

**SYNTHESE UND TESTUNG
CIS-KONFIGURIERTER AZIRIDINE
ALS PSEUDO-IRREVERSIBLE INHIBITOREN
DER SEKRETORISCHEN ASPARTATPROTEASEN
VON *CANDIDA ALBICANS***



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

**VORGELEGT VON
DIPLOM-CHEMIKER CHRISTIAN BÜCHOLD
AUS WÜRZBURG**

WÜRZBURG 2009

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck

der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

2. Prüfer: Prof. Dr. Carsten Schmuck

3. Prüfer: Prof. Dr. Anke Krüger

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2006 bis Juni 2009 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Frau Prof. Dr. T. Schirmeister danke ich für
die ständige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit,
die gewährten wissenschaftlichen Freiräume
sowie die exzellenten Arbeitsbedingungen
und die Ermöglichung zweier Forschungsaufenthalte
in San Francisco und Messina.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von Publikationen^[142,184,185] sowie von Posterpräsentationen und Vorträgen.

Danksagung

Allen voran möchte ich Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die attraktive, interdisziplinäre Themenstellung in einem praxisorientierten Forschungsgebiet danken. Der fortwährende Dialog und das angenehme Arbeitsklima trugen dabei entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Weiterhin danke ich ihr für das mir entgegengebrachte Vertrauen, gleich als „Anfänger“ die Praktikumsleitung des 3. Semesters übernehmen zu dürfen. Ihre großzügige Unterstützung ermöglichte zwei grandiose Forschungsaufenthalte in San Francisco und Messina.

Weiterhin danke ich folgenden Kooperationspartnern und Wissenschaftlern für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit:

- Prof. Dr. Philip Rosenthal und Dr. Jiri Gut, Division of Infectious Diseases, University of California, San Francisco, für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit der Durchführung von Studien an Falcipain 2 & 3 und *Plasmodium falciparum*.
- Prof. Silvana Grasso und Dr. Nicola Micale, Dipartimento Farmaco-Chimico, Università di Messina, für die Aufnahme ins Laboratorio 507 und den Einblick in die Synthese von peptidomimetischen Inhibitoren.
- Prof. Dr. Joachim Morschhäuser und Sabrina Schneider, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an den *Candida-albicans*-Zellkulturen und die Möglichkeit, die SAP-Isoenzyme 1, 2, 3 & 8 in ihrem Labor selbst exprimieren zu dürfen.
- Prof. Dr. Knut Baumann und Dr. Sebastian Rohrer, Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, für die Durchführung der Docking-Experimente.
- Prof. Dr. Matthias Leippe, Dr. Christoph Gelhaus und Astrid Evers, Institut für Zoologie, Universität Kiel, für die Affinitätsstudien mit Streptavidin-Konjugaten.
- Prof. Dr. Caroline Kisker und Uwe Dietzel, Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg, für die Überlassung von Rhodesain und SARS-CoV-PL^{pro}.
- Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann, Barbara Hertlein und Yasmin Hemberger, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der HPLC-CD-Spektroskopie.
- Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Dr. Christoph Albert, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Studien zur Proteinbindung.
- PD Dr. August Stich und Dr. Tobias Ölschläger, Teilprojekt Z1 des SFB630, Universität Würzburg, für die Testungen an Bakterien, Parasiten und Makrophagen.

- Prof. Dr. Gerhard Klebe und Helene Krüger, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg, für der Versuche zur Co-Kristallisation.
- Dr. Bernd Reyer, Dr. Curd Schollmayer sowie Georg Walter, Matthias Völker und Karl Vollmuth, den Jungs von der Werkstatt, danke ich für die Einführung in HTML und NMR bzw. die Unterstützung bei technischen und handwerklichen Problemen.

Großer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Schirmeister, als da wären Dr. Radim Vičík, Dr. Björn Degel, Dr. Franziska Schulz, Markus Schiller, Thomas Pfeuffer, Alexander Breuning, Caroline Schad, Monika Herb, Magdalena Schneider, Armin Welker, Martin Stempka, Verena Buback, Cornelia Heindl, Paula Tabares, Constanze Waltenberger, Qing Ye, Roswitha Scheblein, Thomas Schneider, Thilo Waag, Matthias Rappold, Philipp Fey, Hongmei Wu, Swarna Oli, für die einzigartige Atmosphäre und Unterstützung in jeder erdenklichen Form, die neben dem fachlichen und privaten Austausch maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Ihr seid die Größten!

Für ihre tatkräftige Unterstützung möchte ich meinen F-Praktikanten Barbara Breitenbücher, Eva Siedler, Caroline Schad, Bei Shi und Magdalena Schneider danken. Mit etwas Stolz erfüllen mich dabei vor allem Caro und Maggie, deren Weg im Anschluss gar dauerhaft in unseren AK geführt hat.

