

# Entwicklung von Cysteinproteaseinhibitoren

Ein klassischer und ein kombinatorischer Ansatz  
zur Inhibitoroptimierung



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

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

**Uwe Machon**

aus Stockstadt am Main

Würzburg 2008



Eingereicht am: \_\_\_\_\_

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

der Dissertation

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_



***„The future is always born under pain“***

**(G'Kar)**



Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Carsten Schmuck von November 2003 bis Dezember 2008 am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind an folgender Stelle veröffentlicht worden:

„Amino Acid Binding by 2-(Guanidiniocarbonyl)pyridines in Aqueous Solvents: A Comparative Binding Study Correlating Complex Stability with Stereoelectronic Factors“, C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109-1118.

„2-(Guanidiniocarbonyl)furans as a New Class of Potential Anion Hosts: Synthesis and First Binding Studies“ C. Schmuck, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4385-4392.

„A facile and efficient multi-gram synthesis of N-protected guanidino-carbonyl pyrrole carboxylic acids“ C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 324-329.

„Guanidino-carbonylpyrrole als neue Cystein-Protease-Inhibitoren“ T. Schirmeister, C. Schmuck, K. Baumann, S. Rohrer, U. Machon, S. Langolf, Patent in Anmeldung, **2008**.

„N-geschützte Guanidin-substituierte Heteroaromaten als neue Cystein-Protease-Inhibitoren“ T. Schirmeister, C. Schmuck, K. Baumann, S. Rohrer, U. Machon, S. Langolf, Patent in Anmeldung, **2008**.

„Design of Cysteine Protease Inhibitors – a Classical and a Combinatorial Approach“ U. Machon, S. Langolf, T. Schirmeister, C. Schmuck, *Posterbeitrag*, Chem-SyStM, Würzburg **2007**.

„Synthesis of a combinatorial library of cysteine protease inhibitors for falcipain and direct enzyme screening on solid support“ U. Machon, C. Schmuck, T. Schirmeister, *Posterbeitrag*, 3<sup>rd</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630 / SFB 544 „New Trends in Infectious Disease Research“, Retzbach **2007**.

„A new lead structure for antimalarial and antitrypanosomal drugs“ S. Langolf, U. Machon, T. Schirmeister, C. Schmuck, *Posterbeitrag*, 4<sup>th</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630 / SFB 544 / SFB 766 „New Trends in Infectious Disease Research“, Kloster Bronnbach **2008**.





## Danksagung

An erster Stelle möchte ich **Prof. Dr. Carsten Schmuck** für die Möglichkeit danken, ein hochinteressantes und Target-orientiertes Thema auf dem medizinisch-chemischen Gebiet bearbeiten zu dürfen. Ihm gilt ein besonderer Dank für die stete Diskussionsbereitschaft, die hervorragende Betreuung, die Hilfe bei der Lösung von schwierigen Fragestellungen und die gute Zusammenarbeit, die zum Gelingen der Arbeit im großen Maß beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich den folgenden Personen danken...

... zunächst **Prof. Dr. Tanja Schirmeister** für die Hilfe bei den Fragen zu den Enzym-Assays und die Möglichkeit der Durchführung dieser Messungen in ihrer Arbeitsgruppe.

... den Mitgliedern des AK Schirmeister für die Unterstützung bei den Assays, besonders hervorzuheben sind **Conny Heindl, Radim Vičík, Martin Stempka, Markus Schiller, Christian Büchold** und **Monika Herb**.

... **Prof. Dr. Knut Baumann** und **Sebastian Rohrer** von der Technischen Universität Braunschweig für die zahlreichen Docking-Rechnungen.

... **Prof. Dr. Matthias Leippe, Dr. Christoph Gelhaus** und **Astrid Evers** von der Zoologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die mikrobiologischen Tests an den Plasmodien.

... den Mitarbeitern vom SFB 630, insbesondere **Dr. Tobias Ölschläger, Dr. August Stich, Elena Katzowitsch, Jennifer Rath** und **Martina Schultheis** vom Teilprojekt Z1 für die Durchführung der mikrobiologischen Tests und **Dr. Heike Bruhn** vom Teilprojekt QM für die Unterstützung bei organisatorischen Fragen.

... **Prof. Dr. Philip Rosenthal** und **Christian Büchold** für die Studien an Falcipain-2 am Department of Medicine, General Hospital San Francisco, USA.

... beim gesamten AK Schmuck und allen Ehemaligen für das tolle Arbeitsklima und die schöne Zeit während der Promotion: hervorheben möchte ich meine ehemaligen Laborkollegen **Lars Geiger, Jürgen Dudaczek, Thomas Rehm, Karsten Klemm, Barbara Geibel**, und **Sebastian Langolf**.

... meinen ehemaligen F-Praktikanten während der Doktorarbeit **Gerd Gröger, Viktoria Geßner, Barbara Geibel, Yuchen Sun, Michael Grotz** und **Elisabeth Memmel** für die Unterstützung bei einigen Synthesen.

... den Analytikabteilungen des Instituts für Organische Chemie in Würzburg: die NMR-Abteilung mit **Dr. Matthias Grüne** und **Elfriede Ruckdeschel** und die Abteilung für Massenspektrometrie mit **Dr. Michael Büchner** und **Fritz Dadrich**.

... **Bernd Brunner**, **Markus Braun** und **Manfred Ludwig** für die stete Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Für das sicherlich anstrengende Korrekturlesen meiner Doktorarbeit danke ich **Christian Urban** (schon ab dem ersten Semester sind wir ein gutes Team), **Peter Wich** (Danke auch für die vielen hilfreichen Diskussionen zur Festphasensynthese und zur Enzymkinetik) und **Sebastian Langolf** (Danke für die tolle Unterstützung auf dem Themengebiet im letzten Jahr).

Schließlich möchte ich meiner Familie, besonders **meinen Eltern** und meinem Bruder **Carsten Machon** für die geduldige Unterstützung danken. Auch möchte ich mich bei meinem Freund **Bernd Maier** für die immerwährende Hilfe in allen Lebenslagen und die Geduld bedanken.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INHIBITOROPTIMIERUNG MIT HILFE VERSCHIEDENER METHODEN .....</b>	<b>4</b>
2.1	INHIBITOROPTIMIERUNG DURCH VARIATION VON STRUKTURELEMENTEN .....	4
2.2	INHIBITOROPTIMIERUNG MITTELS KOMBINATORISCHER CHEMIE .....	9
<b>3</b>	<b>GRUNDLAGEN UND METHODEN DER INHIBITOROPTIMIERUNG .....</b>	<b>13</b>
3.1	VORKOMMEN UND BEDEUTUNG VON CYSTEINPROTEASEN .....	13
3.2	DER HYDROLYSEMECHANISMUS BEI CYSTEINPROTEASEN.....	15
3.3	INHIBITOREN VON CYSTEINPROTEASEN .....	18
3.4	KLASSISCHE METHODEN ZUR ENZYMKINETISCHEN BESTIMMUNG DER EIGENSCHAFTEN VON INHIBITOREN .....	26
3.4.1	<i>Grundlagen der Enzymkinetik .....</i>	<i>26</i>
3.4.2	<i>Enzym-Assays zur Bestimmung der Inhibitoreigenschaften .....</i>	<i>28</i>
3.5	PROTEIN-ASSAYS FÜR HARZGEBUNDENE VERBINDUNGEN .....	33
3.5.1	<i>Harze für Protein-Assays .....</i>	<i>34</i>
3.5.2	<i>Lektin-Assays an harzgebundenen kombinatorischen Bibliotheken.....</i>	<i>39</i>
3.5.3	<i>Spezielle proteinbindende Assays für kombinatorische Festphasenbibliotheken.....</i>	<i>41</i>
3.5.4	<i>Enzym-Assays an harzgebundenen kombinatorischen Bibliotheken.....</i>	<i>45</i>
<b>4</b>	<b>DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
4.1	INHIBITOROPTIMIERUNG NACH DEM KLASSISCHEN ANSATZ.....	50
4.1.1	<i>Synthese der Inhibitoren auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis.....</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Screening der Inhibitoren auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis.....</i>	<i>64</i>
4.1.3	<i>Design und Synthese neuer Inhibitoren auf Pyrrol- und Furan-Basis .....</i>	<i>78</i>
4.2	INHIBITOROPTIMIERUNG MITTELS KOMBINATORISCHER CHEMIE .....	93
4.2.1	<i>Entwicklung der Screeningmethode am Harz.....</i>	<i>93</i>
4.2.2	<i>Synthese und Design der kombinatorischen Inhibitorbibliothek .....</i>	<i>99</i>
4.2.3	<i>Screening der kombinatorischen Inhibitorbibliothek.....</i>	<i>136</i>
4.2.4	<i>Synthese und Screening ausgewählter Bibliotheksmitglieder .....</i>	<i>141</i>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>160</b>
7.1	ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN UND ANALYTISCHE METHODEN.....	160
7.2	SYNTHESEN IN LÖSUNG .....	164
7.2.1	<i>Synthese der Benzol- und Pyridinverbindungen .....</i>	<i>164</i>
7.2.2	<i>Synthese der Furanverbindungen.....</i>	<i>170</i>
7.2.3	<i>Synthese der Inhibitoren <b>79</b> bis <b>84</b> auf Furan- und Pyrrolbasis .....</i>	<i>188</i>

## Inhaltsverzeichnis

---

7.2.4	<i>Synthese der Bausteine für die Festphasensynthese</i> .....	205
7.3	FESTPHASENSYNTHESE .....	213
7.3.1	<i>Allgemeine Arbeitsmethoden</i> .....	213
7.3.2	<i>Synthese der Inhibitor-Bibliothek und der Testinhibitoren an PEGA-Harz</i> .....	216
7.3.3	<i>Synthese des peptidischen Inhibitors an Sieberamid-Harz</i> .....	220
7.3.4	<i>Synthese der peptidischen Inhibitoren an MBHA-Harz</i> .....	221
7.4	DURCHFÜHRUNG DER ENZYM-ASSAYS .....	241
7.4.1	<i>Screening in Lösung</i> .....	241
7.4.2	<i>Screening für harzgebundene Inhibitoren</i> .....	243
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>244</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>250</b>
9.1	LITERATUR .....	250
9.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	256
9.3	MESSERGEBNISSE DES FESTPHASENSCREENINGS AN FALCIPAIN-2 UND RHODESAIN .....	258

## 1 Einleitung

Eine durch Erreger hervorgerufene Erkrankung bezeichnet man als Infektionskrankheit. Sie kann je nach Erregertyp in ganz unterschiedlichen Ausmaßen das erkrankte Individuum beeinträchtigen. Es gibt kaum zu bemerkende, auch inapparente genannt, jedoch auch sehr drastische Symptome. Viele Infektionskrankheiten führen ohne Behandlung mit entsprechenden Medikamenten zum Tod. Da sich die Natur den gegebenen Umständen stets anpasst und die Erreger somit häufig Resistenzen gegen lang angewandte Arzneimittel ausbilden, müssen ständig neue Wirkstoffe entwickelt werden. Voraussetzung hierfür ist ein umfassendes Wissen über den Erreger selbst, um mögliche Angriffsorte für potentielle neue Wirkstoffe zu erhalten. Sehr häufig spielen bestimmte Enzyme der Erreger eine entscheidende Rolle bei deren Entwicklung und Verbreitung im Organismus. Enzyme sind Proteine, die selektiv bestimmte biochemische Reaktionen katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollen durch gezielte Hemmung einiger bestimmter Enzyme, die für die Erreger von Infektionskrankheiten essentiell sind, neue potentielle Wirkstoffe gefunden werden. Bei den untersuchten Enzymen handelt es sich um Cysteinproteasen.

Die Infektionskrankheit mit den verheerendsten Folgen stellt Malaria dar, da sie mit bis zu 660 Millionen Krankheits- und 3 Millionen Todesfällen pro Jahr, davon 90 % im tropischen Afrika, weltweit die größten Auswirkungen besitzt. Von der Krankheit sind vor allem Schwangere und Kinder unter fünf Jahren betroffen. Aufgrund des weltweiten Tourismus treten auch in Deutschland vermehrt Malariafälle auf, allein in 2006 wurden 566 Krankheitsmeldungen gezählt.<sup>[1]</sup> Malaria wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* (*P.*), den sogenannten Protozoen, verursacht. Es gibt vier humanpathogene *P.*-Arten: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. falciparum*, die jeweils zu spezifischen Krankheitsbildern führen. *P. falciparum* ist die am weitesten verbreitete Spezies. Die infektiösen Stadien der Malaria-Parasiten, die sogenannten Sporozoiten, werden beim Biss über den Speichel infizierter weiblicher Anopheles-Mücken auf den Menschen übertragen. Dort dringen die Parasiten innerhalb von 30 Minuten in Leberzellen ein und setzen nach ein bis zwei Wochen Merozoiten frei, die nun Erythrozyten befallen. Dort findet eine explosionsartige asexuelle Vermehrung statt, so dass weitere rote Blutkörperchen infiziert werden und sich das typische fieberhafte Krankheitsbild entwickelt. Bereits seit dem 19. Jahrhundert existieren Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria, hier ist Chinin zu

erwähnen, das in einigen Staaten heute noch eingesetzt wird. Generell kann man alle bekannten Wirkstoffe in sechs Gruppen unterteilen, die in der folgenden Tabelle mit jeweils einigen Beispielen aufgeführt sind.

Wirkstoffgruppe	Beispiele
4-Aminochinoline	Chloroquin, Amodiaquin, Piperaquin, Pyronaridin
Arylaminoalkohole	Chinin, Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin
8-Aminochinoline	Primaquin, Tafenoquin
Artemisinine	Artemisinin, Dihydroartemisinin, Artemether, Artesunat
Antifolate bzw. Wirkstoffkombinationen	Sulfadoxin/Pyrimethamin, Dapson/Chlorproguanil, Atovaquon/Proguanil
Antibiotika	Doxycyclin, Clindamycin, Azithromycin, Fosmidomycin

**Tab. 1.1** Wirkstoffgruppen zur Behandlung einer akuten Malariaerkrankung und zur Prophylaxe

Wegen immer häufigere Resistenzen der Erreger gegenüber den gängigen Medikamenten ist die Forschung nach neuen wirksamen Substanzen wichtig. Die Wirkweise der bekannten Therapeutika ist sehr verschieden. Die Substanzen können bei den Erregerstadien in der Leber aber auch im Blut eingreifen. Ein potentiell Target stellen parasitäre Enzyme dar, die für den Erreger eine essentielle Rolle im Lebenszyklus spielen. So sind seit 1996 z.B. Proteasehemmer als Medikamente zur Behandlung von AIDS erfolgreich im Einsatz.<sup>[2]</sup> Für Malaria sind bis heute keine derartigen Wirkstoffe auf dem Markt, jedoch sind einige für den Erreger essentielle Proteasen identifiziert worden. Beim Malariaerreger sind vier Cysteinproteasen bekannt, die als Falcipaine bezeichnet werden.<sup>[3]</sup> Die Erreger ernähren sich vom Proteinanteil des menschlichen Hämoglobins und bauen diesen mit Hilfe der Falcipaine durch Hydrolyse ab. In der sauren Nahrungsvakuole des Erregers liefern die Proteasen durch diese Hydrolyse Aminosäuren zur parasitären Proteinsynthese. Die gezielte Hemmung dieser Enzyme führt dazu, dass sich der Erreger nicht mehr vermehren und im Wirtsorganismus weiter verbreiten kann. Aus diesem Grund werden in der modernen Forschung Cysteinproteasen als Targets für neue potentielle Wirkstoffe gegen Malaria untersucht.<sup>[4]</sup> Falcipain-2 ist eine von vier Cysteinproteasen (Falcipain-1, -2, -2' und -3) und dessen Inhibierung wurde verstärkt in den letzten Jahren untersucht.<sup>[5]</sup>

Eine weitere Infektionskrankheit, die ähnlich wie Malaria durch Protozoen verursacht wird, stellt die Schlafkrankheit dar. Bei der Schlafkrankheit gibt es zwei Erregertypen für verschiedene Formen der Erkrankung: *Trypanosoma brucei gambiense* (Westafrikanische Schlafkrankheit) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Ostafrikanische Schlafkrankheit). Beides sind humanpathogene Protozoen, die sich hauptsächlich im Krankheitsverlauf und in der Übertragung unterscheiden. Unbehandelt führt die Schlafkrankheit zum Tod. Der Erreger wird durch den Biss einer infizierten TseTse-Fliege auf den Menschen übertragen. Zuerst vermehrt sich der Erreger im subkutanen Gewebe, im Blut und in der Lympheflüssigkeit, und nach gewisser Zeit durchdringt er die Bluthirnschranke und befällt das zentrale Nervensystem. Der Krankheitsverlauf unterteilt sich demnach in zwei Stadien: dem frühen Stadium der Vermehrung (hämolymphatisches Stadium) und dem späten Stadium nach dem Befall des zentralen Nervensystems (neurologisches Stadium). Auch für die Schlafkrankheit existieren einige Wirkstoffe, diese werden in zwei Gruppen unterteilt, je nachdem in welchem Stadium der Erkrankung das Medikament wirkt und eingesetzt werden kann. Für das frühe Stadium eignen sich Pentamidin und Suramin, beim fortgeschrittenen Stadium werden das toxische Melarsoprol und Eflornithin eingesetzt. Im Allgemeinen sind die Medikamente zur Behandlung im hämolymphatischen Stadium weniger toxisch, leichter zu verabreichen und effektiver als die des neurologischen Stadiums.<sup>[6]</sup>

Die bei der Ostafrikanischen Schlafkrankheit beteiligte Cysteinprotease ist Rhodesain, die von der Struktur her eine hohe Ähnlichkeit zu Falcipain-2 aufweist. Rhodesain kommt in den Lysosomen vor und dient dem Erreger als Verdauungsenzym, um Aminosäuren als Bausteine zur Biosynthese von neuen parasitären Proteinen zu erhalten. Eine Blockierung dieses Enzyms kann die Vermehrung des Parasits stoppen. Somit stellt auch diese Protease ein Target für neue potentielle Wirkstoffe gegen die Schlafkrankheit dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, über verschiedene Ansätze neue Inhibitoren für die parasitären Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain zu entwickeln. Die Inhibitoroptimierung soll zum einen durch Strukturvariationen bekannter aktiver Substanzen und zum anderen durch einen kombinatorischen Ansatz erfolgen. Über diese Wege soll eine Grundlage für neue potentielle Therapeutika gegen Malaria bzw. die Schlafkrankheit geschaffen werden.

## 2 Inhibitoroptimierung mit Hilfe verschiedener Methoden

Es gibt verschiedene Wege neue potente Enzyminhibitoren zu finden. Auf dem klassischen Weg werden Strukturanaloga von bekannten aktiven Substanzen, z.B. isolierte Naturstoffe, identifiziert und gezielt untersucht. Dazu werden häufig Molekülbibliotheken mit hoher struktureller Diversität getestet und entsprechende Treffer durch Variationen bestimmter Fragmente optimiert. In der heutigen Zeit werden diese Screenings oft durch computergestützte virtuelle Screenings ergänzt. Diese Methode soll hier als die „klassische Methode“ bezeichnet werden.

Bei der zweiten Methode geht es um einen kombinatorischen Ansatz. Dabei wird eine Verbindungsbibliothek synthetisiert, die aus einer großen Anzahl an potentiellen Inhibitoren besteht. Durch die Möglichkeit der parallelen Festphasensynthese kann hier enorm Zeit gespart werden, um eine hohe Anzahl an Verbindungen zu erhalten. In einem anschließenden Enzym-Assay können gute Inhibitoren aus dieser Bibliothek identifiziert und weiter untersucht werden. In dieser Arbeit wird diese zweite Möglichkeit als die „kombinatorische Methode“ bezeichnet.

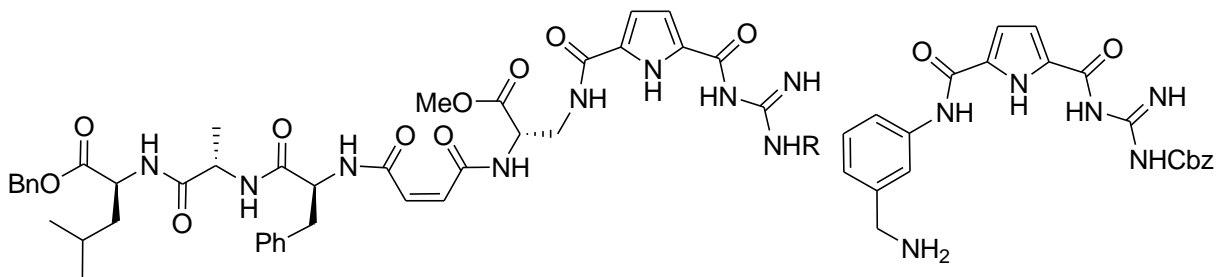
Beide Methoden sollen angewendet werden, um neue Inhibitoren für Cysteinproteasen zu finden. In den folgenden Kapiteln werden die beiden unterschiedlichen Wege im Einzelnen vorgestellt, dabei wird jeweils auf die Charakterisierung der Inhibitoreigenschaften von neuen Substanzen eingegangen. Das Inhibitorpotential wird durch Untersuchungen an den isolierten Proteasen und mikrobiologische Tests an den entsprechenden Erregern beschrieben.

### 2.1 Inhibitoroptimierung durch Variation von Strukturelementen

Grundlage für die klassische Methode sind die Ergebnisse aus der Diplomarbeit von *Langolf*. Ausgehend von der Verbindung **1**, von der bekannt ist, dass sie in der Lage ist, Falcipain-2 zu hemmen, wurden weitere Screenings am isolierten Enzym auf Inhibitoreigenschaften von Testsubstanzen durchgeführt.<sup>[7]</sup> Ursprünglich ist **1** die Vorstufe der am Guanidinrest entschützten Form **2**, welche als Inhibitor für Aspartatproteasen in den Arbeiten von *Büchold* dienen sollte.<sup>[8]</sup> Hier sollte insbesondere eine der zehn sekretorischen Aspartatproteasen inhibiert werden, die beim Hefepilz *Candida albicans* vorkommt.<sup>[9,10]</sup> Diese Erreger



verursachen eine schwerwiegende Pilzkrankheit, die vor allem bei HIV-positiven Menschen aufgrund ihrer Immunschwäche auftritt.<sup>[11,12]</sup> Der zentrale Maleinsäurebaustein von **2** sollte von Aspartatresten (Asp 32 und Asp 218) im aktiven Zentrum der Protease nukleophil angegriffen werden und die Guanidiniocarbonylpyrroleinheit von **2** sollte als Carboxylatbindungsstelle fungieren. Die Eigenschaften dieses Motivs als künstliche Bindungsstelle für Anionen ist bereits seit Ende der 90er Jahre bekannt.<sup>[13,14]</sup> Guanidiniocarbonylpyrrole erreichen durch ein Zusammenspiel aus Wasserstoffbrückenbindungen und einer Salzbrücke sogar in sehr polaren Solventien eine hohe Affinität zu den Oxoanionen.<sup>[15]</sup>



R = Boc: **1**

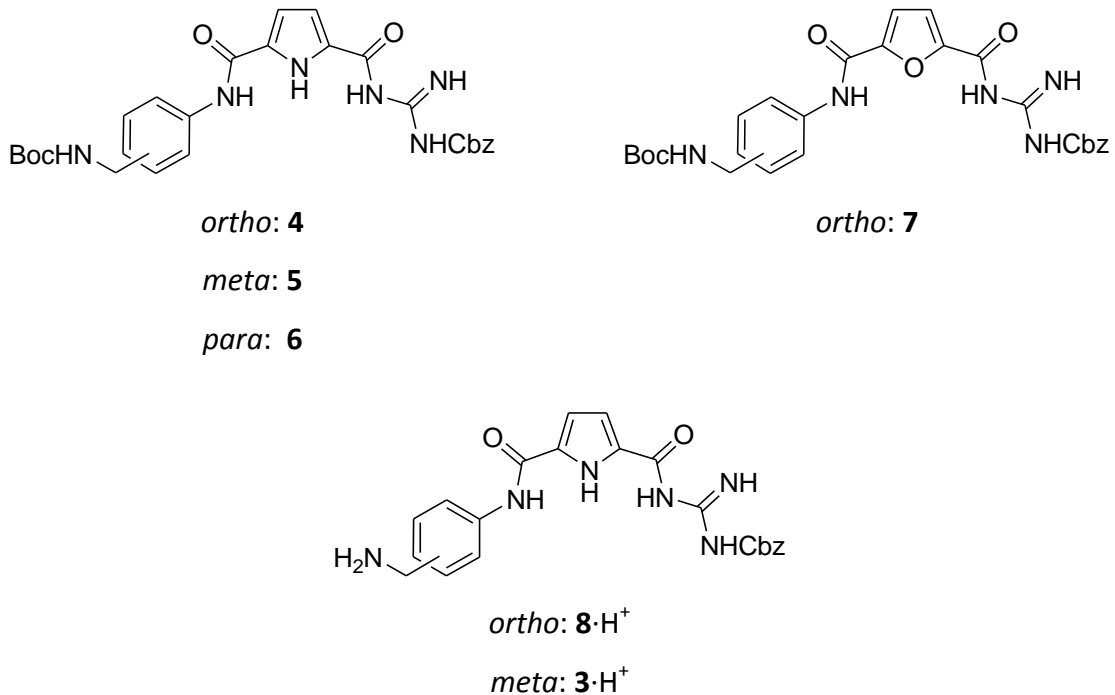
**3**

R = H·HCl: **2**

**Abb. 2.1** Ausgangsverbindungen **1** bis **3** zur Optimierung der Leitstruktur

Die Inhibitoreigenschaften von **1** an Cysteinproteasen wurden während dieser Arbeiten durch Zufall entdeckt. Für **1** war demnach bekannt, dass Falcipain-2 bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M zu 98 % gehemmt wird. Anschließend wurden Docking-Experimente an einem Modell des aktiven Zentrums von Falcipain-2 durchgeführt, um diese guten Inhibitoreigenschaften erklären zu können. Dabei wurde entdeckt, dass der peptidische Anteil und der Maleinsäurebaustein von **1** nicht essentiell für die Hemmung der Cysteinprotease sind. Alles deutete darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindungsklasse um reversible Inhibitoren handelt, die nichtkovalent im aktiven Zentrum von Falcipain-2 gebunden werden. Daraufhin wurde ein virtuelles Screening mit einer Bibliothek aus strukturähnlichen Substanzen durchgeführt, um eine neue Leitstruktur zu erhalten. Bei diesem Screening wurde die Verbindung **3** als potentielle Leitstruktur entdeckt und zur Synthese vorgeschlagen.<sup>[16]</sup>

Langolf konnte nun ein Screening an Falcipain-2 mit strukturähnlichen Verbindungen, hauptsächlich auf Pyrrol-Basis, durchführen und damit neue Erkenntnisse über diese neue Inhibitor-Klasse erlangen. Zusammen mit der Leitstruktur **3** konnten bereits erste optimierte Inhibitoren synthetisiert werden. Diese Verbindungen **3** bis **8** sind in **Abb. 2.2** dargestellt.<sup>[7]</sup>



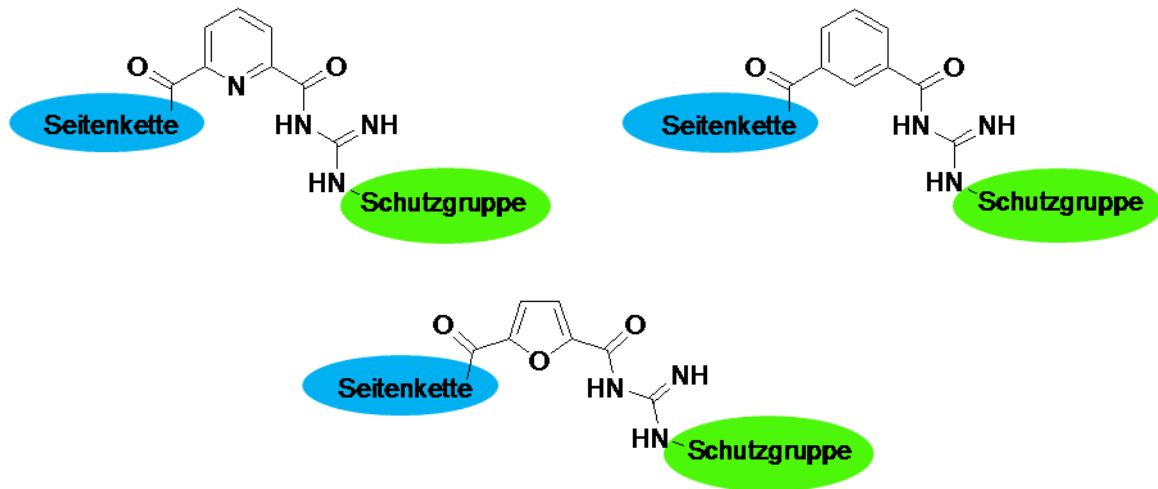
**Abb. 2.2** Von Langolf synthetisierte Inhibitoren **3** bis **8** der ersten Generation

Es wurden erste Messungen an Falcipain-2 und Rhodesain durchgeführt und diese Vertreter der neuen Verbindungsklasse stellten sich als sehr aktive Inhibitoren der Cysteinproteasen heraus. Auch die Entwicklung der Malariaerreger und der Schlafkrankheit konnte in Anwesenheit dieser Substanzen gehemmt werden, wie in ersten mikrobiologischen Untersuchungen festgestellt werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war es nun, diese Optimierung aufbauend auf dem Grundgerüst der Leitstruktur fortzuführen, um zu noch potenteren Inhibitoren zu gelangen. Dabei sollten weitere ähnliche Substanzklassen synthetisiert und untersucht werden, um die erste Generation der Inhibitoren zu erweitern. Es handelt sich hierbei um aromatische Verbindungen auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis.

Für dieses Screening der neuen Substanzklassen sollten zuerst jeweils allgemeine Syntheserouten für Verbindungen auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis entwickelt werden.

Die Substanzklassen sind in **Abb. 2.3** dargestellt und besitzen ein aromatisches Grundgerüst, entweder einen Benzolring oder einen Heteroaromaten.

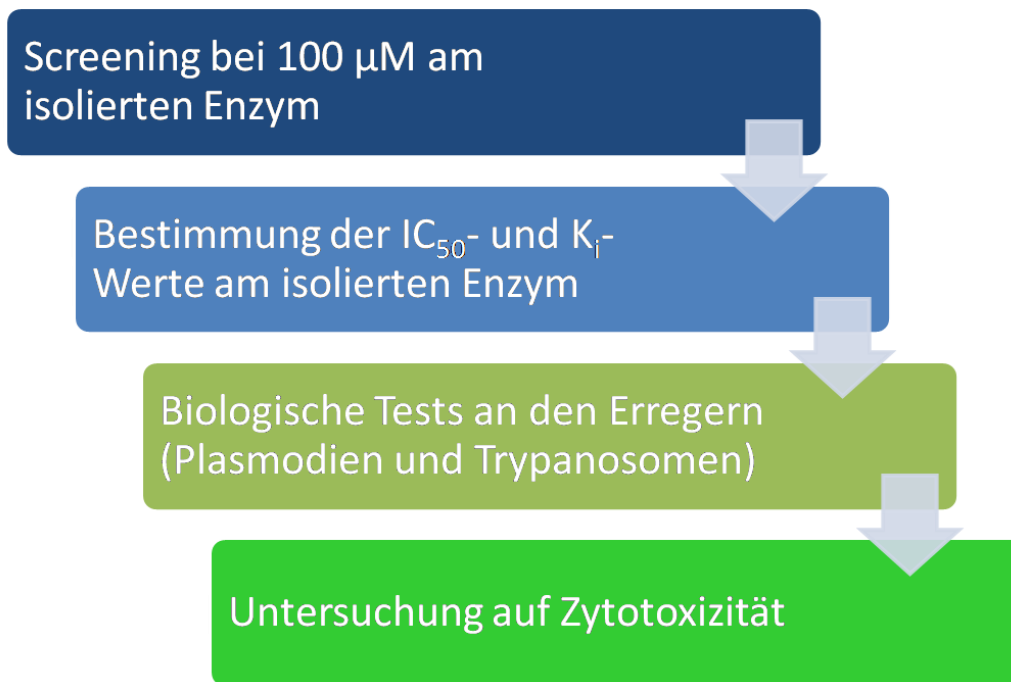


**Abb. 2.3** Potentielle Inhibitoren auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis

Für die variablen Reste sollten bei allen drei Verbindungsklassen gleiche oder ähnliche Strukturelemente verwendet werden, damit die Inhibitoreigenschaften der drei Substanzgruppen direkt miteinander verglichen werden können. Für die Schutzgruppe sollte eine *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) und für die Seitenkette Amide mit verschiedenen Resten oder Esterfunktionen eingesetzt werden. Der Einfluss des zentralen Aromaten auf die Enzymhemmung kann damit eindeutig bestimmt werden.

Nach der erfolgreichen Synthese dieser Substanzklassen sollte nun kombiniert mit dem Wissen aus Docking-Experimenten von *Baumann* eine neue Generation an Inhibitoren für Falcipain-2 und Rhodesain entwickelt werden. Für diese neuen Verbindungen sollte zunächst eine allgemeine Syntheseroute etabliert und anschließend das Inhibitorpotential untersucht werden.

Die synthetisierten Verbindungen sollten auf ihre inhibitorischen Eigenschaften an Rhodesain und an Falcipain-2 untersucht werden. Dies beinhaltet vier Schritte zur vollständigen Charakterisierung der Hemmeigenschaften, die in **Abb. 2.4** schematisch dargestellt sind.



**Abb. 2.4** Prozess zur Charakterisierung der Hemmeigenschaften neuer Inhibitoren

In bereits etablierten fluorimetrischen Enzym-Assays sollte die prozentuale Hemmung bei einer definierten InhibitorKonzentration von 100  $\mu\text{M}$  bestimmt werden, um die potentesten Vertreter zu identifizieren. Bei den in diesem Screening entdeckten Verbindungen mit den höchsten Werten für die Hemmung sollten dann durch Messungen bei unterschiedlichen InhibitorKonzentrationen bis in den nanomolaren Bereich hinein die  $\text{IC}_{50}$ -Werte an der entsprechenden Protease ermittelt werden. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert ist diejenige Konzentration, bei der die Enzymaktivität genau bei 50 % liegt und stellt eine Größe dar, die es möglich macht, verschieden gute Inhibitoren miteinander zu vergleichen. Aus diesen Daten lassen sich ebenfalls die  $\text{K}_i$ -Werte bestimmen, die einen Vergleich mit anderen literaturbekannten Inhibitoren ermöglichen.  $\text{K}_i$  stellt die Dissoziationskonstante zwischen Enzym und Inhibitor bei einer reversiblen Hemmung dar und ist im Gegensatz zu den  $\text{IC}_{50}$ -Werten unabhängig von den verwendeten Konzentrationen des Enzyms und des Substrats. Die hierbei potentesten Vertreter sollten dann in der letzten Phase in biologischen Assays an den Erregern selbst auf ihr Hemmpotential getestet werden. An Rhodesain aktive Substanzen sollten an *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) und an Falcipain-2 aktive Verbindungen an *Plasmodium falciparum* (*P.f.*) untersucht werden. Außerdem sollten durch Tests auf Zytotoxizität die potentielle Anwendung der Substanzen am Menschen überprüft und damit ausgeschlossen werden, dass die Beeinflussung des Erregerwachstums nicht auf andere Effekte als die Enzymhemmung zurückzuführen ist. Folglich erhält man im Idealfall eine Charakterisierung

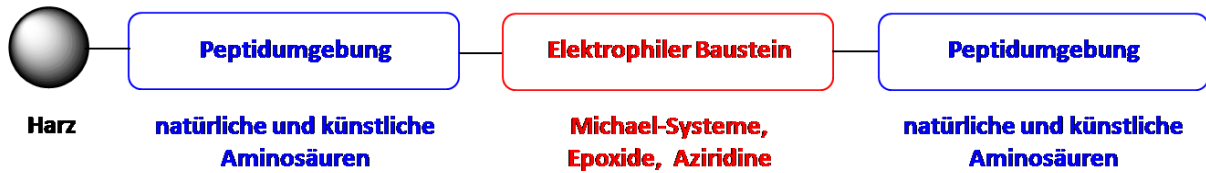
der Substanzen mit der prozentualen Hemmung bei 100  $\mu\text{M}$ , den dazugehörigen  $\text{IC}_{50}$ - und gegebenenfalls den  $K_i$ -Werten an beiden Enzymen, den  $\text{IC}_{50}$ -Werten an den Erregern und den Daten für die Zytotoxizität. Diese Vorgehensweise zur Beschreibung des Potentials der entwickelten Verbindungen kommt bei der im folgenden Kapitel behandelten kombinatorischen Methode zur Inhibitoroptimierung erneut zum Einsatz.

Durch Variationen von Strukturelementen eines bekannten aktiven Inhibitors können noch potentere neue Substanzen entdeckt werden. Dabei spielt die Identifizierung der essentiellen Molekülfragmente eine wichtige Rolle. Es gibt jedoch auch einen anderen Ansatz zur Inhibitoroptimierung, bei dem durch kombinatorische Variationen von Strukturelementen Substanzbibliotheken synthetisiert werden und in einem anschließenden Screening die aktiven Inhibitoren ermittelt werden können. Dieser kombinatorische Ansatz ist Teil der zweiten Aufgabenstellung und wird im folgenden Abschnitt erläutert.

## 2.2 Inhibitoroptimierung mittels kombinatorischer Chemie

Der zweite Projektteil beinhaltet eine komplett andere Herangehensweise, bei der eine kombinatorische Bibliothek an einem Harz als polymeren Träger synthetisiert werden sollte. In einem anschließenden Screening dieser Bibliothek sollten neue potente Inhibitoren für die Cysteinproteasen gefunden werden. Das Screening der Bibliothek sollte direkt am Harz erfolgen, weshalb im Vorfeld eine neue Screeningmethode entwickelt werden sollte. Anschließend sollte eine Inhibitorbibliothek entworfen werden, die potentiell Falcipain-2 und Rhodesain hemmen kann. Die Synthese dieser festphasengebundenen Inhibitoren sollte zum einen an einem geeigneten Harz für die Screeningbedingungen und zum anderen an einem Harz, von dem der Inhibitor abgespalten und in Lösung untersucht werden kann, getestet und entwickelt werden.

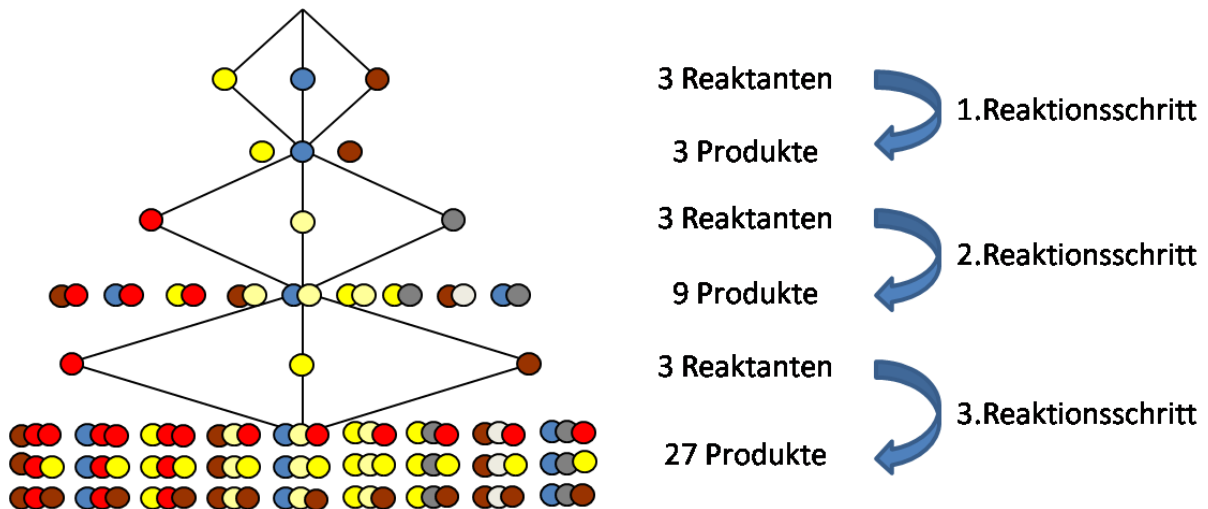
Das Design dieser kombinatorischen Bibliothek ist in **Abb. 2.5** veranschaulicht. Im Zentrum der Verbindungen befindet sich ein elektrophiler Baustein, der von zwei Peptidarmen umgeben ist.



**Abb. 2.5** Das allgemeine Design einer kombinatorischen Inhibitorbibliothek für Cysteinproteasen

Durch die peptidische Umgebung sollte das natürliche Substrat der Proteasen nachgeahmt werden, so dass die Verbindungen erkannt und im aktiven Zentrum gebunden werden können. Die elektrophile Einheit in der Mitte des Inhibitors stellt den Angriffsort für den nukleophilen Cysteinrest im aktiven Zentrum der Protease dar. Das Design der Bibliothek ist auf irreversible Hemmung der Cysteinproteasen ausgelegt, darauf wird in späteren Kapiteln nochmals genauer eingegangen.

Bei dem kombinatorischen Ansatz sollte die „split and mix“-Synthese eingesetzt werden, um die Inhibitorbibliothek zu erhalten.<sup>[17-19]</sup> Im folgenden Schema ist diese Vorgehensweise dargestellt.

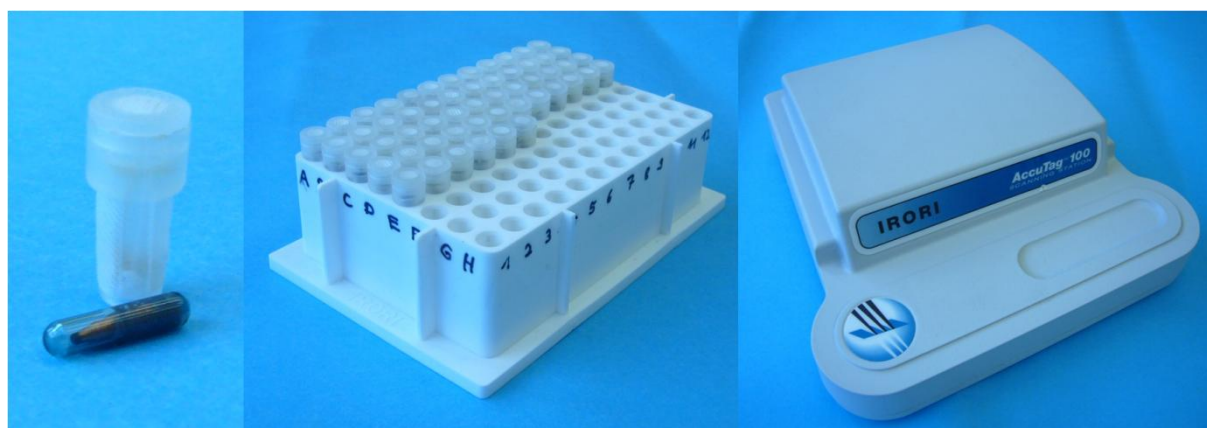


**Abb. 2.6** Schema zur „split and mix“-Synthese einer kombinatorischen Bibliothek

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass in nur wenigen Reaktionsschritten eine große Anzahl an verschiedenen Verbindungen parallel synthetisiert werden können. So ist es z.B. möglich, in nur drei Reaktionsschritten mit jeweils drei Reaktanden  $3 \times 3 \times 3 = 27$  verschiedene Verbindungen herzustellen. Man führt also neun Reaktionen durch und erhält 27 verschiedene Produkte. Dazu wird bei einer festphasengebundenen Bibliothek der polymere Träger jeweils auf so viele Gefäße gleichmäßig aufgeteilt, wie Reaktanden eingesetzt werden und jeweils mit diesen umgesetzt. Dies entspricht dem „split“-Schritt,

anschließend erfolgt der „mix“-Schritt, das Zusammengeben der Harzkügelchen aller drei Fraktionen. Das Harz wird wieder aufgeteilt und in verschiedenen Gefäßen mit den nächsten Reaktanden umgesetzt. Nach erneutem Mischen entsteht so die kombinatorische Bibliothek. Die Zeitersparnis bei dieser Parallelsynthese ist in Anbetracht der erhaltenen Menge an Verbindungen enorm. In einem qualitativen Screening, bei dem sich z.B. durch eine farbliche Änderung die sogenannten „Hits“ identifizieren lassen, können diese analysiert und gezielt synthetisiert werden. Darüber hinaus haben sich als Analysemethode zur Bestimmung der chemischen Struktur der „Hits“ neben dem klassischen Edman-Abbau von Peptiden auch massenspektrometrische Untersuchungen etabliert.

Die „split and mix“-Synthesestrategie kann auch mit der IRORI-Technik kombiniert werden und damit die nachfolgende Analyse der „Hits“ des Screenings vereinfachen.<sup>[20,21]</sup>



**Abb. 2.7** MikroKans mit Radiofrequenzchip (links und Mitte), IRORI Scanstation (rechts)

Hier wird eine definierte Menge des Harzes für die Festphasensynthese in ein sogenanntes MikroKan überführt, einem verschließbaren Kunststoffbehälter mit einer für Lösungsmittel und gelöste Reaktanden durchlässigen Membran. Pro Mitglied der Bibliothek wird ein solches MikroKan benötigt und mit einem radiofrequenzmarkierten Mikrochip versehen. Mit der IRORI Scanstation und einer entsprechenden Software zur Synthesepaltung wird der Aufteilungsschritt vorgegeben und die Sequenzen aller Bibliotheksmitglieder können jederzeit überprüft werden. Mit einer geeigneten Screeningmethode können die Bibliotheksmitglieder nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ auf deren Inhibitoreigenschaften untersucht werden und eine zeitaufwändige Analyse der „Hits“ entfällt.

Die Screeningmethode sollte direkt am Harz erfolgen. Ein Enzym-Assay für festphasengebundene Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain sollte zunächst für den kombinatorischen Ansatz entwickelt werden. Dazu sollte die Synthese eines bekannten Inhibitors an einem für solche Screenings im wässrigen Medium geeigneten Harz und anschließend damit Testscreenings in einem fluorimetrischen Enzym-Assay durchgeführt werden. Nach der erfolgreichen Entwicklung eines Enzym-Assays am Harz sollte dann die gesamte am gleichen Harz gebundene Inhibitorbibliothek getestet werden. Hierbei potente Verbindungen sollten dann nochmals synthetisiert und vom Harz abgespalten werden und wie oben beschrieben vollständig in Lösung charakterisiert werden. Da das Festphasenscreening in dieser Form neu ist, stellt dieser zweite Themenblock eine Herausforderung bezogen auf Methodenentwicklung dar.

Mehrere Wege zur Inhibitoroptimierung sind möglich. Der klassische und der kombinatorische Ansatz besitzen unterschiedliche Ansprüche, um zu einem Ergebnis zu kommen. Die Zielsetzung in dieser Arbeit ist es, jeweils neue Inhibitoren für Cysteinproteasen zu entdecken und zu charakterisieren. Aufgrund der unterschiedlichen Wege müssen verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Im nächsten Kapitel sollen die Grundlagen zur Zielsetzung und einige bereits bekannte Beispiele auf diesem Gebiet vorgestellt werden.



### 3 Grundlagen und Methoden der Inhibitoroptimierung

Die Inhibitoroptimierungen auf den zwei unterschiedlichen Wegen erfordern erstens Hintergrundinformationen zu den untersuchten Cysteinproteasen und schon bekannten Inhibitoren, und zweitens Möglichkeiten zur Quantifizierung der Inhibitoreigenschaften neuer Verbindungen sowohl in Lösung als auch festphasengebunden an Enzymen. So sollen in den ersten Kapiteln allgemeine Informationen zu Cysteinproteasen und deren Katalysemechanismus erläutert werden und anschließend auf die Hemmung dieser Enzyme eingegangen werden. Enzymkinetische Grundlagen und die Beschreibung von Enzym-Assays in Lösung und für harzgebundene Inhibitoren folgen in den beiden letzten Abschnitten.

#### 3.1 Vorkommen und Bedeutung von Cysteinproteasen

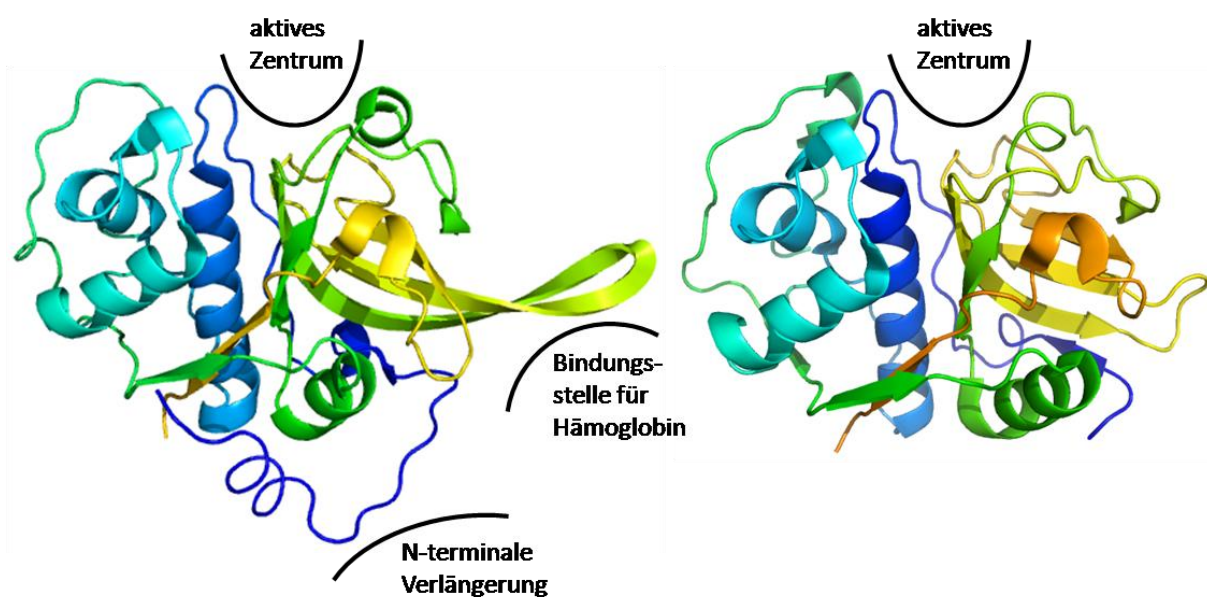
Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen selektiv hydrolysieren können. Man unterscheidet je nach Aufbau des aktiven Zentrums fünf Klassen an Proteasen: Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen. Bis heute wurden über 500 proteolytisch aktive Enzyme entdeckt, jede Klasse ist nach Ähnlichkeit der Enzyme nochmals in Clans und weiter in Familien unterteilt. Man versucht so, strukturell verwandte Proteasen und damit auch Enzyme mit einer ähnlichen Substratspezifität gleich zu klassifizieren.

Charakteristisch für Cysteinproteasen ist die katalytische Triade, die das aktive Zentrum des Enzyms bildet. Sie sind bei Pflanzen, Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen, Würmern und bei Säugetieren, sowie beim Menschen weit verbreitet. Zunächst wurde angenommen, dass sie für den unspezifischen Proteinabbau in der Zelle zuständig sind. Heute weiß man, dass sie beim Menschen auch bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Die meisten humanen Cysteinproteasen gehören zum Clan CA, das C steht hierbei für Cystein. Dieser Clan wird weiter in die Familien C1 und C2 unterteilt, die Familie C1 beinhaltet die lysosomalen Cathepsine und C2 die zytoplasmatischen Calpaine.<sup>[22]</sup>

Die Funktionen von Proteasen in den verschiedensten Organismen sind sehr vielfältig.<sup>[23]</sup> Zu den Wichtigsten gehören die Aktivierung von Proenzymen, die Regulation der Blutgerinnung, die Verdauung, der Eiweißumsatz, die Befruchtung, Immunreaktion, Apoptose und die Signaltransduktion. Proteasen sind folglich in nahezu allen lebenswichtigen Prozessen beteiligt. Durch die selektive Inhibierung dieser Enzyme kann direkt in diese Prozesse

eingegriffen werden, daher spielen sie als mögliche Targets für potentielle neue Therapeutika eine sehr wichtige Rolle. Hierbei kann man unterscheiden, ob eine Protease z.B. eines Krankheitserregers direkt ausgeschaltet wird und damit die Krankheit eingedämmt wird, oder ob ein natürlicher Inhibitor einer humanen Protease geblockt wird, um die Aktivität bestimmter Enzyme gezielt zu erhöhen. Dies kann bei Krankheiten wie Krebs von Bedeutung sein, da hier der gezielte Zelltod initiiert und die Anzahl von Krebszellen dann durch Apoptose erniedrigt werden kann. Proteasen liefern also eine Vielzahl an denkbaren Einsatzmöglichkeiten, wichtig hierbei ist natürlich die selektive Hemmung bestimmter Enzyme, um keine unerwünschten Nebeneffekte zu erzielen.

Falcipain-2 und Rhodesain sind parasitäre Cysteinproteasen aus Protozoen, die Malaria und die Schlafkrankheit auslösen. Beide Cysteinproteasen besitzen eine ähnliche Struktur (siehe **Abb. 3.1**), so dass der Aufbau der aktiven Zentren nahezu identisch ist und die Proteasen somit durch gleiche Inhibitoren gehemmt werden können. Es befinden sich jeweils ein Cystein- und ein Histidinrest im aktiven Zentrum und die Bindungstaschen dort sind für große hydrophobe Reste geeignet. Bevorzugt werden Peptide nach den Sequenzen Phe-Arg bzw. Leu-Arg gespalten. Die einzigen auffälligen Unterschiede der beiden Enzyme werden aus den Strukturen ersichtlich: beim Falcipain-2 befindet sich zusätzlich die Bindungsstelle für das Hämoglobin und eine N-terminale Verlängerung.<sup>[24,25]</sup>

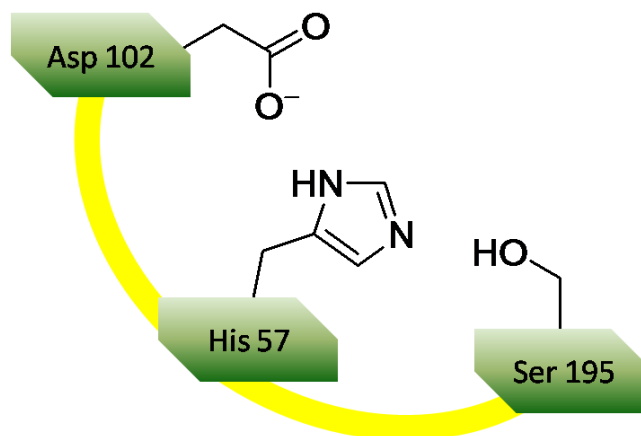


**Abb. 3.1** Kristallstrukturen von Falcipain-2 (links, 1yvb) und Rhodesain (rechts, 2p86), Bilder erstellt mit PyMOL

Die beiden Cysteinproteasen haben ein Aktivitätsmaximum im leicht sauren Bereich bei einem pH-Wert von 5,5, im neutralen bis basischen Bereich sinkt die katalytische Aktivität. Der Mechanismus der katalytischen Hydrolyse von Amidbindungen der Cysteinproteasen soll im nächsten Kapitel näher behandelt werden.

### 3.2 Der Hydrolysemechanismus bei Cysteinproteasen

Der Katalysemechanismus für Cysteinproteasen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, es gibt jedoch Vorschläge, die auf den bekannten Mechanismus der Protease Chymotrypsin aufbauen. Chymotrypsin ist eine Serinprotease, deren Aufbau des aktiven Zentrums aus der sogenannten katalytischen Triade besteht (siehe **Abb. 3.2**). Dabei handelt es sich um die drei Aminosäurereste Asparaginsäure (Asp 102), Histidin (His 57) und Serin (Ser 195).

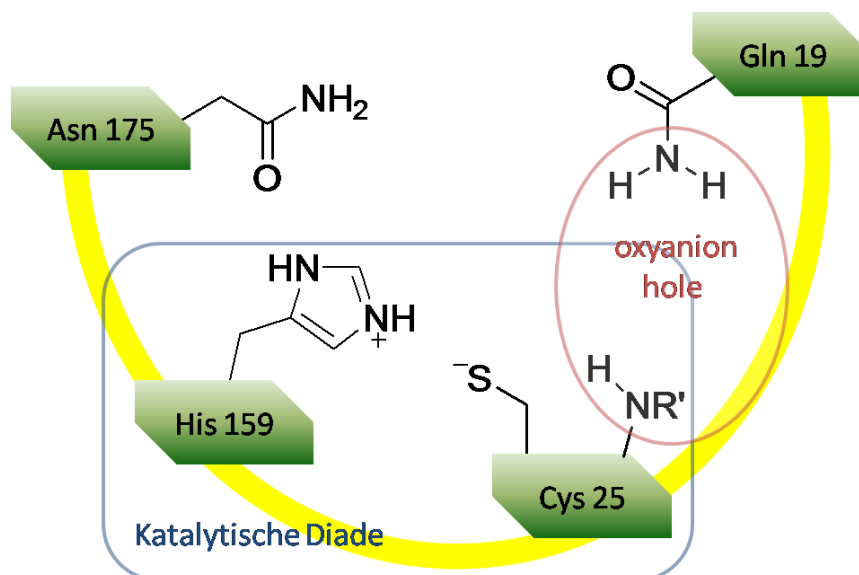


**Abb. 3.2** Schema des aktiven Zentrums der Serinprotease Chymotrypsin

Die katalytische Aktivität beruht auf einer Erhöhung der Nucleophilie des Serinrestes aufgrund des benachbarten Histidins, das das Proton der Hydroxylgruppe aufnehmen kann. Zusätzlich wird der dann positiv geladene Imidazolring durch eine ionische Wechselwirkung und eine Wasserstoffbrückenbindung zum Aspartat stabilisiert. Bei anderen Serinproteasen gibt es Varianten dieser katalytischen Triade, wie den Austausch eines dieser Reste durch ähnliche oder äquivalente Aminosäurereste. Anstatt einer Asparaginsäure kann z.B. ein Asparagin im aktiven Zentrum sitzen, gemeinsam bleibt jedoch immer die erhöhte Nucleophilie des Serins.

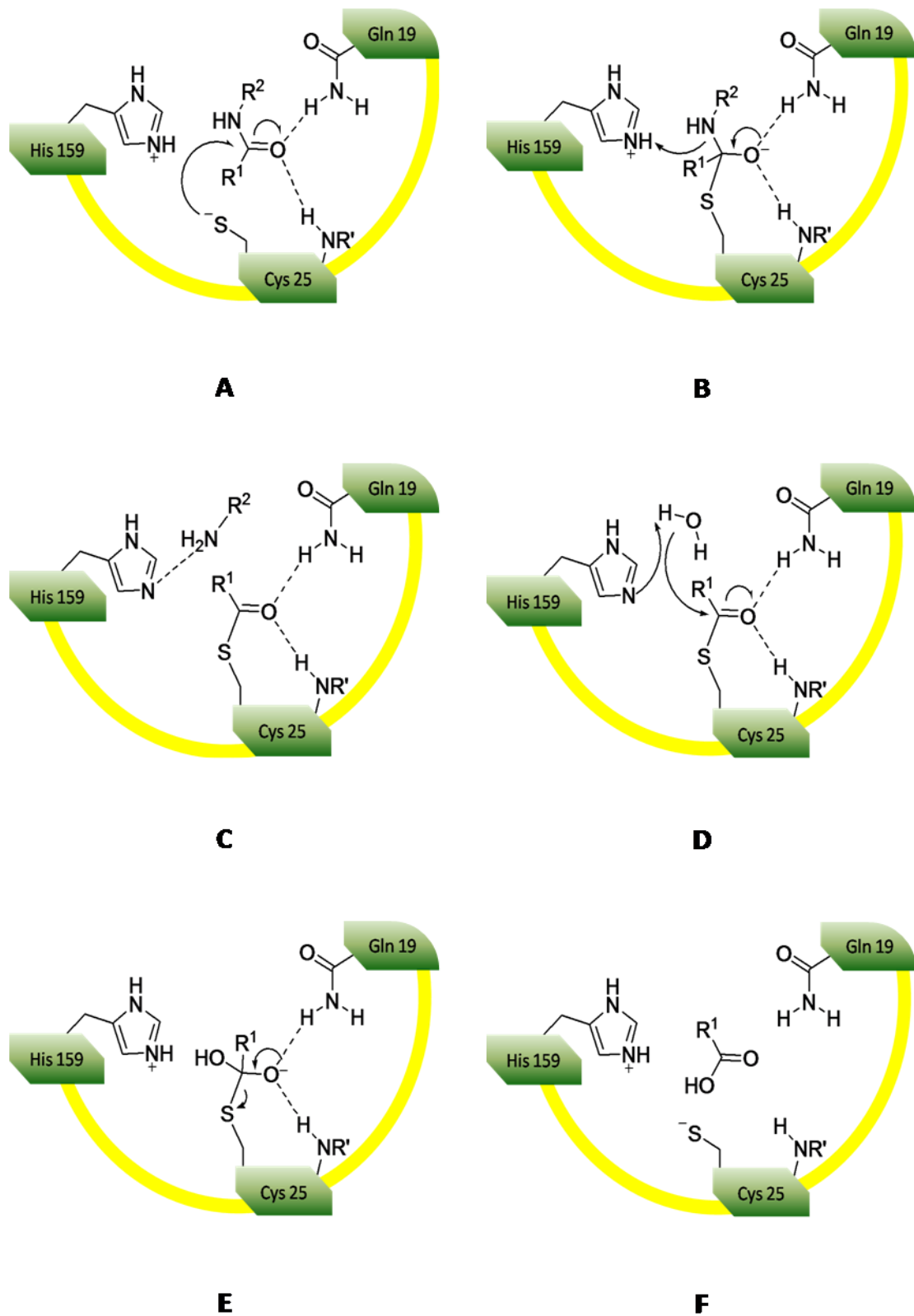
Bei den Cysteinproteasen findet man einen ähnlichen Aufbau im aktiven Zentrum, wobei das Serin durch ein Cystein ersetzt ist. Jedoch ist die katalytische Aktivität bei diesen Proteasen bis heute nicht so ausführlich untersucht wie bei den Serinproteasen. Für Papain, eine

Cysteinprotease aus dem Clan CA und der C1-Familie, haben *Otto* und *Schirmeister* einen Katalysemechanismus vorgeschlagen, der sich auch auf andere Cysteinproteasen übertragen lässt.<sup>[26]</sup> Im aktiven Zentrum von Papain (siehe **Abb. 3.3**) befindet sich eine katalytische Diade, bestehend aus Cystein (Cys 25) und Histidin (His 159). Auch hier wird die Nukleophilie des Thiolrestes durch den Protonenakzeptor in der unmittelbaren Umgebung erhöht. Der protonierte Imidazolring des Histidins wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem benachbarten Asparaginrest (Asn 175) zusätzlich stabilisiert. Außerdem befindet sich das sogenannte „oxyanion hole“ in unmittelbarer Umgebung der Thiolgruppe. Sie stellt eine Bindungstasche für den tetraedrischen Übergangszustand dar und wird vom Peptidrückgrat des Cysteins selbst (Cys 25) und von einem benachbarten Glutaminrest (Gln 19) gebildet.



**Abb. 3.3** Schema des aktiven Zentrums der Cysteinprotease Papain

In dieser Darstellung liegt die katalytische Diade als Ionenpaar vor. Mit dieser ionischen Form kann die erhöhte Nukleophilie des Cysteins bei Papain und anderen Cysteinproteasen vor allem in einer leicht sauren Umgebung erklärt werden. Ob die katalytische Diade ionisch oder in neutraler Form vorliegt, wurde bereits in den 70er Jahren ausführlich diskutiert.<sup>[29-31]</sup> Im Folgenden soll eine hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung durch Papain unter der Annahme, dass das Ionenpaar präkatalytisch vorliegt im Detail erläutert werden. Es handelt sich hierbei um eine kovalente Katalyse, da sich als Zwischenstufe ein kovalentes Enzym-Substrat-Addukt bildet, das anschließend wieder gespalten wird. In **Abb. 3.4** ist der Katalysemechanismus am Beispiel von Papain mit einigen wichtigen Zwischenstufen dargestellt.



**Abb. 3.4** Vorschlag für den Katalysemechanismus bei Cysteinproteasen am Beispiel von Papain

Im ersten Schritt muss sich das zu spaltende Peptid in das aktive Zentrum einlagern. Der Cysteinrest liegt im Gegensatz zu den Serinproteasen bereits präkatalytisch als Thiolatanion vor. Daraus resultiert eine vergleichsweise viel höhere Nucleophilie als bei einer

ungeladenen Thiofunktion. Die Thiolatgruppe greift die zu spaltende Peptidbindung am Carbonyl-C-Atom an (**A**) und es entsteht die tetraedrische Zwischenstufe (**B**). Dieses Thiohalbacetal wird im sogenannten „oxyanion hole“ durch Wasserstoffbrückenbindungen aus der Umgebung stabilisiert, wodurch die Reaktion durch die Herabsetzung der Aktivierungsenergie begünstigt wird. Diese Stabilisierung findet man analog auch bei Serinproteasen. Es ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen, ob bei Cysteinproteasen diese Stabilisierung im oxyanion hole essentiell für die Herabsenkung der Aktivierungsenergie dieser Reaktion verantwortlich ist. Sicher ist, dass diese Stabilisierung existiert, dies konnte durch Röntgenstrukturanalysen eines Komplexes aus Papain mit dem Inhibitor BPACK bzw. Leupeptin untermauert werden. Im nächsten Schritt bildet sich durch Abspaltung eines Amins als Intermediat das acylierte Cystein (**C**). Gleichzeitig liefert der Imidazolring des Histidins das Proton zur Bildung des Amins und liegt anschließend ungeladen vor. Als nächstes reagiert das acylierte Enzym mit einem Wassermolekül und der Histidinrest wird protoniert (**D**). Dabei entsteht erneut eine tetraedrische Zwischenstufe, die im oxyanion hole stabilisiert werden kann (**E**). Abschließend wird die Säurefunktion abgespalten und die katalytische Diade wird wieder regeneriert (**F**).

Geeignete Inhibitoren der Cysteinproteasen sollten eine ähnliche räumliche Struktur wie die natürlichen Substrate aufweisen, um eine vergleichbar hohe Affinität zu erhalten. Im nächsten Kapitel wird auf bereits bekannte Inhibitoren der beiden Cysteinproteasen näher eingegangen.

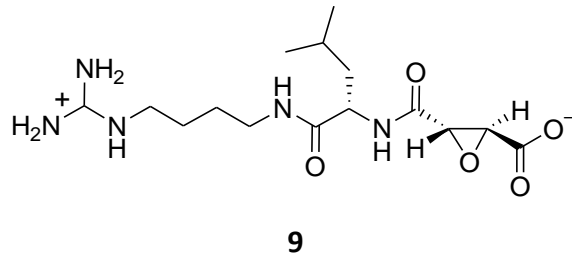
### **3.3 Inhibitoren von Cysteinproteasen**

Bei der Hemmung von Proteasen unterscheidet man prinzipiell zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren. Die Enzyme können reversibel durch Verbindungen gehemmt werden, wenn die Verbindung nichtkovalent bzw. nur schwach kovalent im aktiven Zentrum gebunden ist. Dabei entsteht eine Konkurrenz mit dem natürlichen Substrat, das nun nicht mehr in der Bindungstasche der Protease andocken und dort gespalten werden kann. Ein reversibler Inhibitor kann jedoch wieder aus der Bindungstasche verdrängt werden, was zur Wiedererlangung der ursprünglichen Enzymaktivität führt. Wegen der Konkurrenz zum Substrat muss ein guter reversibler Inhibitor eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum aufweisen. Bei irreversiblen Inhibitoren wird das aktive Zentrum kovalent oder sehr stark

nichtkovalent blockiert. In den meisten Fällen bedeutet das für Proteaseinhibitoren, dass sie ein elektrophiles Strukturelement besitzen, das durch die meist nukleophil reagierenden Proteasen angegriffen werden kann. Dadurch bildet sich eine kovalente Bindung an einen der Aminosäurereste in der Bindungstasche des Enzyms, so dass dieses katalytisch inaktiv wird. Eine Verdrängung ist hier im Allgemeinen nicht möglich, so dass die ursprüngliche Enzymaktivität wieder erreicht ist.

Die meisten irreversiblen Inhibitoren von Cysteinproteasen wurden nach dem Substrat-basierenden Prinzip entwickelt, d.h. sie besitzen einen peptidischen Anteil und einen sogenannten „warhead“. Durch die Peptidkette können Selektivitäten erreicht werden, da entweder das natürliche Substrat oder auch ein natürlicher Inhibitor des Enzyms imitiert wird. Der „warhead“ stellt eine reaktive Gruppe dar, die mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum reagieren soll, damit die Katalyse nicht mehr ablaufen kann. Aufgrund der im Allgemeinen schlechten Applikation und der schnellen hydrolytischen Spaltung peptidischer Verbindungen durch Enzyme im Organismus wurde verstärkt die Entwicklung von peptidomimetischen Inhibitoren verfolgt. Hier wurden unnatürliche Aminosäuren verwendet oder den Peptiden durch die Einführung von Heterozyklen ein rigides Grundgerüst gegeben. Dadurch sollte vor allem der hydrolytische Abbau verhindert werden. Im folgenden Abschnitt soll zunächst ein Überblick gegeben werden, welche irreversiblen und reversiblen Inhibitoren bereits für Cysteinproteasen existieren. Anschließend sollen jeweils einige ausgewählte Beispiele für irreversible und reversible Inhibitoren von Rhodocysteinase bzw. Falcipain-2 etwas ausführlicher vorgestellt werden.

Für irreversible Inhibitoren findet man sehr viele Beispiele, da die kovalente Modifikation des stark nukleophilen Cysteinrests durch Elektrophile möglich ist. Dabei wird das Thiol in den meisten Fällen alkyliert. Es existieren einige Übersichtsartikel zu bestimmten Typen an Inhibitoren von Cysteinproteasen. So gibt es Zusammenstellungen von Inhibitoren, die kleine elektrophile Ringe besitzen und infolge des 1978 entdeckten Inhibitors E-64 (**9**) entwickelt wurden. Das Epoxid **9** konnte neben weiteren Naturstoffen aus dem Pilz *Aspergillus japonicus* isoliert werden.<sup>[27]</sup>



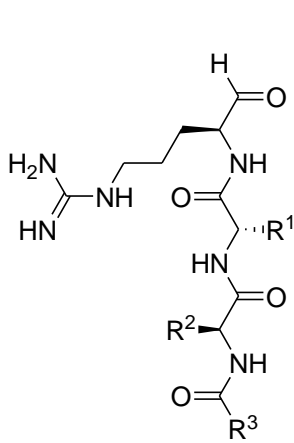
**Abb. 3.5** E-64 – ein peptidischer irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen mit einem elektrophilen Baustein

E-64 inhibiert selektiv Cysteinproteasen, die anderen Proteaseklassen werden jedoch nicht beeinflusst. Lediglich der Cysteinrest ist reaktiv genug, um das Epoxid nukleophil unter Ringöffnung anzugreifen.<sup>[28]</sup> Seit dieser Entdeckung wurden weitere ähnliche Verbindungen mit kleinen Ringen als Bestandteil, wie z.B. Epoxide, Aziridine, Thiirane,  $\beta$ -Lactone und  $\beta$ -Lactame, synthetisiert und erfolgreich zur Hemmung von Cysteinproteasen eingesetzt.

Weitere irreversibel hemmende Verbindungsklassen sind  $\alpha$ -Ketocarboxylverbindungen (Säuren, Ester, Amide und Diketone), Halomethylketone (mit dem bekanntesten Vertreter TPCK), Diazomethane, Acyloxymethylketone, Methylsulfoniumsalze, Disulfide und O-Acylhydroxamate.<sup>[22-23]</sup>

Für reversible Inhibitoren gibt es vergleichsweise wenige Beispiele für potente Inhibitoren. Eine ab Ende der 70er Jahre untersuchte Verbindungsklasse sind peptidische Aldehyde, die sich kovalent an den Cysteinrest binden, wobei sich eine tetraedrische Zwischenstufe bildet. Dieses im aktiven Zentrum stabilisierte Thiohalbacetal kann jedoch wieder hydrolysiert werden, so dass es sich eher um einen reversiblen Inhibierungsmechanismus handelt. Aus Bakterienstämmen der Gattung *Streptomyces* konnten eine Reihe an peptidischen Aldehyden isoliert werden, darunter z.B. Leupeptine **10**, Chymostatine **11** und Antipain **12**. Diese Aldehyde sind nicht selektiv und hemmen gleichermaßen Serin- und Cysteinproteasen.





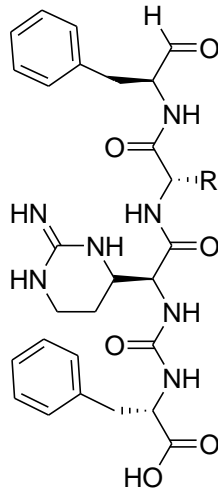
**10**

$R^1 = \text{Me, Et}$

$R^2 / R^3 = \textit{iso}\text{Propyl,}$

$\textit{iso}\text{Butyl, sek.-Butyl}$

**Leupeptine**



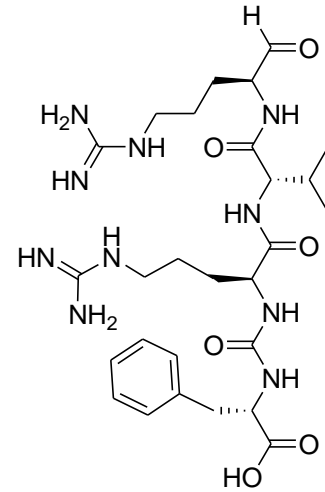
**11**

$R = \textit{iso}\text{Butyl,}$

$\textit{iso}\text{Propyl,}$

sek.-Butyl

**Chymostatine**



**12**

**Antipain**

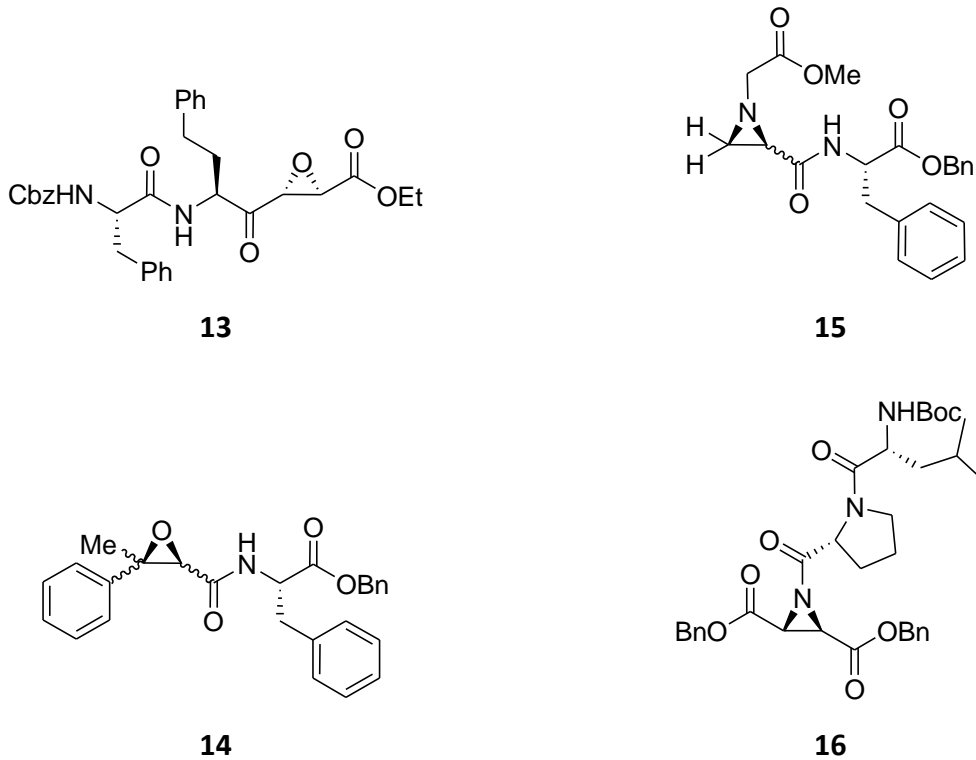
**Abb. 3.6** Peptidische Aldehyde als reversible Cysteinproteaseinhibitoren

Als weitere Verbindungsklasse der reversiblen Inhibitoren sind die Semicarbazone zu nennen, die vergleichsweise schwächere Inhibitoren als die Aldehyde **10** bis **12** darstellen. Aufgrund der Reversibilität werden Semicarbazone ebenso wie peptidische Aldehyde zur Reinigung von Serin- und Cysteinproteasen per Affinitätschromatographie eingesetzt. Bereits in den 80er Jahren wurde die Reinigung von Cathepsin B durch peptidische Aldehyde (z. B. das reduzierte Dipeptid H-Gly-Phe-H) berichtet, die an Sepharose (einem verzweigten Polymer aus Saccharid-Einheiten) gebunden sind.<sup>[32]</sup> Weitere reversible Inhibitoren sind Methylketone, Trifluormethylketone, Nitrile und lysosomale Basen.<sup>[26]</sup>

Für Falcipain-2 und Rhodesain wurden in den letzten Jahren neue Inhibitoren entdeckt, über die im folgenden Teil eine Übersicht gegeben werden soll. Es gibt sowohl Beispiele für irreversible als auch für reversible Inhibitoren der beiden parasitären Proteasen.

Von *Schirmeister* und *McKerrow* wurden einige irreversible Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain auf Basis von elektrophilen Dreiringen und einem peptidischen Anteil entwickelt.<sup>[33-35]</sup> Einige ausgewählte Beispiele dieser Epoxide und Aziridine sind in **Abb. 3.7** dargestellt. Bei der Hemmung greift das Cysteinat aus dem aktiven Zentrum der Protease

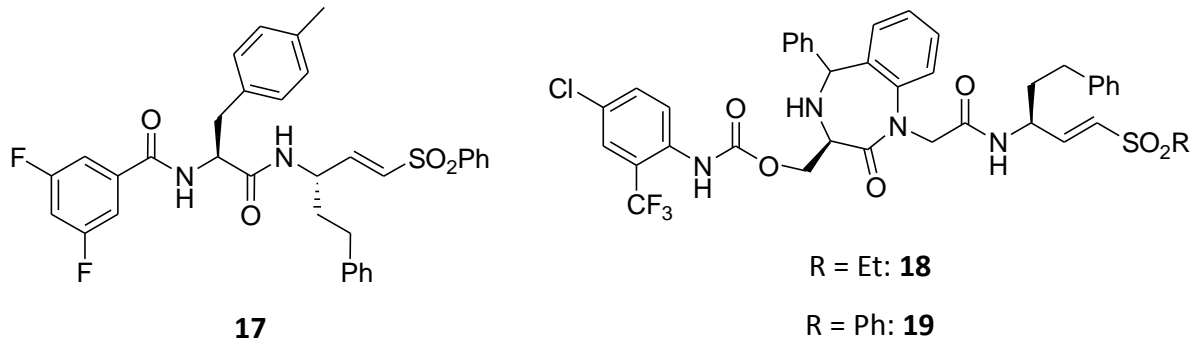
nukleophil unter Ringöffnung an und es bildet sich ein kovalentes Inhibitor-Enzym-Addukt. Durch kinetische Daten konnte belegt werden, dass es sich um irreversible Inhibitoren handelt.



**Abb. 3.7** Epoxide und Aziridine als irreversible Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain

Nach der Synthese wurden die Verbindungen auf ihr Hemmpotential an verschiedenen Cysteinproteasen untersucht. Dabei stellten sich die hier abgebildeten Beispiele **13** bis **16** als hervorragende Inhibitoren der beiden parasitären Proteasen heraus. So wurde für **13** ein  $IC_{50}$ -Wert von  $3.5 \text{ nM}^{[35]}$  und für **16** ein  $K_i$ -Wert von  $2.3 \text{ }\mu\text{M}^{[33]}$  an Rhodesain bestimmt. An Falcipain-2 konnten mäßigeren  $IC_{50}$ -Werte im mikromolaren Bereich erhalten werden:  $52 \text{ }\mu\text{M}$  für **14** und  $2.2 \text{ }\mu\text{M}$  für **15**.<sup>[34]</sup> Die dargestellten Verbindungen sind ausgewählte Beispiele aus einer großen Anzahl an synthetisierten Epoxiden bzw. Aziridinen. Einige dieser Substanzen besitzen ebenfalls eine gute Aktivität *in vitro* gegenüber den Erregern *P. falciparum* bzw. *T. brucei brucei* im mikromolaren Bereich.

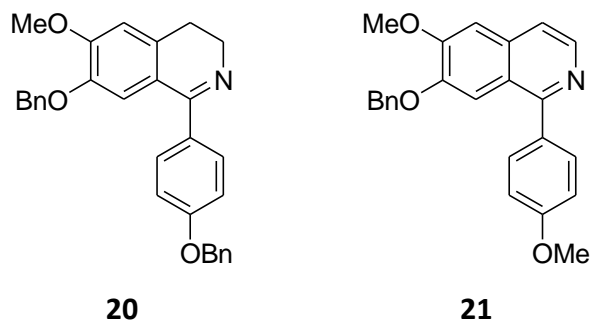
Eine weitere an Falcipain-2 und Rhodesain auf Inhibitoreigenschaften untersuchte Gruppe stellen die Vinylsulfone dar.<sup>[36,37]</sup> In **Abb. 3.8** sind ausgewählte Beispiele aufgeführt.



**Abb. 3.8** Vinylsulfone als irreversible Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain

Für Verbindung **17** konnte ein sehr guter  $K_i$ -Wert von 30 nM an Rhodesain bestimmt werden.<sup>[37]</sup> Für die Substanzen **18** und **19** wurden an Falcipain-2  $K_i$ -Werte von 320 nM für **18** und 600 nM für **19** erhalten.<sup>[36]</sup> Der Vinylsulfonbaustein wurde hierbei von der Thiolgruppe nukleophil angegriffen, es handelt sich somit um einen irreversiblen Inhibierungsmechanismus. Auch hier konnte ebenfalls eine Aktivität gegenüber den entsprechenden Erregern festgestellt werden.

Neue Inhibitoren wurden von *Batra* und *Avery* mit Hilfe eines virtuellen Screenings in Kombination von Docking-Experimenten am aktiven Zentrum von Falcipain-2 entwickelt. Dabei handelte es sich um Isochinoline und Dihydroisochinoline, die synthetisiert und anschließend an Falcipain-2 untersucht wurden.<sup>[38]</sup>

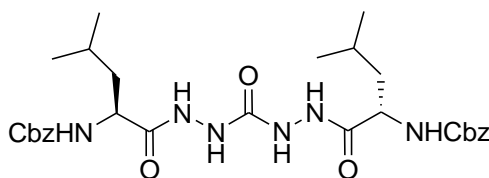


**Abb. 3.9** Dihydroisochinolin **20** und Isochinolin **21** als Inhibitoren von Falcipain-2

Hier wurde bei den Inhibitoren eine sehr gute Korrelation zwischen der Theorie und den experimentellen Daten gefunden. Im Enzym-Assay an Falcipain-2 konnten  $IC_{50}$ -Werte von 3  $\mu$ M für **20** und 10  $\mu$ M für **21** bestimmt werden. Über den Inhibierungsmechanismus wurden keine weiteren Angaben gemacht, da sich aber kein elektrophiles Element in den Strukturen befindet, kann man bei den Dihydroisochinolin und Isochinolin von

reversiblen Inhibitoren ausgehen. In dieser Arbeit wurde auf die Korrelation zu den theoretisch berechneten Inhibitorpotentialen der Verbindungen fokussiert, so dass auch keine mikrobiologischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Ebenso gab es keine Informationen über Selektivitäten im Vergleich zu anderen Proteasen.

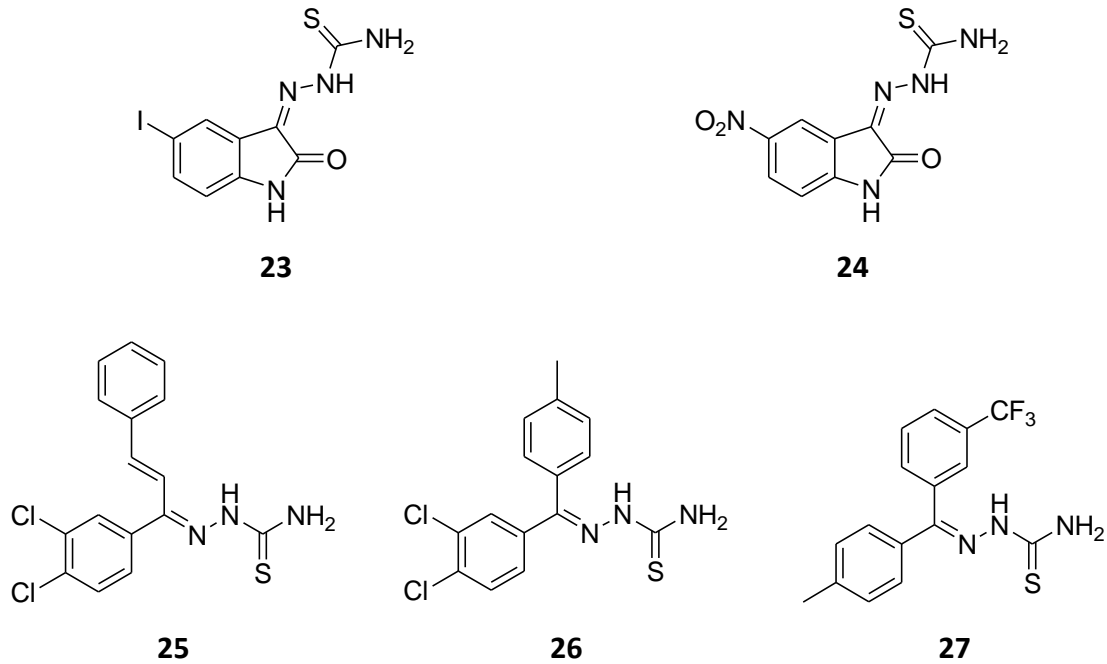
Es wird von einer weiteren Gruppe an reversiblen Inhibitoren von Falcipain-2 berichtet, die eine peptidische Grundstruktur aufweisen. Einige dieser Verbindungen zeigten zum Teil eine sehr gute Selektivität im Vergleich zu anderen Cysteinproteasen wie einiger Cathepsine. In **Abb. 3.10** ist die Struktur des bisher besten Inhibitors dieser Verbindungsklasse gezeigt, dem Diacylcarbohydrazid **22**.

**22**

**Abb. 3.10** Diacylcarbohydrazid **22** - ein reversibler Inhibitor von Falcipain-2

In dieser Reihe wurde ebenfalls Leupeptin **10** untersucht, das mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 31.9 nM in der gleichen Größenordnung liegt wie Verbindung **22** mit einem Wert von 31.8 nM.<sup>[39]</sup> Über entsprechende Untersuchungen am Malariaerreger *P. falciparum* wurden keine Informationen gegeben.

Eine weitere aussichtsreiche Gruppe an Inhibitoren sind Isatine und Thiosemicarbazone, die seit den letzten fünf Jahren ausführlich untersucht werden.<sup>[40-42]</sup> Sie wurde an beiden parasitären Cysteinproteasen getestet und zeigten ein hohes Potential. Die in **Abb. 3.11** aufgeführten Verbindungen **23** bis **27** stellen repräsentative Beispiele dieser Substanzklasse dar. Die Isatine **23** und **24** besitzen als aromatischen Teil ein 2,3-Dioxindolin-Grundgerüst, an das ein Thiosemicarbazon gebunden ist. Die Thiosemicarbazone **25** bis **27** besitzen unterschiedlich substituierte Aromaten als unpolare Reste.



**Abb. 3.11** Isatine und Thiosemicarbazone als Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain

Diese Inhibitorenklasse wird ganz aktuell weiter untersucht, aus diesem Grund gibt es noch keine bestätigten Informationen über die Kinetik und den Inhibierungsmechanismus. Jedoch gibt es für zahlreiche Verbindungen Hemmdaten an beiden parasitären Cysteinproteasen. An Falcipain-2 wurden  $IC_{50}$ -Werte von 28.7  $\mu\text{M}$  für **23**<sup>[40]</sup>, 4.4  $\mu\text{M}$  für **24**<sup>[40]</sup>, 470 nM für **25**<sup>[41]</sup> und 1.8  $\mu\text{M}$  für **26**<sup>[41]</sup> bestimmt, an Rhodesain konnten  $IC_{50}$ -Werte von 1  $\mu\text{M}$  für **23**<sup>[40]</sup>, 17  $\mu\text{M}$  für **24**<sup>[40]</sup>, 38 nM für **25**<sup>[41]</sup>, 38 nM für **26**<sup>[41]</sup> und 8 nM für **27**<sup>[42]</sup> erhalten werden. Hier wurden somit exzellente Inhibitoren entdeckt, die  $IC_{50}$ -Werte im niederen nanomolaren Bereich aufweisen. Sie besitzen ebenfalls eine gute Aktivität bei nanomolaren Konzentrationen gegen die entsprechenden Erreger, wobei die hier bestimmten  $IC_{50}$ -Werte jeweils etwas höher liegen als am isolierten Enzym.

Wie die erläuterten Beispiele an Inhibitoren zeigen, gibt es bereits verschiedene potente Inhibitoren der beiden parasitären Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain. Einige Fragen zur Einsetzbarkeit dieser Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe sind bis heute noch offen, wie z.B. die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus zu inaktiven Spezies dieser Substanzen. Zu nennen wäre in diesem Zusammenhang auch die oftmals schlechte Korrelation zwischen den Hemmeigenschaften am isolierten Enzym im Vergleich zur Aktivität am Erreger der Krankheit. Die Toxizität der untersuchten Inhibitoren ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium. Die Selektivitätsindices müssen sehr groß sein, damit nur der Erreger

und nicht andere humane Zellen angegriffen werden. Somit ist auf diesem Feld die Erforschung neuer Verbindungsklassen als Cysteinproteaseinhibitoren in vielerlei Hinsicht interessant.

Um neue Inhibitoren zu finden und deren Optimierung zu erreichen, ist ein geeigneter Enzym-Assay für die entsprechende Target-Protease als Screeningmethode ein wichtiger Faktor. In diesem Assay steht die reproduzierbare Bestimmung der Hemmeigenschaften neuer Verbindungen im Vordergrund und es müssen Konstanten bestimmt werden, die sinnvolle Informationen über die Stärke des Inhibitors Auskunft geben. Die theoretischen Grundlagen solcher Enzym-Assays sollen im nächsten Kapitel behandelt werden. Diese reichen von der Enzymkinetik bis hin zur praktischen Durchführung der Enzym-Assays.

### 3.4 Klassische Methoden zur enzymkinetischen Bestimmung der Eigenschaften von Inhibitoren

Die Grundlage zur Beschreibung der Inhibitoreigenschaften erfordern Kenntnisse der Kinetik bei den verschiedenen Möglichkeiten der Enzymhemmung. Deshalb sollen im folgenden Kapitel zunächst die allgemeinen mathematischen Grundlagen der Enzymkinetik im Hinblick auf die Inhibierung und im anschließenden Abschnitt die daraus resultierenden Möglichkeiten zur Bestimmung des Inhibitorpotentials von Verbindungen mit unbekannter Aktivität behandelt werden.

#### 3.4.1 Grundlagen der Enzymkinetik

Bei einer nach dem *Michaelis-Menten*-Mechanismus ablaufenden enzymkatalysierten Reaktion wird ein Substrat S in ein Produkt P umgewandelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit selbst hängt hierbei von der Enzymkonzentration [E] ab.

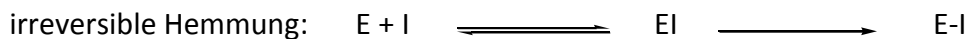
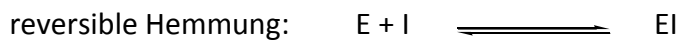


Die Michaeliskonstante  $K_M$  steht mit den vorkommenden Geschwindigkeitskonstanten in folgender Beziehung:

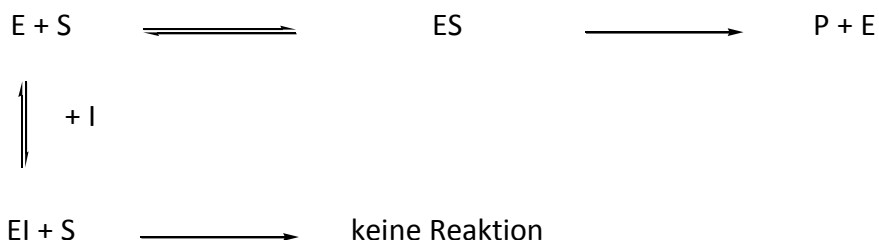
$$K_M = \frac{k'_a + k_b}{k_a}$$

Die Michaeliskonstante  $K_M$ , die eine Größe zur Beschreibung der Affinität eines Substrats zum Enzym darstellt, wird klassisch mit Hilfe experimentell erhaltener Daten bei bekannter Substratkonzentration in der *Lineweaver-Burk*-Auftragung bestimmt.<sup>[43]</sup> Je kleiner der Wert desto größer ist die Affinität des Substrats an das Enzym.

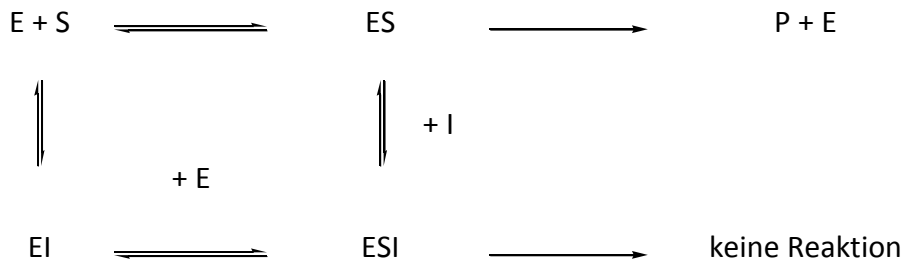
Zur Beschreibung der Enzymhemmung muss man zwischen zwei Fällen unterscheiden: der reversiblen und der irreversiblen Hemmung. Im ersten Fall bildet sich ein Enzym-Inhibitor-Komplex aus, der aufgrund der schwachen Bindung wieder in Enzym und Inhibitor zerfallen kann. Bei der irreversiblen Hemmung jedoch reagiert dieser Komplex in einem weiteren Schritt zu einem stark gebundenen Enzym-Inhibitor-Addukt. Dies kann für beide Fälle in folgenden Gleichungen beschrieben werden.



Außerdem wird noch zwischen der kompetitiven und der nichtkompetitiven Hemmung unterschieden. Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor I mit dem Substrat S um die gleiche Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms E, so dass die katalysierte Reaktion nicht mehr oder im geringeren Maß ablaufen kann und sich kein Produkt P mehr bilden kann. Dabei kann entweder das Substrat oder der Inhibitor einen Komplex mit dem Enzym eingehen (EI oder ES), niemals können aber beide gleichzeitig im aktiven Zentrum gebunden werden.



Bei der nichtkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an einer anderen Stelle als im aktiven Zentrum und führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, so dass dieses nicht mehr katalytisch aktiv ist. An diesen Enzym-Inhibitor-Addukt ESI ist jedoch eine Bindung vom Substrat weiterhin möglich.



Da in dieser Arbeit nur kompetitive Inhibitoren behandelt werden sollen, werden auch nur diese im Weiteren ausführlich behandelt.

Mit dieser grundlegenden Beschreibung der Enzymkinetik lassen sich Hemmeigenschaften von Inhibitoren in geeigneten Enzym-Assays bestimmen. Zunächst sollen die bekannten Enzym-Assays vorgestellt und anschließend auf die Bestimmung der charakteristischen Größen eingegangen werden.

