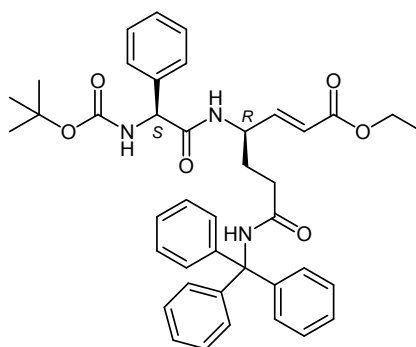
Ansatz: 1.0 g, 1.57 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-OMe;
12.3 g, 15.7 mmol, 15.7 ml (10.0 Äq.) DIBAL (1.0 M in Cyclohexan);
20 ml DCM_{abs}, Reaktionszeit: 7 h –78 °C.

Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung nach ¹H-spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 954 mg, 1.57 mmol, „100 %“ Rohausbeute, hellgelber Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.42 (s, 1H, CHO), 7.34–7.15 (m, 20H, 20 × Ph-CH), 6.63 (s, 1H, NH(Trt)), 5.62 (s, 1H, NH Phg), 5.04 (s, 1H, Phg-α CH), 5.16–4.88 (m, 1H, Gln-α CH), 2.23–2.08 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 1.92–1.72 (m, 2H, Gln-β CH₂), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃).

(*R,E*)-Ethyl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)-hept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-vGln(Trt)-OEt (**CS42**, CS193^{LJ})



Methode: E4.

Ansatz: 954 mg, 1.58 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*R*)-Gln(Trt)-H;
424 mg, 1.89 mmol, 374 µl (1.2 Äq.) Triethylphosphonoacetat;
80.0 mg, 1.89 mmol (1.2 Äq.) LiCl;
240 mg, 1.58 mmol, 236 µl (1.0 Äq.) DBU;
25 ml ACN_{abs}, Reaktionszeit: 4 d bei RT.

R_f: 0.44 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

HPLC (a): R_t = 20.1 min (Methode II a).

HPLC (p): R_t = 28.5 min (Methode IX p).

Ausbeute: 110 mg, 163 μmol, 10 %, hellgelber Feststoff.

Smp.#: 92–93 °C.

[α]_D^{20 °C}: +2.2 ° (c = 0.99, MeOH).

ESI-MS: ber. f. C₄₁H₄₅N₃O₆: 675.33 [M]; gef: 697.9 [M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 10.9 min (Methode IV).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.44–7.03 (m, 20H, 20 × Ph-CH), 6.80–6.54 (m, 1H, HC=CHCO₂Et), 5.76–5.70 (m, 1H, HC=CHCO₂Et), 5.22–5.04 (m, 1H, Phg-α CH), 5.04–4.89 (m, 1H, Gln-α CH), 4.11 (q, 2H, OCH₂CH₃, ³J = 7.05 Hz), 2.80–2.56 (m, 1H, Gln-β CH₂), 2.56–2.38 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.29–2.18 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.39 (bs, 9H, C(CH₃)₃), 1.21 (t, 3H, OCH₂CH₃, J = 7.05 Hz).

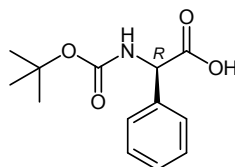
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.77 (CO(NH-Trt)), 170.96 (NCO Phg), 161.81 (CO₂Et), 153.99 (CO₂C(CH₃)₃), 145.78 (HC=CHCO₂Et), 144.33, 144.13, 144.00 (4 × Ph-C_q), 128.41, 128.31, 128.71, 127.49, 126.80, 126.57 (20 × Ph-CH), 120.07 (HC=CH-CO₂Et), 77.83 (CO₂C(CH₃)₃), 70.40 (CPh₃), 60.46 (OCH₂CH₃), 58.51 (Phg-α CH), 49.82 (Gln-α CH), 32.15 (Gln-γ CH₂), 30.95 (Gln-β CH₂), 27.95 (C(CH₃)₃), 13.81 (OCH₂CH₃).

FT-IR#: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3278 (w), 2954 (w), 2230 (w), 2174 (w), 2144 (w), 2015 (w), 1697 (s), 1491 (m), 1350 (m), 1166 (s), 1034 (m), 869 (w), 699 (s).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[3]

12.3.2 (S,E)-Ethyl-4-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)hept-2-enoat (CS43)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(R)-phenylglycin, Boc-(R)-Phg



Methode: A1.

Ansatz: 2.50 g, 16.5 mmol (1.0 Äq.) Boc-(R)-Phg;

4.32 g, 19.8 mmol (1.1 Äq.) (Boc)₂O;

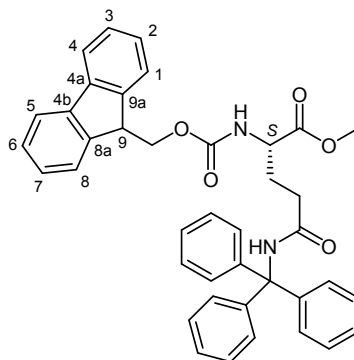
3.05 g, 36.3 mmol (2.2 Äq.) NaHCO₃;

100 ml H₂O/Dioxan, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 7 d RT.

Ausbeute: 2.31 g, 9.21 mmol, 55 %, farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.68 (bs, 1H, CO_2H), 7.44–7.26 (m, 5H, 5 \times Ph- CH), 5.67 (bs, 1H, NH), 5.08 (bs, 1H, Phg- α CH), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

(*S*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester, Fmoc-(*S*)-Gln(Trt)-OMe



Methode: A7.

Ansatz: 5.0 g, 8.19 mmol (1.0 Äq.) Fmoc-(*S*)-Gln(Trt)-OH;
1.37 g, 22.7 mmol (2.77 Äq.) K_2CO_3 ;
1.10 g, 7.78 mmol, 0.48 ml (0.95 Äq.) MeI in 25 ml Aceton;
150 ml Aceton, Reaktionszeit: 2 d RT.

R_f : 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 5.07 g, 8.11 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

Smp.#: 116.5–117.5 °C.

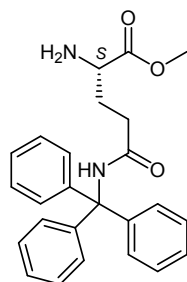
$[\alpha]_D^{20}$: +6.8 ° (c = 1.06, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.73 (d, 2H, 4- CH Fluoren, 5- CH Fluoren, $^3J = 7.60$ Hz), 7.57 (d, 2H, 1- CH Fluoren, 8- CH Fluoren, $^3J = 7.30$ Hz), 7.41–7.34 (m, 2H, 3- CH Fluoren, 6- CH Fluoren), 7.33–7.10 (m, 17H, 2- CH Fluoren, 7- CH Fluoren, 15 \times Ph- CH), 6.87 (s, 1H, $\text{NH}(\text{Trt})$), 5.58 (d, 1H, Gln- α NH , $^3J = 7.90$ Hz), 4.50–4.39 (m, 1H, Fluoren- CH_2 - CO_2 -Gln), 4.39–4.27 (m, 2H, Fluoren- CH_2' - CO_2 -Gln, Gln- α CH), 4.20 (t, 1H, 9- CH Fluoren, $^3J = 6.90$ Hz), 3.70 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.43–2.26 (m, 2H, Gln- γ CH_2), 2.26–2.10 (m, 1H, Gln- β CH_2), 1.98–1.85 (m, 1H, Gln- β' CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.38 (CO_2CH_3), 170.69 ($\text{CONH}(\text{Trt})$), 156.25 (CO Fmoc), 144.55 (3 \times Ph- C_q), 143.83, 143.63 (8a- C_q Fluoren, 9a- C_q Fluoren), 141.27, 141.24 (4a- C_q Fluoren, 4b- C_q Fluoren), 128.65, 127.88, 127.83, 127.66 (15 \times Ph- CH , 2- CH Fluoren, 7- CH Fluoren), 126.96 (3- CH Fluoren, 6- CH Fluoren), 125.05 (1- CH Fluoren, 8- CH Fluoren), 119.91 (4- CH Fluoren, 5- CH Fluoren), 70.61 (CPh_3), 66.91 (Fluoren- CH_2 - CO_2 -Gln), 53.48 (Gln- α CH), 52.45

(CO₂CH₃), 47.16 (9-CH Fluoren), 33.28 (Gln-γ CH₂), 28.26 (Gln-β CH₂).

(S)-2-Amino-4-(tritylcarbamoyl)-butansäuremethylester, (S)-Gln(Trt)-OMe



Methode: A3.

Ansatz: 5.07 g, 8.11 mmol (1.0 Äq.) (Fmoc-(S)-Gln(Trt)-OMe);

8.0 ml Diethylamin;

8.0 ml DMF, Reaktionszeit: 3 d RT, Ausfällen des Produkts in 250 ml Diethylether.

Ausbeute: 2.21 g, 5.48 mmol, 67 %, farbloser Feststoff.

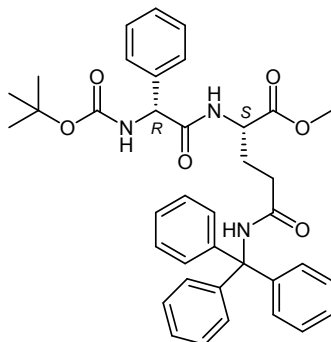
Smp.#: 132.5–134 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +21.0 ° (c = 1.00, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.14 (m, 15H, 15 × Ph-CH), 7.00 (s, 1H, NH(Trt)), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.54–3.40 (m, 1H, Gln-α CH), 2.55–2.26 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.22–2.05 (m, 1H, Gln-β CH₂), 1.90–1.72 (m, 1H, Gln-β' CH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 175.62 (CO₂CH₃), 171.08 (CONH(Trt)), 144.69 (3 × Ph-C_q), 128.67 (6 × Ph-meta-CH), 127.90 (6 × Ph-ortho-CH), 126.98 (3 × Ph-para-CH), 70.51 (CPh₃), 53.59 (Gln-α CH), 52.15 (CO₂CH₃), 33.73 (Gln-γ CH₂), 29.67 (Gln-β CH₂).

(S)-2-((R)-2-tert-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(tritylcarbamoyl)-butansäuremethylester, Boc-(R)-Phg-(S)-Gln(Trt)-OMe



Methode: B3.

Ansatz: 0.94 g, 3.73 mmol (1.0 Äq.) Boc-(R)-Phg-OH;

1.50 g, 3.73 mmol (1.0 Äq.) (S)-Gln(Trt)-OMe;

2.04 g, 3.92 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;
 0.48 g, 3.73 mmol, 0.63 ml (1.0 Äq.) DIPEA;
 20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 2 d RT.

SC: Chloroform.

R_f: 0.43 (Chloroform/Ethylacetat [3/1]).

Ausbeute: 1.98 g, 3.12 mmol, 83 %, farbloser Feststoff.

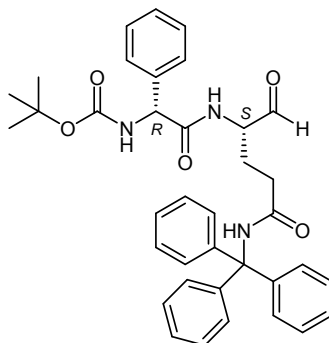
Smp.: 215.5 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -45.5 ° (c = 1.00, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.39–7.10 (m, 20H, 20 × Ph-CH), 6.87–6.74 (m, 1H, NH Gln), 6.70 (s, 1H, NH(Trt)), 5.57 (bs, 1H, NH Phg), 5.06 (bs, 1H, Phg-α CH), 4.60–4.42 (m, 1H, Gln-α CH), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.26–2.06 (m, 3H, Gln-γ CH₂, Gln-β CH₂), 1.90–1.73 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.98 (CO₂CH₃), 171.67 (NCO Phg), 170.13 (CONH(Trt)), 154.95 (CO₂C(CH₃)₃), 144.49 (4 × Ph-C_q), 128.89, 128.67, 128.32, 127.86, 127.19, 126.98 (20 × Ph-CH), 80.09 (CO₂C(CH₃)₃), 70.55 (CPh₃), 58.88 (Phg-α CH), 52.48 (CO₂CH₃), 51.64 (Gln-α CH), 32.44 (Gln-γ CH₂), 28.20 (C(CH₃)₃), 27.48 (Gln-β CH₂).

tert-Butyl-((*S*)-2-(((*R*)-1,5-dioxo-5-(tritylamino)pentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbammat, Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-H



Methode: E1.

Ansatz: 1.0 g, 1.57 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-OMe;
 12.3 g, 15.7 mmol, 15.7 ml (10.0 Äq.) DIBAL (1.0 M in Hexan);
 20 ml CH₂Cl₂, Reaktionszeit: 7 h -78 °C.

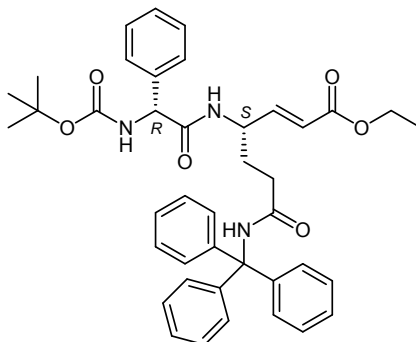
Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung nach ¹H-spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 954 mg, 1.57 mmol, „100 %“ Rohausbeute, hellgelber Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.42 (s, 1H, CHO), 7.51–7.07 (m, 20H, 20 × Ph-CH), 6.68–6.56 (m, 1H, NH(Trt)), 5.76–5.57 (m, 1H, NH Phg), 5.12–4.91 (m, 1H,

Phg- α \underline{CH}), 4.38–4.20 (m, 1H, Gln- α \underline{CH}), 2.21–1.49 (m, 4H, Gln- γ $\underline{CH_2}$, Gln- β $\underline{CH_2}$), 1.38 (s, 9H, C($\underline{CH_3}$)₃).

(*S,E*)-Ethyl-4-((*R*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxo-7-(tritylamino)-hept-2-enoat, Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-vGln(Trt)-OEt (**CS43**, CS388^{LJ})



Methode: E4.