Meinen Mitstreitern bei der Betreuung des 3. Semesters Dr. Yvonne Martin, Dr. Mohammed Attia, Stefan Ries, Martin König, Jessica Klöckner, Monika Herb, Daniel Cappel, Christian Markl, Verena Buback, Ulrike Schmid und Markus Zettner danke ich für die tolle Zusammenarbeit. Nach unserer Einführung neuer Synthesen konnten wir das Praktikum stets weiterentwickeln und qualitativ aufwerten. Hat Spaß gemacht mit euch!

Meinen Korrekturleserinnen Sophie und Cordula möchte ich für das Auffinden von Fehlern danken, die Tanja und mir verborgen blieben. Wer weitere Fehler findet, darf sie behalten.

Letztlich danke ich noch Sophie für ihr Verständnis und ihre bedingungslose Liebe. Allein schon Deine Anwesenheit war Antagonist, um nach so manch ärgerlichem Labortag das Gleichgewicht wieder herzustellen.

FÜR SOPHIE & CHARLY

EIGENARTIG

EIGENARTIG

WIE DAS WORT EIGENARTIG

ES FAST ALS FREMDARTIG HINSTELLT

EINE EIGENE ART ZU HABEN

ERICH FRIED (1921-1988)

Inhaltsverzeichnis

Allgemeiner Teil.....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Aspartatproteasen	3
1.2 Aufbau und Struktur von Aspartatproteasen des Clans AA.....	7
1.3 Katalysemechanismus von Aspartatproteasen.....	11
1.4 Inhibitoren von Aspartatproteasen.....	12
1.5 Hemmung von <i>Candida albicans</i>	22
1.6 Hemmung von Parasiten	23
2 Zielsetzung	25
3 Synthesen.....	29
3.1 Vorstufen	29
3.2 Synthese von <i>cis</i> -konfigurierten Aziridinen.....	30
3.3 Aminosäure-Verknüpfung von Aziridinen	34
3.4 Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrol-verknüpften Aziridins.....	37
3.5 Olefinsynthesen	42
3.6 Synthese des Biotin-markierten Aziridins	45
3.7 Cyclisierungsreaktionen.....	46
3.8 Darstellung von <i>N</i> -Peptidylaziridinen.....	47
4 Enzymassays	48
4.1 Allgemeine Einführung.....	48
4.2 Enzymkinetik.....	48
4.3 Testungen an Aspartatproteasen	53
4.4 Testungen an Cystein- und Serinproteasen	64
5 Biochemische und biologische Untersuchungen.....	70
5.1 Einführung	70
5.2 Antibakterielle Aktivität.....	70
5.3 Antifungale Aktivität	71
5.4 Antiparasitäre Aktivität	71
5.5 Cytotoxizität	75
5.6 Proteinbindung.....	77
6 Pseudo-irreversible Hemmung	80
6.1 Zeitabhängige Hemmung	80
6.2 Aufklärung des Hemmmechanismus	81
6.3 pH-Abhängigkeit der Hemmung	87

7	Dockingstudien	89
8	Affinitätsstudien mit Streptavidin-Konjugaten	91
8.1	Einfluss auf die Morphologie des Parasiten	92
8.2	Affinitäts-Fluoreszenz-Markierung	92
8.3	Affinitätschromatographie	93
8.4	Bindungsstellenanalyse	94
9	Diskussion	95
9.1	Struktur-Wirkungsbeziehung an Aspartatproteasen	95
9.2	Pseudo-irreversible Hemmung	99
9.3	Selektivitätsstudien an Cystein- und Serinproteasen	99
9.4	Hemmung von Mikroorganismen	100
9.5	Nebenprojekte	102
10	Zusammenfassung	104
11	Ausblick	110
12	Summary	113
	Experimenteller Teil	119
13	Allgemeine Angaben	119
13.1	Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden ...	119
13.2	Enzyme, Substrate, Zellkulturen und Synthesechemikalien	120
13.3	Arbeitsmethoden	121
13.4	Fluorimetrische Enzym-Assays	121
13.5	Zellkultur-Assay	124
13.6	Enzym-Gewinnung	124
14	Allgemeine Synthesemethoden	125
14.1	Aziridinsynthesen	125
14.2	Peptidkupplungen	125
14.3	Esterhydrolysen	127
14.4	Carbonsäurederivatisierung	127
14.5	Schutzgruppen	128
14.6	Olefinsynthesen	130
14.7	Diverse Synthesen	130
15	Synthesevorschriften	133
15.1	Diverse Bausteine	133
15.2	Aziridin-Bausteine	141
15.3	Aziridin-Endstufen	159
15.4	<i>E</i> -Olefine	205
15.5	<i>Z</i> -Olefine	210

15.6	Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein	211
15.7	Cyclisierungsreaktionen.....	215
Appendix		218
16	Abkürzungsverzeichnis	218
17	Literaturverzeichnis.....	220
18	Formelregister	229
19	Veröffentlichungen	234
19.1	Publikationen	234
19.2	Vorträge	234
19.3	Posterpräsentationen.....	235

Allgemeiner Teil

1 Einleitung

Enzyme sind Biomoleküle, überwiegend Proteine, die biologische Systeme durch Stabilisierung des Übergangszustands der jeweilig ablaufenden chemischen Reaktion katalysieren.^[1]