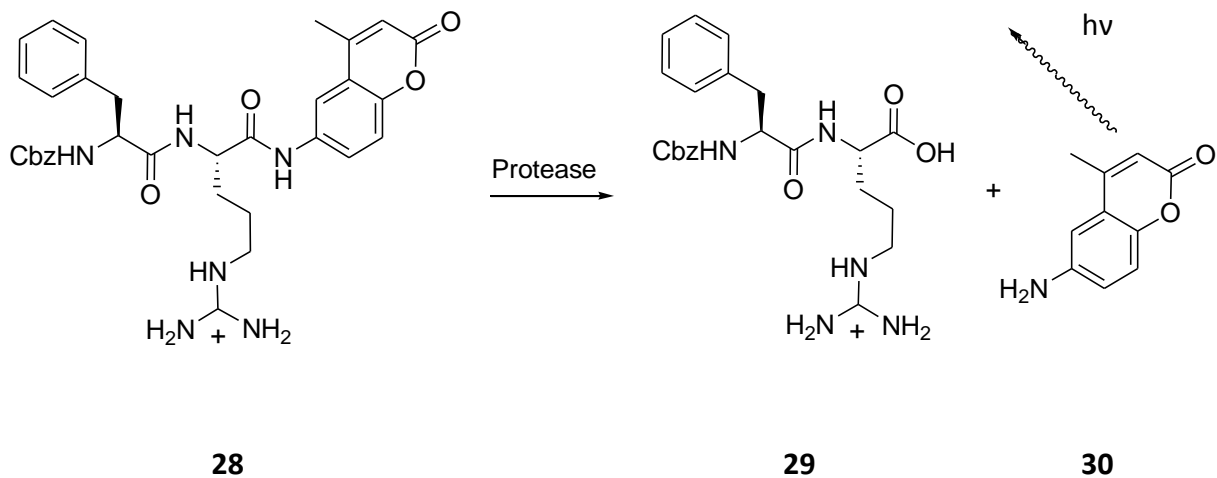
### 3.4.2 Enzym-Assays zur Bestimmung der Inhibitoreigenschaften

Prinzipiell gibt es bei irreversiblen Inhibitoren zwei verschiedene Ansätze, um Hemmeigenschaften zu untersuchen: den kontinuierlichen Assay nach *Tian* und *Tsou*<sup>[44]</sup> und den Verdünnungsassay nach *Kitz* und *Wilson*.<sup>[45]</sup> Beim kontinuierlichen Assay wird nach Zugabe von Enzym zu einer Mischung aus Substrat und Inhibitor die zeitliche Produktzunahme beobachtet. Beim Verdünnungs-Assay hingegen wird das Enzym mit einem Überschuss an Inhibitor inkubiert und anschließend nach der Substratzugabe die Restaktivität des Enzyms bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte in den meisten Fällen ein kontinuierlicher Assay verwendet werden. Die Grundlagen zur Durchführung solcher Enzym-Assays sollen im folgenden Teil vorgestellt werden.

Wie zuvor in Kapitel 3.1 erwähnt ist die Enzymaktivität der betreffenden Cysteinproteasen unter leicht sauren Bedingungen am größten. Für Falcipain-2 und Rhodesain muss der Assay also in einem gepufferten wässrigen Medium bei einem pH-Wert von 5.5 durchgeführt werden, um im pH-Optimum der Proteasen zu arbeiten. Außerdem müssen möglichst natürliche Bedingungen geschaffen werden. Deshalb ist ebenfalls Natriumchlorid in der Pufferlösung vorhanden. Andere Zusätze wie z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) müssen vorhanden sein, um eventuell anwesende Metallionen zu komplexieren, die die Aktivität der Cysteinproteasen negativ beeinflussen könnten. Dithiothreitol (DTT) wird zugesetzt, um eine reduzierende Umgebung zu schaffen, damit der Thiolrest im aktiven

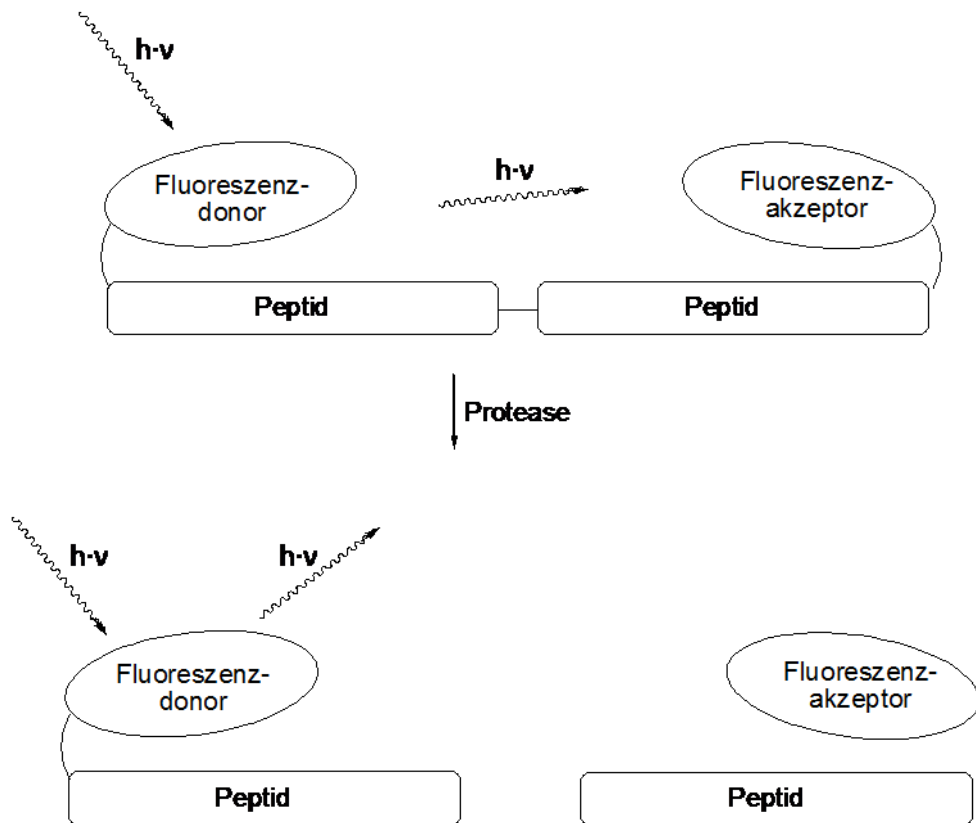


Zentrum nicht durch Oxidation Disulfidbindungen ausgebildet und somit katalytisch inaktiv wird. Als Substrat werden kleine Peptide eingesetzt, die an ein Chromophor gebunden sind und nach Spaltung durch die Protease fluoreszieren. Für Falcipain-2 und Rhodesain bietet sich als Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC (**28**) an, also ein Dipeptid aus Phenylalanin (Phe) und Arginin (Arg), das an 7-Amino-4-methylcumarin (**30**) gebunden ist. Das Substrat an sich zeigt keine bzw. nur sehr schwache Fluoreszenz; das bei der Enzymreaktion freigesetzte Aminomethylcumarin **30** fluoresziert jedoch bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm sehr stark mit einem Maximum bei 460 nm.



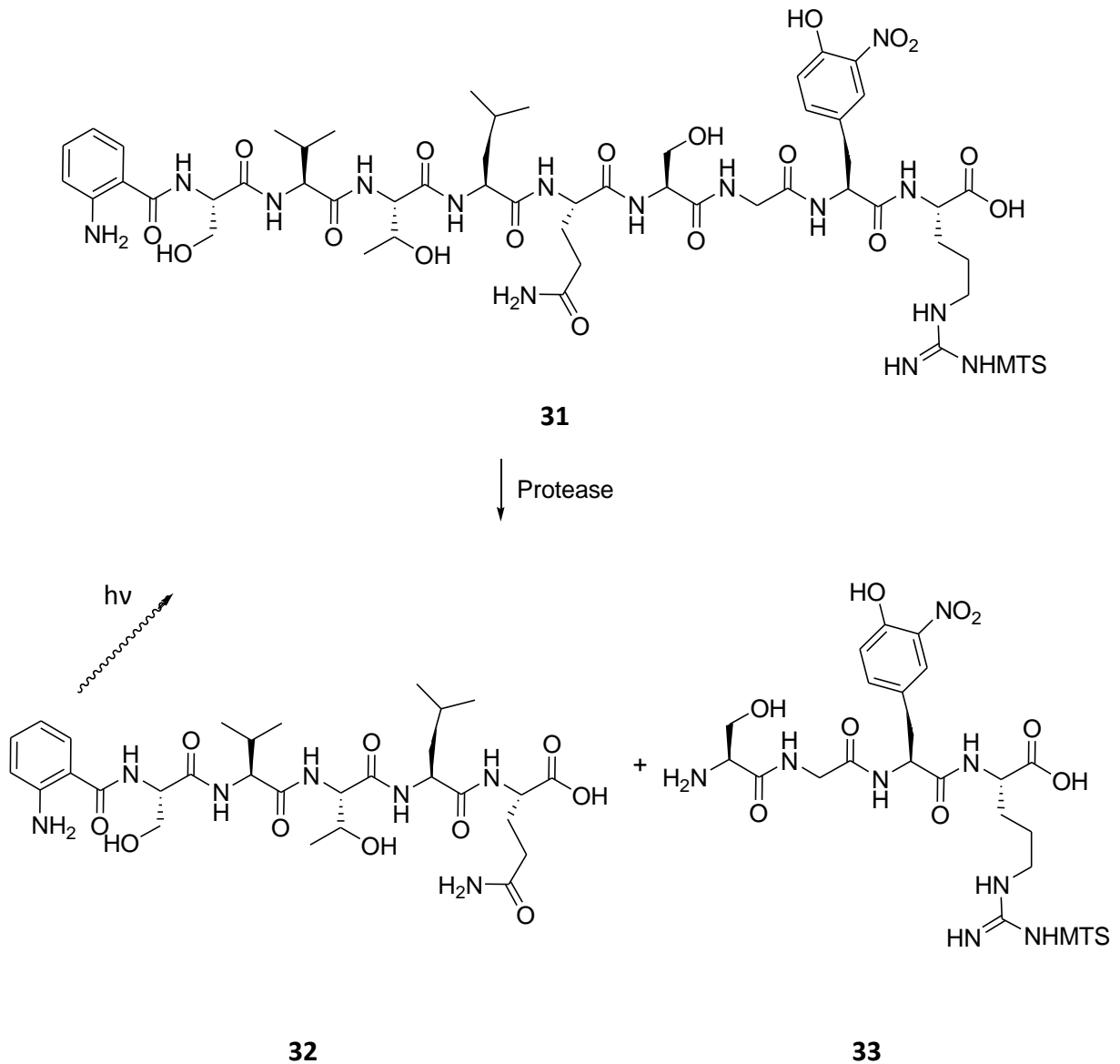
**Abb. 3.12** Spaltung des AMC-Substrats **28** und Bildung des fluoreszierenden Aminomethylcumarins **30**

Eine weitere Substratgruppe für solche Protease-Assays beruht auf FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). FRET ist ein Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei von einem Donor- zu einem Akzeptorfragment übertragen wird. Dieses Prinzip kann auf verschiedene Weise angewandt werden, z.B. klassisch zur Bestimmung von relativen Abständen<sup>[46]</sup> oder auch in spezielleren biologischen Anwendungen wie z.B. die selektive Markierung von bestimmten Nukleinsäuresequenzen<sup>[47,48]</sup> oder als Substrate für Proteasen. FRET-basierende Substrate sind Peptide, die am einen Ende einen Fluoreszenzdonor und am anderen Ende einen Fluoreszenzakzeptor besitzen.



**Abb. 3.13** Schematische Darstellung der Spaltung eines FRET-Substrats

Bei einer Lösung des intakten Substrats kann keine Fluoreszenz gemessen werden, da sie intramolekular gequencht wird. Wenn nun eine Protease das Peptid in zwei Fragmente schneidet, kann das Akzeptormolekül die ausgesendete Strahlung durch die größere räumliche Entfernung nicht mehr absorbieren, so dass eine Fluoreszenz sichtbar wird. In **Abb. 3.12** ist ein Beispiel für solch ein Substrat dargestellt, das von der SARS Hauptprotease gespalten wird und zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt wurde.<sup>[49]</sup>



**Abb. 3.14** Die hydrolytische Spaltung des FRET-Substrats **31**

Der Aminophenylrest von **31** entspricht dem Fluoreszenzdonor, dessen Emission vollständig durch die Nähe zum Nitrotyrosinrest gequencht wird. Aus diesem Grund ist in einer Lösung des Substrats keine Fluoreszenz messbar. Nach der Spaltung entfernen sich die beiden Peptidfragmente **32** und **33** so weit voneinander, dass keine Fluoreszenzlöschung mehr stattfindet. Nach Zugabe des Enzyms zu einer Lösung des Substrats **31** lässt sich also wie bei den Cumarin-basierenden Substraten eine Fluoreszenzzunahme beobachten, von der man Rückschlüsse auf die Enzymaktivität schließen kann.

Die Fluoreszenzänderung nach Zugabe des Substrats kann nun mit Hilfe eines Fluorimeters in zeitlichen Abständen aufgenommen werden. Bei Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit erhält man eine Geradengleichung. Wenn in der Lösung zusätzlich ein Inhibitor

vorhanden ist, verläuft diese Gerade bei sonst gleichen Bedingungen flacher und man kann die Geradensteigungen zueinander in Relation setzen und erhält Informationen über das Inhibitorvermögen. Das Verhältnis der Geradensteigungen bei Anwesenheit und ohne einen Inhibitor ergibt die Hemmung in % für die verwendete Inhibitorkonzentration. Die Hemmung in % kann demnach nach folgender Gleichung berechnet werden.

$$\text{Hemmung in \%} = 100 - \frac{\text{Geradensteigung (Inhibitor)}}{\text{Geradensteigung (DMSO)}} \cdot 100$$

Aus diesen Umsatz-Zeit-Diagrammen lassen sich also die prozentualen Hemmungen bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen bestimmen und anschließend die  $IC_{50}$ -Werte und die Dissoziationskonstanten ( $K_i$ ) für reversible Inhibitoren ermitteln. Die  $IC_{50}$ -Werte erhält man durch eine nichtlineare Kurvenanpassung der Daten der Enzymrestaktivität gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration. Dabei ermittelt man mit einem entsprechenden Programm (GraFit®) diejenige Konzentration an dem Punkt der angepassten Kurve, bei dem die Aktivität des Enzyms 50 % entspricht. Die  $K_i$ -Werte lassen sich ebenfalls mit Hilfe von GraFit®, den bekannten  $K_M$ -Werten des entsprechenden Substrat-Enzym-Paares und der Dixon-Gleichung<sup>[50]</sup> berechnen. In der linearisierten Form kann diese folgend formuliert werden:

$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + \frac{1}{K_i} [I]$$

Das Verhältnis  $v_0/v_i$  gibt die Enzymaktivität bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration  $[I]$  an, das wie oben beschrieben aus den Geradensteigungen ermittelt werden kann. Wenn man nun  $v_0/v_i$  gegen  $[I]$  aufträgt erhält man eine Gerade, aus deren Steigung  $K_i$  berechnet werden kann. Mit Hilfe von GraFit® kann auf eine lineare Auswertung verzichtet werden und eine Anpassung durchgeführt werden. Bei einer nichtkompetitiven Hemmung entspräche der  $IC_{50}$  gleich dem  $K_i$ -Wert. Da hier von einer kompetitiven und reversiblen Hemmung ausgegangen wird, besteht aufgrund der Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor eine Abhängigkeit von der verwendeten Substratkonzentration. Wie zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte nimmt man den Datensatz wie oben beschrieben und ermittelt durch eine nichtlineare Kurvenanpassung mit GraFit® analog zunächst die Konstante  $K_{iapp}$ . Die Konstante  $K_{iapp}$  entspricht dem apparenten  $K_i$ -Wert, bei dem die kompetitive Hemmung noch unberücksichtigt bleibt. Sie entspricht bei einer kompetitiven Hemmung genau dem  $IC_{50}$ -

Wert. Daher muss zusätzlich ein Korrekturfaktor eingeführt werden, bei dem die verwendete Substratkonzentration berücksichtigt ist. Diese Gleichung ist im Folgenden abgebildet und beschreibt den Zusammenhang zwischen  $K_M$  und der Dissoziationskonstante  $K_i$  in Abhängigkeit von der verwendeten Substratkonzentration  $[S]$ :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

Mit dieser Gleichung erhält man nun den wahren  $K_i$ -Wert aus dem mit GraFit® ermittelten  $IC_{50}$ -Wert,  $K_M$  und  $[S]$ . Die  $K_M$ -Werte für das Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC **28**, Falcipain-2 und Rhodesain sind bekannt und müssen somit nicht für diese Arbeit bestimmt werden. Prinzipiell lassen sie sich ebenfalls experimentell durch Aufnahme der Hydrolysekinetik bei verschiedenen Substratkonzentrationen berechnen.

Eine zusätzliche Herausforderung des kombinatorischen Ansatzes (siehe Kapitel 2.2) ist darüber hinaus die Entwicklung eines Enzym-Assays für harzgebundene Inhibitoren. Im nachstehenden Kapitel sollen nun die bisher bekannten Assays beschrieben werden, bei denen festphasengebundene Inhibitoren in Protein-Screenings getestet wurden.

### 3.5 Protein-Assays für harzgebundene Verbindungen

In der Literatur sind zahlreiche Screeningmethoden für kombinatorische Bibliotheken beschrieben, die über die Festphase synthetisiert wurden. Dabei muss man unterscheiden, ob das Screening nach Abspaltung vom Harz in Lösung oder direkt am Harz („on-bead“) durchgeführt wird. Als ein Beispiel für eine kombinatorische Inhibitorsuche durch die Festphasensynthese einer Bibliothek, die anschließend abgespalten wurde, sind die Arbeiten von *Ellman* zu nennen.<sup>[51,52]</sup> Hier wurde eine Bibliothek aus peptidischen Ketonen an der Festphase synthetisiert, um sie anschließend vom Harz abzuspalten und in Lösung als potentielle Cysteinproteaseinhibitoren zu untersuchen. Einen analogen Ansatz führte *Yao* mit Vinylsulfonen als Inhibitoren durch.<sup>[53]</sup> Bei der „on bead“-Methode wird das Screening am Harz durchgeführt. Der Einsatz von Proteinen in solchen Assays schränkt das Screening am Harz insofern ein, da hier die Wahl des Harzes für die kombinatorische Festphasensynthese der Bibliothek entscheidend ist. Tatsächlich sind nur vergleichsweise wenige solche „on-bead“-Assays veröffentlicht, in denen Proteine beteiligt sind. Man kann

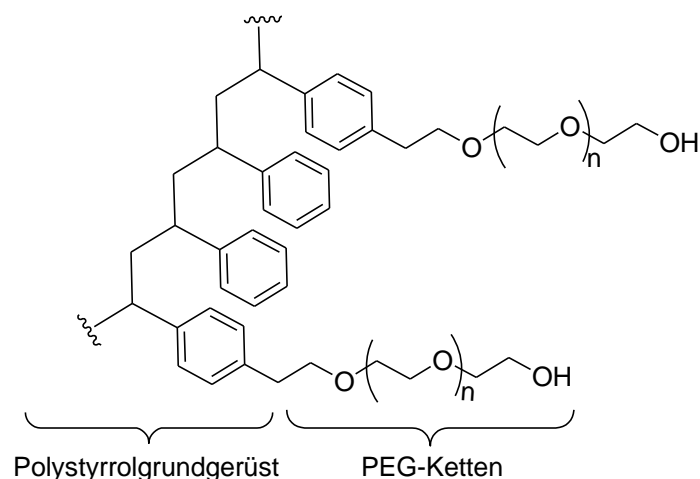
diese Assays in folgende drei Gruppen einteilen: Assays für lektinbindende, weitere proteinbindende Bibliotheken mit speziellen Anwendungen und Enzym-Assays für harzgebundene Bibliotheken.

In den folgenden Kapiteln sollen zunächst die verschiedenen Harze, die für solche Protein-Assays zur Verfügung stehen, beschrieben werden. Anschließend werden die drei Gruppen der bisher existierenden Protein-Assays anhand einiger Beispiele vorgestellt. Im Vordergrund sollen hierbei die jeweils verwendeten Methoden stehen.

### 3.5.1 Harze für Protein-Assays

Wenn man einen Assay für eine harzgebundene Bibliothek durchführen möchte, bei dem Proteine beteiligt sind, muss das Harz ein paar wichtige Kriterien erfüllen. Zuerst sind die Quelleigenschaften in polaren Lösungsmitteln entscheidend: da solche Assays im wässrigen Medium durchgeführt werden oder zumindest in Lösungsmittelgemischen mit Wasser als Hauptbestandteil, muss der polymere Träger sehr gute Quelleigenschaften in polaren Solventien besitzen. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, dass es keine unerwünschten Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Harz geben darf. Das heißt die Proteine dürfen nicht durch die Polymere gebunden werden bzw. nicht die Struktur des Proteins durch Wechselwirkungen beeinflusst oder verändert werden.

Die meisten Harze, die für die organische Festphasensynthese erhältlich sind, basieren auf Polystyrol (PS) und besitzen damit ein sehr unpolares Grundgerüst. Im Allgemeinen haben sie eher schlechte Quelleigenschaften in polaren Medien. Durch Einführung von verschiedenen Funktionalitäten oder Linkern, die aus polaren Gruppen bestehen, können die Quelleigenschaften der Polystyrolharze in polaren Solventien verändert werden. Das gängigste Beispiel für solche polaren Gruppen am polymeren Träger sind eingeführte Polyethylenglykol(PEG)-Ketten. So ist eine Reihe von Harzen kommerziell erhältlich, die auf Polystyrol basieren, jedoch zu etwa 70 % aus eingeführten PEG-Gruppen bestehen. Das prominenteste Beispiel für ein solches Harz zur Festphasensynthese stellt TentaGel dar (siehe **Abb. 3.15**).<sup>[54]</sup>



**Abb. 3.15** Der schematische Aufbau von TentaGel als polymerer Träger zur Festphasensynthese

TentaGel ist ein Harz, das sehr oft in der Synthese von kombinatorischen Bibliotheken Anwendung findet, die anschließend in polaren Medien getestet werden. Die Quelleigenschaften von TentaGel in einigen Lösungsmitteln im Vergleich zu einem gewöhnlichen PS-Harz sind in **Tab. 3.1** zusammengefasst. Die Zahlenwerte entsprechen dem jeweiligen Quellfaktor, um den sich die Harzkügelchen beim Quellen ausdehnen.

Lösungsmittel	PS-Harz	TentaGel
Wasser	-	2.5
Methanol	0.95	2.5
Ethanol	1.05	1.2
Dichlormethan	5.2	3.0
Dimethylformamid	3.5	3.2
Diethylether	2.5	1.1

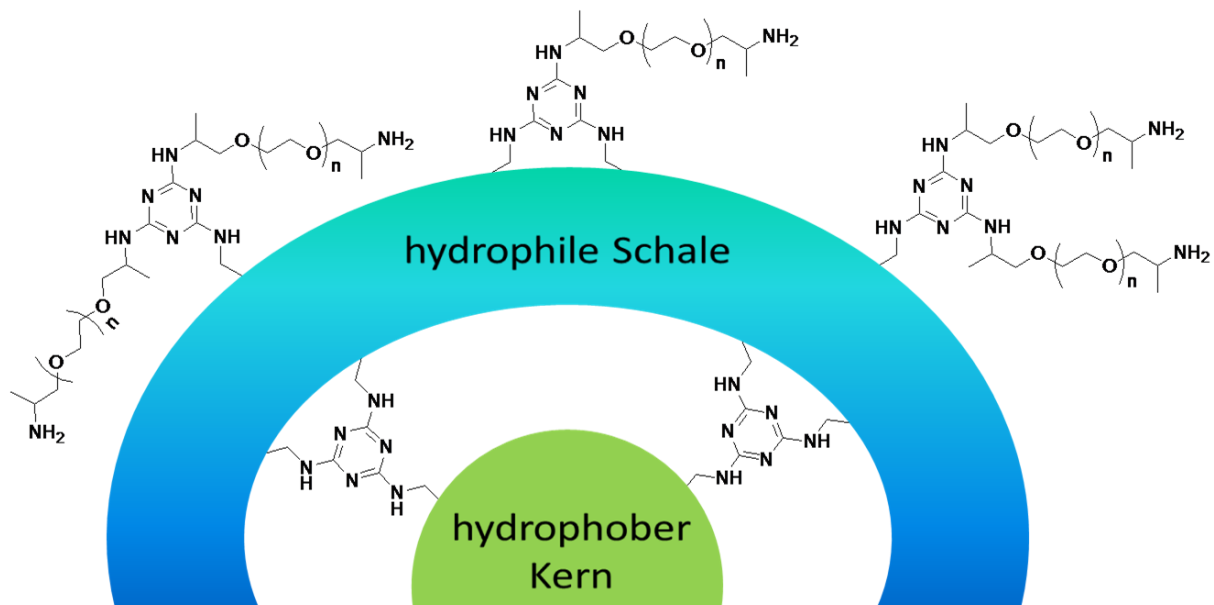
**Tab. 3.1** Quelleigenschaften eines PS-Harzes im Vergleich zu TentaGel

TentaGel besitzt also gute Quelleigenschaften in Wasser und Methanol mit Faktoren von 2.5. Für Dichlormethan und DMF erhält man einen sogar noch besseren Wert mit 3.0 bzw. 3.2, was ebenfalls entscheidend für die Festphasensynthese ist, da die Kupplungsreaktionen zur Darstellung von Peptiden oft in diesen beiden Lösungsmitteln durchgeführt werden.<sup>[54]</sup>

Auch das zweite Kriterium ist bei dieser Gruppe der Harze weitestgehend erfüllt: die unerwünschten unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Protein und dem polymeren

Träger werden durch die Abschirmung des Polystyrolgrundgerüsts durch die PEG-Ketten minimiert.

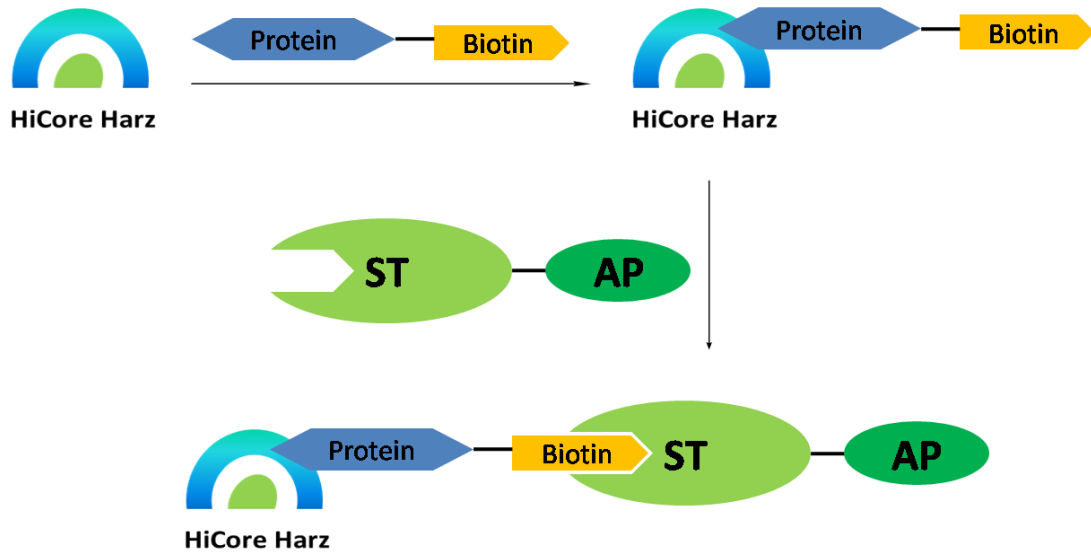
Genau diese Protein-Harz-Wechselwirkungen von einem Polystyrol-basierendem Harz, von TentaGel und von einem neuartigen sogenannten HiCore-Harz wurden von *Lee* und *Park* mittels eines entwickelten Farb-Assays miteinander verglichen.<sup>[55]</sup> Dabei wurden jeweils aminfunktionalisierte Harze untersucht. Bei dem HiCore-Harz handelt es sich um ein synthetisch modifiziertes PS-Harz, das eine über Triazinlinker hochverzweigte und feste Kernregion bildet. In der Schalenregion befinden sich PEG-Ketten und sämtliche Aminfunktionen (siehe **Abb. 3.16**).



**Abb. 3.16** Schematische Darstellung des HiCore-Harzes<sup>[55]</sup>

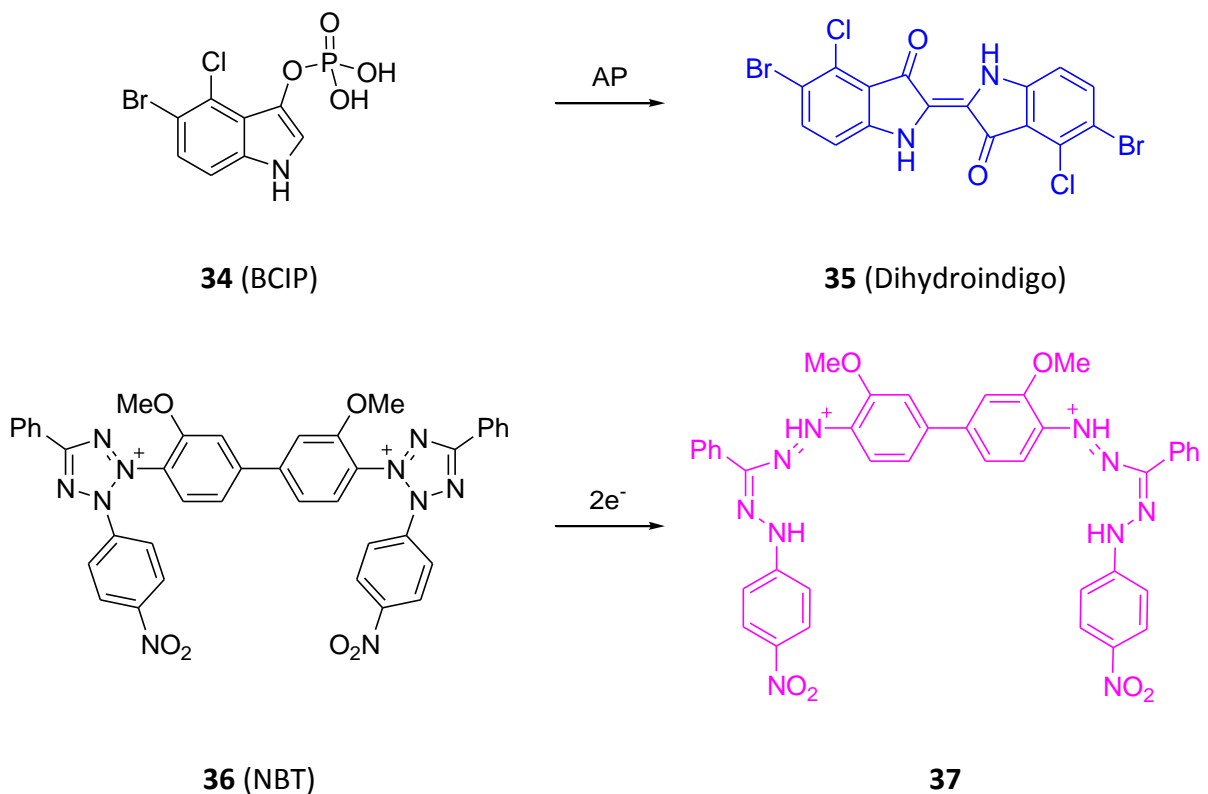
Durch die Aufnahme eines Bildes mittels Elektronenmikroskop der Fluoreszenz-gelabelten Aminfunktionen der Harze konnte belegt werden, dass die Aminfunktionen ausschließlich in der Schalenregion vorkommen. Bei dem entwickelten Assay wurde ein mit einem Biotinrest versehenes Protein mit den drei Harzen inkubiert und anschließend mit einer alkalischen Phosphatase (AP) versetzt, die mit einem Streptavidinrest (ST) modifiziert ist (siehe **Abb. 3.17**). Bei Wechselwirkungen zwischen dem Harz und dem Protein wird auf diese Weise über die Biotin-Streptavidin-Bindung die alkalische Phosphatase an das Harz gebunden. Die Aktivität des Enzyms kann anschließend zur katalytischen Bildung eines Farbstoffs genutzt werden.





**Abb. 3.17** HiCore-Harz-Assay zur Bestimmung der unspezifischen Protein-Harz-Wechselwirkungen

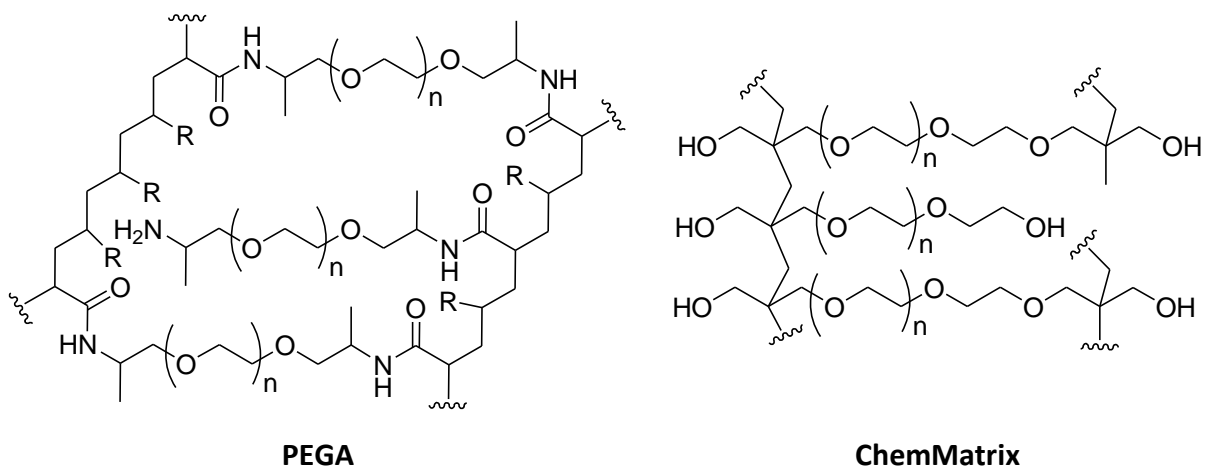
Nach Zugabe des Bromchlorindolylphosphats **34** (BCIP) und des Nitroblau-Tetrazoliumsals **36** (NBT) wird durch die Phosphatase die Bildung von Dihydroindigo (**35**) und des violetten Farbstoffs **37** katalysiert, so dass diejenigen Harzkügelchen eine Färbung aufweisen, an denen das Protein gebunden ist. Die Reaktion zum Farbstoff ist in **Abb. 3.18** dargestellt.



**Abb. 3.18** Reaktion von BCIP und NBT zu den Farbstoffen **35** und **37**

Das Ergebnis dieses Farbttests zeigte, dass sich beim PS-Harz die größte Menge an Protein gebunden hatte, beim HiCore-Harz wurde jedoch keine Farbstoffbildung beobachtet. Das Entscheidende hier ist, dass sich das TentaGel leicht verfärbt hatte, was dafür sprach, dass zumindest schwache Wechselwirkungen mit dem Protein stattfanden. Dieser Farbttest wurde außerdem noch dazu genutzt, quantitativ mehrere am Harz gebundene Proteine zu bestimmen. Durch Aufnahme von UV-Spektren der überstehenden Lösungen nach Inkubierung konnte auf die Menge an unreaktiertem NBT geschlossen werden. So konnte für sechs verschiedene Biotin-modifizierte Proteine gezeigt werden, dass die unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Harz für TentaGel größer als für das HiCore-Harz waren.<sup>[55]</sup>

Des Weiteren gibt es noch Harze, die nicht auf Polystyrol sondern komplett auf PEG-Einheiten basieren. Diese Harze wurden zu Beginn der 90er Jahre von *Meldal* entwickelt – ursprünglich zur Festphasensynthese von Glycopeptiden und Peptiden. Diese Harze quellen hervorragend in DMF, was zur Peptidsynthese sehr wichtig ist, in Wasser sind die Quelleigenschaften ebenfalls sehr gut. Die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und den Harzen sollten ebenfalls sehr gering bis gar nicht vorhanden sein. In **Abb. 3.19** sind zwei Beispiele für diese Art von Harzen zu finden. Wie zu erkennen ist, besitzen sie alle als Hauptbestandteil PEG-Ketten und unterscheiden sich nur in ihren Funktionalitäten und dem Linker.



**Abb. 3.19** Beispiele für Harze auf Polyethylenglykol-Basis

PEGA-Harz ist der prominenteste Vertreter der PEG-basierenden Harze, der in zahlreichen Publikationen als das Harz der Wahl für Protein-Assays auftaucht. Insgesamt besitzen diese Harze eine geringere mechanische Stabilität als vergleichbare Harze auf PS-Basis.<sup>[56-59]</sup> Das

ChemMatrix-Harz ist ein Beispiel für eine Reihe später entwickelte Harze, das eine bessere physikalische sowie chemische Stabilität aufweist und eine höhere Beladung als die klassischen PEGA-Harze besitzt. In den letzten Jahren ist die Anzahl der neuen PEG-basierenden Harze auf dem Markt rasant angestiegen.

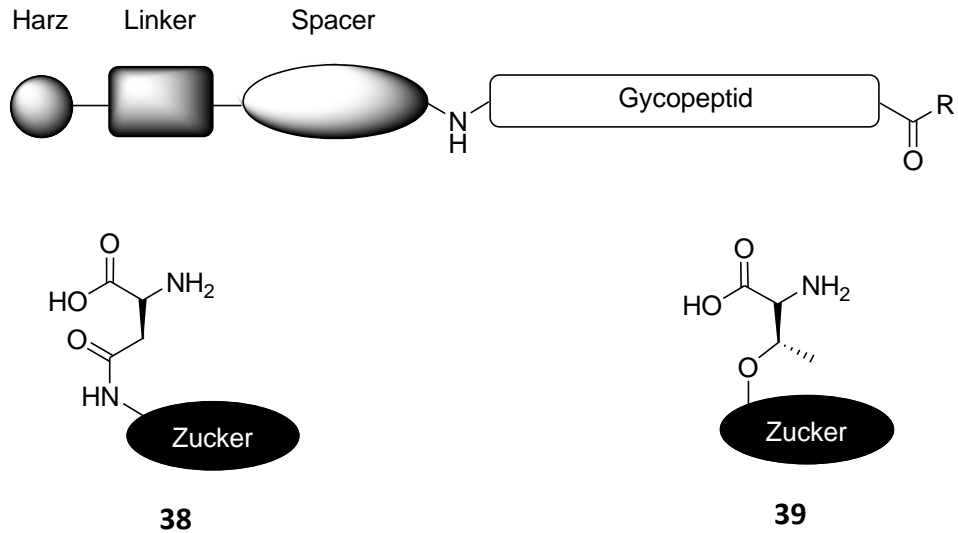
Außer dem PEGA-Harz wurden bis heute weitere PEG-basierenden Harzen entwickelt. Beispiele hierfür wären das SPOCC-, das POEPOP- und das POEPS-3-Harz, die jeweils geringfügige Unterschiede im Polymergrundgerüst aufweisen.<sup>[60]</sup> Hierbei konnten verbesserte Eigenschaften gefunden werden: eine höhere Beladung und verbesserte Quelleigenschaften bei einigen Lösungsmitteln.

Alles in allem sind die PEG-basierenden Harze am besten geeignet für Protein-Assays und besitzen vor allem aufgrund der Quelleigenschaften Vorteile gegenüber den PEG-modifizierten PS-Harzen. Große Biomoleküle wie Proteine gehen keine unerwünschten Wechselwirkungen mit dem polymeren Träger ein, bzw. es liegt bis heute kein Beleg für diese Effekte vor. In den folgenden drei Kapiteln finden sich Anwendungen der diskutierten Harze in verschiedenen Protein-Assays.

### 3.5.2 Lektin-Assays an harzgebundenen kombinatorischen Bibliotheken

Schon seit Beginn der 90er Jahre wurden kombinatorische Bibliotheken von lektinbindenden Verbindungen an PEGA-Harz synthetisiert, um potente Lektinkomplexierer zu finden. Dabei handelte es sich um festphasengebundene Glycopeptide, also peptidische Strukturen, die in den Seitenketten der Aminosäuren Zuckermoleküle besitzen. Lektine sind Proteine, die Kohlenhydrate binden können, die sich in Zellmembranen befinden. Wichtige biochemische Reaktionen werden dadurch ausgelöst, so dass die Zuckererkennung für zahlreiche Prozesse von Bedeutung ist, wie z.B. bei der Immunreaktion, interzelluläre Erkennung, Zelladhäsion, Regulierung des Zellwachstums, Metastasenbildung bei Krebszellen und bei Entzündungen.<sup>[61]</sup>

Kombinatorische Bibliotheken von Lektinkomplexierern wurden ausführlich von *Meldal*<sup>[62,63]</sup> und auch von *Lam*<sup>[64]</sup> beschrieben und mit Hilfe von Protein-Assays untersucht. Das Design einer solchen kombinatorischen Glycopeptidbibliothek von *Meldal* ist in **Abb. 3.20** dargestellt.



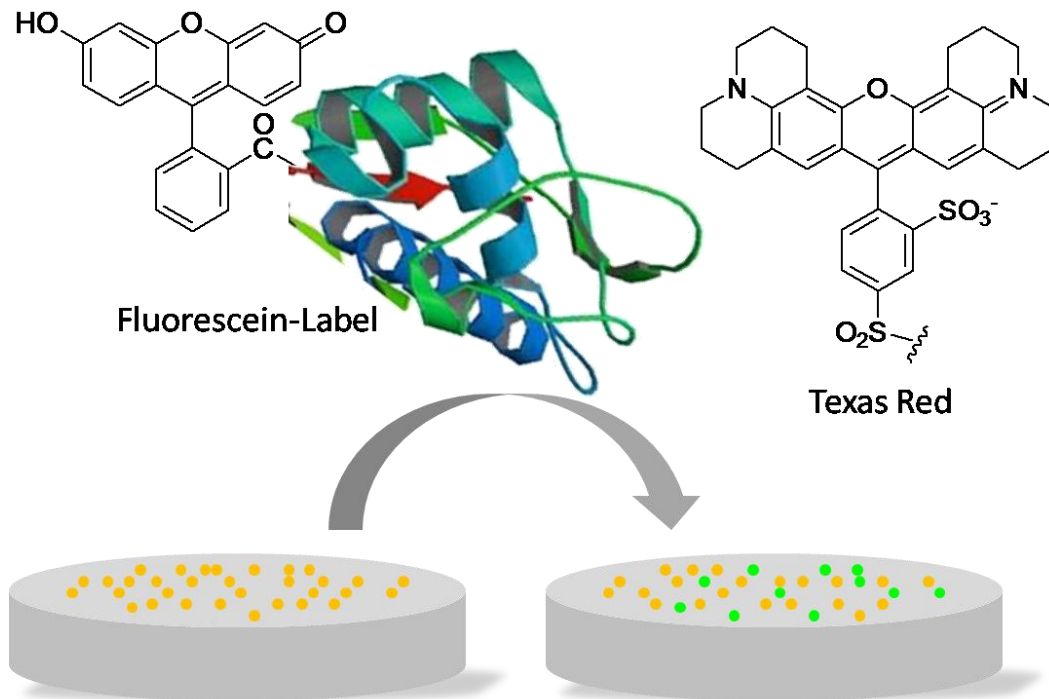
**Abb. 3.20** Glycopeptidbibliothek zur Identifizierung von lektinbindenden Substanzen

Als polymerer Träger wurde PEGA-Harz verwendet, das mit einem photolabilen Linker versehen ist. An diesen Linker schließen sich zunächst ein Spacer zur Detektion per Massenspektrometrie und dann das eigentliche Glycopeptid an. Das lektinbindende Peptid besteht aus verschiedenen natürlichen Aminosäuren und welchen, die in den Resten glycolisiert sind. Als Zucker wurden in dieser Bibliothek Mannose und Glucose verwendet, die über Threonin (Thr) verestert (**39**) oder als aminfunktionalisierte Glucose an Asparaginsäure gekuppelt (**38**) waren. Während der Festphasensynthese lagen die Kohlenhydrate in der komplett über Acetylgruppen bzw. Benzylester geschützten Form vor, erst vor dem Screening wurde die Bibliothek entschützt. Als Rest R wurden aufgrund der später erfolgenden massenspektrometrischen Analyse der Hits verschiedene Carbonsäuren an das Peptid gekuppelt. So richtete sich die Wahl der Carbonsäure zur besseren Unterscheidung nach der letzten Aminosäure des Peptids. Die eingeführten drei Carbonsäuren besaßen unterschiedliche Größen und Massen und erleichterten somit die Analyse.<sup>[65]</sup>

Diese aus 300000 Verbindungen bestehende Bibliothek wurde nun für 30 min mit dem Fluoreszenz-gelabelten Lektin aus *Lathyrus odoratus* (Duftende Platterbse) inkubiert. Es konnten etwa 80 Hits gefunden werden. Die Analyse erfolgte durch MALDI-TOF-Experimente und es konnten die Sequenzen der Hits bestimmt werden. Diese Glycopeptide wurden synthetisiert, und die Erkennung des Lektins konnte in einem weiteren Screening bestätigt werden.



medizinischen Anwendung durch gezielte Hemmung bestimmter Proteine durch die Komplexbildung.<sup>[68]</sup> Die selektive Identifizierung eines Proteins aus sehr verdünnten Proteingemischen durch kleine Moleküle stand hierbei im Vordergrund.<sup>[67]</sup> In diesen Arbeiten von *Kodadek* wurden kombinatorische Peptidbibliotheken an TentaGel synthetisiert und anschließend mit Fluorescein- bzw. Texas Red-markierten Proteinen für eine bis mehrere Stunden inkubiert.



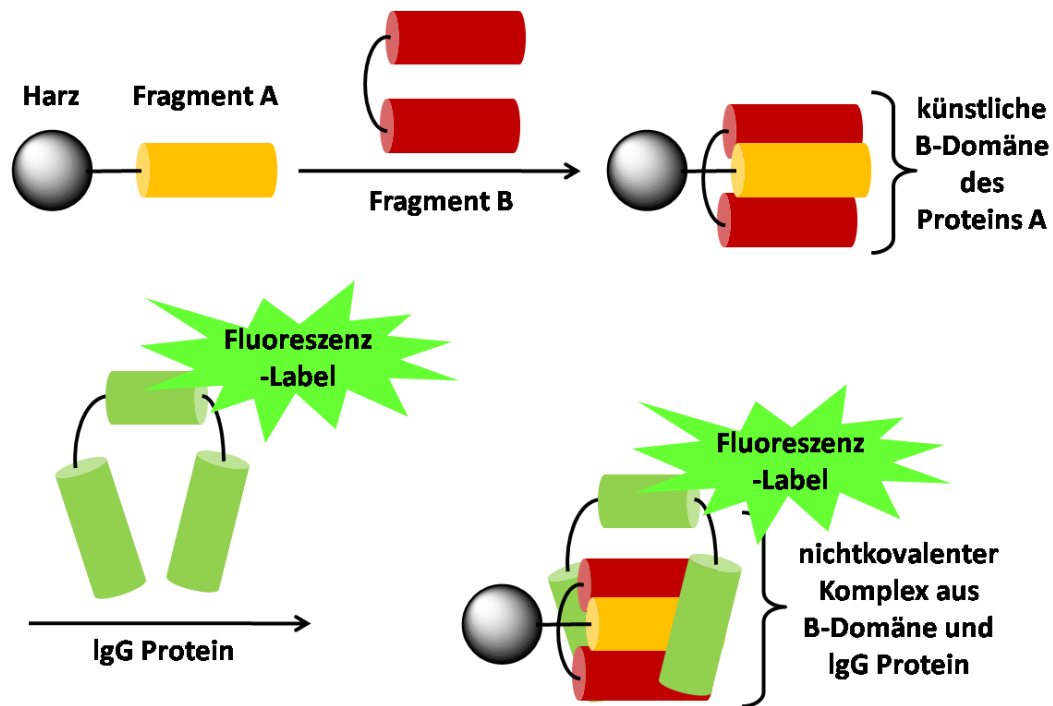
**Abb. 3.22** Schema zur Inkubierung einer harzgebundenen Bibliothek mit markierten Proteinen

Hierbei konnten die Hits detektiert und anschließend die Sequenzen durch einen automatisierten Edman-Abbau erhalten werden. Bei der Identifizierung der Hits bereitete die starke Eigenfluoreszenz des TentaGels Probleme, vor allem im grünen Bereich des Spektrums bei ca. 550 nm. Es wurde kein PEG-basierendes Harz verwendet aufgrund der mechanischen Instabilität, so bleibt es offen, ob diese Probleme mit einer anderen Harzwahl hätten beseitigt werden können. Untersucht wurden sehr große Bibliotheken mit einer Anzahl von bis zu über einer halben Millionen Mitgliedern. Mit dieser entwickelten Methodik konnten Peptide mit hoher Affinität zum Mdm-2 Protein gefunden werden.<sup>[66-68]</sup>

*Albericio* und *Cascone* entwickelten eine neue Methode zur Identifizierung von selektiven Proteinkomplexierern mit Hilfe einer Peptidbibliothek aus 6561 Mitgliedern, die mit Streptavidin als Modellprotein getestet wurde.<sup>[69]</sup> Streptavidin wurde gewählt, da hier die

Bindungseigenschaften zu Peptiden detailliert veröffentlicht sind, und somit die Methode an sich überprüft werden kann. Als Harz wurde ChemMatrix-Harz eingesetzt, also ein PEG-basierendes Harz. Die Hits färbten sich nach Inkubierung violett und konnten durch MALDI-TOF-Experimente identifiziert werden. Die bisher bekannte Bevorzugung von bestimmten Sequenzen durch das Streptavidin konnte hierbei bestätigt werden, so dass diese Methode auch auf andere Proteine anwendbar ist und damit auch neue Peptide zur Komplexierung von Proteinen gefunden werden können. Weitere Vorteile dieser Methode sind der geringe Zeitaufwand und die niedrigen Kosten.

*Giralt* beschreibt eine weitere Anwendung der Kombination aus Kombinatorik und Protein-Assays, in der ein alternatives Design von Proteindomänen erreicht werden konnte.<sup>[70]</sup> In diesem Ansatz wurde eine schnelle Methode der chemischen Modifizierung von natürlichen Proteinen untersucht, um die zeitaufwändige Totalsynthese von großen Proteindomänen zu vermeiden. Es wurde eine kleine kombinatorische Bibliothek aus 300 Peptiden bestehend aus jeweils 22 Aminosäuren an PEGA-Harz synthetisiert. An vier Positionen dieser Sequenz wurde variiert, es handelt sich also um eine gezielt für dieses Problem gestaltete Bibliothek. Diese 22 Aminosäuren sollten einen Teil der B-Domäne des natürlichen Proteins A aus Staphylokokken ersetzen (Fragment A), und bilden im Idealfall eine  $\alpha$ -Helix, die von zwei  $\alpha$ -Helices der restlichen 39 Aminosäuren der Domäne komplexiert wird (Fragment B). Aufgrund der Größe dieser Domäne mit 61 Aminosäurebausteinen und der Tatsache, dass die Bindung zwischen den drei Helices sehr stark ist, kann der kombinatorische Ansatz angewendet werden. Das N-terminale Fragment dieser Domäne wurde für das Screening synthetisiert, so dass die besten Sequenzen des C-terminalen Fragments im Protein-Assay identifiziert werden konnten (siehe **Abb. 3.23**).



**Abb. 3.23** Protein-Assay zur Bestimmung der besten Sequenzen für einen Teil einer Proteindomäne

Die harzgebundene Bibliothek wurde mit dem Fragment B inkubiert, so dass sich gegebenenfalls der nichtkovalente Komplex zwischen den Fragmenten A und B ausbilden konnte, der der kompletten B-Domäne entspricht. Anschließend wurde das Fluoreszenzmarkierte IgG-Protein dazugegeben, das sich selektiv nichtkovalent an die künstliche B-Domäne bindet. Damit fluoreszierten die Harzkügelchen mit den Hits, und sie konnten identifiziert und über MALDI-TOF-Analyse entschlüsselt werden. Unter diesen Sequenzen befand sich auch die natürliche Sequenz, die dem Gemisch als Positivkontrolle der Methode zugefügt wurde. Zwei dieser Sequenzen wurden nun für die Synthese der kompletten B-Domäne verwendet und mit der natürlichen B-Domäne in verschiedenen Untersuchungen verglichen. Unter anderem deutete CD-Spektroskopie darauf hin, dass die beiden künstlichen Varianten der B-Domäne eine ähnliche Struktur aufweisen wie die natürliche Variante. Es konnten also zwei chemische Modifizierungen eines bekannten Proteins synthetisiert werden.

Die kombinatorische Methode in Kombination mit einem Protein-Assay ist also anwendbar zum Auffinden von Proteinfragmenten, die eine ähnliche Struktur wie die entsprechende natürliche Sequenz besitzen. Protein-bindende Bibliotheken und entsprechende Assays lassen sich also auf eine Vielzahl an potentiellen Anwendungen nutzen.

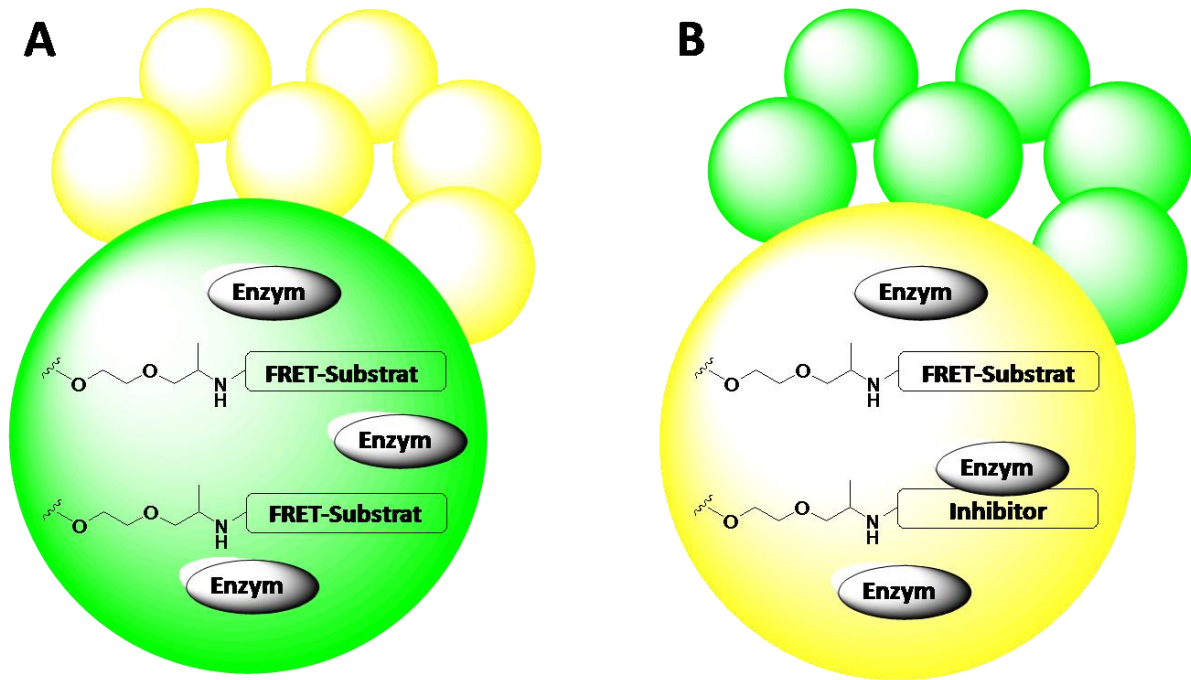


Bisher wurden lediglich Assays präsentiert, die auf die Komplexierung von harzgebundenen Verbindungen durch Proteine beruhen. Nun sollen biochemische Reaktionen behandelt werden, bei denen harzgebundene Substanzen involviert sind. Diese Enzym-Assays sind im nächsten Kapitel vorgestellt.

#### 3.5.4 Enzym-Assays an harzgebundenen kombinatorischen Bibliotheken

Unter den publizierten Protein-Assays gehören diese, bei denen Enzyme beteiligt sind, zu der am meisten durchgeführten und am ausführlichsten untersuchtesten Gruppe. Als Enzyme fanden hauptsächlich Proteasen, aber auch einige andere Enzyme Einsatz. So gibt es Assays für Vertreter aus allen Proteaseklassen, den Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen, und für andere Enzyme wie z.B. die Trypanothion Reduktase<sup>[71]</sup>, die Aldose Reduktase<sup>[72]</sup>, die Serin Racemase<sup>[73]</sup>, die Protein Disulfidisomerase<sup>[74]</sup> und die Brk Protein Tyrosinkinase<sup>[75]</sup>.

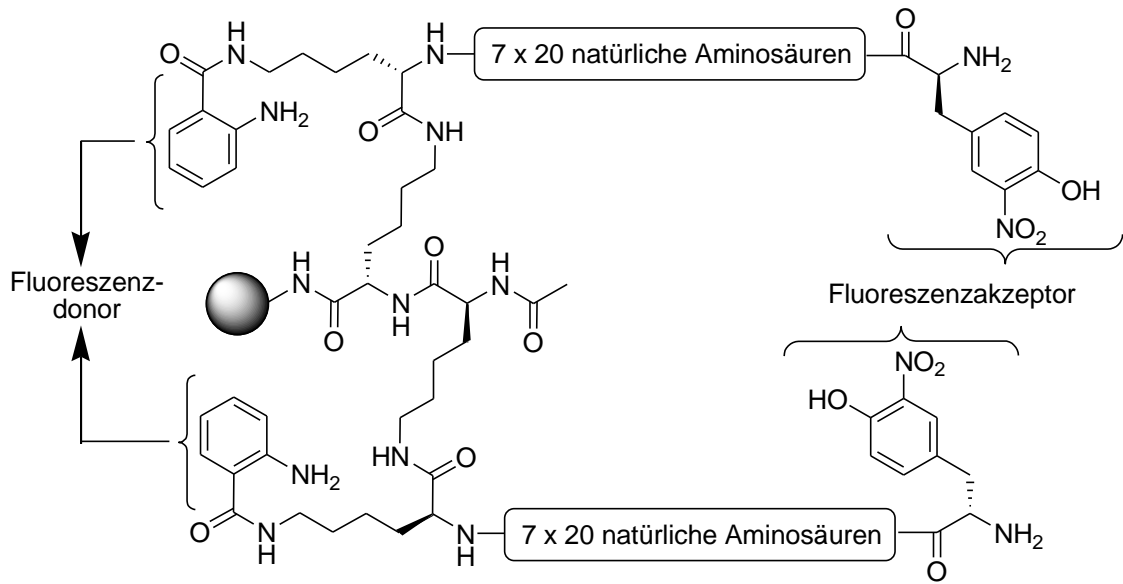
Bei den entwickelten Assays für Enzyme wurde hauptsächlich von *Meldal* Pionierarbeit geleistet. Man kann zwei Assay-Typen unterscheiden: zum einen kann die Substratspezifität des Enzyms und zum anderen Enzyminhibitoren untersucht werden.<sup>[76]</sup> Beim ersten Assay-Typ handelt es sich um eine festphasengebundene Substratbibliothek, die mit dem entsprechenden Enzym inkubiert wird. Nun können durch verschiedene Arten der Visualisierung die besten Substrate detektiert und untersucht werden. Bei dieser Art der Bibliothek handelt es sich um eine sogenannte „one bead one compound“-Bibliothek, das heißt, es befindet sich auf einem Harzkügelchen nur eine Verbindung. Beim zweiten Assay-Typ handelt es sich im Gegensatz dazu um eine „one bead two compounds“-Bibliothek, bei der neben einem guten Substrat für das Enzym eine Bibliothek an potentiellen Inhibitoren gebunden ist. Bei dieser Screeningmethode können somit gute von schlechten Inhibitoren unterschieden werden, da das Enzym das Substrat nicht umsetzen kann, wenn ein guter Inhibitor in der unmittelbaren Umgebung vorliegt. In **Abb. 3.24** sind diese beiden Assay-Typen schematisch gegenüber gestellt.



**Abb. 3.24** A: Assay zur Substratspezifität von Proteasen, B: Assay zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren, grün: fluoreszierendes Harzkügelchen, gelb: nicht leuchtendes Harzkügelchen

Im Allgemeinen wurden Substrate verwendet, die auf FRET beruhen, wie schon im Kapitel 3.4.2 beschrieben. Für die FRET-basierenden Enzym-Assays bedeutet dies, dass der Fluoreszenzdonor auf der zum Harz zugewandten Seite und der Akzeptor am anderen Ende sitzen müssen, so dass die Harzkügelchen bei gespaltenem Substrat zu fluoreszieren beginnen. Für Substratbibliotheken entsprechen die fluoreszierenden Kügelchen den Hits (grün), bei den Inhibitorbibliotheken dagegen die dunkel bleibenden Kügelchen (gelb), da das Enzym das Substrat nur in Abwesenheit eines guten Inhibitors spalten kann.

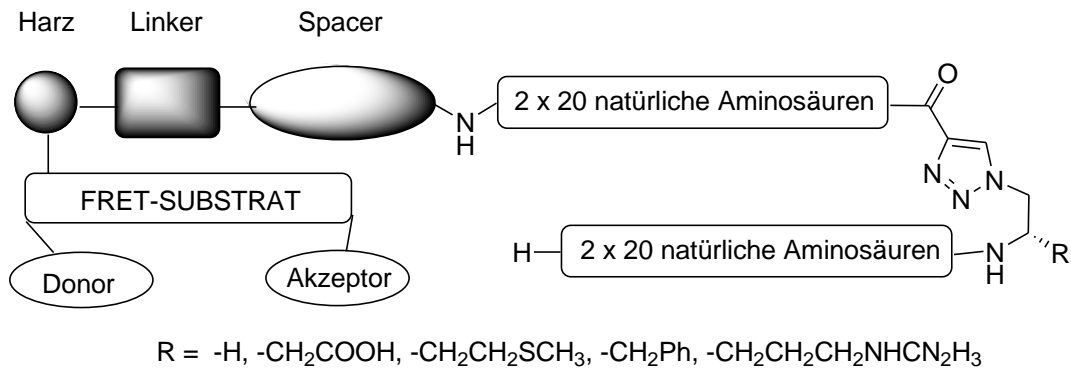
Im folgenden Abschnitt sollen beide Assay-Typen anhand je eines ausgewählten Beispiels näher erläutert werden. Zunächst soll ein Beispiel für eine Substratbibliothek vorgestellt werden, die auf FRET beruht. In der in **Abb. 3.25** dargestellten kombinatorischen Bibliothek an FRET-Substraten wurde die Spezifität der Cysteinprotease CPB2.8 des Erregers *Leishmania mexicana* untersucht.<sup>[77]</sup>



**Abb. 3.25** Kombinatorische Bibliothek zur Substratspezifität der Cysteinprotease aus *Leishmania mexicana*

An PEGA-Harz wurde zunächst ein Lysin-Dipeptid synthetisiert, um eine Verdoppelung der Beladung des Harzes zu erreichen. An den beiden Aminfunktionen der Seitenketten wurde jeweils Lysin mit einem Aminobenzoylrest als Fluoreszenzdonor in der Seitenkette eingeführt. Nun folgt ein Peptid, das an allen sieben Positionen mit allen 20 natürlichen Aminosäuren durchvariiert wurde, so dass sich eine theoretische Gesamtanzahl von 1.28 Milliarden Mitgliedern ergab. Am Ende des Peptids wurde ein Nitrotyrosinbaustein eingeführt, um die Fluoreszenzlöschung zu gewährleisten. Nach Synthese der Bibliothek wurde sie mit der Cysteinprotease inkubiert und anschließend die stark fluoreszierenden Harzkügelchen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops manuell aussortiert und die Sequenzen per Edman-Abbau untersucht. Dabei ergaben sich eine Reihe an guten Substraten mit  $K_M$ -Werten im nanomolaren Bereich und viele Informationen über die Substratspezifität der Protease.

Zur Inhibitorsuche für diese Cysteinprotease konnte dieses Prinzip erweitert werden. *Meldal* untersuchte bisher drei verschiedene Inhibortypen an dieser Protease: eine peptidische Inhibitorbibliothek mit einem Diels-Alder-Addukt<sup>[78]</sup>, eine mit einem reduzierten Aminosäurebaustein als zentrales Element<sup>[79]</sup> und eine mit einem Triazolgrundgerüst<sup>[80]</sup>. Das Design der kombinatorischen Peptidotriazol-Bibliothek ist in **Abb. 3.26** dargestellt.



**Abb. 3.26** Kombinatorische Peptidotriazolbibliothek zur Identifizierung neuer Cysteinproteaseinhibitoren

An PEGA-Harz sind gleichzeitig die Inhibitorbibliothek und ein gutes FRET-Substrat gebunden. Zwischen dem eigentlichen Inhibitor und dem Harz befinden sich ein photospaltbarer Linker und ein Spacer zur Detektion per MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Der Inhibitor an sich besteht aus zwei Peptidsequenzen, an denen alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren durchvariiert wurden, und einem zentralen Triazolbaustein, in dessen Nachbarschaft sich fünf mögliche modifizierte Aminosäuren (Glycin, Methionin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Arginin) befinden. Aus den insgesamt fünf Positionen, an denen die Aminosäuren variiert wurden, ergaben sich 800000 theoretisch mögliche Inhibitoren. Die Bibliothek wurde dann mit der Cysteinprotease inkubiert, die nach 24 Stunden dunkel gebliebenen Harzkügelchen aussortiert und per MALDI-TOF analysiert. Die gefundenen Inhibitoren besitzen  $K_i$ -Werte im nanomolaren Bereich.

Bei beiden Methoden können wie gezeigt Substrate mit hohen  $K_M$ -Werten bzw. sehr potente Inhibitoren für Proteasen entdeckt werden. Diese etablierten Assays konnten bis heute schon bei vielen weiteren Proteasen angewendet werden, gerade bei neuentdeckten Proteasen bildet dies eine neue Möglichkeit, schnell die Substratspezifität und gegebenenfalls neue Inhibitoren zu finden. Neben der oben erwähnten Cysteinprotease wurden mit diesen Assays oder in ähnlichen Ansätzen die Substratspezifitäten der folgenden Proteasen untersucht: Metalloprotease MMP-9<sup>[58]</sup>, Papain<sup>[81]</sup>, Denguefieberprotease NS2B-NS3 und Cathepsin S<sup>[82]</sup>, Napsin A<sup>[83]</sup> und Chymotrypsin<sup>[84]</sup>. Es gibt auch einige speziellere Assays zur Bestimmung der Substratspezifität, die nicht auf FRET beruhen, sondern auf eigens entwickelte Methoden zurückgreifen. Für Thermolysin gibt es z.B. eine beschriebene Methode, bei der die katalysierte Peptidkupplung durch die Protease und somit deren Substrataffinität in einem Festphasen-Assay untersucht wurde.<sup>[85]</sup> In einem anderen Ansatz

wurde eine Bibliothek aus Oktapeptiden, deren N-Terminus geschützt ist, mit verschiedenen Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin und Pepsin) inkubiert. Die entstandenen freien harzgebundenen Aminfunktionen konnten anschließend visualisiert werden.<sup>[86]</sup> Für Inhibitorbibliotheken gibt es ähnlich viele Beispiele für derartige Enzym-Assays: Metalloprotease MMP-12<sup>[87]</sup>, Cruzipain und Cathepsine B und L<sup>[88]</sup>. Für die beiden Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain sind keine Assays weder mit Substrat- noch Inhibitorbibliotheken bekannt.

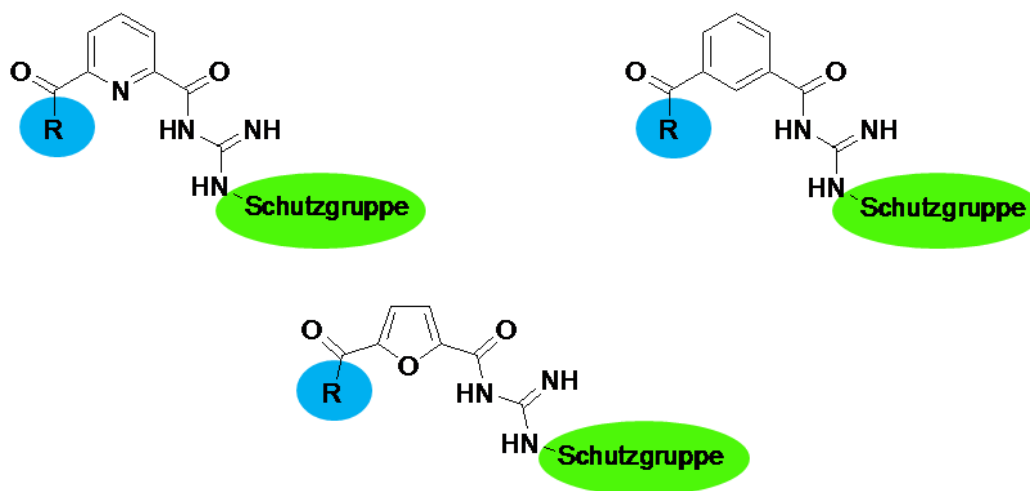
Ein Nachteil dieser Assays ist, dass man nur wenig über das absolute Potential der Hits sagen kann, da nur zwischen Hit und nicht-Hit entschieden werden kann. D.h. zum Beispiel bei einer kombinatorischen Bibliothek, die nur aus potenten aber unterschiedlich aktiven Inhibitoren besteht, könnte man in diesen Assays kein vollständiges Spektrum der Hemmeigenschaften im Vergleich bestimmen. Genau an diesem Punkt ist also noch Forschungsarbeit notwendig.

Mit den Informationen über Cysteinproteasen und deren Inhibitoren können nun die beiden Themenstellungen bearbeitet werden. Für den klassischen Ansatz der Inhibitoroptimierung besteht die Herausforderung darin, die bekannte aktive Substanz weiter zu entwickeln, so dass potentielle Wirkstoffkandidaten gefunden werden können. Beim kombinatorischen Ansatz muss zunächst noch eine neue Methode zum Festphasenscreening der Substanzbibliothek erarbeitet werden.

## 4 Durchführung und Diskussion

### 4.1 Inhibitoroptimierung nach dem klassischen Ansatz

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine Reihe von pyrrolbasierten Verbindungen an der Cysteinprotease Falcipain-2 getestet, um Informationen über gewisse Präferenzen bezüglich bestimmter Strukturelemente zu erhalten. Dabei konnten erste Tendenzen von *Langolf* postuliert werden, die besagen, dass diejenigen Verbindungen das beste Hemmpotential aufwiesen, die unpolare und ungeladene Gruppen besaßen.<sup>[7]</sup> Durch die erhaltenen Informationen aus diesen Screenings sollten nun weitere Verbindungsklassen ergänzend getestet werden. Dabei handelte es sich um Verbindungen auf Pyridin-, Furan- und Benzol-Basis, die diesen Kriterien entsprachen, dass sie unpolar und ungeladen sind (siehe **Abb. 4.1**). Diese Substanzen besitzen einen Guanidinrest, der mit einer Carbamatschutzgruppe versehen ist. Am Rest R sollen verschiedene unpolare Bausteine eingeführt werden.



**Abb. 4.1** Allgemeines Schema der Verbindungen auf Furan-, Pyridin- und Benzol-Basis

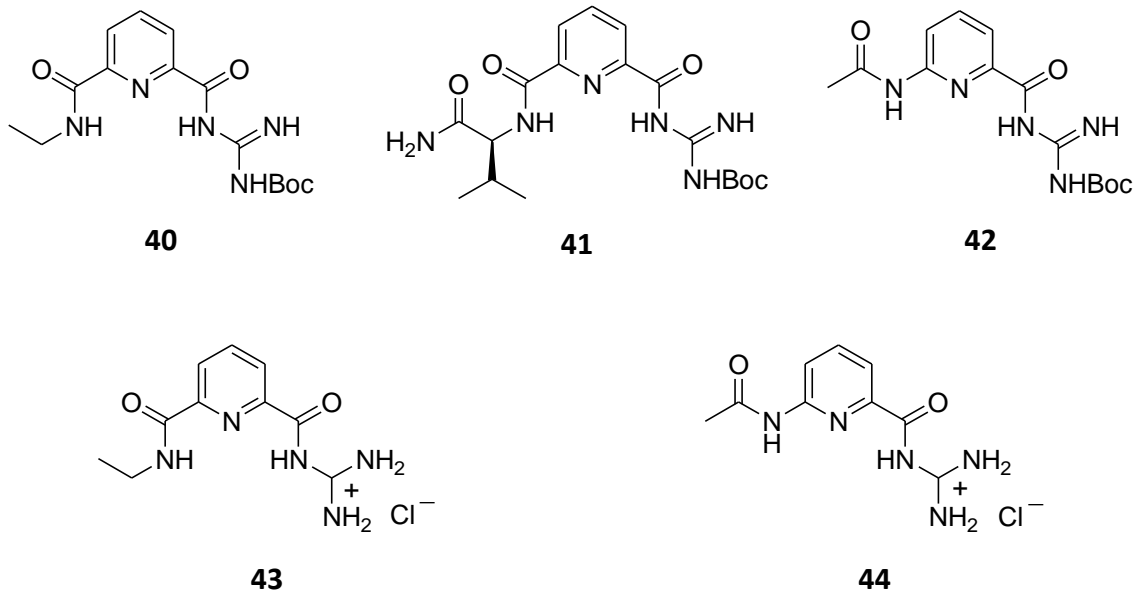
Im folgenden Kapitel sollen zunächst die Synthesen dieser Verbindungen erläutert und die Ergebnisse des Screenings diskutiert werden. Anschließend sollen aus diesen Ergebnissen optimierte Inhibitoren entwickelt und deren Synthese und Hemmeigenschaften beschrieben werden.

#### 4.1.1 Synthese der Inhibitoren auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis

Zunächst stand die Entwicklung einer allgemein anwendbaren Syntheseroute für die Benzol-, Pyridin- und Furan-basierenden Verbindungen im Vordergrund. Diese Verbindungen wurden ursprünglich mit freier Guanidiniogfunktion synthetisiert, da sie als künstliche Aminosäurerezeptoren fungieren sollten.<sup>[89,90]</sup> Die am Guanidin Boc-geschützte Form stellt somit die Vorstufe dieser Rezeptoren dar und entspricht den Kriterien der von *Langolf* entdeckten neuen Inhibitorklasse.

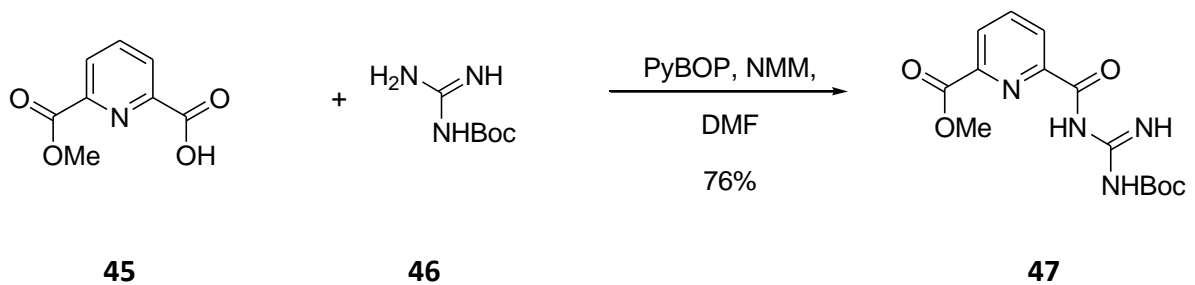
Alle diese Verbindungen haben einen Aromaten oder Heteroaromaten als Basis und einen Guanidinocarbonylrest auf der einen Seite, der mit einer Schutzgruppe versehen ist. Die Heteroaromaten sind jeweils an 2- und 5-Position beim Furan, 2- und 6-Position beim Pyridin und an 1- und 3-Position beim Benzol substituiert. Durch das ähnliche Substitutionsmuster lassen sich die analogen Verbindungen direkt miteinander vergleichen. Der zweite Rest, der dem Guanidinocarbonylsubstituent gegenüberliegt, sollte stark variieren, um hier im späteren Screening eindeutige Präferenzen erkennen zu können. Es sollten sowohl polare als auch unpolare Reste eingeführt werden. Auch einige der Zwischenstufen auf dem Weg zu den gewünschten Zielverbindungen sollten bei dem breiten Screening dieser neuen Verbindungsklassen eingesetzt werden.

Die Pyridinverbindungen **40** bis **42** konnten bereits synthetisiert werden, daher wird hier auf die Beschreibung der Synthese dieser Verbindungen verzichtet.<sup>[89,91]</sup> Sie entsprechen den Vorstufen der entschützten Guanidiniocarbonylpyridine **43** und **44**. Alle drei Vorläufer lagen in der am Guanidinrest Boc-geschützten Form vor.



**Abb. 4.2** Bereits vorhandene Pyridinverbindungen **40** bis **44**

An Position 6 befinden sich jeweils unterschiedliche Reste. Verbindung **40** ist mit Ethylamid und **41** mit einem Valinamidrest substituiert, bei **42** befindet sich an Position 6 eine acetylierte Aminfunktion. Verbindungen **43** und **44** entsprechen den entschützten Chloridsalzen von **40** und **42**. Ergänzend zu diesen fünf Verbindungen sollte nun noch **47** synthetisiert werden, das an Position 6 eine Methylesterfunktion besitzt. Der Methylester **47** konnte ausgehend vom Monomethylester **45** dargestellt werden.

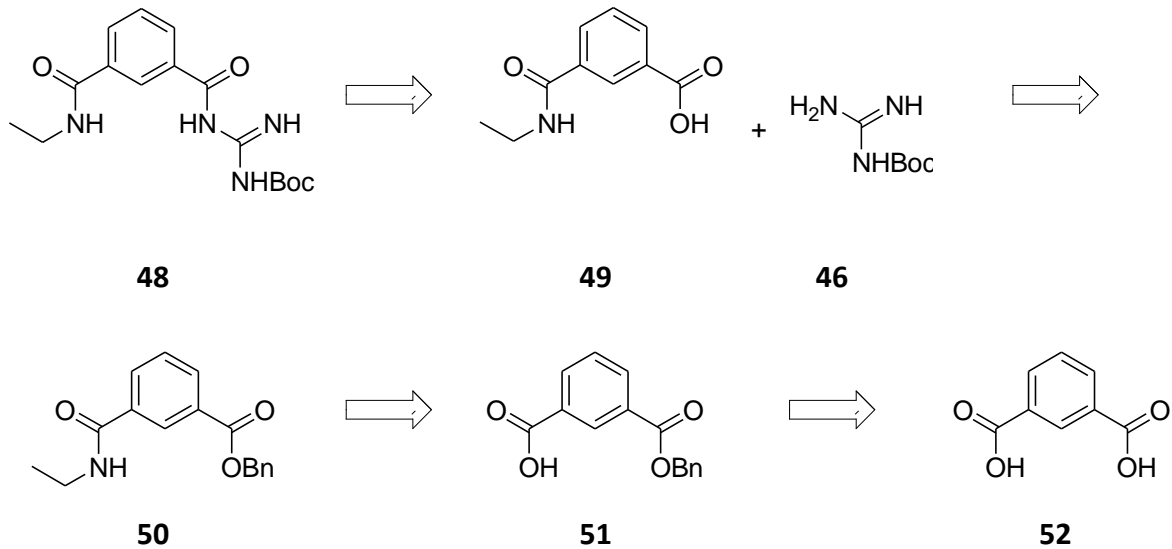


**Abb. 4.3** Synthese der Pyridinverbindung **47**

In einer Kupplung von **45** mit mono-Boc-Guanidin **46** mit PyBOP und NMM in DMF konnte die Verbindung **47** in einer Ausbeute von 76 % erhalten werden. Die Aufarbeitung erfolgte durch Kristallisation aus dem Reaktionsansatz durch Wasserzugabe. Mit dieser zusätzlichen Verbindung **47** standen nun sechs verschiedene potentielle Inhibitoren auf Pyridin-Basis zur Untersuchung auf Hemmeigenschaften zur Verfügung.

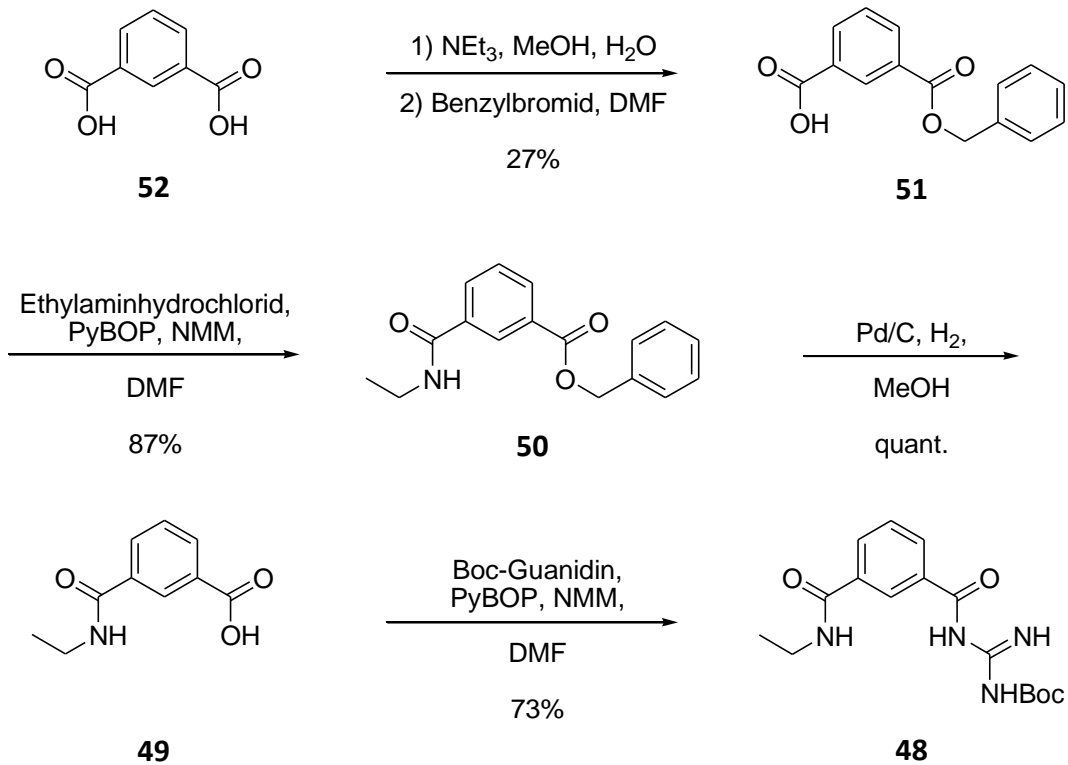


Als nächstes sollte die Verbindung **48** auf Benzol-Basis synthetisiert werden, die zur Pyridinverbindung **40** analog ist. Hier wurde die Synthese ursprünglich bis zum freien Guanidin fortgeführt, um dann die Komplexierungseigenschaften von Oxo-Anionen zu bestimmen.<sup>[89]</sup>



**Abb. 4.4** Retrosyntheseschema der Benzolverbindung **48**

Ausgehend von der käuflichen Isophthalsäure **52** sollte zunächst der Monobenzylester **51** synthetisiert werden (siehe **Abb. 4.4**). An **51** sollte nun Ethylamin in einer Kupplungsreaktion eingeführt werden und anschließend per Hydrogenolyse der Benzylester **50** gespalten werden, um die Carbonsäure **49** zu erhalten. Im letzten Schritt sollte mono-Boc-geschütztes Guanidin **46** an die Carbonsäure **49** gekuppelt werden. Der Syntheseweg zu **48** ist in **Abb. 4.5** dargestellt.

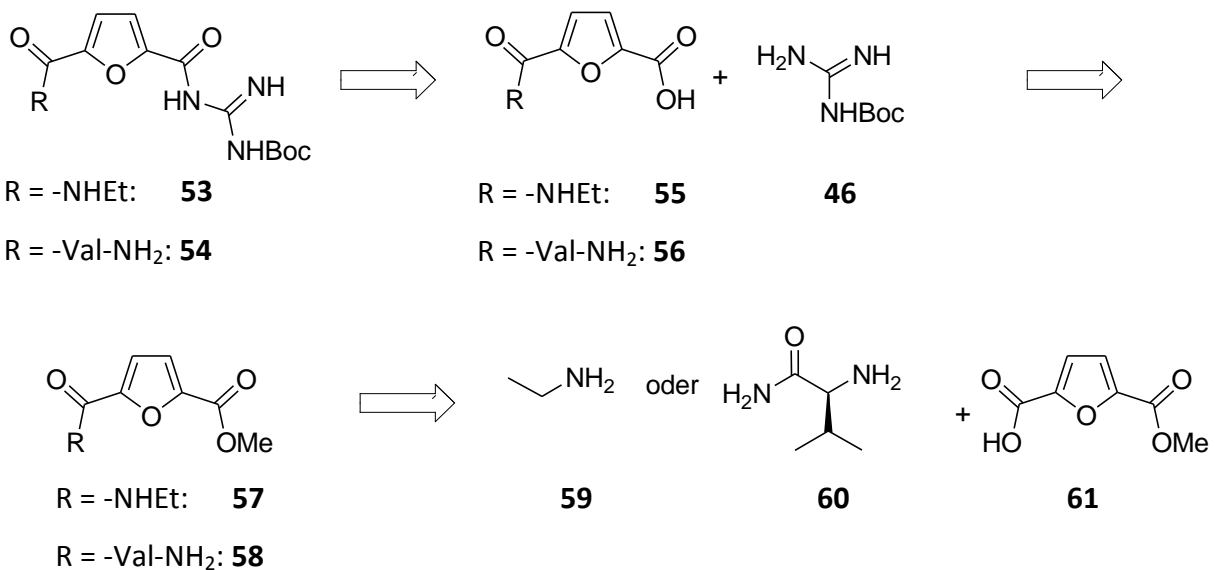


**Abb. 4.5** Synthese der Benzolverbindung **48**

Der Monobenzylester **51** wurde ausgehend von der Isophthalsäure **52** nach einer literaturbekannten Vorschrift synthetisiert.<sup>[92,93]</sup> Nach Deprotonierung von **52** mit einem Äquivalent Triethylamin als Base in einer Mischung aus Wasser und Methanol wurde das erhaltene Triethylammoniumsalz mit Benzylbromid in DMF umgesetzt. Der Benzylester **51** musste nun säulenchromatographisch von erheblichen Mengen an Edukt und dem erwarteten Nebenprodukt Isophthalsäuredibenzylester abgetrennt werden. Dies gelang in einer Ausbeute von 27 %, im Bereich der Literaturwerte von 21 %<sup>[93]</sup> bzw. 49 %<sup>[92]</sup>. Im nächsten Schritt wurde **51** mit Ethylaminhydrochlorid mit PyBOP als Kupplungsreagenz, NMM als Base und DMF als Lösungsmittel gekuppelt. Die Verbindung **50** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 87 % isoliert werden. Die Benzylesterentschützung von **50** wurde durch Hydrogenolyse mit Palladium auf Kohle als Katalysator in Methanol durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Carbonsäure **49** quantitativ erhalten werden. An die Säure **49** konnte nun ebenfalls unter Standardbedingungen mono-Boc-geschütztes Guanidin gekuppelt werden. Auch in diesem Fall wurde die Kombination aus PyBOP, NMM und DMF verwendet, und das Produkt **48** konnte in einer Ausbeute von 73 % durch Säulenchromatographie an Silicagel gereinigt

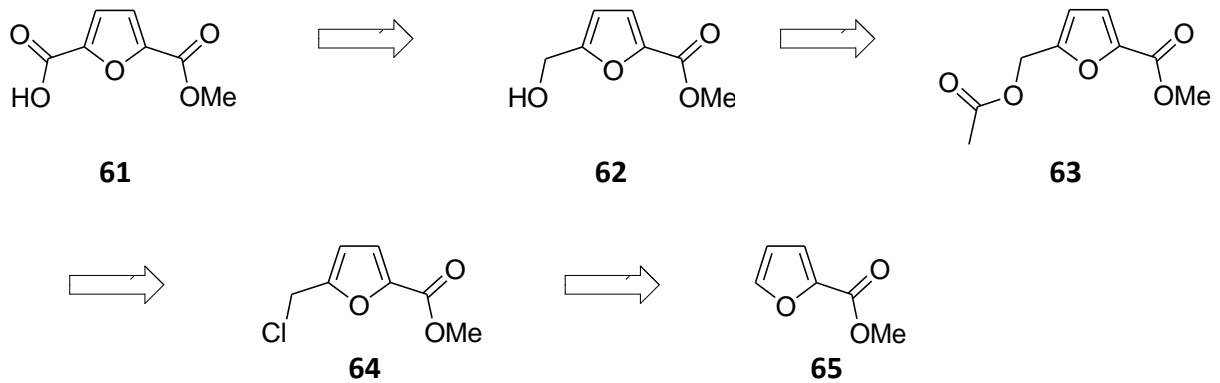
erhalten werden. Analog zur Synthese von **48** sollten sich auch andere Inhibitoren auf Benzol-Basis darstellen lassen.

Als letzte Inhibitor-Klasse sollte die Synthese der analogen Verbindungen auf Furan-Basis synthetisch entwickelt werden. Für die Gruppe der Furane sollten zunächst die zwei an Position 2 verschieden substituierten Furanverbindungen **53** und **54** synthetisiert werden. Der Ausgang der Synthese sollte die mono-geschützte Dicarbonsäure **61** sein.



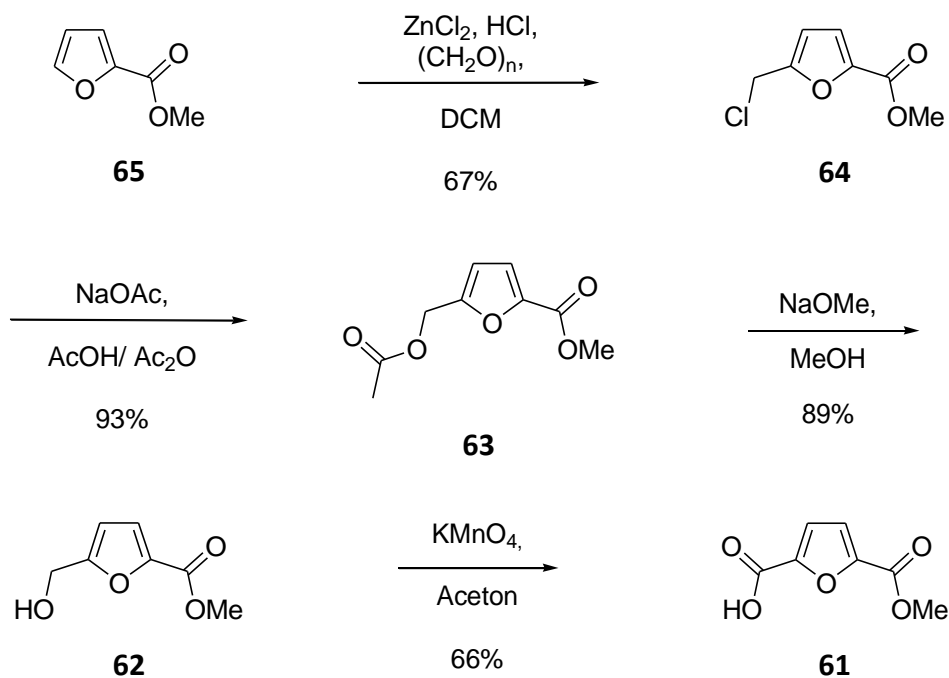
**Abb. 4.6** Retrosyntheseschema der Furanverbindungen **53** und **54**

Der Grundbaustein **61** sollte zum einen mit Ethylamin **59** bzw. mit Valinamid **60** gekuppelt werden. Anschließend sollte die Methylesterfunktion von **57** bzw. **58** verseift werden, damit schließlich die Kupplung mit dem mono-geschützten Guanidin **46** erfolgen kann. Auch hier wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit den Verbindungen auf Pyridin- und Benzol-Basis bei dem anschließenden Enzymscreening als Schutzgruppe am Guanidinrest eine Boc-Gruppe gewählt. Um diesen Synthesepfad zu verfolgen, musste zunächst der Grundbaustein **61** in ausreichenden Mengen zugänglich gemacht werden. Die Retrosynthese ausgehend vom kommerziell erhältlichen Furanmethylester **65** ist in **Abb. 4.7** dargestellt. Diese Synthesestrategie wurde gewählt, da die ersten Schritte bis zur Verbindung **62** literaturbekannt sind.



**Abb. 4.7** Retrosyntheseschema der Furancarbonsäure **61**

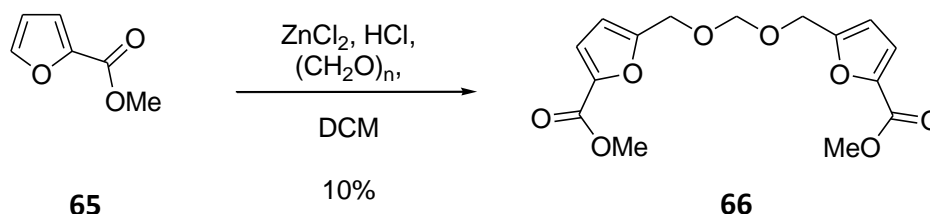
Nach der Chlormethylierung von **65** zum Chloromethylfuran **64** sollte durch eine nukleophile Substitution das Acetoxymethylfuran **63** synthetisiert werden. Anschließend sollte selektiv die Essigsäureesterfunktion von **63** verseift werden und der Alkohol **62** zur Furancarbonsäure **61** oxidiert werden, gegebenenfalls auch über den entsprechenden Aldehyd als Zwischenstufe. Die Synthese des Furanbausteins **61** mit den jeweiligen Reaktionsbedingungen ist in **Abb. 4.8** gezeigt.



**Abb. 4.8** Synthese der Furancarbonsäure **61**

Bei der ersten Stufe findet eine literaturbekannte Chlormethylierung des Furanmethylesters **65** mit Paraformaldehyd und Einleiten von HCl-Gas in trockenem Dichlormethan unter Aktivierung mit Zinkchlorid statt.<sup>[94,95]</sup> Die angegebenen Literaturausbeuten von 66 %<sup>[94]</sup> und 71 %<sup>[95]</sup> in dieser Reaktion konnte nach Aufarbeitung

und Destillation des Produktes **64** mit 67 % ungefähr erreicht werden. Die Ausbeuteverluste in diesem Reaktionsschritt sind bereits in anderen Arbeiten durch die Bildung des Nebenprodukts **66** aufgeklärt worden.<sup>[96]</sup> Das Methanalacetal **66** bildet sich zu 10 % mit dem sich als Zwischenstufe auftretenden Furfurylalkohol **62** unter Säurekatalyse.