Ansatz: 954 mg, 1.57 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-H;
424 mg, 1.89 mmol, 374 μ l (1.2 Äq.) Triethylphosphonoacetat;
80.1 mg, 1.89 mmol (1.2 Äq.) LiCl;
239 mg, 1.58 mmol, 234 μ l (1.0 Äq.) DBU;
15 ml ACN_{abs}, Reaktionszeit: 4 d RT.

R_f: 0.39 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

HPLC (p): R_t = 37.3 min (Methode X p).

Ausbeute: 130 mg, 192 μ mol, 12 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 147 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -2.5 ° (c = 1.02, MeOH).

ESI-MS[#]: ber. f. C₄₁H₄₅N₃O₆: 675.33 [M]; gef: 676.34 [M+H]⁺, 698.32 [M+Na]⁺, 714.32 [M+K]⁺, 1351.70 [2M+H]⁺, 1373.68 [2M+Na]⁺.

LC-MS: R_t = 11.3 min (Methode I).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.01 (m, 20H, 20 \times Ph- \underline{CH}), 6.95 (d, 1H, \underline{NH} Gln, ³J = 7.86 Hz), 6.86–6.63 (m, 1H, $\underline{HC}=\underline{CHCO_2Et}$), 5.83 (dd, 1H, $\underline{HC}=\underline{CHCO_2Et}$, ³J = 15.72 Hz, ⁴J = 1.49 Hz), 5.77–5.66 (m, 1H, \underline{NH} Phg), 5.15–4.85 (m, 1H, Phg- α \underline{CH}), 4.65–4.39 (m, 1H, Gln- α \underline{CH}), 4.21–3.93 (m, 2H, CO₂ $\underline{CH_2CH_3}$), 2.63–2.44 (m, 1H, Gln- γ $\underline{CH_2}$), 2.44–2.26 (m, 1H, Gln- β $\underline{CH_2}$), 2.26–1.97 (m, 1H, Gln- γ' $\underline{CH_2}$), 1.97–1.63 (m, 1H, Gln- β' $\underline{CH_2}$), 1.39 (bs, 9H, C($\underline{CH_3}$)₃), 1.29–1.10 (m, 3H, CO₂ $\underline{CH_2CH_3}$).

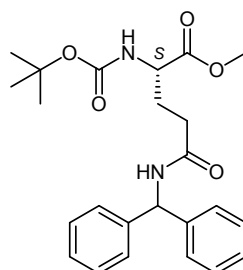
¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.14 (\underline{CO} (NH-Trt)), 171.57 (\underline{NCO} Phg), 166.03, 165.95 ($\underline{CO_2Et}$), 154.96 ($\underline{CO_2C(CH_3)_3}$), 146.38 ($\underline{HC}=\underline{CHCO_2Et}$), 144.63, 144.45, 144.41, 144.34 (4 \times Ph- $\underline{C_q}$), 128.71, 128.63, 128.56 (8 \times Ph- $\underline{meta-CH}$),

127.95, 127.91 127.87, 127.78 (8 × Ph-*ortho*-CH), 127.10, 127.04, 127.02, 126.91, 126.87 (4 × Ph-*para*-CH), 121.15 (HC=CH-CO₂Et), 80.11 (CO₂C(CH₃)₃), 70.67 (CPh₃), 60.28 (CO₂CH₂CH₃), 58.61 (Phg-α CH), 50.03, 49.64 (Gln-α CH), 33.29 (Gln-β CH₂), 30.88, 30.65 (Gln-γ CH₂), 28.25 (C(CH₃)₃), 14.11 (CO₂CH₂CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276 (w), 3059 (w), 3030 (w), 2978 (w), 2931 (w), 2156 (w), 2024 (w), 1971 (w), 1714 (m), 1681 (m), 1650 (s), 1597 (w), 1519 (m), 1491 (s), 1447 (m), 1391 (w), 1366 (m), 1249 (m), 1163 (s), 1178 (w), 1033 (m), 981 (w), 899 (w), 849 (w), 749 (w), 697 (s).

12.3.3 (S,E)-Ethyl-7-(benzhydrylamino)-4-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxohept-2-enoat (CS44)

tert-Butyl-(S)-3-(benzhydrylcarbamoyl)-1-(methoxycarbonyl)propylcarbamate,
Boc-(S)-Gln(CHPh₂)-OMe



Methode: B2.

Ansatz: 2.50 g, 9.57 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Glu-OMe;
1.75 g, 9.57 mmol, 1.65 ml (1.0 Äq.) α-Aminodiphenylmethan;
1.47 g, 9.57 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
2.07 g, 10.0 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.97 g, 9.57 mmol, 1.06 ml (1.0 Äq.) NMM;
60 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1] → [2/1].

R_f: 0.45 (Chloroform/Ethylacetat [5/1]).

Ausbeute: 3.47 g, 8.14 mmol, 85 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 128.8 °C.

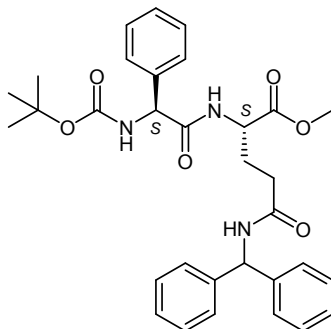
$[\alpha]_D^{20}$: +0.7 ° (c = 1.06, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.17 (m, 10H, 10 × Ph-CH), 6.90 (d, 1H, NHCHPh₂, ³J = 7.35 Hz), 6.23 (d, 1H, NHCHPh₂, ³J = 7.35 Hz), 5.32 (d, 1H, Boc-NH, ³J = 7.10 Hz), 4.27 (bs, 1H, Gln-α CH), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.39–2.28 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.25–2.11 (m, 1H, Gln-β CH₂), 1.99–1.83 (m, 1H, Gln-β' CH₂),

1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.69 (CO₂CH₃), 170.89 (CONH(CHPh₂)), 155.85 (COC(CH₃)₃), 144.65, 141.58 (2 × Ph-C_q), 128.58, 128.56, 127.37, 127.34, 127.29 (10 × Ph-CH), 80.14 (C(CH₃)₃), 57.07 (NH(CHPh₂)), 52.90 (Gln-α CH), 52.37 (CO₂CH₃), 33.88 (Gln-β CH₂), 32.54 (Gln-γ CH₂), 28.24 (C(CH₃)₃).

(S)-2-((S)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(benzhydrylcarbamoyl)-butansäuremethylester, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(CHPh₂)-OMe



Methode: A2.

Ansatz: 3.40 g, 7.97 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Gln(CHPh₂)-OMe;
9.09 g, 79.7 mmol, 6.14 ml (10.0 Äq.) TFA;
40 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1.5 h RT.
Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode B3.

Ansatz 3.51 g, 7.97 mmol (1.0 Äq.) (S)-Gln(CHPh₂)-OMe · TFA;
2.0 g, 7.97 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg;
4.35 g, 8.37 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;
2.06 g, 15.9 mmol, 2.71 ml (2.0 Äq.) DIPEA;
20 ml DCM, 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

R_f: 0.29 (Chloroform/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 2.64 g, 4.71 mmol, 59 %, farbloser Feststoff.

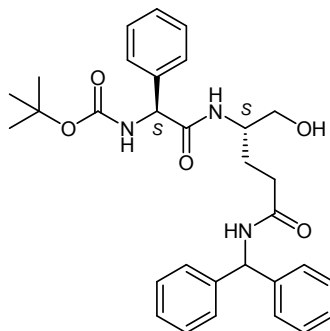
Smp.: 179.4 °C.

[α]_D^{20 °C}: +47.4 ° (c = 1.06, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40–7.15 (m, 15H, 15 × Ph-CH), 7.09–6.93 (m, 2H, NHCHPh₂, NH Gln), 6.22 (d, 1H, NHCHPh₂, ³J = 8.20 Hz), 5.61 (d, 1H, Boc-NH, ³J = 6.80 Hz), 5.14 (bs, 1H, Phg-α CH), 4.49–4.37 (m, 1H, Gln-α CH), 3.57 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.35–2.12 (m, 3H, Gln-β CH₂, Gln-γ CH₂), 1.99–1.81 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.66 ($\text{CONH}(\text{CHPh}_2)$), 171.11 (NCO Phg), 170.97 (CO_2CH_3), 155.19 ($\text{COC}(\text{CH}_3)_3$), 141.54 ($3 \times \text{Ph-C}_q$), 128.87, 128.60, 128.55, 128.40, 127.49, 127.39, 127.34, 127.28 ($15 \times \text{Ph-CH}$), 80.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.19 ($\text{Phg-}\alpha \text{ CH}$), 56.98 ($\text{NH}(\text{CHPh}_2)$), 52.36 (CO_2CH_3), 52.26 ($\text{Gln-}\alpha \text{ CH}$), 32.22 ($\text{Gln-}\gamma \text{ CH}_2$), 28.22 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.75 ($\text{Gln-}\beta \text{ CH}_2$).

tert-Butyl-((*S*)-2-(((*S*)-5-(benzhydrylamino)-1-hydroxy-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(*S*)-CHPh₂-CH₂OH



Methode: E2.

Ansatz: 1.0 g, 1.79 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(*S*)-CHPh₂-OMe;
3.76 g, 5.37 mmol, 5.37 ml (3.0 Äq.) DIBAL (1 M in Hexan);
20 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 45 min -10°C (DIBAL-Zugabe), 3 h 0°C .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1] \rightarrow Ethylacetat.

R_f: 0.06 (Ethylacetat/Chloroform [2/1]).

Ausbeute: 387 mg, 728 μmol , 40 %, farbloser Feststoff.

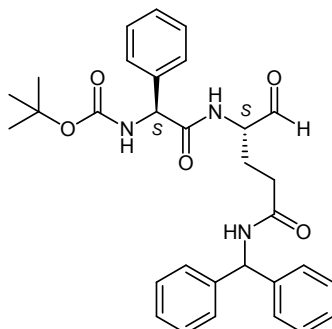
Smp.: 197.5°C .

$[\alpha]_D^{20}$: $+22.5^\circ$ ($c = 1.12$, MeOH).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.51–7.04 (m, 15H, $15 \times \text{Ph-CH}$), 6.86–6.70 (m, 1H, NHCHPh_2), 6.68 (d, 1H, $\text{NH-Gln-}\alpha$, $^3J = 7.80$ Hz), 6.23 (d, 1H, NHCHPh_2 , $^3J = 8.00$ Hz), 5.59 (d, 1H, Boc-NH, $^3J = 5.80$ Hz), 5.00 (bs, 1H, Phg- $\alpha \text{ CH}$), 3.93–3.71 (m, 1H, Gln- $\alpha \text{ CH}$), 3.50–3.40 (m, 2H, CH_2OH), 2.94–2.74 (m, 1H, CH_2OH), 2.40–1.17 (m, 2H, Gln- $\gamma \text{ CH}_2$), 2.01–1.75 (m, 2H, Gln- $\beta \text{ CH}_2$), 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.33 (CONHCHPh_2), 170.97 (NCO Phg), 155.30 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 141.42 ($3 \times \text{Ph-C}_q$), 129.00, 128.70, 128.66, 128.42, 127.51, 127.45, 127.41, 127.37, 127.14 ($15 \times \text{Ph-CH}$), 80.32 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 64.31 (CH_2OH), 59.10 (Phg- $\alpha \text{ CH}$), 57.17 (NHCHPh_2), 51.81 (Gln- $\alpha \text{ CH}$), 32.56 (Gln- $\gamma \text{ CH}_2$), 28.26 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.20 (Gln- $\beta \text{ CH}_2$).

tert-Butyl-((*S*)-2-(((*S*)-5-(benzhydrylamino)-1,5-dioxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(CHPh₂)-H



Methode: E3.

Ansatz: 103 mg, 811 μmol , 70.0 μl (1.25 Äq.) Oxalylchlorid;
 127 mg, 1.62 mmol, 115 μl (2.5 Äq.) DMSO_{abs};
 5 ml DCM_{abs}, 3 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 22 min $-78\text{ }^\circ\text{C}$;
 345 mg, 649 μmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(CHPh₂)-CH₂OH;
 10 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 1 h $-78\text{ }^\circ\text{C}$;
 363 mg, 2.43 mmol, 324 μl (3.75 Äq.) NEt_{3abs};
 Reaktionszeit: 30 min $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min $0\text{ }^\circ\text{C}$.

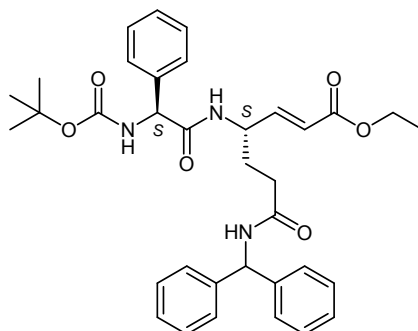
Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung nach ¹H-spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 344 mg, 649 μmol , „100 %“ Rohausbeute, hellgelber Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.38 (s, 1H, CHO), 7.42–7.18 (m, 15H, 15 \times Ph-CH), 6.77–6.55 (m, 1H, NH), 6.26–6.20 (dd (m, 1H, NHCHPh₂), 5.56 (d, 1H, Boc-NH, ³J = 5.50 Hz), 5.08–4.90 (m, 1H, Phg- α CH), 4.42–4.23 (m, 1H, Gln- α CH), 2.48–1.82 (m, 4H, Gln- β CH₂, Gln- γ CH₂), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Diastereomerenverhältnis: 1:0.85 (bestimmt über ¹H-NMR an Phg- α CH).

(*S,E*)-Ethyl-7-(benzhydrylamino)-4-(((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-oxohept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-vGln(CHPh₂)-OEt (**CS44**, CS403^{LJ})



Methode: E4.

Ansatz: 344 mg, 649 μmol (1.0 Äq.) Boc-(*R*)-Phg-(*S*)-Gln(Trt)-H;

175 mg, 779 μmol , 155 μl (1.2 Äq.) Triethylphosphonoacetat;
33.0 mg, 779 μmol (1.2 Äq.) LiCl;
99.0 mg, 649 μmol , 97.1 μl (1.0 Äq.) DBU;
23 ml ACN_{abs} , Reaktionszeit: 5 d bei RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [5/1] \rightarrow [3/1].