Das NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) teilt Enzyme nach dem numerischen EC-System (Enzyme Commission numbers) in sechs Hauptklassen ein: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen.^[2]

Proteasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Proteinen und Peptiden und werden der Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4) zugeordnet. Eine weitere Unterteilung erfolgt nach der Position der Spaltstelle innerhalb des Substrats in Endopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Exopeptidasen (EC 3.4.21-99).^[3]

Die MEROPS-Datenbank^[4] klassifiziert Proteasen auf Grundlage ihrer Aminosäuren im aktiven Zentrum in Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin-, Metallo- und den kürzlich in Pilzen entdeckten Glutamatproteasen^[5,6] (Abbildung 1).

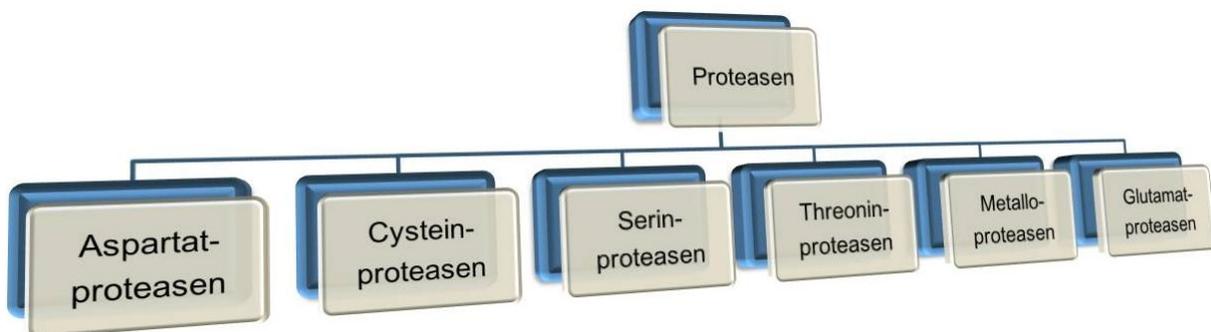


Abbildung 1: Klassifizierung von Proteasen nach MEROPS.

Weiterhin werden Enzyme mit statistisch signifikant ähnlichen Aminosäuresequenzen in Familien zusammengefasst. Familien, von denen angenommen wird, dass sie sich aus gemeinsamen Vorläuferproteinen entwickelt haben, werden in Clans gruppiert. Proteasen des gleichen Clans sind sich in ihren Tertiärstrukturen und/oder in ihren Aminosäuresequenzen im Bereich des aktiven Zentrums ähnlich.^[7]

Die Beteiligung von Proteasen an Proteinsynthese, -umsatz und -funktion erlaubt ihnen physiologische Prozesse wie Verdauung, Befruchtung, Wachstum, Differenzierung, Immunabwehr, Wundheilung, Apoptose, Zellmigration und Signalübertragung zu regulieren.^[8] Allerdings können Proteasen auch bei pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen, wodurch sie sich zunehmend zu vielversprechenden Targets für Inhibitoren entwickeln.^[9] Es gibt inzwischen viele wirksame und selektive Proteaseinhibitoren, die das Fortschreiten von

Krankheiten verlangsamen oder gar stoppen. Als pharmazeutisches Werkzeug müssen sie nicht nur sehr wirksam sein, sondern auch hochselektiv an die Zielprotease binden. Des Weiteren müssen sie als potentielle Arzneimittel geeignete pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften besitzen. Hinweise darauf, wie spezifisch Proteasen Moleküle erkennen, kommen oftmals von ihren peptidischen Substraten.^[8] Obwohl Peptide vielfältige biologische Eigenschaften zeigen, sind ihre Einsatzmöglichkeiten aufgrund ihrer Instabilität, geringen Bioverfügbarkeit und pharmakologischen Eigenschaften eingeschränkt. Um als potentielles Arzneimittel in Frage zu kommen, sollten Proteaseinhibitoren minimalen peptidischen Charakter, eine hohe Stabilität gegenüber proteolytischer Zersetzung, eine gute Membranpermeabilität, eine hohe Lebensdauer in Zellen und Blut, eine geringe Anfälligkeit gegenüber Eliminierung, eine hohe Selektivität gegenüber der Targetprotease und eine gute Bioverfügbarkeit besitzen. Moleküle, die diese Eigenschaften erfüllen, haben meistens ein Molekulargewicht von weniger als 600 Da.^[10]

Proteasen hydrolysieren ihre peptidischen Substrate sequenzselektiv oder sogar -spezifisch. Die Erkennung peptidischer Substrate mit passenden Aminosäureseitenketten erfolgt über die Größe und Hydrophilie bzw. Lipophilie und der räumlichen Anordnung der Taschen im Enzym. Die Nomenklatur nach Schechter und Berger (Abbildung 2)^[11] bezeichnet die Substrat- bzw. Inhibitorreste von der Spaltstelle zum *N*-Terminus hin mit P_x ($x = 1, 2, \dots$), zum *C*-Terminus hin mit P_x' . Die korrespondierenden Bindungstaschen im Enzym werden mit S_x bzw. S_x' bezeichnet.