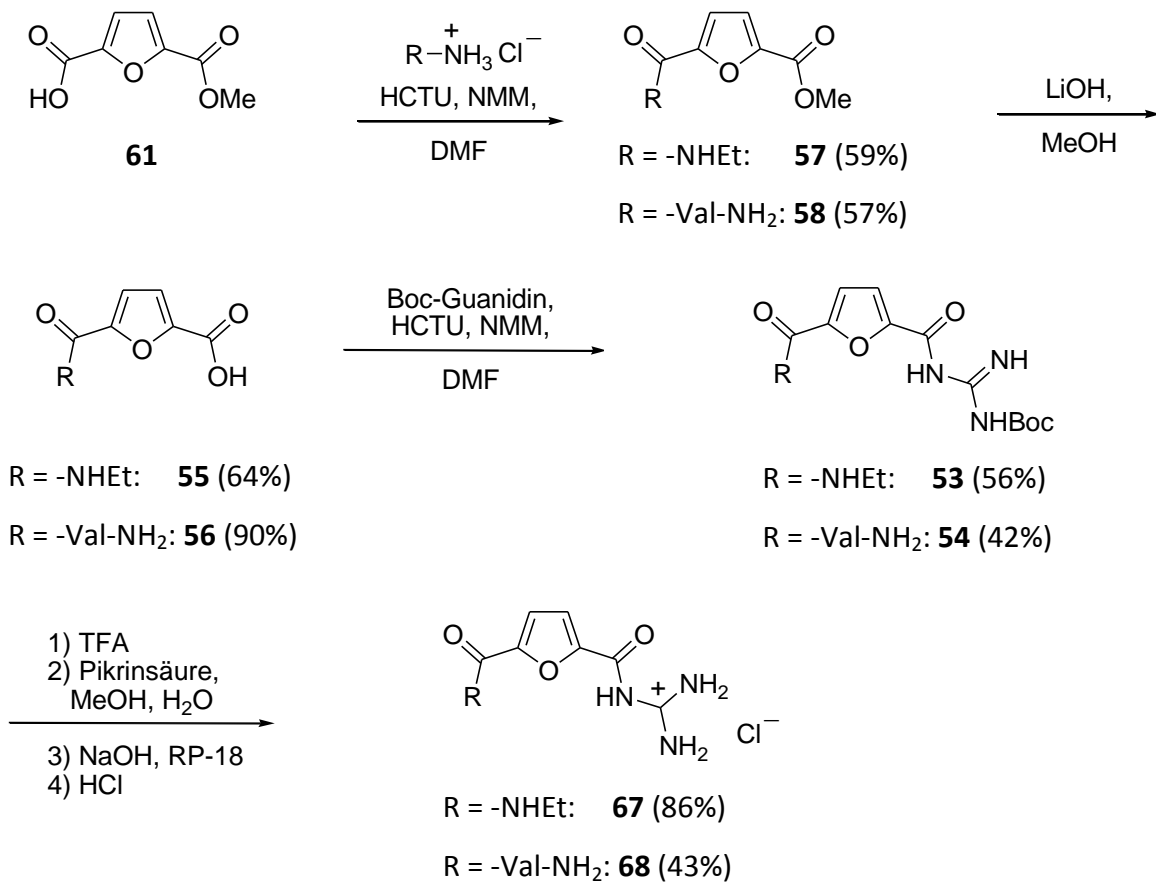


**Abb. 4.9** Bildung des Nebenprodukts **66** bei der Chlormethylierung von **65**

Die Substitution der Chlorgruppe durch Natriumacetat in einer Mischung aus Essigsäure und Essigsäureanhydrid konnte in einer sehr guten Ausbeute von 93 % durchgeführt werden. Auch hier wurde das Produkt **63** destillativ erhalten. Die in der Literatur angegebenen Werte für die Ausbeute von 80-90 %<sup>[97]</sup> und 92 %<sup>[98]</sup> konnten sogar noch übertroffen werden. Die selektive Verseifung der Essigsäureesterfunktion des Acetoxifyrans **63** wurde durch Natriummethanolat in Methanol unter Wasserausschluss erreicht.<sup>[98]</sup> Der Furfurylalkohol **62** konnte ebenfalls durch Destillation in einer sehr guten Ausbeute von 89 %, ähnlich dem Literaturwert von 87 %, erhalten werden. Der letzte Syntheseschritt, die Oxidation des Alkohols **62** zur Furancarbonsäure **61** musste erst entwickelt werden. Zunächst wurde versucht, den Alkohol **62** nach einer für ähnliche Furanverbindungen beschriebenen Oxidation in zwei Stufen mit dem entsprechenden Aldehyd als Zwischenprodukt zu oxidieren.<sup>[99]</sup> Dazu wurde **62** in Aceton gelöst und mit aktivierten Braunstein bei Raumtemperatur umgesetzt. Der Literaturwert für die Ausbeute der Oxidation zum analogen Aldehyd beträgt 93 %, bei der Synthese konnte jedoch per Dünnschichtchromatographie nur eine Zersetzung des Furans beobachtet werden. Nach kurzer Reaktionszeit konnte in der Lösung keine UV-aktive Substanz mehr nachgewiesen werden, so dass diese Reaktionsbedingungen anscheinend nicht mild genug waren oder der entstandene Aldehyd zu labil war. Anschließend wurde deswegen versucht, **62** direkt zur Carbonsäure **61** zu oxidieren. Dazu wurden zunächst verschiedene Reaktionsbedingungen mit Kaliumpermanganat als Oxidationsmittel und Aceton/Wasser-Gemische als Lösungsmittel bei RT getestet. Da die Ausbeuten hierbei sehr gering waren, wurden mildere Bedingungen ausprobiert, d.h. zu der recht verdünnten Lösung des Alkohols **62** in Aceton wurden das

Kaliumpermanganat unter Eiskühlung in fester Form zugegeben. Nach Entfernung des Eisbads erfolgte die Umsetzung zu **61**, so dass das Produkt durch Aufarbeitung und Kristallisation aus salzsaurer Lösung in einer Ausbeute von 66 % erhalten werden konnte. Die Ausbeuteverluste sind durch Hydrolyse des Furans während der sauren wässrigen Aufarbeitung zu erklären.

Ausgehend von der nun vorhandenen unsymmetrischen Furanverbindung **61** konnten nun die Synthesen der verschieden substituierten Furane erfolgen. Der allgemeine Syntheseweg zu den Guanidinofuranen **53** und **54** ist in **Abb. 4.10** dargestellt.

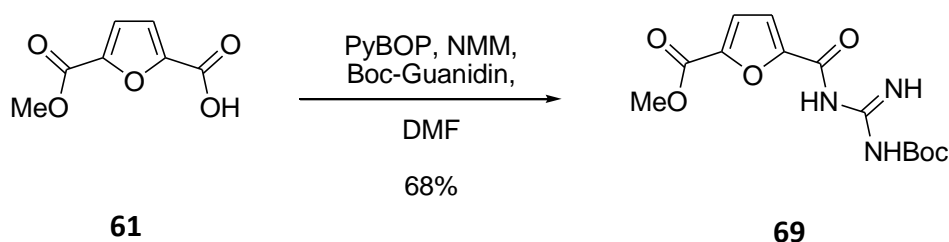


**Abb. 4.10** Synthese der Furanverbindungen **53**, **54**, **67** und **68**

Die Furancarbonsäure **61** wurde mit den Hydrochloridsalzen der entsprechenden Amine nach Aktivierung mit HCTU als Kupplungsreagenz und NMM als Base in DMF umgesetzt. Bei der Aufarbeitung der Verbindungen **57** und **58** war es entscheidend, dass die Rohprodukte per RP-18 Säulenchromatographie gereinigt wurden. Bei der säulenchromatographischen Reinigung auf der Normalphase mit Kieselgel zersetzen sich die unter sauren Bedingungen hydrolyseempfindlichen Furane zum größten Teil, so dass die Ausbeute drastisch verringert

wurde. Die mildere Reinigung auf oktadecylfunktionalisiertem Kieselgel mit Wasser/Methanol-Gemischen als Laufmittel lieferte die Produkte **57** und **58** zu ca. 60 %. Im nächsten Schritt wurden die Methylesterfunktionen von **57** und **58** mit Lithiumhydroxid als Base in Methanol verseift. Die entsprechenden Furan-carbonsäuren **55** und **56** konnten durch Extraktion aus wässrig saurer Lösung in Ausbeuten von 64 % bzw. 90 % isoliert werden. Ausbeuteverluste sind auf Zersetzung in der sauren wässrigen Lösung zurückzuführen. Der Guanidinrest konnte ebenfalls in einer HCTU-Kupplungsreaktion mit mono-Boc-Guanidin **46** eingeführt werden, um die beiden Guanidinofurane **53** und **54** zu erhalten. Auch hier war eine säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte auf RP-18-Kieselgel essentiell, um die Ausbeuten von 56 % und 42 % zu erreichen. Bei beiden Verbindungen wurden anschließend die Boc-Schutzgruppen am Guanidinrest abgespalten, um die entsprechenden Guanidiniocarbonylfurane **67** und **68** zu erhalten. Diese beiden entschützten Versionen wurden im Rahmen anderer Arbeiten als künstliche Rezeptoren für Anionen benötigt und sollten auch in dieser Form auf ihre Hemmeigenschaften getestet werden. Sie wurden zuerst in Trifluoressigsäure (TFA) umgesetzt und anschließend mit einer gesättigten wässrigen Pikrinsäurelösung aus einem Methanol/Wasser-Gemisch als Pikratsalze gefällt. Die Umsalzung zu den entsprechenden Chloridsalzen **67** und **68** wurde durch Lösen der Pikratsalze in verdünnter Natronlauge, anschließender säulenchromatographischer Abtrennung vom Natriumpikrat über RP-18-Kieselgel und Lyophilisieren mit verdünnter Salzsäure erhalten. Über diese Methode konnten die Chloridsalze in sehr hoher Reinheit erhalten werden. Per HPLC konnten bei einer Wellenlänge des UV-Detektors von 275 nm Reinheiten von 98 % für **67** und 97 % für **68** bestimmt werden.

Zusätzlich sollte noch die Furanverbindung **69** synthetisiert werden, die an Position 5 des Furanrings einen Methylestersubstituenten besitzt und damit das Analogon zum Guanidinopyridin **47** darstellt. Somit ist in den späteren Messergebnissen der Einfluss des Austausches des Heteroaromaten direkt erkennbar.

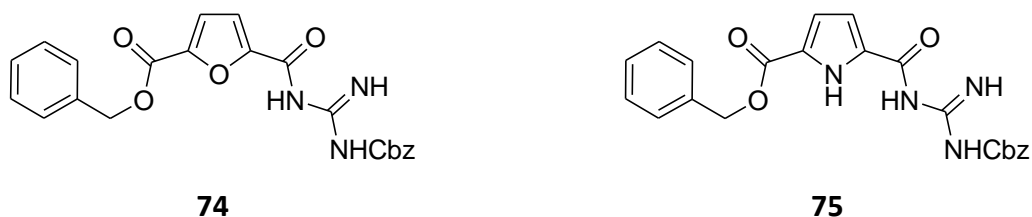


**Abb. 4.11** Synthese der Furanverbindung **69**



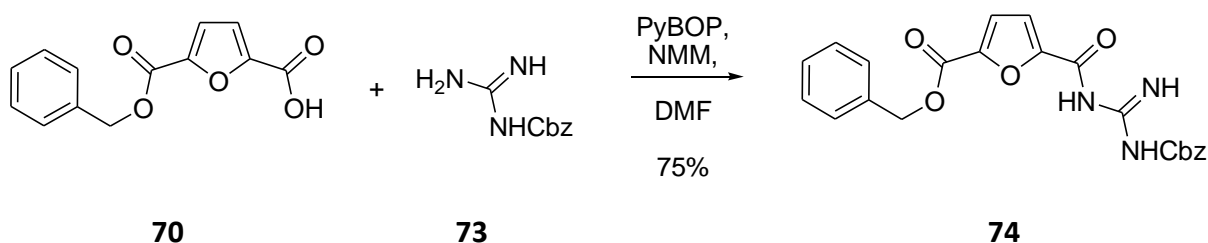


Um den Pool an Furanverbindungen zu erweitern, wurde das zweifach geschützte Guanidinofuran **74** synthetisiert. Diese Verbindung besitzt neben der Benzylesterfunktion einen Cbz-geschützten Guanidinrest und stellt ein Analogon der entsprechenden Pyrrolverbindung **75** dar (siehe **Abb. 4.13**).



**Abb. 4.13** Ergänzende Strukturanaloga **74** und **75** für das Enzyscreening

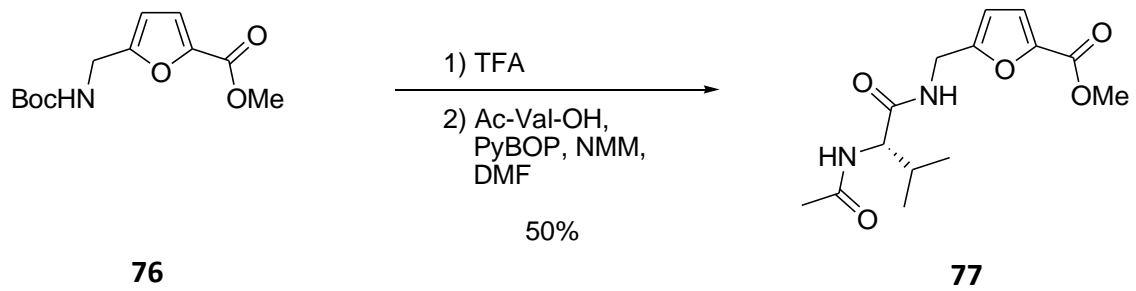
Verbindung **75** lag bereits synthetisiert in der Arbeitsgruppe vor und sollte nun als direkte Vergleichsmöglichkeit zwischen Inhibitoren auf Pyrrol- und Furan-Basis dienen. Die Synthese der analogen Furanverbindung **74** ist in **Abb. 4.14** gezeigt.



**Abb. 4.14** Synthese der Furanverbindung **74**

Die Kupplung von **70** mittels PyBOP und NMM in DMF mit Cbz-Guanidin **73** gelang in einer Ausbeute von 75 %. Die gute Ausbeute im Vergleich zu vorherigen Kupplungen mit der Furancarbonsäure **61** ist dadurch zu erklären, dass hier das Produkt **74** nach der Kupplung durch Wasserzugabe zum Kristallisieren gebracht werden konnte und leicht zu isolieren war.

Die Substanz **77** sollte als weitere Variante der Furanverbindungen synthetisiert werden und besitzt an Position 5 anstatt der Carbonylfunktion eine Methyleneinheit. Die Boc-geschützte Verbindung **76** lag bereits in der Arbeitsgruppe vor<sup>[91]</sup> und sollte nach Entschützung über das freie Amin an N-acetyliertes Valin gekuppelt werden.

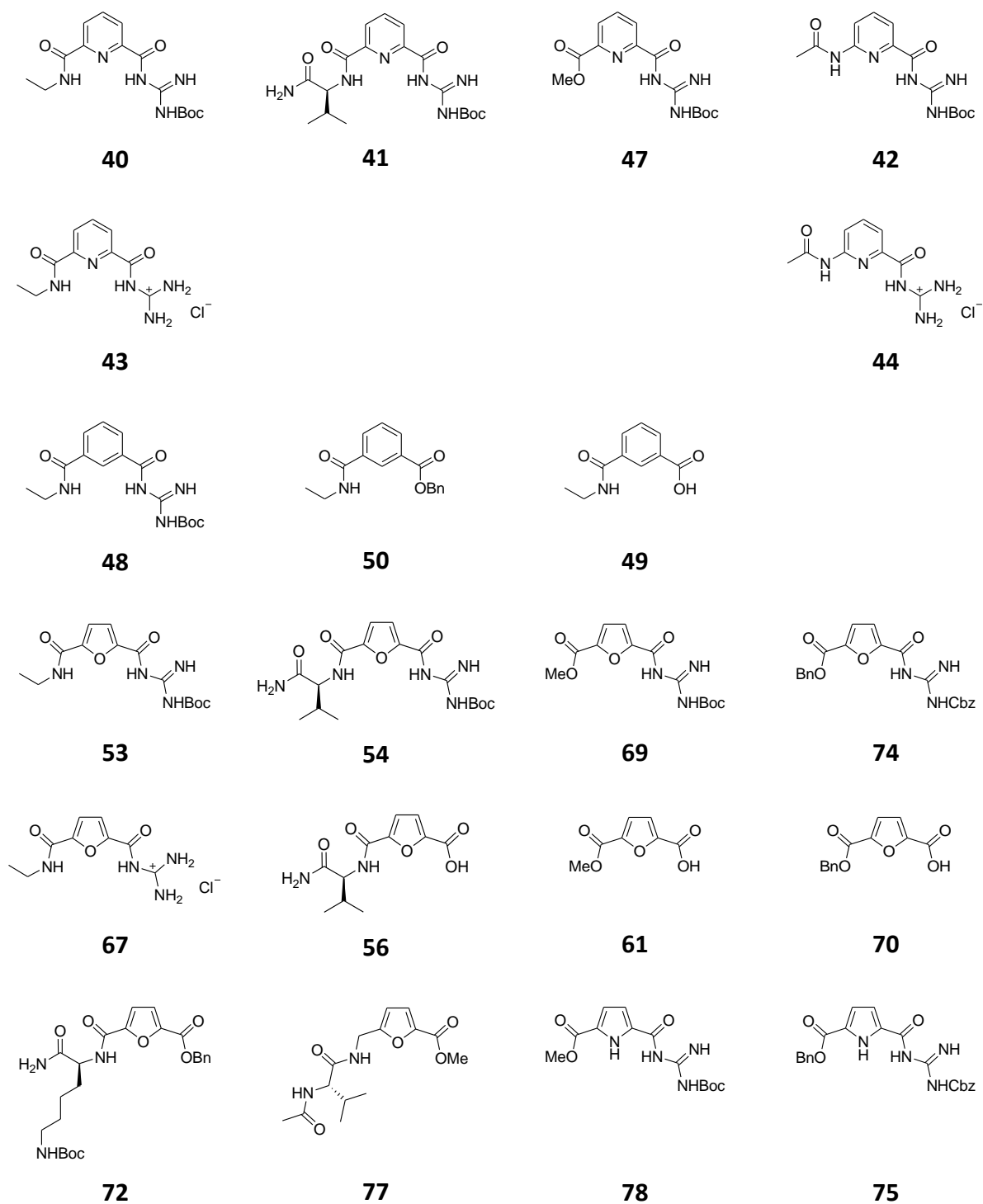


**Abb. 4.15** Synthese der Aminomethylfuranverbindung **77**

Die Boc-Entschützung von **76** erfolgte in TFA, die nach Beendigung der Reaktion im Vakuum entfernt wurde. Dieses Rohprodukt musste direkt in einer Kupplungsreaktion weiter umgesetzt werden, da das entstehende freie Amin nicht stabil und damit nicht isolierbar war. Die Kupplung konnte mit PyBOP und NMM in DMF in einer Ausbeute von 50 % durchgeführt werden. Die Ausbeuteverluste sind hier wahrscheinlich auf die Reste an TFA zurückzuführen, durch die Kupplungsnebenprodukte entstanden sind, die abgetrennt werden mussten. Per Dünnschichtchromatographie konnte die Bildung weiterer Nebenprodukte nachgewiesen werden.

Diese Furanverbindungen samt einiger ihrer Zwischenstufen wurden nun zusammen mit bereits vorliegenden Pyridin- und Benzolverbindungen an Falcpain-2 und Rhodesain auf Inhibitoreigenschaften getestet. In **Abb. 4.16** sind alle im Screening verwendeten Substanzen aufgelistet.

Strukturell ähnliche Substanzen sind, wenn möglich, in einer Reihe oder in einer Spalte angeordnet. Die Hemmdaten der beiden Pyrrol-basierten Verbindungen **75** und **78** wurden ebenfalls bestimmt; diese lagen in der Arbeitsgruppe bereits synthetisiert vor. Sie ergänzen die Verbindungen, so dass direkte Vergleiche zwischen bestimmten Strukturelementen möglich sind.



**Abb. 4.16** Übersicht der im Enzymscreening eingesetzten Verbindungen

Die Ergebnisse des Enzymscreenings der 21 Verbindungen werden im nächsten Kapitel beschrieben.

#### 4.1.2 Screening der Inhibitoren auf Benzol-, Pyridin- und Furan-Basis

Bevor die Ergebnisse des Screenings der potentiellen Inhibitoren präsentiert werden, sollen vorerst die allgemeine Durchführung des Enzym-Assays und die Bestimmung der  $IC_{50}$ - bzw.  $K_i$ -Werte beschrieben werden. Die Grundlagen zu diesen Enzym-Assays befinden sich in Kapitel 3.4.2 und das experimentelle Vorgehen orientierte sich an bereits veröffentlichten Vorschriften.<sup>[100,101]</sup>

Das Screening an Falcipain-2 und Rhodesain wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M in einem Acetatpuffer bei pH = 5.5 durchgeführt. Außerdem enthielt der Puffer noch Natriumchlorid, Dithiothreitol (DTT) und EDTA. Als Substrat im Enzym-Assay wurde für die beiden Cysteinproteasen Cbz-Phe-Arg-AMC verwendet. Das Enzym wurde mit einer Stammlösung des Inhibitors in DMSO versetzt und anschließend zwei Minuten inkubiert. Nach Zugabe einer Lösung des Substrats in DMSO wurde die Fluoreszenzzunahme über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Der Gesamtanteil an DMSO in der Lösung betrug 10 %. Es wurde dabei jede Minute eine Punktmessung mit einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm durchgeführt. Aus den erhaltenen Geraden wurden die Steigungen durch lineare Regression für die Daten der ersten fünf Minuten berechnet. In Relation zu einer unter gleichen Bedingungen gleichzeitig gemessenen Blindprobe ohne Inhibitor ergaben sich prozentuale Werte der Hemmung für eine Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M. Bei den Inhibitoren, die eine Hemmung von über 80 % erreichten, wurden zusätzlich die  $IC_{50}$ - und die  $K_i$ -Werte bestimmt. Dazu wurde analog die prozentuale Hemmung bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt und durch nichtlineare Regressionsanalyse mit GraFit® die Konzentration bestimmt, an der das Enzym genau die Hälfte der maximalen Enzymaktivität zeigte. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen richteten sich nach dem Hemmvermögen der jeweiligen Verbindung. Anschließend konnten die  $K_i$ -Werte wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben und den mit GraFit® bestimmten  $K_{iapp}$ -Wert berechnet werden. Als  $K_M$ -Werte wurden für Cbz-Phe-Arg-AMC experimentell bestimmte Werte aus der Literatur verwendet, diese betragen 21.5  $\mu$ M<sup>[102]</sup> für Falcipain-2 und 826.5 nM<sup>[103]</sup> für Rhodesain.

In solchen Screenings kann es Probleme geben, wenn der Inhibitor aggregiert. Bei einer Größe der Aggregate zwischen 50 und 1000 nm werden Enzyme unspezifisch gehemmt. Der Mechanismus der Hemmung ist bis heute ungeklärt.<sup>[104]</sup> Es sind verschiedene Methoden

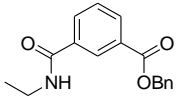
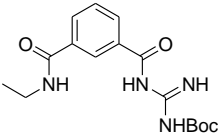
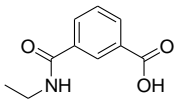
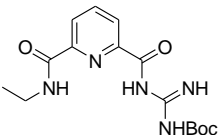
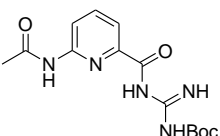
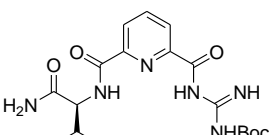
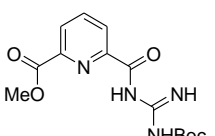
bekannt, um die Bildung von Aggregaten festzustellen. Aggregierende Verbindungen zeigen charakteristische Eigenschaften, die bei klassischen Inhibitoren nicht auftreten. Unter anderem können beispielsweise folgende fünf Punkte überprüft werden:

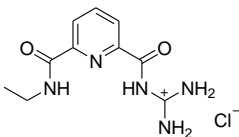
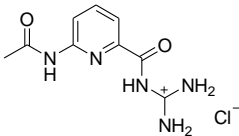
1. Bleibt die Hemmung nach Zugabe eines nichtionischen Tensids erhalten? Wenn ja, dann spricht es gegen die Bildung von Aggregaten, denn durch das Tensid wird dies verhindert.
2. Nimmt die Hemmung bei Erhöhung der Enzymkonzentration im Assay ab? Wenn ja, dann ist die Verbindung sehr wahrscheinlich ein Aggregator.
3. Handelt es sich um eine kompetitive Hemmung? Wenn ja, dann ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Inhibitor aggregiert.
4. Bleibt die Hemmung erhalten, nachdem eine Inhibitor-Enzym-Mischung für einige Minuten zentrifugiert wurde? Wenn ja, dann handelt es sich nicht um eine aggregierende Substanz.
5. Werden auch andere Proteasen von diesen Verbindungen im gleichen Maß gehemmt? Wenn ja, spricht das für die Bildung von Aggregaten, da Aggregate Enzyme unspezifisch hemmen.

Erste Messungen einiger Vertreter der neuen Verbindungsklasse zeigten zwar, dass ein Einfluss des Tensids Brij 35 auf die Hemmung bei einigen Substanzen vorhanden ist (Punkt 1). Jedoch hatte die Erhöhung der Enzymkonzentration nicht zur Folge, dass die Hemmung abnimmt (Punkt 2). Auch ein Zentrifugen-Experiment sprach gegen die Bildung von Aggregaten (Punkt 4). Eine unspezifische Hemmung bei anderen Cysteinproteasen konnte in ersten Tests ebenfalls nicht bestätigt werden (Punkt 5). Obwohl die ersten Messungen überwiegend gegen die Bildung von Aggregaten sprechen, werden derzeit weitere Messungen durchgeführt. Zum Einen um die Bildung von Aggregaten für die Verbindungsklasse eindeutig auszuschließen, und zum Anderen um den Einfluss des Tensids Brij 35 auf die Inhibitoren zu klären. In einer Kooperation werden ergänzend zu den oben genannten fünf Punkten im Moment zusätzlich Bedingungen für DLS-Messungen (dynamische Lichtstreuung) der Inhibitoren unter Assay-Bedingungen getestet, um direkt die Bildung und die Größe etwaiger Aggregate zu untersuchen.<sup>[105]</sup> Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse dieser Messungen noch nicht vollständig durchgeführt werden. Die Untersuchungen werden jedoch fortgeführt, um die beobachteten Ergebnisse

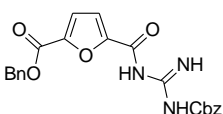
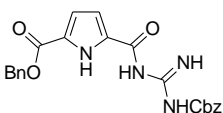
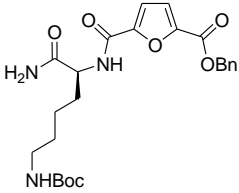
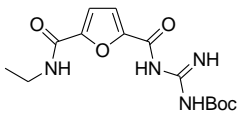
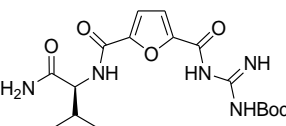
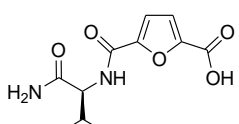
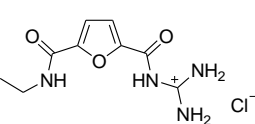
erklären zu können. Zusammenfassend sprechen die durchgeführten ersten Tests nicht für eine unspezifische Hemmung durch Aggregate. Aus diesem Grund wurde das Screening für alle Verbindungen ohne das Tensid Brij 35 durchgeführt.

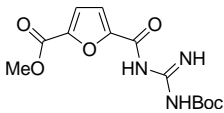
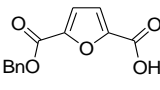
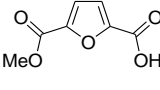
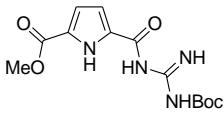
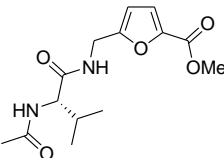
In den nachfolgenden Tabellen **Tab. 4.1** und **Tab. 4.2** sind alle 20 getesteten Verbindungen mit den gesamten Messergebnissen aufgeführt. Zunächst sind die Ergebnisse des Enzymscreenings für die Pyridin- und Benzolverbindungen aufgelistet und anschließend die der Furan- und Pyrrol-basierenden Verbindungen. Teilweise wurden Messwerte an nur einer der beiden Cysteinproteasen bestimmt, was aber aufgrund der Ähnlichkeit der Enzyme ausreichend war, um die strukturellen Präferenzen zu erkennen.

Struktur	Nummer	FP-2 (Hemmung in %)	Rd (Hemmung in %)
	50	43	51
	48	21	20
	49	14	n.d.
	40	32	70
	42	28	16
	41	21	n.d.
	47	18	n.d.

	<b>43</b>	18	n.d.
	<b>44</b>	13	n.d.

**Tab. 4.1** Messergebnisse der Verbindungen auf Benzol- und Pyridin-Basis an Falcipain-2 und Rhodesain

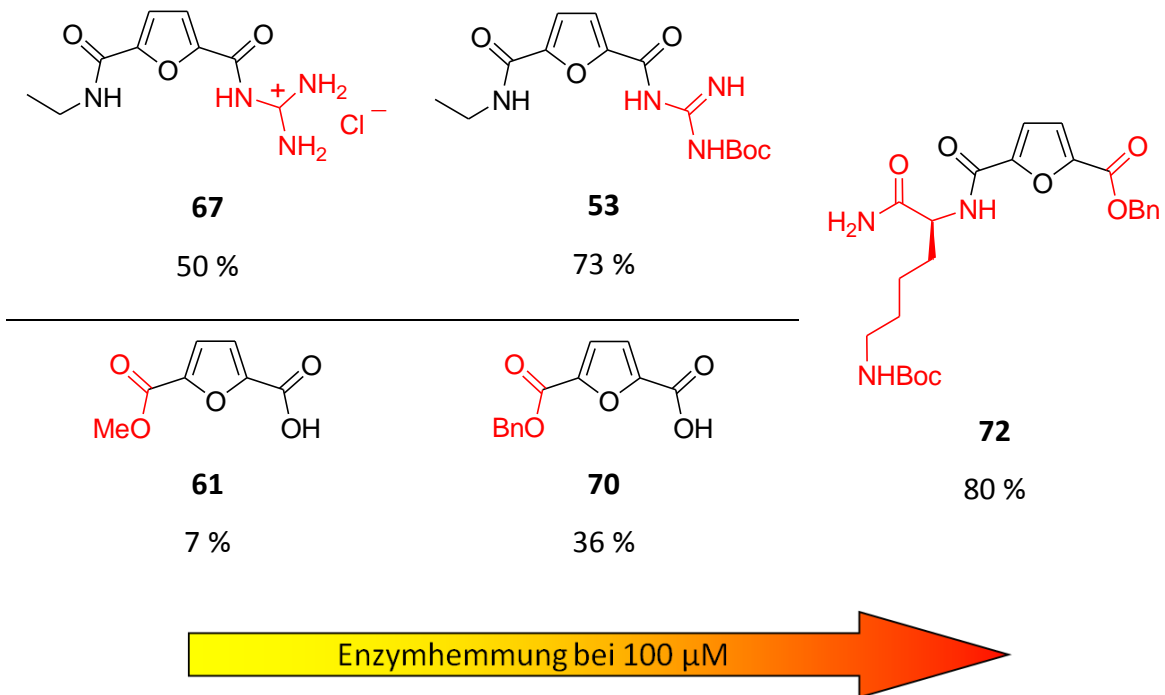
Struktur	Nummer	FP-2			Rd		
		Inh. (%)	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Inh. (%)	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)
	<b>74</b>	100	7.70	2.08	98	1.60	0.032
	<b>75</b>	87	33.0	10.8	95	2.39	0.05
	<b>72</b>	80	16.7	6.08	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>53</b>	73	32.4	11.6	63	n.d.	n.d.
	<b>54</b>	64	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.
	<b>56</b>	51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>67</b>	50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

	<b>69</b>	41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>70</b>	36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>61</b>	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>78</b>	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>77</b>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tab. 4.2** Messergebnisse der Verbindungen auf Furan- und Pyrrol-Basis an Falcipain-2 und Rhodesain

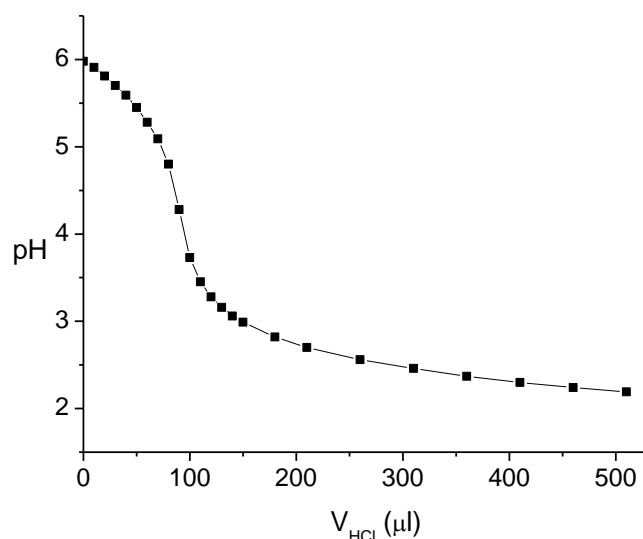
Wenn man nun die erhaltenen Daten aller Verbindungen näher betrachtet, kann man Trends für die untersuchte Verbindungsklasse erkennen. Zunächst sollen die bereits erwähnten in der Arbeit von *Langolf* postulierten Zusammenhänge zwischen Struktur und Inhibitoraktivität anhand der neuen Screeningdaten überprüft werden.<sup>[7]</sup> Laut diesen Ergebnissen bewirken geladene und polare Strukturelemente, dass die Hemmung der Cysteinprotease geringer ausfällt. Mit Hilfe der in **Abb. 4.17** dargestellten Furanverbindungen können diese Trends bestätigt werden.





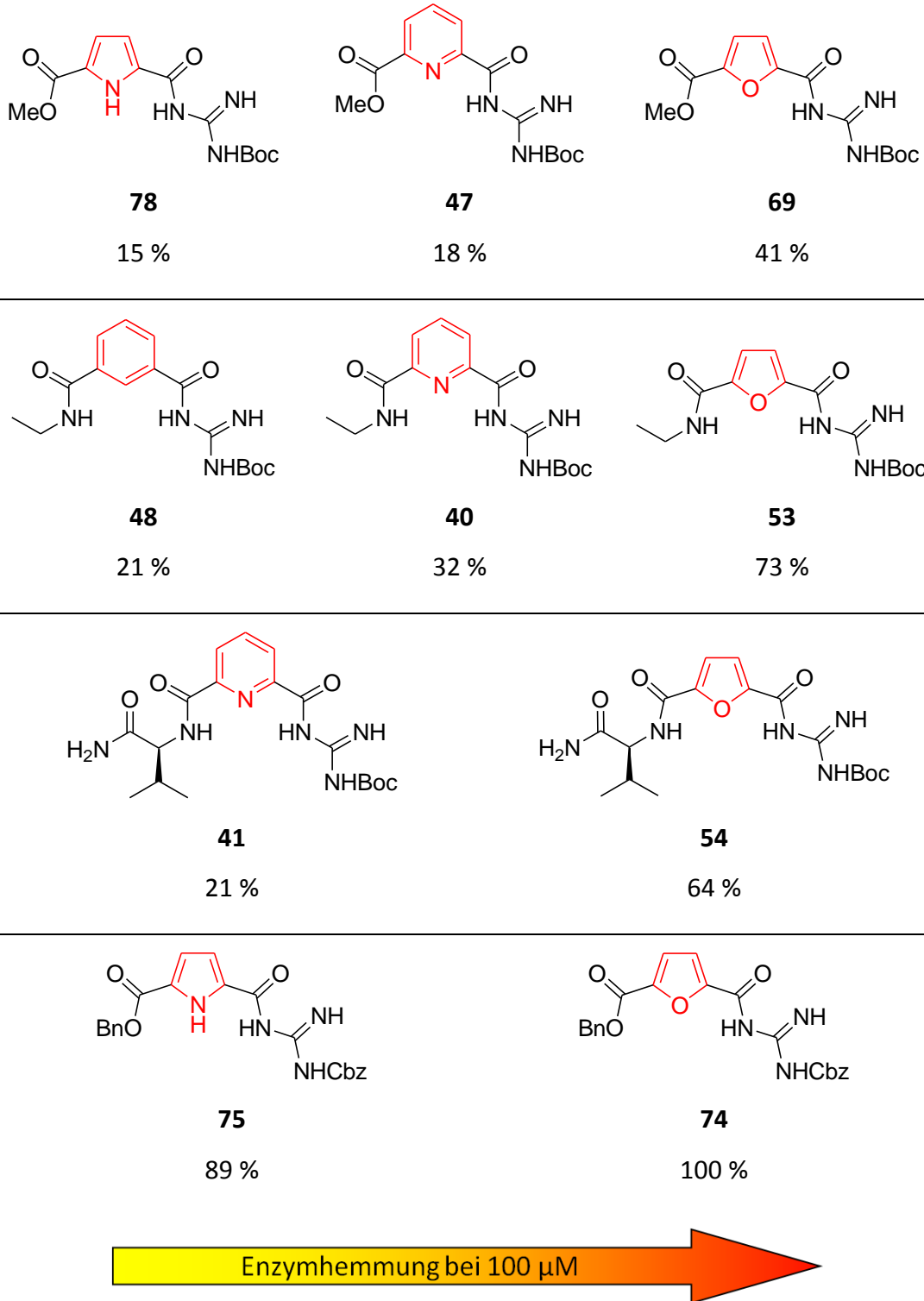
**Abb. 4.17** Vergleich der Hemmung von Falcipain-2 von Verbindungen verschiedener Polaritäten

Bei einem pH-Wert von 5,5, den Bedingungen des Enzym-Assays, liegen Carbonsäuren deprotoniert, also in anionischer Form vor. Somit kann man erklären, dass die Inhibierung von Falcipain-2 für die Carboxylate **61** und **70** so gering ausfallen im Gegensatz zum Benzylester **72**, der recht gute Hemmeigenschaften aufweist. Die Verbindung **67** stellt in dieser Reihe ein Spezialfall dar, da diese die einzige am Guanidin entschützte Verbindung ist, die überhaupt Falcipain-2 effektiv hemmen kann. Diese Tatsache kann leicht durch den niedrigen  $pK_a$ -Wert von 5,6 erklärt werden. Dieser konnte experimentell mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung durch Zugabe von einem halben Äquivalent Natronlauge zu einer 1 mM wässrigen Lösung von **67** bestimmt werden. Durch Messen des pH-Werts dieser Lösung wurde der  $pK_a$ -Wert von 5,6 erhalten. Eine entsprechende pH-Kurve der Titration einer sauren Lösung von **67** mit verdünnter Salzsäure ist in **Abb. 4.18** dargestellt.



**Abb. 4.18** Titrationskurve einer Lösung von Furanverbindung **67**

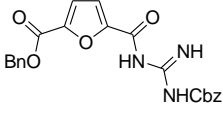
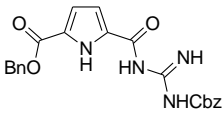
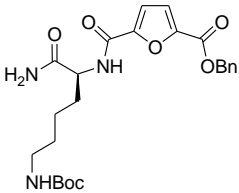
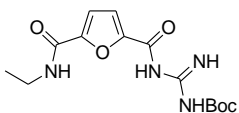
Bei einem pH-Wert von 5.5 liegt der Guanidinrest folglich nicht vollständig protoniert vor, so dass die Polarität im Vergleich zu geladenen Guanidiniocarbonylverbindungen, z.B. auf Pyrrol-Basis, erheblich herabgesetzt ist. Es findet deshalb eine Hemmung von Falcipain-2 statt – zwar nicht so effektiv wie bei der vergleichbaren geschützten Verbindung **53**, aber mit 50 % Hemmung höher als alle am Guanidin entschützten Pyrrolderivate, welche überhaupt keine Inhibitoreigenschaften bei einer Konzentration von 100 μM aufweisen. Eine weitere Tendenz wird hier auch bestätigt: je größer und unpolarer die Strukturelemente sind, desto besser die Hemmeigenschaften. Bei den Analoga **61** und **70**, die sich nur durch einen Methyl- bzw. Benzylester unterscheiden, findet man bei 100 μM Inhibitorkonzentration für **61** nahezu keine Hemmung (7 %), jedoch kann für **70** ein Effekt auf das Enzym beobachtet werden (36 %). Vergleicht man strukturverwandte Verbindungen, so kann auf struktur- und bausteinabhängige Einflüsse geschlossen werden. Aus diesem Grund werden nun die hier getesteten analogen Verbindungen mit unterschiedlichen aromatischen Grundbausteinen, gegebenenfalls unter Einbezug von Screeningdaten passender Substanzen aus vorangegangenen Screenings, miteinander verglichen.



**Abb. 4.19** Hemmung von Falcipain-2 von Verbindungen auf Basis verschiedener Aromaten

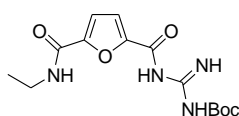
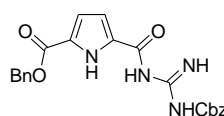
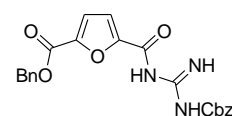
In der oben stehenden Übersicht sind alle Verbindungen mit den Werten der prozentualen Hemmung in einer Reihe aufgelistet, die jeweils die gleichen Reste am aromatischen Grundbaustein besitzen. D.h. nur der Aromat variiert von Benzol über Pyridin und Furan bis Pyrrol. In der ersten Reihe sind Verbindungen gegenübergestellt, die zum Einen einen Boc-

geschützten Guanidinrest und zum Anderen einen Methylesterrest besitzen. Insgesamt inhibieren diese drei Verbindungen Falcipain-2 mit Werten von 15 bis 41 % nur schlecht bis mäßig aufgrund des recht polaren Charakters der Verbindungen. Sie besitzen lediglich die Boc-Schutzgruppe am Guanidin als lipophilen Rest. In dieser Reihe schneidet als zentraler Aromat das Furan vor dem Pyridin und dem Pyrrol am besten ab. Die Verbindungen der zweiten Reihe besitzen ebenso einen Boc-geschützten Guanidinrest und diesmal einen Ethylamidrest. Durch die etwas unpolare Ethylgruppe im Vergleich zum Methylester zuvor liegen die Werte mit 21 bis 73 % etwas höher. Auch diesmal erhält man als die entsprechende Furanverbindung **53** als den mit Abstand besten Vertreter im Vergleich zu den beiden sechsgliedrigen Aromaten. In Reihe drei der **Abb. 4.19** wird die Bevorzugung des Furans erneut deutlich: mit 64 % prozentualer Hemmung von Falcipain-2 durch **54** vor dem Pyridin-basierenden Inhibitor **41** mit 21 % ist hier der Unterschied sichtbar. Die *iso*-Propylgruppe vom Valinrest scheint hier keinen positiven Effekt auf die Inhibitoreigenschaften zu haben. In der letzten Reihe der Übersicht befinden sich zwei analoge Inhibitoren auf Pyrrol- und Furan-Basis. Verbindung **75** und **74** besitzen einen Cbz-geschützten Guanidinrest und eine Benzylesterfunktion, wobei die Pyrrolverbindung **75** bereits in Arbeiten von *Langolf* charakterisiert wurde.<sup>[7]</sup> Beide Verbindungen zeigen sehr gute Hemmeigenschaften gegenüber der Cysteinproteasen und gehen damit als die besten Verbindungen aus dem Screening hervor. In **Tab. 4.3** sind nochmals alle erhaltenen Daten der besten drei Inhibitoren aus diesem Screening und Verbindung **75** mit allen Ergebnissen aus den Enzym-Assays aufgeführt.

Struktur	Nummer	FP-2			Rd		
		Inh.	IC <sub>50</sub>	K <sub>i</sub>	Inh.	IC <sub>50</sub>	K <sub>i</sub>
		(%)	( $\mu$ M)	( $\mu$ M)	(%)	( $\mu$ M)	( $\mu$ M)
	<b>74</b>	100	7.70	2.08	98	1.60	0.032
	<b>75</b>	89	22.3	7.70	95	2.39	0.05
	<b>72</b>	80	16.7	6.08	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>53</b>	73	32.4	11.6	63	n.d.	n.d.

**Tab. 4.3** Messergebnisse an den isolierten Enzymen für die besten Verbindungen des Screenings

Um zu überprüfen, ob diese neue Inhibitor-Klasse auch aktiv gegenüber den Erregern von Malaria bzw. der Schlafkrankheit ist, wurden in verschiedenen Kooperationen<sup>[106,107]</sup> erste mikrobiologische Tests mit den Verbindungen **53**, **75** und **74** durchgeführt. Ebenso wurden Tests auf Zytotoxizität, antibakterielle Wirkung, Biofilminhibition, Fungizität und leishmanizide Wirkung durchgeführt. Bei der Biofilminhibition, Fungizität, antibakteriellen und leishmaniziden Wirkung wurde kein Effekt beobachtet. Die übrigen Ergebnisse sind in **Tab. 4.4** zusammengefasst.

**53****75****74**
**Test auf trypanosomazide Wirkung (*Trypanosoma brucei brucei*)<sup>[105]</sup>**

IC <sub>50</sub> (μM), 48 h	35.8 ± 6.41	9.17 ± 1.05	n.d.
IC <sub>50</sub> (μM), 72 h	> 100	26.7 ± 1.95	n.d.

**Test auf plasmodizide Wirkung (*Plasmodium falciparum*)<sup>[107]</sup>**

IC <sub>50</sub> (μM)	68.1	45.0	132.6
-----------------------	------	------	-------

**Zytotoxizität (Makrophagen J774.1)<sup>[105]</sup>**

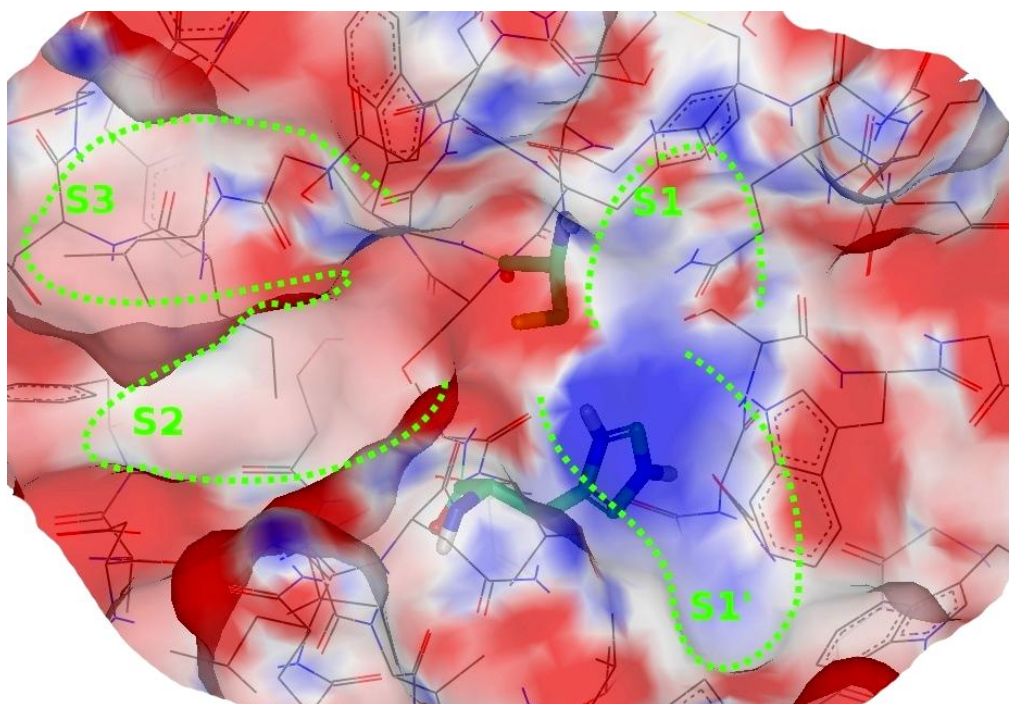
IC <sub>50</sub> (μM)	> 100	> 100	n.d.
-----------------------	-------	-------	------

**Tab. 4.4** Ergebnisse der ersten mikrobiologischen Untersuchungen von **53**, **75** und **74**

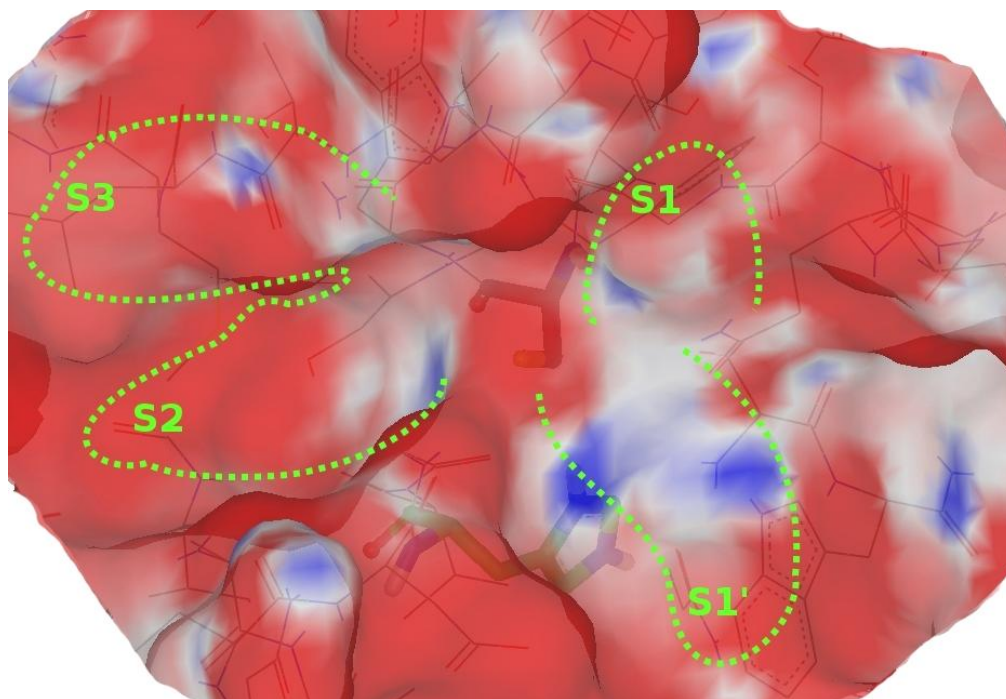
Obwohl zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein vollständiger Datensatz zu den mikrobiologischen Untersuchungen der drei Verbindungen vorliegt, kann man aus den vorhandenen Daten schließen, dass die gefundenen Inhibitoren auch an den entsprechenden Erregern aktiv sind. Da sie an Makrophagen keine Zytotoxizität aufweisen und bei den anderen mikrobiologischen Untersuchungen keine Wirkung zeigen, ist davon auszugehen, dass der hemmende Effekt an den Erregern auf die Inhibierung der jeweiligen Cysteinprotease zurückzuführen ist. Verbindung **75** z.B. hemmt Falcipain-2 mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 7.70 μM und den Malariaerreger mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 45.0 μM. Für Rhodesain ergibt sich für **75** ein K<sub>i</sub>-Wert von 0.05 μM und am Erreger der Schlafkrankheit ein IC<sub>50</sub>-Wert von 9.17 μM. Abweichungen von den gefundenen Werten am isolierten Enzym kann es dennoch geben, da die Beeinflussung der Entwicklung des Erregers noch von anderen Faktoren abhängt wie z.B. der Bioverfügbarkeit oder dem Metabolismus der jeweiligen Substanz. So zeigt der Furan-basierte Inhibitor **74** die besten Hemmeigenschaften gegenüber dem isolierten Enzym mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 2.08 μM bei Falcipain-2, jedoch an den Plasmodien wurde lediglich ein IC<sub>50</sub>-Wert von 132.6 μM bestimmt. Die erste Vermutung, dass die Furanverbindung **74** die Temperaturen von 37 °C über 48 Stunden während des biologischen Assays nicht Stand hält, wurde widerlegt. Die Verbindung wurde unter Assay-

Bedingungen erst in DMSO gelöst und mit Puffer vermischt. Von dieser Lösung wurde sofort und nach 36 Stunden bei 40 °C ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum mit Wasserunterdrückung aufgenommen. Da keine Zersetzung von **74** beobachtet wurde, kann der hohe  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 132.6  $\mu\text{M}$  an den Plasmodien nur durch eine andere Ursache erklärt werden.

An einigen dieser Verbindungen wurden Docking-Rechnungen von *Rohrer* an Falcipain-2 und an Rhodesain durchgeführt. Hierfür wurde am Computer ein Modell des aktiven Zentrums des Enzyms entworfen.<sup>[16]</sup> Die Kristallstruktur von Falcipain-2 (1YVB) wurde aus der Proteindatenbank<sup>[108]</sup> geladen und der kokristallisierte Inhibitor mit *MOE* (Molecular Operating Environment) entfernt. Danach wurde die verbliebene Proteinstruktur in *Schrödinger MAESTRO* geladen. Der *Schrödinger Protein-Prep-Wizard* wurde benutzt, um Wasserstoffatome hinzuzufügen (hier wurde die Thiolgruppe an Cys 42 manuell deprotoniert und das His 174 manuell protoniert), um die Bindetasche auf konservierte Wasserstoffe zu überprüfen, um die intramolekularen H-Brücken zu optimieren und um die Struktur bis zu einer Standardabweichung von 0.1 Å zu minimieren. Die Bindetasche wurde als ein Würfel mit einer Kantenlänge von 20 Å um Cys 42 und His 174 definiert. In **Abb. 4.20** ist dieses erstellte aktive Zentrum gezeigt. Die hydrophoben Bindungsstellen  $S^1$  bis  $S^3$  und  $S^{1'}$  sind grün hervorgehoben, in der die Aminosäurereste des natürlichen Substrats gebunden werden. Für Rhodesain konnte ebenfalls ein entsprechendes Modell entworfen werden (**Abb. 4.21**).

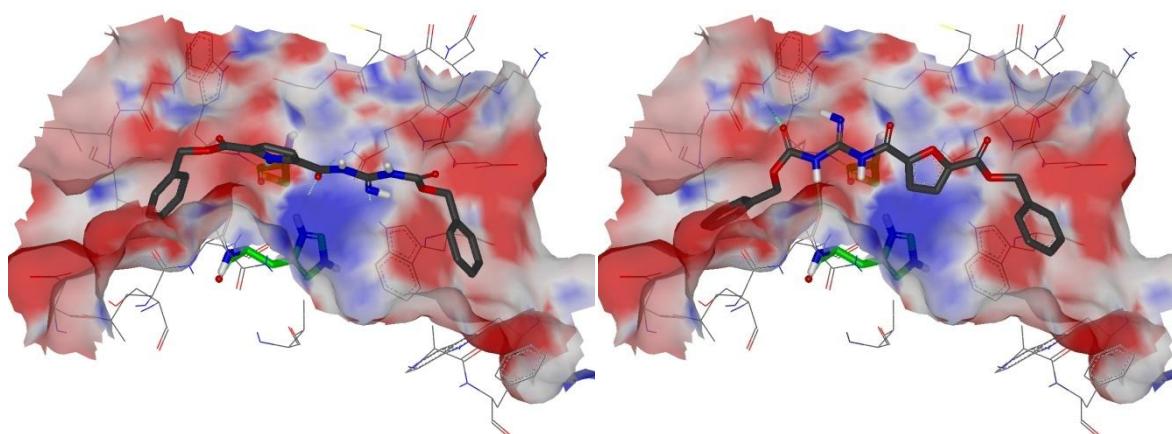


**Abb. 4.20** Aktives Zentrum von Falcipain-2 mit den Bindetaschen  $S^1$  bis  $S^3$  und  $S^{1'}$



**Abb. 4.21** Aktives Zentrum von *Rhodesain* mit den Bindetaschen  $S^1$  bis  $S^3$  und  $S^{1'}$

Nun konnten in diese Modelle verschiedene potentielle Inhibitoren eingefügt werden. Das Docking selbst wurde mit *Schrödinger Glide* im XP-Modus durchgeführt. Die resultierenden Posen wurden als Mol2-File exportiert und mit *OpenEye VIDA3* visualisiert. Die Elektrostatik ist an den verschiedenen Farben der Enzymoberfläche zu erkennen. Die beiden analogen Verbindungen **75** und **74** wurden eingebracht und daraufhin überprüft, wie gut sie den Raum des aktiven Zentrums ausfüllen.



**Abb. 4.22** Docking-Ergebnisse vom Pyrrol **75** (links) und Furan **74** (rechts) im aktiven Zentrum von *Falcipain-2*

Bei diesen beiden erhaltenen Darstellungen ist deutlich ein Unterschied für die Lage im aktiven Zentrum zwischen der Pyrrol- und der Furanverbindung zu sehen. Man hat hier eine genau entgegengesetzte Anordnung der beiden Moleküle in der Protease. Dies könnte einen



möglichen Erklärungsansatz für das unterschiedliche Hemmpotential von **75** und **74** am isolierten Enzym liefern. Bei genauerer Betrachtung des Docking-Ergebnisses der Furanverbindung **74** wird deutlich, dass der Cbz-geschützte Guanidinrest die  $S^2$ -Bindungstasche gut ausfüllt und sich der Benzolring des Benzylesters in der  $S^{1'}$ -Tasche befindet. Bei der Pyrrolverbindung **75** hingegen wird die  $S^2$ -Bindungstasche nicht so optimal besetzt, was das etwas schlechtere Inhibitorvermögen erklären könnte. Es sieht also danach aus, als könnten sich Furane besser im aktiven Zentrum von Falcipain-2 anordnen. Dies gilt es, nun unter anderem durch das Design einer neuen Gruppe an Inhibitoren zu zeigen.

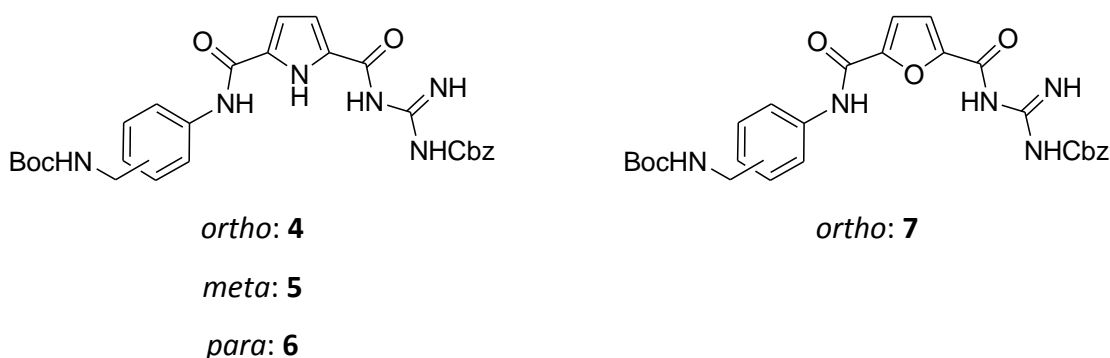
Die bisher gefundenen Ergebnisse, was das Inhibitor-Design betrifft, sollten nun als Ausgangslage für die neu zu synthetisierende Gruppe an Inhibitoren dienen. Die Ergebnisse kann man in einigen Stichpunkten zusammenfassen:

1. Unpolare und ungeladene Strukturelemente haben bessere Hemmeigenschaften als Polare und Geladene.
2. Der geschützte Guanidinrest ist essentiell für eine effektive Inhibierung der Cysteinproteasen.
3. Als zentraler Aromat eignen sich Furan und Pyrrol signifikant besser als Benzol und Pyridin.

Im nächsten Kapitel werden das Design und die Synthese einer neuen Inhibitorgruppe vorgestellt, anschließend die Hemmeigenschaften untersucht und mikrobiologische Testungen beschrieben. Weitere Ergebnisse von Docking-Experimenten der Verbindungen aus dieser Gruppe werden zur Interpretation der erhaltenen Daten herangezogen.

### 4.1.3 Design und Synthese neuer Inhibitoren auf Pyrrol- und Furan-Basis

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen sollte nun die Synthese neuer Inhibitoren entwickelt werden, um diese anschließend auf Hemmeigenschaften an Cysteinproteasen zu untersuchen. Vorlage hierfür sind die Verbindungen **4** bis **7** auf Pyrrol- bzw. Furanbasis von *Langolf*.<sup>[7]</sup> Alle vier Verbindungen besitzen einen Guanidinocarbonylrest und ein unterschiedlich substituiertes Benzoltemplat. Das Templat besteht aus *ortho*-, *meta*- und *para*-Aminobenzylamin. Die aromatische Aminfunktion ist an die Pyrrolcarbonsäure geknüpft, das benzyliche Amin ist Boc-geschützt. Ursprünglich wurde durch Docking-Experimente ein Strukturvorschlag geliefert, der Verbindung **5** in der Boc-entschützten Form entspricht (siehe Kapitel 2.1). Jedoch wurde gefunden, dass die geschützten Vorstufen wesentlich potentere Inhibitoren als die entschützten Verbindungen sind. Bei den Pyrrolen **4** bis **6** konnten bereits alle drei Konstitutionsisomere synthetisiert und weitestgehend untersucht werden. Dabei stellte sich bei den ersten Messungen die *meta*-substituierte Variante **5** als der potenteste Kandidat mit IC<sub>50</sub>-Werten von 12.0 µM an Falcipain-2 und 5.20 µM an Rhodesain dar. Ein erstaunlich hoher Wert wurde für **5** bei den biologischen Tests an Plasmodien (< 0.1 µM) und an Trypanosomen (0.22 µM) gefunden. Die Furanverbindung **7** lieferte einen Wert von 3.59 µM an Rhodesain, biologische Untersuchungen am Erreger stehen hier bis heute noch aus. Mit den Erkenntnissen aus den Screenings und der von *Langolf* gefundenen Hits, sollte ein neuer Inhibitortyp entwickelt werden.



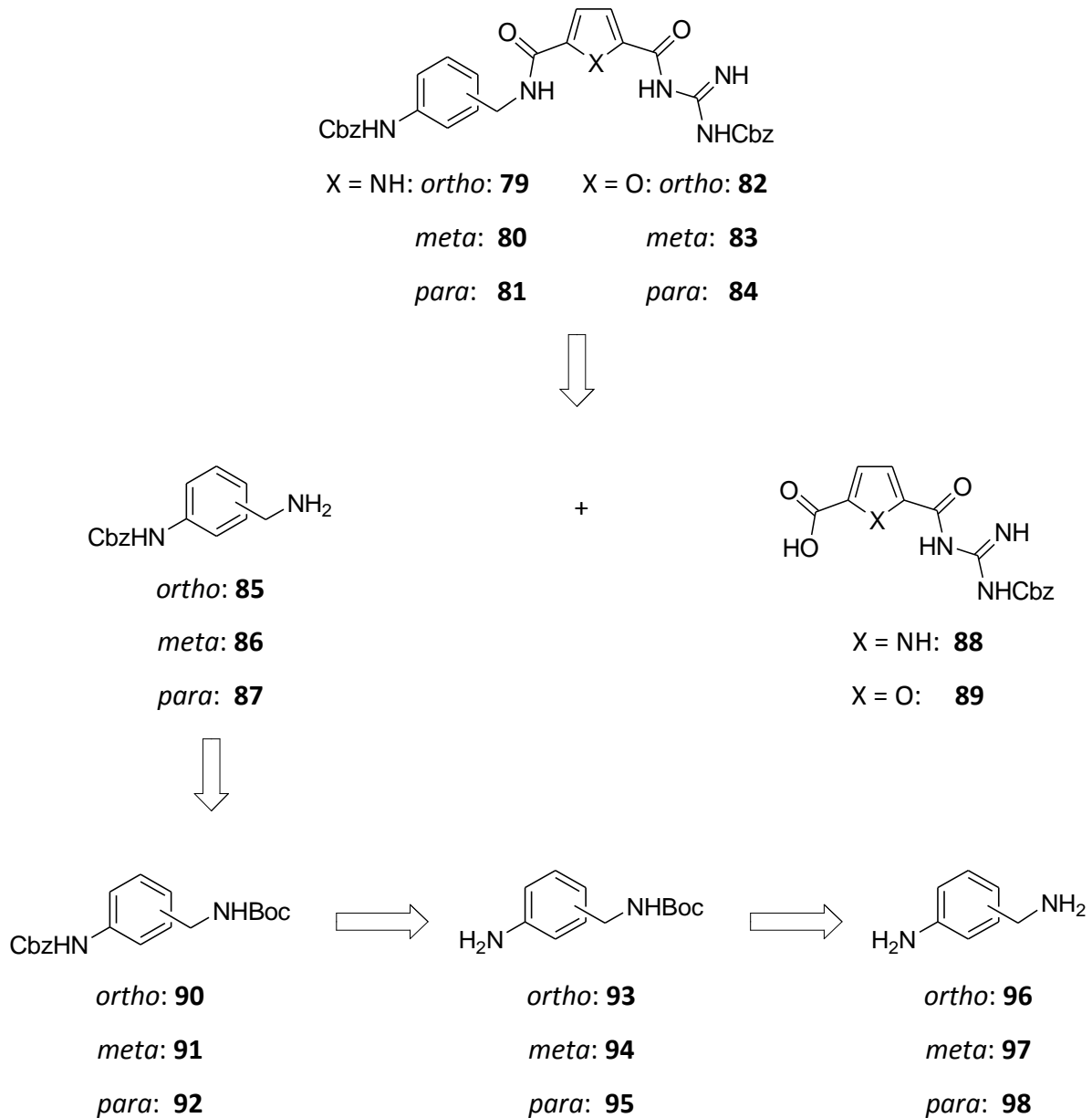
**Abb. 4.23** Bereits existierende Inhibitoren **4** bis **7** von *Langolf*

Es sollten sechs neue Inhibitoren **79** bis **84** synthetisiert werden. Diese Verbindungen sind Konstitutionsisomere, die sich nur entweder am Heteroaromaten bzw. durch das Substitutionsmuster des Benzolrings unterscheiden. Zum einen wurden die Pyrrolderivate **79**

bis **81** und zum anderen die Furanverbindungen **82** bis **84** gewählt. Die offenen Fragen nach den bisherigen Screenings, die mit der Synthese dieser neuen Verbindungen beantwortet werden sollen, kann man folgendermaßen formulieren:

1. Sind Inhibitoren für Falcipain-2 und Rhodesain auf Furan-Basis grundsätzlich besser als solche auf Pyrrol-Basis? Und sind die Hemmwerte an den Erregern in mikrobiologischen Tests bei Furanen grundsätzlich schlechter als bei entsprechenden Pyrrolverbindungen?
2. Ist das Hemmpotential bei Cbz-geschützten Verbindungen größer als bei entsprechenden Boc-geschützten Verbindungen?
3. Ist die Substitution am Benzoltemplat (*ortho*-, *meta*- und *para*-) entscheidend für gute Hemmeigenschaften?

Diese Fragen sollten durch die Wahl der Zielverbindungen und einer ausführlichen Charakterisierung des Inhibitorvermögens beantwortet werden können. Die neuen potentiellen Inhibitoren sind analog zu den Verbindungen **4** bis **7**, sie unterscheiden sich lediglich darin, dass sie anstatt der Boc- eine Cbz-Schutzgruppe besitzen, und dass die CH<sub>2</sub>-Gruppe am Benzoltemplat an der zum Heteroaromat zugewandten Seite sitzt. Damit sollten sie einfacher synthetisch zugänglich sein, da die Peptidkupplung hier nicht über das aromatische sondern über das benzyliche Amin stattfinden kann (siehe **Abb. 4.24**).

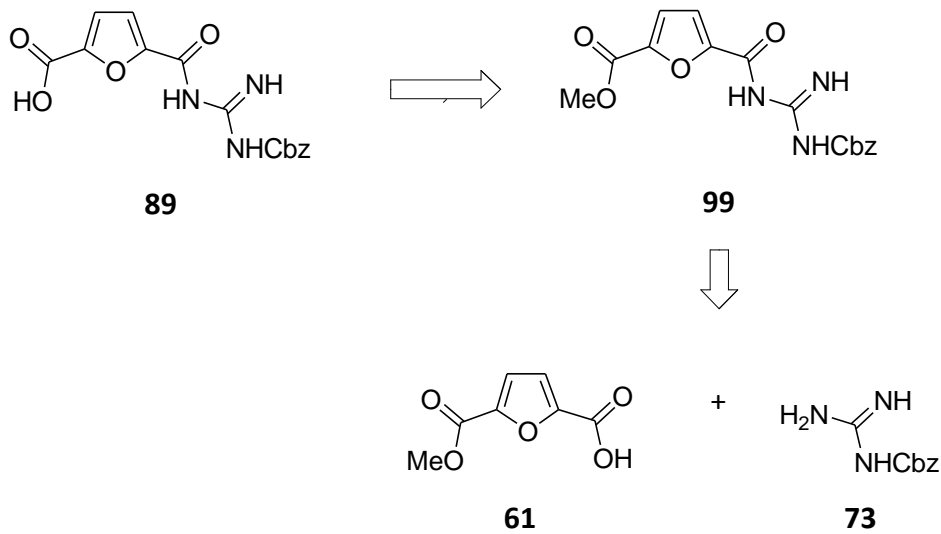


**Abb. 4.24** Retrosyntheseschema der neuen Inhibitoren **79** bis **84**

Die Synthese sollte ausgehend von den Diaminen **96** bis **98** begonnen werden, die sich lediglich im Substitutionsmuster voneinander unterscheiden. Das benzyliche, reaktivere Amin sollte zunächst mit einer Boc-Schutzgruppe versehen werden. Anschließend sollte das aromatische Amin Cbz-geschützt werden und die Boc-Schutzgruppe wieder gespalten werden, um die mono-geschützten Amine **85** bis **87** zu erhalten. Diese Bausteine sollte nun mit den entsprechenden Carbonsäuren **88** und **89** zu den sechs Zielverbindungen **79** bis **84** gekuppelt werden.

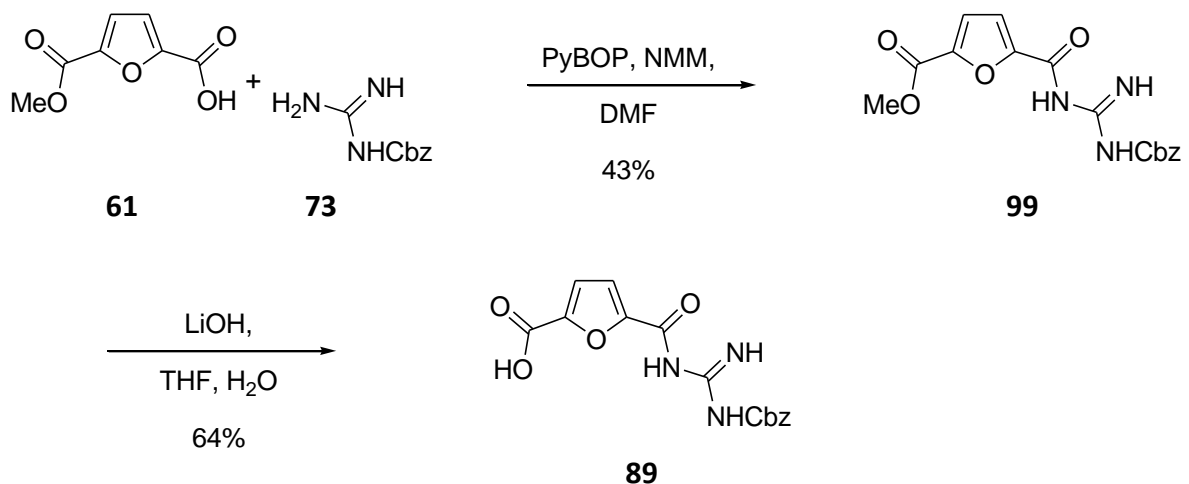
Die Synthese der Pyrrolcarbonsäure **88** wurde standardmäßig nach bekannter Vorschrift durchgeführt, und **88** konnte direkt eingesetzt werden.<sup>[109]</sup> Die Furancarbonsäure **89** wurde

nach einer bereits durchgeführten Synthese von *Langolf* ausgehend von Furancarbonsäure **61** hergestellt werden.<sup>[7]</sup>



**Abb. 4.25** Retrosyntheseschema der Furancarbonsäure **89**

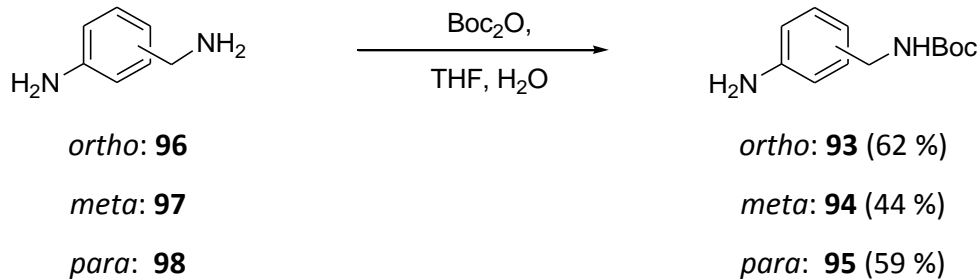
Im ersten Schritt sollte mono-Cbz-geschütztes Guanidin **73** an die Furancarbonsäure **61** gekuppelt werden. Anschließend sollte eine Esterverseifung von **99** zum gewünschten Furanbaustein **89** erfolgen. Die beiden Umsetzungen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 4.26** Synthese der Furancarbonsäure **89**

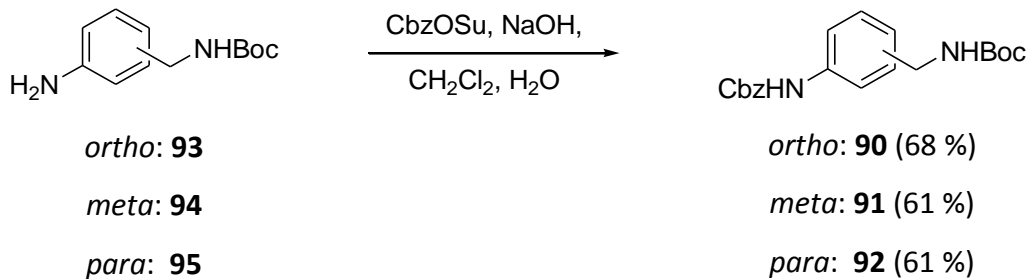
Die Kupplung von Cbz-Guanidin **73** an die Furancarbonsäure **61** gelang mit PyBOP und NMM in DMF in einer Ausbeute von 43 %. Das Produkt **99** wurde durch Kristallisation aus Methanol in sehr reiner Form erhalten. Hier liegt jedoch auch der Grund für die geringere Ausbeute, da es nicht vollständig kristallisierte. Anschließend konnte der Methylester **99** mit

einem Überschuss an Lithiumhydroxid in einer Mischung aus Wasser/THF verseift werden. Durch Kristallisation aus Wasser erhielt man die Furancarbonsäure **89** in einer Ausbeute von 64 %. Die Synthese der mono-Cbz-geschützten Benzoltemplate erfolgte nach dem oben genannten Schema beginnend mit der Boc-Schätzung der Diamine **96** bis **98**.



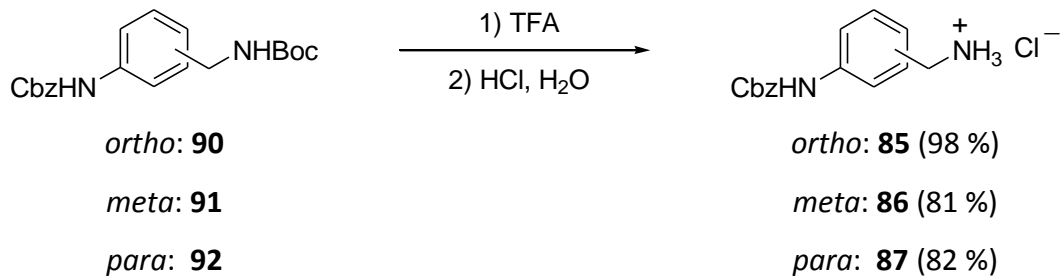
**Abb. 4.27** Mono-Boc-Schätzung der Diamine **96** bis **98**

Die Boc-Schätzung der benzylichen Aminfunktion von **96** bis **98** wurde mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  in einer THF/Wasser-Mischung durchgeführt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Abtrennung an Kieselgel vom Edukt und der entsprechenden Di-Boc-geschützten Verbindungen erhielt man **93** bis **95** in Ausbeuten von 44 bis 62 %.



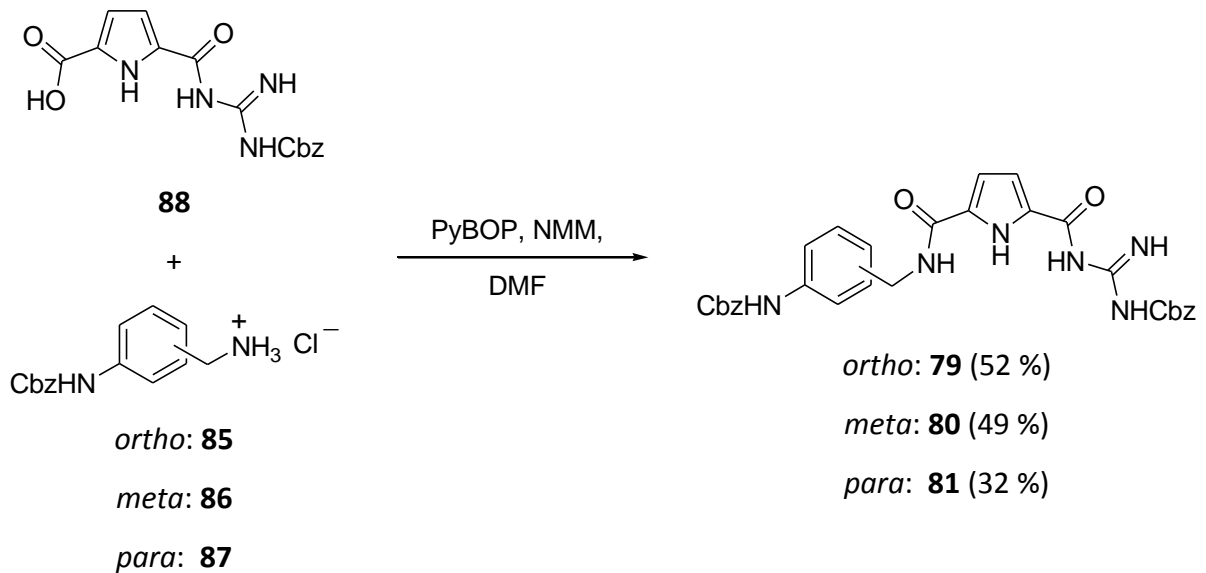
**Abb. 4.28** Cbz-Schätzung der mono-geschützten Amine **93** bis **95**

Anschließend wurde **93** bis **95** in einer Dichlormethan/Wasser-Mischung und Natriumhydroxid als Base mit Cbz-OSu umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel konnten die zweifach geschützten Verbindungen **90** bis **92** mit 61 bis 68 % isoliert werden.



**Abb. 4.29** Boc-Entschützung der Verbindungen **90** bis **92**

Um **85** bis **87** zu erhalten wurde nun die Verbindungen **90** bis **92** mit TFA umgesetzt und die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Nach Umsalzen mit verdünnter Salzsäure konnte die mono-Cbz-geschützten Bausteine **85** bis **87** in Ausbeuten von 81 bis 98 % erhalten werden. Im letzten Schritt wurden die Template an die Pyrrolcarbonsäure **88** gekuppelt.

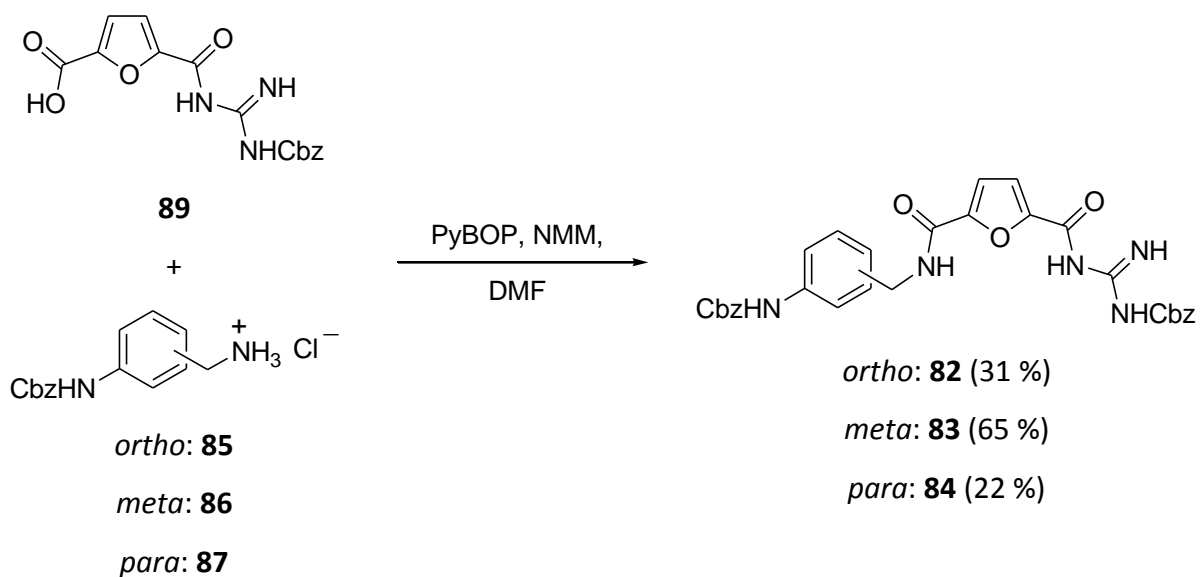


**Abb. 4.30** Synthese der Inhibitoren **79** bis **81** auf Pyrrol-Basis

Dazu wurde PyBOP als Kupplungsreagenz, NMM als Base und DMF als Lösungsmittel verwendet. Die Pyrrolverbindungen **79** bis **81** wurden nach Aufarbeitung entweder säulenchromatographisch an Kieselgel oder durch mehrmalige Kristallisation aus einem Wasser-DMF-Gemisch gereinigt und konnten in Ausbeuten von 32 bis 52 % erhalten werden. Die recht moderaten Ausbeuten sind zum einen auf einen schlechten Umsatz der Reaktion, zum größten Teil aber auf die Aufarbeitung zurückzuführen. Um den Reaktionsumsatz zu steigern, könnte ein anderes Kupplungsreagenz wie z.B. HCTU verwendet werden. Die Aufarbeitung war dadurch erschwert, da die Ansätze im mikromolaren Bereich durchgeführt wurden. Bei größeren Ansätzen sollte zumindest die Kristallisation einfacher durchzuführen

sein und damit geringere Ausbeuteverluste bei der Aufarbeitung ergeben. Weitere Optimierungsversuche wurden hier nicht unternommen, die angegebenen Ausbeuten beziehen sich jeweils auf den ersten und einzigen Syntheserversuch des entsprechenden Inhibitors.

Zur Darstellung der entsprechenden Furanverbindungen **82** bis **84** konnten die gleichen Bedingungen angewendet werden. Die Synthese unterscheidet sich lediglich in der Aufarbeitung, da hier aufgrund der begrenzten Stabilität der hydrolyseempfindlichen Furane auf Kieselgel auf eine säulenchromatographische Trennung verzichtet werden musste.



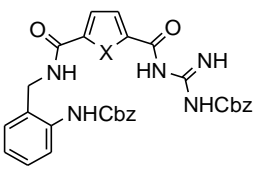
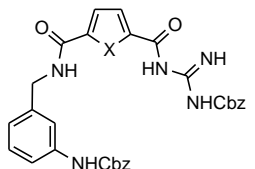
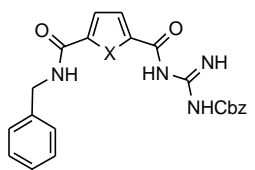
**Abb. 4.31** Synthese der Inhibitoren **82** bis **84** auf Furan-Basis

Die Inhibitoren auf Furan-Basis **82** bis **84** konnten durch Kristallisation zu 22 bis 65 % isoliert werden. Auch hier kann man deutlich sehen, dass die Ausbeute für die entsprechende *para*-substituierte Verbindung **84** am kleinsten ist. Bei der entsprechenden Pyrrolverbindung **81** ist die Ausbeute ebenfalls geringer als bei der *ortho*- und bei der *meta*-Version. Gleich ob Furan oder Pyrrol, die jeweils *para*-substituierten Verbindungen **81** und **84** zeichnen sich durch eine schlechtere Löslichkeit und ein schlechteres Laufverhalten an Kieselgel bei der Dünnschichtchromatographie aus. Auch bei den Furanderivaten wurden diese Kupplungen nicht weiter optimiert und die angegebenen Ausbeuten entsprechen den ersten Syntheseansätzen. Die Wahl des Kupplungsreagenzes könnte noch bedacht werden, da bei allen Inhibitoren stets das Phosphanoxid, ein Nebenprodukt bei der PyBOP-Kupplung, als Verunreinigung auftrat und abgetrennt werden musste. Für die Furanverbindungen könnte



trotz der schlechten Löslichkeit in Wasser-Methanol-Gemischen eine Reinigung über RP-18-Kieselgel in Betracht gezogen werden.

Nun konnten diese sechs Verbindungen zunächst bei 100  $\mu\text{M}$  Inhibitorkonzentration, wie zuvor beschrieben, mit Rhodesain getestet werden. Anschließend wurden noch die  $\text{IC}_{50}$ - und  $K_i$ -Werte bestimmt. Messungen an Falcipain-2 konnten für diese Inhibitoren nicht nach dem gleichen Assay durchgeführt werden, da das Enzym nicht vorrätig war. In einer Kooperationsarbeit<sup>[110]</sup> konnten schließlich  $\text{IC}_{50}$ -Werte an Falcipain-2 bestimmt werden, jedoch unter geringfügig anderen Bedingungen und mit einem anderen Substrat (Cbz-Leu-Arg-AMC). Hierbei wurde auch die Hemmung von Falcipain-3 für diese Verbindungen untersucht, jedoch wurde diese weitere essentielle Cysteinprotease des Malariaerregers nicht durch die Verbindungen **79** bis **84** beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in **Tab. 4.5** dargestellt.

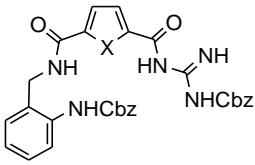
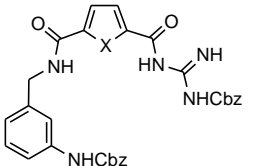
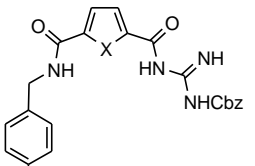
Struktur	X	Nummer	Rd			Fp-2
			100 $\mu\text{M}$ (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
	X = NH	<b>79</b>	98	5.37	0.097	1.12*
	X = O	<b>82</b>	100	4.66	0.14	3.26*
	X = NH	<b>80</b>	97	5.15	0.087	4.80*
	X = O	<b>83</b>	99	2.35	0.040	2.49*
	X = NH	<b>81</b>	98	1.37	0.028	1.87*
	X = O	<b>84</b>	99	4.04	0.060	2.34*

**Tab. 4.5** Messergebnisse der Inhibitoren **79** bis **84** an Rhodesain und Falcipain-2 (\*bestimmt in einer Kooperation<sup>[110]</sup> mit Cbz-Leu-Arg-AMC als Substrat unter analogen Bedingungen)

Das Hemmpotential aller Inhibitoren **79** bis **84** liegt in einem ähnlichen Bereich. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für Rhodesain liegen zwischen 1.37 und 5.37  $\mu\text{M}$  und die  $K_i$ -Werte zwischen 0.04 und 0.14  $\mu\text{M}$ . Es ist der grobe Trend zu erkennen, dass das Hemmpotential bei Rhodesain vom

Substitutionsmuster am Benzoltemplat abhängig ist und in folgender Reihe steigt: *ortho* < *meta* < *para*. Bei Falcipain-2 ist dieser Trend nicht so eindeutig, hier liegen die IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 1.12 und 4.80 µM.

Ein großes Problem dieser Verbindungsklasse stellt die schlechte Löslichkeit im wässrigen Medium dar. Es wurde zwar während des Enzym-Assays keine Kristallisation der Inhibitoren beobachtet, jedoch ist dies aufgrund der geringen Substanzmenge in den weißen Mikrotiterplatten nicht auszuschließen. Deshalb wurde in Löslichkeitstests gezeigt, dass die Inhibitoren bei einer Konzentration von 10 µM in einer wässrigen Pufferlösung mit 10 % DMSO-Anteil vollständig gelöst sind. Diese Konzentration wurde gewählt, da die IC<sub>50</sub>-Werte etwas unterhalb dieser Konzentration liegen. Die Löslichkeitsprobleme setzten sich bei den biologischen Tests an den Trypanosomen und bei der Bestimmung der Zytotoxizität der Inhibitoren weiter fort. Durch Veränderungen der biologischen Assays, z.B. durch die Verwendung niedrigerer Inhibitorkonzentrationen oder die Erhöhung des DMSO-Anteils, sollen die Werte in einer Kooperationsarbeit<sup>[106]</sup> nochmals bestätigt werden. Damit soll eine physikalische Hemmung des Erregerwachstums ausgeschlossen werden. Bis dato sind die Ergebnisse dieser Tests jedoch noch nicht vorhanden. Die Tests an den Plasmodien konnten in beiden Kooperationen mit Kiel<sup>[107]</sup> und mit San Francisco<sup>[110]</sup> ohne Löslichkeitsprobleme durchgeführt werden. Die in den biologischen Assays erhaltenen Werte sind in **Tab. 4.6** aufgeführt.

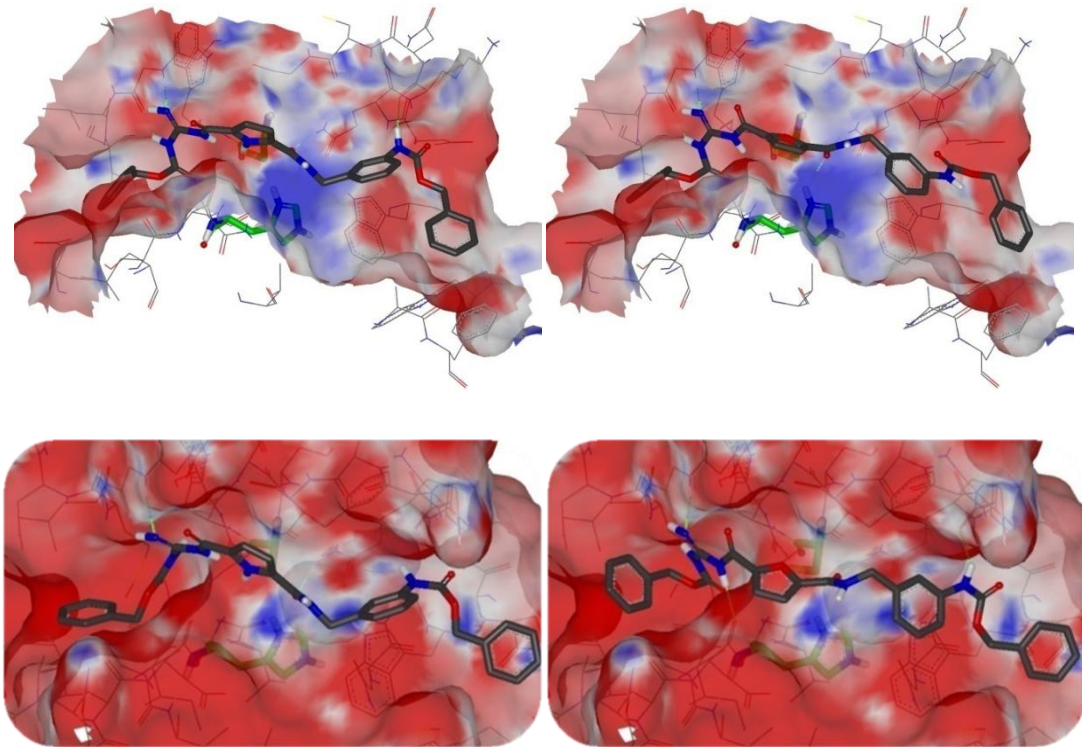
Struktur	Nr.	T. b. b. <sup>[106]</sup>		P. f. <sup>[107]</sup>	Zytotoxizität <sup>[106]</sup>	
			IC <sub>50</sub> μM	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	
	X = NH	79	48 h	1.23 ± 0.49	7.52 ± 1.90 / 4.18*	> 100
			72 h	1.63 ± 0.31		
	X = O	82	48 h	2.28 ± 0.19	6.34 ± 1.47 /9.85*	> 100
			72 h	2.70 ± 0.21		
	X = NH	80	48 h	2.49 ± 0.84	3.38 ± 0.23 / 4.91*	> 100
			72 h	2.71 ± 0.39		
	X = O	83	48 h	8.31 ± 1.45	6.45 ± 0.68	> 100
			72 h	15.74 ± 3.43		
	X = NH	81	48 h	> 100	3.69 ± 4.86	33.7
			72 h	> 100		
	X = O	84	48 h	5.65 ± 1.67	1.06 ± 0.30	54.85
			72 h	14.4 ± 5.13		

**Tab. 4.6** Messergebnisse der biologischen Tests der Inhibitoren **79** bis **84** (T.b.b.: *Trypanosoma brucei brucei*, P.f.: *Plasmodium falciparum*, Zytotoxizität: Makrophagen J774.1, \*bestimmt in einer Kooperationsarbeit<sup>[110]</sup> an einem anderen Plasmodienstamm)

Alle sechs Verbindungen sind in der Lage, beide Erregertypen mit IC<sub>50</sub>-Werten von etwa 1 bis 15 μM zu hemmen. Sie liegen damit im Bereich einiger bereits existierender Wirkstoffe gegen Malaria und der Schlafkrankheit. Für die Inhibitoren **79**, **80** und **82** ergaben die aus beiden Kooperationen unabhängigen Messungen an den verschiedenen Plasmodienstämmen ebenfalls ähnliche Werte. Zwischen den Tests an den Plasmodien und den Trypanosomen sind keine bemerkenswerten Unterschiede festzustellen. Auch das Substitutionsmuster am Benzoltemplat scheint keinen eindeutigen Einfluss auf die Wirkung an den Erregern zu haben. Alle IC<sub>50</sub>-Werte liegen in der gleichen Größenordnung. Eine Ausnahme bildet **81** beim Test an den Trypanosomen. Es konnte trotz zweimaliger Durchführung des Bio-Assays keine Aktivität unterhalb einer Konzentration von 100 μM bestimmt werden. Ein möglicher Grund könnte hier die schlechtere Löslichkeit der *para*-substituierten Verbindungen **81** und **84** sein. Es könnte sein, dass der Inhibitor für eine Aktivität in einer zu geringen Konzentration vorlag. Bei der Bestimmung der Zytotoxizität an

Makrophagen fällt auf, dass nur die *para*-substituierten Verbindungen **81** und **84** im untersuchten Konzentrationsbereich  $IC_{50}$ -Werte zwischen etwa 30 und 50  $\mu M$  aufweisen. Alle anders substituierten Verbindungen zeigen keine toxischen Eigenschaften unter diesen Bedingungen. Es scheint, als ob bei den *para*-substituierten Verbindungen noch ein Nebeneffekt in deren Wirkspektrum vorliegt.