R_f: 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

HPLC (p): R_t = 31.0 min (Methode XI p).

Ausbeute: 75.0 mg, 125 μmol , 19 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 120.2 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +2.2 ° (c = 1.00, CHCl_3).

ESI-MS[#]: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_6$: 599.30 [M]; gef: 600.35 [M+H]⁺, 622.34 [M+Na]⁺, 638.31 [M+K]⁺, 1199.86 [2M+H]⁺, 1221.70 [2M+Na]⁺, 1237.68 [2M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 16.5 min (Methode V).

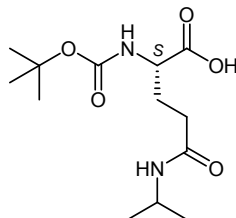
¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.52–7.08 (m, 15H, 15 \times Ph-CH), 6.87–6.70 (m, 1H, Gln NHCHPh₂), 6.76, 6.65* (je dd, 1H, HC=CHCO₂Et, ³J = 15.74 Hz, ³J = 5.20 Hz, ³J* = 15.74 Hz, ³J* = 4.71 Hz), 6.22, 6.16* (je d, 1H, NHCHPh₂, ³J = 8.16 Hz, ³J* = 7.96 Hz), 5.86, 5.34* (dd und d*, 1H, HC=CHCO₂Et, ³J = 15.74 Hz, ⁴J = 1.66 Hz, ³J* = 15.40 Hz), 5.77–5.63 (m, 1H, Boc-NH), 5.20–4.97 (m, 1H, Phg- α CH), 4.63–4.38 (m, 1H, Gln- α CH), 4.22–3.97 (m, 2H, CO₂CH₂CH₃), 2.68–2.54 (m, 1H, Gln- γ CH₂), 2.39–2.15 (m, 1H, Gln- γ' CH₂), 2.12–1.87 (m, 1H, Gln- β CH₂), 1.87–1.57 (m, 1H, Gln- β' CH₂), 1.36 (bs, 9H, C(CH₃)₃), 1.30–1.17 (m, 3H, CO₂CH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.93, 171.43 (CO NHCHPh₂), 171.03 (NCO Phg), 166.04, 165.93 (CO₂Et), 154.14 (CO₂C(CH₃)₃), 146.32 (HC=CHCO₂Et), 141.42, 141.37, 141.3 (3 \times Ph-C_q), 129.08, 129.04, 129.94, 128.69, 128.67, 128.64, 128.53, 128.48, 128.36, 127.51, 127.49, 127.46, 127.42, 127.37, 127.28, 127.22, 127.10, 127.03 (15 \times Ph-CH), 121.74, 121.21 (HC=CHCO₂Et), 80.28, 80.15 (CO₂C(CH₃)₃), 60.54, 60.35 (CO₂CH₂CH₃), 59.32, 58.74 (Phg- α CH), 50.07, 49.82 (Gln- α CH), 32.31, 31.92 (Gln- β CH₂), 29.67, 29.33 (Gln- γ CH₂), 28.25 (C(CH₃)₃), 14.17, 14.13, 14.09 (CO₂CH₂CH₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3302 (m), 3062 (w), 3030 (w), 2979 (w), 2930 (w), 2361 (w), 2333 (w), 2158 (w), 1968 (w), 1715 (m), 1690 (m), 1644 (s), 1586 (w), 1524 (s), 1494 (s), 1453 (w), 1390 (w), 1365 (m), 1309 (w), 1246 (m), 1163 (s), 1078 (w), 1028 (w), 980 (w), 889 (w), 859 (w), 741 (w), 696 (m).

12.3.4 (S,E)-Etyhl-4-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-(isopro-pylamino)-7-oxohept-2-enoat (CS45)

(S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-5-isopropylamino)-5-oxopentansäure,
Boc-(S)-Gln(*i*Pr)-OH



Methode: A1.

Ansatz: 1.0 g, 5.31 mmol (1.0 Äq.) (S)-Gln(*i*Pr)OH;
1.27 g, 5.84 mmol (1.1 Äq.) (Boc)₂O in 10 ml Dioxan;
0.98 g, 11.7 mmol (2.2 Äq.) NaHCO₃;
10 ml H₂O, Reaktionszeit: 0.5 h 0 °C, 3 d RT.

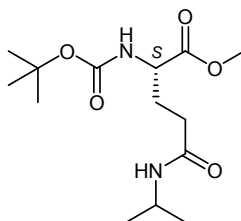
Ausbeute: 1.53 g, 5.31 mmol, 100 %, farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20\text{ °C}}$: -0.5 ° (c = 0.60, H₂O).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 6.80 (d, 1H, NH(*i*Pr), ³J = 6.40 Hz), 5.89 (bs, 1H, Boc-NH), 4.09 (bs, 1H, Gln-α CH), 4.04–3.93 (m, 1H, NHCH(CH₃)₂), 2.30–2.17 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.14–1.98 (m, 1H, Gln-β CH₂), 1.98–1.76 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.10 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂, ³J = 3.20 Hz), 1.12 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂, ³J = 3.20 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 176.90 (C=O₂H), 172.39 (C=ONH(*i*Pr)), 156.14 (C=O₂C(CH₃)₃), 79.59 (C(CH₃)₃), 54.08 (Gln-α CH), 41.43 (NHCH(CH₃)₂), 32.68 (Gln-γ CH₂), 29.04 (Gln-β CH₂), 28.36 (C(CH₃)₃), 22.48 (NHCH(CH₃)₂).

(S)-Methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-(isopropylamino)-5-oxopentanoat,
Boc-(S)-Gln(*i*Pr)-OMe



Methode: A7.

Ansatz 1: 1.53 g, 5.31 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Gln(*i*Pr)-OH;
0.88 mg, 14.7 mmol (2.77 Äq.) K₂CO₃;
0.72 mg, 5.04 mmol, 0.32 ml (0.95 Äq.) MeI in 5 ml DMF;

30 ml DMF, Reaktionszeit: 3 d RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

R_f: 0.17 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 0.95 g, 3.14 mmol, 59 %, farbloser Feststoff.

Methode: B2.

Ansatz 2: 2.50 g, 9.57 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Glu-OMe;
0.57 g, 9.57 mmol, 0.81 ml (1.0 Äq.) Isopropylamin;
1.47 g, 9.57 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
2.07 g, 10.0 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.97 g, 9.57 mmol, 1.06 ml (1.0 Äq.) NMM;
20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Chloroform.

R_f: 0.50 (Chloroform/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 2.68 g, 8.88 mmol, 92 %, farbloser Feststoff.

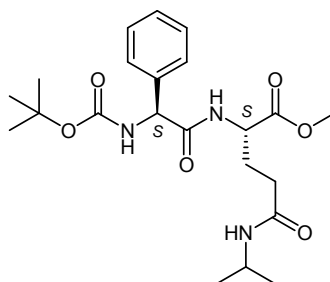
Smp.: 100.5 °C.

[α]_D^{20 °C}: +3.1 ° (c = 1.02, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 5.80 (bs, 1H, NH(*i*Pr)), 5.30 (bs, 1H, Boc-NH), 4.26 (bs, 1H, Gln-α CH), 4.10–4.01 (m, 1H, NHCH(CH₃)₂), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.23–2.13 (m, 3H, Gln-γ CH₂, Gln-β CH₂), 1.95–1.89 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.15 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂), ³J = 3.35 Hz), 1.14 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂), ³J = 3.35 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.79 (CO₂CH₃), 170.81 (CONH(*i*Pr)), 155.20 (CO₂C(CH₃)₃), 80.01 (C(CH₃)₃), 53.04 (Gln-α CH), 52.39 (CO₂CH₃), 41.47 (NHCH(CH₃)₂), 32.84 (Gln-γ CH₂), 28.93 (Gln-β CH₂), 28.28 (C(CH₃)₃), 22.70 (NHCH(CH₃)₂).

(S)-Methyl-2-((S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-5-(isopropylamino)-5-oxopentanoat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-OMe



Methode: A2.

Ansatz: 0.88 g, 2.91 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Gln(*i*Pr)-OMe;

3.32 g, 29.1 mmol, 2.24 ml (10.0 Äq.) TFA;
20 ml DCM, Reaktionszeit: 2 h 0 °C.

Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode B2.

Ansatz 0.92 g, 2.91 mmol (1.0 Äq.) (S)-Gln(*i*Pr)-OMe · TFA;
0.73 g, 2.91 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg;
0.45 g, 2.91 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
0.63 g, 3.06 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.59 g, 5.82 mmol, 0.64 ml (2.0 Äq.) NMM;
20 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

Ausbeute: 760 mg, 1.75 mmol, 60 %, farbloser Feststoff.

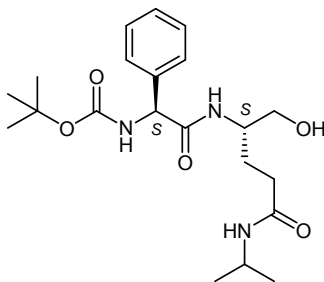
Smp.: 166.9 °C.

[α]_D^{20 °C}: +37.0 ° (c = 1.10, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.28 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 7.05 (d, 1H, NH-Gln-α, ³J = 7.30 Hz), 5.87 (bs, 1H, NH(*i*Pr)), 5.65 (d, 1H, Boc-NH, ³J = 6.70 Hz), 5.15 (bs, 1H, Phg-α CH), 4.51–4.44 (m, 1H, Gln-α CH), 4.06–3.98 (m, 1H, NHCH(CH₃)₂), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.22–2.14 (m, 3H, Gln-γ CH₂, Gln-β CH₂), 1.97–1.90 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂), ³J = 2.80 Hz), 1.12 (d, 3H, NHCH(CH₃)₂), ³J = 2.80 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.76 (CO₂CH₃), 170.95 (CONH(*i*Pr)), 170.47 (NCO Phg), 155.04 (CO₂C(CH₃)₃), 137.32 (Ph-C_q), 128.91 (2 × Ph-*meta*-CH), 128.41 (Ph-*para*-CH), 127.28 (2 × Ph-*ortho*-CH), 80.13 (C(CH₃)₃), 58.77 (Phg-α CH), 53.56 (Gln-α CH), 52.37 (CO₂CH₃), 41.48 (NHCH(CH₃)₂), 32.48 (Gln-γ CH₂), 28.30 (C(CH₃)₃), 27.99 (Gln-β CH₂), 22.67 (NHCH(CH₃)₂).

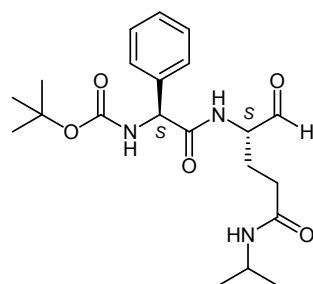
tert-Butyl-((S)-2-(((S)-1-hydroxy-5-(isopropylamino)-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-CH₂OH



Methode: E2.

- Ansatz: 1.50 g, 3.44 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-OMe;
 7.23 g, 10.32 mmol, 10.32 ml (3.0 Äq.) DIBAL (1 M in Hexan);
 20 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 1 h –12 °C (DIBAL-Zugabe), 3 h 0 °C.
- SC: Chloroform/Ethylacetat [10/1] → [5/1] → [3/1] → Ethylacetat.
- R_f: 0.06 (Ethylacetat/Chloroform [2/1]).
- Ausbeute: 357 mg, 876 μmol, 25 %, farbloser Feststoff.
- Smp.: 164.4 °C.
- $[\alpha]_D^{20}$: +39.2 ° (c = 1.06, MeOH).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.37–7.12 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 7.03 (d, 1H, NH-Gln-α, ³J = 8.00 Hz), 6.11 (d, 1H, NH(*i*Pr), ³J = 7.00 Hz), 5.73 (bs, 1H, Boc-NH), 5.07 (bs, 1H, Phg-α CH), 3.99–3.89 (m, 1H, NHCH(CH₃)₂), 3.86–3.68 (m, 1H, Gln-α CH), 3.51–3.25 (m, 2H, CH₂OH), 2.20–1.96 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 1.92–1.62 (m, 2H, Gln-β CH₂), 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.06 (d, 3H, NHCH(CH₃CH₃), ³J = 2.85 Hz), 1.05 (d, 3H, NHCH(CH₃CH₃), ³J = 2.85 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.34 (CONH(*i*Pr)), 170.99 (NCO Phg), 155.23 (CO₂C(CH₃)₃), 137.93 (Ph-C_q), 128.89 (2 × Ph-*meta*-CH), 128.28 (Ph-*para*-CH), 127.05 (2 × Ph-*ortho*-CH), 80.19 (C(CH₃)₃), 64.17 (CH₂OH), 58.91 (Phg-α CH), 51.68 (Gln-α CH), 41.49 (NHCH(CH₃)₂), 32.81 (Gln-γ CH₂), 28.26 (C(CH₃)₃), 26.57 (Gln-β CH₂), 22.54 (NHCH(CH₃)₂).

tert-Butyl-((S)-2-(((S)-5-(isopropylamino)-1,5-dioxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)-carbamat, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-H



Methode: E3.

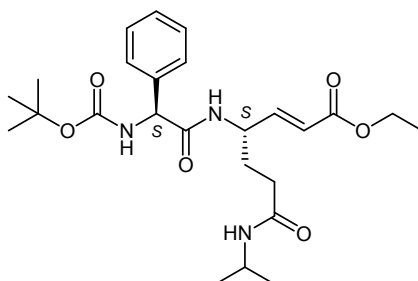
- Ansatz: 130 mg, 1.03 mmol, 87.9 μl (1.25 Äq.) Oxalylchlorid;
 160 mg, 2.05 mmol, 146 μl (2.5 Äq.) DMSO_{abs};
 5 ml DCM_{abs}, Reaktionszeit: 15 min –78 °C;
 334 mg, 820 μmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(*i*Pr)-CH₂OH;
 15 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 1 h –78 °C;
 459 mg, 3.08 mmol, 410 μl (3.75 Äq.) NEt_{3abs};
 Reaktionszeit: 30 min –78 °C, 1.5 h 0 °C.

Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung nach ^1H -spektroskopischer Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 333 mg, 820 μmol , „100 %“ Rohausbeute, hellgelber Feststoff.

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.42 (s, 1H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{O}$), 7.44–7.23 (m, 5H, $5 \times \text{Ph}-\text{C}\underline{\text{H}}$), 5.84–5.71 (m, 1H, $\text{N}\underline{\text{H}}(\text{iPr})$), 5.60 (d, 1H, Boc- $\text{N}\underline{\text{H}}$, $^3J = 5.80$ Hz), 5.23–5.03 (m, 1H, Phg- α $\text{C}\underline{\text{H}}$), 4.43–4.26 (m, 1H, Gln- α $\text{C}\underline{\text{H}}$), 4.09–3.97 (m, 1H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 2.34–1.86 (m, 4H, Gln- γ $\text{C}\underline{\text{H}}_2$, Gln- β $\text{C}\underline{\text{H}}_2$), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 1.16 (d, 3H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_3)$, $^3J = 4.20$ Hz), 1.14 (d, 3H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_3)$, $^3J = 4.20$ Hz).

(*S,E*)-Etyhl-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylacetamido)-7-(isopropylamino)-7-oxohept-2-enoat, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-vGln(*iPr*)-OEt (**CS45**, CS406^{LJ})



Methode: E4.

Ansatz: 330 mg, 820 μmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(*iPr*)-H;
221 mg, 984 μmol , 195 μl (1.2 Äq.) Triethylphosphonoacetat;
41.7 mg, 984 μmol (1.2 Äq.) LiCl;
125 mg, 820 μmol , 122 μl (1.0 Äq.) DBU;
25 ml ACN_{abs} , Reaktionszeit: 4 d bei RT.

SC: Chloroform/Ethylacetat [5/1] \rightarrow [2/1].

R_f: 0.36 (Ethylacetat/Chloroform [2/1]).

HPLC (p): R_t = 19.1 min (Methode XI p).

Ausbeute: 39.0 mg, 82.0 μmol , 10 %, hellgelber Feststoff.

Smp.: 124.1 $^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^{\circ}\text{C}}$: -35.1° ($c = 1.18$, CHCl_3).

ESI-MS[#]: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$: 475.27 [M]; gef: 476.31 [M+H]⁺, 498.29 [M+Na]⁺, 514.27 [M+K]⁺, 973.61 [2M+Na]⁺, 989.59 [2M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 14.5 min (Methode V).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.51–7.24 (m, 5H, $5 \times \text{Ph}-\text{C}\underline{\text{H}}$), 7.21–7.03 (m, 1H, $\text{N}\underline{\text{H}}$ -Gln- α), 6.78 (dd, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}=\text{CHCO}_2\text{Et}$, $^3J = 15.72$ Hz, $^3J = 5.14$ Hz), 5.89 (dd, 1H, $\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{HCO}_2\text{Et}$, $^3J = 15.72$ Hz, $^4J = 1.62$ Hz), 5.76 (d, 1H, Boc- $\text{N}\underline{\text{H}}$,

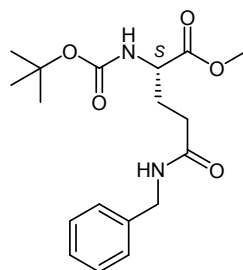
$^3J = 6.18$ Hz), 5.60–5.45 (m, 1H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 5.23–5.00 (m, 1H, Phg- α CH), 4.60–4.39 (m, 1H, Gln- α CH), 4.15 (q, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J = 7.16$ Hz), 4.05–3.85 (m, 1H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 2.09–1.78 (m, 3H, Gln- γ CH_2 , Gln- β CH_2), 1.78–1.55 (m, 1H, Gln- β' CH_2), 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (t, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J = 7.16$ Hz), 1.10 (d, 3H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3\text{CH}_3)$, $^3J = 6.65$ Hz), 1.08 (d, 3H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3\text{CH}_3)$, $^3J = 6.65$ Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.04 ($\text{CONH}(\text{tPr})$), 170.14 (NCO Phg), 166.11 (CO_2Et), 155.16 ($\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 146.60 ($\text{HC}=\text{CHCO}_2\text{Et}$), 138.17 (Ph- C_q), 128.92 ($2 \times$ Ph-*meta*- CH), 128.34 (Ph-*para*- CH), 127.04 ($2 \times$ Ph-*ortho*- CH), 121.63 ($\text{HC}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$), 80.27 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 60.51 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 59.07 (Phg- α CH), 49.74 (Gln- α CH), 41.49 ($\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 32.17 (Gln- γ CH_2), 29.30 (Gln- β CH_2), 28.27 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.59 ($\text{NHCH}(\text{CH}_3\text{CH}_3)$), 22.57 ($\text{NHCH}(\text{CH}_3\text{CH}_3)$), 14.16 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3300 (m), 3066 (w), 2972 (m), 2928 (m), 2872 (w), 2157 (w), 1975 (w), 1716 (m), 1690 (m), 1636 (s), 1524 (m), 1496 (m), 1455 (w), 1365 (m), 1311 (w), 1248 (m), 1163 (s), 1115 (w), 1049 (w), 1027 (w), 980 (w), 930 (w), 890 (w), 850 (w), 802 (w), 698 (m).

12.3.5 *tert*-Butyl-((*S*)-2-(((*S*)-5-(benzylamino)-1-hydroxy-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate

tert-Butyl-(*S*)-3-(benzylcarbamoyl)-1-(methoxycarbonyl)propylcarbamate,
Boc-(*S*)-Gln(Bn)-OMe



Methode: B2.

Ansatz: 2.0 g, 7.65 mmol (1.0 Äq.) Boc-Glu-OMe;
0.82 g, 7.65 mmol, 0.83 ml (1.0 Äq.) Benzylamin;
1.17 g, 7.65 mmol (1.0 Äq.) HOBt · H₂O;
1.66 g, 8.03 mmol (1.05 Äq.) DCC;
0.77 g, 7.65 mmol, 0.84 ml (1.0 Äq.) NMM;
30 ml THF, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 24 h RT.

SC: Petrolether/Ethylacetat [3/1].

R_f: 0.27 (Petrolether/Ethylacetat [1/1]).

Ausbeute: 2.59 g, 7.39 mmol, 97 %, farbloser Feststoff.

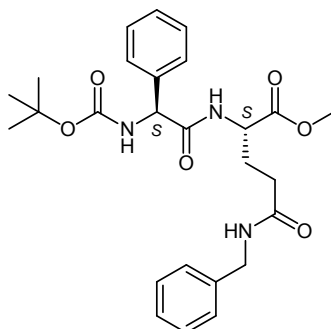
Smp.#: 79.9 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +5.6 ° (c = 1.04, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.34–7.23 (m, 5H, 5 × Ph-CH), 6.31 (bs, 1H, Bn-NH), 5.30 (bs, 1H, Boc-NH), 4.42 (d, 2H, PhCH₂NH, ³J = 5.60 Hz), 3.30 (bs, 1H, Gln-α CH), 3.72 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.32–2.28 (m, 2H, Gln-γ CH₂), 2.23–2.10 (m, 1H, Gln-β CH₂), 2.07–1.93 (m, 1H, Gln-β' CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.71 (CO₂CH₃), 171.66 (CONHBn), 155.78 (COC(CH₃)₃), 138.19 (Ph-C_q), 128.65, 127.78, 127.44 (5 × Ph-CH), 80.11 (C(CH₃)₃), 52.96 (Gln-α CH), 52.40 (CO₂CH₃), 43.69 (NHCH₂Ph), 32.54 (Gln-γ CH₂), 29.00 (Gln-β CH₂), 28.26 (C(CH₃)₃).

(S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-2-phenylacetyl-amino)-4-(benzylcarbamoyl)-butansäuremethylester, Boc-(S)-Phg-(S)-Gln(Bn)-OMe



Methode: A2.

Ansatz: 1.0 g, 2.85 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Gln(Bn)-OMe;

3.25 g, 28.5 mmol, 2.20 ml (10.0 Äq.) TFA;

20 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 1.5 h RT.

Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Methode: B3.

Ansatz: 1.42 g, 2.85 mmol (1.0 Äq.) (S)-Gln(Bn)-OMe · TFA;

0.72 g, 2.85 mmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Phg;

1.56 g, 2.99 mmol (1.05 Äq.) PyBOP;

0.74 g, 5.70 mmol, 0.97 ml (2.0 Äq.) DIPEA;

25 ml DCM, Reaktionszeit: 1 h 0 °C, 18 d RT.

Ausbeute: 0.73 mg, 1.50 mmol, 52 % farbloser Feststoff.

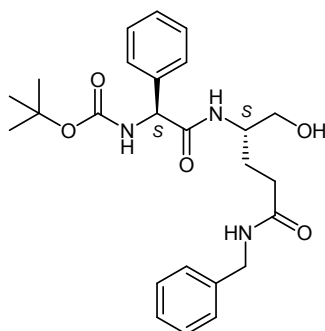
Smp.: 137.5 °C.

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: +31.5 ° (c = 1.08, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.24 (m, 10H, 10 \times Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 6.96 (d, 1H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$ -Gln- α , $^3J = 6.80$ Hz), 6.42 (bs, 1H, Bn- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 5.60 (d, 1H, Boc- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$, $^3J = 6.60$ Hz), 5.11 (bs, 1H, Phg- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 4.53–4.48 (m, 1H, Gln- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 4.40 (d, 2H, Ph $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ NH, $^3J = 5.70$ Hz), 3.62 (s, 3H, CO_2 $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 2.30–2.21 (m, 3H, Gln- γ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$, Gln- β $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.03–1.94 (m, 1H, Gln- β' $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 1.37 (s, 9H, C($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.86 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}_2$ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 171.73 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\underline{\text{B}}\underline{\text{n}}$), 170.52 ($\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -Phg), 155.17 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 138.21, 137.28 (2 \times Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}$), 128.95, 128.64, 128.47, 127.78, 127.29 (10 \times Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 80.19 ($\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 58.83 (Phg- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 52.43 (CO_2 $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 52.17 (Gln- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 43.65 ($\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ Ph), 32.25 (Gln- γ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 28.24 (C($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) $_3$), 28.02 (Gln- β $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$).

tert-Butyl-((*S*)-2-(((*S*)-5-(benzylamino)-1-hydroxy-5-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate, Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(Bn)- CH_2OH (CS401^{LJ})



Methode: E2.

Ansatz: 630 mg, 1.30 mmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Phg-(*S*)-Gln(Bn)-OMe;
550 mg, 3.90 mmol, 3.90 ml (3.0 Äq.) DIBAL (1 M in Hexan);
20 ml THF_{abs}, Reaktionszeit: 30 min -15 °C (DIBAL-Zugabe), 3.5 h 0 °C.

SC: Chloroform/Ethylacetat [3/1] \rightarrow Ethylacetat.

R_f: 0.05 (Ethylacetat/Chloroform [2/1]).

Ausbeute: 160 mg, 351 μmol , 27 %, farbloser Feststoff.

Smp.: 170.9 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: +41.0 ° (c = 1.08, CHCl_3).

ESI-MS[#]: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$: 455.24 [M]; gef: 456.28 [M+H]⁺, 478.26 [M+Na]⁺, 494.24 [M+K]⁺, 933.56 [2M+Na]⁺, 949.53 [2M+K]⁺.

LC-MS: R_t = 14.2 min (Methode V).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.49–7.12 (m, 10H, 10 \times Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 6.86 (d, 1H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$ -Gln- α , $^3J = 8.20$ Hz), 6.61–6.39 (m, 1H, Bn- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 5.75–5.51 (m, 1H, Boc- $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 5.21–4.93 (m, 1H, Phg- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 4.39 (d, 1H, Ph $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ NH, $^3J = 5.80$ Hz), 3.97–3.73 (m, 1H, Gln- α $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 3.48 (d, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ OH, $^3J = 3.40$ Hz), 3.09 (bs, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ OH),

2.32–2.10 (m, 2H, Gln- γ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.00–1.78 (m, 2H, Gln- β $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$).