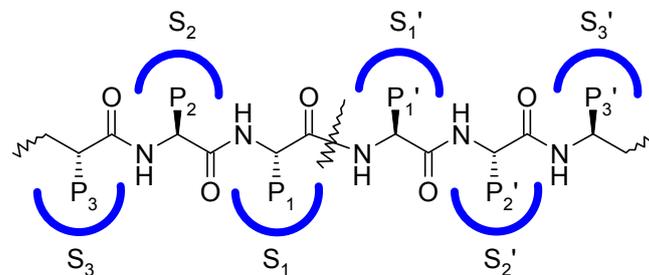


Abbildung 2: Nomenklatur für Substratreste und ihre korrespondierenden Bindungstaschen

Die molekulare Erkennung von Substraten erfolgt über nicht-kovalente spezifische Wechselwirkung der Peptidsequenz mit den Bindungstaschen. Dabei spielt auch die Konformation des peptidischen Rückgrats eine Rolle.^[12,13] Kenntnisse über Substratsequenz und optimale Konfiguration der Substrate erlauben die Entwicklung von konformativ maßgeschneiderten Inhibitoren, die neben ihren molekularen Rezeptoreigenschaften entropisch begünstigt an das Enzym binden können.^[8]

1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Aspartatproteasen

Aspartatproteasen stellen als Enzymfamilie eine eher kleine Gruppe dar, die jedoch aufgrund ihrer signifikanten Rollen bei zahlreichen physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen von besonderem Interesse ist.^[14] Die Funktion dieser nur als Endopeptidasen vorkommenden Enzyme benötigt für gewöhnlich eine saure Umgebung, wodurch ihre Wirkung auf spezielle Regionen in verschiedenen Organismen beschränkt ist. Trotzdem sind Aspartatproteasen weit verbreitet und wurden in Bakterien, Archae-Bakterien, Viren, Parasiten, Pilzen, Pflanzen, Säugetieren und somit auch dem Menschen gefunden.^[15,16] Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Vorkommen ausgewählter Aspartatproteasen und ihre Klassifizierung nach MEROPS.^[4]

Tabelle 1: Klassifizierung ausgewählter Aspartatproteasen nach MEROPS.

<i>Clan</i>	<i>Familie</i>	<i>ausgewählte Proteasen</i>	<i>Vorkommen</i>
AA	A1	Pepsin	Mensch, Tier
		Chymosin	Tier
		Renin	Mensch, Tier
		Cathepsin D & E	Mensch, Tier
		BACE1 & 2	Mensch
		SAP1-10	Pilze
		Plasmepsin I, II, IV & V	Parasiten
	A2	HIV-1-Protease	Viren
		SIV-Protease	Viren
AB	A6	Nodavirus-Peptidase	Viren
	A21	Tetravirus-Peptidase	Viren
AC	A8	Signal-Peptidase II	Bakterien, Pflanzen
AD	A22	Presenilin 1 & 2	Mensch
	A24	Prepilin-Peptidase 1 & 2 Reflagellin-Peptidase	Bakterien Archae-Bakterien
AE	A25	gpr-Endopeptidase	Bakterien
	A31	HybD-Peptidase	Bakterien
AF	A26	Omptin	Bakterien
A-	A5	Thermopsin	Archae-Bakterien

BACE: β -Sekretase, β -site APP cleaving enzyme, Memapsin 2

SAP: sekretorische Aspartatprotease

HIV: human immunodeficiency virus

SIV: simian immunodeficiency virus

gpr: germination protease

HybD: hydrogenase-processing endopeptidase

Die Verdauungsenzyme Pepsin und Chymosin^[14] spielen eine wichtige physiologische Rolle im Verdauungstrakt von Säugetieren, ebenso wie Renin im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).^[17] Dabei spaltet Renin das α_2 -Globulin Angiotensinogen zum Decapeptid Angiotensin I. Dieses wird dann durch ACE (Angiotensin converting enzyme), einer Zn-

Metalloprotease, in das Octapeptid Angiotensin II umgewandelt, welches unter anderem den Blutdruck erhöht. Eine Fehlregulation dieses Systems führt von Bluthochdruck bis hin zu Herzversagen und kann durch den Einsatz entsprechender Inhibitoren behandelt werden.^[14,18]

Die β -Sekretase BACE (β -site APP cleaving enzyme, Memapsin 2)^[14] und Cathepsin D (CathD)^[19] spielen bei einer Reihe von neurologischen Störungen eine Rolle, darunter auch der Alzheimer-Demenz. Eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme in Alzheimer-Patienten steht dabei in Zusammenhang mit dem Auftreten sogenannter „seniler Plaques“, die als Auslöser des Verlusts von Nervenzellen gelten. Diese senilen Plaques enthalten das Amyloid-Beta-Peptid (A β), das durch Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) durch BACE und Cathepsin D gebildet wird. Auch hier könnten Inhibitoren das Fortschreiten der Krankheit anhalten oder verhindern.