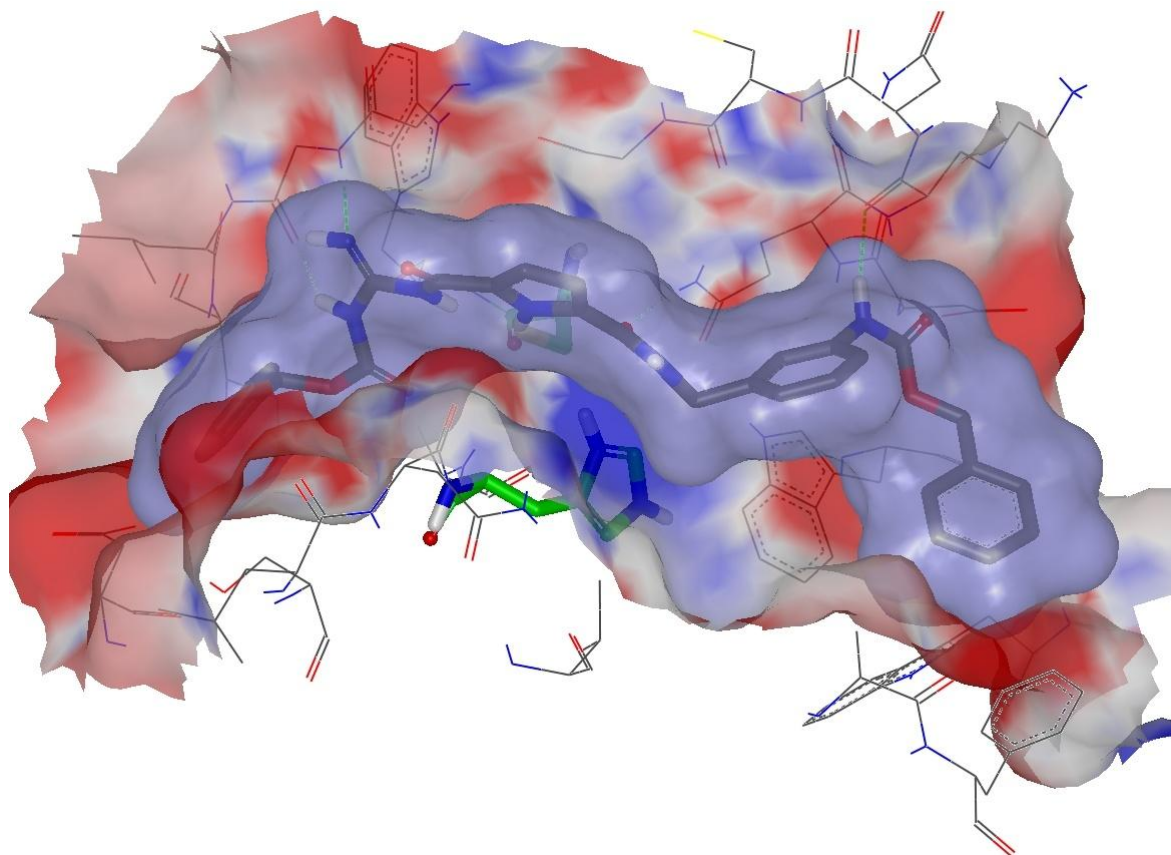
Auch an einigen dieser Verbindungen wurden Docking-Rechnungen von *Rohrer* an Falcipain-2 und an Rhodesain durchgeführt.<sup>[16]</sup> Im folgenden Abschnitt sollen diese Ergebnisse in Bezug auf die experimentellen Daten für zwei ausgewählte Inhibitoren diskutiert werden, und damit mögliche Erklärungen für die guten Hemmeigenschaften gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Rechnungen für beiden analogen Verbindungen **80** und **83** sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 4.32** Inhibitoren **80** und **83** im aktiven Zentrum von Falcipain-2 (oben) und Rhodesain (unten)

Man kann hier sehr schön erkennen, dass die Inhibitoren eine ähnliche Ausrichtung in der Bindungstasche aufweisen. Der geschützte Guanidinrest befindet sich in der Nähe der  $S^2$ -Tasche, so dass der Benzolring der Cbz-Gruppe in dieser sitzen kann. Die  $S^3$ -Bindungstasche ist laut diesen Berechnungen nicht besetzt, dafür belegt das Benzoltemplat den Raum um den Bindungstaschen  $S^1$  und  $S^{1'}$ . Es ist deutlich zu erkennen, dass alle Verbindungen den

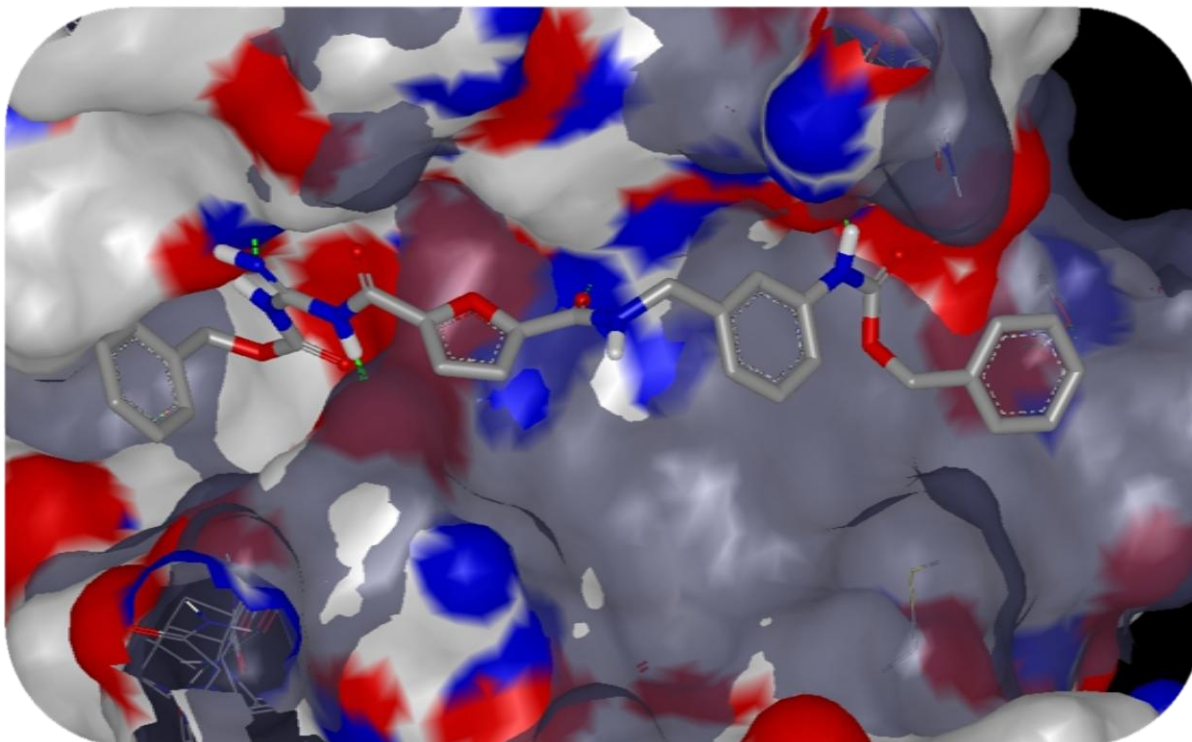
Raum im aktiven Zentrum gut ausfüllen, dies ist nochmals in **Abb. 4.33** an einem Beispiel verdeutlicht.



**Abb. 4.33** Die Bindungstasche von Falcipain-2 wird von Inhibitor **80** nahezu vollständig ausgefüllt.

Die Bindetaschen  $S^2$  und  $S^1$  werden gut ausgefüllt,  $S^2$  ist durch die Cbz-Schutzgruppe optimal besetzt. Der Raum von  $S^1$  wird durch das Benzoltemplat nicht vollständig beansprucht, hier sind prinzipiell auch etwas größere Aromaten möglich. Die  $S^3$ -Bindetasche ist laut diesen Rechnungen gar nicht besetzt und könnte durch einen weiteren Substituenten am Guanidin ausgefüllt werden. Man kann anhand dieser Docking-Experimente die guten Inhibitoreigenschaften erklären, jedoch ist auch ersichtlich, dass die Verbindungsklasse weiter optimiert werden kann.

Da auch für Rhodesain ein entsprechendes Modell für Docking-Experimente entwickelt wurde, können die beiden Enzyme miteinander verglichen werden. Auf diese Weise könnten neue Ideen zur besseren Selektivität neuer Inhibitoren für eine der Proteasen erhalten werden. In **Abb. 4.34** ist ein direkter Vergleich der aktiven Zentren von Falcipain-2 und Rhodesain mit dem Inhibitor **83** dargestellt.



**Abb. 4.34** Inhibitor **83** in überlagerten Bindungstaschen von Falcipain-2 (farbig) und Rhodesain (grau)

Mit diesem Vergleich lässt sich erklären, warum die Inhibitoren Rhodesain besser hemmen als Falcipain-2. Die Proteinoberfläche von Rhodesain wurde hier in grau über die farbige Oberfläche von Falcipain-2 gelegt. Vor allem in der Region der  $S^{1'}$ -Bindetasche kann man erkennen, dass das aktive Zentrum bei Rhodesain etwas kleiner ist. An dieser Stelle können die Inhibitoren also den Raum besser ausfüllen als bei Falcipain-2. Hier besteht aus diesem Grund jedoch auch die Möglichkeit, die Selektivität der Inhibitoren zu verbessern. Verbindungen mit größeren unpolaren organischen Gruppen in der Region des Benzoltemplats sollten Falcipain-2 besser inhibieren als Rhodesain.

Grundlegend bei den Docking-Rechnungen und bei der Auswertung der Enzym-Assays ist es, dass es sich bei dieser Verbindungsklasse um kompetitive reversible Inhibitoren handelt, die nichtkovalent mit dem aktiven Zentrum der Proteasen wechselwirken. Diese Reversibilität ist jedoch aus den bisherigen experimentellen Versuchen an den Enzymen nicht belegt. Zur Unterscheidung, ob ein Inhibitor reversibel oder irreversibel ist, bieten sich die Dialyse, Gelfiltration, Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmung oder auch die tryptische Verdauung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes an. Zunächst wurde die Dialyse eines Vertreters der Inhibitoren durchgeführt werden. Man inkubiert das Enzym mit dem Inhibitor, und es bildet sich der Enzym-Inhibitor-Komplex. Nun wird die Restenzymaktivität bestimmt,

die in dem Fall eines guten Inhibitors kaum vorhanden ist. In mehreren Zeitabständen wird nun die Enzymrestaktivität der mit Puffer gespülten Probe bestimmt. Falls der Inhibitor reversibel ist und deshalb der Komplex wieder dissoziieren kann, wird er durch eine proteinundurchlässige Membran weggespült. Das Enzym regeneriert sich, und man kann nach einer bestimmten Zeit die ursprüngliche Aktivität der Protease wieder herstellen. Bei einem irreversiblen Inhibitor bleibt die Hemmung bestehen. Die Dialyse wurde an einer anderen Cysteinprotease durchgeführt, für die das praktische Vorgehen bereits bekannt war. Hierzu wurde Cathepsin B gewählt, eine humane lysosomale Cysteinprotease, die an der Apoptose von Tumorzellen beteiligt ist.<sup>[111]</sup> Cathepsin B ( $c = 1.45 \text{ mg/ml}$ ) wurde zusammen mit dem Inhibitor **80** ( $c = 400 \text{ }\mu\text{M}$ ) in Tris-Puffer ( $c = 50 \text{ mM}$ ), Natriumchlorid ( $200 \text{ mM}$ ), EDTA ( $5 \text{ mM}$ ), DTT ( $2 \text{ mM}$ ) bei pH 6.5 inkubiert. Gleichzeitig wurde auch jeweils eine Probe ohne Inhibitor und eine mit E-64 als Kontrollexperimente durchgeführt. Die Messung ohne Inhibitor wurde mit reinem DMSO durchgeführt und diente als Referenz für die Restenzymaktivität. Der irreversible Inhibitor E-64 wurde als positive Kontrolle verwendet. Nach 3 min wurde die Enzymaktivität aller Proben überprüft. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in eine Dialyse-Apparatur überführt und mit Puffer unter Eiskühlung dialysiert. Im Abstand von jeweils einer Stunde wurde die Enzymaktivität erneut überprüft. Die Aktivität des Enzyms im Kontrollversuch mit reinem DMSO sank nach einer Stunde auf 77 %, nach zwei Stunden auf 53 % und nach drei Stunden auf 25 % der ursprünglichen Aktivität. Dies zeigt, dass die Cysteinprotease unter diesen Bedingungen nur begrenzt stabil ist. Das Umsatz-Zeit-Diagramm des Dialyseexperiments nach drei Stunden ist in **Abb. 4.35** dargestellt.

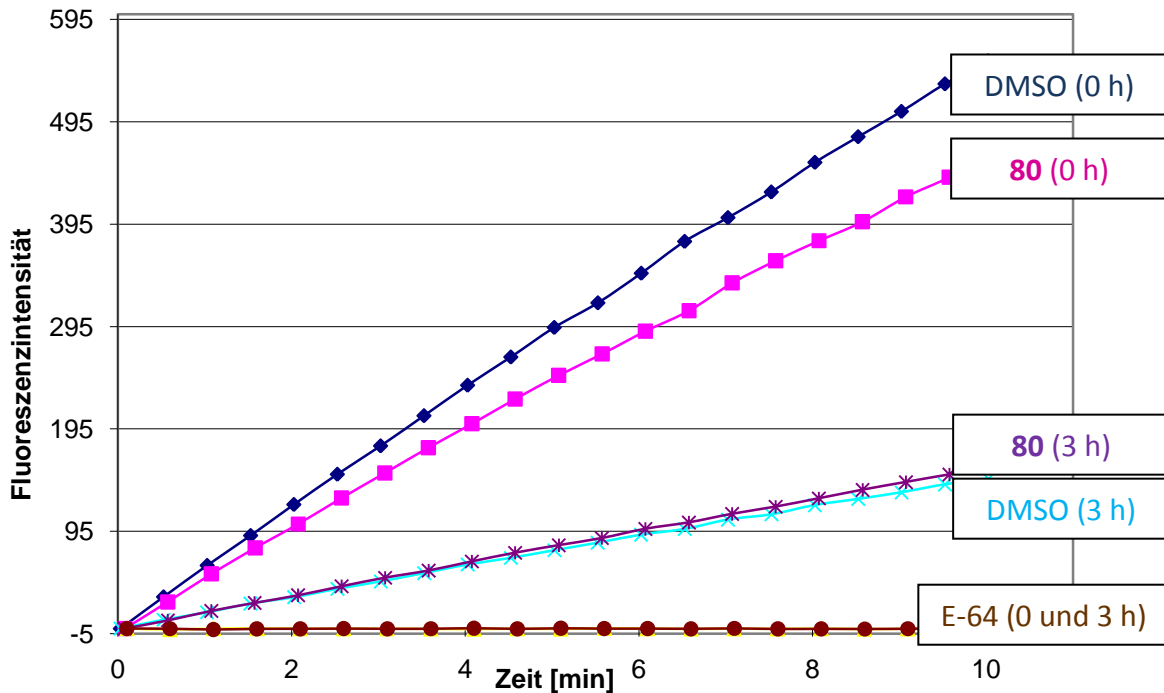


Abb. 4.35 Umsatz-Zeit-Diagramm beim Dialysexperiment des Inhibitors **80** mit E-64 als Vergleichssubstanz

Nach drei Stunden wurde bei der Probe von **80** die Enzymaktivität zurückgewonnen, weshalb man auf eine reversible Hemmung schließen kann. Dieses Experiment allein kann aus zwei Gründen jedoch nicht als Beweis für die Reversibilität gelten. Erstens war der Inhibitor **80** unter den Dialysebedingungen nicht löslich und kristallisierte während des Versuchs aus, und zweitens betrug die Hemmung von Cathepsin B unter diesen Bedingungen zu Beginn der Dialyse nur 15 %. Wahrscheinlich resultierte dieser schlechte Hemmwert aus der unzureichenden Löslichkeit des Inhibitors und der Tatsache, dass sich das Tensid im Puffer befand, das wie oben beschrieben einen Einfluss auf die Substanzklasse im Enzym-Assay hat. Da trotzdem die volle Enzymaktivität durch die Dialyse hergestellt werden konnte, kann man dies zumindest als einen Hinweis auf die Reversibilität interpretieren.

Alles in allem konnte beim klassischen Ansatz gezeigt werden, dass man durch gezielte Veränderungen von Strukturteilen neue sehr potente Inhibitoren finden kann. In Kombination mit den Docking-Experimenten konnte diese Leitstruktur weiterentwickelt werden, bis Inhibitoren mit  $K_i$ -Werten im nanomolaren Bereich gefunden wurden. Aufgrund der viel versprechenden toxikologischen Untersuchungen ist eine Anwendung als Therapeutika dieser Substanzklasse gegen die Schlafkrankheit oder Malaria denkbar.



## 4.2 Inhibitoroptimierung mittels kombinatorischer Chemie

Beim kombinatorischen Ansatz zur Entdeckung neuer Inhibitoren werden durch Screenings von Molekülbibliotheken neue aktive Substanzen identifiziert. Im Folgenden wird zunächst die Entwicklung einer neuen Screeningmethode für festphasengebundene Inhibitorbibliotheken behandelt. Anschließend wird die Synthese der kombinatorischen Bibliothek und die Screeningergebnisse präsentiert. In den beiden letzten Abschnitten werden die Synthese einiger ausgewählter Bibliotheksmitglieder und deren Hemmeigenschaften in Lösung beschrieben.

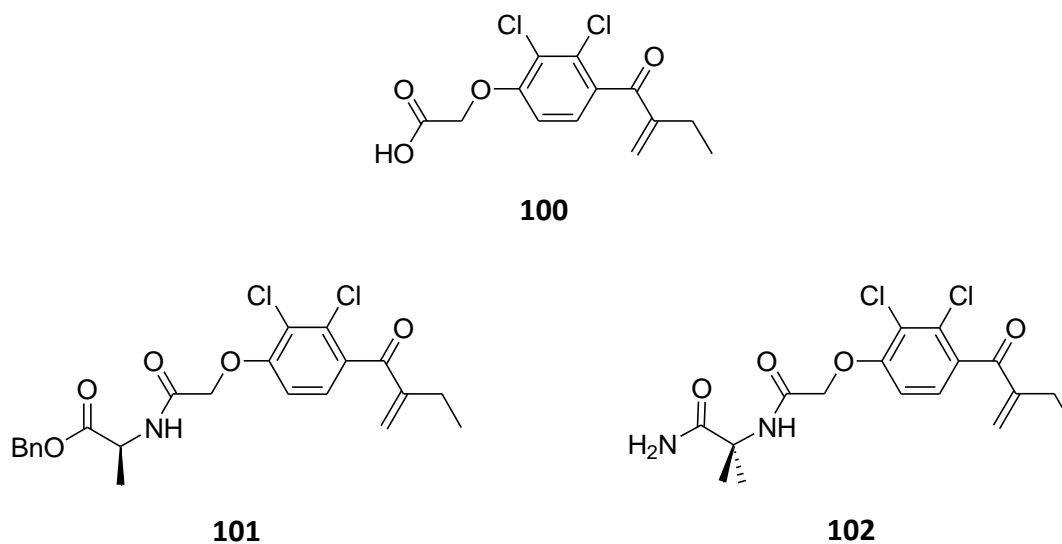
### 4.2.1 Entwicklung der Screeningmethode am Harz

Vor der Synthese einer kombinatorischen Bibliothek musste ein Assay für die beiden Zielproteasen entwickelt werden. Zunächst wurde der Assay an Falcipain-2 getestet. Ein äquivalenter Assay für ein Screening von Inhibitoren in Lösung ist bereits bekannt, ausgehend davon sollte er nun für festphasengebundene Inhibitoren modifiziert werden. Dabei wurde zunächst die Frage nach dem zu verwendenden Harz geklärt, anschließend wurde ein festphasengebundener Inhibitor hergestellt, um Testmessungen durchführen und die Assay-Bedingungen optimieren zu können. Es sind bereits Festphasen-Assays für Proteasen bekannt, bei denen einzelne Inhibitoren identifiziert werden können (siehe Kapitel 3.5.4). Die neu entwickelte Screeningmethode soll es jedoch möglich machen, eine Abstufung der prozentualen Hemmung für alle Mitglieder der kombinatorischen Inhibitorbibliothek zu erhalten. Aus diesem Grund sollte, ähnlich wie in den bereits beschriebenen Screenings in Lösung, die festphasengebundene Substanz mit dem Enzym inkubiert werden, und anschließend die Enzymrestaktivität bestimmt werden. Auf diese Weise würde man für alle Mitglieder der Bibliothek einen Wert für die prozentuale Hemmung erhalten, und man könnte neben den besten Inhibitoren auch schlechte oder mittelmäßige identifizieren können.

Bei der Wahl des Harzes wurde auf bereits in Kapitel 3.5 diskutierte literaturbekannte Erfahrungen gebaut. Sie fiel auf PEGA-Harz, das vollständig aus PEG-Ketten aufgebaut ist. TentaGel wurde aufgrund der möglicherweise auftretenden unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen ausgeschlossen. Das ebenfalls geeignete HiCore-Harz ist kommerziell nicht erhältlich und wurde aus diesem Grund nicht gewählt. Das PEGA-Harz

wurde gerade für Protease-Assays schon häufig verwendet und stellt damit ein für diese Zwecke erfolgversprechendes Harz dar.

Im zweiten Schritt wurde die Synthese einiger Testinhibitoren an PEGA-Harz durchgeführt. Es wurde ein geeigneter Inhibitor benötigt, der in Lösung gute Hemmeigenschaften an Falcipain-2 aufweist. Die Etacrynsäureamide **101** und **102** stellen bereits bekannte Inhibitoren von Cysteinproteasen dar.<sup>[112]</sup> Die  $K_i$ -Werte betragen  $62.3 \mu\text{M}$  für **101** und  $111 \mu\text{M}$  für **102**. Da die Etacrynsäure (**100**) leicht über die Säurefunktion in einer Peptidkupplungsreaktion an festphasengebundene Aminfunktionen eingeführt werden kann, sollte der Etacrynsäurebaustein an PEGA-Harz eingeführt werden.



**Abb. 4.36** Etacrynsäure **100** und die Etacrynsäureamide **101** und **102**

Die Testinhibitoren sollten außer dem Etacrynsäurederivat noch unterschiedlich große peptidische Linker besitzen, damit Informationen über dessen Einfluss auf die Hemmstärke gewonnen werden können. Für festphasengebundene Verbindungen und damit auch für deren Reaktionen gilt der Effekt der hohen Verdünnung („hypercentropic efficacy“), welcher besagt, dass diese Verbindungen am polymeren Träger trotz gleicher Menge mit einer vergleichbaren Verbindung in Lösung als stark verdünnt zu betrachten ist.<sup>[113]</sup> Das bedeutet für Reaktionen an der festen Phase, dass diese vergleichsweise langsamer ablaufen. Aus diesem Grund wird standardmäßig ein hoher Überschuss an Reagenzien eingesetzt, um dem entgegen zu wirken. Für ein Enzym-Assay ist dieser Effekt ebenfalls von Bedeutung, da die Protease den festphasengebundenen Inhibitor erreichen muss, um blockiert zu werden. Ein größerer Linker könnte diesem Effekt zumindest zum Teil entgegenwirken und eine



einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde mit einem negativen Kaisertest<sup>[114]</sup> für freie festphasengebundene Aminfunktionen (siehe Kapitel 4.2.2.1) und die Abspaltungen der Fmoc-Schutzgruppen mit einem positiven Test bestätigt. Abschließend wurden die festphasengebundenen Substanzen **105** bis **107** mit DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Als nächstes wurde die Frage geklärt, wie ein festphasengebundener Inhibitor in einer definierten Menge auf die Mikrotiterplatten überführt werden kann. Im Vergleich zum bereits existierenden Fluoreszenz-Assay für Falcipain-2 kann keine Lösung des Inhibitors in DMSO zur Enzymlösung gegeben werden. Ein weiteres Problem stellt die Menge des Inhibitors dar: Da man für festphasengebundene Verbindungen den Effekt der Verdünnung berücksichtigen muss, war eine theoretische Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nicht ausreichend, um eine vergleichbare Hemmung wie in Lösung zu erhalten. Die Stoffmenge muss für harzgebundene Verbindungen höher liegen. Gewählt wurde eine Gesamtkonzentration von 0.64 mM während des Assays, bezogen auf die theoretische Beladung des PEGA-Harzes. Man kann hier eigentlich von einer Konzentration sprechen, da eine Suspension des Harzes in der Lösung vorliegt. Als nächstes wurde getestet, ob sich das PEGA-Harz isopyknotisch im Lösungsmittel suspendieren lässt. Im Idealfall besitzt das Harz in einer isopyknotischen Mischung die gleiche Dichte wie das Solvens, so dass sich die Harzkügelchen gleichmäßig verteilen. Auf diese Weise ist es möglich, eine definierte Menge des Harzes in einem bestimmten Volumen zu entnehmen. So wurde PEGA-Harz eingewogen und Puffer bzw. DMSO dazugegeben. Von dieser konzentrierteren Stammlösung (20 mg/ml) sollten dann später 20  $\mu\text{l}$  zu der Enzymlösung gegeben werden, um die erwünschte Gesamtkonzentration von 0.64 mM zu erreichen. Dabei zeigte sich, dass sich die Harzkügelchen in DMSO gleichmäßig verteilen, sich jedoch in der wässrigen Lösung sehr schnell am Gefäßboden absetzen. DMSO schien also das Lösungsmittel der Wahl zu sein. So wurden für die erste Testmessung Proben der festphasengebundenen Inhibitoren **105** bis **107** in DMSO suspendiert und anschließend der Assay mit den in **Tab. 4.7** angegebenen Konzentrationen durchgeführt. Nach zwei Minuten Inkubationszeit wurde die Substratlösung zugegeben (Gesamtkonzentration von 40  $\mu\text{M}$ ), die Suspension vermischt und über das Fluorimeter die Enzymaktivität der Probe im Vergleich zu einer Blindprobe von PEGA-Harz bestimmt. Jede Probe wurde doppelt unter den gleichen Bedingungen, jedoch unabhängig voneinander

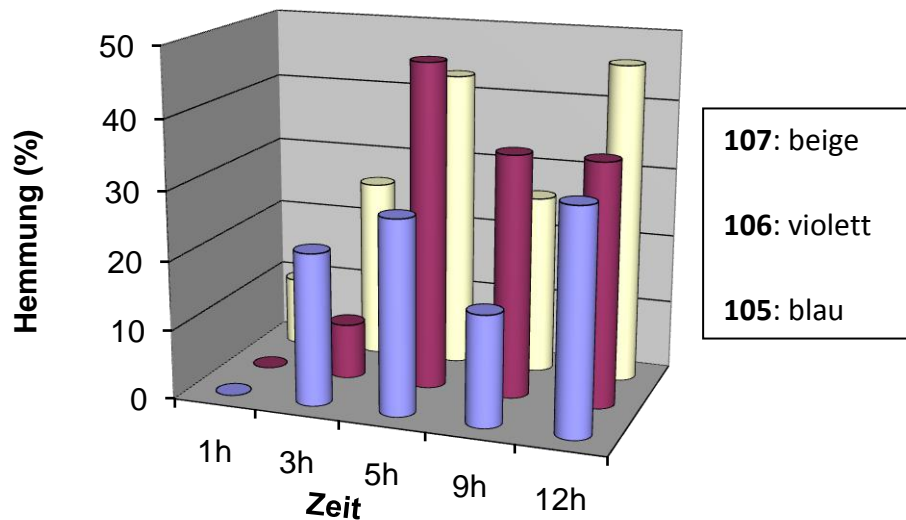
gemessen, um bereits einen ersten Eindruck auf die Reproduzierbarkeit dieser Messwerte zu erhalten.

Pufferinhalt	Konzentration	Pufferinhalt	Konzentration
Natriumacetat	45 mM	EDTA	4.5 mM
Natriumchlorid	180 mM	DTT	200 $\mu$ M
Falcpain-2	0.4 mg/ml	Substrat (Cbz-Phe-Arg-AMC)	40 $\mu$ M

**Tab. 4.7** Konzentrationen der Bestandteile des wässrigen Puffers (pH = 5.5) im Enzym-Assay an der Festphase

Hierbei konnte keinerlei Hemmung durch die festphasengebundenen Etacrynsäurederivate beobachtet werden. Ebenso konnte aber auch festgestellt werden, dass das PEGA-Harz wie erwartet keinen erheblichen Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Wie in Kapitel 3.5 bereits erläutert wurden die literaturbekannten „on bead“-Protein-Assays immer mit Inkubationszeiten von mehreren Stunden durchgeführt. So sollte als nächstes der Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Hemmstärke erarbeitet werden. Dazu wurden fünf verschiedene Inkubationszeiten gewählt, das heißt, es wurde Enzym mit den festphasengebundenen Inhibitoren **105** bis **107** bzw. mit dem PEGA-Harz als Vergleich zusammengegeben und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde dann das Substrat zugegeben und mit dem Fluorimeter die Spaltung des Substrats beobachtet.

Hier konnte zwar erstmals eine Hemmung der Protease im Vergleich zur Blindprobe beobachtet werden, jedoch wurden keine reproduzierbaren Werte erhalten. Durch eine starke Abnahme der Enzymaktivität bei den größeren Inkubationszeiten hat sich unter diesen Bedingungen vermutlich das Enzym zum großen Teil zersetzt. Dadurch wird die Fehlerspannbreite groß und man erhält keine reproduzierbaren Werte. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Parameter verändert, und zwar die Temperatur während der Inkubation. Die Mikrotiterplatten mit den inkubierten Enzymlösungen wurden bei 9 °C im Kühlschrank aufbewahrt, dann das Substrat zugegeben und die Suspension vermischt. Unter diesen Bedingungen konnten nun Hemmwerte bestimmt werden, die in **Abb. 4.38** dargestellt sind.



**Abb. 4.38** Prozentuale Hemmung der Etacrynsäurederivate bei verschiedenen Inkubationszeiten (bei 9 °C)

Die Werte für die Hemmung auch bei längeren Inkubationszeiten werden größer. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass das Enzym bei festphasengebundenen Inhibitoren mehr Zeit benötigt, diese zu binden und damit blockiert zu werden. Bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden konnten die Messwerte am besten reproduziert werden, bei den kürzeren Zeiten waren die Schwankungen zwischen Einzelmessungen größer. Man kann hier außerdem erkennen, dass mit Zunahme des peptidischen Linkers auch die Hemmung der Enzymaktivität zunimmt. Hierbei ist jedoch entscheidend, dass auch bei Verbindung **105**, die keinen Linker enthält, eine Hemmung detektiert werden kann. Die Wahl der Inkubationszeit scheint bei dieser Methode jedoch entscheidender zu sein als die Einführung eines Linkers.

Die aus den Testmessungen erhaltenen Bedingungen für die Durchführung dieses neuen Enzym-Assays für festphasengebundene Inhibitoren entsprechen den in **Tab. 4.7** angegebenen Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 9 °C. Dies scheinen die optimalen Bedingungen für diesen Protease-Assay zu sein. Diese Screeningbedingungen für Falciapin-2 lassen sich auch auf Rhodesain, wie später in Kapitel 4.2.3 erläutert, übertragen. Es wurden keine Testmessungen an Rhodesain durchgeführt.

Im nächsten Kapitel werden nun das Design und die Synthese der kombinatorischen Inhibitorbibliothek diskutiert und im darauffolgenden Abschnitt die Screeningergebnisse der Bibliothek an Falcipain-2 und Rhodesain unter den oben genannten Bedingungen präsentiert.

#### 4.2.2 Synthese und Design der kombinatorischen Inhibitorbibliothek

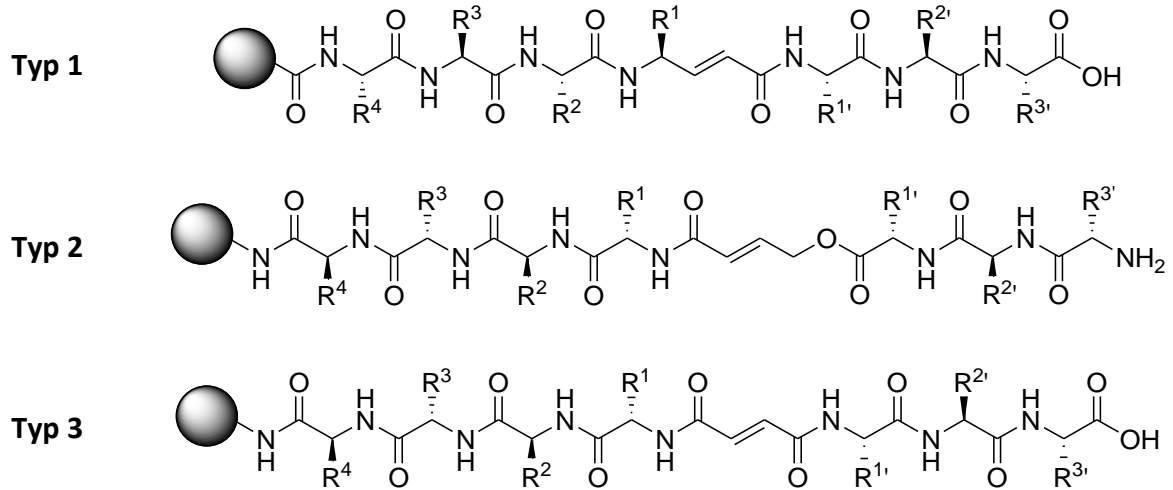
Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, sollten die Mitglieder der kombinatorischen Inhibitorbibliothek das natürliche Substrat der Proteasen imitieren und damit einen peptidischen Grundaufbau besitzen. Als nukleophiles Angriffszentrum für den Cysteinrest der Enzyme wurde ein elektrophiler Baustein eingeführt. Beim Design der Bibliothek mussten für einen erfolgreichen kombinatorischen Ansatz die folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Die Festphasensynthese muss an einem für das Screening geeigneten Harz durchgeführt werden können.
2. Der Inhibitor muss an einem Harz synthetisiert werden können, von dem er abgespalten und in Lösung untersucht werden kann.
3. Alle Reaktionsschritte müssen quantitativ ablaufen, um mögliche festphasen-gebundene Nebenprodukte zu vermeiden.

Diese Anforderungen an das Design wurden anhand der folgenden Arbeitsschritte bearbeitet und überprüft:

1. An einem Harz wird die Synthese eines Prototyps getestet und der Inhibitor anschließend abgespalten und in Lösung charakterisiert.
2. Die Festphasensynthese an einem für das Screening geeigneten Harz wird anhand geeigneter Farbttests überprüft.
3. Die Inhibitorbibliothek wird synthetisiert.
4. Die Inhibitorbibliothek wird auf Hemmung der Cysteinproteasen getestet.
5. Einige ausgewählte Vertreter werden synthetisiert und deren Hemmeigenschaften in Lösung mit denen an der Festphase verglichen.

Im Verlauf der Arbeit wurden drei unterschiedliche Strukturtypen solcher festphasengebundener Inhibitoren untersucht. Diese besitzen alle ein Michael-System als elektrophiles Zentrum und eine Peptidumgebung. Die drei Inhibortypen sind in **Abb. 4.39** dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäurereste erfolgte in Anlehnung an die von *Schechter* und *Berger* verwendete Nomenklatur für Proteasen und ihre Substrate.<sup>[115]</sup>



**Abb. 4.39** Drei Inhibitortypen für kombinatorische Inhibitorbibliotheken

Bei Typ 1 handelt es sich um einen harzgebundenen Inhibitor, der als elektrophiles Zentrum eine mit einem Michael-System modifizierte Aminosäure aufweist. Der Inhibitortyp 2 besitzt ein Hydroxycrotonsäurebauelement als zentrales Element, das mit den umgebenden Aminosäuren zum einen über die Carbonsäurefunktion in einer Amidbindung und zum anderen über den Alkohol in einer Esterfunktion verknüpft ist. Bei dem dritten Typ befindet sich zentral ein Fumarsäurediamid als Verknüpfungsstelle zwischen den Peptidketten. In den folgenden Kapiteln werden jeweils die Versuche zu den drei verschiedenen Inhibitortypen nacheinander beschrieben.

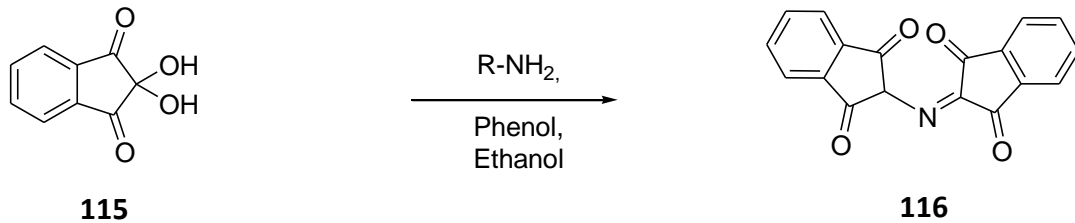




Butylester-geschützte Aminosäuren, die nach jedem Kupplungsschritt im Sauren gespalten werden sollen. Der MBHA-Linker hält den sauren Bedingungen stand. So sollte im ersten Schritt Cbz-Glu-O<sup>t</sup>Bu an das MBHA-Harz **114** gekuppelt und anschließend die *tert*-Butylesterfunktion gespalten werden, um **113** zu erhalten. Danach sollten Aminosäure-*tert*-butylester über deren freie Aminfunktionen an die feste Phase gekuppelt und jeweils die Esterfunktion im Sauren gespalten werden, bis das Tripeptid **112** entstanden ist. Dann sollte ein Aminoalkohol über die Aminfunktion an das Peptid gebunden werden, wobei hier für den Testinhibitor Alaninol verwendet werden sollte. Die Hydroxylfunktion von **111** sollte dann „on bead“ zum entsprechenden Aldehyd **110** oxidiert werden. In einer Horner-Wadsworth-Emmons-Variante (HWE) der Wittig-Reaktion sollte dann das *E*-konfigurierte Michael-System **109** aufgebaut werden. An die Carbonsäurefunktion von **109** sollten nun weitere Aminosäuren wie zuvor beschrieben gekuppelt werden. Im letzten Schritt sollte die Abspaltung des Inhibitors vom MBHA-Harz unter stark sauren Bedingungen erfolgen. Die Herausforderung bei diesem Inhibitortyp bestand darin, dass nicht nur Peptidkupplungen sondern auch andere organische Reaktionen an der festen Phase durchgeführt werden sollten: eine Oxidation von einem Alkohol zu einem Aldehyd und eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion. Es gibt bis heute zahlreiche Reaktionen der klassischen organischen Chemie, die zur Festphasensynthese modifiziert wurden.<sup>[118-121]</sup> Problematisch bei diesen publizierten Vorschriften ist, dass nie der Reaktionsumsatz an der Festphase überprüft wurde. Nach Abspaltung vom Harz wurden lediglich Ausbeuten der gesamten Synthesen angegeben, und oftmals mussten Nebenprodukte abgetrennt werden. Für den kombinatorischen Ansatz muss die Umsetzung jedoch quantitativ erfolgen. Dafür werden geeignete Methoden zur Kontrolle der Umsetzungen benötigt.

Zur Überprüfung der einzelnen Reaktionsschritte wurden Farbttests durchgeführt und Abspaltungen vom Harz nach bestimmten Reaktionsschritten vorgenommen, um das entstandene Produkt in Lösung zu charakterisieren. Die Farbttests müssen so beschaffen sein, dass sie harzgebundene Amin-, Carbonsäure-, Alkohol- und Aldehydfunktionen anzeigen können, damit alle Reaktionsschritte kontrolliert werden können. Bevor auf die Festphasensynthese eingegangen wird, sollen zunächst die benutzten Farbttests erläutert werden.

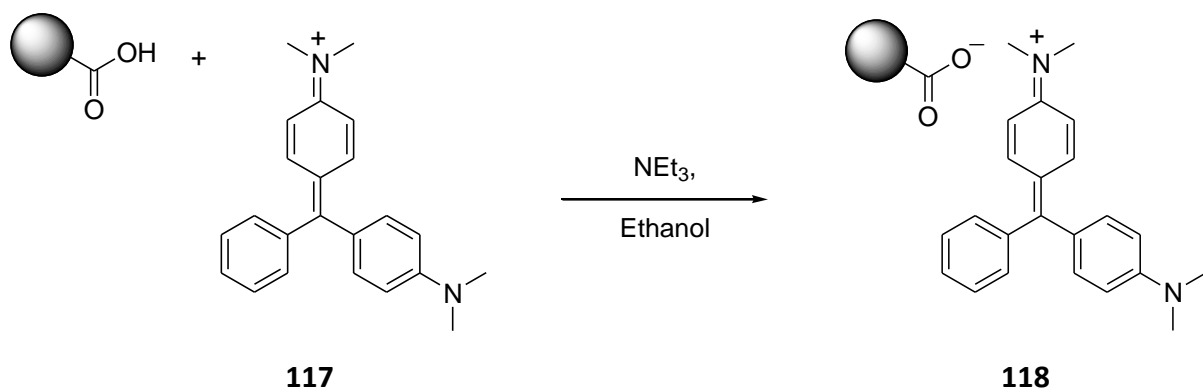
Es existieren für nahezu alle funktionelle Gruppen Farbttests für die Festphasensynthese.<sup>[122,123]</sup> Für Aminfunktionen sind diese Tests am besten etabliert, da sie bei der Standardmethode zur Synthese von Peptiden vom C- zum N-Terminus aussagekräftige Belege zur Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen liefern. Die wohl bekannteste Farbreaktion mit Ninhydrin als Färbereagenz stellt der sogenannte Kaisertest dar.<sup>[114]</sup>



**Abb. 4.41** Kaisertest für festphasengebundene Aminfunktionen

In Gegenwart von freien primären Aminen bildet sich aus dem Ninhydrin der blaue Farbstoff **116**, der die Harzkügelchen anfärbt. In Abwesenheit von Aminfunktionen bzw. bei einem geschützten Amin bleibt das Harz farblos und durchsichtig. Die Durchführung dieses Tests ist einfach und effizient: eine kleine Probe des Harzes wird in ein kleines Glasgefäß überführt und erst mit einer Lösung von Phenol in Ethanol und anschließend mit einer ethanolischen Ninhydrinlösung versetzt. Diese Mischung wird erhitzt und man erhält unmittelbar das Ergebnis, das mit dem bloßen Auge zu erkennen ist.

Für die Kontrolle der inversen Peptidsynthese wurde ein Test für festphasengebundene Carbonsäurefunktionen verwendet. Der sogenannte Malachitgrüntest ist in **Abb. 4.42** dargestellt ist.<sup>[124]</sup>



**Abb. 4.42** Malachitgrüntest für festphasengebundene Carbonsäurefunktionen

Bei diesem Farbttest wurden einige Harzkügelchen in ein kleines Glasgefäß überführt und mit einer ethanolischen Lösung von Malachitgrün (**117**) und etwas Triethylamin versetzt. Die Base deprotonierte die harzgebundene Carbonsäure und das entstandene Carboxylat bildete mit dem Farbstoff eine Salzbrücke und färbt das Harz grün. Anschließend folgte ein intensiver Waschgang des Harzes **118** zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs mit Ethanol, bis die überstehende Lösung farblos war. Bei Anwesenheit von Carboxylatfunktionen blieben die Harzkügelchen grün gefärbt, bei Abwesenheit waren sie durchsichtig und farblos.



**Abb. 4.43** Positiver (links) und negativer (rechts) Malachitgrüntest

Für festphasengebundene Hydroxylfunktionen sind verschiedene Farbreaktionen in der Literatur beschrieben.<sup>[125-128]</sup> Es wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet, die beide in **Abb. 4.44** dargestellt sind. Für diese Versuche wurde OH-funktionalisiertes Wang-Harz verwendet.

Bei der ersten Methode ist das Ziel, unter basischen Bedingungen Trichlortriazin **120** (TCT) als Linker einzuführen, um anschließend einen Farbstoff daran zu binden. Die Hydroxylfunktion greift das TCT nukleophil unter Chlorsubstitution an, in einem zweiten Reaktionsschritt kann dann ein nukleophiler Farbstoff wie z.B. Fuchsin **122** oder Fluorescein **123** ebenfalls durch Chlorsubstitution eingeführt werden und damit die Harzkügelchen anfärben.<sup>[126]</sup> Dieser Farbttest wird im folgenden Teil als TCT-Test bezeichnet. Bei der zweiten Methode wird im ersten Schritt die Alkoholfunktion des Wang-Harzes **119** mit Tosylchlorid in Toluol zu einer besseren Abgangsgruppe umgesetzt und anschließend von *para*-Nitrobenzylpyridin (PNBP) substituiert. Nach Behandlung des Pyridiniumaddukts mit einer Base wie z.B. Piperidin sollte sich die an der benzylichen Position deprotonierte Spezies **127** bilden, die eine violette Färbung zeigt.<sup>[125]</sup> Dieser Farbttest wird im folgenden

Abschnitt PNBP-Test genannt. Sowohl der TCT- als auch der PNBP-Test wurden zunächst an OH-funktionalisiertem Wang-Harz als Positivprobe und an aminfunktionalisiertem MBHA-Harz als Blindprobe getestet. Es sollte hier vorweg ermittelt werden, welcher Test aussagekräftiger zum Verfolgen der Vollständigkeit der Oxidation vom Alkohol zum Aldehyd ist.

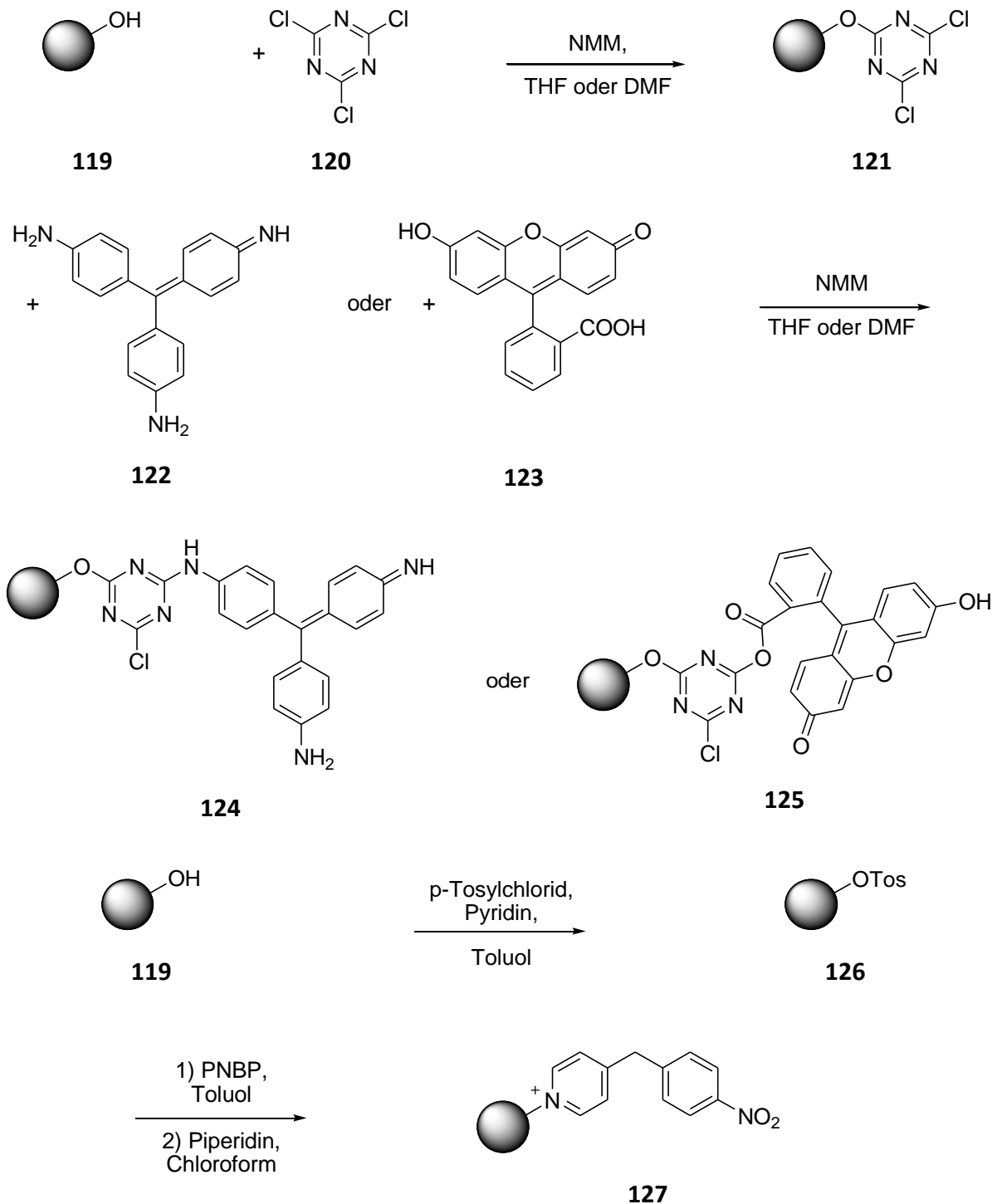
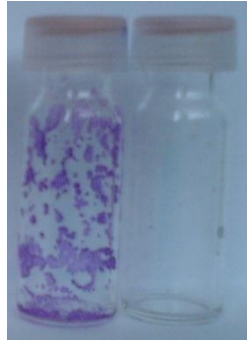


Abb. 4.44 Farbtests für festphasengebundene Alkoholfunktionen; oben: TCT-Test, unten: PNBP-Test

Der TCT-Test lieferte mit Wang-Harz weder für Fuchsin **122** noch für Fluorescein **123** ein positives Ergebnis. Auch nach mehrmaliger Durchführung der Tests blieben die Harzkügelchen stets farblos. Nach erneuter Literaturrecherche zu diesem Farb-Test stellte sich heraus, dass das veröffentlichte Protokoll aufgrund nicht gegebener Reproduzierbarkeit in einer späteren Veröffentlichung modifiziert wurde.<sup>[129]</sup> Nach dieser Vorschrift sollte nun die Reaktionszeit des Harzes mit dem TCT auf 20 Minuten verlängert und dabei auf 70 °C erhitzt werden. Obwohl der TCT-Test nun mit einer Dauer von ca. einer halben Stunde nicht mehr als schnelle Reaktionskontrolle geeignet war, wurde er dennoch unter den neuen Bedingungen mit beiden Farbstoffen **122** und **123** durchgeführt. Das Durchführungsprotokoll führte jedoch auch diesmal nicht zum gewünschten Ergebnis, denn wieder konnte keine Farbänderung der Harzkügelchen festgestellt werden. Weitere Versuche zu diesem ohnehin zeitintensiven Farbttest wurden nicht unternommen, stattdessen wurde der PNB-Test auf seine Tauglichkeit untersucht.

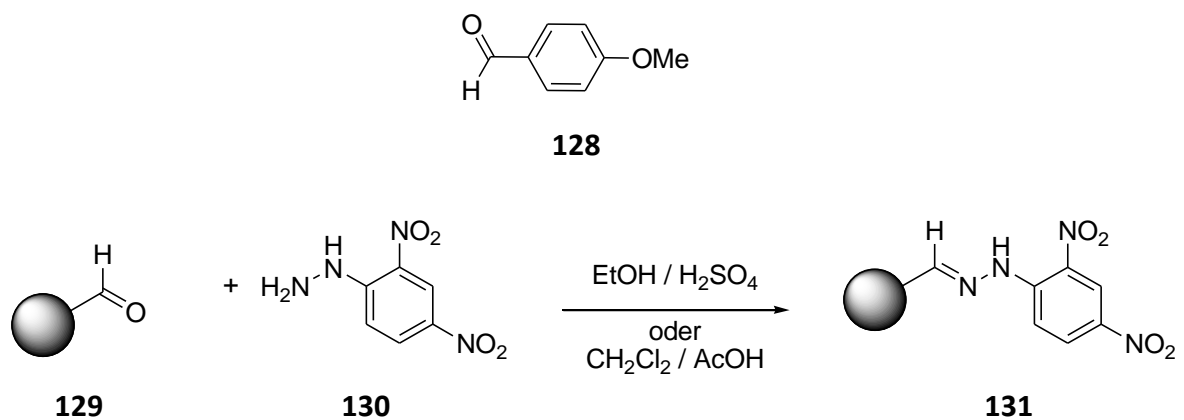
Beim veröffentlichten Protokoll zur Durchführung des PNB-Tests sollte eine Probe des Harzes auf einer Kieselgelfolie zur Dünnschichtchromatographie mit den entsprechenden Reagenzien umgesetzt werden.<sup>[125]</sup> D.h. zu dem Harz wurde zunächst eine Lösung von Tosylchlorid und Pyridin in Toluol und dann eine Lösung von PNB in Toluol gegeben. Die Folie wurde nun von der Unterseite erhitzt bis die Orangefärbung wieder verschwunden war. Zuletzt wurde eine 10 %ige Lösung von Piperidin in Chloroform auf das Harz getropft und die Mischung erneut erhitzt. Nach anschließendem Waschen des Harzes mit Dichlormethan sollte sich die Violettärbung der Harzkügelchen auf dem weißen Untergrund erkennen lassen. Jedoch konnte auf diese Weise nie ein eindeutig positiver Farbttest durchgeführt werden. Ein großes Problem hierbei war, dass es sehr schwierig war, die Harzkügelchen beim Waschen mit Dichlormethan auf der Folie zu halten. Der PNB-Test wurde aus diesem Grund modifiziert und anstatt auf einer Kieselgelfolie in kleinen Glasbehältern durchgeführt. Das Wang- und das MBHA-Harz wurden wie zuvor beschrieben mit den drei Lösungen im offenen Glasgefäß behandelt und erhitzt. Dabei verteilten sich die Harzkügelchen auf der Glasoberfläche. Dieser Test konnte nun mehrmals reproduziert werden, es musste lediglich darauf geachtet werden, dass man das Harz nicht zu lange erhitzte, da sich sonst die Harzkügelchen nach dem Test ebenfalls verdunkelten. In **Abb. 4.45** ist das Ergebnis für beide Harze dargestellt.



**Abb. 4.45** Positive (links) und negative (rechts) Probe nach Durchführung des PNBP-Tests

Im linken Glasgefäß ist das positive Ergebnis für das Wang-Harz zu erkennen, beim rechten Gefäß sind die farblosen MBHA-Harzkügelchen kaum zu sehen. Der PNBP-Test zeigte also in kurzer Zeit eindeutig an, ob festphasengebundene Hydroxylfunktionen vorhanden sind oder nicht. Er scheint folglich als Reaktionskontrolle für die Oxidation des Alkohols zum Aldehyd geeignet zu sein. Weitere literaturbekannte Methoden zur Visualisierung harzgebundener Alkoholfunktionen wurden aus diesem Grund nicht getestet.

Die Detektion von festphasengebundenen Aldehyden wurde ebenfalls als Reaktionskontrolle für die Festphasensynthese untersucht. In der Literatur sind „on bead“-Farbtests<sup>[130-132]</sup> und quantitative Methoden mittels Fluoreszenz<sup>[133]</sup> beschrieben. Hier wurden zwei Varianten zur Visualisierung von festphasengebundenen Aldehydfunktionen untersucht. Als Testharz wurden mehrere Proben aus verschiedenen Ansätzen aus der später diskutierten Synthesesequenz nach der „on bead“-Oxidation des festphasengebundenen Aminoalkohols **111** verwendet.



**Abb. 4.46** Anisaldehyd zum Anfärben von Aldehyden (**128**, oben), DNPH-Test für harzgebundene Aldehydfunktionen (unten)

Bei dem Anisaldehyd-Test wurde eine Reaktion der Aldehydfunktion mit 4-Anisaldehyd **128** in Gegenwart von einem Gemisch aus Schwefelsäure und Essigsäure in ethanolischer Lösung durchgeführt, um die Aldehydfunktionen rot zu färben.<sup>[132]</sup> Doch konnte bei diesem Test kein positives Resultat für an MBHA-Harz gebundene Aldehydfunktionen erhalten werden. Anders als in der Beschreibung des experimentellen Vorgehens in der Literatur verklumpten die Harzkügelchen in unserem Fall, eine Rotfärbung blieb zudem aus. Ein Problem könnte die Abspaltung vom Harz sein, da diese beim MBHA-Harz unter eben stark sauren Bedingungen erfolgt.

Beim DNPH-Test wurden zwei unterschiedliche Reaktionslösungen von 2,4-Dinitrophenylhydrazin **130** (DNPH) hergestellt: zum einen in einem Gemisch aus Dichlormethan und Essigsäure<sup>[122]</sup> und zum anderen in einer schwefelsauren Ethanol-Lösung.<sup>[130]</sup> Bei beiden Vorschriften sollte nach Behandlung des Harzes bei Anwesenheit von Aldehyden oder Ketonen eine Orange- bzw. Rotfärbung der Harzkügelchen auftreten. Diese Tests führten in der Tat beide bei dem festphasengebundenen Aldehyd zu einer intensiv gelben bis hellorangenen Färbung des Harzes, wohingegen der Alkohol farblos blieb. Eine intensive Rotfärbung wie in der Literatur beschrieben wurde aber nicht beobachtet. Die Ursache für die schwächere Färbung könnte darin liegen, dass bei aliphatischen Aldehyden, wie in diesem Fall, die Farbintensität generell geringer sein dürfte als bei entsprechenden aromatischen Aldehyden, die in der Literatur verwendet wurden. Eine zuverlässige Reaktionskontrolle für die HWE-Reaktion konnte mit den Farbttests für Aldehydfunktionen nicht gefunden werden, da der Farbunterschied von hellgelb zu intensiv gelb zu gering war.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zuverlässige Farbttests für Amine, Carbonsäuren und für Alkohole an der festen Phase für die oben beschriebene Synthese eines Testinhibitors des Typs 1 gefunden wurden. Der Test für Aldehydfunktionen schien nicht sehr aussagekräftig. Die Ergebnisse der Farbttests werden im folgenden Abschnitt bei dem jeweiligen Reaktionsschritt diskutiert.

Das Syntheschema der Verbindung **133** ist in **Abb. 4.47** ausgehend von aminfunktionalisiertem MBHA-Harz dargestellt. Die gestrichelten Pfeile bedeuten, dass die Synthese des Inhibitors **133** auf diese Weise nicht möglich war.



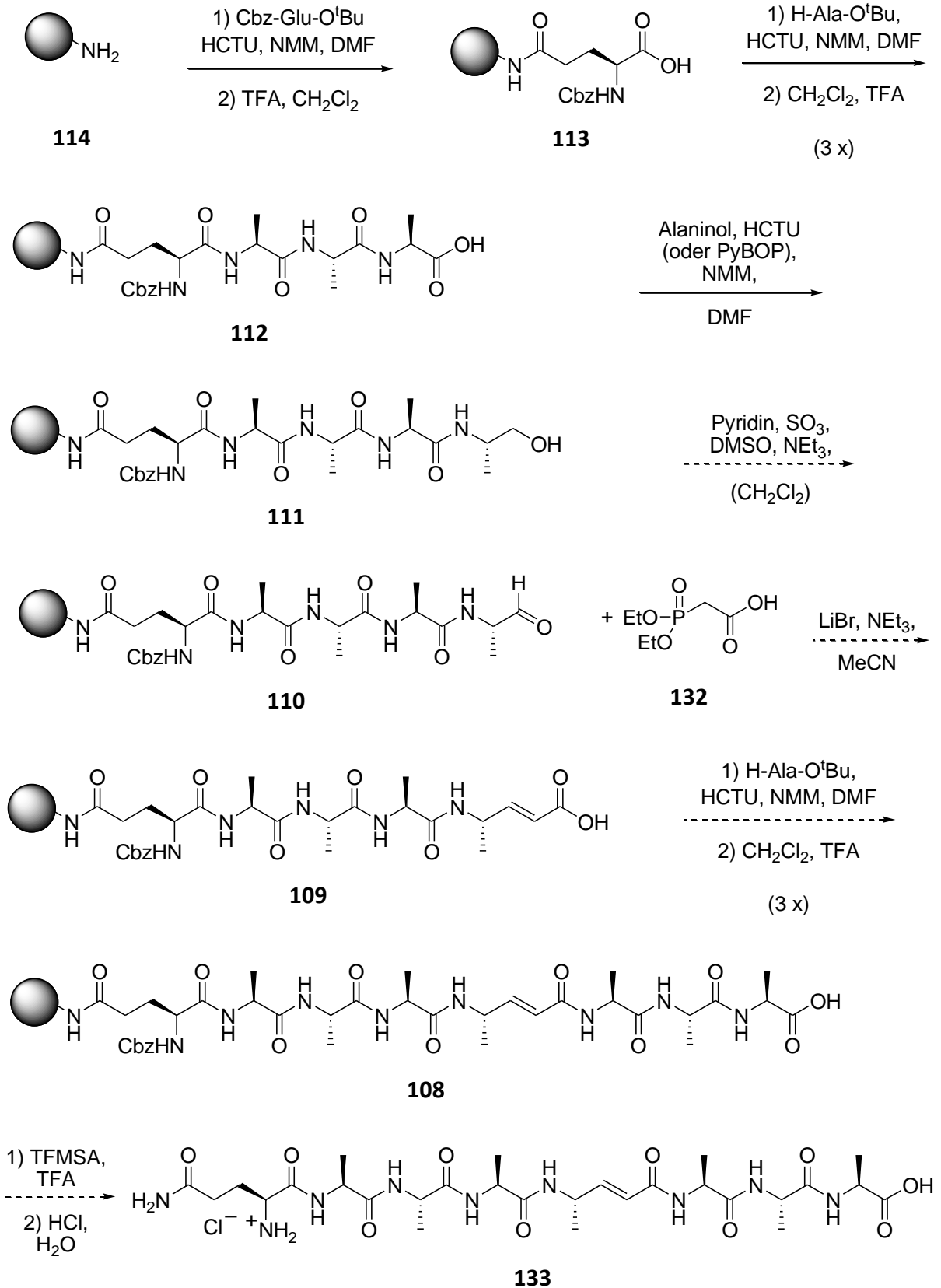


Abb. 4.47 Syntheseversuch des Inhibitors 133

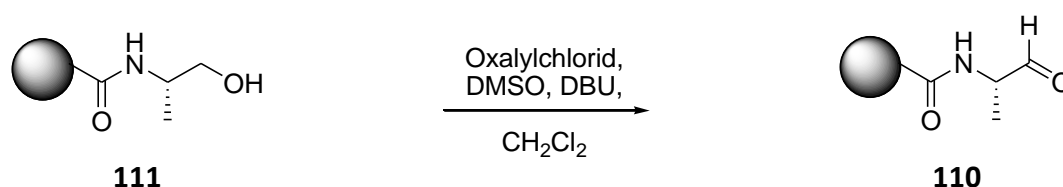
Im ersten Schritt wurde die Cbz- und *tert*-Butylester-geschützte Glutaminsäure an das MBHA-Harz **114** unter den Standardbedingungen für Peptidkupplungen mit HCTU, NMM und

DMF an der festen Phase gebunden. Ein negativer Kaisertest belegte die Vollständigkeit dieses Reaktionsschritts, ein positiver Malachitgrüntest von **113** nach Spaltung des *tert*-Butylesters mit einer 50%igen Lösung von TFA in Dichlormethan bestätigte dies nochmals. Der Alanin-*tert*-butylester konnte nun ebenfalls unter Standardbedingungen mit HCTU, NMM und DMF und jeweils Abspaltung der Schutzgruppen mit TFA in Dichlormethan eingeführt werden, so dass Verbindung **112** erhalten wurde. Diese Reaktionsschritte konnten mit dem Malachitgrüntest verfolgt und auf Vollständigkeit überprüft werden. Die Kupplung des Alaninols erfolgte im ersten Versuch mit HCTU als Kupplungsreagenz, in späteren Versuchen mit PyBOP. Damit konnte die Umsetzung schneller quantitativ erfolgen, bei HCTU war mehrmaliges Kuppeln notwendig. Dies konnte per Malachitgrüntest verfolgt werden. Des Weiteren wurde hier mit Hilfe eines negativen Kaisertests gezeigt, dass die Kupplung nicht über die OH-Funktion des Alaninols unter Bildung einer Esterfunktion stattgefunden hat. Anschließend erfolgten die problematischen Reaktionsschritte, die im folgenden Absatz diskutiert wird.

DMSO findet als Oxidationsmittel in einer Reihe verschiedener Oxidationen Verwendung.<sup>[134]</sup> Die Oxidation des Alkohols **111** sollte unter verschiedenen Bedingungen mit der Kombination aus DMSO, dem Pyridin-SO<sub>3</sub>-Komplex und Triethylamin erfolgen. Bei dieser Variante der Kornblum-Reaktion<sup>[135]</sup> fungiert das DMSO als Oxidationsmittel ähnlich wie bei der Swern-Oxidation. Für Reaktionen direkt an der Festphase gibt es ebenfalls bereits zahlreiche analoge Protokolle, darunter auch einige zur Darstellung von Aminoaldehyden.<sup>[136-139]</sup> Diese milden Oxidationsbedingungen sind für Umsetzungen an der festen Phase geeignet. Zunächst wurden zwei Ansätze mit jeweils fünf Äquivalenten an Pyridin-SO<sub>3</sub>-Komplex und Triethylamin in reinem DMSO<sup>[137]</sup> bzw. in einer Mischung aus Dichlormethan und DMSO<sup>[136]</sup> getestet. Der PNBP-Test blieb auch nach mehreren Tagen Umsetzung bei beiden Ansätzen unverändert positiv, so dass es den Anschein hatte, dass sich der Alkohol nicht vollständig umgesetzt hatte. Der DNPH-Test für Aldehyde zeigte, wie oben erwähnt, eine intensive Gelbfärbung des Harzes an, was dafür spricht, dass zumindest zum Teil eine Oxidation zu Aldehyd stattgefunden hatte. In weiteren Literaturvorschriften wurden zur quantitativen Umsetzung 10 Äquivalente an Reagenzien in reinem DMSO<sup>[139]</sup> und in einer Mischung aus DMSO und Dichlormethan<sup>[138]</sup> eingesetzt. Auch hier waren beide Farbttests nicht eindeutig, so dass auf eine unvollständige Oxidation geschlossen wurde. Ein Erwärmen des Reaktionsansatzes bei verschiedenen Reaktionszeiten zeigte keine

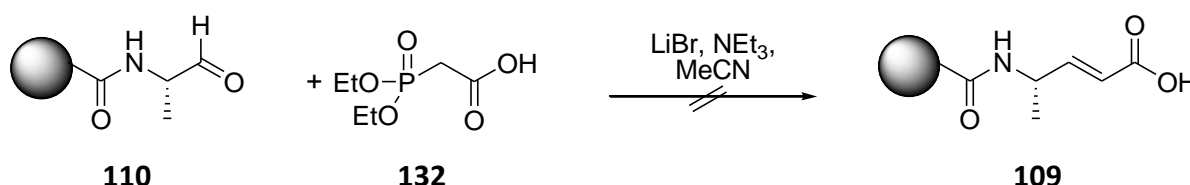
Auswirkung auf die Ergebnisse der Farbtests. Generell ließ sich aus den Versuchen erschließen, dass der Reaktionsumsatz in reinem DMSO besser gelang als in Mischungen mit Dichlormethan.

Die Oxidation vom Alkohol **111** zum Aldehyd **110** wurde analog auch nach einem bekannten Protokoll für festphasengebundene Swern-Oxidationen durchgeführt.<sup>[140-142]</sup> Bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde der festphasengebundene Alkohol in Dichlormethan mit Oxalylchlorid, DMSO und Diazabicycloundecan (DBU) umgesetzt. Doch auch bei dieser Methode konnte per Farbttest keine vollständige Umsetzung nachgewiesen werden. Die Swern-Oxidation bot also keine Verbesserung und war außerdem von der praktischen Durchführung durch die Kühlung des Harzes auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  schwierig. Aus diesen Gründen wurde die zuvor beschriebene Oxidation mit dem Pyridin- $\text{SO}_3$ -Komplex für alle weiteren Testansätze verwendet.



**Abb. 4.48** Swern-Oxidation zur Darstellung des Aldehyds **110** an der Festphase

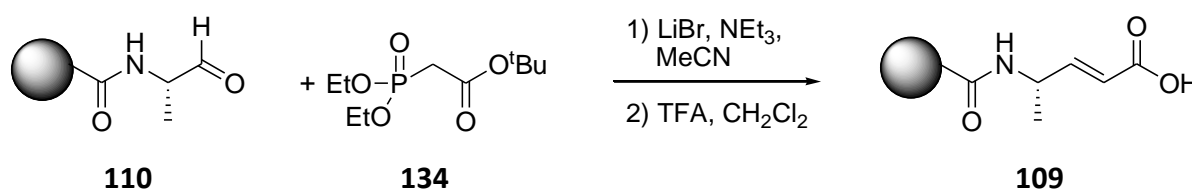
Nach der Oxidation wurde trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse der Farbtests versucht, die HWE-Reaktion mit der Phosphorverbindung **132** durchzuführen. Ähnliche Wittig-Reaktionen an der festen Phase waren bereits in der Literatur beschrieben, jedoch mit anderen Carbonyl- bzw. Phosphorverbindungen.<sup>[143-147]</sup> Hierbei gibt es beide Varianten: mit der Carbonylverbindung am Harz oder in der Reaktionslösung. Zunächst sollte wie geplant der festphasengebundene Aldehyd **110** mit der Carbonsäure **132** in Acetonitril umgesetzt werden. Eine Vorschrift für exakt diese Umsetzung lag nicht vor.



**Abb. 4.49** Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit der Carbonsäure **132**

Die HWE-Reaktion fand bei Anwesenheit von Lithiumbromid und mit Triethylamin als Base statt. Die Reagenzien wurden in einem sehr hohen Überschuss (30 Äquivalente) eingesetzt,

um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Nach Zugabe aller Reagenzien bildete sich eine Suspension, die wahrscheinlich das ausgefallene Triethylammoniumsalz der Carbonsäure **132** darstellt. Nach der Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Harz gewaschen und Farbttests durchgeführt. Der DNPH-Test blieb unverändert und der Malachitgrüntest war negativ. Es ist also eindeutig davon auszugehen, dass aufgrund der schlechten Löslichkeit keine Umsetzung erfolgte. Um dies zu verhindern, wurde die gleiche Reaktion mit dem *tert*-Butylester **134** durchgeführt. Der Ester sollte anschließend wie zuvor die Aminosäureester im Säuren gespalten werden.



**Abb. 4.50** Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit dem *tert*-Butylester **134**

In diesem Fall hatten sich alle Reagenzien vollständig gelöst, so dass die Reaktion auch mit 15 Äquivalenten durchgeführt werden konnte. Anschließend wurde unter den zuvor beschriebenen Standardbedingungen mit TFA der *tert*-Butylester gespalten. Der Malachitgrüntest war vor der Umsetzung mit TFA negativ, danach positiv. Insgesamt kann man anhand der Farbttests sagen, dass die Oxidation und die HWE-Reaktion zumindest teilweise funktioniert hatten.

Zur weiteren Bestätigung, dass bei der Oxidation und bei der HWE-Reaktion eine Umsetzung stattfand, wurden drei weitere Aminosäuren an **109** gekuppelt, um **133** zu erhalten. Alle Kupplungen konnten unter den bisher beschriebenen Bedingungen durchgeführt werden. Die erste Peptidkupplung hätte insofern problematisch sein können, da es sich nicht um eine gewöhnliche Carbonsäure handelt, sondern um das Michael-System **109**, wodurch die Reaktivität gesenkt wird. Doch wie auch schon in ähnlichen literaturbeschriebenen Kupplungsreaktionen erfolgte die Kupplung ohne Probleme quantitativ.<sup>[147,148]</sup> Ein Indiz dafür, dass die vorherigen Umsetzungen zumindest zum Teil erfolgten, stellt die Tatsache dar, dass die Malachitgrüntests vor und nach diesen Kupplungen wie erwartet positiv bzw. negativ verliefen. Dagegen sprachen allerdings die Abspaltversuche vom polymeren Träger: An bestimmten Stellen der Reaktionssequenz ab der Oxidation zum Aldehyd bis nach der HWE-Reaktion wurde versucht, das jeweilige Produkt vom Harz abzuspalten. Doch bei all

diesen Versuchen konnte kein eindeutiges Produkt bestimmt werden. Dazu wurde nach dem Standardprotokoll für Spaltungen des MBHA-Linkers die jeweilige harzgebundene Verbindung mit einer Lösung von 10 % Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in TFA bei Raumtemperatur umgesetzt. Per HPLC, massenspektrometrisch und per  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden die jeweils erhaltenen Fraktionen analysiert. Außer Fragmenten konnte nie das gewünschte Produkt erhalten werden, was für eine Zersetzung während der sauren Abspaltbedingungen oder eine unvollständige Umsetzung am Harz sprach.

In den erwähnten Literaturvorschriften wird nie von derartigen Problemen berichtet. Die Umsetzungen wurden als quantitativ angenommen und erst nach Abspaltung vom polymeren Träger eine Gesamtausbeute angegeben. Die Ausbeute für eine Reaktionssequenz mit einer Oxidation und einer Wittig-Reaktion betrug 55 bis 70 %, berechnet über die theoretische Beladung des Harzes.<sup>[139]</sup> Worauf die Verluste zurückzuführen sind, wird jedoch nicht erwähnt. In einem Fall wurde die Oxidation von Aminoalkoholen, darunter auch Alaninol, unter den gleichen Bedingungen beschrieben.<sup>[137]</sup> Die Umsetzung wurde durch die Aufnahme von FT-IR-Spektren direkt am Harz verfolgt, und durch das Erscheinen der Aldehydbande bei  $1732\text{ cm}^{-1}$  und Verschwinden des Signals für den Alkohol bei  $3420\text{ cm}^{-1}$  bestätigt. Nach der Zeit, nachdem sich dieser Signalsatz nicht mehr veränderte, wurde die Reaktion als quantitativ angenommen und die Produkte nach Abspaltung und Schützung in Lösung zu nur 21 % (bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes) isoliert. Hier wird deutlich, dass die Reaktionen sehr wahrscheinlich ebenfalls nicht quantitativ verliefen.

Voraussetzung für den kombinatorischen Ansatz ist eine vollständige Umsetzung bei allen Reaktionsschritten. Da eine quantitative Synthese des Inhibitortyps 1 unter den untersuchten Bedingungen nicht möglich war, wurden weitere Versuche in diese Richtung aufgegeben. Alles in allem konnte hier jedoch gezeigt werden, dass bei der organischen Festphasensynthese, vor allem wenn andere als die üblichen Peptidkupplungsreaktionen zum Einsatz kommen, oft widersprüchliche und beschönigende Aussagen in Veröffentlichungen zu finden sind. Ein Beispiel ist die Oxidation vom Alkohol zum Aldehyd, die nach unseren Ergebnissen nie quantitativ funktioniert. In den erwähnten Literaturvorschriften wurden diese Umsetzungen quantitativ angenommen, ohne dies zu überprüfen. Erst nach Abspaltung und Reinigung der Produkte wurde eine Ausbeute des

erwünschten Produktes bestimmt, oftmals mit erheblichen „Verlusten“. Diese Ausbeuten spiegeln jedoch nicht wider, ob die jeweilige Reaktion vollständig verlief oder ob die Ausbeuteverluste auf die Isolierung des Produktes zurückzuführen ist. Da die drastischen Abspaltbedingungen offensichtlich zur Zersetzung der festphasengebundenen Verbindungen geführt haben und keine Fragmente isoliert werden konnten, ist diese Verbindungsklasse für die kombinatorische Inhibitorsuche ungeeignet. Diese Verbindungen wurden deshalb nicht weiter untersucht. Stattdessen wurde der Inhibitortyp 2 auf seine Eignung für den kombinatorischen Ansatz überprüft.

#### 4.2.2.2 *Syntheseversuche zur Darstellung des Inhibitortyps 2*

Als nächstes wurde der Inhibitortyp 2 auf Tauglichkeit für den kombinatorischen Ansatz überprüft. Diese peptidische Verbindung besitzt ein Hydroxycrotonsäureamid als zentrales Element, das über den Alkohol mit einem Tripeptid verestert ist. Die Retrosynthese des Testinhibitors **135** ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die verwendeten Aminosäuren wurden so gewählt, da sie auch in der Synthese der Bibliothek eingesetzt werden sollten.

Bei diesem Inhibitortyp kommen ausschließlich Kupplungsreaktionen nach der Fmoc-Strategie in der Festphasensynthese zum Tragen, deshalb schien diese Variante als äußerst aussichtsreich. Ausgegangen wurde von einem aminfunktionalisierten Harz für die Festphasensynthese. Um möglichst milde Abspaltbedingungen zu gewährleisten, wurde das Sieberamid-Harz **142** verwendet.<sup>[149]</sup> Von diesem polymeren Träger kann schon mit einer 1 %igen Reaktionslösung von TFA in Dichlormethan das Produkt innerhalb sehr kurzer Zeit abgespalten werden. Nach der Einführung der vier Fmoc-geschützten Aminosäuren **143-145** unter Standardbedingungen mit HCTU und NMM in DMF und jeweiliger Fmoc-Entschützung mit Piperidin in DMF, sollte das Tetrapeptid **138** erhalten werden. Dies sollte anschließend mit der **139** umgesetzt werden. Die Synthese der Hydroxycrotonsäure **139** startete bei der Crotonsäure **141** durch Bromierung zu **140** und anschließender Substitution des Bromids. An die freie OH-Funktion von **136** sollten dann die letzten drei Aminosäuren **103, 104** und **137**, ebenfalls nach der Fmoc-Strategie, eingeführt werden. Zuletzt erfolgt die Abspaltung vom Harz, um den Inhibitor **135** zu erhalten.

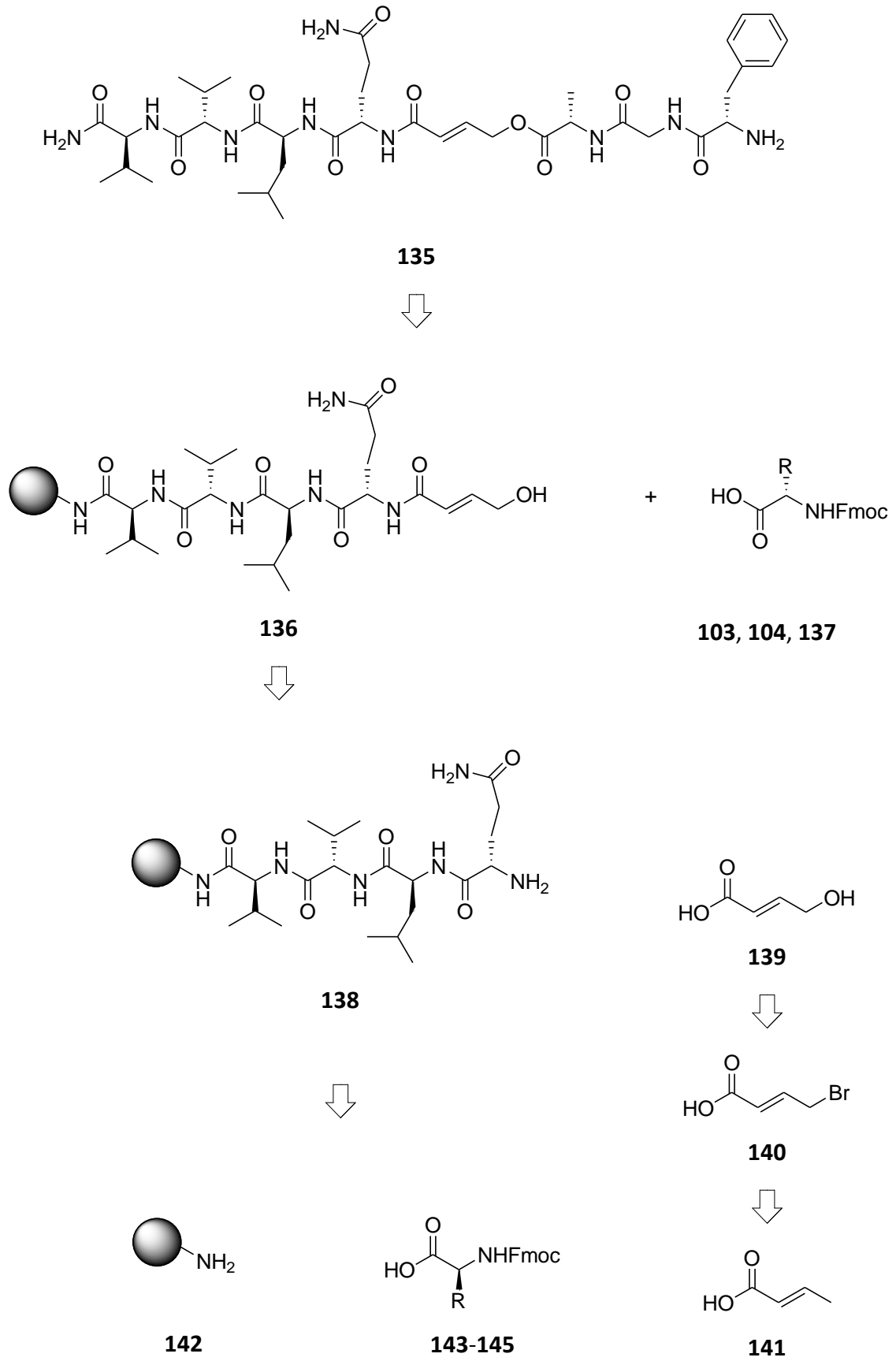
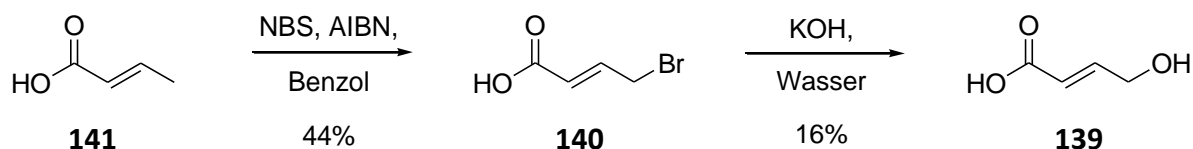


Abb. 4.51 Retrosyntheseschema des Inhibitortyps 2

Bevor die Festphasensynthese besprochen wird, soll zuerst die Synthese der Hydroxycrotonsäure **139** diskutiert werden. Hierzu wurde auf literaturbekannte Vorschriften zurückgegriffen, bei denen ausgehend von Crotonsäure **141** eine radikalische Bromierung und anschließend eine Substitution zur Hydroxylverbindung stattfinden sollte.<sup>[150-152]</sup>

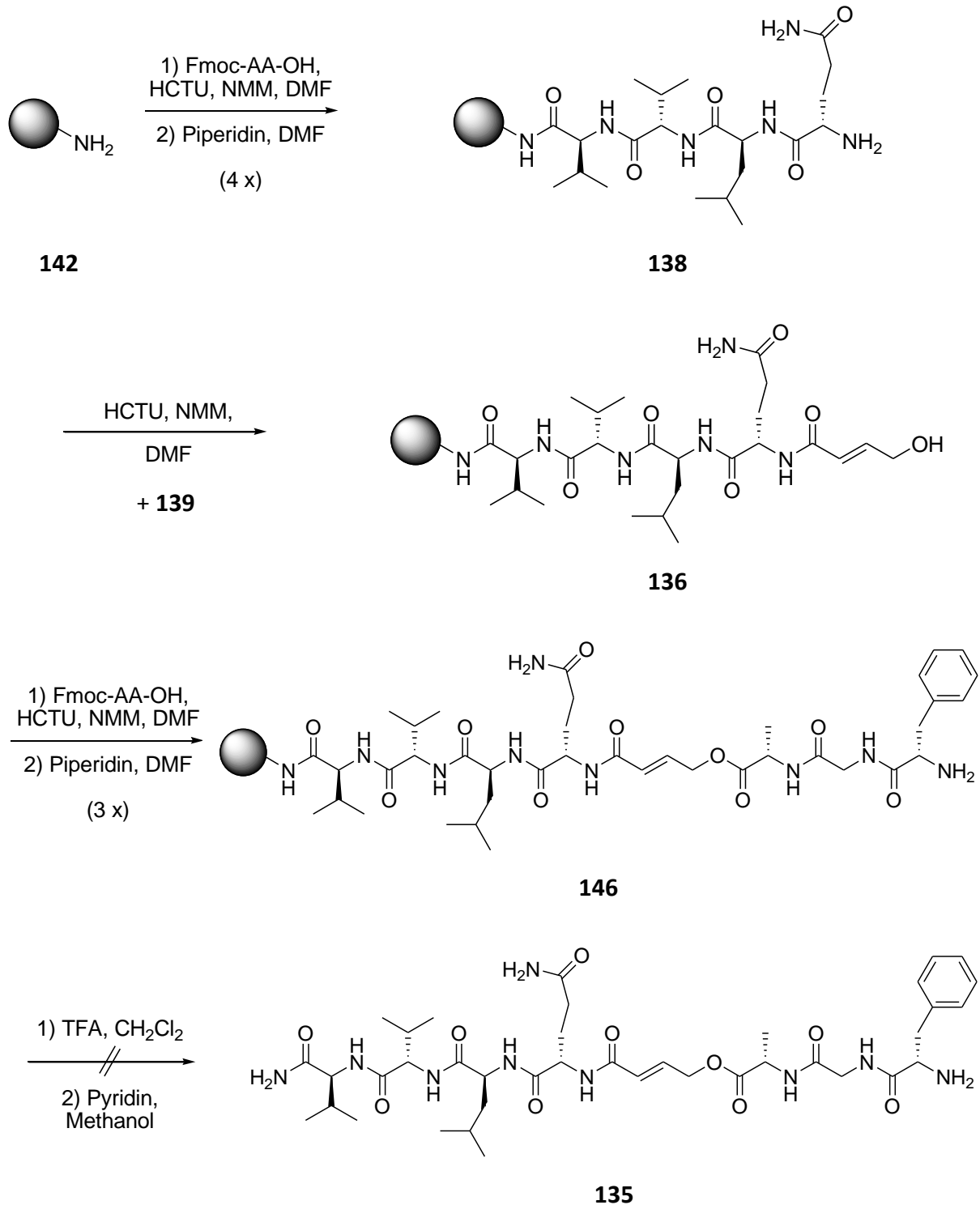


**Abb. 4.52** Synthese der Hydroxycrotonsäure **139** ausgehend von **141**

Die Bromierung von **140** wurde mit N-Bromsuccinimid (NBS) und mit N,N'-Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) als Radikalstarter in Benzol durchgeführt. Das Produkt konnte durch Kristallisation aus Tetrachlorkohlenstoff rein erhalten werden. Die Literaturliteraturausbeute von 47 % wurde mit 44 % nahezu erreicht, die Verluste können durch die unvollständige Kristallisation erklärt werden. Die aus der Mutterlauge nachträglich auskristallisierte weniger reine Fraktion wurde zur Ausbeutebestimmung nicht hinzugezogen. Im zweiten Schritt sollte durch eine ebenfalls in der Literatur beschriebenen Substitutionsreaktion die Hydroxylfunktion eingeführt werden.<sup>[153]</sup> Zu dieser Synthese ist eine Ausbeute von 71 % angegeben, die in mehrmaligen Versuchen jedoch nie erreicht wurde. Es konnte jeweils nur eine Menge von 10 bis 16 % des gewünschten Produkts **139** isoliert werden. Beim Erhitzen der Reaktionsmischung mit Kaliumhydroxid bildeten sich vermutlich Polymere, die über Silicagel säulenchromatographisch abgetrennt werden konnten. Außerdem musste anschließend ein weiteres Nebenprodukt, das nicht näher charakterisiert wurde an der MPLC über RP-18-Kieselgel entfernt werden. Syntheseoptimierungen wurden an dieser Stelle nicht unternommen, da eine ausreichende Menge für die Festphasensynthese zugänglich war.

Mit diesem Baustein und kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren konnte nun die Festphasensynthese durchgeführt werden. Der erste Syntheserversuch für den Testinhibitor **135** ist in **Abb. 4.53** dargestellt.

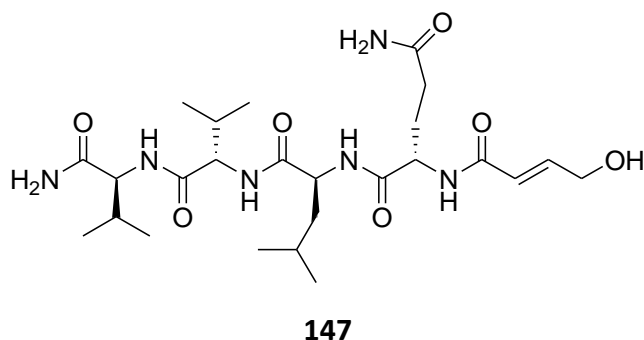




**Abb. 4.53** Synthese des Testinhibitors **135**

Die Festphasensynthese wurde mit dem aminfunktionalisierten Sieberamid-Harz **142**<sup>[149]</sup> begonnen, an das die ersten vier Aminosäuren nach der Fmoc-Strategie mit HCTU und NMM in DMF gekuppelt wurden. An das erhaltene Tetrapeptid **138** konnte nun die Hydroxycrotonsäure **139** ebenfalls unter Standardbedingungen eingeführt werden. Hierbei wurden jedoch nur 1.25 Äquivalente der Carbonsäure **139** eingesetzt, um zu vermeiden, dass

die ungeschützte Alkoholfunktion von **139** ebenfalls mit dem gebildeten Aktivester reagiert und somit Nebenprodukte entstanden. Die bisherigen Kupplungen und Fmoc-Abspaltungen konnten stets mit eindeutigen Kaisertests verfolgt werden (Farbtests siehe Kapitel 4.2.2.1). Die Kupplung des Crotonsäurebausteins **139** wurde zusätzlich mit einem positiven PNBP-Test bestätigt. Dieser Test wurde für die Kupplung der nächsten Fmoc-Aminosäure ebenfalls zur Überprüfung des quantitativen Umsatzes verwendet. Erst nach zweimaligem Kuppeln konnte ein negativer PNBP-Test erhalten werden. Die restlichen beiden Aminosäuren **103** und **137** konnten nun nach der Fmoc-Strategie unter Verfolgung der Umsetzung mit Kaisertests eingeführt werden. Im letzten Schritt sollte die Abspaltung von der festen Phase unter sehr milden sauren Bedingungen durchgeführt werden. Das Harz wurde mehrmals für wenige Minuten mit einer 1 %igen Lösung von TFA in Dichlormethan behandelt und die jeweiligen Abspaltlösungen in eine Lösung aus Pyridin und Methanol überführt, um die Säure zu neutralisieren. Nach Aufarbeitung des erhaltenen Gemisches konnten jedoch lediglich Spuren der gewünschten Zielverbindung **135** in einem Gemisch mit der Verbindung **147** nachgewiesen werden (siehe **Abb. 4.54**).



**Abb. 4.54** Isoliertes Fragment **147** aus der Testsynthese des Inhibitors **135**

Auch in weiteren Ansätzen konnte lediglich dieses Fragment in einer Ausbeute von 42 % isoliert werden. Prinzipiell gibt es in diesem Fall zwei plausible Erklärungen für das Misslingen der Festphasensynthese: Erstens könnte die Kupplung an den festphasengebundenen Alkohol **136** nicht funktioniert haben, und zweitens könnte die Esterfunktion des Inhibitors **135** unter den Abspaltbedingungen hydrolysiert sein. Gegen die erste Annahme spricht der negative PNBP-Test nach dem zweiten Kupplungsansatz, wobei die Zuverlässigkeit dieses Farbtests nicht näher untersucht ist und unter Umständen in diesem speziellen Fall nicht anwendbar sein könnte. Der PNBP-Test wurde vorher lediglich an Wang-Harz durchgeführt. Für die zweite Annahme spricht auch, dass der vinyloge Alkohol

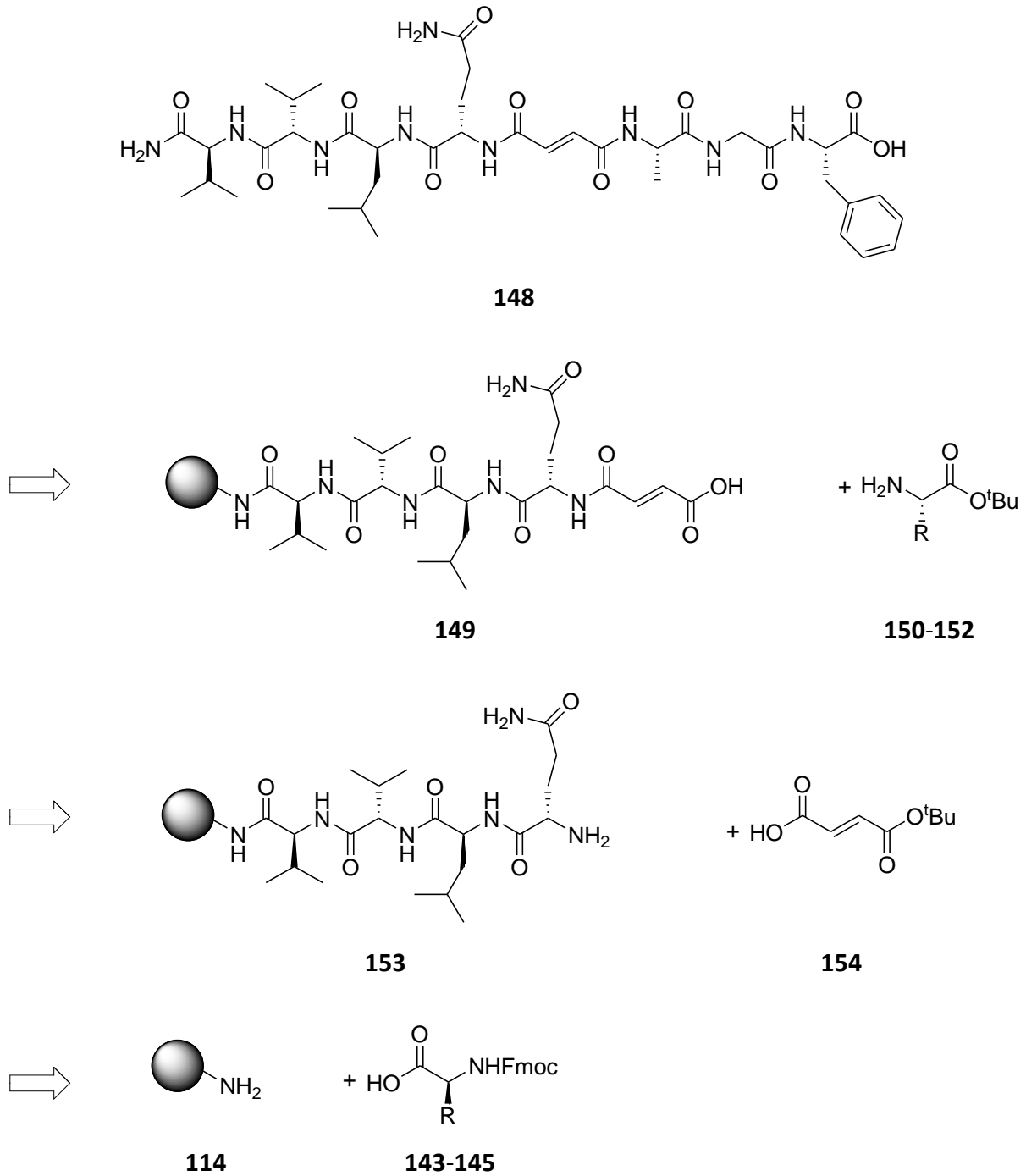
nicht so stabil sein könnte. Selbst bei den sehr milden Abspaltbedingungen könnte sich der Ester zersetzt haben.

Die Verbindung **147** selbst stand nun für Messungen an den Cysteinproteasen zur Verfügung. Zunächst wurde sie an Falcipain-2 und an Rhodesain bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wie zuvor beschrieben getestet. Bei Rhodesain konnte kein Effekt auf die Enzymaktivität beobachtet werden, bei Falcipain-2 lediglich eine Inhibierung von 27 %. Wahrscheinlich ist die schlechte Hemmung beider Cysteinproteasen durch die polare Hydroxylfunktion von **147** zu erklären. Aufgrund der schlechten Hemmeigenschaften wurden auch keine weiteren mikrobiologischen Tests an den Erregern bzw. auf Zytotoxizität durchgeführt.

Für die Synthese einer kombinatorischen Bibliothek eignet sich die Verbindungsklasse des Inhibitortyps 2 aufgrund des labilen Esters nicht. Einzelne Mitglieder der Bibliothek könnten nicht sicher synthetisiert werden. Abgesehen davon ist es wahrscheinlich, dass die Synthese am PEGA-Harz ebenfalls nicht funktioniert oder das „on bead“-Screening aufgrund der Hydrolyse des Esters während der Messungen keine zuverlässigen Werte liefert. Deshalb wurde als nächstes eine Synthesestrategie für Inhibitoren des Typs 3 untersucht.