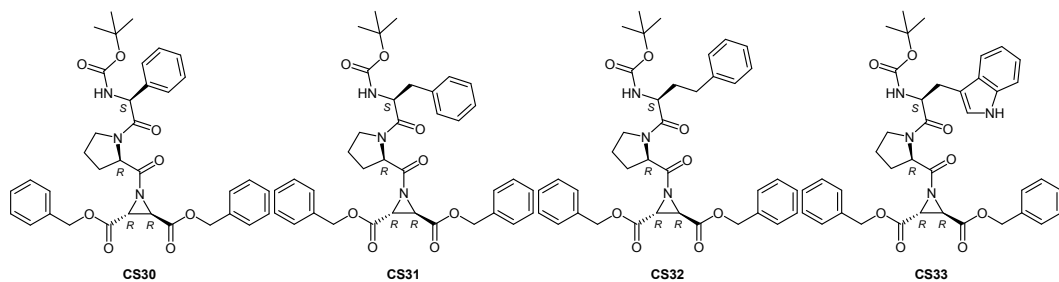
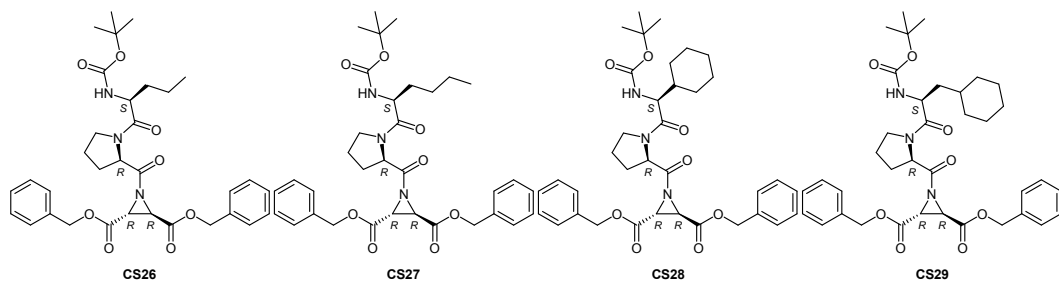
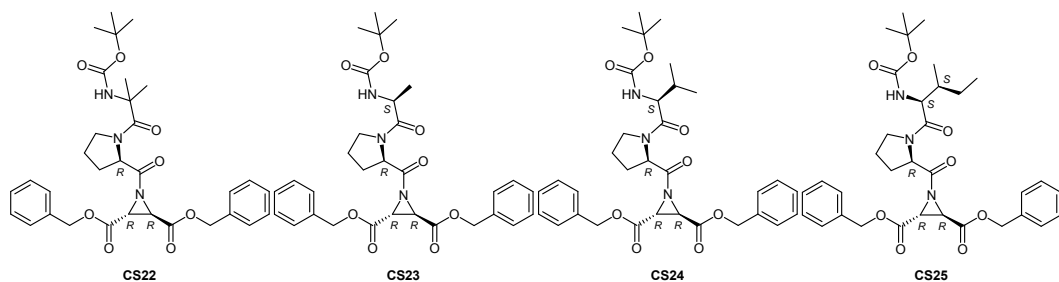
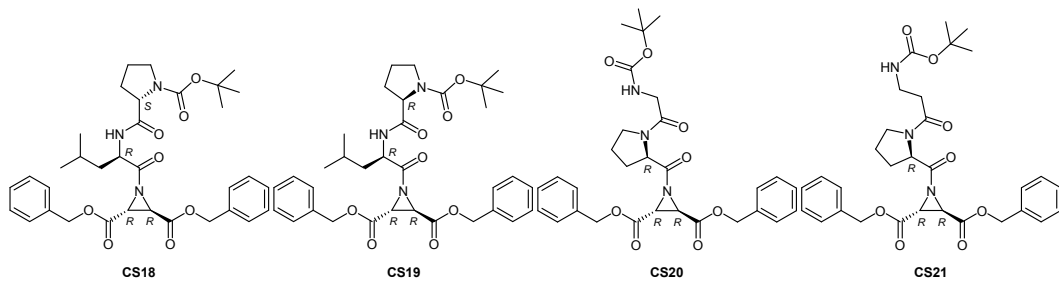
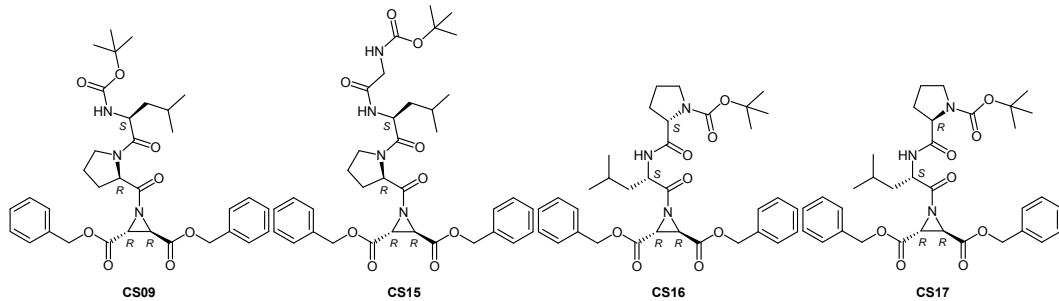
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.08 ($\underline{\text{C}}\text{ONHCH}_2\text{Ph}$), 171.02 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{O Phg}$), 155.30 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 138.14 ($2 \times \text{Ph-}\underline{\text{C}}_q$), 128.99 ($2 \times \text{NHCH}_2\text{Ph-}\underline{\text{meta-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 128.66 ($2 \times \text{NHCH}_2\text{Ph-}\underline{\text{ortho-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 128.40 ($\text{NHCH}_2\text{Ph-}\underline{\text{para-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 127.77 ($2 \times \text{Ph-}\underline{\text{meta-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H Phg}}$), 127.45 ($\text{Ph-}\underline{\text{para-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H Phg}}$), 127.10 ($2 \times \text{Ph-}\underline{\text{ortho-}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H Phg}}$), 80.31 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 64.37 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{OH}$), 59.08 ($\text{Phg-}\alpha$ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 51.81 ($\text{Gln-}\alpha$ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 43.68 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 32.61 ($\text{Gln-}\gamma$ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 28.25 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$), 26.41 ($\text{Gln-}\beta$ $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$).

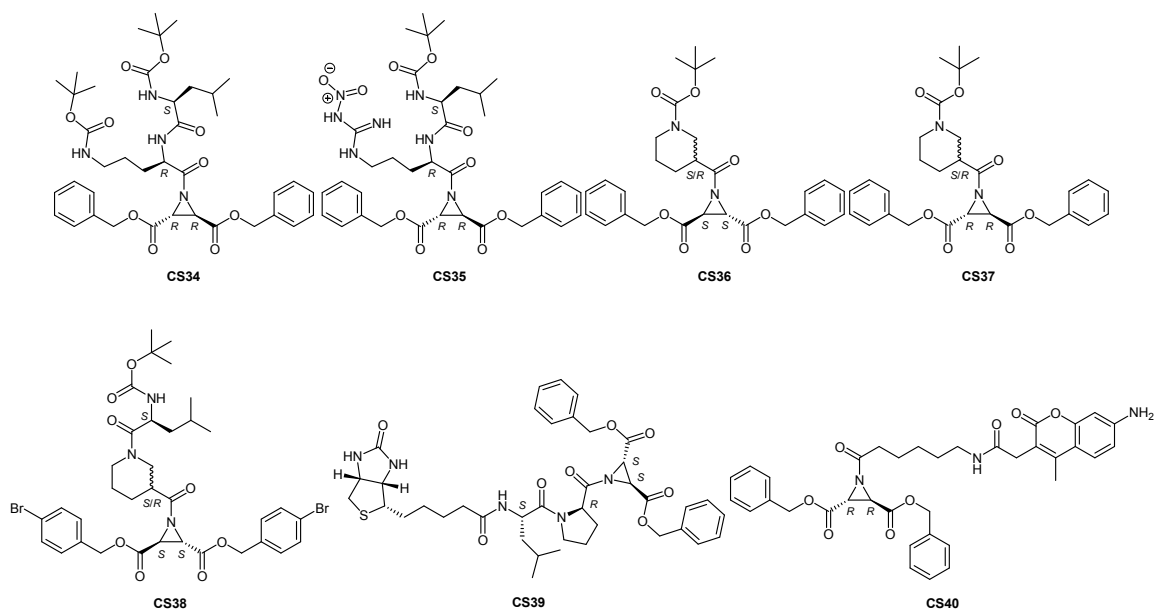
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3313 (m), 3063 (w), 3034 (w), 2930 (w), 2871 (w), 2157 (w), 2011 (w), 1968 (w), 1691 (m), 1654 (s), 1641 (s), 1625 (m), 1545 (m), 1524 (s), 1497 (m), 1453 (m), 1391 (w), 1365 (m), 1313 (w), 1267 (w), 1245 (m), 1162 (s), 1077 (w), 1049 (w), 1024 (w), 884 (w), 846 (w), 801 (w), 745 (w), 697 (m).

APPENDIX

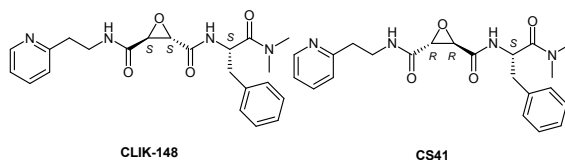
13 Formelregister

Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren:

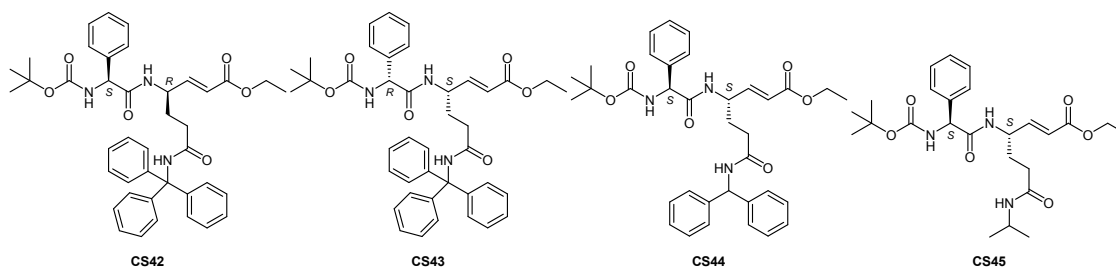




Oxiran-2,3-dicarboxamid-basierte Inhibitoren:



Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren:



14 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut	Arg	Arginin
ACN	Acetonitril	AS	Aminosäure
Ahx	Aminohexansäure	Asn	Asparagin
Aib	2-Aminoisobuttersäure	Asp	Aspartat (Asparaginsäure)
Ala	Alanin	Azi	Aziridin
β -Ala	β -Alanin	Äq.	Äquivalent
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin	b	breit
AMCA	2-(7-Amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure	Bio	Biotin

Bn	Benzyl	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	FP	Falcipain
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	FT	Fourier-Transformation
Brij 35	Polyoxyethylen(23)laurylether	ges.	gesättigt
Cath	Cathepsin	Gln	Glutamin
Cbz	Benzyloxycarbonyl	Glu	Glutamat (Glutaminsäure)
Cha	Cyclohexylalanin	Gly	Glycin
Chg	Cyclohexylglycin	HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
CP	Cystein-Protease	His	Histidin
Cru	Cruzain	HIV	human immunodeficiency virus
Cy	Cyclohexyl	HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
Cys	Cystein	hPhe	Homophenylalanin
d	Duplett	(HP)LC	(high performance) liquid chromatography
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	HTS	high-throughput-screening
dd	Duplett von Duplett	Ile	Isoleucin
ddd	Duplett von Duplett von Duplett	<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
dt	Duplett von Triplet	IR	Infrarotspektroskopie
DC	Dünnschichtchromatographie	i. Vak.	im Vakuum
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	kat.	katalytisch
DCM	Dichlormethan	Kon.	Konfiguration
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid	konz.	konzentriert
DIPEA	Diisopropylethylamin	Leu	Leucin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin	LJ	Laborjournal
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	<i>L. m.</i> (a)	<i>Leishmania-major</i> -Amastigoten
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>L. m.</i> (p)	<i>Leishmania-major</i> -Promastigoten
dr	diastereomeric ratio	m	Multiplet
DTT	Dithiothreitol	Me	Methyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MS	Massenspektrometrie
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolon	n.d.	not determined
ESI	Elektronensprayionisation	quin.	Quintett
n.i.	no inhibition	Nip	Nipecotinsäure

Nle	Norleucin	Rho	Rhodesain
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	RP	reversed phase
NMR	nuclear magnetic resonance	RT	Raumtemperatur
Nva	Norvalin	s	Singulett
NTDs	neglected tropical diseases	SC	Säulenchromatographie
Orn	Ornithin	Sdp.	Siedepunkt
pBr-Bn	<i>para</i> -Brombenzyl	sept.	Septett
PDB	protein data bank	sext.	Sextett
Ph	Phenyl	Smp.	Schmelzpunkt
Phe	Phenylalanin	Su	Succinimid
Phg	Phenylglycin	t	Triplett
Pip	Piperidin	td	Triplett von Duplett
PM	Plasmepsin	TFA	Trifluoressigsäure
PPA	Propylphosphonsäureanhydrid	THF	Tetrahydrofuran
Pro	Prolin	Trp	Tryptophan
pTosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	Trt	Trityl
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat	Val	Valin
Pyr	Pyridin	v	vinylog
q	Quartett	WHO	World Health Organization
R	Rest		

15 Literaturverzeichnis

- [1] Schurigt, U.; Schad, C.; Glowa, C.; Baum, U.; Thomale, K.; Schnitzer, J. K.; Schultheis, M.; Schaschke, N.; Schirmeister, T.; Moll, H., Aziridine-2,3-Dicarboxylate-Based Cysteine Cathepsin Inhibitors Induce Cell Death in *Leishmania major* Associated with Accumulation of Debris in Autophagy-Related Lysosome-Like Vacuoles, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 5028-5041.
- [2] Heller, E.; Gutmann, A.; Hiltenperger, G.; Lautenschläger, W.; Lohse, M. J.; Schad, C.; Schirmeister, T.; Seufert, F.; Zlotos, D. P.; Holzgrabe, U., Microwave Hydrogenations Large-Size, High Pressure Microwave Reactor, *G. I. T. Laboratory Journal* **2013**, *1-2*, 32-33.
- [3] Breuning, A.; Degel, B.; Schulz, F.; Büchold, C.; Stempka, M.; Machon, U.; Heppner, S.; Gelhaus, C.; Leippe, M.; Leyh, M.; Kisker, C.; Rath, J.; Stich, A.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Schmuck, C.; Schirmeister, T., Michael Acceptor Based Antiplasmodial and Antitrypanosomal Cysteine Protease Inhibitors with Unusual Amino Acids, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1951-1963.
- [4] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J., MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 325.
- [5] Rawlings, N. D.; Tolle, D. P.; Barrett, A. J., MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, D160-D164.
- [6] Turk, B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785-799.
- [7] Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305.
- [8] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [9] Drag, M.; Salvesen, G. S., Emerging principles in protease-based drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 690-701.
- [10] Madala, P. K.; Tyndall, J. D.; Nall, T.; Fairlie, D. P., Update 1 of: Proteases Universally Recognize Beta Strands In Their Active Sites, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, PR1-PR31.
- [11] Deu, E.; Verdoes, M.; Bogyo, M., New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *19*, 9-16.
- [12] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A., The resurgence of covalent drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307-317.
- [13] Otto, H. H.; Schirmeister, T., Cysteine Proteases and Their Inhibitors, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.
- [14] Schomburg, I.; Chang, A.; Ebeling, C.; Gremse, M.; Heldt, C.; Huhn, G.; Schomburg, D., BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments, *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, D431-D433.
- [15] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A., MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, D343-D350.
- [16] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A., Asparagine Peptide Lyases, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38321-38328.
- [17] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J., Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.* **1993**, *290*, 205.
- [18] Fairlie, D. P.; Tyndall, J. D. A.; Reid, R. C.; Wong, A. K.; Abbenante, G.; Scanlon, M. J.; March, D. R.; Bergmann, D. A.; Chai, C. L. L.; Burkett, B. A., Conformational Selection of Inhibitors and Substrates by Proteolytic Enzymes: Implications for Drug Design and Polypeptide Processing, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1271-1281.
- [19] Schechter, I.; Berger, A., On size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.
- [20] Wittmack, H., The fermentative action of the juice of the fruit *Carica papaya*, *Pharm. J. Trans.* **1878**, *9*, 449.
- [21] Dubey, V. K.; Pande, M.; Singh, B. K.; Jagannadham, M. V., Papain-like proteases: Applications of their inhibitors, *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6*, 1077-1086.
- [22] Schirmeister, T.; Welker, A., Erfolgreiches Konzept: Proteasen als Zielstrukturen für Antiinfektiva, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 564-574.
- [23] Thompson, A. J.; Patel, K., New agents for the treatment of hepatitis C virus - focus on telaprevir, *Virus Adaptation and Treatment* **2012**, *4*, 75-84.
- [24] Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D., Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459.