Eine weitere Rolle kommt Cathepsin D, das im sauren Milieu von Lysosomen gebildet wird, bei der Tumordinvasion und der Metastasierung von Krebs zu.^[20,21] In diesem Zusammenhang könnte Cathepsin D als Marker für den Krebsstatus sowie als Target für die Therapie eingesetzt werden. Aufgrund seiner Rolle als Wachstumsfaktor ist das enzymatisch inaktive Procathepsin D von besonderem Interesse. Dieses Glycoprotein ist über Asn70 und Asn199 mit Oligosacchariden verknüpft, die mit zwei Mannose-6-phosphat-Resten modifiziert sind.^[22,23] Die Funktion von Procathepsin D als autokriner Wachstumsfaktor wurde dabei in Brust-, Prostata-, Eierstock- und Lungenkrebszellen nachgewiesen.^[24-30]

Die parasitäre Tropenkrankheit Malaria wird von Parasiten der Gattung *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale*), die über die *Anopheles*-Stechmücke übertragen werden, ausgelöst.^[31-33] Dabei kommt es jährlich zu ca. 250 Millionen Infektionen, von denen nach aktuellen Schätzungen fast eine Millionen tödlich enden.^[34] Aufgrund der globalen Erwärmung und zunehmender Resistenzen der Überträgermücken und der Parasiten gegen Insektizide bzw. Arzneimittel wird ein weiterer Anstieg dieser Zahlen erwartet. Im erythrocytären Lebenszyklus des Parasiten kommt es zum Abbau von Hämoglobin im Wirt. Für diesen Weg der Nahrungsaufnahme greift *P. falciparum*, der für den Menschen gefährlichste Erreger, neben den Cysteinproteasen Falcipain 1, 2 & 3^[35] auf die Aspartatproteasen Plasmepsin I, II & IV sowie die Histo-Aspartatprotease HAP zurück.^[33] Insgesamt weist das Genom von *P. falciparum* mindestens zehn Gene für Aspartatproteasen (Plasmepsin I, II, IV-X, HAP) auf.^[36] Weiterhin sind die Metalloprotease Falcilysin^[37] sowie DPAP1 (Dipeptidyl-Aminopeptidase 1)^[38] in den für das Wachstum des Parasiten essentiellen Metabolismus der Hämoglobinspaltung involviert. Dabei spielen vor allem die Falcipaine oder Plasmepsine eine wichtige Rolle in den frühen Stadien des Hämoglobinabbaus, der wohl von den Plasmepsinen initiiert wird.^[39-41] Während die Hemmung einzelner vakuolärer Plasmepsine vom Parasiten nahezu kompensiert werden kann,^[42,43] scheint Falcipain 3 die einzige essentielle vakuo-

läre Protease von *P. falciparum* zu sein.^[44] Damit stellen beide Enzymklassen geeignete Targets für potentielle Arzneistoffe gegen Malaria dar.^[33,45] Für eine effektive Hemmung sollten potentielle Wirkstoffe dabei an möglichst vielen der vakuolären Proteasen wirken.

Die Infektion mit dem HI-Virus (human immunodeficiency virus), die zum Ausbruch der Immunschwäche-Krankheit AIDS (acquired immune deficiency syndrome) führt, gehört zu den weltweit größten viralen Bedrohungen und fordert jährlich 2.5 Millionen Todesfälle bei derzeit 40 Millionen Infizierten.^[46-48] Innerhalb der pathophysiologischen Prozesse dieser Pandemie stellte sich mit der HIV-1-Protease eine Aspartatprotease als geeignetes Target für Inhibitoren heraus. Grund dafür ist die essentielle Rolle der Protease in der Replikation des Retrovirus.^[47,49] Neben Problemen mit Wasserlöslichkeit, schlechter Membranpermeabilität, hoher Proteinbindung und der unzureichenden metabolischen Stabilität, die schlechte pharmakokinetische Eigenschaften bedingen und hohe Dosen erfordern, treten bei im klinischen Einsatz befindlichen Inhibitoren besonders Probleme mit der schnellen Replikation des Retrovirus auf. Dabei entstehen während der viralen Transkription der RNA in DNA eine hohe Anzahl an Abweichungen, die zu einer großen Zahl mutierter viraler Stämme und damit auch zu Resistenzen gegen die verabreichten Arzneimittel führen.^[50]

Als Tiermodell für die Testung von neuen Therapeutika, die die HIV-1-Protease adressieren, dienen mit SIV (simian immunodeficiency virus) infizierte Rhesusaffen.^[51] Dieses Virus wurde in über 30 Arten von Primaten gefunden und verursacht eine Krankheit, die dem menschlichen AIDS ähnelt. Das aktive Zentrum der SIV-Protease unterscheidet sich dabei in nur drei von 13 Aminosäuren von dem der HIV-1-Protease. Weiterhin sind mindestens zwei Fälle bekannt, in denen SIV von Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde.^[52] Dies führte einmal zu einer AIDS-Pandemie und in einem anderen Fall zur Infektion einiger weniger Individuen. In einem dritten Fall konnte der primatische SIV-Überträger nicht identifiziert werden.^[53,54]