4.2.2.3 *Synthese des Inhibitortyps 3*

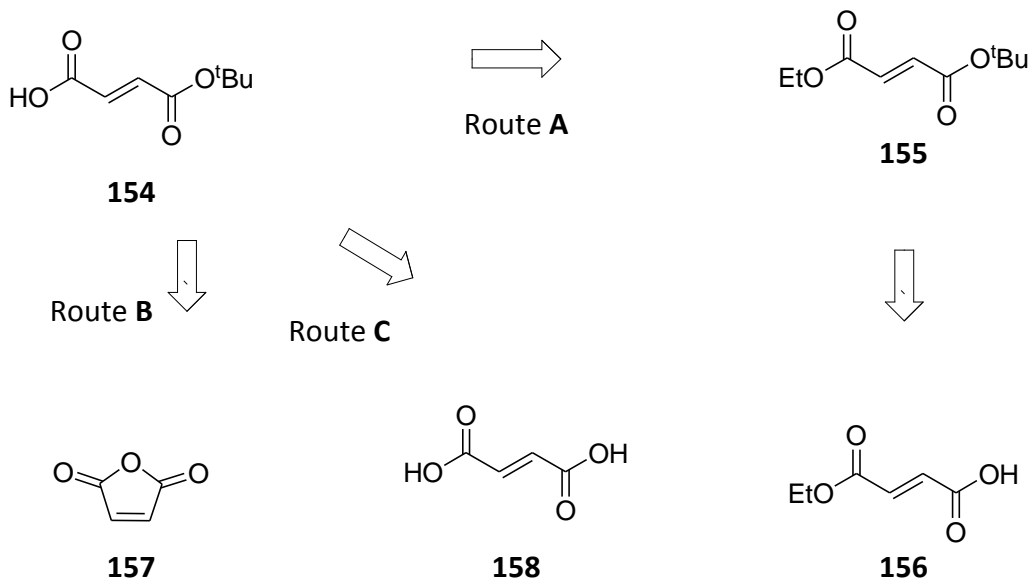
Der Inhibitortyp 3 beinhaltet einen Fumarsäurebaustein als zentrales elektrophiles Element, auch hier kann die Synthese komplett in Peptidkupplungen durchgeführt werden. Das zugehörige Syntheschema ist in **Abb. 4.55** gezeigt.



**Abb. 4.55** Retrosyntheschema des Testinhibitors 3

Bei diesem Ansatz sollte die Synthese erneut bei aminfunktionalisiertem MBHA-Harz **114** begonnen werden, da bei dieser Route wieder Schutzgruppen im Säuren gespalten werden müssen. Die ersten vier Aminosäuren **143** bis **145** sollten wie bereits zuvor beschrieben vom C- zum N-Terminus nach der Fmoc-Strategie an den polymeren Träger angebracht werden, um **153** zu erhalten. Im nächsten Schritt sollte der mono-geschützte Fumarsäurebaustein **154** an **153** gekuppelt und anschließend im sauren entschützt werden. An die nun freie Carbonsäure von **149** sollten die Aminosäureester **150** bis **152** gekuppelt werden, diesmal vom N- zum C-Terminus. Zuletzt sollte dann unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten werden, um den Inhibitor **148** zu erhalten. Die Wahl der Aminosäuresequenz dieser Testverbindung beruht wie beim Testinhibitor 3 darauf, dass die eingesetzten Aminosäuren in der Synthese der Inhibitorbibliothek verwendet werden sollten.

Vor der Festphasensynthese musste zunächst ein Weg gefunden werden, um die mono-geschützte Fumarsäure **154** zu synthetisieren. Diese Synthese sollte im größeren Maßstab durchführbar sein, da für die Synthese der Inhibitorbibliothek eine größere Menge erforderlich ist. In **Abb. 4.56** sind drei verschiedene Wege zur Synthese von **154** dargestellt, die getestet wurden.

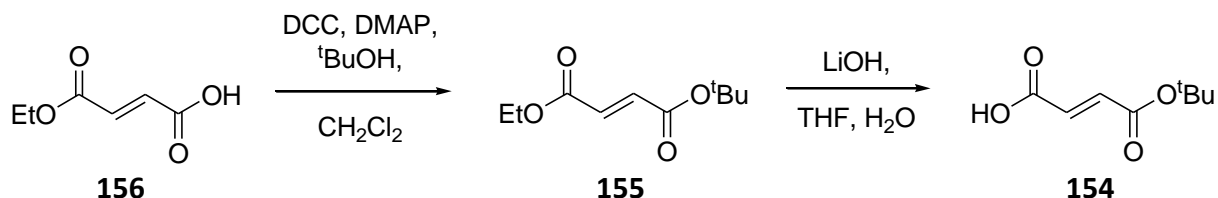


**Abb. 4.56** Retrosynthese des Fumarsäurebausteins **154** über drei alternative Routen

Darunter befinden sich zwei in der Literatur beschriebene Syntheserouten (**A** und **B**). Zum Einen wird vom kommerziell erhältlichen mono-Ethylester **156** über den Diester **155** und

zum Anderen von Maleinsäureanhydrid (**157**) begonnen. Außerdem sollte eine direkte mono-Veresterung von Fumarsäure (**158**) getestet werden (Route C).

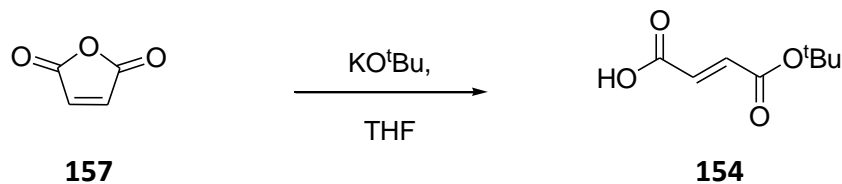
Zunächst wurde die Variante über den Diester **155** durchgeführt (Route A). In **Abb. 4.57** ist das Reaktionsschema der zweistufigen Synthese dargestellt.



**Abb. 4.57** Route A: Synthese des Fumarsäurebausteins **154** ausgehend vom mono-Ethylester **156**

Nach Aktivierung der Carbonsäure **156** mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde sie mit *tert*-Butanol bei 0°C in Dichlormethan umgesetzt. 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) wurde als Base verwendet. Die Ausbeute in diesem Reaktionsschritt sollte laut Literatur bei 76-81 %<sup>[154]</sup> bzw. bei 60 %<sup>[155]</sup> liegen. In einem ersten Ansatz konnte eine Ausbeute von 46 % erreicht werden. Probleme hierbei bereitete die destillative Isolierung des Diesters **155**, da das DMAP in der Mischung sublimierte und sich somit schwer abtrennen ließ. Im zweiten Schritt sollte eine selektive Hydrolyse des Ethylesters von **155** mit Lithiumhydroxid in einer Wasser-THF-Mischung stattfinden. Laut Literatur sollte die Ausbeute 93 % betragen.<sup>[156]</sup> Die Bedingungen der Vorschrift wurden übernommen und durchgeführt, jedoch konnte lediglich das Edukt **155** quantitativ reisoliert werden. In einem zweiten Versuch wurde die Menge an Lithiumhydroxid im gleichen Ansatz von einem zu zehn Äquivalenten erhöht. Doch bereits nach 15 Minuten wurden beide Esterfunktionen vollständig hydrolysiert, und es konnte nur noch Fumarsäure (**158**) isoliert werden. Weitere Versuche nach dieser Route wurden nicht unternommen, da zeitgleich eine der beiden alternativen Routen erfolgreich zu Verbindung **154** geführt hatte.

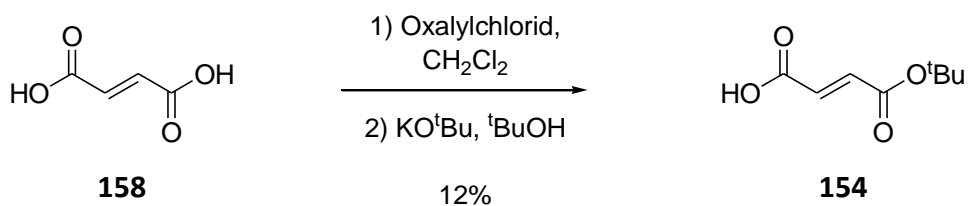
Beim zweiten Ansatz (Route B) wurde von Maleinsäureanhydrid (**157**) ausgegangen, das mit einem Alkohol vollständig zu einem Maleinsäuremonoester hydrolysieren und anschließend zur Fumarsäure **154** isomerisieren sollte. In **Abb. 4.58** ist diese Reaktion abgebildet.



**Abb. 4.58** Route B: Synthese des Fumarsäurebausteins **154** über die Hydrolyse von Maleinsäureanhydrid

Die Verbindung **157** wurde in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur mit Kalium-*tert*-butylat umgesetzt.<sup>[157]</sup> Laut Literaturvorschrift sollte dies in zwei Schritten geschehen: zuerst die Hydrolyse des Anhydrids in einem größeren Ansatz und anschließend die Isomerisierung vom *cis*- zum *trans*-Produkt im kleinen Maßstab (100 mg). Beide Reaktionsschritte erfolgten unter den gleichen Bedingungen mit Kalium-*tert*-butylat in THF. Die angegebenen Ausbeuten betragen nach jeweiliger Aufarbeitung für die Hydrolyse 57 % und für die Isomerisierung 86 %. Somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 49 % über beide Stufen. Nach der Durchführung konnte das Produkt nur verunreinigt erhalten werden. Auf weitere Reinigungsversuche wurde verzichtet, da die Durchführung des zweiten Reaktionsschrittes laut Literatur nur in kleinem Maßstab möglich ist.

Parallel zu den beiden zuvor beschriebenen Synthesewegen wurde ein Testansatz ausgehend von Fumarsäure (**158**) durchgeführt (Route C). Diese Variante hatte den Vorteil, dass die Synthese in nur einem Reaktionsschritt durchführbar ist.



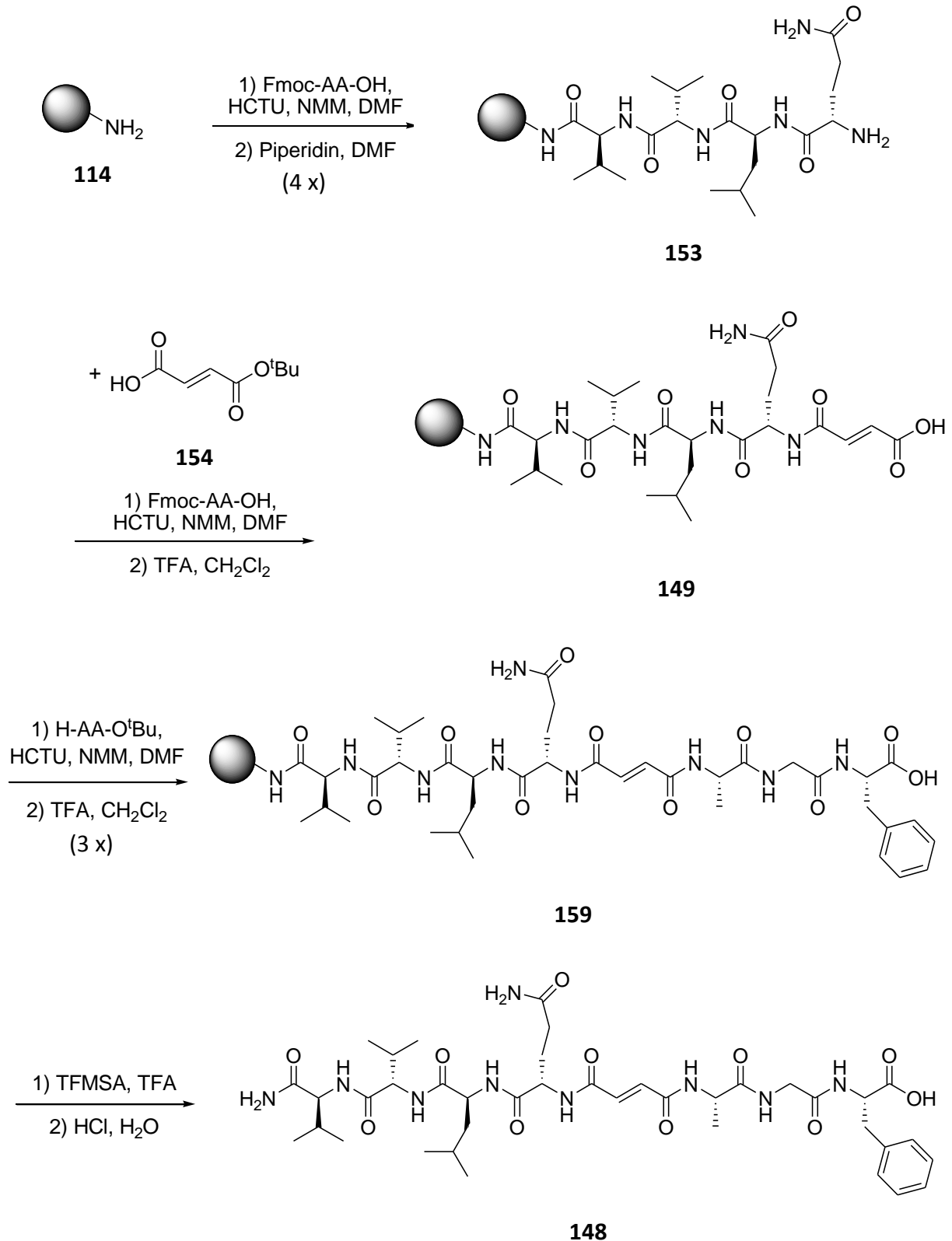
**Abb. 4.59** Route C: Synthese des Fumarsäurebausteins **154** über die Aktivierung als Säurechlorid

Die Dicarbonsäure **158** wurde im ersten Schritt mit einem Äquivalent an Oxalylchlorid in Dichlormethan umgesetzt. Das so generierte Säurechlorid sollte anschließend mit Kalium-*tert*-butylat in *tert*-Butanol umgesetzt werden, um **154** zu erhalten. Das nach Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt musste säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden, da sich wie erwartet neben erheblichen Mengen an Edukt **158** noch der entsprechende Di-*tert*-butylester in der Mischung befand. Dies erklärt die recht geringe Ausbeute von 12 %. Diese Reaktion konnte ohne Einbußen in der Reinheit des erhaltenen Produkts auch im großen

Maßstab durchgeführt werden, um ausreichende Mengen an **154** herzustellen. Trotz der geringen Ausbeute wurde diese Syntheseroute zur Darstellung des mono-geschützten Fumarsäurebausteins **154** angewendet.

Da nun alle für die Festphasensynthese des Inhibitors **148** notwendigen Bausteine vorrätig waren, konnte der erste Testansatz durchgeführt werden. In **Abb. 4.60** ist diese Synthese abgebildet. Ausgehend vom MBHA-Harz **114** wurden zunächst die ersten vier Aminosäuren nach der Fmoc-Strategie mit HCTU und NMM in DMF gekuppelt und jeweils die Schutzgruppe mit einer Lösung aus Piperidin und DMF gespalten. Hierbei wurden alle Reaktionsschritte mit dem Kaisertest verfolgt (siehe Kapitel 4.2.2.1). Anschließend erfolgte die Einführung des Fumarsäurebausteins **154** an das Tetrapeptid **153** unter den üblichen Kupplungsbedingungen, auch hier wurde der Reaktionsumsatz per negativen Kaisertest bestätigt. Trotz der zur Carbonsäure konjugierten Doppelbindung war die Reaktivität in diesem Fall ausreichend, der Kaisertest zeigte auch bei Standardbedingungen eine vollständige Umsetzung an. Nun wurde der *tert*-Butylester mit einer 50 %igen Lösung von TFA in Dichlormethan gespalten, wobei die Reaktion mit einem vor der Abspaltung negativen und hinterher positiven Malachitgrüntest bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4.2.2.1). Nun konnten die letzten drei Aminosäuren in *tert*-Butylester-geschützter Form mit HCTU und NMM in DMF eingeführt werden, wobei die Esterfunktion jeweils nach dem Kupplungsschritt mit TFA in Dichlormethan gespalten wurde. So erhielt man den festphasengebundenen Inhibitor **159**, der anschließend mit einer 10 %igen Lösung von TFMSA in TFA vom polymeren Träger abgespalten wurde. Das Produkt **148** konnte nach Entfernung der TFA und TFMSA aus einer salzsauren Lösung gefällt werden. Die Ausbeute bei dieser Reaktionssequenz betrug 89 %.





**Abb. 4.60** Synthese des Inhibitors **148** mittels N- zu C- und C- zu N-Strategie an der Festphase

Da die Verbindung **148** in allen gängigen Lösungsmitteln gering bzw. gar nicht löslich war, wurde versucht, sie durch Salzbildung mit Triethylamin löslicher in polaren Lösungsmitteln zu machen. Dazu wurde **148** in Wasser suspendiert und mit einem Überschuss an

Triethylamin versetzt und gefriergetrocknet. Zurück blieb ein voluminöser weißer Feststoff, der ein wesentlich besseres Löslichkeitsvermögen in Wasser, DMSO und Methanol aufwies. Die nun zugänglichen Konzentrationen von **148** in diesen Lösungsmitteln reichten aus, um den Inhibitor vollständig charakterisieren zu können und in den Enzym-Assays einzusetzen.

Alles in allem war nun der Weg offen, um eine potentielle Inhibitorbibliothek zu synthetisieren. Da die Bibliothek an PEGA-Harz synthetisiert werden musste, wurde die Synthese der gleichen Aminosäuresequenz erneut an diesem Harz getestet. Bei diesem Harz kann der Inhibitor nicht abgespalten werden, deshalb waren hier die Ergebnisse der Farbttests entscheidend. Für die Malachitgrüntests wurden exakt die gleichen Ergebnisse wie beim Ansatz am MBHA-Harz beobachtet, bei den Kaisertests konnte jedoch bei der Anbringung der ersten beiden Aminosäuren kein positives Testergebnis erhalten werden. Die darauffolgenden Kaisertests lieferten jedoch die erwarteten Resultate. Es ist anzunehmen, dass an diesen Stellen der sperrige Rest des Valins den Farbttest beeinflusst oder prinzipiell die ersten Kaisertests beim PEGA-Harz nicht funktionieren. So wurden die Kaisertests der ersten beiden Kupplungen ignoriert.

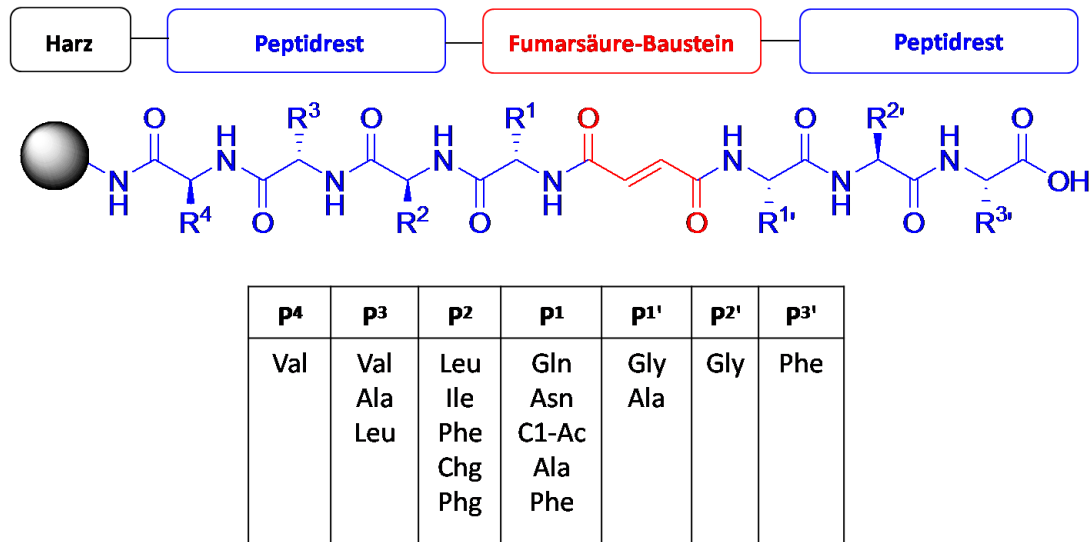
Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Synthese der kombinatorischen Inhibitorbibliothek durchführbar war. Im nächsten Kapitel wird zunächst auf das Design der Bibliothek, also auf die Wahl der eingesetzten Aminosäuren, und anschließend auf deren Synthese und die dabei angewandte Technik eingegangen.

#### 4.2.2.4 Synthese der kombinatorischen Bibliothek des Inhibitortyps 3

Der Testinhibitor **148** konnte bereits erfolgreich an MBHA- und an PEGA-Harz synthetisiert werden. Durch diese Syntheseroute ist die Wahl der möglichen einsetzbaren Aminosäuren eingeschränkt, denn es dürfen sich keine säurelabilen Schutzgruppen in den Resten der Aminosäuren befinden. Aufgrund des säurelabilen PEGA-Harzes können auch keine Schutzgruppen, die unter basischen Bedingungen abzuspalten sind, verwendet werden. So scheiden z.B. diejenigen Aminosäuren mit einer Hydroxylfunktion in der Seitenkette aus, also Serin (Ser) und Threonin (Thr). Ebenso problematisch sind die Aminosäuren mit Carboxylatfunktionen in der Seitenkette wie Glutaminsäure (Glu) und Asparaginsäure (Asp). Carbonsäuren in der Seitenkette werden bei der Fmoc-Strategie standardmäßig als *tert*-Butylester geschützt. Bei den sauren Bedingungen während der N zu C-Route würden auch die Ester in der Seitenkette von Glutamin- und Asparaginsäure gespalten werden. Eine Synthese des Inhibitors könnte nur mit orthogonalen Schutzgruppen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit hier wären Benzylester geschützte Carboxylate, doch die notwendigen stark sauren Spaltbedingungen mit TFMSA hätten beim MBHA-Harz die Spaltung vom Harz zur Folge. Beim PEGA-Harz ist es fraglich, ob das Harz den stark sauren Bedingungen überhaupt standhält. Ebenso ungeeignet sind Aminosäuren mit Aminen in der Seitenkette, wie z.B. Lysin (Lys) oder Arginin (Arg). Die meisten gewöhnlichen Schutzgruppen werden unter den sauren Bedingungen während der Synthese ebenfalls gespalten. Die freien Aminfunktionen würden in den weiteren Kupplungsschritten zur Bildung anderer Produkte führen. Für die lipophilen Aminosäuren, wie Valin (Val) und Leucin (Leu), die auch schon bei der Testsynthese zum Einsatz kamen spielt dies keine Rolle. Aminosäuren mit Amidfunktionen in der Seitenkette, wie Glutamin (Gln) oder Asparagin (Asn), sind auch einsetzbar.

Neben diesen Einschränkungen ist für die Wahl der Aminosäuren die Substratspezifität der Cysteinproteasen ausschlaggebend. Es sollte hier durch die Verwendung von ungewöhnlichen Aminosäuren an bestimmten Positionen des Inhibitors eine hohe Diversität erreicht werden. Im folgenden Schema befindet sich eine Übersicht der verwendeten Aminosäuren an diesen Positionen. Die Nomenklatur erfolgte in Anlehnung an *Schechter* und *Berger*.<sup>[115]</sup> In diesem Fall ist problematisch, dass es sich ausgehend vom Fumarsäurebaustein um ein symmetrisches Diamid handelt. Es kann also keine eindeutige

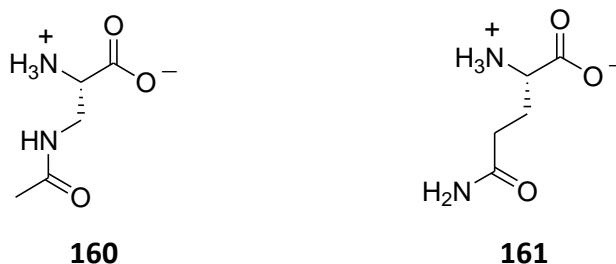
Richtung vom C- zum N-Terminus definiert werden. Zur Vereinfachung wurde der tetrapeptidische Teil für die Bindungstaschen  $S^1$  bis  $S^4$  und der tripeptidische Teil für  $S^{1'}$  bis  $S^{3'}$  festgelegt. Diese Bezeichnungen beschreiben jedoch nicht notwendigerweise die Lage im aktiven Zentrum der Cysteinprotease. Davon ausgehend wurde nun die folgende Auswahl an Aminosäuren getroffen.



**Abb. 4.61** Design der kombinatorischen Inhibitorbibliothek für Falcipain-2 und Rhodesain

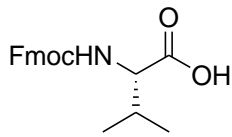
Wie in diesem Schema zu sehen ist, werden an vier von den sieben Positionen im Inhibitor einige *L*-Aminosäuren variiert. Die Auswahl der Aminosäuren richtete sich nach zwei Kriterien: zum Einen sollte das Wissen über das natürliche Substrat der Proteasen des CA-Clans der Familie C1 berücksichtigt werden, zum Anderen sollten ungewöhnliche, zum Teil auch unnatürliche Aminosäuren in die Bibliothek eingebaut werden. Beim tripeptidischen Fragment sind die Positionen  $P^{2'}$  und  $P^{3'}$  mit Glycin (Gly) bzw. Phenylalanin (Phe) fest definiert, lediglich an  $P^{1'}$  sollten Alanin (Ala) und Gly eingebaut werden. Dieser Teil wurde kaum bis gar nicht variiert. Beim tetrapeptidischen Teil wurde die  $P^3$ - wenig variiert und die  $P^4$ -Position mit Valin (Val) konstant gehalten. An  $P^3$  waren unpolare Aminosäuren wie Ala, Val und Leucin (Leu) vorgesehen. Entscheidend sollten die  $P^2$ - und die  $P^1$ -Position sein. Für  $P^2$  sollten ebenfalls unpolare Aminosäuren verwendet werden, zum einen die natürlich Vorkommenden Leu, Isoleucin (Ile) und Phe und die beiden unnatürlichen Aminosäuren Cyclohexylglycin (Chg) und Phenylglycin (Phg). Die letzteren beiden unnatürlichen Aminosäuren wurden gewählt, um dem Inhibitor eine proteolytische Stabilität zu verleihen. Cysteinproteasen der C1 Familie besitzen eine ausgeprägte Präferenz für Arginin an  $P^1$ . Arg

konnte aus bereits erwähnten Synthesegründen nicht eingebaut werden und würde bei einem Screening auch sehr wahrscheinlich gegenüber den anderen Aminosäuren dominieren. Um dies zu vermeiden, wurde bewusst kein Weg gesucht, um Arg einzubauen. Es sollten vielmehr andere ungewöhnliche Aminosäuren für P<sup>1</sup> gefunden werden. An der P<sup>1</sup>-Position waren zusätzlich zu den unpolaren Aminosäuren Ala und Phe also auch Asn und Gln vorgesehen. Außerdem sollte die unnatürliche Aminosäure **160**, oder hier auch als C1(Ac) bezeichnet, eingebaut werden, die ein Konstitutionsisomer von Glutamin darstellt. Lediglich die Amidbindung in der Seitenkette ist bei beiden Aminosäuren vertauscht.



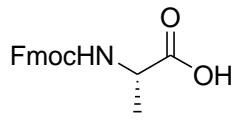
**Abb. 4.62** Strukturen der isomeren Aminosäuren C1(Ac) und Glutamin im Vergleich

Die Aminosäuren an P<sup>1</sup>- bis P<sup>4</sup>-Position müssten in der Fmoc-geschützten Form, die der Positionen P<sup>1'</sup> bis P<sup>3'</sup> als *tert*-Butylester eingesetzt werden. Alle verwendeten Aminosäuren sind in der folgenden Abbildung (**Abb. 4.63**) dargestellt.



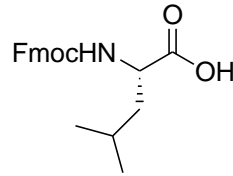
**143**

Fmoc-Val-OH



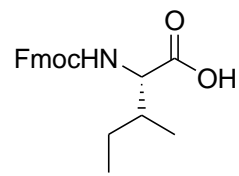
**104**

Fmoc-Ala-OH



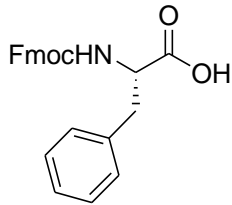
**144**

Fmoc-Leu-OH



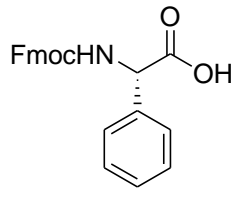
**162**

Fmoc-Ile-OH



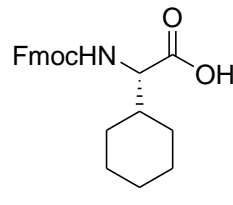
**137**

Fmoc-Phe-OH



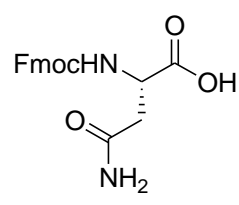
**163**

Fmoc-Phg-OH



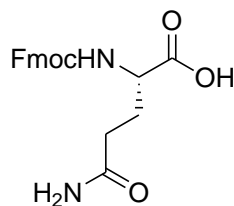
**164**

Fmoc-Chg-OH



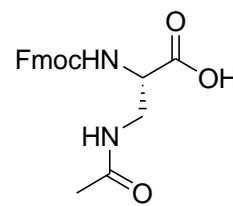
**165**

Fmoc-Asn-OH



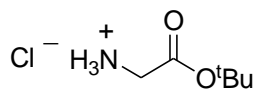
**145**

Fmoc-Gln-OH



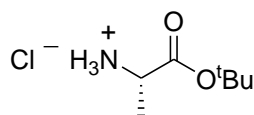
**166**

Fmoc-C1(Ac)-OH



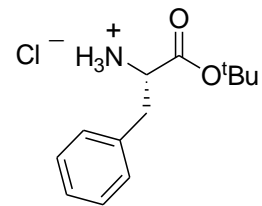
**150**

H-Gly-O<sup>t</sup>Bu



**151**

H-Ala-O<sup>t</sup>Bu

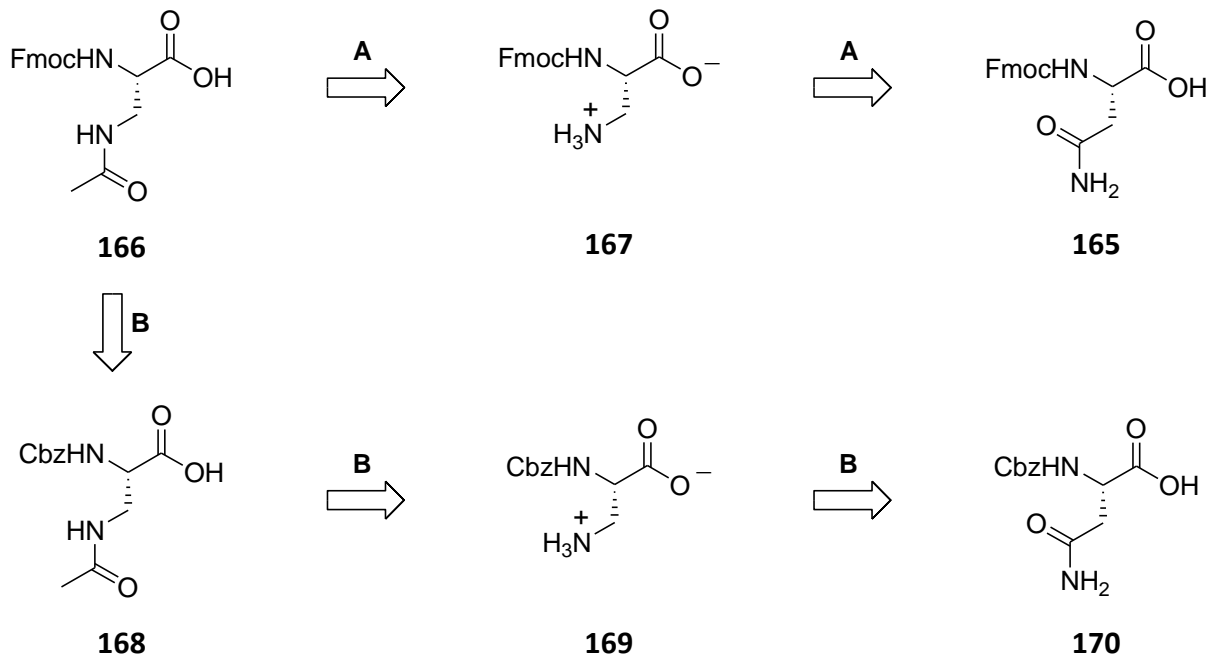


**152**

H-Phe-O<sup>t</sup>Bu

**Abb. 4.63** Aminosäuren für die Festphasensynthese der kombinatorischen Inhibitorbibliothek

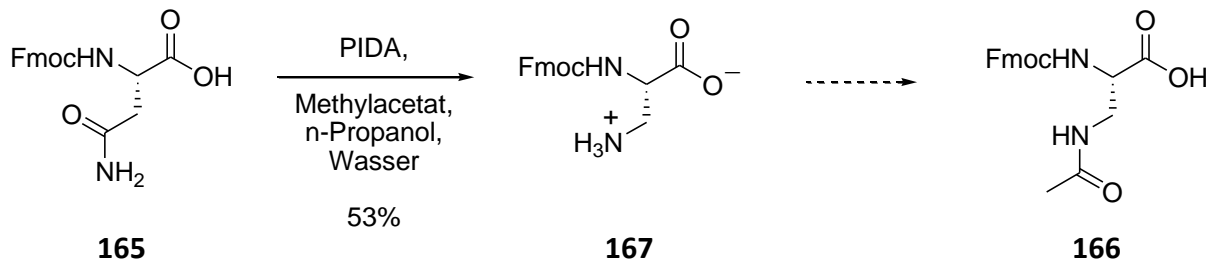
Alle diese Aminosäuren sind kommerziell erhältlich außer der C1(Ac)-Aminosäure **166**. Für **166** musste vorweg eine Syntheseroute entwickelt werden. Prinzipiell waren zwei im folgenden Schema abgebildeten Synthesewege möglich und sollten getestet und miteinander verglichen werden.



**Abb. 4.64** Strategien **A** und **B** zur Synthese der C1(Ac)-Aminosäure **166**

Nach dem ersten Weg (Route **A**) sollte von Fmoc-geschützten Asn **165** ausgegangen werden. Durch einen Hoffmannabbau sollte die C1-Aminosäure **167** erhalten werden, die anschließend acetyliert werden sollte. Dieser Reaktionspfad wird im Folgenden als Fmoc-Route bezeichnet. Bei dem alternativen Weg, der Cbz-Route (**B**), sollte mit dem Cbz-geschützten Asn **170** begonnen werden, das ebenfalls durch einen Hoffmannabbau zu **169** umgesetzt werden sollte. Nach anschließender Acetylierung zu **168** sollte eine Cbz-Entschützung und Fmoc-Schützung im letzten Schritt stattfinden, um die gewünschte Aminosäure **167** zu erhalten. Der große Unterschied bei diesen Syntheserouten ist, dass der Acetylierungsschritt aufgrund der baselabilen Fmoc-Gruppe bei der Fmoc-Route nicht wie gewöhnlich im Basischen bzw. nur unter milderen Bedingungen durchgeführt werden kann. Bei der Cbz-Route spielt dies keine Rolle, hier können Standardbedingungen für die Acetylierung verwendet werden.

In der folgenden Abbildung ist ausgehend von der käuflichen Fmoc-Aminosäure **165** die Fmoc-Route dargestellt. Die Reaktionsbedingungen für die Acetylierung ist weiter unten dargestellt, da hier mehrere verschiedene Bedingungen getestet wurden.



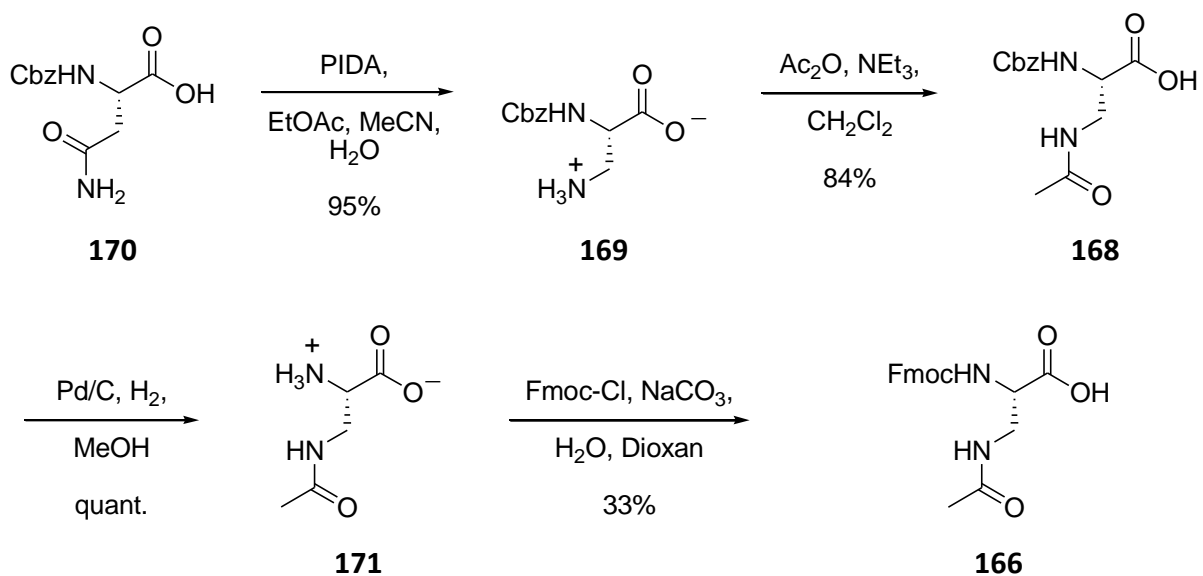
**Abb. 4.65** Die Fmoc-Route zur Darstellung der Fmoc-geschützten Aminosäure **166**

Der erste Reaktionsschritt entspricht einem literaturbekannten Hoffmannabbau von Asn **165**.<sup>[158]</sup> Das Edukt wurde mit PIDA in einem Lösungsmittelgemisch aus Methylacetat, n-Propanol und Wasser bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Produkt kristallisierte aus und konnte in einer Ausbeute von 53 % erhalten werden, was dem angegebenen Literaturwert von 59 % für diese Umsetzung nahe kommt. Die geeigneten Reaktionsbedingungen für die Acetylierung der Aminfunktion von **167** in Anwesenheit der Fmoc-Schutzgruppe zu finden, gestaltete sich schwierig. Das Problem hierbei ist, dass bei gewöhnlichen Acetylierungen neben dem eigentlichen Acetylierungsreagenz, in den meisten Fällen Essigsäureanhydrid oder Essigsäurechlorid, eine nichtnukleophile Base anwesend ist, damit die Aminfunktion deprotoniert vorliegt. Dadurch wird allerdings im Edukt selbst ein primäres Amin gebildet, das die Fmoc-Schutzgruppe leicht spalten kann. Ein solcher Ansatz mit Triethylamin als Base und Essigsäureanhydrid als Acetylierungsreagenz in Dichlormethan führte bereits nach kurzer Zeit zu einer Fmoc-Entschützung. Aus diesem Grund wurden mittels Literaturrecherche verschiedene Acetylierungsbedingungen ausgewählt und anschließend getestet. In den weiteren Versuchen wurde stets Essigsäureanhydrid als Acetylierungsreagenz verwendet. Das Lösungsmittel, die Reaktionszeit und die Temperatur wurden jeweils variiert. Zunächst wurde eine Vorschrift zur Acetylierung von Methionin im Sauren getestet.<sup>[159]</sup> Eine andere in der Literatur beschriebene Möglichkeit war die Acetylierung von Aminosäuren in saurer wässriger Lösung unter Behandlung im Ultraschallbad.<sup>[160]</sup> Hier konnte lediglich in einem kleinen Testansatz etwas Produkt **166** isoliert und im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nachgewiesen werden, jedoch in größeren Maßstäben konnte diese Umsetzung nicht reproduziert werden. Schließlich wurden noch Reaktionen in reinem Essigsäureanhydrid mit einem Kaliumfluorid-Addukt auf Aluminiumoxid (KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>[161]</sup> und mit DMAP<sup>[162]</sup> als Katalysatoren getestet.



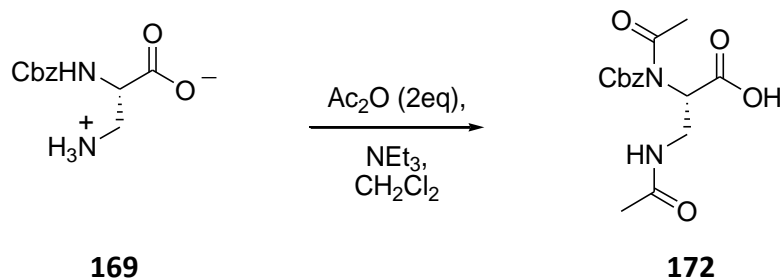
Per Dünnschichtchromatographie wurden alle beschriebenen Reaktionen verfolgt und anschließend aufgearbeitet. Teilweise bildeten sich mehrere neue Verbindungen, die jedoch in keinem der Fälle isoliert oder deren Strukturen per  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aufgeklärt werden konnten. Man konnte bei den meisten Reaktionen eine Zersetzung des Eduktes beobachten, z.B. sehr oft die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Da Verbindung **166** trotz intensiver Bemühungen über die Fmoc-Route unter den getesteten Bedingungen nicht dargestellt werden konnte, wurde nun die oben bereits beschriebene Cbz-Route untersucht (**Abb. 4.66**).



**Abb. 4.66** Die Cbz-Route zur Darstellung der Fmoc-geschützten Aminosäure **166**

Im ersten Schritt wurde wieder ein Hoffmannabbau mit PIDA in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester, Acetonitril und Wasser durchgeführt.<sup>[158]</sup> Hier konnte die Aminosäure **169** in einer guten Ausbeute von 95 % isoliert werden. Anschließend konnte die Acetylierung der Aminfunktion von **169** mit Essigsäureanhydrid in Dichlormethan und Triethylamin als Base durchgeführt werden. Bei diesem Schritt war es äußerst wichtig, nur ein Äquivalent an Essigsäureanhydrid einzusetzen, da sonst eine Mehrfachacetylierung zu **172** stattfindet (siehe **Abb. 4.67**).

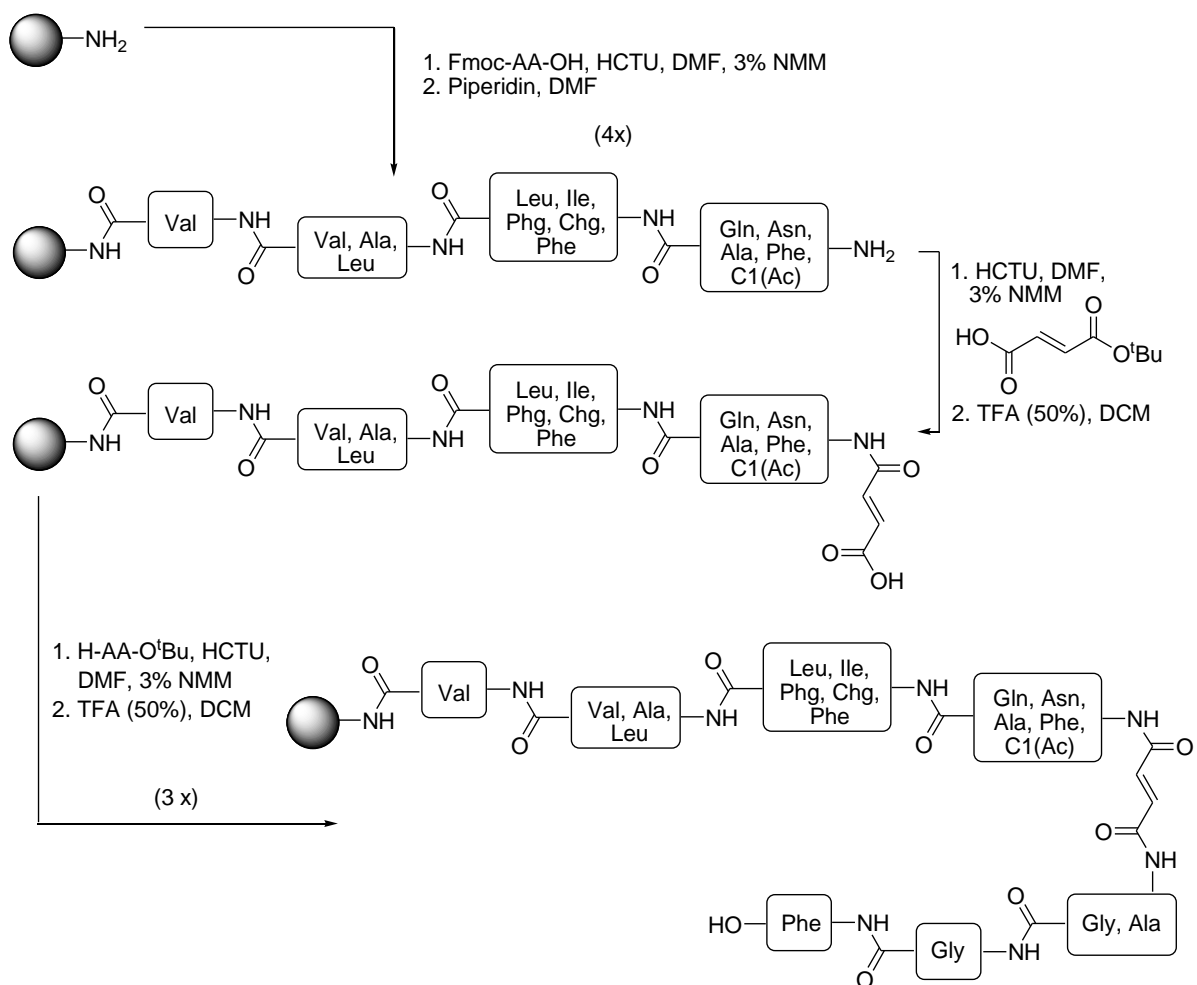


**Abb. 4.67** Die Bildung des Nebenproduktes **172** bei der Acetylierung

Bei genau zwei Äquivalenten an Acetylierungsreagenz unter den gleichen Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur konnte hauptsächlich die zweifachacetylierte Aminosäure **172** isoliert werden. Auch bei der optimierten Umsetzung mit nur einem Äquivalent konnte die Bildung von **172** zu etwa 5 % im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachgewiesen werden. Auf eine säulenchromatographische Reinigung wurde an dieser Stelle jedoch verzichtet, und das Produkt **168** konnte in einer Ausbeute von 84 % erhalten werden. Im nächsten Schritt fand die Cbz-Entschützung mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse in Methanol statt. Da das Produkt dieser Umsetzung in Methanol schlecht löslich war und auskristallisierte wurde die Suspension mit einer Mischung aus Methanol und 5 %iger Salzsäure versetzt und anschließend der Katalysator abfiltriert. Die Bildung des Produkts **171** konnte in einem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachgewiesen werden. Das Hydrochloridsalz **171** wurde quantitativ erhalten und ohne Reinigung und Charakterisierung weiter umgesetzt. Zur Einführung der Fmoc-Schutzgruppe wurde **171** zunächst in einer 10 %igen wässrigen Natriumcarbonatlösung gelöst und bei 0 °C eine Lösung von Fmoc-Cl in Dioxan zugetropft. Diese Umsetzung erfolgte in Anlehnung an bereits bekannte Fmoc-Schützungen.<sup>[163]</sup> Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte die Fmoc-Aminosäure **166** lediglich in Ausbeuten um die 20 % isoliert werden. Auch hier wurde versucht, durch Zugabe von mehreren Äquivalenten an Fmoc-Cl den Reaktionsumsatz zu erhöhen, jedoch wurde hierbei per Dünnschichtchromatographie die Bildung von mehreren Nebenprodukten beobachtet. Auch bei Verlängerung der Reaktionszeit wurde dies festgestellt. Bei den Nebenprodukten handelt es sich um mehrfach Fmoc-geschützte Verbindungen und um hydrolysiertes Fmoc-Cl. Die beste Ausbeute von 33 % wurde bei der Reaktion von **171** mit nur 1.1 Äquivalenten von Fmoc-Cl und einer Reaktionszeit von 24 Stunden erzielt. Die Fmoc-Aminosäure **166** musste säulenchromatographisch an Kieselgel von entstandenen Nebenprodukten abgetrennt werden. Somit stellt die Cbz-Route zur

Darstellung von **166** eine zuverlässige Synthesemethode dar, jedoch müssen Ausbeuteverluste im letzten Reaktionsschritt in Kauf genommen werden. Alternative Fmoc-Schützungen an dieser Stelle sind denkbar, wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Es bietet sich beispielsweise der Einsatz von Fmoc-OSu oder neuere Ansätze über polymergebundene Fmoc-Reagenzien an.<sup>[164]</sup>

Nach der Synthese der benötigten Fmoc-Aminosäure **166** konnte nun die kombinatorische Inhibitorbibliothek nach der „split and mix“-Synthese dargestellt werden. Dazu wurde zunächst nach Trocknen des vom Hersteller vorgequollenen PEGA-Harzes eine isopyknotische Lösung in einer Mischung aus Dichlormethan und Hexan hergestellt, um das PEGA-Harz in die 150 MikroKans zu überführen. Anschließend wurde jeweils ein radiofrequenzmarkierter Mikrochip in alle Gefäße gegeben, sie wurden verschlossen, mit Hilfe der *IRORI Accu Tag Synthesis*-Software eingescannt und nach dem folgenden Reaktionsschema umgesetzt.



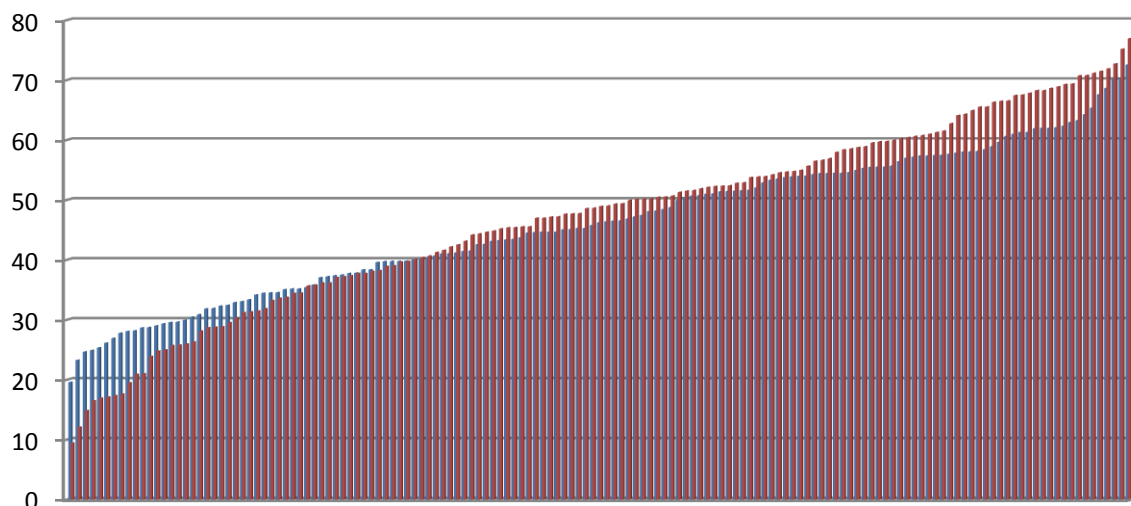
**Abb. 4.68** Schema zur Synthese der kombinatorischen Inhibitorbibliothek

Bei der Synthese der Bibliothek wurde analog wie beim Testinhibitor **148** vorgegangen, lediglich die Reaktions- und Waschzeiten wurden etwas verlängert, und es wurden 3.0 anstatt 2.5 Äquivalente an Reaktanden eingesetzt. Jeder Kupplungsschritt wurde zweimal durchgeführt, wobei zwischen den Kupplungsschritten die Aufteilung der MikroKans auf die Reaktionsgefäße mit Hilfe der IRORI-Technik erfolgte. Die Umsetzungen wurden exemplarisch an zwei MikroKans pro Reaktionsgefäß mit dem Kaisertest und/bzw. dem Malachitgrüntest überprüft. Dazu wurden die Gefäße geöffnet und jeweils eine kleine Probe des Harzes zur Untersuchung entnommen. Nach der vollendeten Synthese der Bibliothek erfolgte ein intensiver Waschgang mit Dichlormethan, Methanol und Diethylether, und die Bibliothek wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Es konnte also erfolgreich eine Synthese einer Inhibitorbibliothek entwickelt werden, die sowohl natürliche als auch unnatürliche Aminosäuren als Bausteine enthält. Die Sequenzen sind neu und für Inhibitoren der Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain ungewöhnlich. Das Screening der Bibliothek auf Inhibitoreigenschaften der Mitglieder gegenüber Falcipain-2 und Rhodesain konnte nun durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sollten neue interessante Inhibitoren mit ungewöhnlichen Aminosäuresequenzen liefern.

### **4.2.3 Screening der kombinatorischen Inhibitorbibliothek**

Die gesamte Bibliothek wurde an Falcipain-2 und an Rhodesain getestet. Auf diese Weise wurden für alle 150 Mitglieder der Bibliothek Hemmwerte in Prozent erhalten. Der Assay konnte wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben für beide Cysteinproteasen durchgeführt werden. In der folgenden Grafik ist eine Übersicht über diese beiden Screenings dargestellt. Die Hemmwerte für alle 150 Bibliotheksmitglieder bei Falcipain-2 und Rhodesain sind in einer Tabelle im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 9.3).



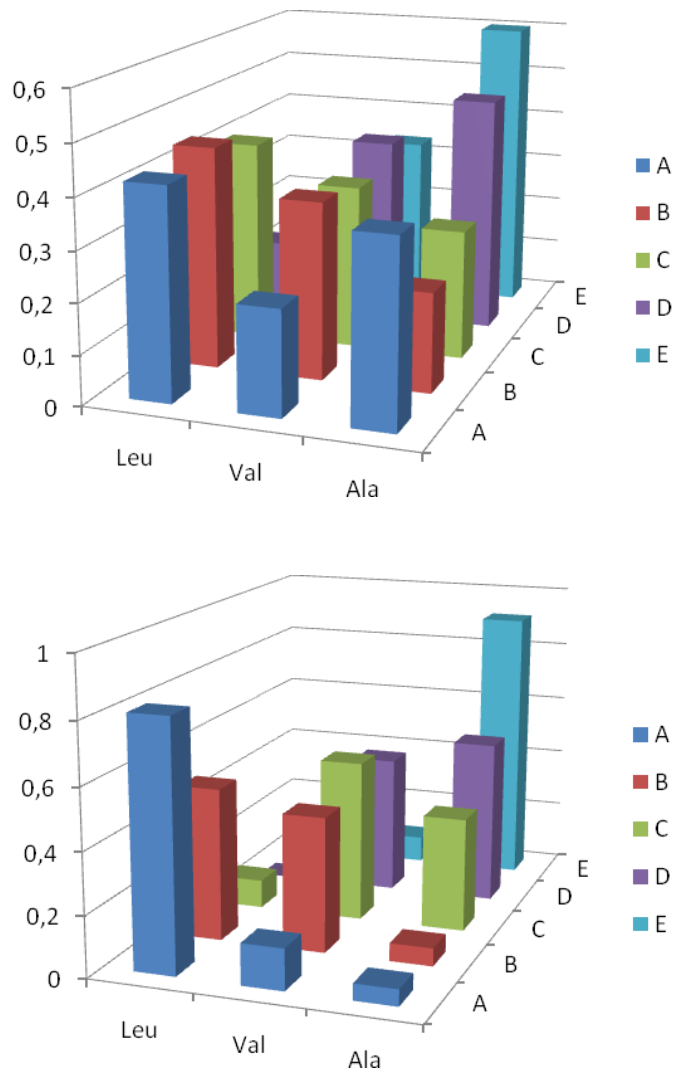
**Abb. 4.69** Übersicht über die beiden Screenings an Falcipain-2 (blau) und an Rhodesain (rot)

Aufgetragen sind hier die gefundenen Hemmwerte in % der einzelnen Bibliotheksmitglieder, wobei pro Verbindung je zwei Balken dargestellt sind. Die Messwerte aus dem Falcipain-2-Screening sind blau, die für das Rhodesain-Screenings sind rot dargestellt. In diesem Diagramm lässt sich erkennen, dass alle Mitglieder der Bibliothek die beiden strukturähnlichen Cysteinproteasen hemmen können mit Hemmungen zwischen 7 und 77 %. Aus den Ergebnissen lassen sich Rückschlüsse auf Bevorzugung von bestimmten Aminosäureresten an einigen Positionen der Bibliothek feststellen. Es wurde ein statistischer Ansatz gewählt, um die Screeningdaten auszuwerten. Die Inhibitoren wurden in fünf Gruppen (A bis E) nach dem Inhibitorpotential aufgeteilt. Diese Gruppen und die jeweilige Anzahl an Inhibitoren sind in **Tab. 4.8** aufgeführt.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Hemmung I an der Festphase	$I \geq 60\%$	$60\% > I \geq 50\%$	$50\% > I \geq 40\%$	$40\% > I \geq 30\%$	$30\% > I$
Anzahl der Mitglieder beim Falcipain-Screening	19	45	42	29	15
Anzahl der Mitglieder beim Rhodesain-Screening	37	34	32	24	23

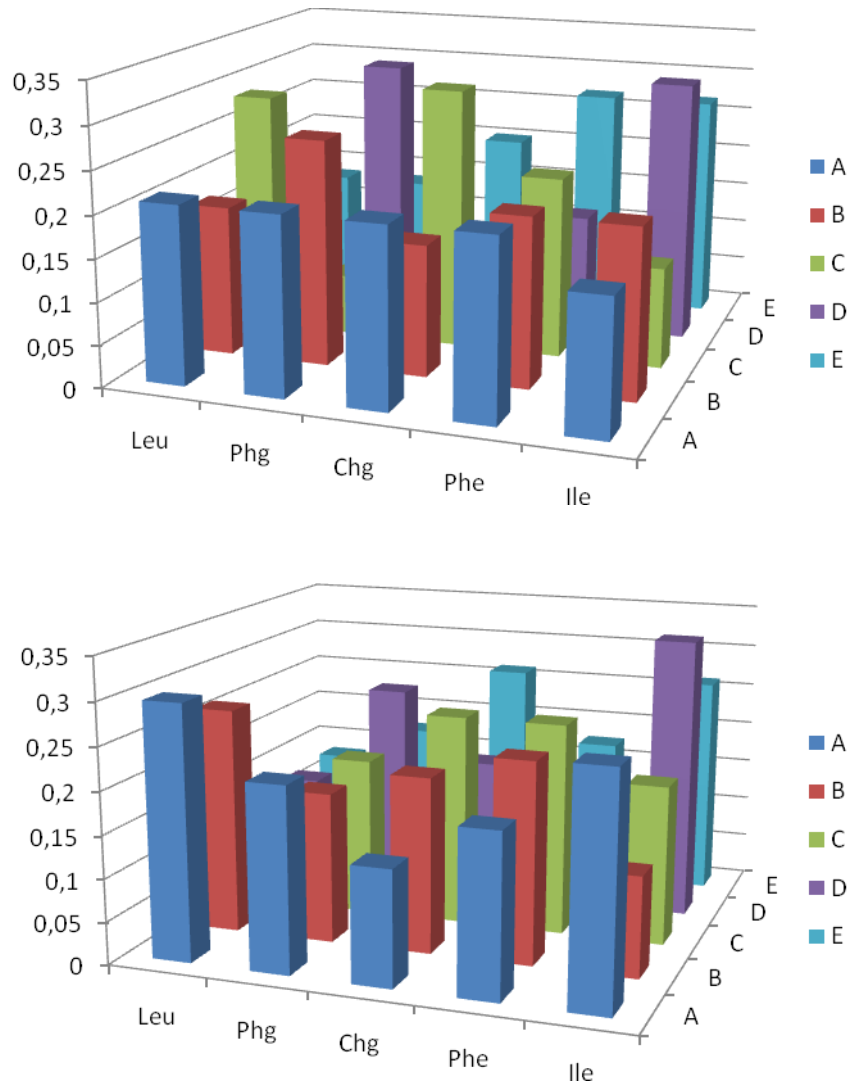
**Tab. 4.8** Einteilung der Inhibitoren nach ihrem Inhibitorpotential

Anschließend wurden für jede Gruppe die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren an allen vier variierten Positionen berechnet. Auf diese Weise erhält man pro Gruppe den prozentualen Anteil der jeweiligen Aminosäure und kann Rückschlüsse auf die Güte dieser Aminosäure an der bestimmten Position ziehen. Die relativen Häufigkeiten der an P<sup>3</sup> verwendeten Aminosäuren sind in **Abb. 4.70** dargestellt. Für Falcipain-2 und Rhodesain wurden hier sehr ähnliche Tendenzen gefunden. So ist Leucin im Vergleich zu Phenylalanin und Alanin offensichtlich bevorzugt. Die kleinste Aminosäure Alanin in dieser Reihe kommt am häufigsten in der Gruppe mit den niedrigsten Hemmwerten vor. Offensichtlich sind an P<sup>3</sup> große unpolare Seitenketten am besten geeignet, um die Bindungstaschen der Cysteinproteasen auszufüllen.



**Abb. 4.70** Relative Häufigkeiten der Aminosäuren an P<sup>3</sup> für Falcipain-2 (oben) und Rhodesain (unten); die Gruppen A bis E für beide Proteasen sind in **Tab. 4.8** aufgeführt.

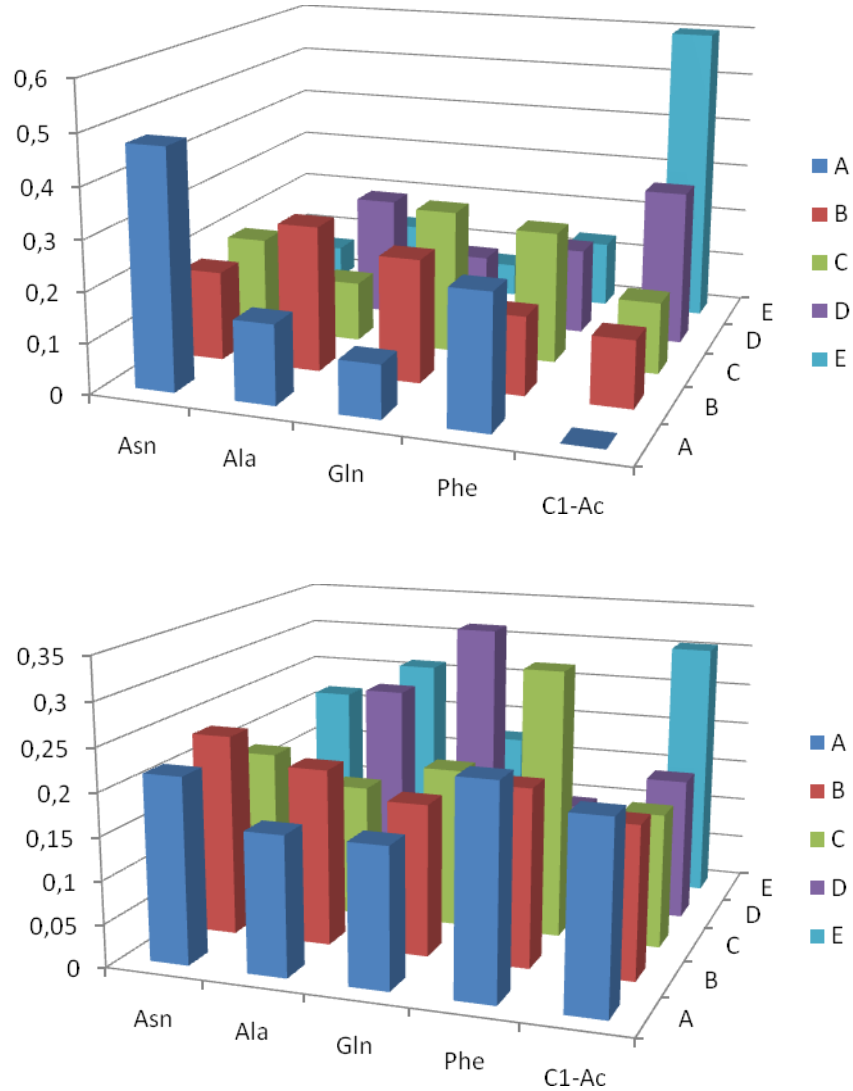
An P<sup>2</sup> können aus diesem statistischen Ansatz kaum klare Präferenzen bestimmter Aminosäuren für beide Proteasen erkannt werden. Leucin scheint für Rhodesain an dieser Position etwas bevorzugt zu sein gegenüber den anderen Aminosäuren. Die anderen Werte sind gleichmäßig verteilt (siehe **Abb 4.71**), was darauf hinweist, dass an P<sup>2</sup> offensichtlich verschiedene Seitenketten toleriert werden. Außerdem wurden in der Bibliothek an dieser Position lediglich relativ ähnliche unpolare Aminosäuren eingebaut.



**Abb 4.71** Relative Häufigkeiten der Aminosäuren an P<sup>2</sup> für Falcipain-2 (oben) und Rhodesain (unten); die Gruppen A bis E für beide Proteasen sind in **Tab. 4.8** aufgeführt.

An P<sup>1</sup> ist es ähnlich wie an P<sup>2</sup>: fast alle eingebauten Aminosäuren werden von den Proteasen mit wenigen Ausnahmen toleriert (siehe **Abb. 4.72**). Für Falcipain-2 ist offensichtlich ein Asparaginrest an dieser Position von Vorteil. Im Gegensatz dazu zeigt die künstliche C1-Ac-

Aminosäure die schlechtesten Werte für die Inhibierung. Die entsprechenden Daten für Rhodesain sind gleichmäßig verteilt. Für beide Proteasen scheint Phenylalanin ebenfalls etwas bevorzugt zu sein.



**Abb. 4.72.** Relative Häufigkeiten der Aminosäuren an  $P^1$  für Falcipain-2 (oben) und Rhodesain (unten); die Gruppen A bis E für beide Proteasen sind in **Tab. 4.8** aufgeführt.

An Stelle  $P^{11}$  wurden nur zwei Aminosäuren eingebaut, wobei hier eine leichte Bevorzugung von Glycin gegenüber Alanin zu erkennen ist. Zusammengefasst lässt sich aus der statistischen Auswertung des Festphasenscreenings sagen, dass die besten Inhibitoren an  $P^3$  und an  $P^2$  Leucin, an  $P^1$  Phenylalanin und für Falcipain-2 auch Asparagin und an  $P^{11}$  Glycin besitzen. Um dies zu bestätigen, sollten nun einige der Inhibitoren am Harz synthetisiert und abgespalten werden und deren Hemmeigenschaften an Falcipain-2 und Rhodesain in Lösung

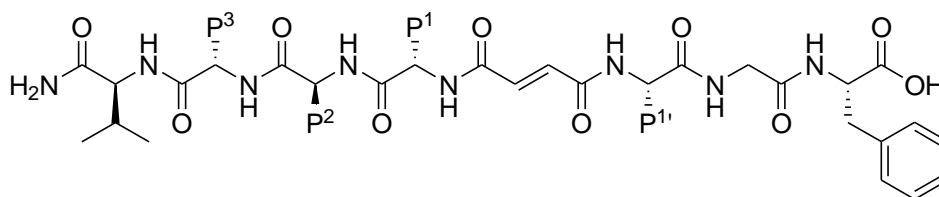


untersucht werden. Im folgenden Kapitel wird die Synthese und die Charakterisierung der Verbindungen vorgestellt.

#### 4.2.4 Synthese und Screening ausgewählter Bibliotheksmitglieder

Aus dem Datensatz der beiden Festphasenscreenings wurden nun zusätzlich zu dem bereits synthetisierten Inhibitor **148** 13 Mitglieder ausgewählt, die nun für vergleichende Messungen in Lösung an beiden Enzymen synthetisiert werden sollten. Nicht nur der Vergleich mit den aus dem Festphasenscreening gewonnenen Daten war interessant, sondern auch das absolute Potential dieser Verbindungsklasse. Aus dem Festphasenscreening konnten die Inhibitoren bisher nur vergleichend betrachtet werden. Außerdem sollte der Inhibierungsmechanismus in weiteren Experimenten näher untersucht werden. Die Frage, ob diese Verbindungsklasse die Cysteinproteasen tatsächlich irreversibel hemmt, sollte ebenfalls durch Dialyseexperimente und in Messungen der Zeitabhängigkeit der Inhibierung geklärt werden.

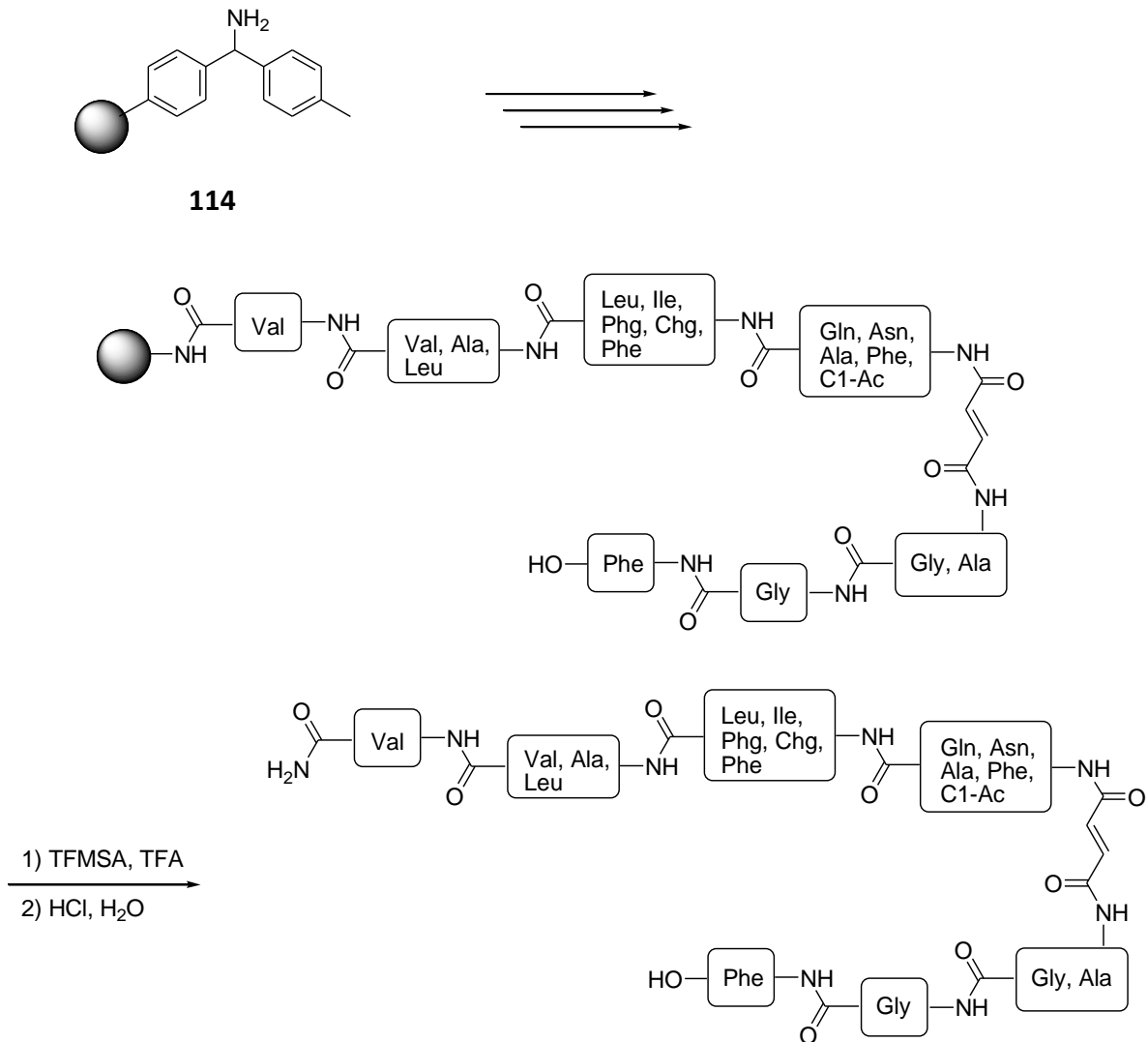
Zunächst soll die Synthese und Auswahl der Inhibitoren aus der Bibliothek behandelt werden. In **Tab. 4.9** sind die Sequenzen der ausgewählten Inhibitoren und deren prozentuale Hemmungen aus dem Festphasenscreening dargestellt. Die Auswahl der Verbindungen orientierte sich an den Ergebnissen der beiden Festphasenscreenings. So wurden bewusst die Kombination von Leucin an P<sup>3</sup> und P<sup>2</sup> gewählt, da dies laut dem Screening die besten Inhibitoren sein sollten. Die peptidischen Inhibitoren wurden analog der zuvor beschriebenen Synthese des Testinhibitors **148** auf MBHA-Harz als polymerer Träger synthetisiert. Der Inhibitor ist über den C-Terminus des Valins gebunden, der nach der Abspaltung vom Harz als Amid funktionalisiert vorliegt.



Nr.	P <sup>3</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P <sup>1'</sup>	Hemmung von FP-2	Hemmung von Rd
					in %	in %
148	Val	Leu	Gln	Ala	48	64
173	Leu	Leu	Ala	Gly	55	65
174	Leu	Leu	Ala	Ala	58	67
175	Leu	Leu	C1-Ac	Gly	54	60
176	Ala	Leu	C1-Ac	Gly	32	32
177	Ala	Chg	Asn	Gly	73	26
178	Val	Chg	Asn	Gly	61	46
179	Val	Chg	Gln	Gly	51	53
180	Ala	Chg	C1-Ac	Gly	23	25
181	Leu	Leu	Asn	Gly	70	71
182	Ala	Leu	Asn	Gly	41	24
183	Leu	Phg	Asn	Gly	51	50
184	Leu	Phe	Asn	Gly	70	61
185	Leu	Leu	Phe	Gly	69	69

**Tab. 4.9** Sequenzen und Hemmwerte aus dem Festphasenscreening der Inhibitoren **148**, **173** bis **185**

Das allgemeine Syntheschema für die Darstellung der Inhibitoren ist in **Abb. 4.73** dargestellt. Die ersten vier Aminosäuren wurden wie schon bei der Bibliothekssynthese über die Fmoc-Strategie an die feste Phase angebracht. Die mono-geschützte Fumarsäure **154** wurde gekuppelt und anschließend der *tert*-Butylester mit TFA in Dichlormethan gespalten. An die freie Carbonsäurefunktion konnten nun die restlichen drei Aminosäureester gekuppelt werden. Auch hier wurde jeweils die gesamte Syntheseroute mit dem Kaisertest bzw. dem Malachitgrüntest kontrolliert.



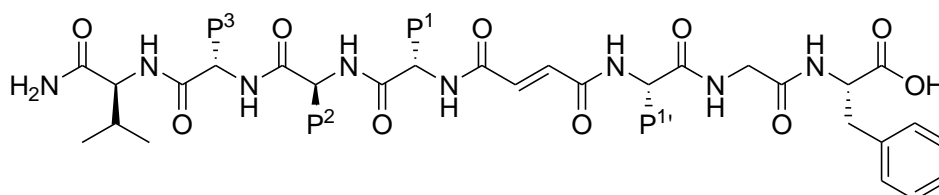
**Abb. 4.73** Allgemeine Syntheseroute für die peptidischen Inhibitoren an MBHA-Harz **114**

Der MBHA-Linker (siehe **Abb. 4.73**) kann im stark sauren durch Behandlung mit einer Lösung aus Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in TFA gespalten werden. Nach Abspaltung der Verbindungen vom polymeren Träger und Kristallisation aus verdünnter Salzsäure mussten die erhaltenen weißen Feststoffe aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in sämtlichen gängigen Lösungsmitteln zu den entsprechenden Triethylammoniumsalzen umgesalzt werden. Dazu wurden alle Verbindungen in reichlich Wasser suspendiert und durch Zugabe von möglichst wenig Triethylamin aufgelöst. Nach mehrmaligem Gefriertrocknen konnten auf diese Weise die entsprechenden wesentlich besser löslichen Triethylammoniumsalze gewonnen werden. Das Umsalzen gelang in den meisten Fällen nicht vollständig, was in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Inhibitoren an zu kleinen Integralen der Signale für das Triethylammoniumkation zu erkennen war. Zur Bestimmung der korrekten molekularen

Masse der Inhibitoren wurde der Anteil an Triethylamin anhand der Integrale dieser Signale berücksichtigt. In einigen wenigen Fällen fiel das Integral für das Triethylammoniumkation etwas zu groß aus. Dies kann dadurch erklärt werden, dass beim Lyophilisieren HCl-Rückstände vorhanden waren, wodurch sich Triethylammoniumchlorid bildete. Auch dies wurde zur Berechnung der molekularen Masse der Inhibitoren berücksichtigt. Durch chromatographische Reinigungsschritte wie MPLC oder HPLC konnte das Triethylammoniumchlorid nicht abgetrennt werden. Im Säuren sind die Verbindungen unlöslich, dadurch fällt der Einsatz von Kieselgel mit einem Laufmittel mit Säurezusatz weg. Eine Zugabe von Triethylamin zum Laufmittel führt zur Bildung der Triethylammoniumsalze, die auch auf dem Säulenmaterial liegen bleiben. Der Einsatz von RP-Materialien wurde ebenfalls getestet, doch auch hier ist mit und ohne TFA in Wasser-Methanol-Laufmittelgemischen keine ausreichende Löslichkeit erreicht worden. Nur unter Verwendung einer RP-18-Säule in Kombination mit einem Wasser-Methanol-Mischung, das Triethylamin enthält, konnten die Inhibitoren unter isokratischen Bedingungen zumindest analytisch an der HPLC untersucht werden. Gleiche Bedingungen an der MPLC hatten zur Folge, dass sich die Verbindung über das Säulenmaterial verteilte und sich praktisch keine Trennleistung erreichen ließ. Die per HPLC bestimmten Reinheiten der Inhibitoren betragen ohne weitere Reinigungsschritte zwischen 70 und 92 % bei einer Wellenlänge von 250 nm. Bei größeren Wellenlängen lagen die Werte höher, jedoch absorbieren die peptidischen Verbindungen nur bei niedrigeren Wellenlängen. Nebenprodukte bzw. peptidische Verunreinigungen können ebenfalls nur im Bereich zwischen 220 und 250 nm vom UV-Detektor erfasst werden. Bei 220 nm konnten keine eindeutigen Werte für die Reinheit erhalten werden, da der UV-Detektor durch die hohe Empfindlichkeit auf geringste Schwankungen des Lösungsmittelgemisches ansprach und die Baseline über den zeitlichen Verlauf schwankte.

Die Reinheiten für die Messungen waren ausreichend für die Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften. Alle Verbindungen wurden zunächst an Falcipain-2 und Rhodesain bei einer InhibitorKonzentration von 100  $\mu\text{M}$  getestet. Von den guten Inhibitoren wurden zusätzlich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte am isolierten Enzym und später in mikrobiologischen Untersuchungen an den Erregern bestimmt. Wie schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben wurden einige der Inhibitoren durch Zugabe des Tensids Brij 35 (0.005 %) auf Bildung von Aggregaten überprüft. Bei den peptidischen Verbindungen hatte das Tensid jedoch keinen Einfluss auf

die Hemmung. In **Tab. 4.10** sind die Sequenzen der synthetisierten Mitglieder und deren entsprechende Messergebnisse dargestellt.



Nr.	P <sup>3</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P <sup>1'</sup>	Festphasen- screening FP-2/Rd (in %)	Screening (100 μM) FP-2/Rd (in %)	IC <sub>50</sub> FP-2/Rd (in μM)	IC <sub>50</sub> P.f./T.b.b. (in μM)
148	Val	Leu	Gln	Ala	48 / 64	45 / 37	n.d. / n.d.	n.d. / n.d.
173	Leu	Leu	Ala	Gly	55 / 65	75 / 99	n.d. / 47	n.d. / n.d.
174	Leu	Leu	Ala	Ala	58 / 67	87 / 96	38.4* / 66	> 100 / n.d.
175	Leu	Leu	C1-Ac	Gly	54 / 60	80 / 87	46.7* / 89	n.d. / n.d.
176	Ala	Leu	C1-Ac	Gly	32 / 32	84 / 30	n.d. / n.d.	> 100 / n.d.
177	Ala	Chg	Asn	Gly	73 / 26	79 / 98	35 / 21	75 / n.d.
178	Val	Chg	Asn	Gly	61 / 46	90 / 96	15 / 4.0	32 / > 100
179	Val	Chg	Gln	Gly	51 / 53	83 / 99	4.4 / 4.1	27 / > 100
180	Ala	Chg	C1-Ac	Gly	23 / 25	83 / 95	20 / 17	22 / > 100
181	Leu	Leu	Asn	Gly	70 / 71	92 / 63	29 / 131	74 / n.d.
182	Ala	Leu	Asn	Gly	41 / 24	33 / 8	193 / n.d.	n.d. / n.d.
183	Leu	Phg	Asn	Gly	51 / 50	76 / 26	61 / n.d.	> 100 / n.d.
184	Leu	Phe	Asn	Gly	70 / 61	49 / 6	n.d. / n.d.	n.d. / n.d.
185	Leu	Leu	Phe	Gly	69 / 69	100 / 68	2.2 / 9.0	> 100 / n.d.

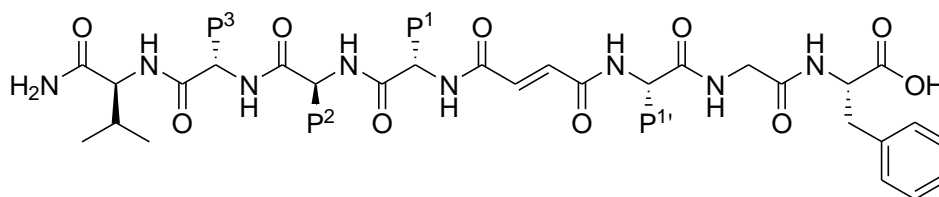
**Tab. 4.10** Sequenzen und Messergebnisse der Inhibitoren **148, 173 bis 185** (\*bestimmt in einer Kooperation<sup>[110]</sup> mit Cbz-Leu-Arg-AMC als Substrat unter analogen Bedingungen)

Bei einem Vergleich der Hemmwerte des Festphasenscreenings mit den nun erhaltenen Werten in Lösung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM wird die Zuverlässigkeit der neuen Methode bestätigt. Bis auf einige Ausnahmen bei den Verbindungen **177, 180, 183** und **184** stimmt der relative Vergleich der Messwerte vor allem unter Einbeziehung der bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte bei allen Verbindungen überein. Die absoluten Werte für das Hemmpotential aus dem Festphasenscreening allein sind nicht aussagekräftig für die

einzelnen Verbindungen. Dazu liegen die Einzelwerte viel zu nah aneinander. Viel entscheidender ist aber, dass die Ergebnisse der statistischen Auswertung durch diese Messungen bestätigt werden. Demnach sollte Verbindung **185** für beide Proteasen am besten sein, und ist es auch mit  $IC_{50}$ -Werten im niederen mikromolaren Bereich. Der analoge Inhibitor **181**, der an  $P^1$  Asparagin anstatt Phenylalanin besitzt, sollte laut der Statistik nur an Falcipain-2 gut sein. Dies wird ebenfalls bestätigt: 29  $\mu$ M an Falcipain-2 gegenüber 131  $\mu$ M an Rhodesain stimmen mit den Ergebnissen aus dem Festphasenscreening gut überein. Die weiteren Inhibitoren **173** bis **175** mit Leucin an  $P^3$  und  $P^2$  hemmen beide Proteasen schlechter als **185** und **181**. Sie besitzen an  $P^1$  Alanin oder die C1-Ac-Aminosäure. Wenn man diese Leucin-haltigen Inhibitoren mit Verbindung **176** vergleicht, bei der an  $P^3$  Leucin durch Alanin ausgetauscht ist, findet man kaum noch eine Hemmung der Proteasen. Des Weiteren wurden auch Inhibitoren mit ungewöhnlichen Sequenzen ausgewählt, die beim Festphasenscreening ungewöhnlich hohe Einzelhemmwerte aufwiesen. Die Verbindungen **177** bis **180** besitzen an  $P^3$  Valin oder Alanin, an  $P^2$  Cyclohexylglycin und an  $P^1$  Asparagin, Glutamin oder die C1-Ac-Aminosäure. **177** und **178** wiesen beim Festphasenscreening an Falcipain-2 hohe Hemmwerte auf, **179** war für beide Proteasen im besseren Drittel und **180** einer der schlechtesten Inhibitoren. Die Verbindungen **178** und **179** stellten sich als ungewöhnlich gute Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im niederen mikromolekularen Bereich heraus (jeweils 4  $\mu$ M an Rhodesain). Mit Valin an  $P^3$ , Cyclohexylglycin an  $P^2$  und Glutamin bzw. Asparagin an  $P^1$  sind Positionen von Aminosäuren besetzt, die bei der statistischen Auswertung jeweils im mittleren Bereich lagen. Anhand dieser Beispiele kann man sehen, dass es bei der Screeningmethode neben dem statistischen Ansatz auch möglich ist, durch Berücksichtigung von Sequenzen mit guten Einzelhemmwerten Hits zu finden. Verbindung **180** bildet in dieser Reihe eine Ausnahme, sie ergab für beide Enzyme schlechte Hemmwerte beim Festphasenscreening (23 bzw. 25 %). Die  $IC_{50}$ -Werte in Lösung an beiden Proteasen liegen jedoch im unteren mikromolaren Bereich (20  $\mu$ M bei Falcipain-2 und 17  $\mu$ M bei Rhodesain). Grund für solche falsch negativen Ergebnisse könnte sein, dass die Festphasensynthese in allen Schritten nicht vollständig funktioniert hat. Da bei einer kombinatorischen Synthese nicht bei allen Mitgliedern die Umsetzungen per Farbttest kontrolliert werden, kann es sein, dass solche Artefaktmesswerte entstehen. Dies ist ein generelles Problem kombinatorischer Ansätze.

Bei den biologischen Tests fällt auf, dass nur wenige der Inhibitoren an den Erregern aktiv sind. Generell war von einigen Inhibitoren die Löslichkeit zu schlecht, um die Tests durchzuführen. Am Erreger der Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei brucei*) sind alle getesteten Inhibitoren inaktiv, am Malariaerreger (*Plasmodium falciparum*) sind nur **177** bis **181** aktiv. Ursachen für die schlechte *in-vitro*-Aktivität der Verbindungsklasse können eine schlechte Bioverfügbarkeit oder auch der Metabolismus der Substanzen durch den Parasit sein. Bei den Tests an den Trypanosomen spielte die schlechte Löslichkeit sehr wahrscheinlich eine bedeutende Rolle dafür, dass überhaupt keine Aktivität gefunden wurde. Bei den Tests an den Plasmodien wurden keine Löslichkeitsprobleme beobachtet. Für die Zytotoxizität konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit keine IC<sub>50</sub>-Werte an Makrophagen bestimmt werden. Die hier beschriebenen Fumarsäurediamide stellen insgesamt eine neue Klasse an Cysteinproteaseinhibitoren dar, die allerdings aufgrund schlechter Löslichkeit nicht vollständig mikrobiologisch charakterisiert werden kann. Zur vollständigen Beschreibung der Hemmeigenschaften werden im folgenden Teil weitere Experimente beschrieben. Zum Einen soll die Selektivität der Inhibitoren untersucht werden, und zum Anderen der Mechanismus der Inhibierung aufgeklärt werden.

Die peptidischen Inhibitoren wurden zur Untersuchung der Selektivität an einer anderen Cysteinprotease getestet. Zunächst wurden alle Verbindungen bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM an Cathepsin B getestet. Für die hierbei besten Inhibitoren wurden anschließend die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Insgesamt wird Cathepsin B schlechter gehemmt als Falcipain-2 und Rhodesain. Jedoch befinden sich auch hier einige Beispiele mit IC<sub>50</sub>-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Vor allem Verbindung **178** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2.2 µM zeigt eine besonders gute Hemmung. Cathepsin B wird also von den Fumarsäurediamiden ebenfalls inhibiert, jedoch werden andere Aminosäuresequenzen bevorzugt.



Nr.	P <sup>3</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P <sup>1'</sup>	Screening (100 μM)	IC <sub>50</sub>
					Cathepsin B (in %)	Cathepsin B (in μM)
148	Val	Leu	Gln	Ala	23	n.d.
173	Leu	Leu	Ala	Gly	38	n.d.
174	Leu	Leu	Ala	Ala	45	n.d.
175	Leu	Leu	C1-Ac	Gly	n.i.	n.d.
176	Ala	Leu	C1-Ac	Gly	n.i.	n.d.
177	Ala	Chg	Asn	Gly	78	30.9
178	Val	Chg	Asn	Gly	100	2.2
179	Val	Chg	Gln	Gly	81	n.d.
180	Ala	Chg	C1-Ac	Gly	83	18.5
181	Leu	Leu	Asn	Gly	21	n.d.
182	Ala	Leu	Asn	Gly	17	n.d.
183	Leu	Phg	Asn	Gly	13	n.d.
184	Leu	Phe	Asn	Gly	24	n.d.
185	Leu	Leu	Phe	Gly	73	29.9

**Tab. 4.11** Screeningergebnisse der Inhibitoren **148**, **173** bis **185** an Cathepsin B zur Überprüfung der Selektivität

Zur Bestätigung der irreversiblen Hemmeigenschaften der peptidischen Inhibitoren wurde wie schon in Kapitel 4.1.3 beschrieben ein Dialyseexperiment mit E-64 als Referenzsubstanz durchgeführt. Da Verbindung **178** an Cathepsin B sehr gute Hemmeigenschaften zeigte, wurde dieser Inhibitor exemplarisch für diese Substanzgruppe untersucht. Es wurden die gleichen Konzentrationen und Bedingungen verwendet wie bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Die Aktivität des Enzyms im Kontrollversuch sank nach einer Stunde auf 77 %, nach zwei Stunden auf 53 % und nach drei Stunden auf 25 % der ursprünglichen Aktivität. Das Umsatz-Zeit-Diagramm des Dialyseexperiments ist in **Abb. 4.74** dargestellt.



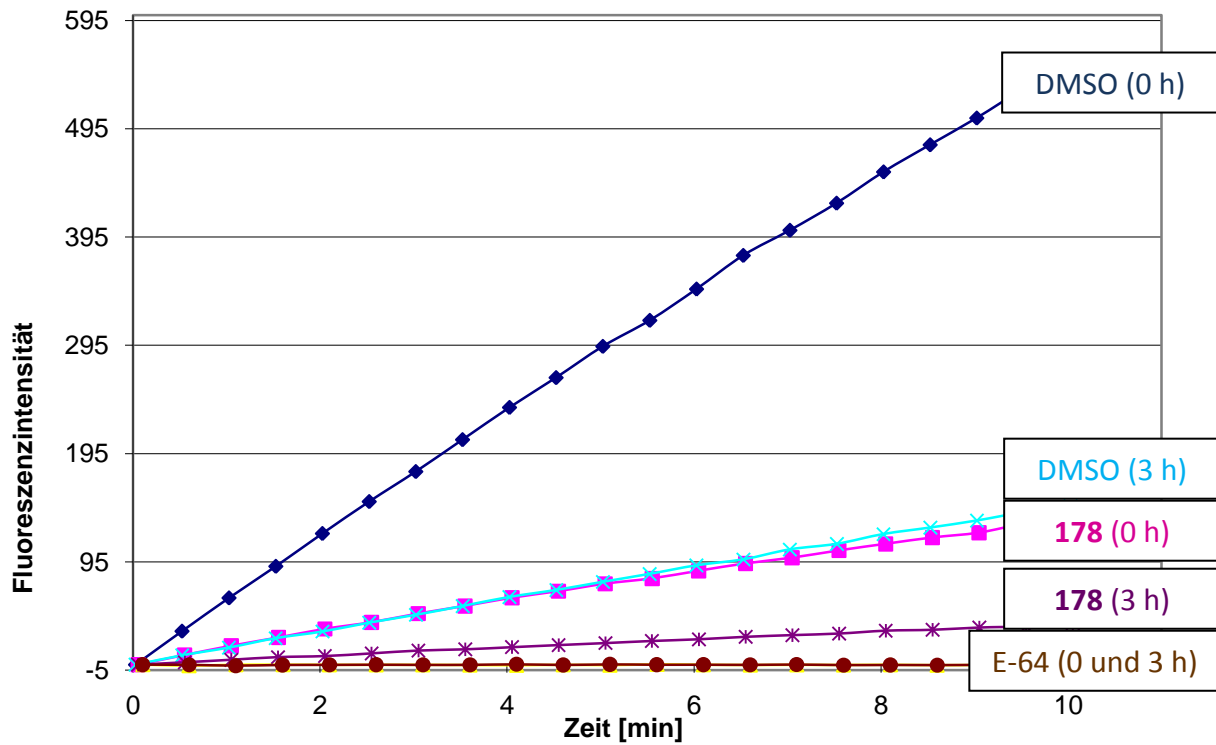


Abb. 4.74 Umsatz-Zeit-Diagramm beim Dialyseexperiment des Inhibitors **178** mit E-64 als Vergleichssubstanz

Vor der Dialyse wurde die Protease zu 74 % von **178** gehemmt. Nach drei Stunden wurde Cathepsin B immer noch zu 73 % inhibiert, weshalb man auf eine irreversible Hemmung schließen kann. Zusätzlich wurde die Zeitabhängigkeit der Hemmung ebenfalls mit Inhibitor **178** an Cathepsin B untersucht. Bei einem irreversiblen Inhibitor sollte die Hemmung zeitabhängig exponentiell zunehmen, bei einem reversiblen Inhibitor ändert sich der Wert der Hemmung nach einer Phase der Gleichgewichtseinstellung jedoch nicht mehr. **178** wurde also mit der Protease über drei verschiedene Zeiträume inkubiert und anschließend die Enzymrestaktivität durch Substratzugabe (Cbz-Phe-Arg-AMC) bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Messreihen durchgeführt, jeweils bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen, so dass insgesamt sechs  $IC_{50}$ -Werte bestimmt werden konnten (siehe Tab. 4.12).

Zeit (min)	$IC_{50}$ erste Messung ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ zweite Messung ( $\mu M$ )
5	2.9	2.2
20	2.1	2.15
35	1.9	2.05

Tab. 4.12 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Hemmung von Cathepsin B durch Inhibitor **178**

Die  $IC_{50}$ -Werte zeigen alle wie erwartet die Tendenz, dass sie bei zunehmender Inkubationszeit kleiner werden. Zwar fällt der Unterschied zwischen den  $IC_{50}$ -Werten sehr gering aus. Die für irreversible Inhibitoren typische Zeitabhängigkeit kann mit diesem Experiment jedoch bestätigt werden.

Mit dem kombinatorischen Ansatz zur Inhibitoroptimierung konnte in kurzer Zeit eine hohe Anzahl an potentiellen Inhibitoren auf Hemmeigenschaften untersucht werden. Dabei konnten peptidische Inhibitoren mit ungewöhnlichen Aminosäureresten identifiziert und synthetisiert werden. Erstmals ist es durch die neue Screeningmethode möglich gewesen, in einer statistischen Auswertung das gesamte Spektrum der Hemmstärke einer Inhibitorbibliothek in Erfahrung zu bringen. Nicht nur die besten Inhibitoren können demnach gefunden werden, sondern durch den Vergleich der unterschiedlichen Hemmwirkung der verschiedenen Bibliotheksmitglieder werden auch Erkenntnisse über die Bevorzugung von Aminosäuren an bestimmten Positionen gewonnen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist es, dass sie auf alle „one bead – one compound“-Inhibitorbibliotheken anwendbar ist. Der Einbau eines FRET-Substrats ist nicht notwendig. Der Inhibierungsmechanismus konnte ebenfalls charakterisiert werden: es handelt sich um irreversible Inhibitoren. Sehr wahrscheinlich wird das Michael-System vom Cysteinrest der Protease nukleophil angegriffen und auf diese Weise kovalent geblockt.