- [25] Mladenovic, M.; Schirmeister, T.; Thiel, S.; Thiel, W.; Engels, B., The Importance of the Active Site Histidine for the Activity of Epoxid- or Aziridine-Based Inhibitors of Cysteine Proteases, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 120-128.
- [26] Varughese, K. I.; Ahmed, F. R.; Carey, P. R.; Hasnain, S.; Huber, C. P.; Storer, A. C., Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1330-1332.
- [27] Varughese, K. I.; Su, Y.; Cromwell, D.; Hasnain, S.; Xuong, N., Crystal Structure of an Actinidin-E-64 Complex, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5172-5176.
- [28] Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D., Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers, *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, *1824*, 68-88.
- [29] Schurigt, U., Role of Cysteine Cathepsins in Joint Inflammation and Destruction in Human Rheumatoid Arthritis and Associated Animal Models, In *Innovative Rheumatology*, Matsuno, H., Ed. 2013; pp 1-21, DOI: 10.5772/53710.
- [30] Mohamed, M. M.; Sloane, B. F., Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 764-775.
- [31] McKerrow, J. H.; Rosenthal, P. J.; Swenerton, R.; Doyle, P., Development of protease inhibitors for protozoan infections, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2008**, *21*, 668-672.
- [32] Renslo, A. R.; McKerrow, J. H., Drug discovery and development for neglected parasitic diseases, *Nat. Chem. Biol* **2006**, *2*, 701-710.
- [33] McKerrow, J. H.; Engel, J. C.; Caffrey, C. R., Cysteine Protease Inhibitors as Chemotherapy for Parasitic Infections, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 639-644.
- [34] Rudenskaya, G. N.; Pupov, D. V., Cysteine Proteinases of Microorganisms and Viruses, *Biochemistry (Moscow)* **2008**, *73*, 1.
- [35] Caffrey, C. R.; McKerrow, J. H.; Salter, J. P.; Sajid, M., Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases, *TRENDS Parasitol.* **2004**, *20*, 241-248.
- [36] Mottram, J. C.; Brooks, D. R.; Coombs, G. H., Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 455-460.
- [37] Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Alexander, J., Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 375.
- [38] Soares, R. M. A.; Souza dos Santos, A. L.; Bonaldo, M. C.; de Andrade, A. F. B.; Alviano, C. S.; Angluster, J.; Goldenberg, S., *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes, *Exp. Parasitol.* **2003**, *104*, 104-112.
- [39] Alexander, J.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C., *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response, *J. Immunol.* **1998**, *161*, 6794-6801.
- [40] Bart, G.; Frame, M. J.; Carter, R.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C., Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *88*, 53-61.
- [41] McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R.; Kelly, B.; Loke, P.; Sajid, M., Proteases in Parasitic Diseases, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, *1*, 497-536.
- [42] Selzer, P. M.; Pingel, S.; Hsieh, I.; Ugele, B.; Chan, V. J.; Engel, J. C.; Bogyo, M.; Russel, D. G.; Sakanari, J. A.; McKerrow, J. H., Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11015-11022.
- [43] Abdulla, M.-H.; O'Brien, T.; Mackey, Z. B.; Sajid, M.; Grab, D. J.; McKerrow, J. H., RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L Affects Disease Progression in Mouse Model, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e298.
- [44] O'Brien, T. C.; Mackey, Z. B.; Fetter, R. D.; Choe, Y.; O'Donoghue, A. J.; Zhou, M.; Craik, C. S.; Caffrey, C. R.; McKerrow, J. H., A Parasite Cysteine Protease Is Key to Host Protein Degradation and Iron Acquisition, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28934-28943.
- [45] Mackey, Z. B.; O'Brien, T. C.; Greenbaum, D. C.; Blank, R. B.; McKerrow, J. H., A Cathepsin B-like Protease Is Required for Host Protein Degradation in *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48426-48433.
- [46] Steverding, D.; Sexton, D. W.; Wang, X.; Gehrke, S. S.; Wagner, G. K.; Caffrey, C. R., *Trypanosoma brucei*: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target, *Int. J. Parasitol.* **2012**, *42*, 481-488.
- [47] Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H., Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection, *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 725-734.
- [48] Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H., A Cysteine Protease Inhibitor Cures Chagas' Disease in an Immunodeficient-Mouse model of Infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3932-3939.

- [49] Barr, S. C.; Warner, K. L.; Kornreic, B. G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J. H., A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 5160-5161.
- [50] Rosenthal, P. J., Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasite, *Curr. Opin. Hematol.* **2002**, *9*, 140-145.
- [51] Ettari, R.; Bova, F.; Zappalà, M.; Grasso, S.; Micale, N., Falcipain-2 Inhibitors, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 136-167.
- [52] Jílková, A.; Rezáčová, P.; Lepsík, M.; Horn, M.; Váchová, J.; Fanfrlík, J.; Brynda, J.; McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R.; Mares, M., Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35770-35781.
- [53] WHO, *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases*, World Health Organization: 2010.
- [54] Pearson, R. D.; de Queiroz Sousa, A., Clinical Spectrum of Leishmaniasis, *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 1-13.
- [55] Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S. H. E.; Ullmann, U., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 4th ed.; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York, **2001**.
- [56] Schurigt, U.; Moll, H., Behandlung und Prophylaxe der kutanen Leishmaniose, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 532-537.
- [57] Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Canavate, C.; Dedet, J.-P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; López-Vélez, R.; Moreno, J., The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years, *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 334-359.
- [58] Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?, *Nature Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 873-882.
- [59] Laskay, T.; Zandbergen, G. v.; Solbach, W., Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?, *Trends in Microbiology* **2003**, *11*, 210-214.
- [60] Le Pape, P., Development of new antileishmanial drugs - current knowledge and future prospects, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 708-718.
- [61] Ryczak, J.; Kunick, C., Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 538-544.
- [62] Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de Vries, P. J., Miltefosin: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis, *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2576-2597.
- [63] Stich, A., Die Afrikanische Schlafkrankheit, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 546-550.
- [64] Stich, A., Die wichtigste tropische Infektionskrankheit Malaria, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 508-511.
- [65] WHO, *World Malaria Report 2011*, World Health Organization: 2011.
- [66] Turk, V.; Turk, B., Lysosomal Cysteine Proteases and Their Inhibitors: Recent Developments, *Acta Chim. Slov.* **2008**, *55*, 727-738.
- [67] Tsuge, H.; Nishimura, T.; Tada, Y.; Asao, T.; Turk, D.; Turk, V.; Katunuma, N., Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain-CLIK148 Complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *266*, 411-416.
- [68] Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J.; Plancher, J.-M.; Hartmann, G.; Isshiki, Y.; Morikami, K.; Shimma, N.; Haap, W.; Banner, D. W.; Diederich, F., Halogen Bonding at the Active Sites of Human Cathepsin L and MEK1 Kinase: Efficient Interactions in Different Environments, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2048-2054.
- [69] Greenspan, P. D.; Clark, K. L.; Tommasi, R. A.; Cowen, S. D.; McQuire, L. W.; Farley, D. L.; van Duzer, J. H.; Goldberg, R. L.; Zhou, H.; Du, Z.; Fitt, J. J.; Coppa, D. E.; Fang, Z.; Macchia, W.; Zhu, L.; Capparelli, M. P.; Goldstein, R.; Wigg, A. M.; Doughty, J. R.; Bohacek, R. S.; Knap, A. K., Identification of Dipeptidyl Nitriles as Potent and Selective Inhibitors of Cathepsin B through Structure-Based Drug Design, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4524-4534.
- [70] Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H.; Markley, J. L., The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data, *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, D301-D303.
- [71] DeLana, W. L., *The PyMOL Molecular Graphics System*.
- [72] Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N.; Bode, W., The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity, *EMBO J.* **1991**, *10*, 2321-2330.
- [73] McGrath, M. E., The lysosomal cysteine proteases, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 181-204.
- [74] Cathers, B. E.; Barrett, C.; Palmer, J. T.; Rydzewski, R. M., pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B, *Bioorg. Chem.* **2002**, *30*, 264-275.

- [75] Shenoy, R. T.; Sivaraman, J., Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors, *J. Struct. Biol.* **2011**, *173*, 14-19.
- [76] Ménard, R.; Carmona, E.; Plouffe, C.; Brömme, D.; Konishi, Y.; Lefebvre, J.; Storer, A. C., The specificity of the S₁' subsite of cysteine psoteases, *FEBS Lett.* **1993**, *328*, 107-110.
- [77] Sajid, M.; McKerrow, J. H., Cysteine proteases of parasitic organisms, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *120*, 1-21.
- [78] Chan, V. J.; Selzer, P. M.; McKerrow, J. H.; Sakanari, J. A., Expression and alteration of the S₂ subsite of the *Leishmania major* cythepsin B-like cysteine protease, *Biochem. J.* **1999**, *340*, 113-117.
- [79] Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S., Vinyl Sulfones as Antiparasitic Agents and a Structural Basis for Drug Design, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25697-25703.
- [80] Mott, B. T.; Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Ang, K. K.-H.; Leister, W.; Shen, M.; Silveira, J. T.; Doyle, P. S.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H.; Inglesse, J.; Austin, C. P.; Thomas, C. J.; Shoichet, B. K.; Maloney, D. J., Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB, *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (52-60), 52.
- [81] Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Pandey, K. C.; Harrison, A.; Sajid, M.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S., Structures of Falcipain-2 and Falcipain-3- Bound to Small Molecule Inhibitors: Implications for Substrate Specificity, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 852-857.
- [82] Kerr, I. D.; Wu, P.; Marion-Tsukamaki, R.; Mackey, Z. B.; Brinen, L. S., Crystal Structures of TbCatB and Rhodesain, Potential Chemotherapeutic Targets and Major Cysteine Proteases of *Trypanosoma brucei*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, 1-9.
- [83] Selzer, P. M.; Chen, X.; Chan, V. J.; Cheng, M.; Kenyon, G. L.; Kuntz, I. D.; Sakanari, J. A.; Cohen, F. E.; McKerrow, J. H., *Leishmania major*: Molecular Modeling of Cysteine Proteases and Prediction of New Nonpeptide Inhibitors, *Exp. Parasitol.* **1997**, *87*, 212-221.
- [84] Powers, J. P.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E., Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.
- [85] Klebe, G., *Wirkstoffdesign*, 2nd ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2009.
- [86] Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I., Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523-528.
- [87] Schirmeister, T.; Klockow, A., Cysteine Protease Inhibitors Containing Small Rings, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585-596.
- [88] Katunuma, N.; Murata, E.; Kakegawa, H.; Matsui, A.; Tsuzuki, H.; Tsuge, H.; Turk, D.; Turk, V.; Fukushima, M.; Tada, Y.; Asao, T., Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo, *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 6-10.
- [89] Sumiya, S.; Yoneda, T.; Kitamura, K.; Murata, M.; Yokoo, C.; Tamai, M.; Yamamoto, A.; Inoue, M.; Ishida, T., Molecular Design of Potent Inhibitor Specific for Cathepsin B Based on the Tertiary Structure Prediction, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 299-303.
- [90] Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Hara, T.; Murata, M.; Kitamura, K.; Ishida, T., Substrate Specificity of Bovine Cathepsin B and Its Inhibition by CA074, Based on Crystal Structure Refinement of the Complex, *J. Biochem.* **2000**, *127*, 635-643.
- [91] Martichonok, V.; Plouffe, C.; Storer, A. C.; Ménard, R.; Jones, J. B., Aziridine Analogs of [[*trans*-(Epoxysuccinyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane (E-64) as Inhibitors of Cysteine Proteases, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3078-3085.
- [92] Helten, H.; Schirmeister, T.; Engels, B., Model Calculations about the Influence of Protic Environments on the Alkylation Step of Epoxide, Aziridine, and Thirane Based Cysteine Protease Inhibitors, *J. Phys. Chem.* **2004**, *108*, 7691-7701.
- [93] Helten, H.; Schirmeister, T.; Engels, B., Theoretical Studies about the Influence of Different Ring Substituents on the Nucleophilic Ring Opening of Three-Membered Heterocycles and Possible Implications for the Mechanisms of Cysteine Protease Inhibitors, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 233-237.
- [94] Vicik, R.; Helten, H.; Schirmeister, T.; Engels, B., Rational Design of Aziridine-Containing Cysteine Protease Inhibitors with Improved Potency: Studies on Inhibition Mechanism, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1021-1028.
- [95] Buback, V.; Mladenovic, M.; Engels, B.; Schirmeister, T., Rational Design of Improved Aziridine-Based Inhibitors of Cysteine Proteases, *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 5282-5289.
- [96] Naganawa, H.; Usui, N.; Takita, T.; Hamada, M.; Umezawa, H., S-2,3-Dicarboxy-aziridine, a new metabolite from a *streptomyces*, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 828-829.
- [97] Nakao, Y.; Fujita, M.; Warabi, K.; Matsunaga, S.; Fusetani, N., Miraziridine A, a Novel Cysteine Protease Inhibitor from the Marine Sponge *Theonella aff. mirabilis*, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462-10463.