Ein interessanter Zusammenhang wird bezüglich des gemeinsamen Auftretens von HIV- und Malariainfektionen beobachtet. Neben der geographischen Überschneidung dieser beiden Infektionskrankheiten in Afrika südlich der Sahara verdichten sich Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung.^[46,55,56]

Der Hefepilz *Candida albicans* (lat. *candidus*: glänzend weiß; *albicare*: weiß werden) tritt als harmloser Begleiter in der humanen Mikroflora auf.^[57] Bei 50 % der Bevölkerung wird er auf Schleimhäuten der Mundhöhle und des Magen-Darm-Trakt sowie in der vaginalen Flora gefunden.^[58] Jedoch kann dieser opportunistische Organismus besonders bei Menschen, deren Immunsystem geschwächt wurde, zu oberflächlichen, aber auch lebensbedrohlichen systemischen Infektionen führen. Davon sind Menschen mit Diabetes, Krebs- oder AIDS-Erkrankungen betroffen oder Menschen, deren Immunabwehr durch Immunsuppressiva nach Organtransplantationen oder den Einsatz von Breitband-Antibiotika oder Steroiden ge-

schwächt wurde.^[59] Neben den Schleimhäuten werden dabei vor allem innere Organe wie Lunge, Herz, Leber, Bauchspeicheldrüse, Niere oder das zentrale Nervensystem befallen.^[57] Im fortgeschrittenen Stadium führen systemische Mykosen durch *Candida*, auch in Verbindung mit Resistenzen gegen gebräuchliche Pharmazeutika, zu hohen Mortalitätsraten.^[60] Wie alle pathogenen Mikroorganismen hat auch *Candida* effektive Virulenzfaktoren entwickelt, die dem Pilz bei der Überwindung von Verteidigungsmechanismen und bei der Kolonisierung im Wirt helfen und dadurch Infektionen und Krankheiten auslösen. Auch wenn die Virulenzfaktoren in *C. albicans* abhängig von der Art der Infektion sind, gelten die vom Hefepilz exprimierte zehn sekretorischen Aspartatproteasen (SAP1-10), die 1965 erstmals beschrieben wurden, als Schlüsselfaktoren.^[61-64] Dabei zeigten zahlreiche Untersuchungen, wie diese Enzyme in verschiedenster Weise zur Pathogenität von *C. albicans* beisteuern. So stellen sie Nährstoffe durch den Abbau von Proteinen im Wirt zur Verfügung oder unterstützen die Anhaftung an Oberflächen und die Invasion durch Gewebebarrieren.^[65-68] Die SAP-Isoenzyme werden von einer Familie von zehn homologen Genen codiert, die während der Infektion unterschiedlich reguliert werden. Dies spiegelt die verschiedenen Funktionen der Isoenzyme wieder.^[58,63,69] Aufgrund homologer Sequenzen sowie ähnlicher Eigenschaften lassen sich die SAP-Isoenzyme in die Gruppen 1-3 (67 %) und 4-6 (89 %) einteilen.^[57,68,70] SAP1-3, die zu Beginn einer Infektion exprimiert werden, helfen dem Pilz bei der Anlagerung an und bei der Schädigung von Wirtsgewebe.^[59,70-73] Dagegen wurden SAP4-6 zusammen mit SAP2, dem am häufigsten vorkommenden SAP-Isoenzym, verstärkt beim Befall von Leber und Niere nachgewiesen.^[57,58,63,74] Die polymorphologische Fähigkeit des Hefepilzes zur Keimfaden- bzw. Hyphenbildung ist dabei essentiell für das invasive Wachstum. So werden SAP4-6 überwiegend in der hyphalen Form des Pilzes, die als die pathogenere gilt, exprimiert.^[68,74-77] Während SAP1-8 in den extrazellulären Raum sekretiert werden, sind die Sequenz-ähnlichen, GPI-verankerten (Glycosylphosphatidylinositol) Enzyme SAP9 & 10 membrangebunden. Dabei beeinflussen SAP9 & 10 die Anlagerung, die Beschaffenheit der Zelloberfläche und die Zellteilung.^[57,78-80] Nur wenig ist hingegen über SAP7 & 8 bekannt. Eine Induktion von SAP7, das nur noch 27 % Ähnlichkeit mit den anderen SAP-Proteinen besitzt, wurde bei vaginalen Infektionen in Mäusen gefunden.^[81] Eine Expression von SAP8 konnte in Fällen oraler Candidosis nachgewiesen werden.^[82,83]