Die kombinatorische Methode hat im Vergleich zur klassischen Methode vor allem bezogen auf die Zeitersparnis einen enormen Vorteil. Sie ist aber durch die Einschränkungen in der Synthese gegenüber dem klassischen Ansatz benachteiligt. So können beide Methoden zur Inhibitoroptimierung zu einem erfolgreichen Resultat führen und müssen je nach Problemstellung angewendet werden.

## 5 Zusammenfassung

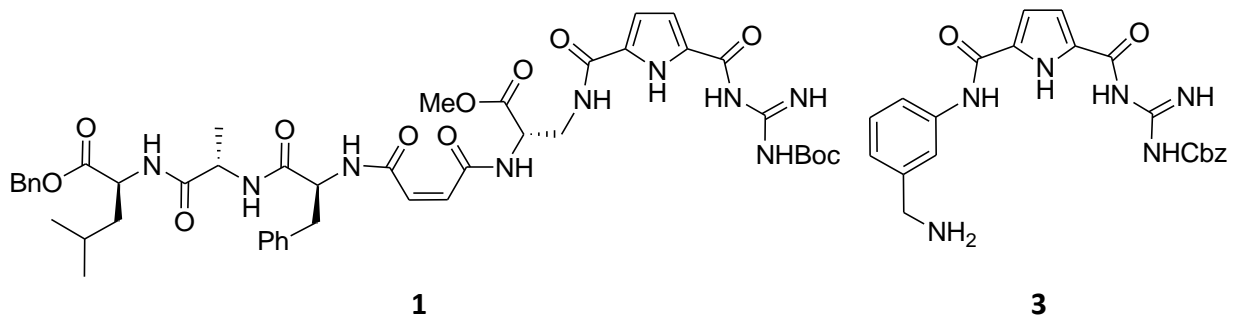
Die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten spielt eine wichtige Rolle, da die Erreger gegenwärtig Resistenzen gegenüber den gängigen Medikamenten gebildet haben. Oftmals besteht eine recht hohe Toxizität der bereits bestehenden Wirkstoffe, so dass deren Potential noch verbessert werden kann. Malaria und die Schlafkrankheit sind Infektionskrankheiten, deren Entwicklung und Ausbreitung im Wirt durch die gezielte Hemmung bestimmter parasitärer Cysteinproteasen gestoppt werden kann. Für den Malariaerreger (*Plasmodium falciparum*) ist das Target Falcipain-2 und für den Erreger der Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei rhodensiense*) ist es Rhodesain.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei aussichtsreiche Ansätze untersucht, um eine Inhibitoroptimierung durchzuführen, die klassische und die kombinatorische Methode. Der klassische Ansatz basiert auf einer Struktur, deren Aktivität per Zufall entdeckt wurde. In Screenings von synthetisierten Strukturanaloga, gestützt durch virtuelle Docking-Experimente am aktiven Zentrum der Cysteinproteasen, sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erarbeitet werden. Die kombinatorische Methode stellt eine komplett unterschiedliche Herangehensweise dar. Zunächst sollte ein peptidischer Inhibitor entworfen werden, der durch Festphasensynthese an einem geeigneten Harz synthetisiert werden sollte. Durch den kombinatorischen Einsatz von Aminosäuren kann auf diese Weise unter enormer Zeitersparnis eine große Anzahl an Inhibitoren synthetisiert werden. In einem Screening dieser harzgebundenen Inhibitoren sollen anschließend die potentesten Inhibitoren identifiziert werden. Die Aktivität der gefundenen Inhibitoren aus beiden Ansätzen an den protozoischen Erregern sollte dann durch *in-vitro*-Experimente an Plasmodien und Trypanosomen weiter untersucht werden.

### *Der klassische Ansatz zur Inhibitoroptimierung*

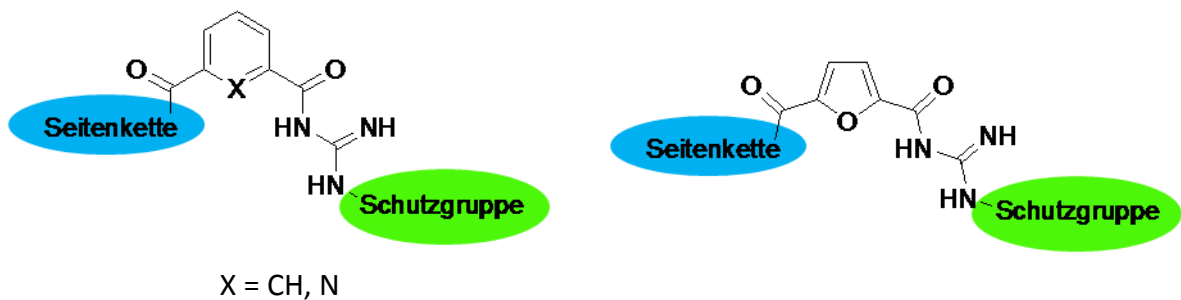
Die Grundlage für den klassischen Ansatz bildete die Verbindung **1**, bei der entdeckt wurde, dass sie Falcipain-2 zu 98 % bei einer Konzentration von 100 µM inhibieren kann. Daraufhin wurde in Kooperationsarbeiten durch Docking-Experimente an einem Modell der erzeugten Bindungstasche von Falcipain-2 ein virtuelles Screening von ähnlichen Verbindungen durchgeführt. Hierbei entstand die Verbindung **3** als Strukturvorschlag für einen guten Inhibitor der Cysteinprotease. In weiteren Arbeiten wurde ein Screening von synthetisierten

Pyrrolverbindungen an Falcipain-2 und Rhodesain durchgeführt, um weitere Erkenntnisse dieser Verbindungsklasse zu erlangen.[7]



**Abb. 5.1** Ausgangsverbindungen des klassischen Ansatzes: Zufallshit **1** und Strukturvorschlag **3** aus Dockings

Bekannt über diese Verbindungsklasse war bisher, dass vor allem unpolare und nicht geladene Substanzen die besten Hemmeigenschaften besaßen. Außerdem schien der geschützte Guanidinrest entscheidend für die Inhibierung zu sein. Es wurden auch einige Verbindungen mit einem Furanring als zentralen Aromaten getestet, die in den ersten Messungen sehr aussichtsreich schienen. Einige der im Vorfeld untersuchten Substanzen stellten sich als sehr gute Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain mit  $IC_{50}$ -Werten nahe dem nanomolaren Bereich heraus. Auch gegen die Krankheitserreger waren diese Verbindungen *in vitro* im gleichen Konzentrationsbereich wirksam.

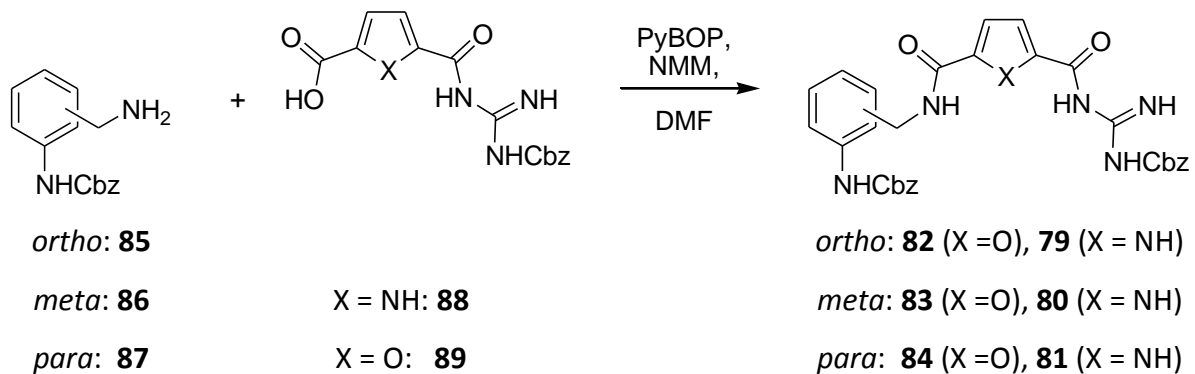


**Abb. 5.2** Potentielle Inhibitoren auf Pyridin-, Benzol- und Furan-Basis

Ergänzend zu diesem Screening sollte nun der Einfluss des zentralen Aromats erforscht werden. Daher wurden weitere Verbindungen mit diesen Merkmalen auf Pyridin-, Benzol- und Furan-Basis synthetisiert. Es konnten allgemeine Syntheserouten entwickelt werden, um diese neuen Substanzklassen synthetisch zugänglich zu machen. Anschließend wurden diese Verbindungen auf Hemmeigenschaften an Falcipain-2 und Rhodesain untersucht. Zusammenfassend wurden diese Ergebnisse aus allen durchgeführten Screenings erhalten:

1. Unpolare und ungeladene Strukturelemente haben bessere Hemmeigenschaften als Polare und Geladene.
2. Der geschützte Guanidinrest ist essentiell für eine effektive Inhibierung der Cysteinproteasen.
3. Als zentraler Aromat eignet sich Furan und Pyrrol signifikant besser als Benzol und Pyridin.

Mit diesen Informationen wurden weitere Prototypen auf Furan- und Pyrrol-Basis synthetisiert und vollständig auf Inhibierung von Falcipain-2 und Rhodesain untersucht. Ebenso wurden mikrobiologische Tests an den Krankheitserregern und Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die Cbz-geschützten Inhibitoren **79** bis **84** konnten ausgehend von den Carbonsäuren **88** und **89** synthetisiert werden. Die Furancarbonsäure **89** konnte erfolgreich in einer sechsstufigen Synthese hergestellt werden, für **88** war die Synthese bereits etabliert. Die verschieden substituierten Benzoltemplete **85** bis **87** konnten jeweils über drei Stufen dargestellt werden. Durch Kupplungen der Amine **85** bis **87** mit den Carbonsäuren **88** und **89** wurden die sechs Inhibitoren **79** bis **84** erhalten.



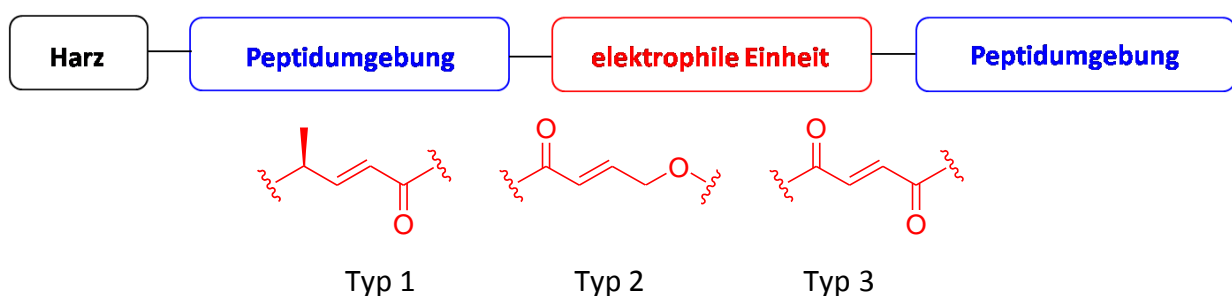
**Abb. 5.3** Syntheschema der Inhibitoren **79** bis **84** auf Pyrrol- und Furan-Basis

Die Substanzen zeigten sehr gute Hemmeigenschaften an beiden Cysteinproteasen mit IC<sub>50</sub>-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Außerdem besaßen sie eine hohe *in-vitro*-Aktivität gegenüber den Erregern im gleichen Konzentrationsbereich. Beispielsweise wurden für **80** IC<sub>50</sub>-Werte von 5.15 µM bei Rhodesain und 4.80 µM bei Falcipain-2 bestimmt. Die *in-vitro*-Aktivität von **80** an Trypanosomen lag bei 2.49 µM und an Plasmodien bei 3.38 µM. Die Ergebnisse an den isolierten Enzymen passen somit sehr gut zu den mikrobiologischen Tests. Die Inhibitoren **79**, **80**, **82** und **83** zeigten keine Zytotoxizität an Makrophagen, die beiden *para*-substituierten Inhibitoren eine geringe Giftigkeit. Der reversible

Inhibierungsmechanismus konnte in einem Dialyseexperiment mit Cathepsin B bestätigt werden. In Docking-Rechnungen der Substanzen an Modellen der aktiven Zentren beider Proteasen konnten die Inhibitoreigenschaften erklärt werden. Die reversibel bindenden Substanzen füllen den Raum der Bindungstasche sehr gut aus. Insgesamt konnten Substanzen mit exzellenter Aktivität gegenüber Protozoen mit dem klassischen Ansatz zur Inhibitorsuche gefunden werden.

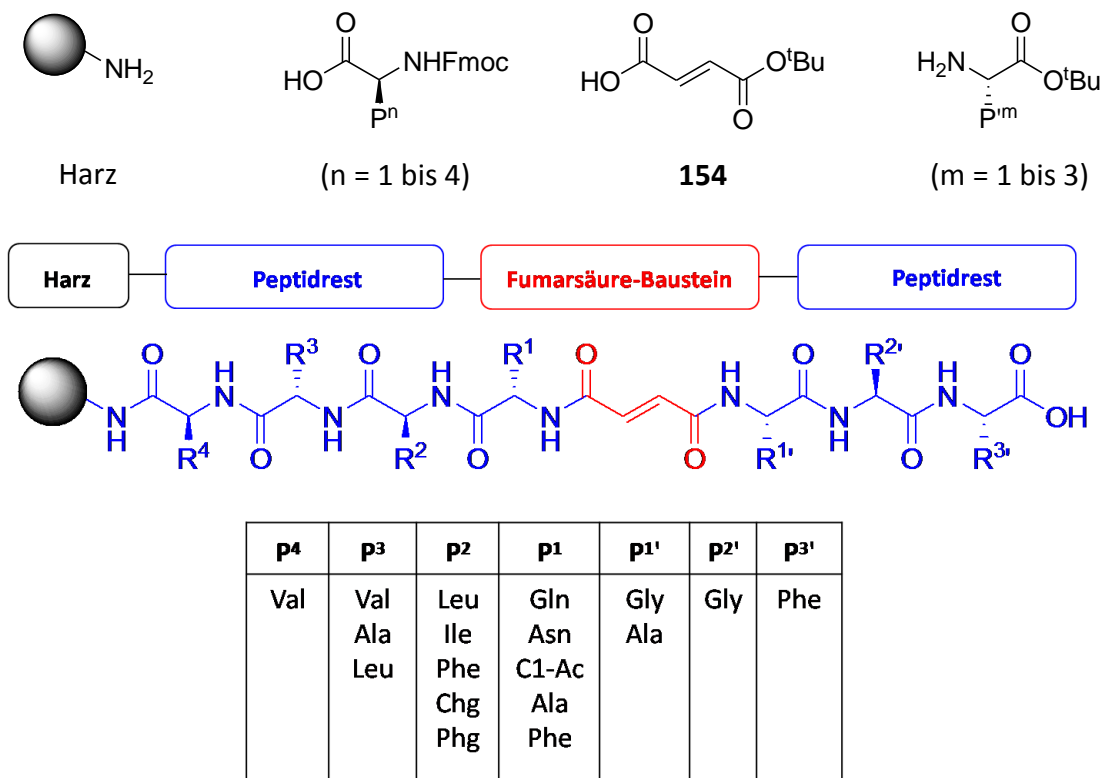
#### *Der kombinatorische Ansatz zur Inhibitoroptimierung*

Zunächst wurde für den kombinatorischen Ansatz zur Inhibitoroptimierung eine Screeningmethode für Falcipain-2 und Rhodesain direkt an einem geeigneten Harz zur Festphasensynthese entwickelt. Dazu wurden Etacrynsäurederivate am polymeren Träger gebunden und für Testmessungen zur Bestimmung der optimalen Screeningbedingungen verwendet. Die Etacrynsäurederivate sind bekannte Inhibitoren von Falcipain-2 und Rhodesain. Neu bei dieser Screeningmethode war es, dass erstmals ein quantitatives Screening aller Bibliotheksmitglieder möglich sein sollte, und nicht nur die besten Inhibitoren entdeckt werden. Ebenfalls neu ist, dass die Screeningmethode auf „one bead – one compound“-Inhibitorbibliotheken anwendbar ist im Gegensatz zu bisher publizierten Assays zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren. Für die bekannten Assays wurden „one bead – two compounds“-Bibliotheken mit einem geeigneten eingebauten FRET-Substrat benötigt. Im nächsten Schritt wurden drei unterschiedliche peptidische Inhibortypen auf die Tauglichkeit für den kombinatorischen Ansatz überprüft. Diese Verbindungstypen besaßen ein elektrophiles Zentrum, das von dem Cysteinrest der Protease nukleophil angegriffen werden sollte. Es handelte sich also um irreversible Inhibitoren. In der Umgebung befinden sich Aminosäuren, die variiert werden sollten.



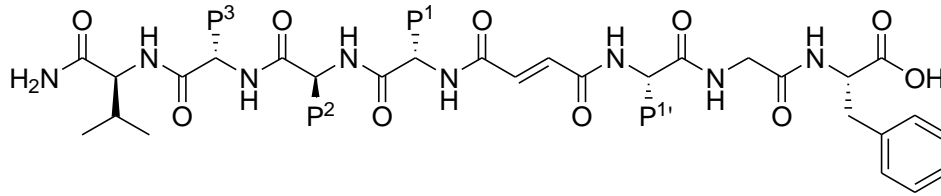
**Abb. 5.4** Allgemeines Schema der drei untersuchten Inhibortypen

Einer der drei untersuchten Inhibitoren erfüllte die Anforderungen des kombinatorischen Ansatzes (Typ 3). Die Synthese der Verbindungsklasse konnte an PEGA- und an MBHA-Harz durchgeführt werden. Das PEGA-Harz wurde zur Synthese der kombinatorischen Inhibitorbibliothek und das anschließende Festphasenscreening benötigt, und das MBHA-Harz, um einzelne Inhibitoren vom polymeren Träger abzuspalten und in Lösung zu untersuchen. Die ersten vier Aminosäuren wurden nach der etablierten C- zu N-Strategie über Fmoc-geschützte Aminosäuren eingeführt, anschließend konnte der Fumarsäurebaustein **154** eingeführt werden. Die Anbringung der letzten drei Aminosäuren erfolgte über die N- zu C-Methode mit *tert*-Butylester-geschützten Aminosäuren.



**Abb. 5.5** Bausteine zur Festphasensynthese des Inhibitortyps 1 und Design der Inhibitorbibliothek

Auf diese Weise konnte eine Inhibitorbibliothek mit 150 Mitgliedern synthetisiert und anschließend mit Falcipain-2 und Rhodesain in Enzym-Assays untersucht werden. Eine statistische Auswertung des erhaltenen Datensatzes ließ auf die Bevorzugung von Leucin an p<sup>3</sup> und p<sup>2</sup>, Asparagin und Phenylalanin an p<sup>1</sup> schließen. Aus diesen Ergebnissen des Festphasenscreenings wurden 14 besonders interessante Inhibitoren der Bibliothek ausgewählt und an MBHA-Harz synthetisiert. Diese Verbindungen wurden schließlich in Lösung auf Aktivität an den isolierten Enzymen und in mikrobiologischen Assays untersucht. So konnten unter anderem die in **Tab. 5.1** dargestellten Inhibitoren gefunden werden.



Nr.	P <sup>3</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P <sup>1'</sup>	Festphasen-	Screening	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
					screening	(100 μM)	FP-2/Rd	P.f./T.b.b.
					FP-2/Rd	FP-2/Rd	FP-2/Rd	FP-2/Rd
					(in %)	(in %)	(in μM)	(in μM)
178	Val	Chg	Asn	Gly	61 / 46	90 / 96	15 / 4.0	32 / > 100
179	Val	Chg	Gln	Gly	51 / 53	83 / 99	4.4 / 4.1	27 / > 100
181	Leu	Leu	Asn	Gly	70 / 71	92 / 63	29 / 131	74 / n.d.
185	Leu	Leu	Phe	Gly	69 / 69	100 / 68	2.2 / 9.0	> 100 / n.d.

Tab. 5.1 Ausgewählte peptidische Inhibitoren mit den Screeningergebnissen

Der Inhibitor **185** beispielsweise hemmt Falcipain-2 mit guten IC<sub>50</sub>-Werten von 2.2 μM und Rhodesain mit 9.0 μM. Die Substanz zeigte jedoch *in vitro* keine Aktivität gegenüber den Trypanosomen. In den mikrobiologischen Tests an den Erregern fielen alle Ergebnisse schlechter als an den isolierten Enzymen aus. Die schlechte Löslichkeit, die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus durch den Erreger der peptidischen Inhibitoren schienen von großer Bedeutung zu sein. Die Verbindungen **178** und **179** lieferten trotzdem gute Werte von 32 μM bzw. 27 μM an *Plasmodium falciparum*. Des Weiteren konnte der irreversible Inhibierungsmechanismus durch ein Dialyseexperiment an Cathepsin B bestätigt werden. Es handelt sich also um kovalent bindende Inhibitoren. Insgesamt konnte eine neue Screeningmethode erfolgreich entwickelt und umgesetzt werden, die künftig für andere interessante Fragestellungen zur Verfügung steht.

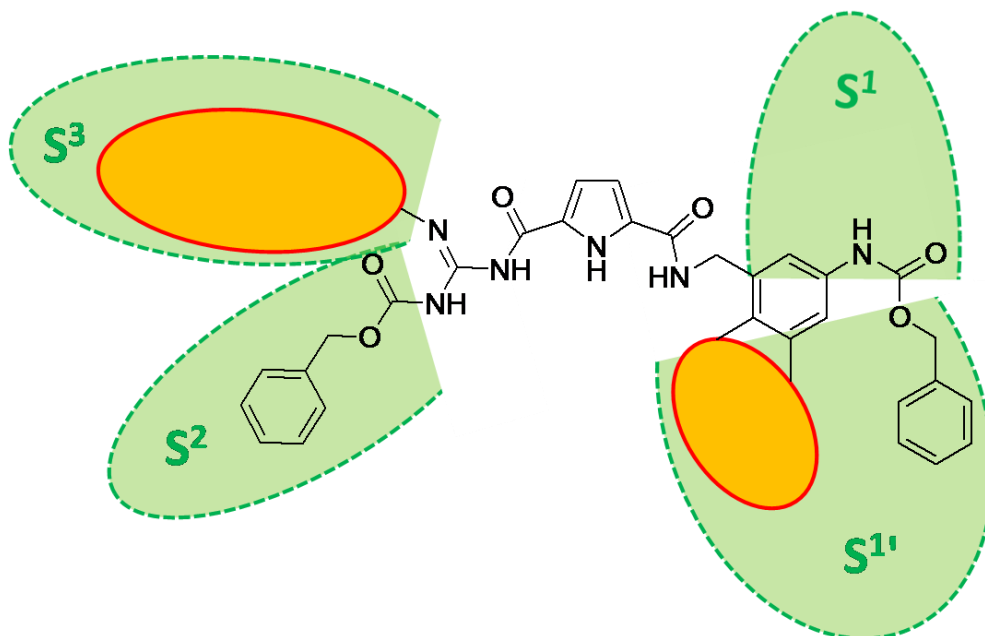
Beide unterschiedliche Methoden zur Inhibitoroptimierung führten zu potenten Cysteinproteaseinhibitoren. Aus dem klassischen Ansatz konnten hochaktive Substanzen mit geringer Zytotoxizität entwickelt werden, deren Einsatz als Wirkstoffe gegen Malaria oder der Schlafkrankheit denkbar ist. Der bearbeitete kombinatorische Ansatz lieferte eine neuartige Screeningmethode, die auch auf andere Targets anwendbar ist.



## 6 Ausblick

Mit den Verbindungen auf Pyrrol- und Furan-Basis aus dem klassischen Ansatz wurde eine neue Leitstruktur für antiplasmodiale bzw. antitrypanosomale Wirkstoffe gefunden. Durch weitere Experimente muss der reversible Inhibierungsmechanismus bestätigt werden. Dazu könnten beispielsweise Messungen zur Zeitabhängigkeit der Hemmung durchgeführt werden. Die Verbindungsklasse zeigte bisher gute Hemmwerte an den isolierten Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain und an den Erregern von Malaria und der Schlafkrankheit. Bisher ist sie nicht auf Selektivität gegenüber Proteasen anderer Klassen getestet worden. So könnten in weiteren Enzym-Assays mit Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen die Hemmeigenschaften der Verbindungen bestimmt werden. Im Idealfall ergäbe sich eine Selektivität für wenige bestimmte Cysteinproteasen.

Die  $IC_{50}$ -Werte lagen für Falcipain-2 und Rhodesain im niedrigen mikromolaren Bereich. Durch weitere Optimierungen könnten die Aktivität gesteigert und die Selektivität erhöht werden. Ansätze bieten hier die Erweiterung des Benzoltemplats aus der Leitstruktur und die Einführung zusätzlicher unpolarer Gruppen am Guanidinrest zur Besetzung der  $S^3$ -Bindetasche (siehe **Abb. 6.1**).

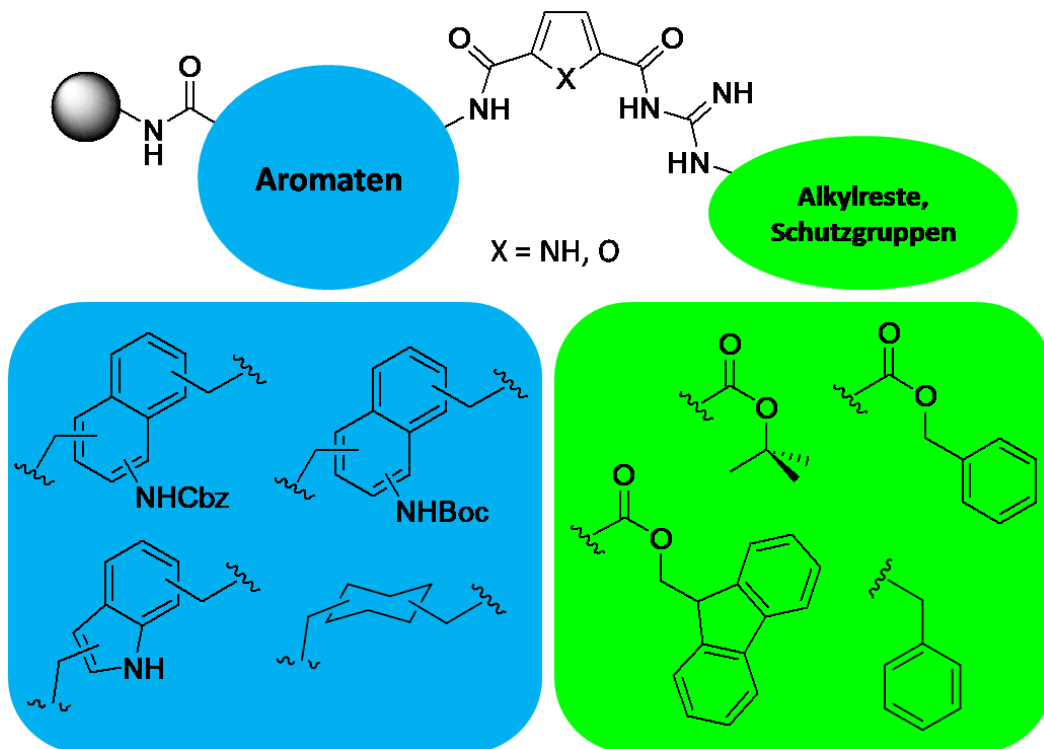


**Abb. 6.1** Inhibitor im aktiven Zentrum von Falcipain-2 (grün: Bindetaschen des Enzyms) mit möglichen Strukturvariationen (orange: bisher unbesetzter Raum für unpolare organische Reste)

Aus den Docking-Experimenten am aktiven Zentrum von Falcipain-2 geht hervor, dass die orange markierten Räume in  $S^3$  und  $S^{1'}$  von den bisherigen Inhibitoren nicht besetzt sind. Bei Rhodesain hingegen ist zumindest die  $S^{1'}$ -Bindetasche besser ausgefüllt. Über diesen Unterschied beider Enzyme könnte durch den Austausch des Benzolrings durch einen größeren Aromaten, beispielsweise Naphthalin- oder Indolderivate, eine bessere Selektivität gegenüber Falcipain-2 erreicht werden. Um aktivere Inhibitoren beider Proteasen zu erhalten, könnte zur Ausfüllung von  $S^3$  ein Rest am Guanidin eingeführt werden. Es ist prinzipiell möglich nukleophile Amine über ein trifluorsulfuryliertes Intermediat einzuführen.<sup>[165]</sup> So könnten z.B. Alkyl- oder Phenylreste an dieser Position eingeführt werden. Auch der kombinatorische Ansatz könnte zu weiteren Optimierung der Pyrrol- und Furanverbindungen genutzt werden.

Beim kombinatorischen Ansatz ist zukünftig vor allem die Anwendung der neuen Screeningmethode auf andere Enzyme denkbar. So könnten andere Proteasen aus allen Klassen mit ähnlich aufgebauten Inhibitorbibliotheken getestet werden. Voraussetzung hierfür ist lediglich, dass das Enzym zum Einen stabil genug ist und zum Anderen, dass der Enzym-Assay mit Fluoreszenz-basierenden Substraten durchgeführt wird.

Interessant wäre auch die Untersuchung einer Bibliothek aus Inhibitoren, die durch andere Mechanismen die Protease hemmen. Bisher wurde diese neue Methode nur auf irreversibel hemmende Verbindungen angewendet. Reversible oder allosterische Inhibitoren könnten an der Festphase synthetisiert werden und die Screeningmethode zur Identifizierung der Hits eingesetzt werden. Beispielsweise könnte eine Bibliothek von den aus dem klassischen Ansatz gefundenen reversiblen Inhibitoren getestet werden. In **Abb. 6.2** ist ein denkbare Design solch einer Bibliothek abgebildet.



**Abb. 6.2** Design einer neuen kombinatorischen Bibliothek aus reversiblen Inhibitoren auf Pyrrol- und Furanbasis

Bei diesen Verbindungen können insbesondere zwei Stellen variiert werden: der Rest am Guanidin und das aromatische Templat. Am Guanidin könnten wie bisher Carbamatschutzgruppen wie z.B. eine Boc-, Cbz- oder Fmoc-Schutzgruppe sitzen oder auch andere Alkylreste. Als Templat eignen sich verschieden substituierte Benzolverbindungen, aber auch größere unpolare Gruppen wie Naphthaline oder Cyclohexylderivate. Aufgrund der Zeitersparnis bei der Synthese könnte auf diese Weise eine hohe Anzahl von verschiedenen Templaten parallel untersucht werden, um die Inhibitoren auf Furan- und Pyrrol-Basis schneller optimieren zu können.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen und analytische Methoden

#### Lösungsmittel:

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und nach literaturbekannten Verfahren getrocknet. So wurden folgende Trockenmittel für die entsprechenden Lösungsmittel verwendet, wobei die Mischung zum Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert wurde:

- Dichlormethan, DMF, Triethylamin mit  $\text{CaH}_2$
- Diethylether und THF mit Natriumdraht und Benzophenon als Indikator
- Methanol mit Magnesium.

#### Schutzgas:

Als Schutzgas wurde Argon (99.998 %) der Firma *Linde* verwendet.

#### Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden folgende DC-Alufolien verwendet:

- *Merck* DC-Alufolien des Typs Kieselgel 60 F<sub>254</sub>
- *Macherey-Nagel* AluGRAM RP-18 W/UV<sub>254</sub>.

Die Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen angegeben (v/v), und die Detektion erfolgte entweder über UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) oder bei nicht UV-aktiven Verbindungen durch Anfärben mit einer sauren Ninhydrinlösung in Ethanol für aminhaltige Substanzen oder durch Anfärben in einer Jod-Kammer.

### **Säulenchromatographie:**

Es wurden folgende Kieselgeltypen verwendet:

- *Macherey-Nagel* MN-Kieselgel 60, 0.040 – 0.063 mm / 230 – 240 mesh ASTM
- *Biomedicals GmbH* ICN Silica Kieselgel, 0.032 – 0.063 mm
- octadecyl-funktionalisiertes Kieselgel (RP-18) der Firma *Aldrich*

Die Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen angegeben (v/v). Die Dicke und Länge der verwendeten Säulen richtete sich nach dem jeweiligen Trennproblem. Die Laufgeschwindigkeit wurde durch Druckluft beschleunigt.

### **Analytische „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC)**

Gerät: *Dionex* HPLC-Anlage bestehend aus: P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector und UVD 340U UV Detektor

Säule: *Supelcosil* LC-18 Reversed Phase, 25 cm x 4.6 mm, 5 µm

Als Laufmittel wurden kommerziell erhältliche Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Die Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

### **Präparative „Medium Performance Liquid Chromatography“ (MPLC)**

Gerät: Combi Flash der Firma *Teledyne Isco, Inc.*

Säule: *RediSep* C-18 reversed Phase (43 g)

Als Laufmittel wurden destillierte Lösungsmittel verwendet. Die Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

### **Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

Geräte: Avance AC 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) der Firma *Bruker*  
Avance DMX 600 ( $^1\text{H}$ : 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 150 MHz) der Firma *Bruker*

Die Kernresonanzspektren wurden bei 27 °C aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebung beziehen sich auf die jeweils verwendeten deuterierten Lösungsmittel als internen Standard und sind in parts per million (ppm) angegeben. Die Kopplungskonstanten einiger relevanter Signale sind in Hertz (Hz) aufgeführt. Für die Signal-Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett vom Dublett, m = Multiplett. Alle Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte mittels Literatur<sup>[166,167]</sup> oder gegebenenfalls durch zusätzliche Experimente wie DEPT135.

### **FT-Infrarotspektroskopie (FT-IR)**

Gerät: FT-IR 1600 Spektrometer der Firma *Perkin-Elmer*

Die Substanzen wurden entweder als KBr-Pressling oder auf einem ATR-Aufsatz vermessen. Die Lagen der Banden wurden in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben, und die Intensitäten mit s = sehr intensiv, m = mittelmäßig intensiv, w = wenig intensiv und br = breit abgekürzt.<sup>[168]</sup>

### **pH-Meter**

Gerät: pH-Meter 766 Calimatic der Firma *Knick*

Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte durch kommerziell erhältliche Pufferlösungen (pH = 4.01 und pH = 7.00).

### **Schmelzpunktbestimmung (Smp.)**

Gerät: SMP-20 der Firma *Büchi*

Die Messungen wurden in offenen Schmelzpunktröhrchen durchgeführt, die Ergebnisse sind nicht korrigiert.

### **Massenspektroskopie**

Geräte: MAT 900 S Massenspektrometer der Firma *Finnigan*

Micro-TOF Spektrometer der Firma *Bruker Daltonics*

Die Zuordnungen der Peaks wurden mittels gängiger Literatur vorgenommen. Als Molekülpeak M sind jeweils die neutralen Verbindungen ohne Gegenion angegeben.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Gerät: Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian GmbH* mit Mikrotiterplatten-Leseinheit

Für die fluorimetrischen Enzym-Assays wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc GmbH* verwendet.

### **Schüttelapparatur**

Gerät: KS 130 basic Laborschüttler der Firma *IKA*

### **Lyophilisation**

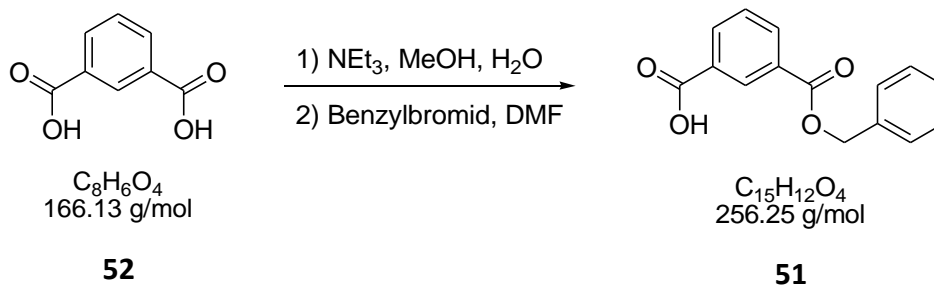
Geräte: Alpha 1-4 der Firma *Christ*

Alpha 1-4 LD plus der Firma *Christ*

## 7.2 Synthesen in Lösung

### 7.2.1 Synthese der Benzol- und Pyridinverbindungen

Isophthalsäuremonobenzylester (**51**)<sup>[92,93]</sup>



Es wurde Isophthalsäure **52** (4.00 g, 24.1 mmol, 1 eq) in einer Mischung aus Methanol (50 ml) und Wasser (5 ml) suspendiert und eine Lösung von Triethylamin (3.40 ml, 24.2 mmol, 1 eq) in Methanol (25 ml) zugegeben. Die klare Lösung wurde 1 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der ölige Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Öl wurde in DMF (60 ml) gelöst und Benzylbromid (4.53 g, 26.5 mmol, 1.1 eq) dazugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 2 h bei 100 °C unter Rückfluss erhitzt. Die erkaltete Mischung wurde in 5 %ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (120 ml) gegossen, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Diese Suspension wurde mit Essigester (3 x 70 ml) extrahiert, um entstandenen Dibenzylester zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 bis 4 angesäuert. Die saure Lösung wurde nun mit Essigester (3 x 70 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert, und der erhaltene weiße Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Diethylether/Hexan = 1/1). Man erhielt **51** als weißen Feststoff (1.67 g, 6.52 mmol, 27 %).

**R<sub>f</sub>** 0.40 (SiO<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/Hexan = 1/1);

**Smp.** 108 °C;

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 5.38 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.34-7.50 (m, 5H, 5 x Phenyl-CH), 7.67 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Benzol-CH an C5), 8.19-8.23 (m, 2H,

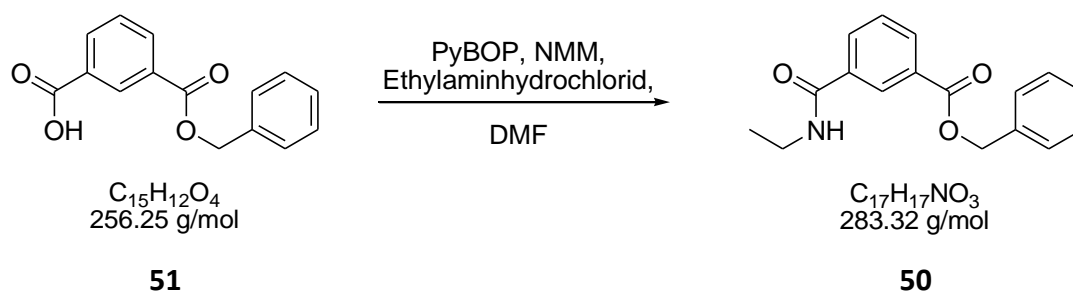


Benzol-CH an C4 und C6), 8.50 (t,  $^4J_{\text{HH}} = 1.8$  Hz, 1H, Benzol-CH an C2), 13.32 (bs, 1H, COOH) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 66.6$  ( $\text{CH}_2$ ), 128.1, 128.2, 128.6, 129.5, 129.8 (Ar-CH), 130.0, 131.4 (Benzyl- $\text{C}_q$ ), 133.3, 133.9 (Ar-CH), 135.9 (Phenyl- $\text{C}_q$ ), 164.9, 166.4 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu} = 3028\text{-}2551$  (m), 1719 (s), 1705 (s), 1690 (s), 1609 (m), 1585 (m), 1496 (w), 1448 (m), 1425 (m), 1375 (w), 1269 (s), 1174 ((m), 1146 (m), 1007 (m), 934 (m), 728 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ;

### 3-Ethylcarbamoylbenzol-1-carbonsäurebenzylester (**50**)



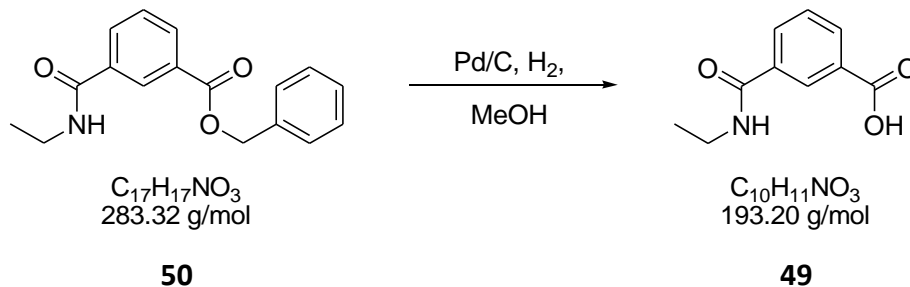
Es wurden der Benzylester **51** (1.20 g, 4.68 mmol, 1 eq) und PyBOP (2.44 g, 4.68 mmol, 1 eq) in einer Mischung aus DMF (5 ml) und NMM (1.00 ml, 9.36 mmol, 2 eq) gelöst. Die Lösung wurde 10 min bei RT gerührt und anschließend eine Lösung von Ethylaminhydrochlorid (382 mg, 4.68 mmol, 1 eq) in DMF (5 ml) und NMM (0.55 ml, 4.68 mmol, 1 eq) zugegeben. Die gelbe Lösung wurde 1 d bei RT gerührt. Anschließend wurde Wasser (40 ml) zugegeben und die Lösung mit Diethylether (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 20 ml) gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der erhaltene weiße Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{SiO}_2$ , Diethylether/Hexan = 1/1) und man erhielt **50** als weißen Feststoff (1.16 g, 4.08 mmol, 87 %).

**R<sub>f</sub>** 0.14 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ /Hexan = 1/1);

**Smp.** 92 °C;

<b><math>^1\text{H-NMR}</math></b>	(400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ = 1.13 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.2 Hz, 3H, Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 3.30 (s, 2H, Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 5.39 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 7.34-7.50 (m, 5H, 5 x Phenyl- $\text{CH}$ ), 7.62 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.8 Hz, 1H, Benzol- $\text{CH}$ an C5), 8.10-8.13 (m, 2H, Benzol- $\text{CH}$ an C4 und C6), 8.45 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 1.7 Hz, 1H, Benzol- $\text{CH}$ an C2), 8.69 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.2 Hz, 1H, Amid- $\text{NH}$ ) ppm;
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math></b>	(100 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ = 14.7 (Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 34.2 (Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 66.4 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 127.9, 128.0, 128.2, 128.5, 128.9 (Ar- $\text{CH}$ ), 129.7 (Ar- $\text{C}_q$ ), 131.6, 131.9 (Ar- $\text{CH}$ ), 135.2, 136.0 (Ar- $\text{C}_q$ ), 165.0, 165.2 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3366 (s), 2971 (m), 1715 (s), 1637 (s), 1545 (s), 1258 (s), 1150 (s) $\text{cm}^{-1}$ ;
<b>MS</b>	(EI) $m/z$ = 283.2 ( $\text{M}^+$ ).

### 3-Ethylcarboxamidbenzol-1-carbonsäure (**49**)



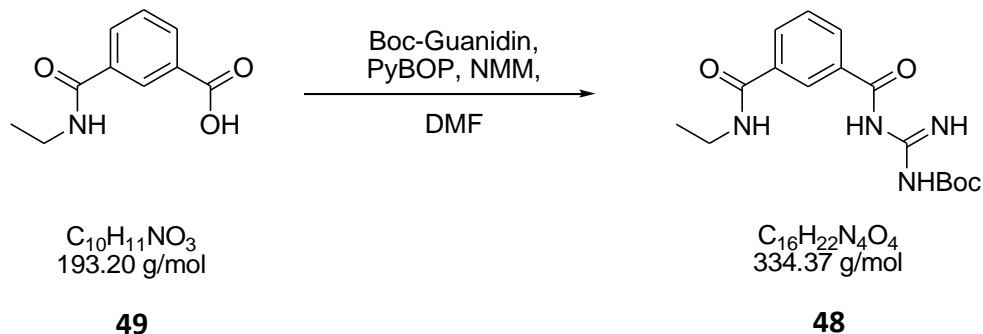
Es wurden der Benzylester **50** (1.00 g, 3.53 mmol, 1 eq) und Palladium/Kohle (100 mg) vorgelegt und unter Argon in Methanol (30 ml) suspendiert. In die Reaktionsmischung wurde bei RT für 30 min Wasserstoff eingeleitet. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und mit reichlich Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt **49** als weißen Feststoff (680 mg, 3.53 mmol, 100 %).

**R<sub>f</sub>** 0.00 (SiO<sub>2</sub>, Diethylether/Hexan = 1/1);

**Smp.** 227 °C;

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.13 (t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H, Ethyl-CH <sub>3</sub> ), 3.30 (m, 2H, Ethyl-CH <sub>2</sub> ), 7.58 (t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Benzol-CH an C5), 8.05-8.07 (dd, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 2H, Benzol-CH an C4 und C6), 8.42 (t, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, Benzol-CH an C2), 8.65 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.3 Hz, 1H, Amid-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 14.7 (CH <sub>3</sub> ), 34.1 (CH <sub>2</sub> ), 128.0, 128.6 (Benzol-CH), 131.1 (Benzol-C <sub>q</sub> ), 131.3, 131.6 (Benzol-CH), 135.0 (Benzol-C <sub>q</sub> ), 165.1, 167.0 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3307 (s), 3075-2551 (w), 1686 (s), 1635 (s), 1542 (s), 1448 (w), 1322 (m), 938 (w) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(EI) <i>m/z</i> = 193.1 (M <sup>+</sup> ).

1-N-Boc-Guanidinocarbonyl-3-ethylcarboxamidbenzol (**48**)



Die Carbonsäure **49** (500 mg, 2.59 mmol, 1 eq) und PyBOP (1.35 g, 2.59 mmol, 1 eq) wurden in einer Mischung aus DMF (5 ml) und NMM (500 µl, 5.18 mmol, 2 eq) gelöst. Die Lösung wurde 10 min bei RT gerührt und anschließend eine Lösung von Boc-Guanidin **46** (412 mg, 2.59 mmol, 1 eq) in DMF (5 ml) und NMM (355 µl, 2.59 mmol, 1 eq) zugegeben. Die gelbe Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend wurde Wasser (40 ml) dazugegeben und mit Diethylether (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 25 ml) gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff wurde säulenchromatographisch

gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Diethylether/Hexan/Triethylamin = 6/2/1), und man erhielt **48** als weißen Feststoff (633 mg, 1.89 mmol, 73 %).

**R<sub>f</sub>** 0.18 (SiO<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/Hexan = 3/1);

**Smp.** 70 °C (Zersetzung);

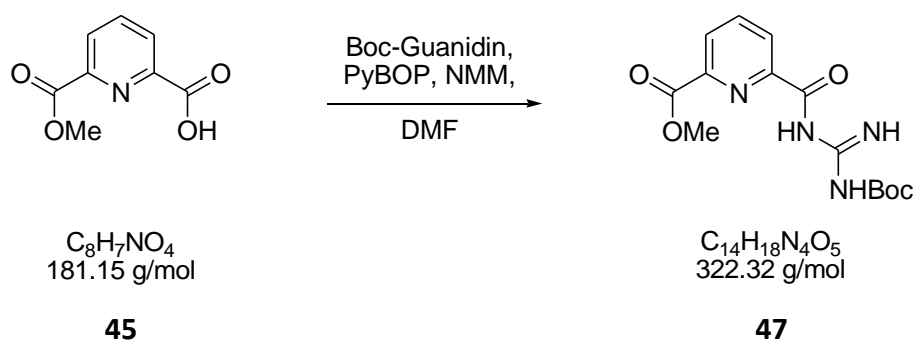
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H, Ethyl-CH<sub>3</sub>), 1.49 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.29 (m, 2H, Ethyl-CH<sub>2</sub>), 7.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, Benzol-CH an C5), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, 1H, Benzol-CH an C4/C6), 8.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Benzol-CH an C4/C6), 8.51-8.53 (m, 2H, Benzol-CH an C2 und Amid-NH), 8.61 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.63 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 11.00 (br.s, 1H, Guanidin-NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 14.7 (Ethyl-CH<sub>3</sub>), 27.7 (Boc-CH<sub>3</sub>), 34.1 (Ethyl-CH<sub>2</sub>), 81.8 (Boc-C<sub>q</sub>), 127.7, 127.9, 130.0, 131.1 (Benzol-CH), 134.8, 137.4 (Benzol-C<sub>q</sub>), 154.2, 158.9, 165.8, 176.2 (C<sub>q</sub>) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3379 (m), 2965 (w), 2925 (w), 1730 (m), 1638 (s), 1541 (s), 1324 (m), 1243 (s), 1151 (s) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z$  = 357.1539 (M + Na<sup>+</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 357.154 (M + Na<sup>+</sup>).

#### 6-N-Boc-Guanidinocarbonylpyridin-2-carbonsäuremethylester (**47**)

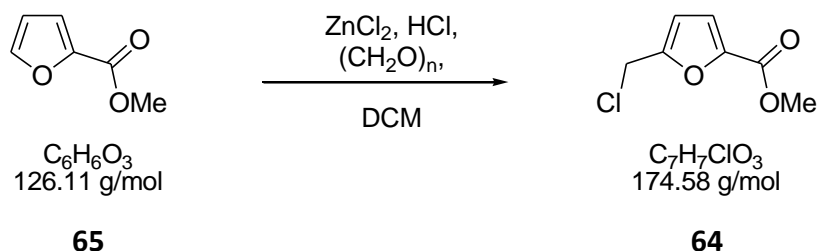


Der Pyridin-2,6-dicarbonsäuremonomethylester **45** (500 mg, 2.76 mmol, 1 eq) und PyBOP (1.44 g, 2.76 mmol, 1 eq) wurden in 5%igen NMM in DMF (10 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von Boc-Guanidin **46** (439 mg, 2.76 mmol, 1 eq) in einer 5%igen Lösung

von NMM in DMF (5 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch 1 d bei RT gerührt. Anschließend wurde Wasser (30 ml) zugegeben, wobei sich das Gemisch erwärmte und ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt **47** als weißen Feststoff (680 mg, 2.11 mmol, 76 %).

<b>R<sub>f</sub></b>	0.61 (SiO <sub>2</sub> , EtOAc/Hexan/MeOH = 4/4/1 mit 0.1 % NEt <sub>3</sub> );
<b>Smp.</b>	165 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.44 (s, 9H, Boc-CH <sub>3</sub> ), 3.93 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 8.21-8.37 (m, 3H, 3 x Pyridin-CH), 8.65 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 8.91 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.06 (br.s, 1H, Guanidin-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 27.8 (Boc-CH <sub>3</sub> ), 52.6 (OCH <sub>3</sub> ), 79.1 (Boc-C <sub>q</sub> ), 126.4, 127.9, 139.6 (Pyridin-CH), 146.8, 149.8 (Pyridin-C <sub>q</sub> ), 157.5, 159.8, 164.5, 167.7 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3390 (m), 3131 (m), 2973 (m), 1732 (s), 1703 (s), 1658 (s) 1568 (s), 1418 (s), 1324 (s), 1142 (s), 748 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 345.1175 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 345.117 (M + Na <sup>+</sup> ).

## 7.2.2 Synthese der Furanverbindungen

5-Chloromethylfuran-2-carbonsäuremethylester (**64**)<sup>[94,95]</sup>

Der Methylester **65** (50 ml, 468 mmol, 1 eq) wurde mit Dichlormethan (240 ml), Zinkchlorid (17.5 g, 128 mmol) und Paraformaldehyd (20.1 g, 668 mmol) auf 35 °C erwärmt. Anschließend wurde unter Rühren über 3 h HCl-Gas, das mit konz. Schwefelsäure getrocknet worden war, in die braune Suspension eingeleitet. Die Mischung wurde nach Abkühlen auf kaltes Wasser (500 ml) gegossen und die beiden Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde zunächst mit Dichlormethan (2 x 150 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 x 50 ml) gewaschen und schließlich mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde das erhaltene schwarze Öl im Vakuum destilliert (68-70 °C, 0.12 mbar). Man erhielt **64** als ein farbloses Öl, das nach einigen Tagen als farbloser Feststoff kristallisierte (53.9 g, 309 mmol, 66 %).

**R<sub>f</sub>** 0.68 (SiO<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/Hexan = 1/1);

**Smp.** 30 °C;

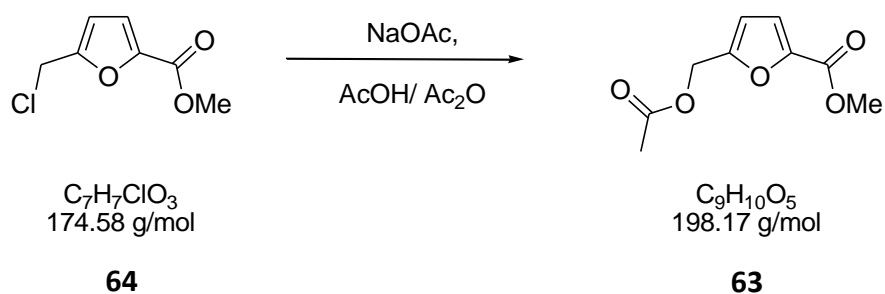
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.48 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, Furan-CH an C4), 7.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, Furan-CH an C3) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 35.7 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (OCH<sub>3</sub>), 110.4, 117.8 (Furan-CH), 143.8, 153.1 (Furan-C<sub>q</sub>), 157.7 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 2960 (w), 1737 (s), 1305 (s), 770 (m) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI) *m/z* = 174.1 (M<sup>+</sup>).

5-Acetoxymethylfuran-2-carbonsäuremethylester (**63**)<sup>[97,98]</sup>



Das Chlormethylfuran **64** (53.8 g, 308 mmol, 1 eq) und wasserfreies Natriumacetat (107 g) wurden in Eisessig (216 ml) und Essigsäureanhydrid (21.6 ml) suspendiert und für 6 h bei einer Ölbadtemperatur von 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Diethylether (350 ml) zur Lösung gegeben und das Gemisch vorsichtig mit einer gesättigten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (5 x 100 ml) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum destilliert (86 °C, 0.28 mbar), wobei man **63** (57.1 g, 290 mmol, 93 %) als farblosen Feststoff erhielt.

**R<sub>f</sub>** 0.44 (SiO<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/Hexan = 1/1);

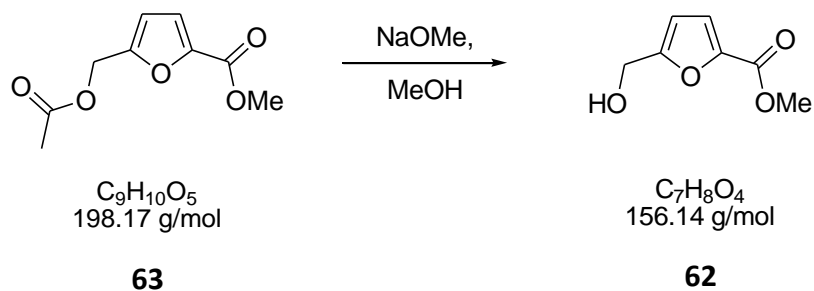
**Smp.** 39 °C;

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 2.09 (s, 3H, Acetyl-CH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 1H, Furan-CH an C-4), 7.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, 1H, Furan-CH an C-3) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 20.0 (Acetyl-CH<sub>3</sub>), 52.0 (OCH<sub>3</sub>), 57.6 (CH<sub>2</sub>), 112.7, 118.7 (Furan-CH), 144.7, 153.5 (Furan-C<sub>q</sub>), 159.5, 170.8 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3144 (w), 2951 (w), 1737 (s), 1526 (w), 1439 (w), 1376 (w), 1309 (m) 1214 (m), 1028 (m) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI) *m/z* = 198.1 (M<sup>+</sup>).

5-Hydroxymethylfuran-2-carbonsäuremethylester (**62**)<sup>[98]</sup>

Natrium (2.84 g, 123 mmol, 0.5 eq) wurde portionsweise in trockenem Methanol (35 ml) gelöst und zu der Lösung von Methylester **63** (46.5 g, 235 mmol, 1 eq) gegeben. Die gelbliche Lösung wurde bei RT 1 d gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zu einem säureaktivierten Kationenaustauscher ( $\alpha = 1.6$  mmol/g, 293 g, 2 eq), der zuvor mit verdünnter Salzsäure, Wasser und Methanol gewaschen worden war, gegeben und 30 min gerührt. Nach Filtration und Reinigung mit reichlich Methanol (ca. 2.5 l) wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum destilliert (109 °C, 0.33 mbar). Man erhielt **62** als farbloses Öl, das nach einigen Tagen als farbloser Feststoff kristallisierte (32.7 g, 209 mmol, 89 %).

**R<sub>f</sub>** 0.22 (SiO<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/Hexan = 1/1);

**Smp.** 20 °C;

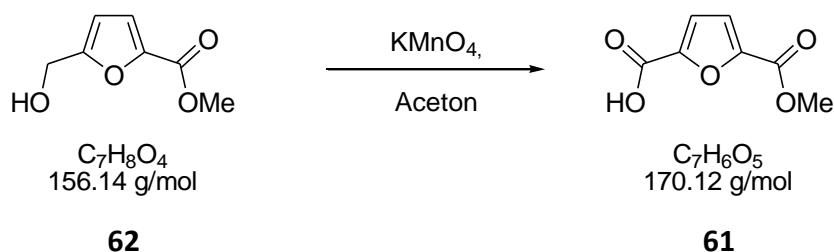
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.47 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9 Hz, 1H, OH), 6.50 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, Furan-CH an C4), 7.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, 1H, Furan-CH an C3) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 51.7 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (CH<sub>2</sub>), 109.2, 119.3 (Furan-CH), 142.8, 158.5 (Furan-C<sub>q</sub>), 160.3 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3402 (br), 2953 (w), 1719 (s), 1524 (m) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI)  $m/z$  = 156.1 (M<sup>+</sup>).



2,5-Furandicarbonsäuremonomethylester (**61**)

Der Furanalkohol **62** (2.00 g, 12.8 mmol, 1 eq) wurde in Aceton (200 ml) gelöst und auf 5 °C gekühlt. Zur Lösung wurde Kaliumpermanganat (4.10 g, 26.1 mmol, 2 eq) portionsweise zugegeben und 45 min bei RT gerührt. Während der Reaktion begann die Suspension zu sieden und die violette Farbe des Kaliumpermanganats verschwand vollständig. Der entstandene Braunstein wurde über Celite abfiltriert und mit Methanol (ca. 20 ml) gewaschen. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde der noch mit MnO<sub>2</sub> verunreinigte Feststoff mit möglichst wenig verdünnter NaOH gelöst und der restliche Braunstein abfiltriert. Daraufhin wurde die Furancarbonsäure **61** mit konzentrierter Salzsäure bis zu pH = 1-3 ausgefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen des Niederschlags im Exsikkator über Phosphorpentoxid erhielt man **61** als leicht gelblichen Feststoff (1.46 g, 7.40 mmol, 66 %).

**R<sub>f</sub>** 0.34 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/DCM = 1/1 mit 1 % AcOH);

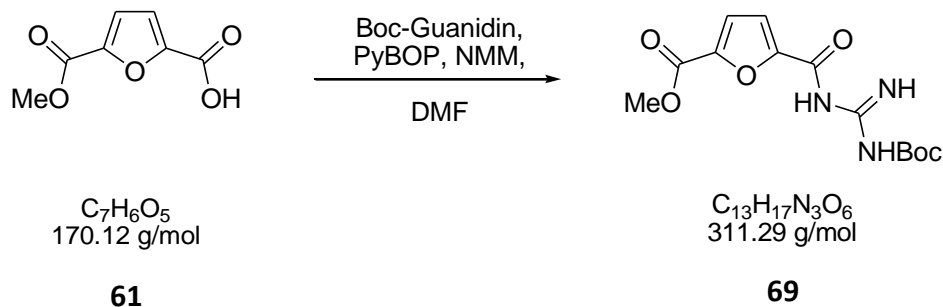
**Smp.** 173 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, Furan-CH), 7.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH), 13.69 (br.s, 1H, COOH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 52.3 (OCH<sub>3</sub>), 118.5, 119.1 (Furan-CH), 147.1, 147.5 (Furan-C<sub>q</sub>), 158.0, 158.9 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3130 (w), 1737 (m), 1688 (s), 1294 (s) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI)  $m/z$  = 170.1 (M<sup>+</sup>).

5-*N*-Boc-Guanidinocarbonylfuran-2-carbonsäuremethylester (**69**)

Die Carbonsäure **61** (200 mg, 1.18 mmol, 1 eq), PyBOP (614 mg, 1.18 mmol, 1 eq.), NMM (358 mg, 0.389 ml, 3.54 mmol, 3 eq) und Boc-Guanidin **46** (188 mg, 1.18 mmol, 1 eq) wurden in DMF (4 ml) gelöst und bei RT 1 d gerührt. Unter Kühlung im Eisbad wurde das Produkt mit Wasser (15 ml) ausgefällt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen und anschließend im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt **69** (261 mg, 0.838 mmol, 71 %) als hellgelben Feststoff.

**R<sub>f</sub>** 0.82 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/Hexan/MeOH/NEt<sub>3</sub> = 4/4/1/1);

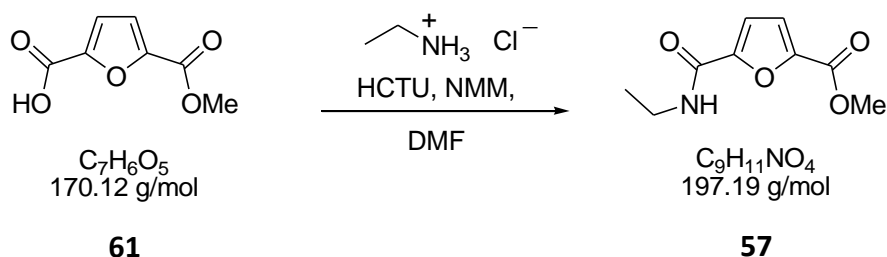
**Smp.** 152 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.45 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH an C4), 7.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH an C3), 8.68 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.58 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 10.99 (br.s, 1H, Guanidin-NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 27.6 (Boc-CH<sub>3</sub>), 52.1 (OCH<sub>3</sub>), 82.3 (Boc-C<sub>q</sub>), 116.3, 119.2 (Furan-CH), 144.6, 163.4 (Furan-C<sub>q</sub>), 154.1, 158.2, 159.1, 167.9 (C<sub>q</sub>) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3358 (m), 1723 (s), 1644 (m), 1244 (s) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI)  $m/z$  = 311.1 (M<sup>+</sup>).

5-Ethylcarboxamidfuran-2-carbonsäuremethylester (**57**)

Die Carbonsäure **61** (300 mg, 1.76 mmol, 1 eq), HCTU (730 mg, 1.76 mmol, 1 eq.), NMM (535 mg, 5.29 mmol, 3 eq) und Ethylaminhydrochlorid (144 mg, 1.76 mmol, 1 eq) wurden in DMF (10 ml) gelöst und bei RT 1 d gerührt. Anschließend wurde Wasser (30 ml) zugegeben und die Lösung mit Essigester (16 x 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (30 ml) gewaschen und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und man erhielt **57** (206 mg, 1.04 mmol, 59 %) als hellgelben Feststoff.

**R<sub>f</sub>** 0.79 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/Hexan/MeOH/ $\text{NEt}_3$  = 8/8/2/1);

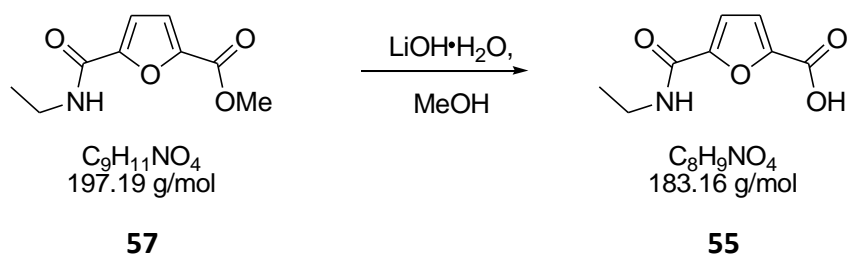
**Smp.** 72 °C;

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 1.10 (t,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7.2 Hz, 3H, Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 3.26 (m, 2H, Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.20 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 3.7 Hz, 1H, Furan- $\text{CH}$ ), 7.37 (d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 3.5 Hz, 1H, Furan- $\text{CH}$ ), 8.61 (br.t,  $^3J_{\text{HH}}$  = 5.5 Hz, 1H,  $\text{NH}$ ) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 14.6 (Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 33.6 (Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 52.1 ( $\text{OCH}_3$ ), 114.2, 119.2 (Furan- $\text{CH}$ ), 144.2, 150.6 (Furan- $\text{C}_q$ ), 156.7, 158.1 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3297 (w), 2966 (w), 1724 (m), 1654 (s), 1310 (s), 1262 (s), 1100 (s), 1021 (s), 801 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (EI)  $m/z$  = 197.1 ( $\text{M}^+$ ).

5-Ethylcarboxamidfuran-2-carbonsäure (**55**)

Zu einer Lösung des Methylesters **57** (237 mg, 1.20 mmol, 1 eq) in Methanol (20 ml) wurde LiOH-Monohydrat (503 mg, 12.0 mmol, 10 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 50 min gerührt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Wasser (20 ml) gelöst. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit konzentrierter Salzsäure (ca. 1-2 ml) auf pH 3 eingestellt, sofort mit Essigester (6 x 10 ml) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxid wurde **55** (212 mg, 1.16 mmol, 96 %) als hellgelber Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.72 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

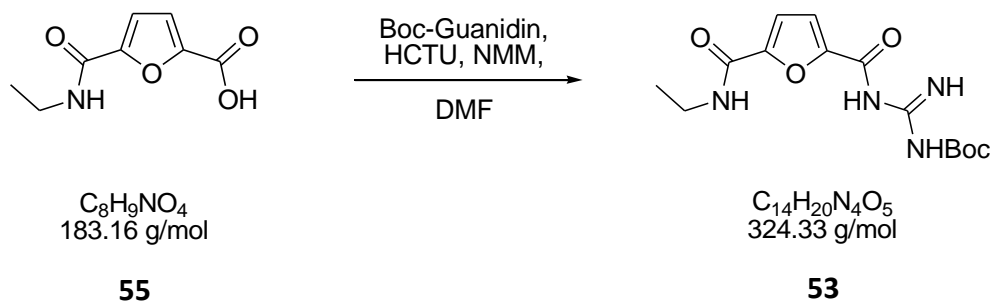
**Smp.** 125 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.10 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, Furan-CH an C3/C4), 7.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH an C3/C4), 8.55 (br.t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, 1H, NH), 13.47 (br.s, 1H, COOH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 14.7 (CH<sub>3</sub>), 33.5 (CH<sub>2</sub>), 114.1, 118.5 (Furan-CH), 145.5, 150.2 (Furan-C<sub>q</sub>), 156.9, 159.0 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3421 (m), 2966 (w), 1717 (s), 1641 (s), 1407 (w), 1269 (m), 1090 (m), 1021 (m), 800 (m) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (EI)  $m/z$  = 183.0 (M<sup>+</sup>).

5-N-Boc-Guanidinocarbonylfuran-2-ethylcarboxamid (**53**)

Zu einer Lösung der Carbonsäure **55** (120 mg, 655  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), HCTU (271 mg, 655  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) und NMM (199 mg, 1.97 mmol, 3 eq) in DMF (4 ml) wurde eine Lösung von Boc-Guanidin **46** (104 mg, 655  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) in DMF (4 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 d bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Wasser (20 ml) und Rühren für 15 min wurde die Mischung mit Essigester (5 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen und mit  $\text{NaSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und man erhielt **53** (120 mg, 370  $\mu\text{mol}$ , 56 %) als leicht braunen Feststoff.

**R<sub>f</sub>** 0.81 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/Hexan/MeOH/ $\text{NEt}_3$  = 8/8/2/1);

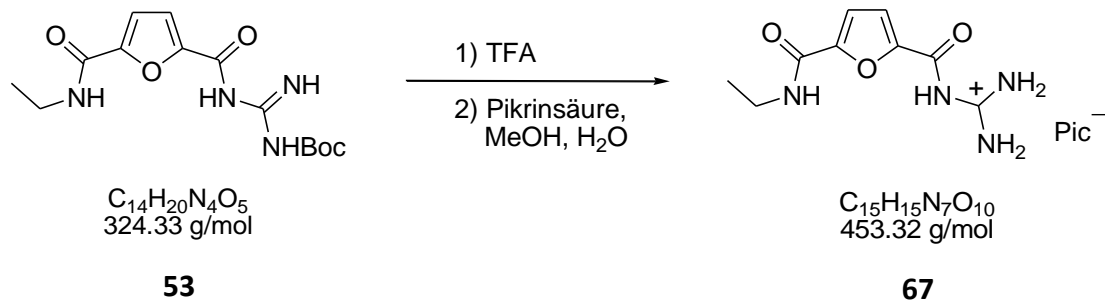
**Smp.** 113 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 1.11 (t,  $^3J_{\text{HH}}$  = 7.2 Hz, 3H, Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 1.47 (s, 9 H, Boc- $\text{CH}_3$ ), 3.26 (m, 2H, Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 7.13-7.14 (m, 2H, 2 x Furan- $\text{CH}$ ), 8.50 (br.s, 1H, NH), 8.66 (br.s, 1H, NH), 9.46 (br.s, 1H, NH), 10.87 (br.s, 1H, NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 14.8 (Ethyl- $\text{CH}_3$ ), 27.7 (Boc- $\text{CH}_3$ ), 33.5 (Ethyl- $\text{CH}_2$ ), 69.3 (Boc- $\text{C}_q$ ), 114.1, 116.7 (Furan- $\text{CH}$ ), 149.3, (2 x Furan- $\text{C}_q$ ), 157.1, 158.8, 162.6 ( $\text{C}_q$ ) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3476 (m), 3347 (m), 3214 (m), 2979 (w), 1733 (m), 1619 (s), 1497 (s), 1239 (s), 1149 (s), 843 (w)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (ESI-pos)  $m/z$  = 347.3 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

2-Ethylcarboxamidfuran-5-carbonylguanidiniopikrat (**67**)

Zur Boc-geschützten Verbindung **53** (50.0 mg, 0.154 mmol, 1 eq) wurde bei 0 °C TFA (5 ml) gegeben. Das Eisbad wurde entfernt, und die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Die TFA wurde im Ölpumpenvakuum bei RT entfernt und der gelbliche Rückstand in Methanol gelöst (2 ml). Anschließend wurde eine gesättigte Pikrinsäurelösung in Wasser (8 ml) dazugegeben und die Mischung für 1 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt **67** als gelben Feststoff (60.0 mg, 0.132 mmol, 86 %). **67** konnte in das entsprechende Chloridsalz überführt werden, indem es in verdünnter NaOH gelöst wurde und anschließend säulenchromatographisch das Natriumpikrat abgetrennt wurde (RP-18, erst Wasser, dann Methanol). Zur wässrigen Lösung wurde etwas verdünnte Salzsäure gegeben und das entsprechende Chloridsalz quantitativ durch Lyophilisieren erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.52 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 244 °C (Zersetzung);

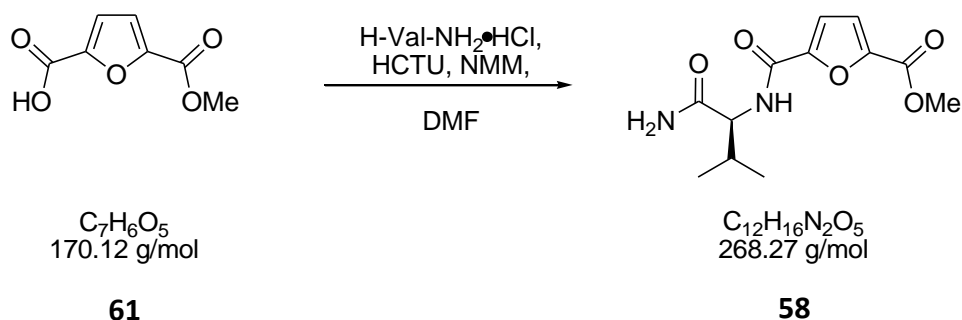
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, Furan-CH), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, Furan-CH), 8.30 (br.s, 4H, 2 x Guanidin-NH<sub>2</sub>), 8.58 (s, 2H, 2 x Pikrat-CH), 8.64 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 1H, NH), 11.18 (br.s, 1H, NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 14.6 (Ethyl-CH<sub>3</sub>), 33.6 (Ethyl-CH<sub>2</sub>), 114.6, 119.7 (Furan-CH), 124.1 (C<sub>q</sub>), 125.1 (2 x Pikrat-CH), 141.8, 145.1, 150.6, 154.6, 156.6, 157.0, 160.8 (C<sub>q</sub>) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3356 (m), 3159 (m), 2952 (w), 1726 (s), 1650 (s), 1568 (s), 1435 (m), 1365 (s), 1324 (s), 1266 (s) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (ESI) berechnet:  $m/z = 225.0987$  ( $MH^+$  - Pikrat),  
 gefunden:  $m/z = 225.098$  ( $M^+$ ).

5-{N-[(S)-1-Carboxamid-2-methylpropyl]carboxamid}furan-2-carbonsäuremethylester (**58**)



Zu einer Lösung der Carbonsäure **61** (300 mg, 1.76 mmol, 1 eq), HCTU (730 mg, 1.76 mmol, 1 eq) und NMM (535 mg, 5.29 mmol, 3 eq) in DMF (10 ml) wurde H-Val-NH<sub>2</sub>-HCl **60** (269 mg, 1.76 mmol, 1 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (30 ml) und Rühren für 15 min wurde die Mischung mit Essigester (10 x 10 ml) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum entfernt, und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (RP-18 Kieselgel, Methanol/Wasser = 1/3) gereinigt. Man erhielt **58** (270 mg, 1.01 mmol, 57 %) als weißen Feststoff.

**R<sub>f</sub>** 0.21 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 3/1);

**Smp.** 135 °C (Zersetzung);

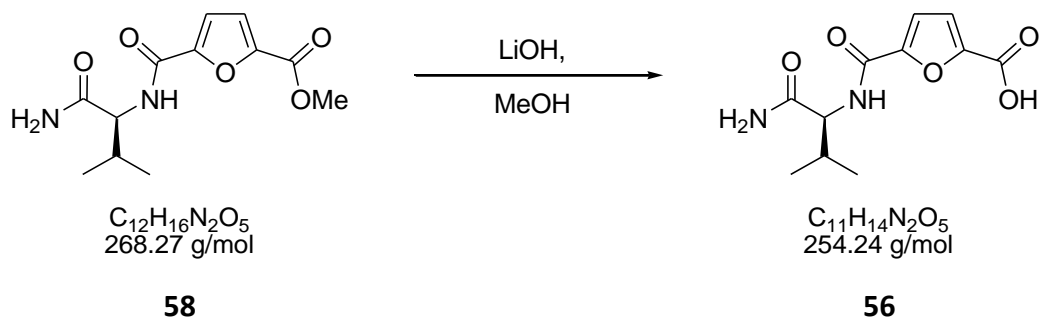
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.90 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, 6H, Val-CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 1H, Val-CH), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, Val-NCH), 7.15 (br.s, 1H, NH), 7.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 2H, Furan-CH), 7.56 (br.s, 1H, NH), 8.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 18.4, 19.3 (Val-CH<sub>3</sub>), 30.3 (Val-CH), 52.2 (OCH<sub>3</sub>), 57.9 (Val-NCH), 114.9, 119.2 (Furan-CH), 144.5, 149.8 (Furan-C<sub>q</sub>), 156.8, 158.1, 172.4 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3365 (m), 3227 (w), 2966 (w), 1724 (m), 1638 (s), 1297 (m)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (ESI-pos)  $m/z$  = 291.3 (M + Na<sup>+</sup>).

5-{N-[(S)-1-Carboxamid-2-methylpropyl]carboxamid}furan-2-carbonsäure (**56**)



Zu einer Lösung des Methylesters **58** (50.0 mg, 186  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) in Methanol (7 ml) wurde LiOH (44.6 mg, 1.86 mmol, 10 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 75 min gerührt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Wasser (5 ml) gelöst. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit 5%iger Salzsäure auf pH 3 eingestellt, mit Essigester (6 x 10 ml) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhielt man **56** (43.0 mg, 169  $\mu\text{mol}$ , 90 %) als weißen Feststoff.

**R<sub>f</sub>** 0.74 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 192 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.90 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 12.1 Hz, 6H, Val-CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 1H, Val-CH), 4.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, Val-NCH), 7.15 (br.s, 1H, NH), 7.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH), 7.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 1H, Furan-CH), 7.56 (br.s, 1H, NH), 8.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, NH), 13.50 (br.s, 1H, COOH) ppm;

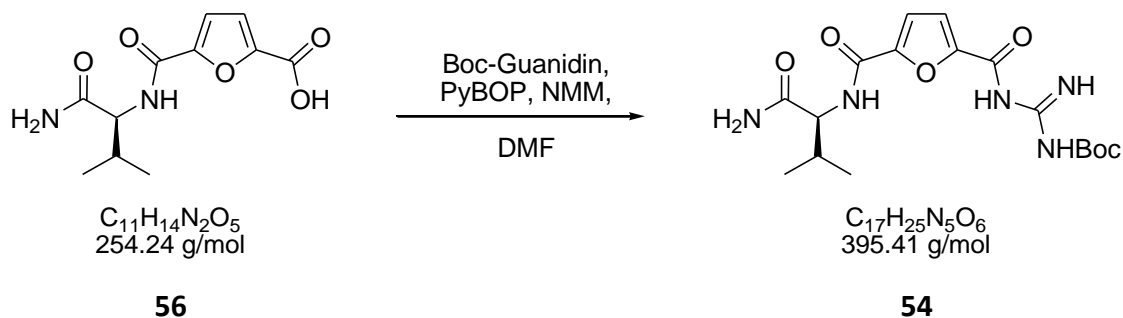
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 18.3, 19.3 (Val-CH<sub>3</sub>), 30.3 (Val-CH), 57.8 (Val-NCH), 114.9, 118.4 (Furan-CH), 149.4 (2 x Furan-C<sub>q</sub>), 156.9, 159.0, 172.4 (C=O) ppm;



**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3365 (w), 3269 (w), 2952 (w), 1738 (m), 1654 (s), 1255 (s), 1103 (m)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (ESI-pos)  $m/z$  = 277.3 ( $M + \text{Na}^+$ ).

*5-N-Boc-Guanidinocarbonylfuran-2-N-[(S)-1-Carboxamid-2-methylpropyl]carboxamid (54)*



Eine Lösung der Furancarbonsäure **56** (100 mg, 393  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), PyBOP (205 mg, 393  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), Boc-Guanidin **46** (93.9 mg, 590  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) und NMM (119 mg, 0.129 ml, 1.18 mmol, 3 eq) in DMF (10 ml) wurde 1 d bei RT gerührt. Nach der Zugabe von Wasser (25 ml) und Rühren für 15 min wurde die Mischung mit Essigester (6 x 10 ml) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene gelbe Öl in Wasser (10 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch (RP-18 Kieselgel, Methanol/Wasser = 1/3) gereinigt und man erhielt **54** (66.3 mg, 168  $\mu\text{mol}$ , 43 %) als weißen Feststoff.

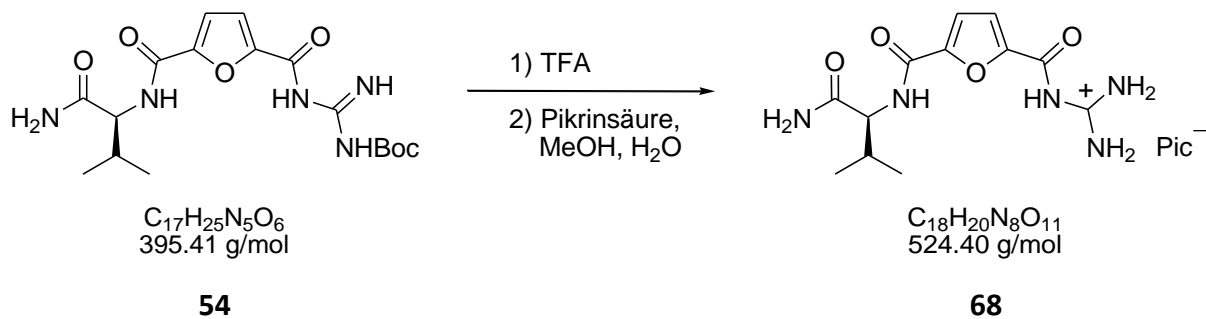
**R<sub>f</sub>** 0.50 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/Hexan/MeOH/ $\text{NEt}_3$  = 8/8/1/2);

**Smp.** 76 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 0.90 (dd,  $^4J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 11.2$  Hz, 6H, Val- $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ), 2.08 (m, 1H, Val- $\text{CH}$ ), 4.28 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 8.8$  Hz, 1H, Val-NCH), 7.15 (br.s, 1H, NH), 7.18 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.3$  Hz, 1H, Furan- $\text{CH}$ ), 7.30 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.7$  Hz, 1H, Furan- $\text{CH}$ ), 7.58 (br.s, 1H, NH), 8.02 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0$  Hz, 1H, NH), 8.66 (br.s, 1H, NH), 9.44 (br.s, 1H, NH) ppm;

<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 18.4, 19.3 (Val-CH <sub>3</sub> ), 27.7 (Boc-CH <sub>3</sub> ), 30.5 (Val-CH), 57.7 (Val-NCH), 81.7 (Boc-C <sub>q</sub> ), 115.1, 116.8 (Furan-CH), 148.6, 157.2, 158.9, 168.7, 172.5, 173.2 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3384 (m), 2979 (w), 1738 (m), 1638 (s), 1545 (m), 1490 (m), 1365 (m), 1324 (m), 1244 (s), 1151 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(ESI-pos) <i>m/z</i> = 396.3 (MH <sup>+</sup> ).

2-{N-[(S)-1-Carboxamid-2-methylpropyl]carboxamid}furan-5-carbonylguanidiniopikrat (**68**)



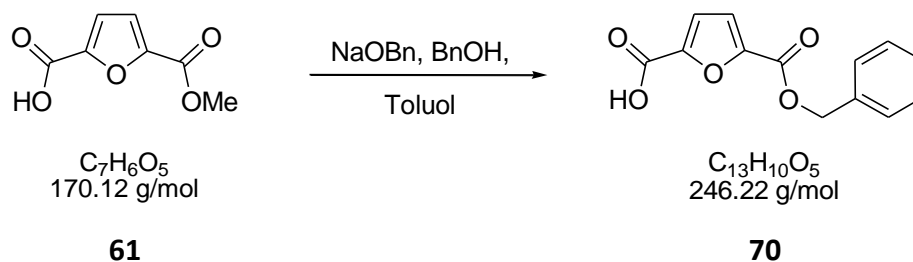
Zur Boc-geschützten Verbindung **54** (65.0 mg, 164  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) wurde bei 0 °C TFA (5 ml) gegeben. Das Eisbad wurde entfernt, und die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Die TFA wurde im Ölpumpenvakuum bei RT entfernt und der gelbliche Rückstand in Methanol gelöst (2 ml). Anschließend wurde eine gesättigte Pikrinsäurelösung in Wasser (8 ml) dazugegeben und die Mischung für 1 d gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt das gewünschte Produkt **68** als gelben Feststoff (36.6 mg, 69.8  $\mu\text{mol}$ , 43 %). Das Pikratsalz **68** konnte in das entsprechende Chloridsalz überführt werden, indem es in verdünnter NaOH gelöst wurde und anschließend säulenchromatographisch das Natriumpikrat abgetrennt wurde (RP-18, erst Wasser, dann Methanol). Zur wässrigen Lösung wurde etwas verdünnte Salzsäure gegeben und das entsprechende Chloridsalz quantitativ durch Lyophilisieren erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.55 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 106 °C (Zersetzung);

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 0.91 (dd, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 6H, Val-CH <sub>3</sub> ), 2.08 (m, 1H, Val-CH), 4.32 (dd, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, Val-NCH), 7.16 (br.s, 1H, NH), 7.52 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, Furan-CH), 7.57 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, Furan-CH), 7.59 (br.s, 1H, NH), 8.28 (d, 1H, NH), 8.33 (br.s, 4H, 2 x Guanidin-NH <sub>2</sub> ), 8.58 (s, 2H, 2 x Pikrat-CH), 11.30 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 18.4, 19.3 (Val-CH <sub>3</sub> ), 30.3 (Val-CH), 58.0 (Val-NCH), 115.6, 119.7 (Furan-CH), 124.2 (C <sub>q</sub> ), 125.2 (2 x Pikrat-CH), 141.9, 145.4, 150.0, 154.6, 156.7, 157.1, 160.8, 172.3 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3371 (m), 3283 (m), 3172 (m), 2979 (w), 1724 (s), 1646 (s), 1545 (s), 1345 (s), 1269 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI) berechnet: $m/z$ = 296.1353 (M <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 296.135 (M <sup>+</sup> ).

### 2,5-Furandicarbonsäuremonobenzylester (**70**)

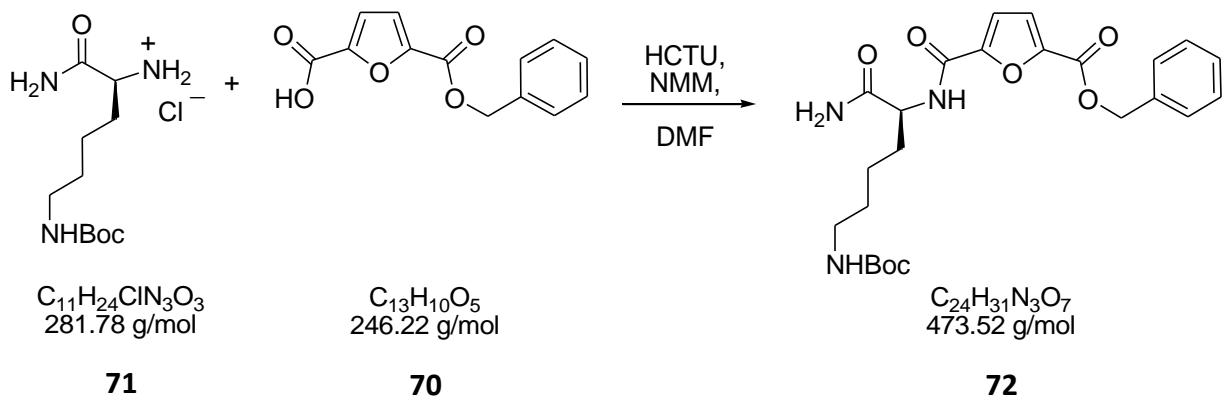


Die Carbonsäure **61** (500 mg, 2.94 mmol, 1 eq) wurde in Toluol (70 ml) gelöst und eine Lösung aus Natrium (54.2 mg, 2.36 mmol, 0.8 eq) in getrocknetem Benzylalkohol (5 ml) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 12 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die ölige Lösung mit Wasser (3 x 50 ml) extrahiert und das Rohprodukt durch Ansäuern der wässrigen Phase auf pH 3 mit konzentrierter Salzsäure ausgefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert in Wasser (20 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt **70** (704 mg, 2.86 mmol, 24 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.62 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

<b>Smp.</b>	153 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 5.31 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.31 (d, 1H, Furan-CH), 7.37–7.47 (m, 6H, 5 x Benzyl-CH, Furan-CH), 13.72 (br.s, 1H, COOH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 66.5 (CH <sub>2</sub> ), 118.4, 119.4 (Furan-CH), 128.3, 128.4 128.5 (Benzyl-CH), 135.5 (Benzyl-C <sub>q</sub> ), 145.6, 147.5 (Furan-C <sub>q</sub> ), 157.4, 158.7 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3119 (m), 3006 (w), 1726 (s), 1698 (s), 1281 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(EI) $m/z$ = 246.0 (M <sup>+</sup> ).

*5-{N-[5-(S)-N-Boc-Amino-1-carboxamidpentyl]carboxamid}furan-2-carbonsäurebenzylester*  
(72)



Der Benzylester **70** (92.8 mg, 377  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), HCTU (157.2 mg, 377  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) und NMM (110  $\mu\text{l}$ , 1.14 mmol, 3 eq) wurden in DMF (5 ml) gelöst und anschließend das Lysinamid **71** (93.1 mg, 377  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 5 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (30 ml) wurde die milchige Lösung mit Essigester (7 x 20 ml) ausgeschüttelt und das Lösungsmittel entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (RP-18-Kieselgel, Methanol/Wasser = 1/3) und an der Lyophile getrocknet. Man erhielt **72** als weißen Feststoff (128 mg, 270  $\mu\text{mol}$ , 71 %).

**R<sub>f</sub>** 0.70 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/Hexan/MeOH/NEt<sub>3</sub> = 4/4/1/1);

**Smp.** 56 °C (Zersetzung);

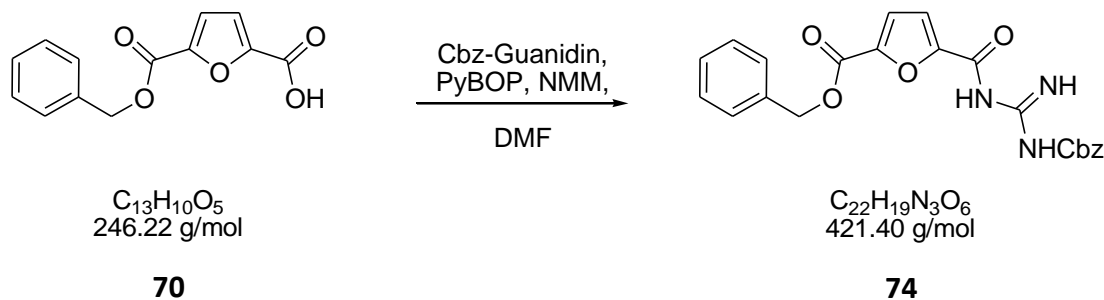
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.18-1.39 (m, 13H, Boc-CH<sub>3</sub>, 2 x Lys-CH<sub>2</sub>), 1.70 (m, 2H, Lys-CH<sub>2</sub>), 2.87 (m, 2H, Lys-CH<sub>2</sub>), 4.34 (m, 1H, Lys-NCH), 5.36 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6.73 (br.t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.9 Hz, 1H, NHBoc), 7.06 (br.s, 1H, NH), 7.34-7.47 (m, 8H, 5 x Benzyl-CH, 2 x Furan-CH, NH), 8.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H, NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 22.9 (Lys-CH<sub>2</sub>), 28.2 (Boc-CH<sub>3</sub>), 29.2(Lys-CH<sub>2</sub>), 31.4(Lys-CH<sub>2</sub>), 52.6 (Lys-CH<sub>2</sub>-NHBoc), 66.3 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 77.3 (Boc-C<sub>q</sub>), 114.8, 119.5 (Furan-CH), 128.2, 128.3, 128.5 (Benzyl-CH), 135.6 (Benzyl-C<sub>q</sub>), 144.3, 150.2 (Furan-C<sub>q</sub>), 155.5, 156.8, 157.5, 173.2 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3343 (m), 2931 (m), 1715 (s) 1685 (s), 1287 (s) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z$  = 496.20542 (M + Na<sup>+</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 496.20664 (M + Na<sup>+</sup>).

**5-N-Cbz-Guanidinocarbonylfuran-2-carbonsäurebenzylester (74)**



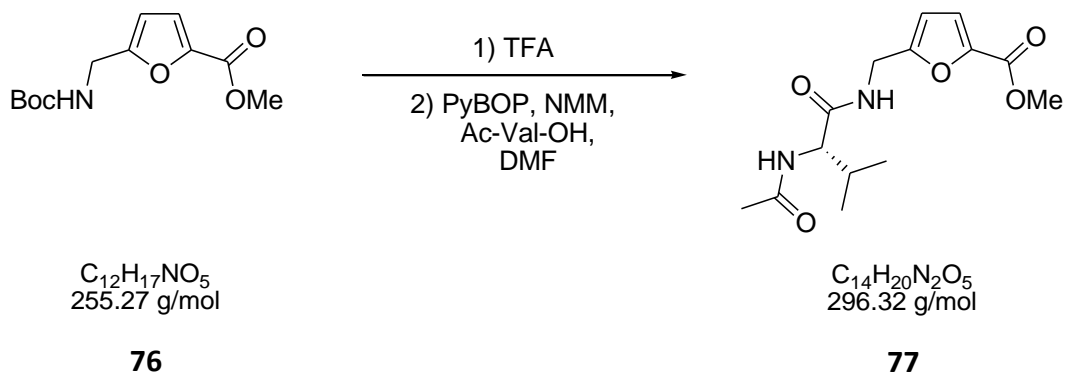
Die Carbonsäure **70** (49.8 mg, 202 μmol, 1 eq), PyBOP (41.8 mg, 202 μmol, 1 eq) und NMM (67.0 μl, 607 μmol, 3 eq) wurden in DMF (2 ml) gelöst und daraufhin Cbz-Guanidin **73** (41.8 mg, 202 μmol, 1 eq) zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 1 d bei RT gerührt und anschließend Wasser (20 ml) zugegeben. Dabei fiel **74** als weißer Feststoff aus, der nach Abfiltrieren im Vakuum getrocknet wurde (64.1 mg, 152 μmol, 75 %).

**R<sub>f</sub>** 0.79 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/Hexan/MeOH/NEt<sub>3</sub> = 4/4/1/1);

**Smp.** 132 °C (Zersetzung);

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 5.22 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.20 (br.s, 1H, Furan-CH), 7.32–7.47 (m, 11H, 5 x Cbz-CH, 5 x Benzyl-CH, Furan-CH), 8.79 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.67 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 11.27 (br.s, 1H, Guanidin-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 66.3 (CH <sub>2</sub> ), 67.0 (CH <sub>2</sub> ), 116.7, 119.6 (Furan-CH), 127.9, 128.2, 128.26, 128.33, 128.47, 128.54 (Benzyl-CH), 135.5, 135.6 (Benzyl- C <sub>q</sub> ), 144.8, 157.6, 158.7 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3403 (s), 3283 (w), 3113 (w), 1723 (s), 1688(s), 1278 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 444.11661 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 444.11561 (M + Na <sup>+</sup> ).

5-[[*(S)*-2-Acetamido-3-methylbutanamido]methyl]furan-2-carbonsäuremethylester (**77**)

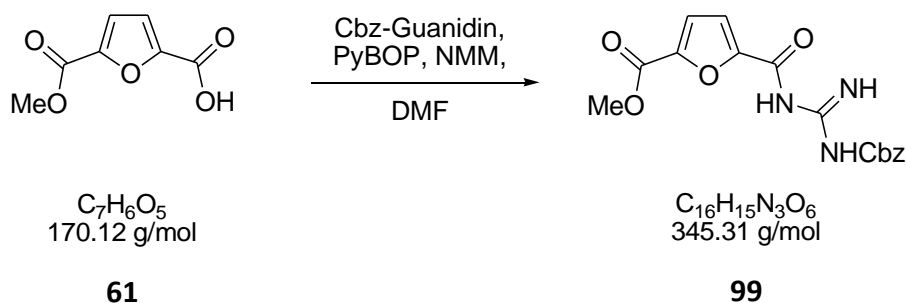


Es wurde der Methylester **76** (155 mg, 607  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) in TFA (5 ml) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das überschüssige TFA am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zum erhaltenen gelblichen Öl wurde eine Lösung von PyBOP (520 mg, 1.00 mmol, 1.65 eq) und Ac-Val-OH (159 mg, 1.00 mmol, 1.65 eq) in einer 5 %igen Lösung von NMM in DMF (6 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 d bei RT gerührt. Anschließend wurden Wasser (30 ml) und gesättigte NaCl-Lösung (20 ml) zugegeben. Die gelbe Lösung wurde mit Essigester (5 x 20 ml) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet, so dass sich ein weißer Feststoff bildete. Dieser wurde abfiltriert, mit etwas Wasser gewaschen und über

Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet. Man erhielt **77** als weißen Feststoff (90.0 mg, 304  $\mu\text{mol}$ , 50 %).