- [98] Schaschke, N., Miraziridine A: nature's blueprint towards protease class-spanning inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 855-857.
- [99] Moroder, L.; Musiol, H.-J.; Scharf, R., Aziridine-2-carboxylic acid, *FEBS Lett.* **1992**, *299*, 51-53.
- [100] Schirmeister, T., Aziridine-2,3-dicarboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Papain, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329*, 239-244.
- [101] Schirmeister, T., New Peptidic Cysteine Protease Inhibitors Derived from the Electrophilic alpha-Amino Acid Aziridine-2,3-dicarboxylic Acid, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560-572.
- [102] Schirmeister, T., Inhibition of Cysteine Proteases by Peptides Containing Aziridine-2,3-Dicarboxylic Acid Building Blocks, *Biopolymers* **1999**, *51*, 87-97.
- [103] Schirmeister, T.; Peric, M., Aziridinyl Peptides as Inhibitors of Cysteine Proteases: Effect of a Free Carboxylic Acid Function on Inhibition, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1281-1291.
- [104] Schirmeister, T., Aziridine-2,2-dicarboxylates: Synthesis, Reactions, and Photochromism, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 1895-1899.
- [105] Vicik, R.; Busemann, M.; Gelhaus, C.; Stiefl, N.; Scheiber, J.; Schmitz, W.; Schulz, F.; Mladenovic, M.; Engels, B.; Leippe, M.; Baumann, K.; Schirmeister, T., Aziridine-Based Inhibitors of Cathepsin L: Synthesis, Inhibition Activity, and Docking Studies, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1126-1141.
- [106] Ponte-Sucre, A.; Vicik, R.; Schultheis, M.; Schirmeister, T.; Moll, H., Aziridine-2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2439-2447.
- [107] Vicik, R.; Hoerr, V.; Glaser, M.; Schultheis, M.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Holzgrabe, U.; Caffrey, C. R.; Ponte-Sucre, A.; Moll, H.; Stich, A.; Schirmeister, T., Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* as lead trypanocidal agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2753-2757.
- [108] Schulz, F.; Gelhaus, C.; Degel, B.; Vicik, R.; Heppner, S.; Breuning, A.; Leippe, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Schirmeister, T., Screening of Protease Inhibitors as Antiplasmodial Agents. Part I: Aziridines and Epoxides, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1214-1224.
- [109] Rupp, I.; Bosse, R.; Schirmeister, T.; Pradel, G., Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *158*, 208-212.
- [110] Gelhaus, C.; Vicik, R.; Hilgenfeld, R.; Schmidt, C. L.; Leippe, M.; Schirmeister, T., Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate, *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 435-438.
- [111] Gelhaus, C.; Vicik, R.; Schirmeister, T.; Leippe, M., Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of *Plasmodium falciparum* merozoites from infected red blood cells, *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 499-502.
- [112] Grabowsky, S.; Pfeuffer, T.; Checinska, L.; Weber, M.; Morgenroth, W.; Luger, P.; Schirmeister, T., Electron-Density Determinations of Electrophilic Building Blocks as Model Compounds for Protease Inhibitors, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2759-2768.
- [113] Mladenovic, M.; Junold, K.; Fink, R. F.; Thiel, W.; Schirmeister, T.; Engels, B., Atomistic Insights into the Inhibition of Cysteine Proteases: First QM/MM Calculations Clarifying the Regiospecificity and the Inhibition Potency of Epoxide- and Aziridine-Based Inhibitors, *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 5458-5469.
- [114] Paasche, A.; Arnone, M.; Fink, R. F.; Schirmeister, T.; Engels, B., Origin of the Reactivity Differences of Substituted Aziridines: CN vs CC Bond Breakages, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5244-5249.
- [115] Schirmeister, T.; Breuning, A.; Murso, A.; Stalke, D.; Mladenovic, M.; Engels, B.; Szeghalmi, A.; Schmitt, M.; Kiefer, W.; Popp, J., Conformation and Hydrogen Bonding Properties of an Aziridinyl Peptide: X-ray Structure Analysis, Raman Spectroscopy and Theoretical Investigations, *J. Phys. Chem.* **2004**, *108*, 11398-11408.
- [116] Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K., L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.
- [117] Machon, U.; Büchold, C.; Stempka, M.; Schirmeister, T.; Gelhaus, C.; Leippe, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Kisker, C.; Leyh, M.; Schmuck, C., On-Bead Screening of a Combinatorial Fumaric Acid Derived Peptide Library Yields Antiplasmodial Cysteine Protease Inhibitors with Unusual Peptide Sequences, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5662-5672.
- [118] Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Brömme, D., Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193-3196.
- [119] Chen, Y. T.; Lira, R.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Roush, W. R., Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5860-5863.
- [120] Abdulla, M.-H.; Lim, K.-C.; Sajid, M.; McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R., Schistosomiasis Mansonii: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor, *PLoS Med.* **2007**, *4*, e14.

- [121] Vermeire, J. J.; Lantz, L. D.; Caffrey, C. R., Cure of Hookworm Infection with a Cysteine Protease Inhibitor, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1680.
- [122] Brak, K.; Kerr, I. D.; Barrett, K. T.; Fuchi, N.; Debnath, M.; Ang, K.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.; Doyle, P. S.; Brinen, L. S.; Ellman, J. A., Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas Disease Chemotherapy, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1763-1773.
- [123] Schneider, T., *Dissertation: Synthese von reversiblen und kovalent-reversiblen Cysteinprotease-Inhibitoren*, Würzburg, 2011.
- [124] Han, S.-Y.; Kim, Y.-A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [125] Brückner, R., *Reaktionsmechanismen*, 2nd ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, **2003**.
- [126] Bodanszky, M., *Principles of Peptide Synthesis*, 2nd ed.; Springer Verlag: Berlin Heidelberg, 1993.
- [127] Neises, B.; Steglich, W., Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
- [128] Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [129] Castro, B.; Dormoy, J. R., *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4747-4750.
- [130] Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C., *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222.
- [131] Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M., The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (3), 442-445.
- [132] Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B., *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [133] Li, P.; Xu, J. C., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3605-3608.
- [134] Anderson, G. W.; Paul, R., *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4423.
- [135] Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203-6205.
- [136] Wissmann, H.; Kleiner, H. J., New Peptide Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 133-134.
- [137] Hu, Y.; Yamada, K. A.; Chalmers, D. K.; Annavajjala, D. P.; Covey, D. F., Enantioselective Synthesis of Cyclothiazide Analogues: Novel Probes of the Stereospecific Actions of Benzothiadiazines at AMPA-Type Glutamate Receptors, *J. Am. Chem. Am. Soc.* **1996**, *118*, 4550-4559.
- [138] Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T., An improved synthesis of aziridine-2,3-carboxylates via azido alcohols - epimerization studies, *Tetrahedron Asymm.* **2003**, *14*, 3301.
- [139] Pöchlauer, P.; Müller, E. P.; Peringer, P., Zum Mechanismus der Aziridinsynthese aus 2-Azidoalkoholen und Triphenylphosphin, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1238-1247.
- [140] Bodanszky, M.; Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag: Berlin-Heidelberg, **1994**.
- [141] Mast, C. A.; Eißler, E.; Stroncius, A.; Stammler, H.-G.; Neumann, B.; Sewald, N., *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4667.
- [142] Sweeney, J. B., Aziridenes: epoxides' ugly cousins?, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 247-258.
- [143] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P., *Organic Chemistry*, Oxford University Press: New York, **2001**.
- [144] Eicher, T.; Hauptmann, S., *Chemie der Heterocyclen*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1994.
- [145] Riedel, E., *Anorganische Chemie*, 5th ed.; Walter de Gruyter: Berlin, 2002.
- [146] Ham, G. E., Activated Aziridines. I. Reaction of Anilines with O-Ethyl-N,N-Ethyleneurethane. Mechanism and Hammett ρ -Constant, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3052.
- [147] Vicik, R. Dissertation: Synthese und Eigenschaften *N*-acylierter Aziridin-2,3-dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren von Cystein-Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie.
- [148] Schad, C. Diplomarbeit: Synthese und Testung neuer *N*-acylierter Aziridin-2,3-carbonsäure-Derivate als Inhibitoren von parasitären Cystein-Proteasen, Würzburg, 2009.
- [149] Elsayy, M. A.; Hewage, C.; Walker, B., Racemisation of N-Fmoc phenylglycine under mild microwave-SPPS and conventional stepwise SPPS conditions: attempts to develop strategies for overcoming this, *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 302-311.
- [150] Ternansky, R. J.; Draheim, S. E., *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6569.
- [151] Greenbaum, D.; Medzihradzky, K. F.; Burlingame, A.; Bogyo, M., Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569-581.
- [152] Riggs, J. L.; Siewald, R. J.; Burckhalter, J. H.; Downes, C. M.; Metcalf, T. G., Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum, *Am. J. Pathol.* **1958**, *34*, 1081-1098.

- [153] Cebra, J. J.; Goldstein, G., Chromatographic purification of tetramethyl Rhodamine-immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit globulin polypeptid chains, *J. Immunol.* **1965**, *95*, 230-245.
- [154] Khalfan, H.; Abuknesha, R.; Rand-Weaver, M.; Price, R. G., Aminomethyl coumarin acetic acid: a new fluorescent labelling agent for Proteins, *Histochem. J.* **1986**, *18*, 497-499.
- [155] Green, F. J., *Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Milwaukee, Wis.: Aldrich Chemical Co.: 1990.
- [156] Chersi, A.; di Modugno, F.; Rosanò, L., Selective "in synthesis" labelling of peptides by fluorochromes, *Biochimica et Biophysica Acta* **1997**, *1336*, 83-88.
- [157] Papesch, V.; Schroeder, E. F., Synthesis of 1-mono-and 1,3-disubstituted 6-aminouracils. Diuretic activity, *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 1879-1890.
- [158] Drumm, J. E.; Deininger, D. D.; LeTiran, A.; Wang, T.; Grillot, A.; Liao, Y.; Ronkin, S. M.; Stamos, D. P.; Tang, Q.; Tian, S.; Oliver-Shaffer, P., Facile preparation of fused ring azolylureas, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5535-5538.
- [159] Mishra, A.; Srivastava, K.; Tripathi, R.; Puri, S. K.; Batra, S., Search for new pharmacophores for antimalarial activity. Part III: Synthesis and bioevaluation of new 6-thiouredo-4-anilinoquinazolines, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4404-4412.
- [160] Anzini, M.; Chelini, A.; Mancini, A.; Cappelli, A.; Frosini, M.; Ricci, L.; Valoti, M.; Magistretti, J.; Castelli, L.; Giordani, A.; Makovec, F.; Vomero, S., Synthesis and Biological Evaluation of Amidine, Guanidine, and Thiourea Derivatives of 2-Amino-(6-trifluoromethoxy)benzothiazole as Neuroprotective Agents Potentially Useful in Brain Diseases, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 734-744.
- [161] Mori, K.; Iwasawa, H., Stereoselective synthesis of optically active forms of d-multistriatin, the attractant for european populations of the smaller european elm bark beetle, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 87-90.
- [162] Bogyo, M.; Verhelst, S.; Bellingard-Dubochaud, V.; Toba, S.; Greenbaum, D., Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 27-38.
- [163] Tamai, M.; Yokoo, C.; Murata, M.; Oguma, K.; Sota, K.; Sato, E.; Kanaoka, Y., Efficient Synthesetic Method for Ethyl (+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-Methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate (EST), a New Inhibitor of Cysteine Proteinases *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1098-1104.
- [164] Detterbeck, R.; Hesse, M., Konfiguration und enantioselektive Synthese des Pilzmetaboliten WF14861, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 222-232.
- [165] Kemp, D. S.; Bowen, B. R.; Muendel, C., Synthesis and Conformational Analysis of Epindolidione-Derived Peptide Models for β -Sheet Formation, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4650-4657.
- [166] Sparks, S. M.; Chow, C. P.; Zhu, L.; Shea, K. J., Type 2 Intramolecular *N*-Acylnitroso Diels-Alder Reaction: Scope and Application to the Synthesis of Medium Ring Lactams, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3025-3035.
- [167] A., B. M.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essendorf, A. P.; Masamune, S.; Roush, W. R.; Sakai, T., Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion: Use of Lithium Chlorid and an Amine for base-sensitive Compounds, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2183-2186.
- [168] Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D., The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733-1738.
- [169] Wittig, G.; Geissler, G., Zur Reaktionsweise des Pentaphenyl-phosphors und einiger Derivate, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *580*, 44-57.
- [170] Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B., The Wittig Olefination Reaction and Modifications Involving Phosphoryl-Stabilized Carbanions. Stereochemistry, Mechanism, and Selected Synthetic Aspects, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
- [171] Bordwell, F. G., *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456.
- [172] Nakatani, K.; Hashimoto, S., *J. Soc. Org. Synthetic Chem.* **1975**, *33*, 925.
- [173] Kricheldorf, H., R., *Makromol. Chem.* **1974**, *175*, 3325.
- [174] Ando, K., A Mechanistic Study of the Horner-Wadsworth-Emmons Reaction: Computational Investigation on the Reaction Pass and the Stereochemistry in the Reaction of Lithium Enolate Derived from Trimehtyl Phosphonoacetat with Acetaldehyd, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6815-6821.
- [175] Still, W. C.; Gennari, C., Direct Synthesis of *Z*-unsaturated Esters. A Useful Modification of the Horner-Emmons Olefination., *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4405-4408.
- [176] Ando, K., Practical Synthesis of *Z*-Unsaturated Esters by Using a New Horner-Emmons Reagent, Ethyl Diphenylphosphonoacetate, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4105-4108.
- [177] Ando, K., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1934-1939.
- [178] Ando, K., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8411-8416.
- [179] Galaud, F.; Lubell, W. D., Homoserine-Derived Cyclic Sulfamidates as Chiral Educt for the Diversity-Oriented Synthesis of Lactam-Bridged Dipeptides, *Biopolymers* **2005**, *80*, 665-674.