Die Hypothese, *C.-albicans*-Infektionen durch Hemmung der SAP-Isoenzyme bekämpfen zu können, stützt sich auf Tiermodelle, die mit dem Aspartatprotease-Inhibitor Pepstatin A (Abbildung 8, S. 13) behandelt wurden. Positiven Wirkungen in Bezug auf Infektionen der Schleimhäute und des Peritonealraums^[84,85] stehen widersprüchliche Ergebnisse bei systemischen Infektionen gegenüber. Dies wird allerdings den ungenügenden pharmakokinetischen Eigenschaften des Inhibitors zugesprochen.^[86,87] So erfährt der Ansatz, Candidosen mit Inhibitoren zu behandeln, in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit. Die

Beobachtung, dass HIV-Patienten in der antiretroviralen Therapie, die auch Aspartatprotease-Inhibitoren beinhaltet, übereinstimmend weniger anfällig für *C.-albicans*-Infektionen sind, stützt diese Theorie.^[88,89] Auch ein direkter inhibitorischer Effekt von HIV-Protease-Inhibitoren auf *C. albicans* konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.^[90,91] Allerdings verhindert die limitierte Selektivität dieser Inhibitoren sowie deren Wirkung an nur einigen der SAP-Isoenzyme eine therapeutische Anwendung.

Da verschiedene SAP-Isoenzyme für das Fortschreiten von *C.-albicans*-Infektionen verantwortlich sind, sollten potentielle Inhibitoren möglichst viele der Isoenzyme hemmen, um effektiv gegen den Pilz zu wirken.^[64] Um die Wirkung potentieller Inhibitoren auf die unterschiedlichen SAP-Isoenzyme zu testen, ist ihre *In-vitro*-Expression erforderlich. Einige der Isoenzyme konnten als rekombinante Proteine in *Escherichia coli* (SAP1, 2, 3 & 6),^[60] *Saccharomyces cerevisiae* (SAP1-3)^[92] und *Pichia pastoris* (SAP4-6)^[93] exprimiert werden. Eine Expression im ursprünglichen Wirt war aber unter Laborbedingungen bislang nicht möglich. Seit längerem ist bekannt, dass *C. albicans* während des Wachstums in einem Medium, das als einzige Stickstoffquelle beispielsweise Rinderserumalbumin (BSA) enthält, lediglich SAP2 in signifikanten Mengen exprimiert. Eine Hemmung dieser Proteaseaktivität stoppte das Pilzwachstum.^[61,75,94,95] Die Konstruktion von Tetracyclin-induzierbaren SAP-Genen ermöglicht nun eine gezielte Expression der einzelnen SAP-Isoenzyme und damit auch die Testung der Wirkung potentieller Inhibitoren auf die unterschiedlichen Isoenzyme.^[64]

1.2 Aufbau und Struktur von Aspartatproteasen des Clans AA

Die Aspartatproteasen des Clans AA sind in die Familien A1, A2, A3, A9 & A10 unterteilt. Dabei gehören die wichtigsten Proteasen den verwandten Familien von Pepsin (A1) und Retropepsin (A2) an (Tabelle 1, S. 3).^[4] Die Proteasen der Pepsin-Familie sind aus zwei β -Domänen aufgebaut, die durch Gen-Duplikation entstanden sind und je einen der katalytischen Aspartatreste tragen.^[7,96] Diese zweilappige Pseudo-Dimer-Struktur wird durch drei Disulfid-Brücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert.^[97,98] Die konservierte Bindungstasche mit dem aktiven Zentrum, welches durch eine N-terminale Haarnadelschleife („flap“) gegen Solvens abgeschirmt ist, befindet sich zwischen den beiden Domänen.^[99] In Abbildung 3 sind die Strukturen (Darstellung in PyMOL^[100]) der humanen Proteasen Pepsin (PDB: 1PSN),^[101] Renin (2V0Z)^[18] und Cathepsin D (1LYA)^[102] denen von Plasmepsin II (1LF4, *P. falciparum*)^[103] und SAP2 (1EAG, *C. albicans*)^[104,105] mit ihren jeweiligen katalytischen Aspartatresten (Tabelle 2) gegenübergestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die katalytischen Zentren und charakteristischen Haarnadelschleifen („flap“) ausgewählter Aspartatproteasen des Clans AA, Familie A

Protease	Katalytisches Zentrum		„flap“
Pepsin	Asp32	Asp215	Thr77
Renin	Asp32	Asp215	Thr77
Cathepsin D	Asp33	Asp231	Ser80
Plasmeypsin II	Asp34	Asp214	Ser79
SAP2	Asp32	Asp218	Asp86