<b>R<sub>f</sub></b>	0.41 (SiO <sub>2</sub> , EtOAc/Hexan/MeOH = 4/4/1);
<b>Smp.</b>	198 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 0.83 (dd, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1.9 Hz, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 6H, Val-CH <sub>3</sub> ), 1.87 (s, 3H, Acetyl-CH <sub>3</sub> ), 1.94 (m, 1H, Val-CH), 3.79 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.11 (dd, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.6 Hz, 1H, Val-CHNH), 4.32 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.41 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, Furan-CH), 7.23 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 1H, Furan-CH), 7.89 (br.d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, Acetyl-NH), 8.55 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH <sub>2</sub> -NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 18.2 (Val-CH <sub>3</sub> ), 19.1 (Val-CH <sub>3</sub> ), 22.4 (Acetyl-CH <sub>3</sub> ), 30.2 (Val-CH), 35.6 (CH <sub>2</sub> ), 51.6 (OCH <sub>3</sub> ), 57.9 (Val-NCH), 109.1, 119.3 (Furan-CH), 142.6, 157.5 (Furan-C <sub>q</sub> ), 158.2, 169.4, 171.4 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3272 (s), 3104 (w), 2961 (m), 1734 (s), 1634 (s), 1567 (s), 1518 (s), 1148 (s), 763 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(EI) $m/z$ = 296.1 (M <sup>+</sup> ).

## 7.2.3 Synthese der Inhibitoren 79 bis 84 auf Furan- und Pyrrolbasis

5-N-Cbz-Guanidinocarbonylfuran-2-carbonsäuremethylester (**99**)

Die Furancarbonsäure **61** (500 mg, 2.94 mmol, 1 eq), PyBOP (1.53 g, 2.94 mmol, 1 eq.), NMM (970  $\mu\text{l}$ , 8.80 mmol, 3 eq) und Cbz-Guanidin **73** (668 mg, 2.94 mmol, 1 eq) wurden in DMF (4 ml) gelöst und bei RT 1 d gerührt. Unter Rühren wurde Wasser (10 ml) zugegeben und die Lösung mit Essigester (5 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Wasserzugabe wurde das Rohprodukt an der Lyophile getrocknet. Nach Umkristallisation unter leichtem Erwärmen aus Methanol erhielt man **99** (441 mg, 1.28 mmol, 43 %) als leicht bräunlichen Feststoff.

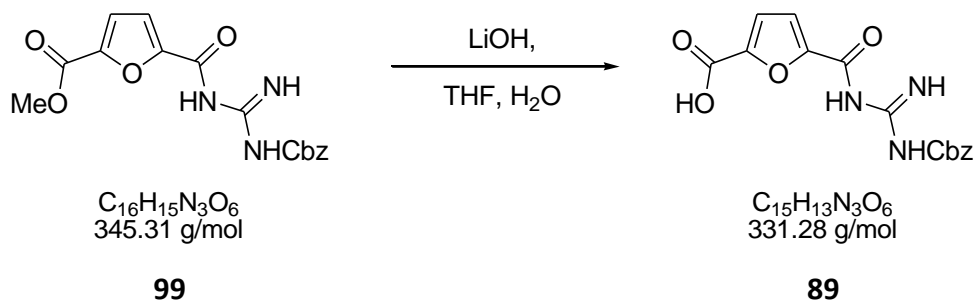
**R<sub>f</sub>** 0.59 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EtOAc = 1/1);

**Smp.** 140 °C;

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 3.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.22 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 7.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.3 Hz, 1H, Furan-CH), 7.19 (m, 6H, 5 x Cbz-CH, Furan-CH), 8.74 (br.s, 1H, NH), 9.66 (br.s, 1H, NH), 11.26 (br.s, 1H, NH) ppm;

Die vollständige Charakterisierung dieser Verbindung ist in der Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht.<sup>[7]</sup>



5-N-Cbz-Guanidinocarbonylfuran-2-carbonsäure (**89**)

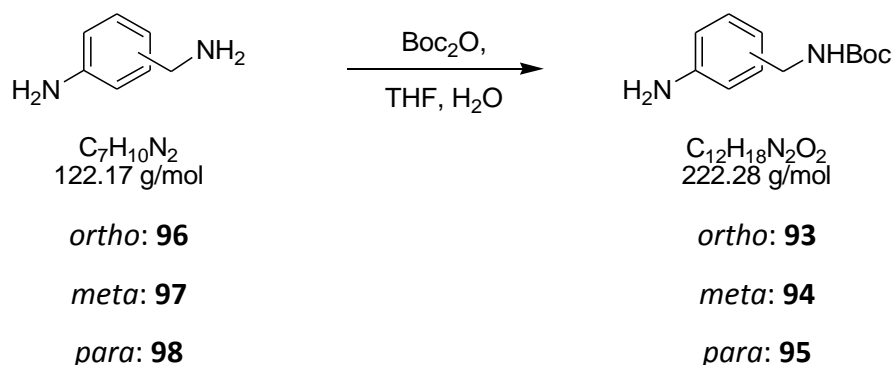
Es wurden der Methylester **99** (386 mg, 1.12 mmol, 1 eq) in einer 4/1-Mischung aus THF und Wasser (20 ml) gelöst und LiOH (268 mg, 11.2 mmol, 10 eq) zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das THF im Vakuum bei RT abdestilliert. Die erhaltene Suspension wurde mit 5 %iger Salzsäure auf pH = 2 angesäuert. Aus der Lösung kristallisierte ein weißer Feststoff, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und nach Wasserzugabe an der Lyophile getrocknet wurde. Man erhielt das Produkt **89** als weißen Feststoff (239 mg, 0.721 mmol, 64 %).

**R<sub>f</sub>** 0.60 (RP-18, H<sub>2</sub>O/MeOH = 1/1, mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

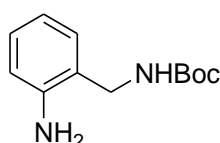
**Smp.** 220 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 5.21 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 7.20-7.41 (m, 7H, 5 x Cbz-CH, 2 x Furan-CH), 8.73 (br.s, 1H, NH), 9.65 (br.s, 1H, NH), (br.s, 1H, NH), 12.35 (br.s, 2H, NH, COOH) ppm;

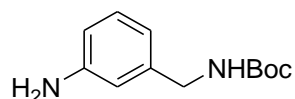
Die vollständige Charakterisierung dieser Verbindung ist in der Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht.<sup>[7]</sup>

Darstellung der tert-Butyl-(aminobenzyl)-carbamate **93** bis **95**

Die verschieden substituierten Aminomethylaniline **96** bis **98** (1.00 g, 8.19 mmol, 1 eq) wurden in einer Mischung aus THF und Wasser (2/1, 15 ml) gelöst und unter Rühren wurde  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.95 g, 8.91 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (20 ml) gelöst und die erhaltene Lösung mit Wasser (10 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die Rohprodukte wurden säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Hexan/Essigsäureethylester = 2/1) gereinigt. Nach Aufnehmen in Wasser und Lyophilisieren konnten die Produkte **93** bis **95** als gelbliche Feststoffe erhalten werden.

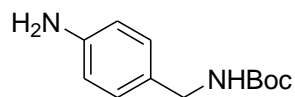
**93**

<b>Ausbeute</b>	1.13 g (5.11 mmol, 62 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.37 ( $\text{SiO}_2$ , Hexan/EtOAc = 2/1);
<b>Smp.</b>	93 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ = 1.39 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ), 3.95 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.97 (br.s, 2H, $\text{NH}_2$ ), 6.49 (dt, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.3 Hz, $^4J_{\text{HH}}$ = 0.9 Hz, 1H, Ar- $\text{CH}$ ), 6.59 (dd, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.3 Hz, $^4J_{\text{HH}}$ = 1.2 Hz, 1H, Ar- $\text{CH}$ ), 6.93 (m, 2H, Ar- $\text{CH}$ ), 7.20 (br.t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.6 Hz, 1H, NH) ppm;



94

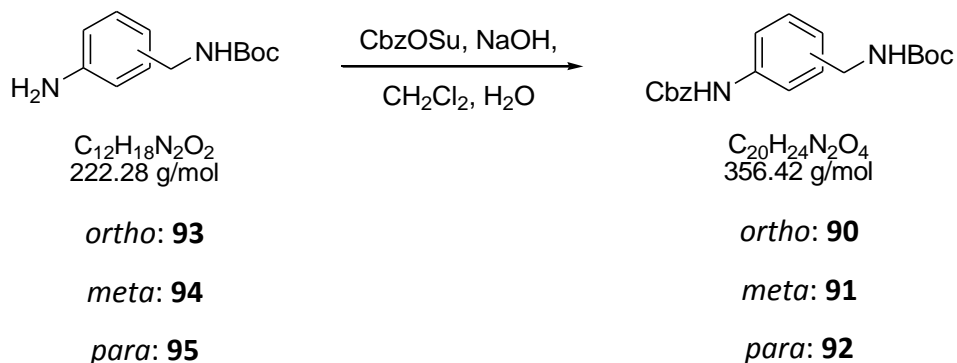
<b>Ausbeute</b>	798 mg (3.59 mmol, 44 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.29 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc = 2/1);
<b>Smp.</b>	39 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.39 (s, 9H, Boc-CH <sub>3</sub> ), 3.97 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5.10 (br.s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.37-6.43 (m, 3H, Ar-CH), 6.93 (t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.21 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.7 Hz, 1H, NH) ppm;



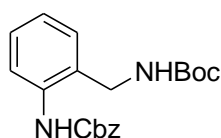
95

<b>Ausbeute</b>	1.07 mg (4.81 mmol, 59 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.13 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc = 2/1);
<b>Smp.</b>	79 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.38 (s, 9H, Boc-CH <sub>3</sub> ), 3.92 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.90 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 6.48 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 2H, 2 x Ar-CH), 6.88 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 2H, 2 x Ar-CH), 7.10 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 1H, NH) ppm;

Die vollständige Charakterisierung dieser Verbindungen ist in der Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht.<sup>[7]</sup>

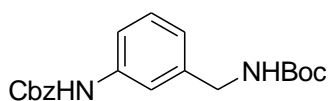
Darstellung der *N*-Boc-Aminomethyl-*N*-Cbz-aniline **90** bis **92**

Die mono-Boc-geschützten Diamine **93** bis **95** (750 mg, 3.37 mmol, 1 eq) wurden in Dichlormethan (15 ml) gelöst, und anschließend NaOH (160 mg, 4.05 mmol, 1.2 eq) und Wasser (15 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde Benzyloxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid (930 g, 3.71 mmol, 1.1 eq) langsam zugegeben. Anschließend wurde die Mischung 24 h bei RT gerührt. Es wurden Dichlormethan (20 ml) und Wasser (20 ml) zugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan (10 ml) extrahiert. Das Lösemittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/Essigester = 2/1) gereinigt. Nach Gefriertrocknen aus Wasser an der Lyophile konnten die Produkte **90** bis **92** als gelbliche Feststoffe erhalten werden.

**90**

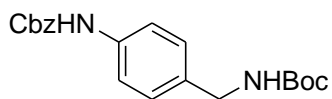
<b>Ausbeute</b>	817 mg (2.29 mmol, 68 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.40 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc = 2/1);
<b>Smp.</b>	99 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ = 1.38 (s, 9H, Boc-CH <sub>3</sub> ), 4.10 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NHBoc), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.09-6.15 (m, 1H, Ar-CH), 7.20-7.25 (m, 2H, 2 x Ar-CH), 7.32-7.48 (m, 7H, 6 x Ar-CH, NHBoc), 9.13 (br.s, 1H, NHCbz) ppm;

<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 28.2 (Boc-CH <sub>3</sub> ), 39.8 (NHCH <sub>2</sub> ), 65.8 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 78.2 ( <sup>tert</sup> Butyl-C <sub>q</sub> ), 123.7, 124.5, 127.2, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4 (Ar-CH), 132.5, 135.4, 136.7 (Ar-C <sub>q</sub> ), 154.1, 156.2 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3361 (w), 3248 (w), 2979 (w), 1731 (m), 1656 (m), 1593 (m), 1545 (s), 1454 (m), 1212 (s), 1043 (s), 865 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(EI) berechnet: $m/z$ = 356.17306 (M <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 356.17335 (M <sup>+</sup> ).



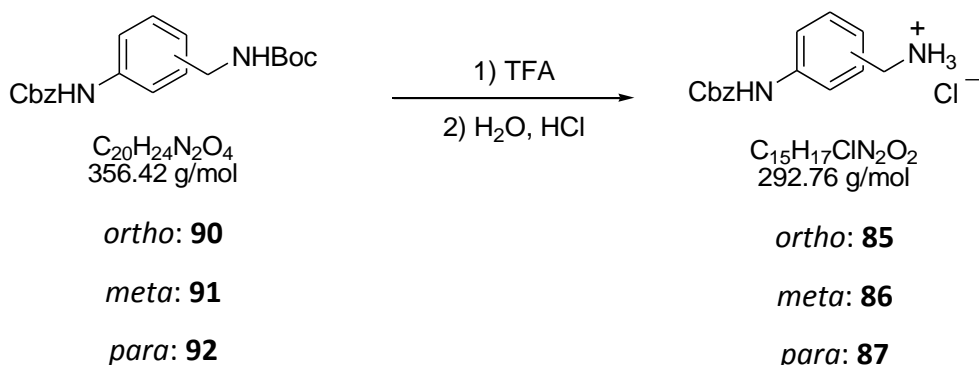
91

<b>Ausbeute</b>	730 mg (2.05 mmol, 61 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.51 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc = 2/1);
<b>Smp.</b>	89 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 1.39 (s, 9H, Boc-CH <sub>3</sub> ), 4.07 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NHBoc), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 6.86 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.20 (t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.31-7.43 (m, 9H, 8 xAr-CH; NHBoc), 9.73 (br.s, 1H, NHCbz) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 28.2 (Boc-CH <sub>3</sub> ), 43.8 (CH <sub>2</sub> NHBoc), 65.6 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 77.7 (Boc-C <sub>q</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 116.6, 116.7, 121.0, 126.4, 128.0, 128.4, 128.6 (Ar-CH), 136.7, 140.9, 139.0 (Ar-C <sub>q</sub> ), 153.3, 155.8 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3355 (s), 3328 (s), 3096 (w), 3069 (w), 3035 (w), 3008 (w), 2990 (m), 2969 (m), 2942 (m), 2877 (m), 1701 (s), 1686 (s), 1599 (s), 1543 (s), 1512 (s), 1448 (m), 1250 (s), 1177 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(EI) berechnet: $m/z$ = 356.17306 (M <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 356.17306 (M <sup>+</sup> ).

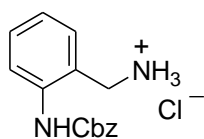


92

<b>Ausbeute</b>	730 mg (2.05 mmol, 61 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.33 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/Essigester = 2/1);
<b>Smp.</b>	120 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.38 (s, 9H, 3 x CH <sub>3</sub> ), 4.04 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NHBoc), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.13 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 2H, Ar-CH), 7.29 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 1H, Boc-NH), 7.30-7.44 (m, 7H, 7 xAr-CH), 9.69 (br.s, 1H, Cbz-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 28.2 (Boc-CH <sub>3</sub> ), 42.9 (CH <sub>2</sub> NHBoc), 65.6 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 77.7 (Boc-C <sub>q</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 118.1, 127.4, 127.9, 128.0, 128.4 (Ar-CH), 134.2, 136.6, 137.6 (Ar-C <sub>q</sub> ), 153.4, 155.7 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3352 (w), 2959 (w), 1699 (s), 1682 (s), 1514 (s), 1228 (s), 1162 (s), 1051 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(EI) berechnet: $m/z$ = 356.17306 (M <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 356.17333 (M <sup>+</sup> ).

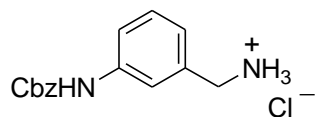
Darstellung der Cbz-Aminophenyl-methylammoniumchloride **85** bis **87**

Die geschützten Diamine **90** bis **92** (570 mg, 1.60 mmol, 1 eq) wurden bei 0 °C in TFA (3 ml) gelöst. Nach 1 h Rühren bei RT wurde die TFA im Ölpumpenvakuum entfernt. Es wurden Wasser (2 ml) und 5 %ige Salzsäure (10 Tropfen) zugegeben und die erhaltene Lösung gefriergetrocknet. Nach anschließendem Aufnehmen des Rückstands in Wasser und erneutem Lyophilisieren konnten die Produkte **85** bis **87** als farblose Feststoffe erhalten werden.

**85**

<b>Ausbeute</b>	459 mg (1.57 mmol, 98 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.25 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/Essigester = 2/1);
<b>Smp.</b>	76 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 4.01 (q, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 5.16 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.23-7.25 (m, 1H, Ar-CH), 7.26-7.49 (m, 8H, Ar-CH), 8.17 (br.s, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 9.37 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 38.1 (CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 66.0 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 125.2, 125.3 (Ar-CH), 127.6 (Ar-C <sub>q</sub> ), 127.9, 128.0, 128.5, 128.9, 129.9 (Ar-CH), 136.3, 136.6 (Ar-C <sub>q</sub> ), 154.6 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3347 (w), 3286 (w), 3036 (w), 1699 (s), 1590 (m), 1523 (s), 1451 (s), 1237 (s), 1042 (s) cm <sup>-1</sup> ;

**HR-MS** (EI) berechnet:  $m/z = 256.12063$  ( $M^+$ ),  
 gefunden:  $m/z = 256.12072$  ( $M^+$ ).

**86**

**Ausbeute** 380 mg (1.30 mmol, 81 %);

**R<sub>f</sub>** 0.74 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester = 2/1);

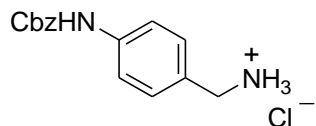
**Smp.** 151 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta = 3.94$  (s, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 5.16 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 7.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.30-7.43 (m, 7H, Ar-CH), 7.59 (s, 1H, Ar-CH), 8.47 (br.s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 9.91 (br.s, 1H, NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta = 42.3$  (CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 65.7 (Cbz-CH<sub>2</sub>), 118.4, 118.7, 123.0, 128.0, 128.4, 129.0 (Ar-CH), 134.6, 136.6, 139.3 (Ar-C<sub>q</sub>), 153.4 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu} = 3550$  (br), 3403 (br), 3291 (m), 3065 (w), 3034 (w), 2955 (w), 2929 (w), 1700 (s), 1598 (m), 1546 (s), 1452 (m), 1249 (s) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (EI) berechnet:  $m/z = 256.12063$  ( $M^+$ ),  
 gefunden:  $m/z = 256.12054$  ( $M^+$ ).

**87**

**Ausbeute** 384 mg (1.31 mmol, 82 %);

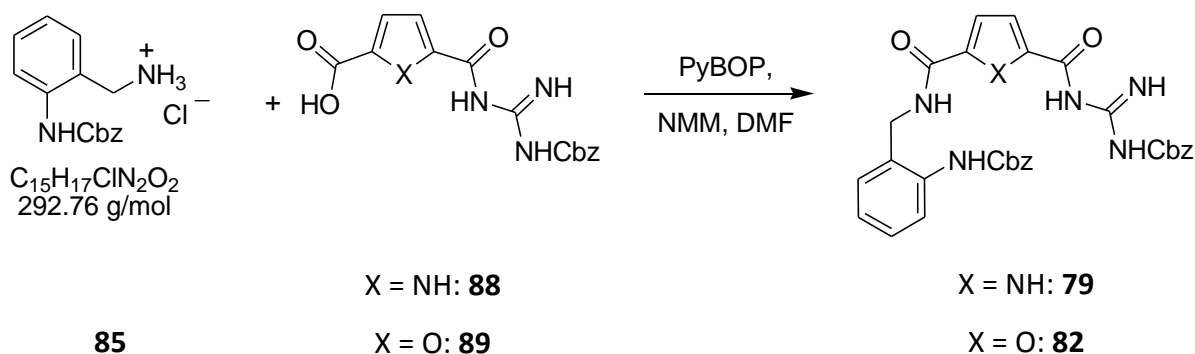
**R<sub>f</sub>** 0.24 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester = 2/1);

**Smp.** 155 °C (Zersetzung);

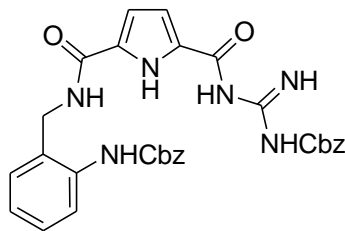


<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 3.93 (q, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 5.15 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.32-7.44 (m, 7H, Ar-CH), 7.49 (d, 2H, Ar-CH), 8.25 (br.s, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 9.87 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 42.1 (CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 66.2 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 118.0 (Ar-CH), 127.9 (Ar-C <sub>q</sub> ), 128.0, 128.0, 128.4, 129.6 (Ar-CH), 136.5, 139.3 (Ar-C <sub>q</sub> ), 153.3 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3364 (w), 2957 (m), 1708 (s), 1598 (m), 1535 (s), 1420 (m), 1318 (m), 1222 (s), 1055 (s), 828 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(EI) berechnet: $m/z$ = 256.12063 (M <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 256.12049 (M <sup>+</sup> ).

Darstellung der ortho-substituierten Inhibitoren **79** und **82**



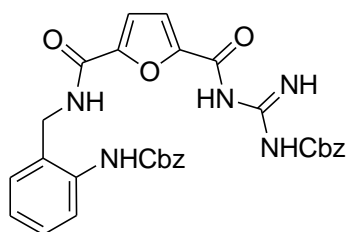
Die Pyrrolcarbonsäure **88** (100.0 mg, 303 μmol, 1 eq) bzw. die Furancarbonsäure **89** (100 mg, 302 μmol, 1 eq) wurden jeweils mit Verbindung **85** (88.7 mg, 303 μmol, 1 eq), PyBOP (158 mg, 303 μmol, 1 eq), NMM (100 μl, 3 eq) und DMF (3 ml) versetzt und die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Wasser (5 ml) zugegeben, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Nach Wasserzugabe und Trocknen an der Lyophile wurden die Produkte **79** und **82** als gelbliche Feststoffe erhalten. Der Inhibitor **79** musste säulenchromatographisch gereinigt werden (Silicagel, Cyclohexan/Essigester/Ethanol = 8/3/1). Verbindung **82** wurde mehrmals wieder in wenig DMF gelöst und anschließend durch Wasserzugabe erneut ausgefällt, um das Produkt in besserer Reinheit zu erhalten.



$C_{30}H_{28}N_6O_6$   
568.58 g/mol

**79**

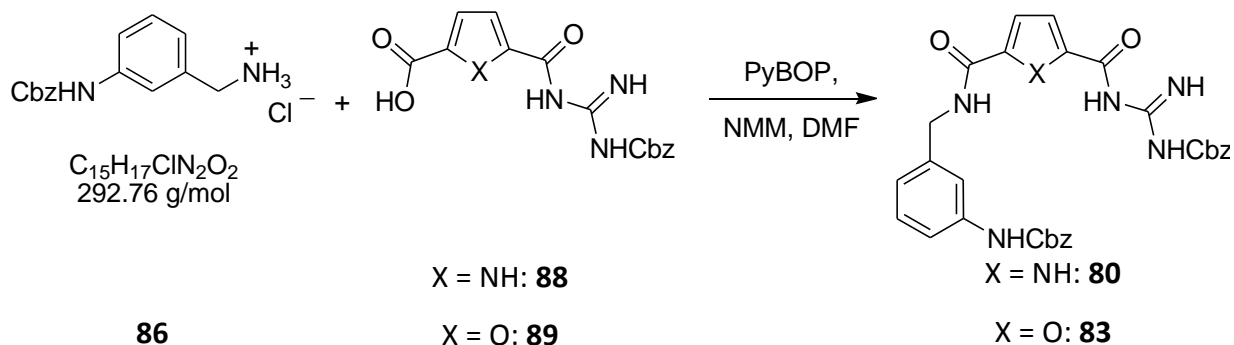
<b>Ausbeute</b>	90.0 mg (158 $\mu$ mol, 52 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.27 (SiO <sub>2</sub> , Cyclohexan/EtOAc/EtOH = 8/3/1),
<b>Smp.</b>	153 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 4.42 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.9 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 5.16 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 6.86 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 6.97 (br.s, 1H, Pyrrol-CH), 7.13 (dt, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 7.4 Hz, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1.1 Hz, 1H, Ar-CH), 7.24-7.44 (m, 13H, Ar-CH), 8.78 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 8.99 (br.t, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.9 Hz, 1H, CH <sub>2</sub> -NH), 9.37 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.44 (br.s, 1H, NH), 11.14 (br.s, 1H, NH), 11.86 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 38.8 (CH <sub>2</sub> NH), 65.8, 66.2 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 112.1, 123.9, 124.6, 127.6, 127.88, 127.93, 128.38, 128.42, 128.9 (Ar-CH), 131.3, 135.8, 136.8 (Ar-C <sub>q</sub> ), 154.1, 158.9, 160.1 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3383 (w), 3273 (w), 1702 (m), 1685 (m), 1625 (m), 1526 (s), 1243 (s), 1023 (s), 753 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 591.19625 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 591.19739 (M + Na <sup>+</sup> ).



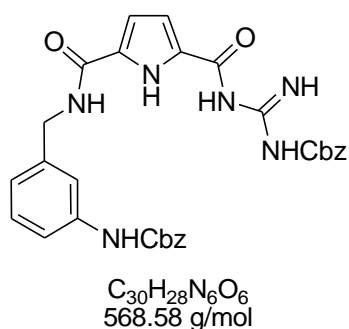
$C_{30}H_{27}N_5O_7$   
569.56 g/mol

**82**

<b>Ausbeute</b>	53.0 mg (93.0 $\mu$ mol, 31 %)
<b>R<sub>f</sub></b>	0.79 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc/EtOH = 2/1/1),
<b>Smp.</b>	130 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 4.43 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5.16 (m, 4H, 2 x Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.11 (dt, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 6.3 Hz, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 1.1 Hz, 1H, Ar-CH), 7.23-7.50 (m, 16H, Ar-CH, CH <sub>2</sub> NH), 8.78 (br.s, 1H, NH), 9.18 (br.s, 1H, NH), 9.38 (br.s, 1H, NH), 9.52 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 38.5 (NH-CH <sub>2</sub> ), 65.9, 66.8 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 115.2, 124.7, 127.6, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.4, 128.45, 128.47 (Ar-CH), 128.7, 131.3, 135.7, 135.9, 136.7, 148.0, 148.9, 154.2, 157.6, 157.7, 158.4, 158.5 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3373 (w), 1731 (m), 1631 (m), 1529 (m), 1298 (m), 1214 (s), 1044 (m), 747 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 592.18027 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 592.18026 (M + Na <sup>+</sup> ).

Darstellung der meta-substituierten Inhibitoren **80** und **83**

Die Pyrrolcarbonsäure **88** (60.0 mg, 182  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) bzw. die Furancarbonsäure **89** (60.0 mg, 181  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) wurden jeweils mit Verbindung **86** (53.2 mg, 182  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), PyBOP (94.5 mg, 182  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), NMM (60  $\mu\text{l}$ , 3 eq) und DMF (2 ml) versetzt und die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Wasser (5 ml) zugegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Nach Wasserzugabe und Trocknen an der Lyophile wurden die Produkte **80** und **83** als gelbliche Feststoffe erhalten. Der Inhibitor **80** musste säulenchromatographisch gereinigt werden ( $\text{SiO}_2$ , Hexan/Essigester/Ethanol = 8/1/1).



**Ausbeute** 50.7 mg (89.2  $\mu\text{mol}$ , 49 %);

**R<sub>f</sub>** 0.23 ( $\text{SiO}_2$ , Hexan/EtOAc/EtOH = 8/1/1),

**Smp.** 107 °C (Zersetzung);

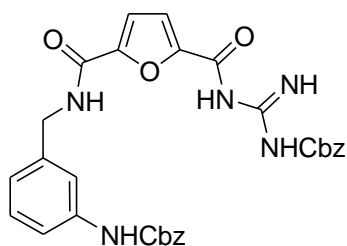
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 4.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 5.13 (s, 4H, 2 x Cbz-CH<sub>2</sub>), 6.85 (br.s, 1H, Pyrrol-CH), 6.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 7.23 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.31-7.44 (m, 14H, 13 x Ar-

CH, NH), 8.89 (br.s, 2H, 2 x NH), 9.75 (br.s, 1H, NH), 11.16 (br.s, 1H, NH), ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 45.8 (NH-CH<sub>2</sub>), 65.6 (Cbz-CH<sub>2</sub>), 112.0, 116.8, 117.1, 121.5, 127.6, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.7 (Ar-CH), 136.6, 139.1, 140.0, 153.3, 159.3 (C<sub>q</sub>) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3396 (br), 3298 (br), 3095 (w), 3077 (w), 3034 (w), 2958 (m), 2915 (s), 2859 (m), 1728 (s), 1625 (s), 1552 (s), 1496 (m), 1462 (s), 1396 (s), 1311 (s) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z$  = 591.19625 (M + Na<sup>+</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 591.19658 (M + Na<sup>+</sup>).



C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>  
569.56 g/mol

**83**

**Ausbeute** 67.0 mg (118 μmol, 65 %)

**R<sub>f</sub>** 0.43 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/EtOAc/EtOH = 2/1/1),

**Smp.** 88 °C (Zersetzung);

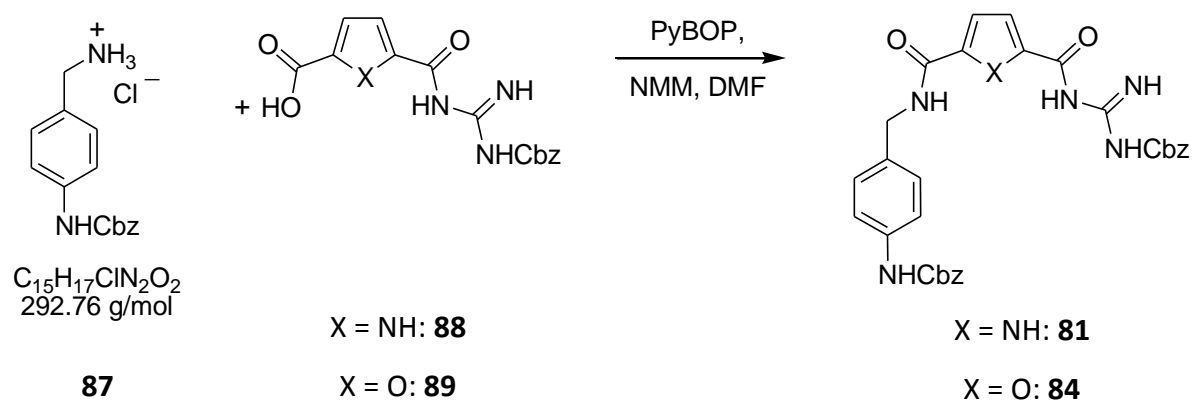
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 4.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 5.13 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 5.17 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 6.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, Furan-CH), 7.20-7.25 (m, 2H, Ar-CH), 7.32-7.43 (m, 13H, Ar-CH), 8.77 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.12 (br.s, 1H, Guanidin-NH), 9.75 (br.s, 1H, NH), 11.14 (br.s, 1H, Guanidin-NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 42.0 (NH-CH<sub>2</sub>), 65.6 (Cbz-CH<sub>2</sub>), 116.8, 116.9, 121.4, 127.7, 128.0, 128.4, 128.7, 130.1 (Ar-CH), 136.6, 139.2, 139.7, 149.2, 153.3, 158.4, 158.8, 162.3 (C<sub>q</sub>) ppm;

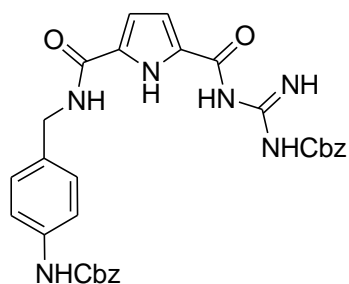
**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3490 (br), 3382 (br), 3095 (w), 3077 (w), 3034 (w), 2960 (w), 2934 (w), 1728 (s), 1630 (s), 1599 (m), 1550 (s), 1498 (s), 1383 (m), 1315 (s), 1291 (s), 1217 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**HR-MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z$  = 592.1803 ( $\text{M}^+ + \text{Na}^+$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 592.1798 ( $\text{M}^+ + \text{Na}^+$ ).

*Darstellung der para-substituierten Inhibitoren **81** und **84***



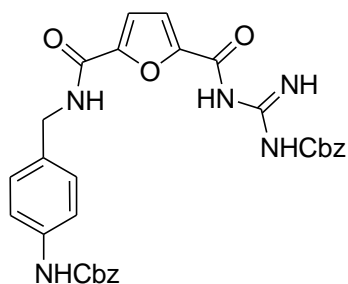
Die Pyrrolcarbonsäure **88** (100 mg, 303  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) bzw. die Furancarbonsäure **89** (100 mg, 302  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) wurden jeweils mit Verbindung **87** (88.5 mg, 303  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), PyBOP (31.5 mg, 60.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), NMM (100  $\mu\text{l}$ , 3 eq) und DMF (4 ml bzw. 2 ml) versetzt und die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Wasser (5 ml) zugegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Nach Wasserzugabe und Trocknen an der Lyophile wurden die Produkte **81** und **84** als gelbliche Feststoffe erhalten. Beide Verbindungen wurden mehrmals wieder in wenig DMF gelöst und anschließend durch Wasserzugabe erneut ausgefällt, um die Produkte in besserer Reinheit zu erhalten.



$C_{30}H_{28}N_6O_6$   
568.58 g/mol

**81**

<b>Ausbeute</b>	28.0 mg (49.2 $\mu$ mol, 32 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.31 (SiO <sub>2</sub> , Cyclohexan/EtOAc/EtOH = 8/3/1),
<b>Smp.</b>	204 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 4.37 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 5.5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> -NH), 5.13 (s, 4H, 2 x Cbz-CH <sub>2</sub> ), 6.84 (br.s, 1H, Pyrrol-CH), 6.98 (br.s, 1H, Pyrrol-CH), 7.21 (d, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 2H, Ar-CH), 7.31-7.42 (m, 13H, 12 x Ar-CH, NH), 8.72 (br.s, 1H, NH), 8.83 (br.s, 1H, NH), 9.35 (br.s, 1H, NH), 9.71 (br.s, 1H, NH), 11.10 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 41.8 (NH-CH <sub>2</sub> ), 65.7 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 111.9, 118.2, 127.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.40, 128.43 (Ar-CH), 133.3, 136.6, 137.9, 146.5, 153.4, 159.4 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3332 (w), 1703 (w), 1685 (m), 1627 (s), 1531 (s), 1415 (w), 1255 (s), 1083 (m), 1063 (m), 745 (s) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 591.19625 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 591.19653 (M + Na <sup>+</sup> ).



$C_{30}H_{27}N_5O_7$   
569.56 g/mol

**84**

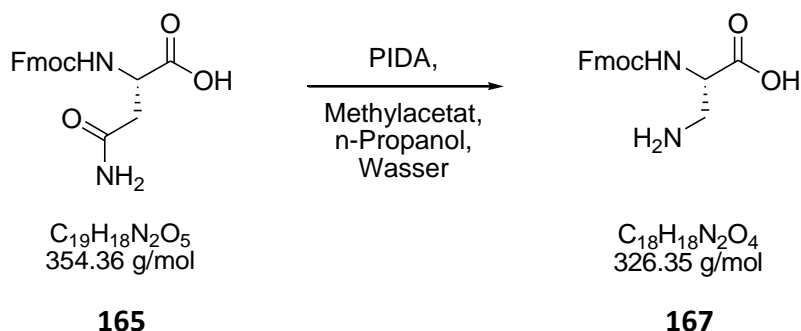
<b>Ausbeute</b>	37.0 mg (65.0 $\mu$ mol, 22 %)
<b>R<sub>f</sub></b>	0.79 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc/EtOH = 2/1/1),
<b>Smp.</b>	167 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 4.41 (m, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5.13 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 5.21 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.17-7.23 (m, 4H, Ar-CH), 7.32-7.43 (m, 14H, Ar-CH, NH), 8.68 (br.s, 1H, NH), 8.94 (br.s, 1H, NH), 9.72 (br.s, 1H, NH), 11.16 (br.s, 1H, NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 41.6 (NHCH <sub>2</sub> ), 65.7 (Cbz-CH <sub>2</sub> ), 114.7, 118.2, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4 (Ar-CH), 132.9, 136.6, 137.9, 148.1, 153.3, 157.1, 158.8 (C <sub>q</sub> ) ppm;
<b>IR</b>	(ATR) $\tilde{\nu}$ = 3373 (w), 3030 (w), 2363 (m), 1702 (m), 1622 (m), 1528 (s), 1213 (s), 1050 (m), 748 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 592.18027 (M + Na <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 592.18022 (M + Na <sup>+</sup> ).



## 7.2.4 Synthese der Bausteine für die Festphasensynthese

### 7.2.4.1 Synthese der Fmoc-Aminosäure 166

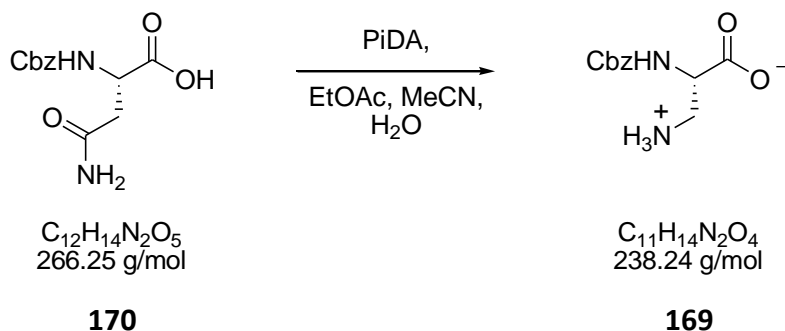
$N_{\alpha}$ -Fmoc- $\beta$ -Amino-L-alanin (**167**)<sup>[158]</sup>



Zu einer Suspension von  $N_{\alpha}$ -Fmoc-L-Asparagin **165** (5.00 g, 14.1 mmol, 1 eq) in einer Mischung aus Methylacetat (50 ml), n-Propanol (50 ml) und Wasser (5 ml) wurde PIDA (6.00 g, 18.6 mmol, 1.3 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei RT und anschließend 5 h bei 32 °C gerührt. Die entstandene Suspension wurde im Eisbad gekühlt, abfiltriert und der weiße Feststoff mit n-Propanol (2 x 20 ml), Methanol (2 x 20 ml) und mit Methylacetat (2 x 20 ml) gewaschen. Der Feststoff wurde anschließend in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt **167** wurde als weißer Feststoff (2.43 g, 7.45 mmol, 53 %) erhalten.

**$^1$ H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 2.82 (m, 1H,  $CH_2NH_2$ ), 3.02 (m, 1H,  $CH_2NH_2$ ), 3.74 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.24 (m, 3H, Fmoc- $CH_2$ ,  $CHNH$ Fmoc), 6.83 (br.s, 2H,  $NH_2$ ), 7.31-7.43 (m, 4H, 4 x Fmoc-Ar-CH), 7.70 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.0 Hz, 2H, 2 x Fmoc-Ar-CH), 7.84 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.88 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 2H, 2 x Fmoc-Ar-CH) ppm;

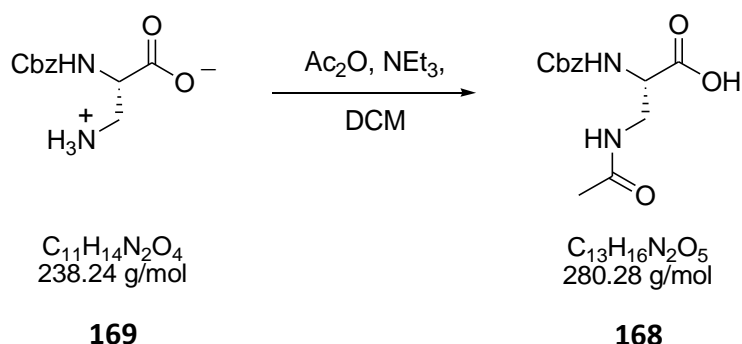
Die vollständige Charakterisierung der Verbindung **167** ist in der Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht.<sup>[169]</sup>

*N*<sub>α</sub>-Cbz-β-Amino-L-alanin (**169**)<sup>[158]</sup>

Eine Suspension von *N*<sub>α</sub>-Cbz-*L*-Asparagin **170** (5.00 g, 18.8 mmol) in einer Mischung aus Essigester (24 ml), Acetonitril (24 ml) und Wasser (12 ml) wurde im Eisbad auf 5 °C abgekühlt und PIDA (7.26 g, 22.5 mmol) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und für 5 h bei RT weitergerührt. Die entstandene Suspension wurde im Eisbad gekühlt, abfiltriert und der weiße Feststoff mit Diethylether (2 x 10 ml) gewaschen. Der Feststoff wurde anschließend in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 4.23 g (17.8 mmol, 95 %) des weißen Produktes **169** erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 2.99-3.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.27- 3.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.28-4.33 (m, 1H, CH), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 7.29-7.35 (m, 5H, Aryl-CH), 7.66 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, NH), 7.88 (br.s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ppm;

Die vollständige Charakterisierung der Verbindung **169** ist in der Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht.<sup>[170]</sup>

*N*<sub>α</sub>-Cbz-β-Acetylamino-L-alanin (**168**)

Essigsäureanhydrid (3.60 ml, 37.4 mmol, 1.1 eq) wurde zu einer Suspension aus *N*<sub>α</sub>-Cbz-β-Amino-L-Alanin **169** (8.10 g, 34.0 mmol, 1 eq) in Dichlormethan (200 ml) zugetropft. Anschließend wurde Triethylamin (10.5 ml, 74.8 mmol, 2.2 eq) zur Reaktionslösung zugegeben. Nach 5 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung klar und die Reaktion war beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum destillativ entfernt und das erhaltene Öl in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt **168** wurde (8.01 g, 28.8 mmol, 84 %) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.10 (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 9/1 mit 0.1 % AcOH);

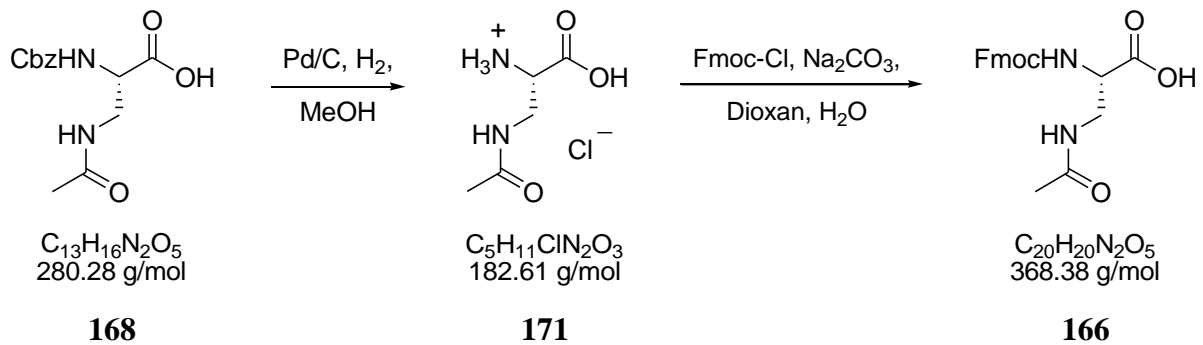
**Smp.** 43 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.23-3.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.84-3.89 (m, 1H, CH), 5.01 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>O), 6.90 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, NHCbz), 7.29-7.38 (m, 5H, Ar-CH), 7.79 (br.s, 1H, NHCH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 22.5 (CH<sub>3</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>NH), 54.0 (CH), 65.5 (Cbz-CH<sub>2</sub>), 127.7, 127.8, 128.3 (Ar-CH), 136.9 (Cq), 156.0, 169.9, 172.0 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3350 (m), 3060 (w), 2950 (w), 1720 (s), 1540 (s), 1225 (m), 1065 (m) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (ESI-neg.) berechnet:  $m/z = 279.09865$  (M<sup>-</sup> - H<sup>+</sup>),  
 gefunden:  $m/z = 279.09864$  (M<sup>-</sup> - H<sup>+</sup>).

*N*<sub>α</sub>-Fmoc-β-Acetylamino-L-alanin (**166**)

Durch eine Lösung aus Aminosäure **168** (8.01 g, 28.6 mmol, 1 eq) in Methanol (150 ml) mit Palladium/Kohle (801 mg) wurde für 7 h bei 35 °C Wasserstoff geleitet. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und der Filterkuchen mit einer Mischung aus 5%iger Salzsäure und Methanol (1/1, 100 ml) gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, und der gelbe Rückstand in Wasser gelöst und lyophilisiert. Es wurden 6.34 g Rohprodukt **171** erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Ein aufgenommenes <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigte die Vollständigkeit der Cbz-Entschützung.

In einer wässrigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (100 ml, 10 %) wurde die Aminosäure **171** (6.34 g Rohprodukt) gelöst und eine Lösung von Fmoc-Cl (8.14 g, 31.5 mmol, 1.1 eq) in Dioxan (100 ml) bei 0 °C langsam zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 100 ml). Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene gelbe Öl säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol = 9/1 + 0.1 % AcOH) gereinigt. Es wurde das Produkt **166** (3.45 g, 9.37 mmol, 33 %) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** 0.12 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/Hexan/MeOH = 4/4/1 mit 1 % AcOH);

**Smp.** 237 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.27-3.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.44-3.48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.04-4.09 (m, 1H, CH), 4.23-4.30 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 7.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-Ar-CH), 7.42 (m, 3H, Fmoc-

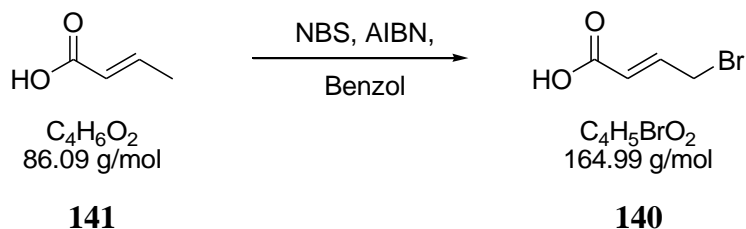
Ar-CH, Fmoc-NH), 7.72 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ar-CH), 7.90 (m, 3H, Fmoc-Ar-CH, CH<sub>2</sub>NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta = 22.5$  (CH<sub>3</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 46.6 (Fmoc-CH), 54.1 (CH), 65.7 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1, 125.2, 127.1, 127.6 (Fmoc-Aryl-CH), 140.7, 143.8 (Fmoc-Ar-Cq), 155.9, 169.7, 172.1 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu} = 3405$  (m), 2931 (w), 1700 (s), 1660 (s), 1545 (s), 1265 (m), 1035 (m) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z = 391.12644$  (M + Na<sup>+</sup>),  
gefunden:  $m/z = 391.12575$  (M + Na<sup>+</sup>).

## 7.2.4.2 Synthese der elektrophilen Bausteine für die peptidischen Inhibitoren

4-Bromcrotonsäure (**140**)

Zu einer Lösung von Crotonsäure **141** (20.0 g, 0.23 mol) in Benzol (260 ml) wurde N-Bromsuccinimid zugegeben und die Reaktionslösung unter Rückfluss erhitzt. In der Siedehitze wurde eine Lösung von N,N'-Azobisisobutyronitril (0.50 g, 3.70 mmol) in Benzol (6.6 ml) vorsichtig über den Rückflusskühler zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere 3 h erhitzt, über Nacht stehen gelassen, im Eisbad abgekühlt und das ausgefallene Succinimid abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde destillativ am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Tetrachlorkohlenstoff (30 ml) versetzt und für 1 d im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Produkt wurde schließlich abfiltriert, mit wenig kaltem Tetrachlorkohlenstoff gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt das gewünschte Produkt **140** (17.0 g, 103 mmol, 44 %) als hellgelber Feststoff.

**R<sub>f</sub>**                      0.72 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH = 10/0.3, mit 1 % Essigsäure);

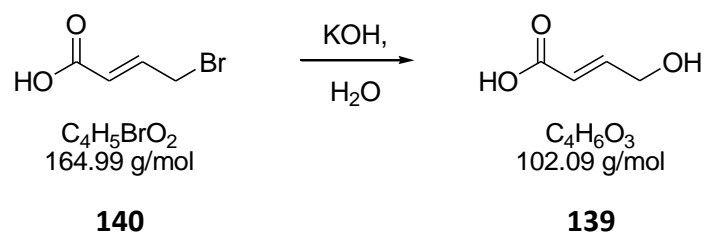
**Smp.**                      68-70 °C;

**<sup>1</sup>H-NMR**                      (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.03 (dd, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.05 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>), 7.12 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR**                      (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 28.8 (CH<sub>2</sub>), 123.9, 144.6 (Olefin-CH), 171.1 (C=O) ppm;

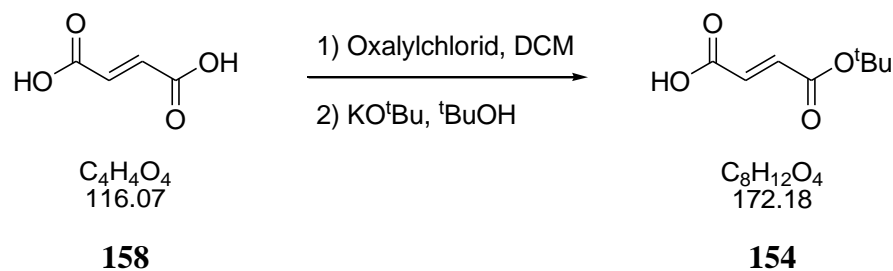
**IR**                      (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3064 (w), 2837 (w), 1703 (s), 1423 (m), 1295 (m), 1238 (m), 935 (m), 687 (m), 540 (m) cm<sup>-1</sup>;

**HR-MS**                      (ESI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 162.94002 (M<sup>-</sup> - H<sup>+</sup>),  
 gefunden:  $m/z$  = 162.94007 (M<sup>-</sup> - H<sup>+</sup>).

4-Hydroxycrotonsäure (**139**)

Zu einer kalten Lösung von 4-Bromcrotonsäure **140** (16.7 g, 101 mmol, 1 eq) in Wasser (167 ml) wurde eine wässrige 2 M KOH-Lösung (333 ml) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung 5 min unter Rückfluss erhitzt, anschließend im Eisbad abgekühlt und mit 10%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert (pH 4-5). Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockne abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Essigester, 1 % Essigsäure) gereinigt. Nach anschließendem Lyophilisieren aus Wasser konnte das Produkt **139** (1.61 g, 15.8 mmol, 16 %) als weißer Feststoff erhalten werden. Bei einigen Ansätzen reichte die Reinigung über Kieselgel nicht aus, noch verunreinigtes Produkt ließ sich in diesen Fällen gut an der MPLC (RP18-Säule, Wasser) reinigen.

<b>R<sub>f</sub></b>	0.42 (SiO <sub>2</sub> , EtOAc mit 0.1 % AcOH);
<b>Smp.</b>	103-104 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 4.12 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.05 (t, 1H, OH), 5.93 (dt, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 15.5 Hz, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 2.2 Hz, 1H, CH=CHCH <sub>2</sub> ), 6.89 (dt, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 15.5 Hz, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, CHCH <sub>2</sub> ), 12.15 (br.s, 1H, COOH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 60.1 (CH <sub>2</sub> ), 119.5, 148.9 (Olefin-CH), 167.1 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3250 (br), 2954 (w), 1675 (s), 1634 (s), 1444 (m), 1401 (m), 1286 (s), 1252 (s), 1085 (s), 1010 (m), 961 (s), 899 (s), 581 (m), 510 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-neg.) berechnet: $m/z$ = 101.02442 (M <sup>-</sup> - H <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 101.02433 (M <sup>-</sup> - H <sup>+</sup> ).

Fumarsäuremono-*tert*-butylester (**154**)

Zu einer Lösung von Fumarsäure **158** (20.0 g, 172 mmol, 1 eq) in einer Mischung aus Dichlormethan (100 ml) und DMF (5 ml) wurde eine Lösung von Oxalylchlorid (24.0 g, 189 mmol, 1.1 eq) in Dichlormethan (20 ml) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel destillativ im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in *tert*-Butanol gelöst (75 ml) und unter Eisbadkühlung Kalium-*tert*-butylat (21.2 g, 189 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Die Lösung wurde für 2 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester mit 0.1 % Essigsäure) gereinigt. Nach anschließendem Lyophilisieren aus Wasser konnte das Produkt **154** (3.40 g, 19.7 mmol, 12 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

<b>R<sub>f</sub></b>	0.30 (SiO <sub>2</sub> , Hexan/EtOAc = 1/1 mit 0.1 % AcOH);
<b>Smp.</b>	66 °C;
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 1.46 (s, 9H, 3 x CH <sub>3</sub> ), 6.59 (dd, <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> = 15.6 Hz, <sup>4</sup> J <sub>HH</sub> = 19.8 Hz, 2H, 2 x CH), 13.08 (br.s, 1H, COOH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 27.6 (3 x CH <sub>3</sub> ), 81.4 (C <sub>q</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 133.8, 134.3 (Olefin-CH), 163.7, 165.8 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 2985 (m), 1714 (s), 1472 (w), 1423 (w), 1370 (m), 1305 (m), 1272 (s), 1160 (s), cm <sup>-1</sup> ;
<b>HR-MS</b>	(ESI-pos.) berechnet: $m/z$ = 171.06628 (M <sup>-</sup> - H <sup>+</sup> ), gefunden: $m/z$ = 171.06623 (M <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> ).



## 7.3 Festphasensynthese

### 7.3.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

#### *Standard-Kupplungsbedingungen am MBHA- und am Sieberamid-Harz*

Für die beiden verwendeten Harze wurden die Peptidkupplungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Harz wurde für 1 h bei RT in DMF (10 ml) vorgequollen und anschließend abfiltriert. Die Fmoc- bzw. *tert*-Butylester-geschützte Aminosäure wurde beim MBHA- und beim Wang-Harz mit HCTU und beim Sieberamid-Harz mit PyBOP (jeweils 2.5 eq) als Kupplungsreagenz, NMM (300  $\mu$ l) als Base und DMF (10 ml) mit dem harzgebunden Carboxylat bzw. Amin für einige Stunden bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 x 10 ml für jeweils 10 min) gewaschen und Farb-Tests mit kleinen Proben des Harzes zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion durchgeführt. Bei Bedarf wurde der gesamte Kupplungsschritt unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

#### *Fmoc-Abspaltung an der festen Phase*

Das nach der Kupplung zuletzt mit DMF gewaschene Harz wurde mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF (2 x 10 ml für jeweils 30 min) umgesetzt. Anschließend erfolgte ein intensives Waschen mit DMF (6 x 10 ml für jeweils 5 bis 10 min), um die letzten Reste des Piperidins zu entfernen. Ein positiver Kaisertest bestätigte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und somit die Bildung der freien Aminfunktion.

#### *tert-Butylesterspaltungen an der festen Phase*

Das nach der Kupplung zuletzt mit DMF gewaschene Harz wurde zunächst mit Dichlormethan (3 x 10 ml für jeweils 5 bis 10 min) gewaschen. Zum Harz wurde eine Lösung von 25 % TFA in Dichlormethan (1 x 10 ml für 5 min) und anschließend eine Lösung von 50 % TFA in Dichlormethan (1 x 10 ml für 30 min) gegeben und jeweils bei RT geschüttelt. Die TFA wurde in einem intensiven Waschgang mit Dichlormethan (3 x 10 ml für jeweils 5 min) und mit DMF (3 x 10 ml für jeweils 10 min) entfernt. Ein positiver Malachitgrüntest bestätigte die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe und somit die Bildung der freien Carboxylatfunktion.

*Kaisertest zur Detektion festphasengebundener Aminfunktionen*

Es wurden Lösungen aus Ninhydrin (1.00 g) in Ethanol (10 ml) und Phenol (40.0 g) in Ethanol (10 ml) angesetzt. Einige Harzkügelchen des zu analysierenden Polymers wurden mit je 0.2 ml der beiden Lösungen versetzt und für 1 min auf ca. 100 °C erhitzt. Polymerkügelchen mit freien Aminfunktionen färbten sich dunkel, während Harz ohne freie Aminfunktionen farblos und durchsichtig blieb.

*Malachitgrüntest zur Detektion festphasengebundener Carboxylatfunktionen*

Es wurde eine Lösung aus Malachitgrünoxalat (250 mg) in Ethanol (100 ml) angesetzt. Einige Harzkügelchen des zu analysierenden Polymers wurden mit je 0.2 ml der Lösung und 3 Tropfen Triethylamin versetzt und für 2 min bei RT geschüttelt. Die tiefgrüne Lösung wurde abdekantiert und das Harz solange mit Ethanol nachgespült, bis die Waschlösung farblos war. Polymerkügelchen mit freien Carboxylatfunktionen färbten sich grün, während Harz bei Abwesenheit von Säurefunktionen farblos und durchsichtig blieb.

*PNBP-Test zur Detektion festphasengebundener Hydroxylgruppen*

Es wurden drei Reaktionslösungen hergestellt: Lösung 1: Tosylchlorid (59.0 mg) in Toluol (5 ml) und Pyridin (4 ml), Lösung 2: 4-para-Nitrobenzylpyridin (16.1 mg) in Toluol (1 ml) und Lösung 3: 10% Piperidin in Chloroform. Einige Harzkügelchen des zu analysierenden Polymers wurden in ein HPLC-Vial übertragen und mit Dichlormethan gewaschen. In zwei weiteren HPLC-Vials wurden eine positive Probe mit Wang-Harz und eine negative Probe mit MBHA-Harz vorbereitet. Beide Proben ließ man vor dem Test ausgiebig in Dichlormethan quellen und wusch sie anschließend. Beim Waschen des Harzes, Quellen oder bei Zugabe der Reagenzien wurde immer so vorgegangen, dass das HPLC-Vial zugeschraubt und durch Schütteln versucht wurde, die Harzkügelchen auf der Glasfläche zu verteilen. Die überstehende Lösung konnte jeweils mit einer Spritze entfernt werden. Die Harzproben wurden mit 2-3 Tropfen der Lösung 1 und mit 2-3 Tropfen der Lösung 2 versetzt. Anschließend wurde das HPLC-Vial vorsichtig erwärmt bis alle Flüssigkeit verdampft war und alle Harzkügelchen trocken und farblos waren. Während des Erhitzens war eine leichte Gelb-

oder Orangefärbung der Lösung und des Harzes zu beobachten. Dann wurden 2-3 Tropfen der Lösung zugegeben und es wurde mit Dichlormethan gewaschen. Bei einem positiven Test färbten sich die Harzkügelchen violett, war er negativ, blieben sie farblos. Wurde das Harz vorher zu heiß beim Erhitzen, färbten sich die Kügelchen schwarz.

#### *Abspaltung der Peptide vom MBHA-Harz*

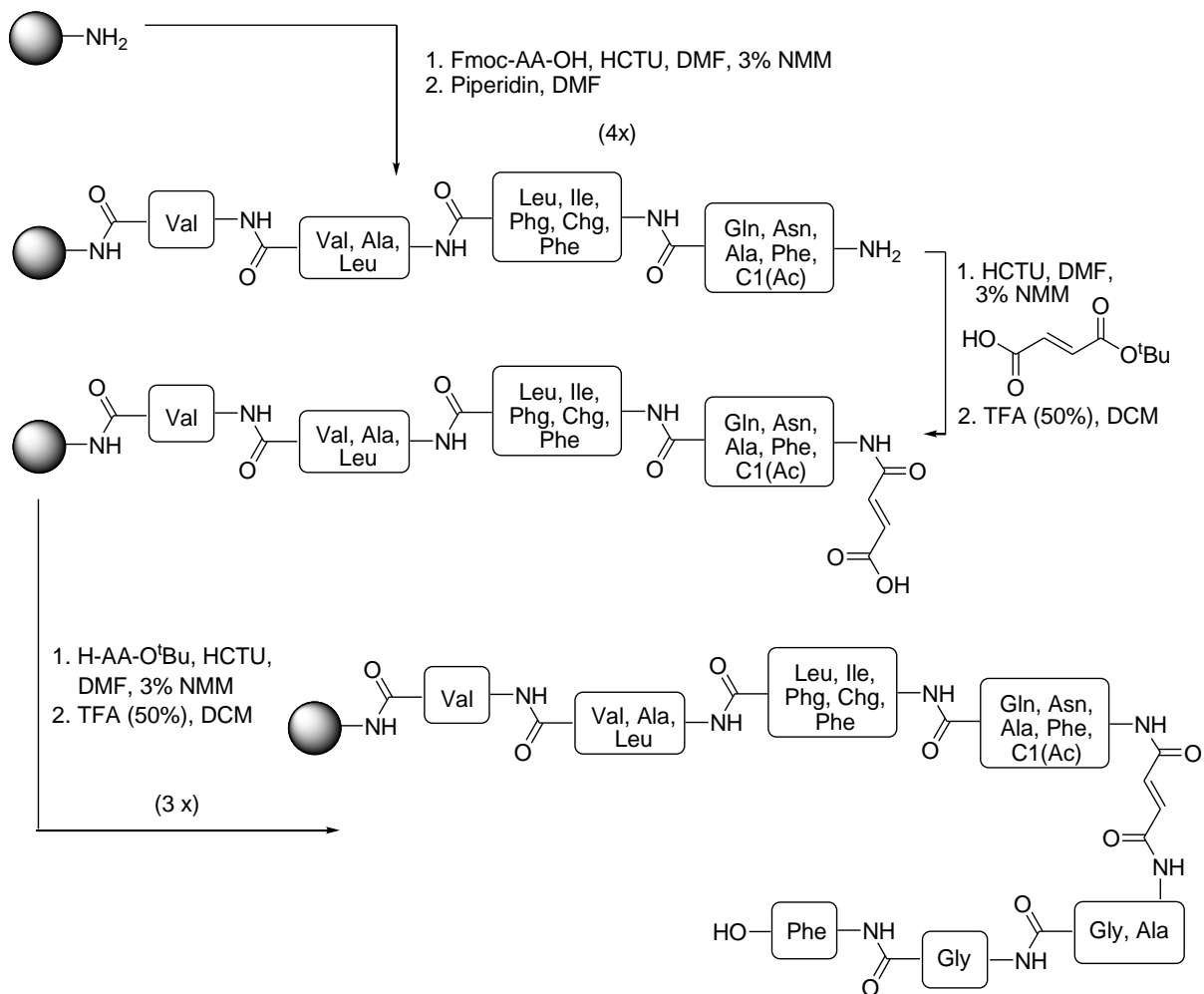
Vor dem Abspalten der Produkte vom polymeren Träger erfolgte ein sorgfältiges Waschen des Harzes: das zuletzt mit DMF gewaschene Harz wurde mit Dichlormethan (3 x 10 ml für jeweils 10 min), Methanol (3 x 10 ml für jeweils 10 min), Diethylether (2 x 10 ml für jeweils 10 min) und erneut mit Dichlormethan (3 x 10 ml für jeweils 10 min) gewaschen. Anschließend wurde das Harz im Membranpumpenvakuum getrocknet und für 3 h mit einer 10%igen Lösung von Trifluormethansulfonsäure in Trifluoressigsäure (10 ml) bei RT geschüttelt. Die Abspalllösung wurde abgesaugt, das Harz noch mit Trifluoressigsäure (2 x 5 ml) gewaschen und das Filtrat im Ölpumpenvakuum maximal eingeeengt. Der erhaltene gelbe ölige Rückstand wurde nun mit 0.1 M Salzsäure (20 ml) versetzt, wobei sich ein weißer Feststoff bildete. Dieser wurde abgesaugt und mit 0.1 M Salzsäure (2 x 5 ml) gewaschen, mit Wasser versetzt und an der Lyophile getrocknet. Der weiße Feststoff wurde zur Erhöhung der Löslichkeit umgesalzt und somit erneut mit Wasser versetzt, und zu der Suspension ca. 20% der Masse der Carbonsäure Triethylamin gegeben. Dabei löste sich der Feststoff und konnte erneut an der Lyophile getrocknet werden. Die Produkte konnten so als weiße, voluminöse Feststoffe erhalten werden.

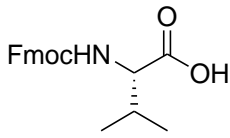
#### *Abspaltung der Peptide vom Sieberamid-Harz*

Vor dem Abspalten der Produkte vom polymeren Träger erfolgte ein sorgfältiges Waschen des Harzes: das zuletzt mit DMF gewaschene Harz wurde mit Dichlormethan (3 x 5 ml für jeweils 10 min), Methanol (3 x 5 ml für jeweils 10 min), Diethylether (2 x 5 ml für jeweils 10 min) und erneut mit Dichlormethan (3 x 5 ml für jeweils 10 min) gewaschen. Anschließend wurde das Harz im Membranpumpenvakuum getrocknet und für 2 min mit einer 1%igen Lösung von Trifluoressigsäure (5 ml) in Dichlormethan bei RT geschüttelt, und die Abspalllösung mit Argon durch eine Fritte in eine 10%ige Lösung von Pyridin in Methanol

(10 ml) gepresst und somit vom Harz abgetrennt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 10mal wiederholt und anschließend das Lösungsmittel abdestilliert. Der klebrige Rückstand wurde mit Wasser (25 ml) versetzt, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und der ausgefallene weiße Feststoff abfiltriert. Dieser wurde erneut mit Wasser versetzt und an der Lyophile getrocknet und gegebenenfalls säulenchromatographisch gereinigt.

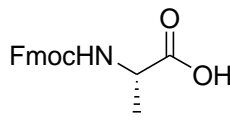
### 7.3.2 Synthese der Inhibitor-Bibliothek und der Testinhibitoren an PEGA-Harz





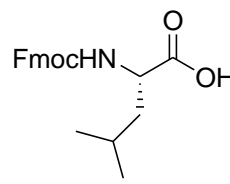
**143**

Fmoc-Val-OH



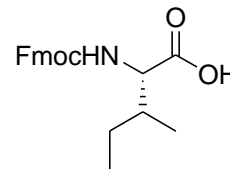
**104**

Fmoc-Ala-OH



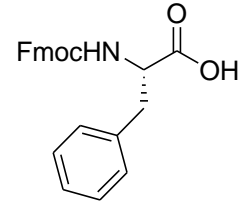
**144**

Fmoc-Leu-OH



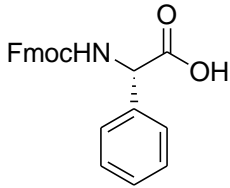
**162**

Fmoc-Ile-OH



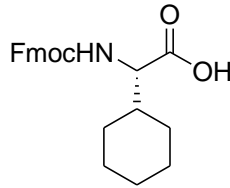
**137**

Fmoc-Phe-OH



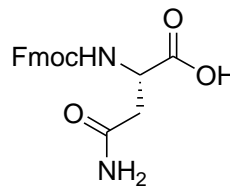
**163**

Fmoc-Phg-OH



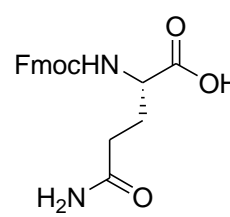
**164**

Fmoc-Chg-OH



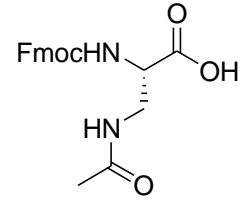
**165**

Fmoc-Asn-OH



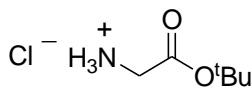
**145**

Fmoc-Gln-OH



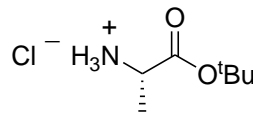
**166**

Fmoc-C1(Ac)-OH



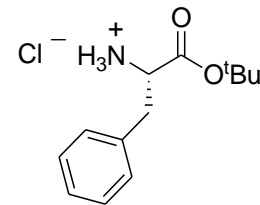
**150**

H-Gly-O<sup>t</sup>Bu



**151**

H-Ala-O<sup>t</sup>Bu



**152**

H-Phe-O<sup>t</sup>Bu

Um das PEGA-Harz auf die 150 *MikroKans* gleichmäßig verteilen zu können, wurde eine Mischung aus Dichlormethan und Hexan (8/1) hergestellt und das PEGA-Harz (30 g, vorgequollen vom Hersteller erhalten, entspricht ca. 5 g) 30 min in dieser Mischung (31 ml) geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Harz im Membranpumpenvakuum getrocknet, so dass man getrocknetes PEGA-Harz (4.50 g, 1.80 mmol bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes von 0.40 mmol/g) erhielt, das sehr klebrig an der Glaswand haftete. Nun wurde wieder von der Dichlormethan/Hexan-Mischung (124 ml) dazugegeben, und pro *MikroKan* 800 µl dieser isopyknotischen Suspension pipettiert (entspricht 30.0 mg pro *MikroKan*). Alle 150 Gefäße wurden mit einem Accu-Tag Radiofrequenzchip versehen, verschlossen, gemäß der *IRORI Accu Tag Synthesis*-Software eingescannt und auf zwei Gefäße verteilt. Die *MikroKans* wurden mit DMF (pro Gefäß 80 ml) bedeckt und unter Schütteln für 3 h quellen gelassen.

Das Lösungsmittel wurde durch frisches DMF ersetzt und NMM dazugegeben. In beide Gefäße wurden HCTU und Fmoc-Val-OH (**143**, jeweils 916 mg, 2.70 mmol, 3 eq) gegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit DMF (jeweils 2 x 80 ml) wurde der Kupplungsschritt unter den gleichen Bedingungen über Nacht wiederholt und erneut mit DMF (jeweils 3 x 80 ml) gewaschen. Nach den ersten fünf Kupplungsschritten wurden zwei *MikroKans* geöffnet und eine kleine Harzprobe entnommen, um einen Kaisertest durchzuführen. Ein negativer Farbttest zeigte jeweils die vollständige Umsetzung an. Anschließend wurden die *MikroKans* gemäß der *IRORI Accu Tag Synthesis*-Software eingescannt und auf drei Gefäße verteilt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF (2 x 60 ml für jeweils 30 min) umgesetzt. Anschließend erfolgte ein intensiver Waschgang mit DMF (4 x 50 ml für jeweils 15 bis 30 min), um die letzten Reste des Piperidins zu entfernen. Für die folgenden Ein positiver Kaisertest bestätigte die Bildung der freien Aminfunktion.

Für die nächsten drei Kupplungsschritte wurde analog vorgegangen, die jeweilige Gefäßanzahl und die Ansatzgrößen sind in **Tab. 7.1** aufgeführt. Von der jeweiligen Aminosäure wurden in allen Fällen gleich viele Äquivalente wie von HCTU eingesetzt. Für die nachfolgenden Reaktionsschritte wurden alle 30 Bibliotheksmitglieder, die die künstliche C1(Ac)-Aminosäure **166** enthielten, getrennt von den übrigen Inhibitoren behandelt, d.h. jeweils in separaten Reaktionsgefäßen weiter umgesetzt. Es wurde bei diesen Verbindungen nach den folgenden Kupplungen zusätzlich ein Kaisertest durchgeführt, um mit einem negativen Test zu belegen, dass die Acetylgruppe in der Seitenkette der Aminosäure nicht abgespalten wurde.

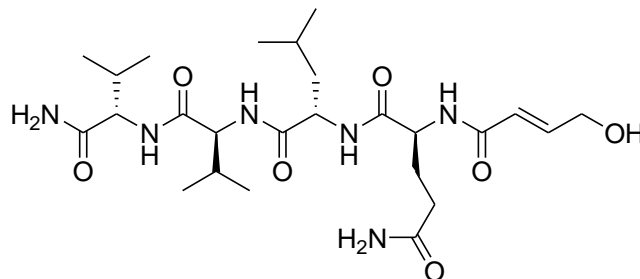
Für die nachfolgenden Reaktionsschritte wurden zur Bestätigung der jeweiligen Reaktionen Malachitgrüntests zur Detektion freier Carboxylatfunktionen durchgeführt. Als nächstes wurde der Fumarsäurebaustein **154** nach analogen Bedingungen an die Festphase gekuppelt. Die *tert*-Butylester-Abspaltung wurde durch Schütteln mit einer 25%igen Lösung von TFA in Dichlormethan (für 1 h) und mit einer 50%igen Lösung von TFA in Dichlormethan (2 h) erreicht. Darauf folgte ein intensiver Waschgang mit Dichlormethan (3 x), DMF (1 x), Dichlormethan (2 x) und DMF (2 x). Für die letzten drei Kupplungen der Aminosäure-*tert*-butylester wurden die gleichen Kupplungs- und Abspaltbedingungen verwendet.

Kupplungsschritt	Gefäßanzahl	DMF	NMM	HCTU
1	2	80 ml	2.5 ml	1.12 g (2.70 mmol)
2	3	50 ml	1.5 ml	745 mg (1.80 mmol)
3	5	30 ml	1.0 ml	447 mg (1.08 mmol)
4	5	30 ml	1.0 ml	447 mg (1.08 mmol)
5	3	80 ml	2.5 ml	894 mg (2.16 mmol)
		30 ml	1.0 ml	447 mg (1.08 mmol)
6	4	80 ml	2.5 ml	894 mg (2.16 mmol)
		20 ml	0.6 ml	223 mg (1.08 mmol)
7	3	80 ml	2.5 ml	894 mg (2.16 mmol)
		30 ml	1.0 ml	447 mg (1.08 mmol)
8	3	80 ml	2.5 ml	894 mg (2.16 mmol)
		30 ml	1.0 ml	447 mg (1.08 mmol)

**Tab. 7.1** Ansatzgrößen bei den Kupplungsschritten bei der Synthese der kombinatorischen Bibliothek

Ein intensiver Waschgang mit den aufgeführten Lösungsmittelmengen beschloss die Synthese der Inhibitorbibliothek: Dichlormethan (3 x 60 ml bzw. 3 x 30 ml), DMF (60 ml bzw. 30 ml), Dichlormethan (2 x 60 ml bzw. 2 x 30 ml), Methanol (3 x 60 ml bzw. 3 x 30 ml), Dichlormethan (3 x 60 ml bzw. 3 x 30 ml). Alle 150 Mitglieder der Bibliothek wurden im Ölpumpenvakuum bei RT getrocknet.

## 7.3.3 Synthese des peptidischen Inhibitors an Sieberamid-Harz

*NH<sub>2</sub>-Val-Val-Leu-Gln-HyCr (147)*

$C_{25}H_{44}N_6O_7$   
540.65 g/mol

**147**

Die Anbringung der ersten vier Aminosäuren erfolgte unter oben erwähnten Standard-Kupplungsbedingungen auf Sieberamid-Harz (300 mg, 180  $\mu$ mol bei einer Beladung von 0.6 mmol/g, 1 eq) und jeweiliger Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift (Kapitel 7.3.1). Die Kupplung des Hydroxycrotonsäurebausteins **139** wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt, jedoch mit nur 1.25 eq an **139** und PyBOP statt HCTU. Diese Reaktionsschritte wurden alle per Kaisertest und die Kupplung von **139** zusätzlich durch einen positiven PNBP-Test bestätigt. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift für das Sieberamid-Harz (Kapitel 7.3.1) und das gewünschte Produkt **147** wurde per MPLC (RP-18 Kieselgel, Rampe von Wasser zu Methanol) gereinigt. Da die Verbindung nur sehr schwach UV-aktiv ist, musste die Detektion bei 220nm erfolgen. Nach mehrmaligen Lyophilisieren nach Wasserzugabe wurde ein weißer Feststoff erhalten (40.8 mg, 75.5  $\mu$ mol, 42 %).

**Smp.** 256°C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.83 (m, 18H, 4 x Val-CH<sub>3</sub>, 2 x Leu-CH<sub>3</sub>), 1.22 (m, 1H, Leu-CH), 1.45 (m, 2H, Leu-CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 1H, Gln-CH<sub>2</sub>), 1.72 (m, 1H, Gln-CH<sub>2</sub>), 1.93-2.08 (m, 5H, Gln-CH<sub>2</sub>, OH, 2 x Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.05-4.35 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-OH, 4 x  $\alpha$ -NH-CH), 6.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15.4 Hz, 1H, HyCr-CH), 6.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15.4 Hz, 1H, HyCr-CH), 6.74 (br.s, 1H, Amid-NH<sub>2</sub>),



7.00 (br.s, 1H, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.25 (br.s, 2H, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.64 (br.d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, α-NH), 7.79 (br.d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, α-NH), 8.00 (br.d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, α-NH), 8.17 (br.d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, α-NH) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 17.9, 18.2, 19.2 (Val-CH<sub>3</sub>), 21.7, 23.0 (Leu-CH<sub>3</sub>), 24.1 (Leu-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.9 (Gln-CH<sub>2</sub>), 30.2, 30.4 (Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31.5 (Gln-CH<sub>2</sub>), 40.7 (Leu-CH<sub>2</sub>), 51.2 (Leu-α-CH), 52.3 (Gln-α-CH), 57.2, 57.9 (Val-α-CH), 60.2 (CH<sub>2</sub>OH), 122.1, 143.3 (HyCr-CH), 165.9, 170.7, 171.3, 171.9, 172.7, 173.8 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3421 (br), 3284 (m), 2966 (w), 1637 (s), 1545 (m), 1409 (w), 1173 (w), 1021 (w) cm<sup>-1</sup>;

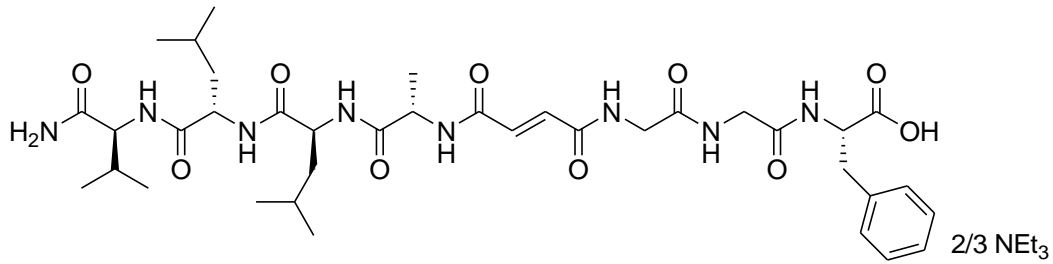
**HR-MS** (ESI-pos.) berechnet:  $m/z$  = 563.31637 (M + Na<sup>+</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 563.31658 (M + Na<sup>+</sup>).

### 7.3.4 Synthese der peptidischen Inhibitoren an MBHA-Harz

Der Aufbau der folgenden peptidischen Inhibitoren erfolgte nach der gleichen Synthesestrategie wie die der Bibliothek. Die ersten vier Aminosäuren wurden unter Standard-Kupplungsbedingungen auf MBHA-Harz (300 mg, 390 μmol bei einer Beladung von 1.3 mmol/g, 1 eq) mit jeweiliger Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift durchgeführt (Kapitel 7.3.1). Die Umsetzungen wurden jeweils mit negativen bzw. positiven Kaisertests verfolgt. Die Kupplung des Fumarsäurebausteins **154** (2.5 eq) wurde ebenfalls mit HCTU (2.5 eq) und NMM durchgeführt. Die Umsetzung wurde mit einem negativen Kaisertest bestätigt und anschließend nach dem Standardprotokoll die *tert*-Butylesterfunktion gespalten. Ab nun wurde der Malachitgrüntest zur Bestätigung der nachfolgenden Umsetzungen durchgeführt. Die Anbringung der letzten drei Aminosäure-*tert*-butylester wurde ebenfalls unter Standard-Bedingungen erreicht. Die peptidischen Inhibitoren konnten nun der allgemeinen Vorschrift (Kapitel 7.3.1) vom polymeren Träger abgespalten und aufgearbeitet werden. Die Umsalzen zu den entsprechenden Triethylammoniumsalzen verlief in vielen Fällen nicht vollständig. Der Anteil an Triethylamin wurde durch die Integrale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestimmt und angegeben. Bei einigen

Fällen war das Integral zu groß, was durch die Bildung von Triethylammoniumchlorid erklärt werden kann. Auch hier wurde bei den entsprechenden Verbindungen der jeweilige Salzanteil angegeben.

$\text{NH}_2\text{-Val}\leftarrow\text{Leu}\leftarrow\text{Leu}\leftarrow\text{Ala}\leftarrow\text{Fum-Gly-Gly-Phe-OH } 2/3\text{NEt}_3$  (**173**)



$\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{10}$  (mit  $2/3 \text{ C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ )  
840.35 g/mol

**173**

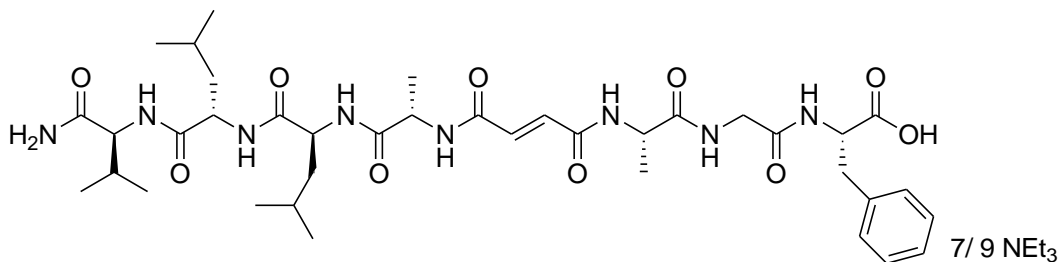
- Ausbeute** 161 mg (191  $\mu\text{mol}$ , 49 %);
- R<sub>f</sub>** 0.43 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);
- Smp.** 244 °C Zersetzung;
- <sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.81-0.87 (m, 18H, 2 x Val-CH<sub>3</sub>, 4 x Leu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, 6H, 3 x Triethylammonium-CH<sub>3</sub>), 1.19 (m, 3H, Ala-CH<sub>3</sub>), 1.45-1.57 (m, 6H, 2 x Leu-CH, 2 x Leu-CH<sub>2</sub>), 1.93 (m, 1H, Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84 (m, 5H, Phe-CH<sub>2</sub>, 3 x Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 3.11 (m, 1H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.73-3.82 (m, 1H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.08 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.28-4.41 (m, 4H, 4 x  $\alpha$ -NH-CH), 6.82-6.92 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.06 (br.s, 2H, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.16-7.33 (m, 5H, 5 x Phe-CH), 7.51 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.89-8.00 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.09 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.55 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.61 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.71 (m, 1H,  $\alpha$ -NH) ppm;
- <sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 9.5 (Triethylammonium-CH<sub>3</sub>), 17.8, 18.0 (Val-CH<sub>3</sub>), 19.3 (Ala-CH<sub>3</sub>), 21.5, 21.8, 23.0, 23.2 (Leu-CH<sub>3</sub>), 24.1, 24.2 (Leu-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.6 (Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 37.2 (Phe-CH<sub>2</sub>), 40.4, 40.6 (Leu-CH<sub>2</sub>), 41.2, 42.1 (Gly-CH<sub>2</sub>), 45.3 (Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 48.5 (Ala- $\alpha$ -CH),

51.07, 51.10 (Leu- $\alpha$ -CH), 54.6 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.2 (Val- $\alpha$ -CH), 126.2, 128.1, 129.1 (Phe-Phenyl-CH), 132.6, 132.9 (Fum-CH), 138.2 (Phe-Phenyl-C<sub>q</sub>), 163.3, 163.5, 163.9, 167.9, 171.6, 171.8, 171.9, 172.7, 173.2 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3398 (br), 3290 (br), 3176 (w), 2968 (s), 2931 (m), 2879 (m), 1630 (s), 1542 (s), 1472 (w), 1466 (w), 1394 (m), 1376 (w), 1349 (w), 1288 (w), 1269 (w), 1099 (w), 1068 (w), 1033 (w), 999 (w), 702 (w), 640 (w) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 771.400 (M<sup>-</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 771.432 (M<sup>-</sup>).

*NH<sub>2</sub>-Val←Leu←Leu←Ala←Fum-Ala-Gly-Phe-OH* 7/9 NEt<sub>3</sub> (**174**)



C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub> (mit 7/ 9 NEt<sub>3</sub>)  
865.61 g/mol

**174**

**Ausbeute** 287 mg (332  $\mu$ mol, 85 %);

**R<sub>f</sub>** 0.42 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 228 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.80-0.87 (m, 18H, 2 x Val-CH<sub>3</sub>, 4 x Leu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (t, 7H, 3 x Triethylammonium-CH<sub>3</sub>), 1.19 (m, 6H, Ala-CH<sub>3</sub>), 1.44-1.57 (m, 6H, 2 x Leu-CH, 2 x Leu-CH<sub>2</sub>), 1.93 (m, 1H, Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.84 (m, 6H, Phe-CH<sub>2</sub>, 3 x Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 3.05 (m, 1H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.63-3.67 (m, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.08 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.22-4.38 (m, 4H, 4 x  $\alpha$ -NH-CH), 6.84-6.91 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.05 (br.s, 2H, Amid-

$NH_2$ ), 7.15-7.34 (m, 5H, 5 x Phe-CH), 7.52 (m, 2H, 2 x  $\alpha-NH$ ), 7.77 (m, 1H,  $\alpha-NH$ ), 8.01 (br.d, 1H,  $\alpha-NH$ ), 8.10 (br.d, 1H,  $\alpha-NH$ ), 8.64 (m, 2H, 2 x  $\alpha-NH$ ) ppm;

**$^{13}C$ -NMR**

(150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.5 (Triethylammonium- $CH_3$ ), 17.8, 18.0 (Val- $CH_3$ ), 18.1, 19.3 (Ala- $CH_3$ ), 21.5, 21.8, 23.0, 23.2 (Leu- $CH_3$ ), 24.1, 24.2 (Leu- $CH(CH_3)_2$ ), 30.7 (Val- $CH(CH_3)_2$ ), 36.8 (Phe- $CH_2$ ), 40.4, 40.6 (Leu- $CH_2$ ), 41.9 (Gly- $CH_2$ ), 45.3 (Triethylammonium- $CH_2$ ), 48.41, 48.45 (Ala- $\alpha$ -CH), 51.06, 51.09 (Leu- $\alpha$ -CH), 54.15 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.2 (Val- $\alpha$ -CH), 126.1, 127.9, 129.4 (Phe-Phenyl-CH), 132.6, 132.9 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl- $C_q$ ), 163.3, 163.4, 171.3, 171.6, 171.8, 171.9, 172.2, 172.7, 173.0 (C=O) ppm;

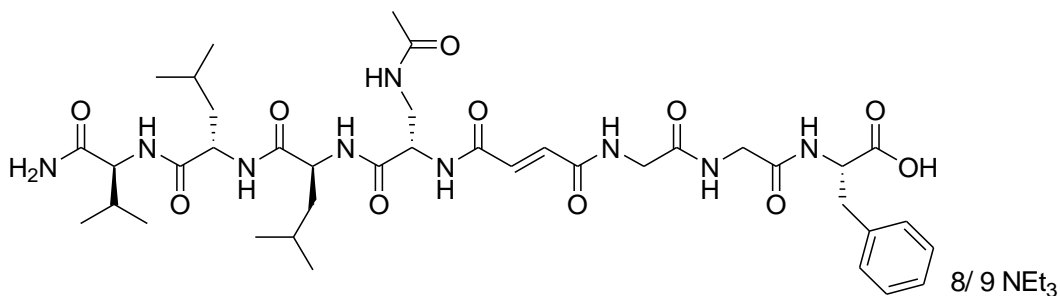
**IR**

(KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3396 (br), 3290 (br), 3074 (w), 2971 (s), 2938 (m), 2882 (w), 1628 (s), 1533 (s), 1472 (w), 1466 (m), 1390 (m), 1371 (w), 1342 (w), 1288 (w), 1256 (w), 1197 (w), 1170 (w), 1028 (m), 999 (w), 701 (m), 636 (w), 601 (w)  $cm^{-1}$ ;

**MS**

(MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 785.420 ( $M^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 785.421 ( $M^-$ ).

$NH_2$ -Val $\leftarrow$ Leu $\leftarrow$ Leu $\leftarrow$ C1(Ac) $\leftarrow$ Fum-Gly-Gly-Phe-OH 8/9  $NEt_3$  (**175**)



$C_{39}H_{59}N_9O_{11}$  (mit 8/9  $C_6H_{15}N$ )  
919.89 g/mol

**175**

**Ausbeute**

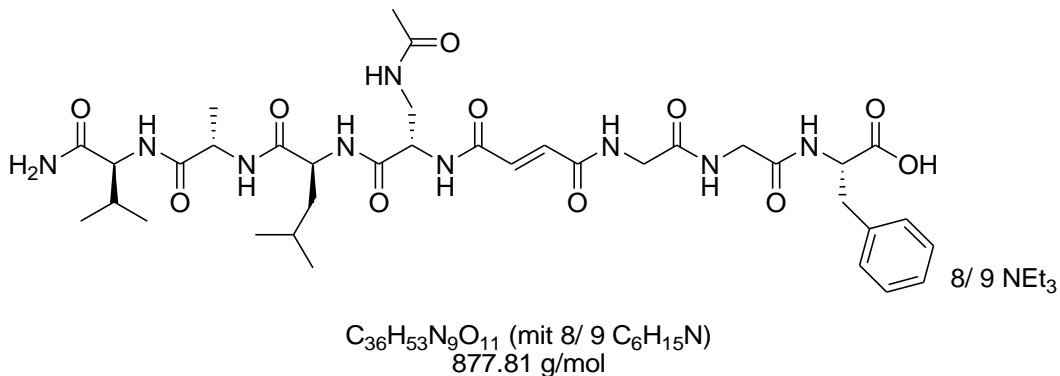
190 mg (207  $\mu$ mol, 53 %);

**$R_f$**

0.40 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $NEt_3$ );

<b>Smp.</b>	231 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 0.80-0.87 (m, 18H, 2 x Val-CH <sub>3</sub> , 4 x Leu-CH <sub>3</sub> ), 1.12 (t, 8H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 1.45-1.60 (m, 6H, 2 x Leu-CH, 2 x Leu-CH <sub>2</sub> ), 1.79 (m, 3H, Acetyl-CH <sub>3</sub> ), 1.93 (m, 1H, Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.84-2.95 (m, 6H, Phe-CH <sub>2</sub> , 3 x Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 3.02-3.07 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.25-3.37 (m, 2H, C1(Ac)-CH <sub>2</sub> ), 3.61-3.64 (m, 1H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 4.06-4.09 (m, 1H, α-NH-CH), 4.24-4.46 (m, 4H, 4 x α-NH-CH), 6.82-6.94 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.05 (br.s, 2H, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.16-7.32 (m, 5H, 5 x Phe-CH), 7.53 (br.d, 1H, α-NH), 7.87 (br.d, 1H, α-NH), 8.00 (m, 1H, α-NH), 8.09 (br.d, 1H, α-NH), 8.15 (br.d, 1H, α-NH), 8.59 (br.d, 1H, α-NH), 8.63 (br.d, 1H, α-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 9.1 (Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 17.8, 19.3 (Val-CH <sub>3</sub> ), 21.5, 21.6, 22.7 (Leu-CH <sub>3</sub> ), 23.11 (Acetyl-CH <sub>3</sub> ), 23.15 (Leu-CH <sub>3</sub> ), 24.1, 24.2 (Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 30.6 (Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 37.0 (Phe-CH <sub>2</sub> ), 40.2 (C1(Ac)-CH <sub>2</sub> ), 40.4, 40.5 (Leu-CH <sub>2</sub> ), 41.3, 42.0 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 45.5 (Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 51.2, 51.4 (Leu-α-CH), 52.9 (C1(Ac)-α-CH), 54.4 (Phe-α-CH), 57.3 (Val-α-CH), 126.3, 128.1, 129.1 (Phe-Phenyl-CH), 132.7, 132.8 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl-C <sub>q</sub> ), 163.4, 163.8, 169.70, 169.74, 169.8, 171.6, 172.2, 172.7, 173.06, 173.11 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3395 (br), 3291 (br), 3080 (m), 2972 (s), 2926 (m), 2876 (s), 1623 (s), 1548 (s), 1477 (m), 1448 (m), 1478 (m), 1448 (w), 1391 (s), 1367 (m), 1322 (s), 1198 (w), 1170 (m), 1079 (w), 1023 (s), 999 (m), 701 (s), 632 (s), 599 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(MALDI-neg.) berechnet: $m/z$ = 828.430 (M <sup>-</sup> ), gefunden: $m/z$ = 828.408 (M <sup>-</sup> ).

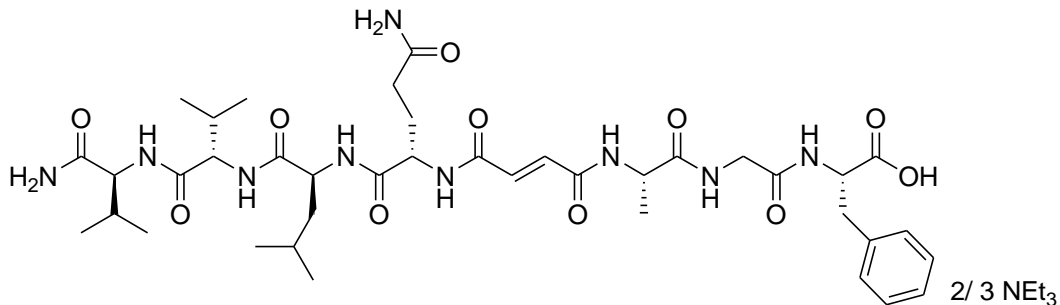
$NH_2$ -Val←Ala←Leu←C1(Ac)←Fum-Gly-Gly-Phe-OH 8/9  $NEt_3$  (**176**)

**176**

- Ausbeute** 277 mg (316  $\mu$ mol, 81 %);
- R<sub>f</sub>** 0.72 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $NEt_3$ );
- Smp.** 239 °C (Zersetzung);
- <sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 0.80-0.86 (m, 12H, 2 x Val- $CH_3$ , 2 x Leu- $CH_3$ ), 1.07-1.21 (m, 11H, 3 x Triethylammonium- $CH_3$ , Ala- $CH_3$ ), 1.45 (m, 2H, Leu- $CH_2$ ), 1.61 (m, 1H, Leu- $CH$ ), 1.79 (m, 3H, Acetyl- $CH_3$ ), 1.93 (m, 1H, Val- $CH(CH_3)_2$ ), 2.72-2.86 (m, 6H, Phe- $CH_2$ , 3 x Triethylammonium- $CH_2$ ), 3.11-3.13 (m, 2H, Phe- $CH_2$ ), 3.26-3.33 (m, 2H, C1(Ac)- $CH_2$ ), 3.72-3.82 (m, 1H, Gly- $CH_2$ ), 4.08 (m, 1H,  $\alpha$ -NH- $CH$ ), 4.28-4.41 (m, 4H, 4 x  $\alpha$ -NH- $CH$ ), 6.81-6.91 (m, 2H, 2 x Fum- $CH$ ), 7.05 (br.s, 2H, Amid- $NH_2$ ), 7.17-7.35 (m, 5H, 5 x Phe- $CH$ ), 7.55 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.89 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.13 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.57-8.71 (m, 3H, 2 x  $\alpha$ -NH) ppm;
- <sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.6 (Triethylammonium- $CH_3$ ), 17.6, 17.8 (Val- $CH_3$ ), 19.3 (Ala- $CH_3$ ), 21.4 (Leu- $CH_3$ ), 22.6 (Acetyl- $CH_3$ ), 23.2 (Leu- $CH_3$ ), 24.1 (Leu- $CH(CH_3)_2$ ), 30.6 (Val- $CH(CH_3)_2$ ), 37.2 (Phe- $CH_2$ ), 40.1 (C1(Ac)- $CH_2$ ), 40.3, 40.5 (Leu- $CH_2$ ), 41.9, 42.1 (Gly- $CH_2$ ), 45.3 (Triethylammonium- $CH_2$ ), 48.3 (Ala- $\alpha$ - $CH$ ), 51.2 (Leu- $\alpha$ - $CH$ ), 53.0 (C1(Ac)- $\alpha$ - $CH$ ), 54.6 (Phe- $\alpha$ - $CH$ ), 57.3 (Val- $\alpha$ - $CH$ ), 126.2, 128.1, 129.1 (Phe-Phenyl- $CH$ ), 132.6, 133.0 (Fum- $CH$ ), 138.3 (Phe-Phenyl- $C_q$ ), 163.2, 163.8, 167.9, 169.69, 169.73, 171.9, 172.1, 172.8, 173.1, 173.2 (C=O) ppm;

- IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3395 (br), 3290 (br), 3081 (s), 3023 (m), 2969 (m), 2935 (m), 2878 (w), 1618 (s), 1546 (s), 1476 (w), 1451 (w), 1494 (m), 1477 (m), 1443 (m), 1392 (m), 1365 (w), 1297 (w), 1258 (m), 1170 (w), 1125 (m), 1098 (w), 702 (m), 646 (m), 600 (m)  $\text{cm}^{-1}$ ;
- MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 786.380 ( $\text{M}^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 786.366 ( $\text{M}^-$ ).