- [180] Rodriguez, M.; Taddei, M., A Simple Procedure for the Transformation of L-Glutamic Acid into the Corresponding Aldehyds, *Synthesis* **2005**, 3, 493-495.
- [181] Bon, D. J.-Y. D.; Banwell, M. G.; Cade, I. A.; Willis, A. C., The total synthesis of (-)-connatusin A, a hirsutane-type sesquiterpene isolated from the fungus *Lentinus connatus* BCC8996, *Tetrahedron* **2011**, 67, 8348-8352.
- [182] Omura, K.; Swern, D., Oxidation of Alcohols by "Activated" Dimethyl Sulfoxid. A Preparative, Steric and Mechanistic Study *Tetrahedron* **1978**, 34, 1651-1660.
- [183] Mancuso, A. J.; Swern, D., Activated Dimethyl Sulfoxide: Useful Reagents for Synthesis, *Synthesis* **1981**, 3, 165-185.
- [184] Tidwell, T. T., Oxidation of Alcohols by Activated Dimethyl Sulfoxide and Related Reactions: An Update, *Synthesis* **1990**, 10, 857-870.
- [185] Reymond, J.-L.; Fluxà, V. S.; Maillard, N., Enzyme assays, *Chem. Commun.* **2009**, 34-46.
- [186] Ludewig, S.; Kossner, M.; Schiller, M.; Baumann, K.; Schirmeister, T., Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10, 368-382.
- [187] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemie*, 5th ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg-Berlin, **2003**.
- [188] Bisswanger, H., *Enzymkinetik*, 3th ed.; WILEY-VCH: Weinheim, **2000**.
- [189] Michaelis, L.; Menten, M. L., Kinetics of Invertase Action, *Biochem. Z.* **1913**, 49, 333-369.
- [190] Schirmeister, T., (S)-Thiirancarboxylic Acid as a Reactive Building Block for a New Class of Cysteine Protease Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2647-2651.
- [191] Grafit Version 5.0.13, Erithacus Software Ltd.: London, **2006**.
- [192] Kitz, R.; Wilson, I. B., Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3245-3249.
- [193] Tian, W.-X.; Tsou, C.-L., Determination of the Rate Constant of Enzyme Modification by Measuring the Substrate Reaction in the Presence of the Modifier, *Biochemistry* **1982**, 21, 1028-1032.
- [194] Morita, T.; Kato, H.; Iwanaga, S.; Takada, K.; Kimura, T.; Sakakibara, S., New Fluorogenic Substrates for alpha-Thrombin, Factor Xa, Kallikreins, and Urokinase, *J. Biochem.* **1977**, 82, 1495-1498.
- [195] Katunuma, N., Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2011**, 87, 29-39.
- [196] Hill, J.; Tyas, L.; Phylip, L. H.; Kay, J.; Dunn, B. M.; Berry, C., High level expression and characterisation of Plamepsin II, an aspartic proteinase from *Plasmodium falciparum*, *FEBS Lett.* **1994**, 352, 155-158.
- [197] Li, T.; Yowell, C. A.; Beyer, B. B.; Hung, S.-W.; Westling, J.; Lam, M. T.; Dunn, B. M.; Dame, J. B., Recombinant expression and enzymatic subsite characterization of plasmepsin 4 from the four *Plasmodium* species infecting man, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, 135, 101-109.
- [198] Degel, B.; Staib, P.; Rohrer, S.; Scheiber, J.; Martina, E.; Büchold, C.; Baumann, K.; Morschhäuser, J.; Schirmeister, T., *Cis*-Configured Aziridines Are New Pseudo-Irreversible Dual-Mode Inhibitors of *Candida albicans* Secreted Aspartic Protease 2, *ChemMedChem* **2008**, 3, 302-315.
- [199] Büchold, C.; Hemberger, Y.; Heindl, C.; Welker, A.; Degel, B.; Pfeuffer, T.; Staib, P.; Schneider, S.; Rosenthal, P. J.; Gut, J.; Morschhäuser, J.; Bringmann, G.; Schirmeister, T., New *cis*-Configured Aziridine-2-carboxylates as Aspartic Acid Protease Inhibitors, *ChemMedChem* **2011**, 6, 141-152.
- [200] Langolf, S.; Machon, U.; Ehlers, M.; Sicking, W.; Schirmeister, T.; Büchold, C.; Gelhaus, C.; Rosenthal, P. J.; Schmuck, C., Development of Antitrypanosomal and Antiplasmodial Nonpeptidic Cysteine Protease Inhibitors based on N-Protected-Guanidino-Furan and -Pyrrole Building Blocks, *ChemMedChem* **2011**, 6, 1581-1586.
- [201] Dude, M.-A.; Kaeppler, U.; Herb, M.; Schiller, M.; Schulz, F.; Vedder, B.; Heppner, S.; Pradel, G.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Schirmeister, T.; Leippe, M.; Gelhaus, C., Synthesis and Evaluation of Non-peptidic Cysteine Protease Inhibitors of *P. falciparum* Derived from Etacrynic Acid, *Molecules* **2009**, 14, 19-35.
- [202] Coombs, G. H.; Goldberg, D. E.; Klemba, M.; Berry, C.; Kay, J.; Mottram, J. C., Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets, *TRENDS Parasitol.* **2001**, 17, 532-537.
- [203] Banerjee, R.; Liu, J.; Beatty, W.; Pelosof, L.; Klemba, M.; Goldberg, D. E., Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 990-995.
- [204] Liu, J.; Gluzman, I. Y.; Drew, M. E.; Goldberg, D. E., The Role of *Plasmodium falciparum* Food Vacuole Plamepsins, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 1432-1437.
- [205] Liu, J.; Istvan, E. S.; Gluzman, I. Y.; Gross, J.; Goldberg, D. E., *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 8840-8845.

- [206] Nezami, A.; Kimura, T.; Hidaka, K.; Kiso, A.; Liu, J.; Kiso, Y.; Goldberg, D. E.; Freire, E., High-Affinity Inhibition of a Family of *Plasmodium falciparum* Proteases by a Designed Adaptive Inhibitor, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8459-8464.
- [207] Hof, F.; Schütz, A.; Fäh, C.; Meyer, S.; Bur, D.; Liu, J.; Goldberg, D. E.; Diederich, F., Aushungern des Malaria-Erregers: Hemmer der Aspartylproteasen Plasmeprin I, II und IV, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2193-2196.
- [208] Liu, K.; Shi, H.; Xiao, H.; Chong, A. G. L.; Bi, X.; Chang, Y.-T.; Tan, K. S. W.; Yada, Y.; Yao, S. Q., Functional Profiling, Identification, and Inhibition of Plasmeprins in Intraerythrocytic Malaria Parasites, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8293-8297.
- [209] Aureggi, V.; Ehmke, V.; Wieland, J.; Schweizer, W. B.; Bernet, B.; Bur, D.; Meyer, S.; Rottmann, M.; Freymond, C.; Brun, R.; Breit, B.; Diederich, F., Potent Inhibitors of Malarial Aspartic Proteases, the Plasmeprins, by Hydroformylation of Substituted 7-Azanorbornenes, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 155-164.
- [210] Luksch, T.; Chan, N.-S.; Brass, S.; Sotriffer, C. A.; Klebe, G.; Diederich, W. E., Computer-Aided Design and Synthesis of Nonpeptidic Plasmeprin II and IV inhibitors, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1323-1336.
- [211] Dunn, B. M.; Jimenez, M.; Parten, B. F.; Valler, M. J.; Rolph, C. E.; Kay, J., A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases, *Biochem. J.* **1986**, *237*, 899-906.
- [212] Westling, J.; Cipullo, P.; Hung, S.-W.; Saft, H.; Dame, J. B.; Dunn, B. M., Active site specificity of plasmeprin II, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2001-2009.
- [213] Huber, W.; Koella, J. C., A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites, *Acta Trop.* **1993**, *55*, 257-261.
- [214] Rätz, B.; Iten, M.; Grether-Bühler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R., The Alamar Blue®(R) assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) in vitro, *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139-147.
- [215] Mikus, J.; Steverding, D., A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®(R)®, *Parasitol Int.* **2000**, *48*, 265-269.
- [216] Twigg, R. S., Oxidation-reduction aspects of resazurin, *Nature* **1945**, *155*, 401-402.
- [217] SOP:M-Z1-003-02, *Sonderforschungsbereich 630: Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases.*
- [218] SOP:M-Z1-007-02, *Sonderforschungsbereich 630: Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases.*
- [219] SOP:M-B3-005-02, *Sonderforschungsbereich 630: Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases.*
- [220] Lang, T.; Goyard, S.; Lebastard, M.; Milon, G., Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice, *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 383-392.
- [221] Ashutosh; Gupta, S.; Ramesh; Sundar, S.; Goyal, N., Use of *Leishmania donovani* Field Isolates Expressing the Luciferase Reporter Gene in In Vitro Drug Screening, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3776-3783.
- [222] SOP:M-B3-014-01, *Sonderforschungsbereich 630: Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases.*
- [223] White, E. H.; Rapaport, E.; Seliger, H. H.; Hopkins, T. A., The Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin: An Efficient Chemical Production of Electronically Excited States, *Bioorg. Chem.* **1971**, *1*, 92-122.
- [224] Makler, M. T.; Hinrichs, D. J., Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 205-210.
- [225] Makler, M. T.; Ries, J. M.; Williams, J. A.; Bancroft, J. E.; Piper, R. C.; Gibbins, B. L.; Hinrichs, D. J., Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 739-741.
- [226] Aminake, M. N.; Schoof, S.; Sologub, L.; Leubner, M.; Kirschner, M.; Arndt, H.-D.; Pradel, G., Thioestrepton and Derivatives Exhibit Antimalarial and Gametocytocidal Activity by Dually Targeting Parasite Proteasome and Apicoplast, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1338-1348.
- [227] SOP:M-B6-006-02, *Sonderforschungsbereich 630: Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases.*
- [228] Ried, W., Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe, *Angew. Chem.* **1952**, *64*, 391-396.
- [229] Evers, A.; Heppner, S.; Leippe, M.; Gelhaus, C., An efficient fluorimetric method to measure the viability of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*, *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1523-1525.

- [230] Mundodi, V.; Kucknoor, A. S.; Gedamu, L., Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition, *BMC Mol. Biol.* **2005**, *6* (3).
- [231] Coombs, G. H., Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa, *Parasitology* **1982**, *84*, 149-155.
- [232] Zangger, H.; Mottram, J. C.; Fasel, N., Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?, *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 1126-1139.
- [233] Baruch, A.; Douglas, A. J.; Bogoyo, M., Enzyme activity - it's all about image, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 29-35.
- [234] Green, N. M., Avidin and streptavidin, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51-67.
- [235] Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Livnah, O., Ligand Exchange between Proteins, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30892-30900.
- [236] Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J., The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *417* **2002**, 463-468.
- [237] Matthews, J. A.; Batki, A.; Hynds, C.; Kricka, L. J., Enhanced Chemiluminescent Method for the Detection of DNA Dot-Hybridization Assays, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 205-209.
- [238] Schrader, F. C.; Glinca, S.; Sattler, J. M.; Dahse, H.-M.; Afanador, G. A.; Prigge, S. T.; Lanzer, M.; Mueller, A.-K.; Klebe, G.; Schlitzer, M., Novel Type II Fatty Acid Biosynthesis (FAS II) Inhibitors as Multistage Antimalarial Agents, *ChemMedChem* **2013**, DOI: 10.1002/cmdc.201200407.
- [239] Untucht, C.; Rasch, J.; Fuchs, E.; Rohde, M.; Bergmann, S.; Steinert, M., An optimized *in vitro* blood-brain barrier model reveals bidirectional transmigration of African trypanosome strains, *Microbiology* **2011**, *157*, 2933-2941.
- [240] Untucht, C. Dissertation: Blut-Hirnschranke-Modelle ECV304-C6 und HBMEC und ihre Anwendung in Transmigrationsuntersuchungen von Streptokokken und afrikanischen Trypanosomen, Braunschweig, 2011.
- [241] Dornbush, P. J.; Vazquez-Anaya, G.; Shokar, A.; Benson, S.; Rapp, M.; Wnuk, S. F.; Wrischnik, L. A.; Land, K. M., AdoHcy hydrolase of *Trichomonas vaginalis*: Studies of the effects of 5'-modified adenosine analogues and related 6-N-cyclopropyl derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7466-7468.
- [242] Abdulla, M.-H.; Ruelas, D. S.; Wolff, B.; Snedecor, J.; Lim, K.-C.; Xu, F.; Renslo, A. R.; Williams, J.; McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R., Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e478.
- [243] de Moraes, J., Antischistosomal Natural Compounds: Present Challenges for New Drug Screens, In *Current Topics in Tropical Medicine*, Rodriguez-Morales, A., Ed. 2012;
- [244] Malvezzi, A.; de Rezende, L.; Izidoro, M. A.; Cezari, M. H. S.; Juliano, L.; Tavares do Amaral, A., Undercovering false positives on a virtual screening search for cruzain inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 350-354.
- [245] Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D., Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD, *Proteins* **2003**, *52*, 609-623.
- [246] Brinen, L. S.; Hansell, E.; Cheng, J.; Roush, W. R.; McKerrow, J. H.; Fletterick, R. J., A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease, *Structure* **2000**, *8*, 831-840.
- [247] Huang, L.; Brinen, L. S.; Ellman, J. A., Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 21-29.
- [248] Freifelder, M., A Simple Preparation of Nipecotic Acid, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1135.
- [249] Biraboneye, A. C.; Madonna, S.; Laras, Y.; Krantic, S.; Maher, P.; Kraus, J.-L., Potential Neuroprotective Drugs in Cerebral Ischemia: New Saturated and Polyunsaturated Lipids Coupled to Hydrophilic Moieties: Synthesis and Biological Activity, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4358-4369.
- [250] Grünigen, R. v.; Sigmüller, G.; Papini, A.; Köcher, K.; Traving, B.; Göhring, W.; Moroder, L., Enzyme immunoassay with captured hapten: a sensitive gastrin assay with biotinyl-gastrin derivatives, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, *372*, 163-172.