$\text{NH}_2\text{-Val}\leftarrow\text{Val}\leftarrow\text{Leu}\leftarrow\text{Gln}\leftarrow\text{Fum-Ala-Gly-Phe-OH}$  2/3  $\text{NEt}_3$  (**148**)



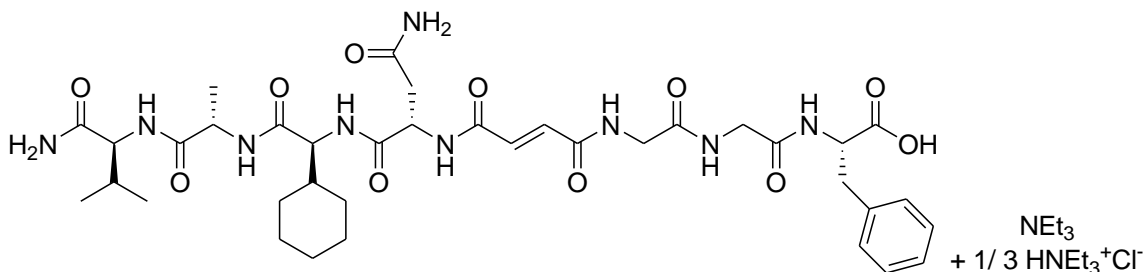
$\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{11}$  (mit 2/3  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ )  
897.40 g/mol

**148**

- Ausbeute** 311 mg (347  $\mu\text{mol}$ , 89 %);
- R<sub>f</sub>** 0.34 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $\text{NEt}_3$ );
- Smp.** 240 °C (Zersetzung);
- <sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 0.81-0.87 (m, 18H, 4 x Val- $\text{CH}_3$ , 2 x Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.12 (br.s, 6H, 3 x Triethylammonium- $\text{CH}_3$ ), 1.22 (m, 3H, Ala- $\text{CH}_3$ ), 1.45 (m, 2H, Leu- $\text{CH}_2$ ), 1.58 (m, 1H, Leu- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.71-1.93 (m, 4H, 2 x Gln- $\text{CH}_2$ ), 2.09 (m, 2H, 2 x Val- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.75 (m, 4H, 3 x Triethylammonium- $\text{CH}_2$ ), 2.90 (m, 1H, Phe- $\text{CH}_2$ ), 3.04 (m, 1H, Phe- $\text{CH}_2$ ), 3.62-3.67 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.07 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.17-4.33 (m, 5H, 5 x  $\alpha$ -NH-CH), 6.78 (br.s, 1H, Amid- $\text{NH}_2$ ), 6.91 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.03 (br.s, 2H, Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.17-7.30 (m, 6H, Amid- $\text{NH}_2$ , 5 x Phe-CH), 7.71 (br.s, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.84 (br.d, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.13-8.23 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.64-8.66 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH) ppm;

<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 10.0 (Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 17.9, 18.01, 18.04, 18.3 (Val-CH <sub>3</sub> ), 19.2, 19.3 (Leu-CH <sub>3</sub> ), 21.7 (Ala-CH <sub>3</sub> ), 23.1, 24.1 (Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 28.0 (Gln-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> ), 30.3, 30.4 (Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 31.5 (Gln-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> ), 37.1 (Phe-CH <sub>2</sub> ), 40.7 (Leu-CH <sub>2</sub> ), 41.9 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 45.5 (Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 48.5 (Ala-α-CH), 51.2 (Leu-α-CH), 52.4 (Gln-α-CH), 54.1 (Phe-α-CH), 57.5, 57.9 (Val-α-CH), 126.2, 128.0, 129.3 (Phe-Phenyl-CH), 132.7, 132.8 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl-C <sub>q</sub> ), 163.3, 163.6, 168.2, 170.8, 170.9, 171.9, 172.2, 172.7, 172.9, 173.6 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3435 (br), 3281 (m), 3076 (w), 2952 (w), 1636 (s), 1545 (m), 1393 (w), 717 (w) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(MALDI-neg.) berechnet: $m/z$ = 828.426 (M <sup>-</sup> ), gefunden: $m/z$ = 828.751 (M <sup>-</sup> ).

NH<sub>2</sub>-Val←Ala←Chg←Asn←Fum-Gly-Gly-Phe-O<sup>-</sup> HNEt<sub>3</sub><sup>+</sup> mit 1/3 HNEt<sub>3</sub>Cl (**177**)



C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub> (mit 1/3 C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>ClN)  
946.94 g/mol

**177**

<b>Ausbeute</b>	262 mg (277 μmol, 71 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.38 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt <sub>3</sub> );
<b>Smp.</b>	245 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 0.82 (m, 6H, 2 x Val-CH <sub>3</sub> ), 0.99-1.19 (m, 21H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>3</sub> , Chg-CH <sub>2</sub> , Ala-CH <sub>3</sub> ), 1.57-1.64 (m, 5H, Chg-CH <sub>2</sub> ), 1.93 (m, 1H, Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.41 (m, 1H, Asn-CH <sub>2</sub> ), 2.57 (m, 1H,



Asn-CH<sub>2</sub>), 2.86 (m, 1H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.06-3.09 (m, 9H, Phe-CH<sub>2</sub>, 3 x Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 3.62-3.82 (m, 2H, 2 x Gly-CH<sub>2</sub>), 4.08 (m, 2H, 2 x α-NH-CH), 4.28-4.50 (m, 3H, 3 x α-NH-CH), 6.85-7.04 (m, 4H, 2 x Fum-CH, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.20-7.41 (m, 7H, 5 x Phe-CH, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.49 (br.d, 1H, α-NH), 7.55 (br.d, 1H, α-NH), 7.82 (br.d, 1H, α-NH), 8.18-8.23 (m, 2H, 2 x α-NH), 8.50 (br.t, 1H, α-NH), 8.74 (m, 1H, α-NH), ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR**

(150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8.6 (Triethylammonium-CH<sub>3</sub>), 17.6 (Val-CH<sub>3</sub>), 17.8 (Val-CH<sub>3</sub>), 19.2 (Ala-CH<sub>3</sub>), 25.6 (Chg-CH<sub>2</sub>), 25.7 (Chg-CH<sub>2</sub>), 25.8 (Chg-CH<sub>2</sub>), 29.0 (Chg-CH<sub>2</sub>), 29.1 (Chg-CH<sub>2</sub>), 30.5 (Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.6 (Chg-CHC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>), 36.8 (Phe-CH<sub>2</sub>), 37.0 (Asn-CH<sub>2</sub>), 41.6 (Gly-CH<sub>2</sub>), 42.2 (Gly-CH<sub>2</sub>), 45.5 (Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 48.3 (Ala-α-CH), 49.9 (Asn-α-CH), 53.5 (Chg-α-CH), 57.3 (Phe-α-CH), 57.4 (Val-α-CH), 126.5 (Phe-Phenyl-CH), 128.2 (Phe-Phenyl-CH), 129.2 (Phe-Phenyl-CH), 132.6 (Fum-CH), 133.0 (Fum-CH), 137.5 (Phe-Phenyl-C<sub>q</sub>), 163.7 (C=O), 168.6 (C=O), 168.7 (C=O), 170.36 (C=O), 170.40 (C=O), 171.4 (C=O), 171.8 (C=O), 171.9 (C=O), 172.7 (C=O), 172.8 (C=O) ppm;

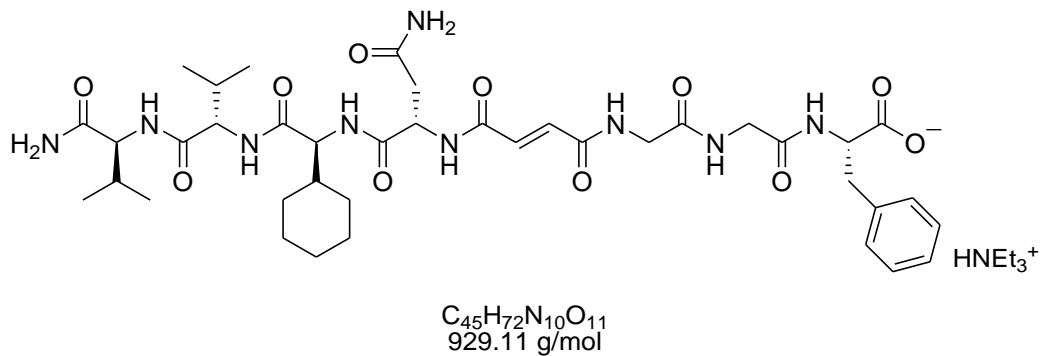
**IR**

(KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3435 (br), 3279 (s), 3089 (w), 2930 (m), 1628 (s), 1545 (s), 1407 (w), 1227 (w), 1021 (w), 704 (w) cm<sup>-1</sup>;

**MS**

(MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 798.379 (M<sup>-</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 798.733 (M<sup>-</sup>).

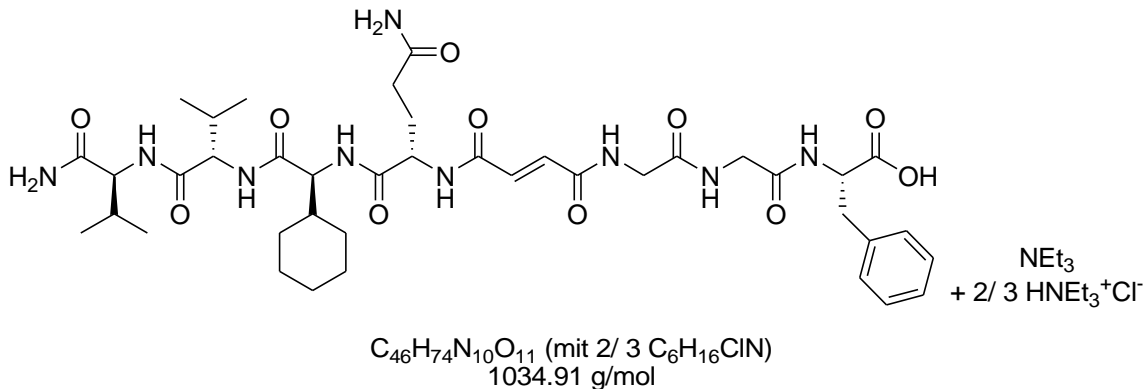
$\text{NH}_2\text{-Val}\leftarrow\text{Val}\leftarrow\text{Chg}\leftarrow\text{Asn}\leftarrow\text{Fum-Gly-Gly-Phe-O}^- \text{HNEt}_3^+$  (**178**)

**178**

<b>Ausbeute</b>	250 mg (269 $\mu\text{mol}$ , 69 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.48 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt <sub>3</sub> );
<b>Smp.</b>	232 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 0.82 (s, 12H, 4 x Val-CH <sub>3</sub> ), 1.05 (m, 14H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>3</sub> , Chg-CH <sub>2</sub> ), 1.54-1.63 (m, 5H, Chg-CH <sub>2</sub> ), 1.93 (m, 2H, 2 x Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.86 (m, 7H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>2</sub> , Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.03 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.62-3.71 (m, 2H, 2 x Gly-CH <sub>2</sub> ), 3.81 (m, 1H, $\alpha$ -NH-CH), 4.09-4.43 (m, 4H, 4 x $\alpha$ -NH-CH), 6.84-7.04 (m, 4H, 2 x Fum-CH, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.18-7.38 (m, 7H, 5 x Phe-CH, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.64-7.78 (m, 2H, 2 x $\alpha$ -NH), 7.97-8.17 (m, 3H, 3 x $\alpha$ -NH), 8.46-8.75 (m, 2H, 2 x $\alpha$ -NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 8.7 (Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 17.87, 17.91, 18.3, 19.2 (Val-CH <sub>3</sub> ), 25.6, 25.7, 25.8, 28.2, 29.1 (Chg-CH <sub>2</sub> ), 30.2 (Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 30.5 (Chg-CHC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> ), 37.0 (Phe-CH <sub>2</sub> , Asn-CH <sub>2</sub> ), 41.8, 42.2 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 45.5 (Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 50.0 (Asn- $\alpha$ -CH), 54.0 (Chg- $\alpha$ -CH), 57.4 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.5, 58.0 (Val- $\alpha$ -CH), 126.3, 128.1, 129.3 (Phe-Phenyl-CH), 132.6, 132.9 (Fum-CH), 137.9 (Phe-Phenyl-C <sub>q</sub> ), 163.6, 164.1, 168.7, 170.6, 170.66, 170.71, 172.7, 172.8, 172.86, 172.91 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3410 (br), 3277 (s), 3062 (w), 2932 (m), 1631 (s), 1545 (s), 1393 (m), 1035 (w), 703 (w) cm <sup>-1</sup> ;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z = 826.411$  ( $M^-$ ),  
 gefunden:  $m/z = 826.661$  ( $M^-$ ).

$NH_2$ -Val←Val←Chg←Gln←Fum-Gly-Gly-Phe-  $O^- HNEt_3^+$  mit 2/3  $HNEt_3Cl$  (**179**)



**179**

**Ausbeute** 319 mg (308  $\mu$ mol, 79 %);

**R<sub>f</sub>** 0.55 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $NEt_3$ );

**Smp.** 250 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 0.82$  (m, 12H, 4 x Val- $CH_3$ ), 1.06 (m, 20H, 3 x Triethylammonium- $CH_3$ , Chg- $CH_2$ ), 1.52-1.64 (m, 6H, Chg- $CH_2$ , Gln- $CH_2$ ), 1.93 (m, 3H, 2 x Val- $CH(CH_3)_2$ , Gln- $CH_2$ ), 2.20 (m, 1H, Gln- $CH_2$ ), 2.23 (m, 1H, Gln- $CH_2$ ), 2.81-3.02 (m, 13H, Phe- $CH_2$ , 3 x Triethylammonium- $CH_2$ ), 3.64-3.70 (m, 2H, Gly- $CH_2$ ), 3.82 (m, 2H, Gly- $CH_2$ ), 4.10-4.45 (m, 5H, 5 x  $\alpha$ -NH- $CH$ ), 6.77 (m, 1H, Amid- $NH_2$ ), 6.85-7.03 (m, 4H, 2 x Fum- $CH$ , Amid- $NH_2$ ), 7.18-7.30 (m, 6H, 5 x Phe- $CH$ , Amid- $NH_2$ ), 7.66 (m, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.82-7.97 (m, 3H, 3 x  $\alpha$ -NH), 8.17 (br.s, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.36-8.73 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH) ppm;

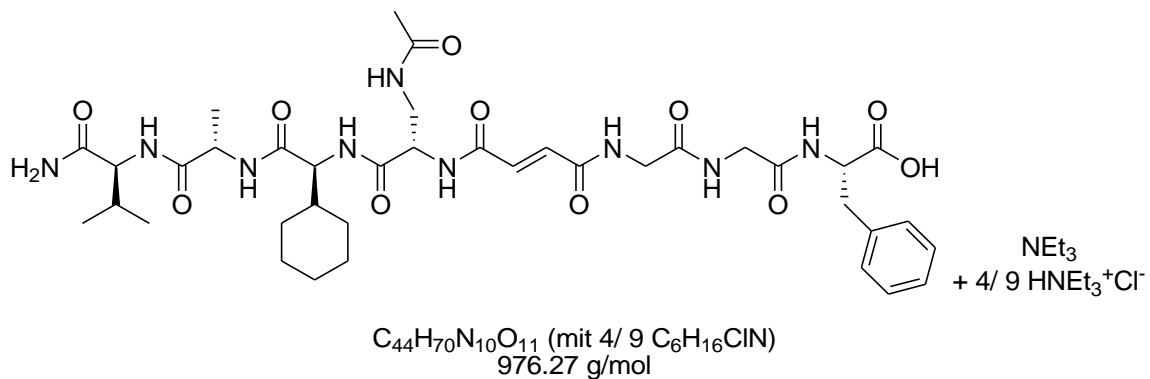
**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 9.6$  (Triethylammonium- $CH_3$ ), 17.9, 18.3, 19.2 (Val- $CH_3$ ), 25.6, 25.7, 25.9 (Chg- $CH_2$ ), 28.1, 29.1 (Chg- $CH_2$ /Gln- $CH_2$ ), 30.1, 30.5 (Val- $CH(CH_3)_2$ ), 31.5 (Chg- $CHC_5H_{10}$ ), 37.0 (Phe- $CH_2$ ), 41.8, 42.2 (Gly- $CH_2$ ), 45.6 (Triethylammonium- $CH_2$ ), 52.4 (Gln- $\alpha$ -CH), 54.0 (Chg- $\alpha$ -CH), 57.4 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.8, 58.0 (Val- $\alpha$ -CH), 126.3, 128.1, 129.3

(Phe-Phenyl-CH), 132.7 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl-C<sub>q</sub>), 164.1, 170.6, 170.7, 172.7, 172.9, 173.6 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3405 (br), 3280 (s), 3062 (w), 2933 (m), 1632 (s), 1545 (s), 1407 (m), 1255 (m), 1032 (w), 703 (w), 634 (w) cm<sup>-1</sup>;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 840.426 (M<sup>-</sup>),  
gefunden:  $m/z$  = 840.661 (M<sup>-</sup>).

*NH<sub>2</sub>-Val←Ala←Chg←C1(Ac)←Fum-Gly-Gly-Phe-O<sup>-</sup> HNEt<sub>3</sub><sup>+</sup> mit 4/9 HNEt<sub>3</sub>Cl (180)*



**180**

**Ausbeute** 263 mg (269 mmol, 69 %);

**R<sub>f</sub>** 0.10 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 225 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 0.80-0.83 (m, 6H, 2 x Val-CH<sub>3</sub>), 1.06 (br.s, 18H, 3 x Triethylammonium-CH<sub>3</sub>, Chg-CH<sub>2</sub>), 1.19 (d, 3H, Ala-CH<sub>3</sub>), 1.56-1.63 (m, 6H, Chg-CH<sub>2</sub>), 1.79 (br.s, 3H, Acetyl-CH<sub>3</sub>), 1.92 (m, 1H, Val-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.82-2.91 (m, 10H, Phe-CH<sub>2</sub>, 3 x Triethylammonium-CH<sub>2</sub>), 3.03-3.06 (m, 1H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3.62 (dd, 1H, Gly-CH<sub>2</sub>), 3.72 (dd, 1H, Gly-CH<sub>2</sub>), 3.82 (d, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.16 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.34 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH-CH), 4.46 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 6.90-6.92 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.04 (br.s, 2H, Amid-NH<sub>2</sub>), 7.17-7.36 (m, 5H, 5 x Phe-

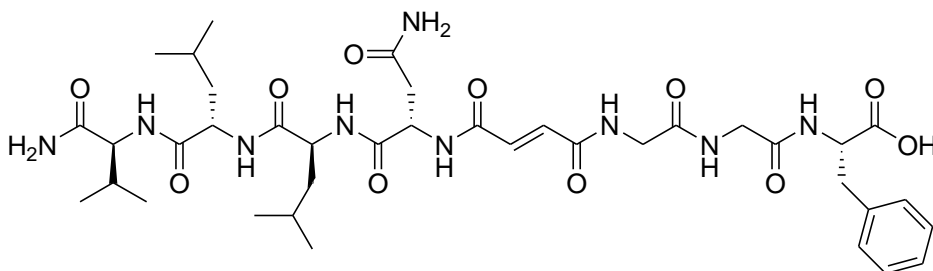
CH), 7.60 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.82-8.02 (m, 3H, 3 x NH), 8.18-8.20 (m, 2H, 2 x NH), 8.62-8.75 (m, 2H, 2 x NH) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.7 (Triethylammonium- $\text{CH}_3$ ), 17.7, 17.8 (Val- $\text{CH}_3$ ), 19.2 (Ala- $\text{CH}_3$ ), 22.6 (C1(Ac)- $\text{CH}_3$ ), 25.7, 25.8, 27.7, 29.0 (Chg- $\text{CH}_2$ ), 30.4 (Val- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 30.6 (Chg- $\text{CHC}_5\text{H}_{10}$ ), 37.1 (Phe- $\text{CH}_2$ ), 40.3 (C1(Ac)- $\text{CH}_2$ ), 41.8, 42.2 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 45.6 (Triethylammonium- $\text{CH}_2$ ), 48.3 (Ala- $\alpha$ -CH), 52.9 (Chg- $\alpha$ -CH), 54.0 (C1(Ac)- $\alpha$ -CH), 54.1 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.3 (Val- $\alpha$ -CH), 126.3, 128.1, 129.3 (Phe-Phenyl-CH), 132.7, 132.8 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl- $\text{C}_q$ ), 163.8, 164.2, 168.3, 168.7, 169.6, 169.7, 170.6, 171.8, 172.7, 173.0 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3283 (br), 3076 (w), 2925 (m), 2850 (w), 1635 (s), 1545 (s), 1393 (m), 1035 (w), 704 (w)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 812.395 ( $\text{M}^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 812.660 ( $\text{M}^-$ ).

*NH<sub>2</sub>-Val←Leu←Leu←Asn←Fum-Gly-Gly-Phe-OH 8/9 NEt<sub>3</sub> (181)*



$\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_{11}$  (mit 8/9  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ )  
905.86 g/mol

**181**

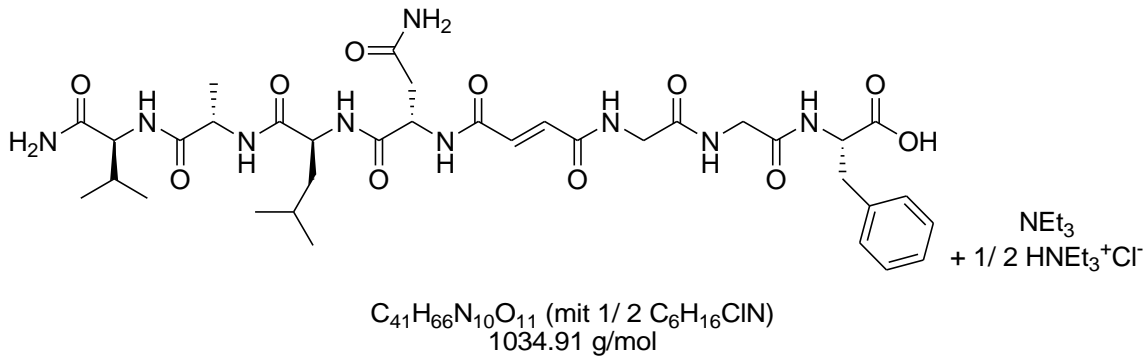
**Ausbeute** 265 mg (293  $\mu\text{mol}$ , 75 %);

**R<sub>f</sub>** 0.66 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt<sub>3</sub>);

**Smp.** 228 °C (Zersetzung);

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 0.80-0.88 (m, 18H, 2 x Val-CH <sub>3</sub> , 4 x Leu-CH <sub>3</sub> ), 1.06 (t, 8H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 1.47-1.58 (m, 6H, 2 x Leu-CH <sub>2</sub> , 2 x Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.94-1.95 (m, 1H, Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.42-2.45 (dd, 1H, Asn-CH <sub>2</sub> ), 2.56-2.59 (dd, 1H, Asn-CH <sub>2</sub> ), 2.78-2.89 (m, 6H, Phe-CH <sub>2</sub> , 3 x Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 3.02-3.05 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.61-3.62 (dd, 1H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 3.70-3.74 (dd, 1H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 3.81-3.82 (m, 2H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 4.04-4.29 (m, 4H, 4 x α-NH-CH), 4.61-4.65 (m, 1H, α-NH-CH), 6.91 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.00 (br.s, 2H, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.06 (br.s, 2H, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.17-7.36 (m, 5H, 5 x Phe-CH), 7.48 (m, 1H, α-NH), 7.87 (br.s, 1H, α-NH), 8.06 (br.d, 1H, α-NH), 8.17 (br.t, 1H, α-NH), 8.22 (br.d, 1H, α-NH), 8.74 (m, 2H, 2 x α-NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ = 9.8 (Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 17.9, 19.3 (Val-CH <sub>3</sub> ), 21.37, 21.44, 23.12, 23.15 (Leu-CH <sub>3</sub> ), 24.1, 24.2 (Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 30.4 (Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 37.1, 37.2 (Phe-CH <sub>2</sub> /Asn-CH <sub>2</sub> ), 40.1, 40.3 (Leu-CH <sub>2</sub> ), 41.9, 42.2 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 45.4 (Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 50.1 (Asn-α-CH), 51.5, 51.6 (Leu-α-CH), 54.3 (Phe-α-CH), 57.5 (Val-α-CH), 126.2, 128.0, 129.4 (Phe-Phenyl-CH), 132.68, 132.74 (Fum-CH), 138.1 (Phe-Phenyl-C <sub>q</sub> ), 163.6, 164.1, 168.2, 168.7, 171.0, 171.6, 171.7, 172.0, 172.7, 173.1 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3406 (br), 3278 (s), 3076 (m), 2959 (m), 1633 (s), 1540 (s), 1390 (m), 1255 (m), 1032 (w), 704 (m), 621 (w) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(MALDI-neg.) berechnet: $m/z$ = 814.411 (M <sup>-</sup> ), gefunden: $m/z$ = 814.629 (M <sup>-</sup> ).

$\text{NH}_2\text{-Val}\leftarrow\text{Ala}\leftarrow\text{Leu}\leftarrow\text{Asn}\leftarrow\text{Fum-Gly-Gly-Phe-O}^- \text{HNEt}_3^+$  mit  $1/2 \text{HNEt}_3\text{Cl}$  (**182**)

**182**

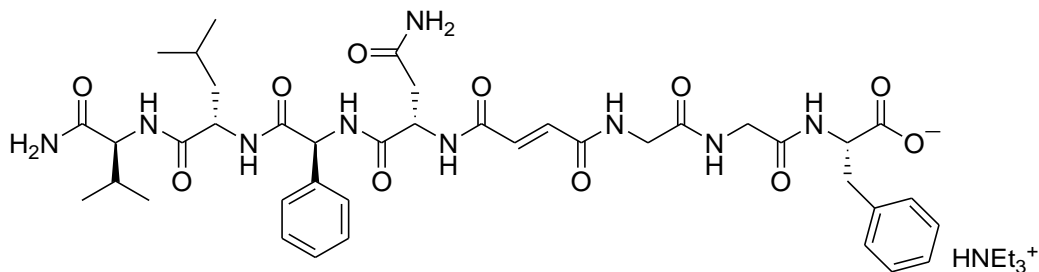
<b>Ausbeute</b>	266 mg (257 $\mu\text{mol}$ , 66 %);
<b>R<sub>f</sub></b>	0.45 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % $\text{NEt}_3$ );
<b>Smp.</b>	193 °C (Zersetzung);
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ = 0.79-0.86 (m, 12H, 2 x Val- $\text{CH}_3$ , 2 x Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.15 (t, 15H, 3 x Triethylammonium- $\text{CH}_3$ ), 1.24 (d, 3H, Ala- $\text{CH}_3$ ), 1.46-1.48 (m, 2H, Leu- $\text{CH}_2$ ), 1.58 (m, 1H, Leu- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.93-1.99 (m, 1H, Val- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.41-2.45 (dd, 1H, Asn- $\text{CH}_2$ ), 2.57-2.61 (dd, 1H, Asn- $\text{CH}_2$ ), 2.86-3.04 (m, 11H, Phe- $\text{CH}_2$ , 3 x Triethylammonium- $\text{CH}_2$ ), 3.62-3.66 (m, 1H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 3.71-3.74 (m, 1H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 3.81-3.82 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.04-4.07 (m, 1H, $\alpha\text{-NH-CH}$ ), 4.17-4.26 (m, 2H, 2 x $\alpha\text{-NH-CH}$ ), 4.35-4.39 (m, 1H, $\alpha\text{-NH-CH}$ ), 4.60-4.64 (m, 1H, $\alpha\text{-NH-CH}$ ), 6.90 (br.s, 2H, 2 x Fum- $\text{CH}$ ), 7.01 (br.s, 2H, Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.06 (br.s, 2H, Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.17-7.36 (m, 5H, 5 x Phe- $\text{CH}$ ), 7.45 (br.s, 1H, $\alpha\text{-NH}$ ), 8.09-8.10 (m, 2H, 2 x $\alpha\text{-NH}$ ), 8.16-8.20 (m, 2H, 2 x $\alpha\text{-NH}$ ), 8.71-8.75 (m, 2H, 2 x $\alpha\text{-NH}$ ) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ = 8.9 (Triethylammonium- $\text{CH}_3$ ), 17.4, 17.8 (Val- $\text{CH}_3$ ), 19.3 (Ala- $\text{CH}_3$ ), 21.4, 23.2 (Leu- $\text{CH}_3$ ), 24.1 (Leu- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 30.4 (Val- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 36.9, 37.0 (Phe- $\text{CH}_2$ /Asn- $\text{CH}_2$ ), 40.3 (Leu- $\text{CH}_2$ ), 41.7, 42.2 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 45.7 (Triethylammonium- $\text{CH}_2$ ), 48.6 (Ala- $\alpha\text{-CH}$ ), 50.1 (Asn- $\alpha\text{-CH}$ ), 51.4 (Leu- $\alpha\text{-CH}$ ), 53.8 (Phe- $\alpha\text{-CH}$ ), 57.4 (Val- $\alpha\text{-CH}$ ), 126.4, 128.2, 129.2 (Phe-Phenyl- $\text{CH}$ ), 132.7, 132.8 (Fum- $\text{CH}$ ), 137.7 (Phe-Phenyl- $\text{C}_q$ ),

163.6, 164.1, 168.5, 168.7, 171.0, 171.5, 171.93, 171.94, 172.8, 173.0  
(C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3421 (br), 3282 (s), 3076 (m), 2962 (m), 2496 (w), 1630 (s),  
1548 (s), 1393 (m), 1250 (s), 1164 (s), 1032 (s), 640 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 772.364 ( $\text{M}^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 772.362 ( $\text{M}^-$ ).

$\text{NH}_2\text{-Val}\leftarrow\text{Leu}\leftarrow\text{Phg}\leftarrow\text{Asn}\leftarrow\text{Fum-Gly-Gly-Phe-O}^- \text{HNEt}_3^+$  (**183**)



$\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{N}_{10}\text{O}_{11}$   
937.09 g/mol

**183**

**Ausbeute** 314 mg (335  $\mu\text{mol}$ , 86 %);

**R<sub>f</sub>** 0.31 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $\text{NEt}_3$ );

**Smp.** 205 °C (Zersetzung);

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  = 0.82-0.89 (m, 12H, 2 x Val- $\text{CH}_3$ , 2 x Leu- $\text{CH}_3$ ),  
1.09 (t, 9H, 3 x Triethylammonium- $\text{CH}_3$ ), 1.46-1.59 (m, 3H, Leu- $\text{CH}_2$ ,  
Leu- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.94-1.95 (m, 1H, Val- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.34 (dd, 1H, Asn- $\text{CH}_2$ ),  
2.54 (dd, 1H, Asn- $\text{CH}_2$ ), 2.79-2.88 (m, 8H, Phe- $\text{CH}_2$ ,  
3 x Triethylammonium- $\text{CH}_2$ ), 3.04 (dd, 2H, Phe- $\text{CH}_2$ ), 3.64 (dd, 1H, Gly-  
 $\text{CH}_2$ ), 3.73 (dd, 1H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 3.83 (dd, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.08 (dd, 1H,  $\alpha$ -NH-  
 $\text{CH}$ ), 4.27-4.34 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH- $\text{CH}$ ), 4.40-4.43 (m, 1H,  $\alpha$ -NH- $\text{CH}$ ), 4.63  
(d, 1H,  $\alpha$ -NH- $\text{CH}$ ), 6.85-6.95 (m, 3H, 2 x Fum- $\text{CH}$ , Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.06 (br.s,  
2H, Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.14-7.42 (m, 11H, 5 x Phe- $\text{CH}$ , Amid- $\text{NH}_2$ ), 7.53 (br.d,



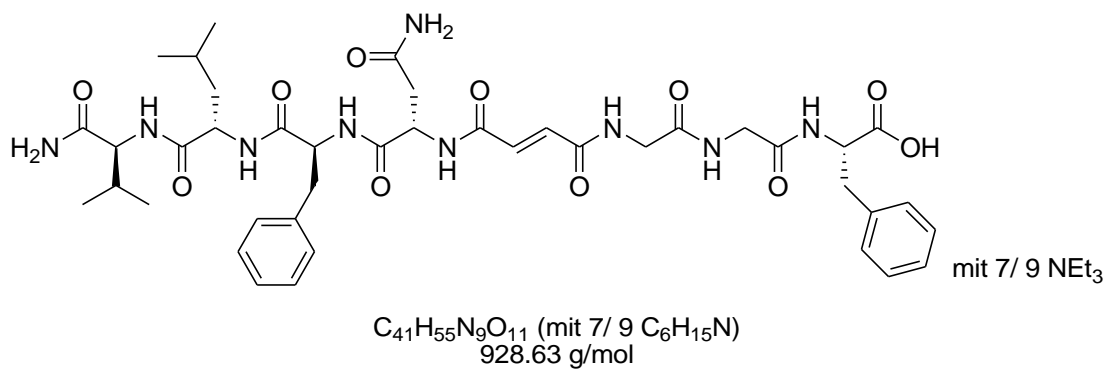
1H,  $\alpha$ -NH), 7.95 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.10 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.16-8.17 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.68 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.74 (br.t, 1H,  $\alpha$ -NH) ppm;

**$^{13}$ C-NMR** (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.5 (Triethylammonium-CH $_3$ ), 18.0, 19.3 (Val-CH $_3$ ), 21.5, 23.2 (Leu-CH $_3$ ), 24.2 (Leu-CH(CH $_3$ ) $_2$ ), 30.5 (Val-CH(CH $_3$ ) $_2$ ), 37.0 (Phe-CH $_2$ ), 37.1 (Asn-CH $_2$ ), 40.3 (Leu-CH $_2$ ), 41.8, 42.2 (Gly-CH $_2$ ), 45.5 (Triethylammonium-CH $_2$ ), 49.9 (Asn- $\alpha$ -CH), 51.5 (Leu- $\alpha$ -CH), 54.06 (Phe- $\alpha$ -CH), 54.10 (Phg- $\alpha$ -CH), 57.4 (Val- $\alpha$ -CH), 126.3, 128.0, 128.1, 129.2, 129.3 (Phenyl-CH), 132.6, 132.8 (Fum-CH), 137.7, 138.0 (Phenyl-C $_q$ ), 163.6, 164.1, 168.3, 168.7, 170.7, 170.8, 171.4, 171.7, 172.8, 173.1 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3277 (br), 3066 (m), 2960 (m), 1634 (s), 1546 (s), 1392 (m), 1252 (m), 1163 (m), 1032 (m), 696 (m), 639 (m)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 834.379 ( $M^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 834.382 ( $M^-$ ).

*NH $_2$ -Val*←*Leu*←*Phe*←*Asn*←*Fum*-*Gly*-*Gly*-*Phe*-OH 7/9 NEt $_3$  (**184**)



**184**

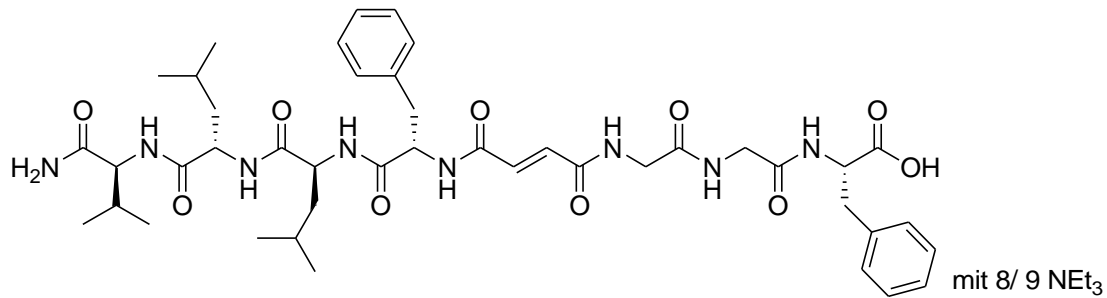
**Ausbeute** 293 mg (316  $\mu\text{mol}$ , 81 %);

**R $_f$**  0.31 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 % NEt $_3$ );

**Smp.** 165  $^\circ\text{C}$  (Zersetzung);

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 0.68-0.90 (m, 12H, 2 x Val-CH <sub>3</sub> , 2 x Leu-CH <sub>3</sub> ), 1.08 (t, 7H, 3 x Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 1.30-1.61 (m, 3H, Leu-CH <sub>2</sub> , Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.83-1.94 (m, 1H, Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.43 (dd, 1H, Asn-CH <sub>2</sub> ), 2.60 (dd, 1H, Asn-CH <sub>2</sub> ), 2.84-2.89 (m, 6H, Phe-CH <sub>2</sub> , 3 x Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 3.04 (m, 1H, Phe-CH <sub>2</sub> ), 3.63 (dd, 1H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 3.72 (dd, 1H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 3.82 (d, 2H, Gly-CH <sub>2</sub> ), 4.00 (dd, 1H, $\alpha$ -NH-CH), 4.32 (m, 2H, 2 x $\alpha$ -NH-CH), 4.74-4.79 (m, 1H, $\alpha$ -NH-CH), 5.39 (d, 1H, $\alpha$ -NH-CH), 6.88-7.04 (m, 4H, 2 x Fum-CH, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.16-7.46 (m, 12H, 5 x Phe-CH, Amid-NH <sub>2</sub> ), 7.50 (br.d, 1H, $\alpha$ -NH), 7.96 (br.d, 1H, $\alpha$ -NH), 8.17 (br.t, 1H, $\alpha$ -NH), 8.48-8.53 (m, 2H, 2 x $\alpha$ -NH), 8.75-8.81 (m, 2H, 2 x $\alpha$ -NH) ppm;
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(150 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 9.6 (Triethylammonium-CH <sub>3</sub> ), 17.9, 19.2 (Val-CH <sub>3</sub> ), 21.6, 23.1 (Leu-CH <sub>3</sub> ), 24.2 (Leu-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 30.3 (Val-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 36.9 (Phe-CH <sub>2</sub> ), 37.1 (Asn-CH <sub>2</sub> ), 40.5 (Leu-CH <sub>2</sub> ), 41.8, 42.2 (Gly-CH <sub>2</sub> ), 45.5 (Triethylammonium-CH <sub>2</sub> ), 49.9 (Asn- $\alpha$ -CH), 51.5 (Leu- $\alpha$ -CH), 54.0, 56.6 (Phe- $\alpha$ -CH), 57.5 (Val- $\alpha$ -CH), 126.3, 127.3, 128.1, 128.2, 129.3 (Phe-Phenyl-CH), 132.4, 133.0 (Fum-CH), 138.0 (Phe-Phenyl-C <sub>q</sub> ), 163.7, 164.1, 168.3, 168.7, 169.5, 170.5, 171.3, 171.4, 172.7, 173.0 (C=O) ppm;
<b>IR</b>	(KBr) $\tilde{\nu}$ = 3400 (br), 3286 (s), 3066 (m), 2963 (m), 2358 (w), 1631 (s), 1542 (s), 1383 (m), 1024 (m), 701 (m), 638 (m) cm <sup>-1</sup> ;
<b>MS</b>	(MALDI-neg.) berechnet: $m/z$ = 848.395 (M <sup>-</sup> ), gefunden: $m/z$ = 848.733 (M <sup>-</sup> ).

$NH_2$ -Val←Leu←Leu←Phe←Fum-Gly-Gly-Phe-OH 8/9  $NEt_3$  (**185**)



$C_{43}H_{60}N_8O_{10}$  (mit 8/ 9  $C_6H_{15}N$ )  
938.93 g/mol

### 185

- Ausbeute** 308 mg (328  $\mu$ mol, 84 %);
- R<sub>f</sub>** 0.38 (RP-18, Wasser/MeOH = 1/1 mit 0.1 %  $NEt_3$ );
- Smp.** 160 °C (Zersetzung);
- <sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 0.80-0.89 (m, 18H, 2 x Val- $CH_3$ , 4 x Leu- $CH_3$ ), 1.08 (t, 8H, 3 x Triethylammonium- $CH_3$ ), 1.45-1.61 (m, 6H, 2 x Leu- $CH(CH_3)_2$ , 2 x Leu- $CH_2$ ), 1.90-1.95 (m, 1H, Val- $CH(CH_3)_2$ ), 2.70-2.95 (m, 1H, Phe- $CH_2$ ), 2.85-2.89 (m, 7H, Phe- $CH_2$ , 3 x Triethylammonium- $CH_2$ ), 3.02-3.05 (m, 2H, Phe- $CH_2$ ), 3.60-3.82 (m, 3H, Gly- $CH_2$ ), 4.08-4.11 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 4.15-4.35 (m, 3H, 3 x  $\alpha$ -NH-CH), 4.61-4.65 (m, 1H,  $\alpha$ -NH-CH), 6.75-6.88 (m, 2H, 2 x Fum-CH), 7.06 (br.s, 2H, Amid- $NH_2$ ), 7.14-7.35 (m, 10H, 5 x Phe-CH), 7.51 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 7.90 (br.s, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.09-8.10 (br.d, 1H, 2 x  $\alpha$ -NH), 8.15 (br.t, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.28 (br.d, 1H,  $\alpha$ -NH), 8.64-8.70 (m, 2H, 2 x  $\alpha$ -NH) ppm;
- <sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.5 (Triethylammonium- $CH_3$ ), 17.8, 19.2 (Val- $CH_3$ ), 21.6, 21.8, 23.0, 23.2 (Leu- $CH_3$ ), 24.1, 24.2 (Leu- $CH(CH_3)_2$ ), 30.7 (Val- $CH(CH_3)_2$ ), 37.1, 37.5 (Phe- $CH_2$ ), 40.4, 40.8 (Leu- $CH_2$ ), 41.8, 42.1 (Gly- $CH_2$ ), 45.5 (Triethylammonium- $CH_2$ ), 51.1 (2 x Leu- $\alpha$ -CH), 54.1 (2 x Phe- $\alpha$ -CH), 57.1 (Val- $\alpha$ -CH), 126.2, 126.3, 128.0, 128.1, 129.2, 129.3 (Phe-Phenyl-CH), 132.6, 132.7 (Fum-CH), 137.9, 138.0 (Phe-Phenyl- $C_q$ ), 163.5, 164.1, 168.2, 168.7, 170.9, 171.6, 171.8), 172.7, 173.1 (C=O) ppm;

**IR** (KBr)  $\tilde{\nu}$  = 3281 (br), 3066 (m), 2959 (m), 2873 (w), 1635 (s), 1545 (s),  
1392 (m), 1254 (m), 1163 (m), 1032 (m), 700 (m), 639 (m)  $\text{cm}^{-1}$ ;

**MS** (MALDI-neg.) berechnet:  $m/z$  = 847.436 ( $M^-$ ),  
gefunden:  $m/z$  = 847.796 ( $M^-$ ).

## 7.4 Durchführung der Enzym-Assays

In diesem Kapitel ist die Durchführung der angewandten Enzym-Assays für alle verwendeten Proteasen beschrieben. Zuerst sind die Screeningbedingungen für Verbindungen in Lösung und anschließend die für festphasengebundene Inhibitoren aufgeführt.

Generell wurden für die fluorimetrischen Assays ausschließlich weiße Mikrotiterplatten verwendet und die Bestimmung der Enzymaktivität wurde stets bei 25 °C durchgeführt.

### 7.4.1 Screening in Lösung

Es wurden Enzym-Assays für drei verschiedene Cysteinproteasen durchgeführt. Als erstes wurden die untersuchten Verbindungen bei einer Gesamtinhibitorkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  getestet. Anschließend wurden die Verbindungen, die eine prozentuale Hemmwerte von größer 80 % aufwiesen, zur Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{K}_i$ -Werte mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Für Falciapin-2 und Rhodesain wurden die gleichen Assay-Bedingungen verwendet. Es wurden Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 5.5 mit folgenden Konzentrationen hergestellt (siehe **Tab. 7.2**).

Natriumacetat	50.0 mM
EDTA	5.00 mM
Natriumchlorid	200 mM

**Tab. 7.2** Konzentrationen und Zusammensetzung der Pufferlösung

Da für beide Enzyme das gleiche Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC verwendet wurde, konnten auch die gleichen Einstellungen am Fluorimeter für beide Assays angewandt werden (siehe **Tab. 7.3**).

Anregungswellenlänge	380 nm
Detektionswellenlänge	460 nm
Detektor	manuell (450 V)
Spaltbreite der Anregung	10 nm
Spaltbreite der Detektion	20 nm
Messintervall	pro Minute eine Messung
Gesamtzeit	5 min

**Tab. 7.3** Fluorimetereinstellungen für den Enzym-Assay von Falcipain-2 und Rhodesain

Das Gesamtvolumen von 250 µl pro Mikrotiterplattenöffnung setzte sich zusammen aus dem Assay-Puffer, einer Enzymlösung, DMSO mit bzw. ohne darin gelösten Inhibitor und einer Lösung des Substrats Cbz-Phe-Arg-AMC in DMSO (siehe **Tab. 7.4**). Vom Enzym wurde eine konzentrierte Stammlösung hergestellt, von der bei Verwendung von 10 µl pro Mikrotiterplattenöffnung die Fluoreszenzmessungen bei reinem DMSO eine Gerade mit einer Steigung zwischen 15 und 25 ergab. Dazu wurden die ausstehenden Enzymlösungen mit Assay-Puffer, der DTT in einer Konzentration von 2.00 mM enthielt, solange verdünnt, bis die gewünschte Fluoreszenzzunahme erreicht war. Für die Vergleichsmessung wurde reines DMSO, ansonsten eine 1.25 mM Lösung der zu testenden Verbindung in DMSO verwendet. Als Substrat wurde Cbz-Phe-Arg-AMC in einer Konzentration von 2.00 mM in DMSO gelöst.

Assay-Puffer	215 µl
Enzymlösung	10 µl
DMSO bzw. Inhibitorlösung	20 µl
Substratlösung	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>250 µl</b>

**Tab. 7.4** Durchführung des Enzym-Assays an Falcipain-2 und Rhodesain

Die angegebenen Volumina wurden nacheinander in die Mikrotiterplatte pipettiert, gründlich durchmischt und anschließend die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen.

Aus diesen Daten konnten die prozentualen Hemmwerte der Verbindungen bei einer InhibitorKonzentration von 100  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Um nun die  $\text{IC}_{50}$ - und die  $\text{K}_i$ -Werte zu erhalten, wurden die Inhibitorstammlösungen weiter mit DMSO verdünnt, um nach dem Pipettieren zu folgenden InhibitorKonzentrationen zu erhalten: 80  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.1  $\mu\text{M}$ . Nun konnten die prozentualen Hemmungen zu den verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden. Anschließend konnten die Rohdaten wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben mittels Excel und GraFit® ausgewertet werden, um die  $\text{IC}_{50}$ - und die  $\text{K}_i$ -Werte zu erhalten.

#### 7.4.2 Screening für harzgebundene Inhibitoren

Für an PEGA-Harz gebundene Verbindungen wurde der Enzym-Assay für Falcipain-2 und Rhodesain unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Es wurde die gleiche Pufferlösung wie im vorigen Kapitel beschrieben verwendet, lediglich die Durchführung des Assays unterscheidet sich in einigen Punkten. Die Fluorimetereinstellungen konnten für das Festphasenscreening ebenfalls übernommen werden, lediglich wurden zur Auswertung der Daten die Messpunkte der ersten 10 Minuten verwendet.

Beim Screening für festphasengebundene Inhibitoren mussten zunächst isopyknotische Suspensionen der an PEGA-Harz gebundenen Bibliotheksmitglieder in DMSO hergestellt werden. Dazu wurden etwa 5 – 10 mg des Harzes eingewogen und anschließend mit einer definierten Menge an DMSO versetzt, um eine Konzentration von 20 mg/ml zu erreichen. Die Suspensionen wurden mindestens 1 h quellen gelassen. Anstatt DMSO wurde bei diesem Screening als Vergleichsprobe eine isopyknotische Suspension der gleichen Konzentration (20 mg/ml) von reinem PEGA-Harz in DMSO verwendet. Anschließend wurden analog die Lösungen in Mikrotiterplatten vereinigt, die Volumina der Lösungen sind die gleichen wie die in **Tab. 7.4** angegebenen Werte. Vor den eigentlichen Fluoreszenzmessungen wurde das Enzym mit den isopyknotischen Suspensionen zusammengegeben, durchmischt und für 12 h im Kühlschrank bei 9 °C ohne Rühren inkubiert. Dann wurde die Substratlösung zugegeben, erneut gemischt und die Enzymaktivität bestimmt. Hierbei war wichtig, dass die Lösungen in den Mikrotiterplatten bereits auf RT erwärmt waren, da sonst die geringere Enzymaktivität die Messergebnisse verfälschten.

## 8 Summary

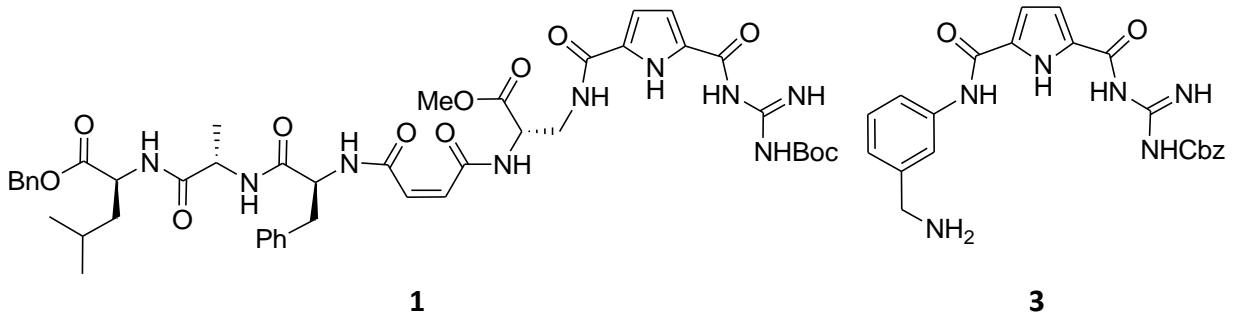
The development of new drugs against infectious diseases plays an important role due to the growing resistance of the pathogens against the current pharmaceuticals. Also there is often a high toxicity of the existing therapeutics so that their properties must be improved. Malaria and the sleeping sickness are infectious diseases. The parasites' development in the hosts can be stopped by the inhibition of their cysteine proteases. For the Malaria parasite (*Plasmodium falciparum*) the target is falcipain-2 and for the pathogen of the sleeping sickness (*Trypanosoma brucei rhodensiense*) it is rhodesain.

Within this work two promising approaches for inhibitor optimization were investigated, the classical and the combinatorial method. The classical approach is based on a compound with a high activity against falcipain-2 which was discovered by chance. The structure-reactivity relations were to be developed in screenings of analogous compounds and by computational docking experiments in the active site of the cysteine proteases. The combinatorial method is a completely different procedure. Initially a peptidic inhibitor has to be designed that can be introduced via solid phase synthesis on a suitable resin. By the combinatorial variation of amino acids a high number of inhibitors can be obtained in a very short time. In a screening of these resin-bound compounds the active members of the library can be identified. The antiparasitic and antitrypanosomal activity of the inhibitors of both approaches could be determined by biological *in vitro* investigations with the protozoic pathogens.

### *The classical approach for inhibitor optimization*

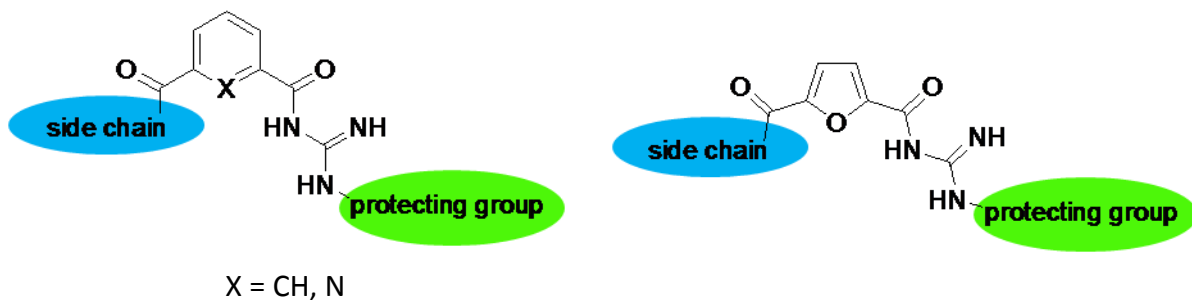
Compound **1** presents the starting point for the classical approach. It was discovered that **1** can inhibit falcipain-2 by 98 % at a concentration of 100  $\mu$ M. Therefore, a virtual screening using docking experiments with a model of the binding pocket of falcipain-2 with similar compounds was performed in a collaboration. Compound **3** emerged as a possible potent inhibitor of the cysteine protease (see **Abb. 8.1**). A screening of several synthesized pyrrole compounds with falcipain-2 and rhodesain was accomplished to gain further information about the compound classes.





**Abb. 8.1** Starting compounds of the classical approach: first new inhibitor **1** and structure **3** from dockings

The results of the screening show that nonpolar and uncharged species have the best inhibitory properties. Furthermore the guanidine moiety seemed to be crucial for inhibition. Some analogous furan compounds were also tested and showed promising first results. Several of the investigated compounds turned out to be very good inhibitors of falcipain-2 and rhodesain with  $IC_{50}$ -values near the nanomolar range. They showed also activity *in vitro* against the pathogens in the same concentration range.

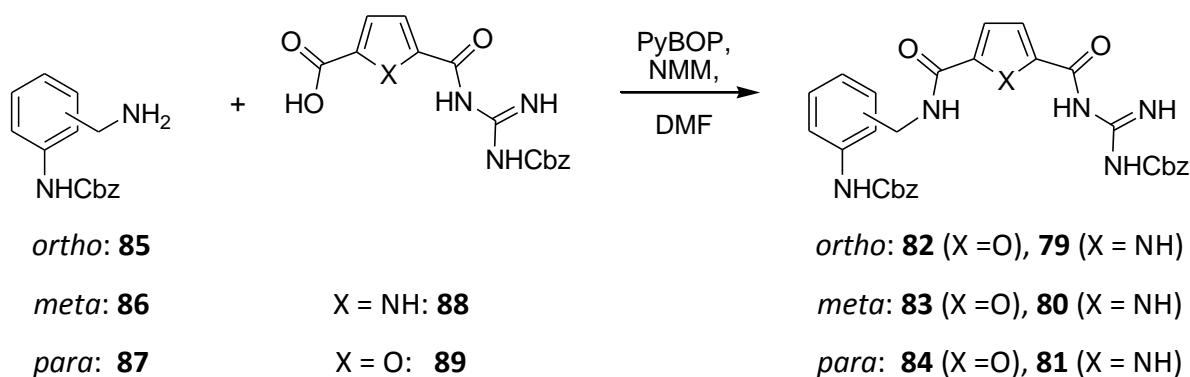


**Abb. 8.2** Potential inhibitors based on pyridine, benzene and furan

Additionally, the influence of the central aromatic ring was to be examined. Therefore new compounds based on pyridine, benzene and furan were synthesized (see **Abb. 8.2**). General syntheses routes were established to make these compounds accessible. Afterwards the compounds were screened to determine their inhibitory properties. In summary, the results obtained in all screenings were as follows:

1. Nonpolar and uncharged structural parts have better inhibitory properties than polar and charged ones.
2. The protected guanidin moiety is essential for an effective inhibition of the cysteine proteases.
3. Furans and pyrroles as the aromatic part are significantly better than benzenes and pyridines.

With this information improved pyrrole- and furan-based compounds were synthesized and their inhibitory properties against falcipain-2 and rhodesain investigated. Microbiological tests with the pathogens and cytotoxicity tests were also performed. The Cbz-protected inhibitors **79** to **84** were synthesized starting from the carboxylic acids **88** and **89**. The furan carboxylic acid **89** was obtained successfully in a six step synthesis, the synthesis for **88** had already been established before. The differently substituted benzenes **85** to **87** were each synthesized in three steps. The six inhibitors **79** to **84** were obtained by coupling of the amines **85** to **87** with the carboxylic acids **88** and **89**.

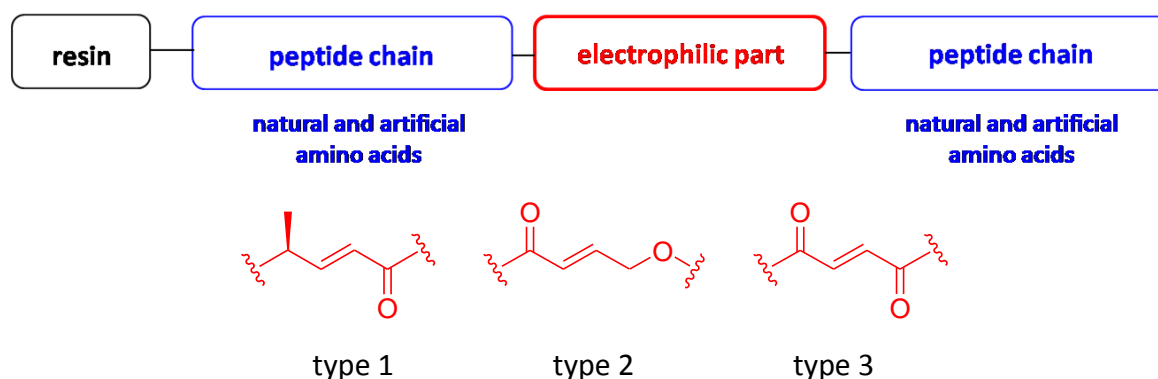


**Abb. 8.3** Synthesis of the pyrrole- and furan-based inhibitors **79** to **84**

The substances showed excellent inhibitory properties of both cysteine proteases with IC<sub>50</sub> values in the lower micromolar range. Additionally, they have a high *in-vitro* activity against the pathogens in the same concentration region. Inhibitor **80** for example had IC<sub>50</sub> values of 5.15 μM for rhodesain and 4.80 μM for falcipain-2. In the *in-vitro* experiments we obtained an IC<sub>50</sub> value of 2.49 μM for the antitrypanosomal and 3.38 μM for the antiplasmodial activity of **80**. Hence, the results with the isolated enzymes fit very well to the microbiological investigations. The inhibitors **79**, **80**, **82** and **83** showed no cytotoxicity, whereas the two *para*-substituted compounds showed a slight cytotoxicity on macrophages. Reversible inhibition mechanism could be confirmed by a dialysis experiment with cathepsin B. The inhibitory properties could be explained by virtual dockings of the substances in models of the active sites of both parasitic proteases. The reversibly binding compounds fill out the space in the binding pocket. In summary the classical approach led to substances with an excellent activity against the protozoa and the inhibition mechanism was confirmed to be reversible.

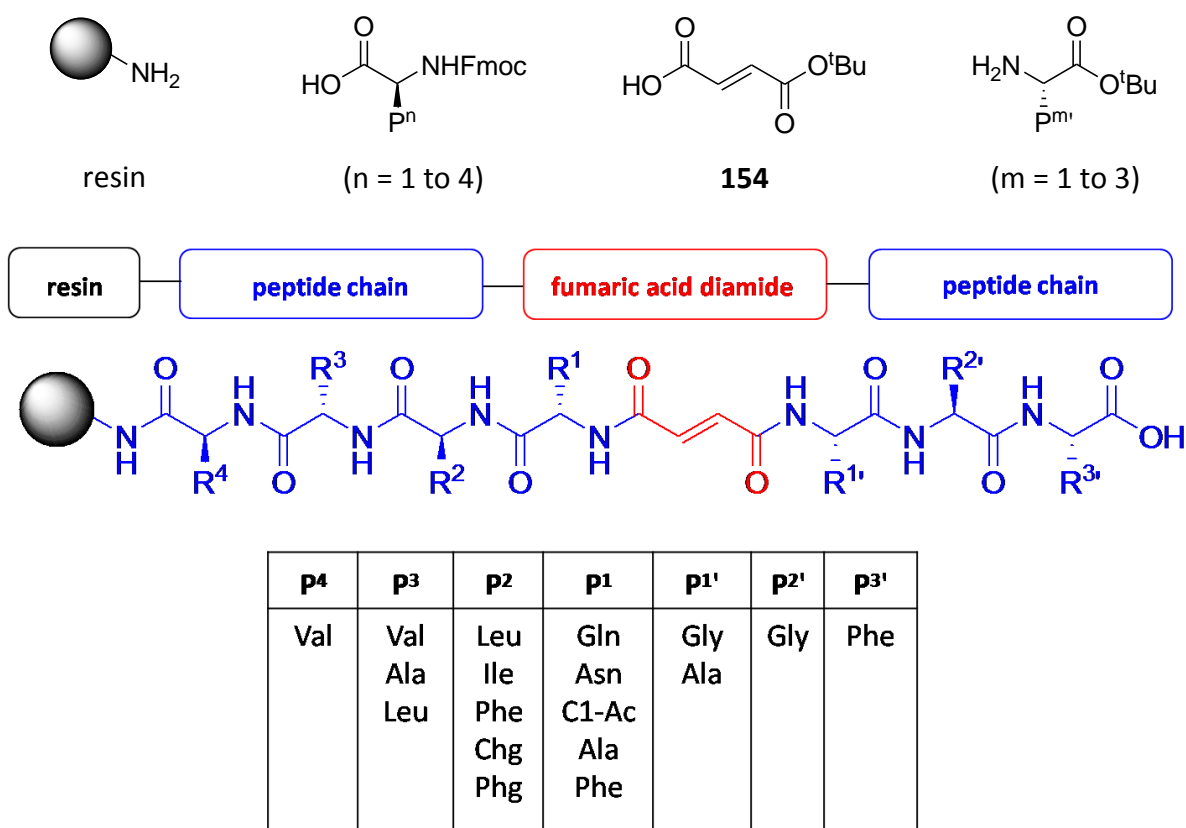
*The combinatorial approach for inhibitor optimization*

For the combinatorial screening, first a new screening method for falcipain-2 and rhodesain performed directly on a resin for solid phase synthesis was developed. Therefore, etacrylic acid derivatives were attached to the polymer support and used in test measurements to determine the optimized screening conditions. Etacrylic acid derivatives are known inhibitors of falcipain-2 and rhodesain. Advantages of this new screening method are that it is possible to screen the library quantitatively and that you need only a “one bead - one compound” inhibitor library in contrast to existing published protease assays, which are “one bead – two compounds”-libraries with additional FRET substrates. In the next step three different peptidic inhibitor types were checked for their suitability in the combinatorial approach. These compounds contained an electrophilic part that should be attacked by the nucleophilic cysteine residue of the proteases. So they are irreversible inhibitors. In their periphery varied amino acids are located.



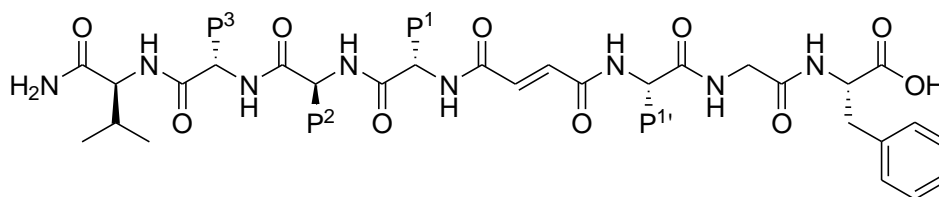
**Abb. 8.4** General design of the three investigated inhibitor types

One of the three inhibitor types fulfilled all requirements needed for the combinatorial approach (type 3). The synthesis of the compounds could be carried out on PEGA and on MBHA resin. The PEGA resin was needed for the synthesis and the subsequent screening of the combinatorial library, the MBHA resin provided cleavable single library members for the investigation in solution. The first four amino acids were coupled according the well-established C- to N-strategy and the use of Fmoc-protected amino acids. After the introduction of the fumaric acid building block **154** the last three amino acids were coupled according the N- to C-method and the use of *tert*-butylester-protected amino acids.



**Abb. 8.5** Building blocks for the solid phase synthesis of inhibitor type 1 and design of the inhibitor library

Thus a 150 membered inhibitor library could be synthesized which was analyzed in enzyme assays with falcipain-2 and rhodesain. These studies confirmed a preference for leucine at P<sup>3</sup> and P<sup>2</sup> and for asparagine and phenylalanine at P<sup>1</sup> from a statistical evaluation of the data. The results of the solid phase screening led to the choice of 14 notably interesting inhibitors and their synthesis on MBHA resin. The inhibition of the isolated enzymes and the microbiological activity of the compounds were finally determined in solution. The inhibitors in **Tab. 8.1** represent examples of good inhibitors.



Nr.	P <sup>3</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P <sup>1'</sup>	solid phase	screening	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
					screening	(100 μM)	FP-2/Rd	FP-2/Rd
					FP-2/Rd	FP-2/Rd	FP-2/Rd	P.f./T.b.b.
					(in %)	(in %)	(in μM)	(in μM)
178	Val	Chg	Asn	Gly	61 / 46	90 / 96	15 / 4.0	32 / > 100
179	Val	Chg	Gln	Gly	51 / 53	83 / 99	4.4 / 4.1	27 / > 100
181	Leu	Leu	Asn	Gly	70 / 71	92 / 63	29 / 131	74 / n.d.
185	Leu	Leu	Phe	Gly	69 / 69	100 / 68	2.2 / 9.0	> 100 / n.d.

**Tab. 8.1** Chosen peptidic inhibitors and their screening results

For example inhibitor **185** inhibits efficiently falcipain-2 (IC<sub>50</sub> of 2.2 μM) and rhodesain (IC<sub>50</sub> of 9.0 μM). The substance showed no *in vitro* activity against *Trypanosoma brucei brucei*. All results from the microbiological tests with the pathogens were worse compared to the results from the assays with the isolated enzymes. The bad solubility, the bioavailability and the metabolism by the pathogen played a role in inhibition. Compounds **178** and **179** delivered good IC<sub>50</sub> values of 32 μM or 27 μM with *Plasmodium falciparum*. An irreversible inhibition mechanism was confirmed by a dialysis experiment with cathepsin B. The compound class represents covalent binding inhibitors. In summary a new screening method was developed and applied. The general method can be used for other investigations in the future.

Both methods for inhibitor optimization led to potent cysteine protease inhibitors. From the classical approach we derived highly active substances with little cytotoxicity which are promising agents against malaria or the sleeping sickness. A new screening method for the combinatorial approach was developed. This enzyme assay can be used for other targets as well.

## 9 Anhang

### 9.1 Literatur

- [1] A. Stich, M. Altenkämper, M. Schlitzer, *Deutsche Apotheker Zeitung* **2008**, *148*, 3266-3275.
- [2] J. P. Lalezari, D. J. Ward, S. A. Tomkins, H. P. Garges, *J. Antimic. Chem.* **2007**, *60*, 170-174.
- [3] I. Rupp, R. Bosse, T. Schirmeister, G. Pradel, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *158*, 208-212.
- [4] R. Korde, A. Bhardwaj, R. Singh, A. Srivastava, V. S. Chauhan, R. K. Bhatnagar, P. Malhotra, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3116-3123.
- [5] P. J. Rosenthal, *International Journal for Parasitology* **2004**, *34*, 1489-1499.
- [6] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/index.html>.
- [7] S. Langolf, *Synthese und Screening von Pyrrol- und Furanverbindungen als Cysteinproteaseinhibitoren*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2008**.
- [8] C. Büchold, *Inhibitoren für Aspartatproteasen mit maßgeschneiderten Bindungsstellen*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2006**.
- [9] M. Schaller, M. Bein, H. C. Korting, S. Baur, G. Hamm, M. Monod, S. Beinhauer, B. Hube, *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 3227-3234.
- [10] J. R. Naglik, S. J. Challacombe, B. Hube, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 400-428.
- [11] M. Fusek, E.A. Smith, M. Monod, B. M. Dunn, S. I. Foundling, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9791-9799.
- [12] M. Schaller, H. C. Korting, C. Borelli, G. Hamm, B. Hube, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2758-2765.
- [13] C. Schmuck, *Chem. Commun.* **1999**, 834-844.
- [14] C. Schmuck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2397-2403.
- [15] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, 709-718.
- [16] S. Rohrer, unveröffentlichte Arbeiten, TU Braunschweig, **2008**.
- [17] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391.
- [18] F. Balkenhohl, C. v. d. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [19] K. Frobel, T. Krämer, *ChiuZ* **1996**, *30*, 270-285.
- [20] X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, M. P. Nova, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *62*, 6029-6033.
- [21] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954-9967.
- [22] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.
- [23] F. Lecaillon, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.
- [24] T. Hogg, K. Nagarajan, S. Herzberg, L. Chen, X. Shen, H. Jiang, M. Wecke, C. Blohmke, R. Hilgenfeld, C. L. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25425-25437.
- [25] K. C. Pandey, S. X. Wang, P. S. Sijwali, A. L. Lau, J. H. McKerrow, P. J. Rosenthal, *PNAS* **2005**, *102*, 9138-9143.
- [26] H.-H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.

- [27] T. Schirmeister, A. Klockow, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585-596.
- [28] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.
- [29] M. Shipton, M. P. J. Kierstan, J. P. G. Malthouse, T. Stuchbury, K. Brocklehurst, *FEBS Lett.* **1975**, *50*, 365-368.
- [30] L. A. Sluyterman, J. Wijdenes, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *71*, 383-391.
- [31] L. Polgár, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *98*, 369-374.
- [32] D. Rich, M. Brown, A. Barrett, *Biochem. J.* **1986**, *235*, 731-734.
- [33] R. Vicik, V. Hoerr, M. Glaser, M. Schultheis, E. Hansell, J. H. McKerrow, U. Holzgrabe, C. R. Caffrey, A. Ponte-Sucre, H. Moll, A. Stich, T. Schirmeister, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2753-2757.
- [34] F. Schulz, C. Gelhaus, B. Degel, R. Vicik, S. Heppner, A. Breuning, M. Leippe, J. Gut, P. J. Rosenthal, T. Schirmeister, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1214-1224.
- [35] F. V. González, J. Izquierdo, S. Rodríguez, J. H. McKerrow, E. Hansell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6697-6700.
- [36] R. Ettari, E. Nizi, M. E. Di Francesco, M.-A. Dude, G. Pradel, R. Vicik, T. Schirmeister, N. Micale, S. Grasso, M. Zappalà, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 988-996.
- [37] P. Jaishankar, E. Hansell, D.-M. Zhao, P. S. Doyle, J. H. McKerrow, A. R. Renslo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 624-628.
- [38] S. Batra, Y. A. Sabnis, P. J. Rosenthal, M. A. Avery, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2293-2299.
- [39] M. K. Ramjee, N. S. Flinn, T. P. Pemberton, M. Quibell, Y. Wang, J. P. Watts, *Biochem. J.* **2006**, *399*, 47-57.
- [40] I. Chiyanzu, E. Hansell, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow, K. Chibale, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3527-3530.
- [41] N. Fujii, J. P. Mallari, E. J. Hansell, Z. Mackey, P. Doyle, Y. M. Zhou, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow, R. Kiplin Guy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 121-123.
- [42] J. P. Mallari, A. Shelat, A. Kosinski, C. R. Caffrey, M. Connelly, F. Zhu, J. H. McKerrow, R. Kiplin Guy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2883-2885.
- [43] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Amer. chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666.
- [44] W.-X. Tian, C.-L. Tsou, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [45] R. Kitz, I. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- [46] H. Schöneborn, *Selbstreplizierende Oligonucleotide: Zum Einfluss der Matrizenlänge bei kinetischen Untersuchungen auf der Basis des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers*, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2002**.
- [47] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
- [48] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nature Biotechnology* **1998**, *16*, 49-53.
- [49] U. Kaeppler, N. Stiefl, M. Schiller, R. Vicik, A. Breuning, W. Schmitz, D. Rupprecht, C. Schmuck, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6832-6842.
- [50] M. Dixon, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [51] A. Lee, L. Huang, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9907-9914.
- [52] W. J. L. Wood, L. Huang, J. A. Ellman, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 869-880.
- [53] G. Wang, S. Q. Yao, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4437-4440.

- [54] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 113-129.
- [55] D.-H. Kim, H.-Y. Lee, H. Kim, H. Kim, Y.-S. Lee, S. B. Park, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 280-285.
- [56] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [57] F.-I. Auzanneau, M. Meldal, K. Bock, *J. Peptide Sci.* **1995**, *1*, 31-44.
- [58] M. Renil, M. Ferreras, J. M. Delaissé, N. T. Foged, M. Meldal, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 195-210.
- [59] M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1849-1850.
- [60] M. Grotli, C. H. Gotfredsen, J. Rademann, J. Burchard, A. J. Clark, J. O. Duus, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 108-119.
- [61] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [62] P. M. St. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1210-1228.
- [63] A. Schleyer, M. Meldal, M. Renil, H. Paulsen, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2064-2067.
- [64] L. Ying, R. Liu, J. Zhang, K. Lam, C. B. Lebrilla, J. Gervay-Hague, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 372-384.
- [65] P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 13312-13320.
- [66] P. G. Alluri, M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. J. Olivos, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13995-14004.
- [67] M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, T. Kodadek, *Chemistry & Biology.* **2004**, *11*, 1127-1137.
- [68] T. Kodadek, K. Bachhawat-Sikder, *Mol. BioSyst.* **2006**, *2*, 25-35.
- [69] M. M. Marani, E. Oliveira, S. Cote, S. A. Camperi, F. Albericio, O. Cascone, *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 215-222.
- [70] J. J. Pastor, G. Granados, N. Carulla, F. Rabanal, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14922-14932.
- [71] H. K. Smith, M. Bradley, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 326-332.
- [72] L. I. Robins, S. M. Dixon, D. K. Wilson, M. J. Kurth, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7728-7735.
- [73] S. M. Dixon, P. Li, R. Liu, H. Wolosker, K. S. Lam, M. J. Kurth, M. D. Toney, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2388-2397.
- [74] J. C. Spetzler, V. Westphal, J. R. Winther, M. Meldal, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 128-137.
- [75] D.-S. Shin, Y.-G. Kim, E.-M. Kim, M. Kim, H.-Y. Park, J.-H. Kim, B.-S. Lee, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 20-30.
- [76] M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1141-1148.
- [77] P. M. St. Hilaire, L. C. Alves, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, M. A. Juliano, L. Juliano, G. H. Coombs, M. Meldal, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 115-122.
- [78] A. Graven, P. M. St. Hilaire, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 441-452.
- [79] P. M. St. Hilaire, L. C. Alves, F. Herrera, M. Renil, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. A. Juliano, L. Juliano, J. Arevalo, M. Meldal, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1971-1982.



- [80] C. H. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324.
- [81] P. M. St. Hilaire, M. Willert, M. A. Juliano, L. Juliano, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 509-523.
- [82] F. M. Alves, I. Y. Hirata, I. E. Gouvea, M. F. M. Alves, M. Meldal, D. Brömme, L. Juliano, M. A. Juliano, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 627-634.
- [83] G. Rossé, E. Kueng, M. G. P. Page, V. Schauer-Vukasinovic, T. Giller, H.-W. Lahm, P. Hunziker, D. Schlattner, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 461-466.
- [84] S. Leon, R. Quarrell, G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997-3002.
- [85] R. H. P. Doezé, B. A. Maltman, C. L. Egan, R. V. Ulijn, S. L. Flitsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3138-3141.
- [86] J. Kofoed, J.-L. Reymond, *Chem. Commun.* **2007**, 4453-4455.
- [87] J. Buchardt, C. B. Schiodt, C. Krog-Jensen, J.-M. Delaissé, N. T. Foged, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 624-638.
- [88] M. Meldal, I. Svendsen, L. Juliano, M. A. Juliano, E. Del Nery, J. Scharfstein, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 83-91.
- [89] C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109-1118.
- [90] C. Schmuck, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4385-4392.
- [91] U. Machon, *Aminosäurerezeptoren auf Furan- und Pyridin-Basis*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2003**.
- [92] R. M. Adlington, J. E. Baldwin, G. W. Becker, B. Cheng, L. Cheng, S. L. Cooper, R. B. Hermann, T. J. Howe, W. McCoull, A. M. McNulty, B. L. Neubauer, G. J. Pritchard, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1491-1508.
- [93] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, M. J. C. Crabbe, T. Nomoto, C. J. Schofield, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4217-4220.
- [94] J. F. Stubbins, P. M. Hudgins, D. C. Murphy, *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 534-537.
- [95] S. Nielek, T. Lesiak, *J. Prakt. Chem.* **1988**, *330*, 825-829.
- [96] P. A. Finan, C. M. Lardner, P. T. O'Sullivan, *J. Chem. Research* **2000**, *S*, 78-79.
- [97] G. Gonis, E. D. Amschutz, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2946-2947.
- [98] P. A. Finan, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3917-3918.
- [99] T. Asami, S. Yoshida, *Heterocycles* **1994**, *38*, 2739-2746.
- [100] P. V. Desai, A. Patny, J. Gut, P. J. Rosenthal, B. Tekwani, A. Srivastava, M. Avery, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1576-1584.
- [101] E. L. Dahl, P. J. Rosenthal, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *139*, 205-212.
- [102] B. R. Shenai, P. S. Sijwali, A. Singh, P. J. Rosenthal, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29000-29010.
- [103] C. R. Caffrey, E. Hansell, K. D. Lucas, L. S. Brinen, A. Alvarez Hernandez, J. Cheng, S. L. Gwaltney II, W. R. Roush, Y.-D. Stierhof, M. Bogyo, D. Steverding, J. H. McKerrow, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *118*, 61-73.
- [104] B. K. Shoichet, *Drug Discovery Today*, **2006**, *11*, 607-615.
- [105] S. Langolf, E. Ansorge, M. Ulbricht, unveröffentl. Arbeiten, Uni Duisburg-Essen, **2008**.
- [106] SFB 630, *Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten*, Z1 Labor zur zentralen Evaluierung von potenziellen Antinfektiva, Universität Würzburg, **2008**.

- [107] C. Gelhaus, M. Leippe, unveröffentlichte Arbeiten, Institut für Zoologie, Universität Kiel, **2008**.
- [108] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [109] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 324–329.
- [110] C. Büchold, P. J. Rosenthal, unveröffentlichte Arbeiten, Department of Medicine, San Francisco, USA, **2008**.
- [111] L. Foghsgaard, D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist, M. Jäättelä, *J. Cell. Biol.* **2001**, *153*, 999-1009.
- [112] U. Käßler, *Synthese und Testung Nichtpeptidischer Cystein-Protease-Inhibitoren - Etacrynsäure als Leitstruktur*, Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- [113] J. I. Crowley, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6363-6365.
- [114] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [115] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1967**, *27*, 157-162.
- [116] Q. Xu, W. G. Gutheil, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 688-691.
- [117] C. Schmuck, P. Wich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4277-4281.
- [118] H. Fenniri, *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [119] F. Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [120] D. Obrecht, J. M. Villalgorido, *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon, Oxford, **1998**.
- [121] B. A. Bunin, *The Combinatorial Index*, Academic Press, San Diego, **1998**.
- [122] C. Kay, O. E. Lorthioir, N. J. Parr, M. Congreve, S. C. McKeown, J. J. Scicinski, S. V. Ley, *Biotechnology and Bioengineering (Combinatorial Chemistry)*, **2001**, *71*, 110-118.
- [123] F. Gaggini, A. Porcheddu, G. Reginato, M. Rodriguez, M. Taddei, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 805-810.
- [124] M. E. Attardi, G. Porcu, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7391-7394.
- [125] O. Kuisle, M. Lolo, E. Quinoá, R. Riguera, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14807-14812.
- [126] M. E. Attardi, A. Falchi, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7395-7399.
- [127] B. A. Burkett, R. C. D. Brown, M. M. Meloni, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5773–5775.
- [128] B. Yan, L. Liu, C. A. Astor, Q. Tang, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4564-4571.
- [129] M. E. Attardi, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2927.
- [130] S. K. Shannon, G. Barany, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 165-170.
- [131] J. J. Cournoyer, T. Kshirsagar, P. P. Fantauzzi, G. M. Figliozzi, T. Makdessian, B. Yan, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 120-124.
- [132] J. Vázquez, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6691-6693.
- [133] B. Yan, W. Li, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9354-9357.
- [134] W. W. Epstein, F. W. Sweat, *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 247-260.
- [135] N. Kornblum, J. W. Powers, C. J. Anderson, W. J. Jones, H. O. Larson, O. Levand, W. M. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *81*, 4113-4114.
- [136] C. Chen, L. A. Ahlberg Randall, R. B. Miller, A. D. Jones, M. J. Kurth, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2661-2662.
- [137] D. P. Rotella, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12246-12247.
- [138] K. Conde-Frieboes, R. K. Schjeltved, J. Breinholt, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8952-8957.
- [139] P. Page, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 794-799.

- [140] W.-C. Cheng, M. Wong, M. M. Olmstead, M. J. Kurth, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2041-2044.
- [141] A. B. Smith, H. Liu, H. Okumura, D. A. Favor, R. Hirschmann, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 741-744.
- [142] S. Hanessian, J. Ma, W. Wang, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4631-4634.
- [143] C. R. Johnson, B. Zhang, *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 45-51.
- [144] R. Williard, V. Jammalamadaka, D. Zava, C. C. Benz, C. A. Hunt, P. J. Kushner, T. S. Scanlan, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
- [145] M. A. Blaskovich, M. Kahn, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1119-1125.
- [146] T. Groth, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 34-44.
- [147] J. Rademann, M. Meldal, K. Bock, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1218-1225.
- [148] N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3152-3155.
- [149] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
- [150] J. Tulla-Puche, G. Barany, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2195-2202.
- [151] S. Liu, R. P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1067-1075.
- [152] M. Pinza, G. Pifferi, *J. Pharm. Sci.* **1977**, *14*, 120-121.
- [153] J.-J. Bourguignon, A. Schoenfelder, M. Schmitt, C.-G. Wermuth, V. Hechler, B. Charlier, M. Maitre, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 893-897.
- [154] B. Neises, W. Steglich, *Organic Syntheses* **1990**, *7*, 93.
- [155] P. Zaderenko, M. C. López, P. Ballesteros, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6825-6828.
- [156] S. E. Denmark, A. Thorarensen, D. S. Middleton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8266-8277.
- [157] P. A. Clarke, R. L. Davie, S. Peace, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2753-2756.
- [158] L. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. Yin, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6918-6920.
- [159] G. W. Wheeler, A. W. Ingersoll, *J. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4604-4606.
- [160] A. V. Reddy, B. Ravindranath, *Synth. Comm.* **1992**, *22*, 257-264.
- [161] V. K. Yadav, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7047-7051.
- [162] R. Murugan, E. F. V. Scriven, *Aldrichimica Acta* **2003**, *36*, 21-27.
- [163] L. Lapatsanis, G. Miliadis, K. Froussios, M. Kolovos, *Synthesis* **1983**, 671-673.
- [164] R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Nájera, J. M. Soriano, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7579-7581.
- [165] C. Schmuck, V. Bickert, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4579-4581.
- [166] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 2. ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1992**.
- [167] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **1995**.
- [168] H. Günzler, M. H. Heise, *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*, 3. ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1996**.
- [169] Barbara Geibel, *Entwurf und Synthese biomimetischer Kohlenhydratrezeptoren*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2007**.
- [170] L. Geiger, *The Versatile Use of Guanidiniocarbonylpyrroles: from Self-Assembly to Peptide Recognition*, Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	Et	Ethyl
Ac	Acetyl	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
AIBN	N,N'-Azo-bis-isobutyronitril	FP-2	Falcipain-2
Ala	Alanin	FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin	Fum	Fumarsäure
AP	alkalische Phosphatase	g	Gramm
Arg	Arginin	Gln	Glutamin
Asn	Asparagin	Glu	Glutaminsäure
Asp	Asparaginsäure	Gly	Glycin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	h	Stunde(n)
Bn	Benzyl	HCTU	2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorophosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl		
C1-Ac	$\beta$ -Acetylamino-L-alanin	HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
Cbz	Benzyloxycarbonyl	HyCr	4-Hydroxycrotonsäure
CD	Circulardichroismus	Hz	Hertz
Chg	Cyclohexylglycin	IC	inhibitory concentration
Cys	Cystein	Ile	Isoleucin
d	Tag(e)	IR	Infrarot
D	Deuterium	K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
DBU	Diazabicycloundecan	Leu	Leucin
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Lys	Lysin
DLS	dynamische Lichtstreuung	MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation - time of flight
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin		
DMF	N,N-Dimethylformamid	MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid	Me	Methyl
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin	mg	Milligramm
DTT	Dithiothreitol	MHz	Megahertz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	min	Minute(n)
EI	Elektronenionisation	MMP	Matrix-Metallo-Protease
ESI	Elektronenspray-Ionisation	MTS	Methyltrichlorsilan

NBS	N-Bromsuccinimid	TPCK	Tosylphenylalanylchlormethylketon
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	UV	ultraviolett
neg	negativ	Val	Valin
nm	Nanometer		
NMR	nuclear magnetic resonance		
NMM	N-Methylmorpholin		
PEG	Polyethylenglykol		
P.f.	Plasmodium falciparum		
Phg	Phenylglycin		
Phe	Phenylalanin		
PNBP	p-Nitrobenzylpyridin		
pos	positiv		
ppm	parts per million		
PS	Polystyrrol		
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophos- pho-niumhexafluorophosphat		
Rd	Rhodesain		
RP	reversed phase		
RT	Raumtemperatur		
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome		
Ser	Serin		
ST	Streptavidin		
Su	Succinimid		
Tab.	Tabelle		
T.b.b.	Trypanosoma brucei brucei		
<sup>t</sup> Bu	tert-Butyl		
TCT	Trichlortriazin		
TFA	Trifluoressigsäure		
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure		
THF	Tetrahydrofuran		
Thr	Threonin		
Tos	Tosyl		

### 9.3 Messergebnisse des Festphasenscreenings an Falcipain-2 und Rhodesain

Archiv	P3	P2	P1	P1'	Rd (%)	FP-2 (%)
1-G01	Ala	Chg	Ala	Ala	26	38
1-G05	Leu	Chg	Ala	Ala	59	43
2-B10	Val	Chg	Ala	Ala	34	57
1-B04	Ala	Ile	Ala	Ala	9	37
1-E11	Leu	Ile	Ala	Ala	49	54
2-E04	Val	Ile	Ala	Ala	34	30
1-C03	Ala	Leu	Ala	Ala	31	62
1-A04	Leu	Leu	Ala	Ala	67	58
2-C05	Val	Leu	Ala	Ala	59	40
1-H06	Ala	Phe	Ala	Ala	18	51
2-B04	Leu	Phe	Ala	Ala	66	57
1-G10	Val	Phe	Ala	Ala	55	35
1-B05	Ala	Phg	Ala	Ala	25	57
1-A08	Leu	Phg	Ala	Ala	72	55
1-D03	Val	Phg	Ala	Ala	50	38
1-B02	Ala	Chg	Asn	Ala	36	45
2-B08	Leu	Chg	Asn	Ala	66	40
1-A02	Val	Chg	Asn	Ala	50	62
1-H11	Ala	Ile	Asn	Ala	17	38
1-D12	Leu	Ile	Asn	Ala	60	47
2-D11	Val	Ile	Asn	Ala	21	33
2-E03	Ala	Leu	Asn	Ala	42	33
1-F04	Leu	Leu	Asn	Ala	59	57
1-C10	Val	Leu	Asn	Ala	50	43
2-D07	Ala	Phe	Asn	Ala	47	25
1-E04	Leu	Phe	Asn	Ala	64	58
1-E05	Val	Phe	Asn	Ala	53	54
1-D02	Ala	Phg	Asn	Ala	44	35
1-F12	Leu	Phg	Asn	Ala	55	55
1-D07	Val	Phg	Asn	Ala	37	51
1-A07	Ala	Chg	C1(Ac)	Ala	29	35
1-H08	Leu	Chg	C1(Ac)	Ala	51	56
1-A03	Val	Chg	C1(Ac)	Ala	46	40
2-A09	Ala	Ile	C1(Ac)	Ala	26	28
1-G08	Leu	Ile	C1(Ac)	Ala	61	32
2-D05	Val	Ile	C1(Ac)	Ala	49	52
2-A12	Ala	Leu	C1(Ac)	Ala	19	28
1-E12	Leu	Leu	C1(Ac)	Ala	63	41
2-D01	Val	Leu	C1(Ac)	Ala	60	35
2-C09	Ala	Phe	C1(Ac)	Ala	17	13
1-E10	Leu	Phe	C1(Ac)	Ala	52	43
1-H12	Val	Phe	C1(Ac)	Ala	44	32

Kapitel 9

Archiv	P3	P2	P1	P1'	Rd (%)	FP-2 (%)
1-C04	Ala	Phg	C1(Ac)	Ala	34	35
1-F02	Leu	Phg	C1(Ac)	Ala	56	52
2-A03	Val	Phg	C1(Ac)	Ala	36	20
1-A05	Ala	Chg	Gln	Ala	39	55
2-E06	Leu	Chg	Gln	Ala	52	47
1-C09	Val	Chg	Gln	Ala	43	47
2-C07	Ala	Ile	Gln	Ala	29	43
1-C11	Leu	Ile	Gln	Ala	47	46
2-E01	Val	Ile	Gln	Ala	38	54
1-E09	Ala	Leu	Gln	Ala	7	54
1-H09	Leu	Leu	Gln	Ala	56	55
1-B01	Val	Leu	Gln	Ala	64	48
1-F07	Ala	Phe	Gln	Ala	30	25
1-F01	Leu	Phe	Gln	Ala	60	49
1-E06	Val	Phe	Gln	Ala	45	58
2-A02	Ala	Phg	Gln	Ala	12	55
1-D06	Leu	Phg	Gln	Ala	68	30
1-D11	Val	Phg	Gln	Ala	34	46
2-D03	Ala	Chg	Phe	Ala	21	29
2-D12	Leu	Chg	Phe	Ala	49	56
1-H05	Val	Chg	Phe	Ala	49	45
1-B11	Ala	Ile	Phe	Ala	40	29
1-B08	Leu	Ile	Phe	Ala	61	51
2-B11	Val	Ile	Phe	Ala	43	45
1-A06	Ala	Leu	Phe	Ala	49	45
2-C01	Leu	Leu	Phe	Ala	69	62
2-A07	Val	Leu	Phe	Ala	45	36
1-G07	Ala	Phe	Phe	Ala	37	30
2-A06	Leu	Phe	Phe	Ala	54	47
2-A05	Val	Phe	Phe	Ala	38	37
2-B05	Ala	Phg	Phe	Ala	47	34
1-H10	Leu	Phg	Phe	Ala	68	53
2-C03	Val	Phg	Phe	Ala	77	58
2-A11	Ala	Chg	Ala	Gly	26	31
1-D08	Leu	Chg	Ala	Gly	60	43
2-B09	Val	Chg	Ala	Gly	40	54
1-F03	Ala	Ile	Ala	Gly	31	54
2-C08	Leu	Ile	Ala	Gly	58	61
2-D10	Val	Ile	Ala	Gly	33	32
1-A10	Ala	Leu	Ala	Gly	40	57
2-B03	Leu	Leu	Ala	Gly	65	55
1-E07	Val	Leu	Ala	Gly	55	29
1-E03	Ala	Phe	Ala	Gly	45	44
1-E01	Leu	Phe	Ala	Gly	67	68
1-F10	Val	Phe	Ala	Gly	48	27

Kapitel 9

Archiv	P3	P2	P1	P1'	Rd (%)	FP-2 (%)
1-D10	Ala	Phg	Ala	Gly	16	41
1-C05	Leu	Phg	Ala	Gly	54	53
1-F11	Val	Phg	Ala	Gly	36	56
1-F05	Ala	Chg	Asn	Gly	26	73
1-E02	Leu	Chg	Asn	Gly	69	45
1-D04	Val	Chg	Asn	Gly	46	61
2-C12	Ala	Ile	Asn	Gly	55	63
2-B06	Leu	Ile	Asn	Gly	68	61
1-D09	Val	Ile	Asn	Gly	39	57
2-A04	Ala	Leu	Asn	Gly	24	41
1-C12	Leu	Leu	Asn	Gly	71	70
2-A01	Val	Leu	Asn	Gly	52	48
2-C06	Ala	Phe	Asn	Gly	66	61
1-B09	Leu	Phe	Asn	Gly	61	51
1-C08	Val	Phe	Asn	Gly	28	40
1-A11	Ala	Phg	Asn	Gly	48	64
1-G06	Leu	Phg	Asn	Gly	50	70
1-D01	Val	Phg	Asn	Gly	45	50
1-G12	Ala	Chg	C1(Ac)	Gly	25	23
1-C06	Leu	Chg	C1(Ac)	Gly	75	26
1-A09	Val	Chg	C1(Ac)	Gly	52	52
1-B07	Ala	Ile	C1(Ac)	Gly	29	29
1-G11	Leu	Ile	C1(Ac)	Gly	60	33
1-A01	Val	Ile	C1(Ac)	Gly	41	28
1-H04	Ala	Leu	C1(Ac)	Gly	32	32
1-B03	Leu	Leu	C1(Ac)	Gly	60	54
1-C01	Val	Leu	C1(Ac)	Gly	54	41
2-D04	Ala	Phe	C1(Ac)	Gly	15	45
1-H02	Leu	Phe	C1(Ac)	Gly	51	59
2-B07	Val	Phe	C1(Ac)	Gly	61	46
2-C11	Ala	Phg	C1(Ac)	Gly	36	37
1-B06	Leu	Phg	C1(Ac)	Gly	66	38
2-E05	Val	Phg	C1(Ac)	Gly	40	25
2-E02	Ala	Chg	Gln	Gly	31	40
2-B02	Leu	Chg	Gln	Gly	71	45
1-B12	Val	Chg	Gln	Gly	53	51
1-D05	Ala	Ile	Gln	Gly	38	38
1-C07	Leu	Ile	Gln	Gly	52	44
1-H01	Val	Ile	Gln	Gly	37	30
2-D02	Ala	Leu	Gln	Gly	38	40
1-B10	Leu	Leu	Gln	Gly	69	42
1-H07	Val	Leu	Gln	Gly	54	54
1-A12	Ala	Phe	Gln	Gly	41	54
2-D06	Leu	Phe	Gln	Gly	57	62
2-A08	Val	Phe	Gln	Gly	42	51



Kapitel 9

<b>Archiv</b>	<b>P3</b>	<b>P2</b>	<b>P1</b>	<b>P1'</b>	<b>Rd (%)</b>	<b>FP-2 (%)</b>
2-D09	Ala	Phg	Gln	Gly	17	34
1-E08	Leu	Phg	Gln	Gly	62	50
1-G04	Val	Phg	Gln	Gly	45	63
2-C10	Ala	Chg	Phe	Gly	48	65
1-C02	Leu	Chg	Phe	Gly	57	40
1-F09	Val	Chg	Phe	Gly	49	48
1-H03	Ala	Ile	Phe	Gly	30	52
2-B12	Leu	Ile	Phe	Gly	73	58
2-C02	Val	Ile	Phe	Gly	50	58
2-C04	Ala	Leu	Phe	Gly	71	45
1-G02	Leu	Leu	Phe	Gly	69	69
1-G03	Val	Leu	Phe	Gly	58	46
1-F08	Ala	Phe	Phe	Gly	47	43
2-A10	Leu	Phe	Phe	Gly	52	41
1-G09	Val	Phe	Phe	Gly	51	60
1-F06	Ala	Phg	Phe	Gly	51	62
2-B01	Leu	Phg	Phe	Gly	71	40
2-D08	Val	Phg	Phe	Gly	68	35