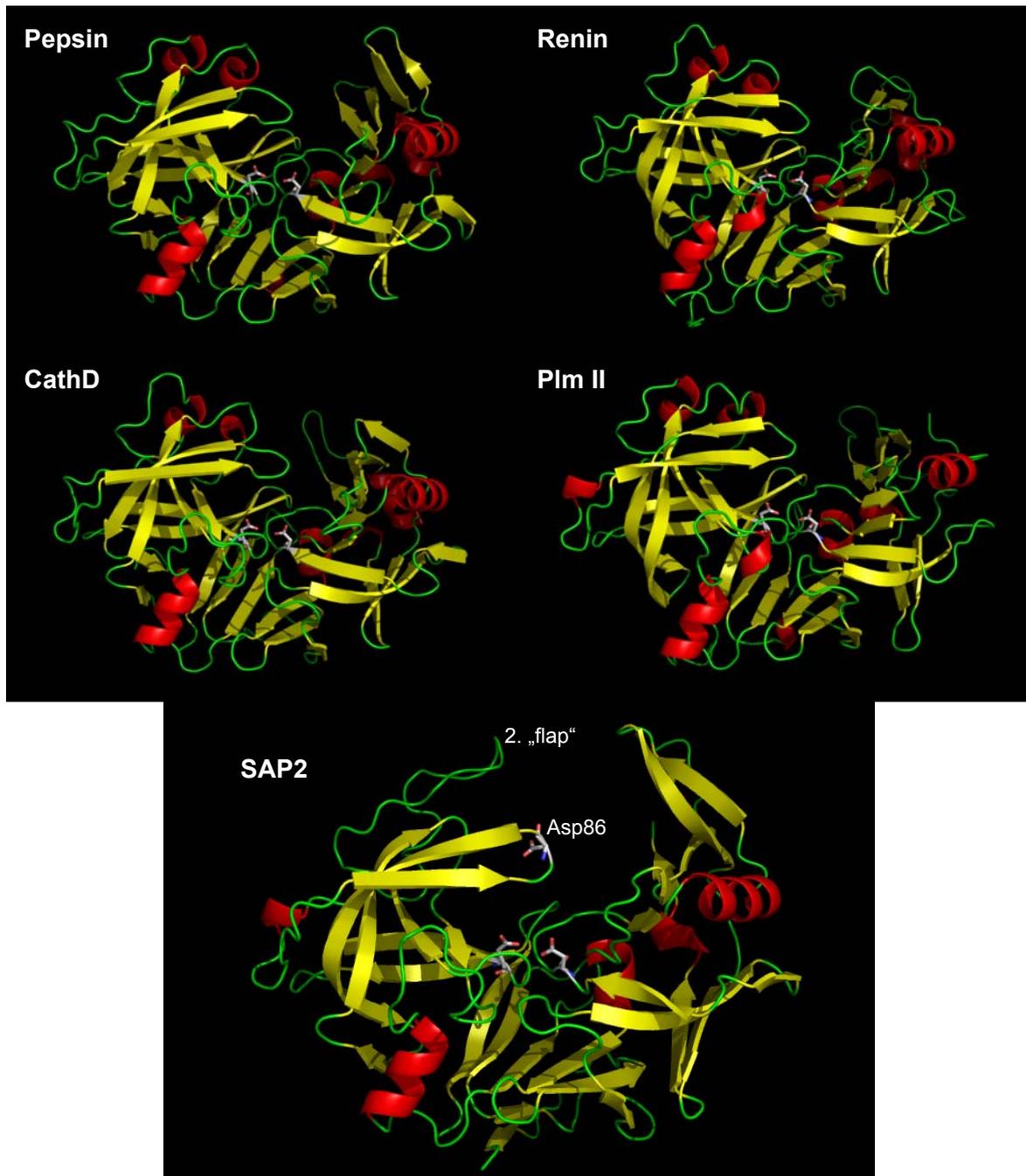


Abbildung 3: Strukturen ausgewählter Aspartatproteasen des Clans AA, Familie A

Neben den ähnlichen Tertiärstrukturen zeigen sich doch signifikante Unterschiede der Aspartatproteasen der Pepsin-Familie in ihrer Detailstruktur, was zu Selektivitäten bezüglich der

Substrate führen kann.^[57] So besitzt die SAP2, wie alle Isoenzyme von *C. albicans*, eine vergrößerte S3-Bindetasche, die von einer zweiten „flap“-Schleife überlagert ist.^[104,106] Weiterhin tragen alle SAP-Isoenzyme an der Spitze ihrer traditionellen Haarnadelschleife, die die S1-Tasche abdeckt, einen für Aspartatproteasen der A1-Familie einzigartigen Asp86-Rest. Andere Aspartatproteasen tragen an dieser Stelle einen Threonin- oder Serinrest (Tabelle 2). Möglicherweise führen diese Modifikationen zu der breiten Substratspezifität, die bei den SAP-Isoenzymen beobachtet wird und viele humane Proteine wie Mucin, extrazelluläre Matrixproteine, Proteine des Immunsystems, endotheliale Zellproteine sowie Gerinnungsfaktoren umfasst.^[57,107-110] Abbildung 4A veranschaulicht durch Überlagerung die ähnlichen Tertiärstrukturen von Pepsin (orange), Renin (gelb), Cathepsin D (türkis), Plasmepsin II (magenta) und SAP2 (grün) und hebt den für die SAP-Isoenzyme charakteristischen Unterschied in der Haarnadelschleife („flap“) über der S1-Tasche (B) hervor. Ebenso wird die typische zweite „flap“-Schleife dargestellt.

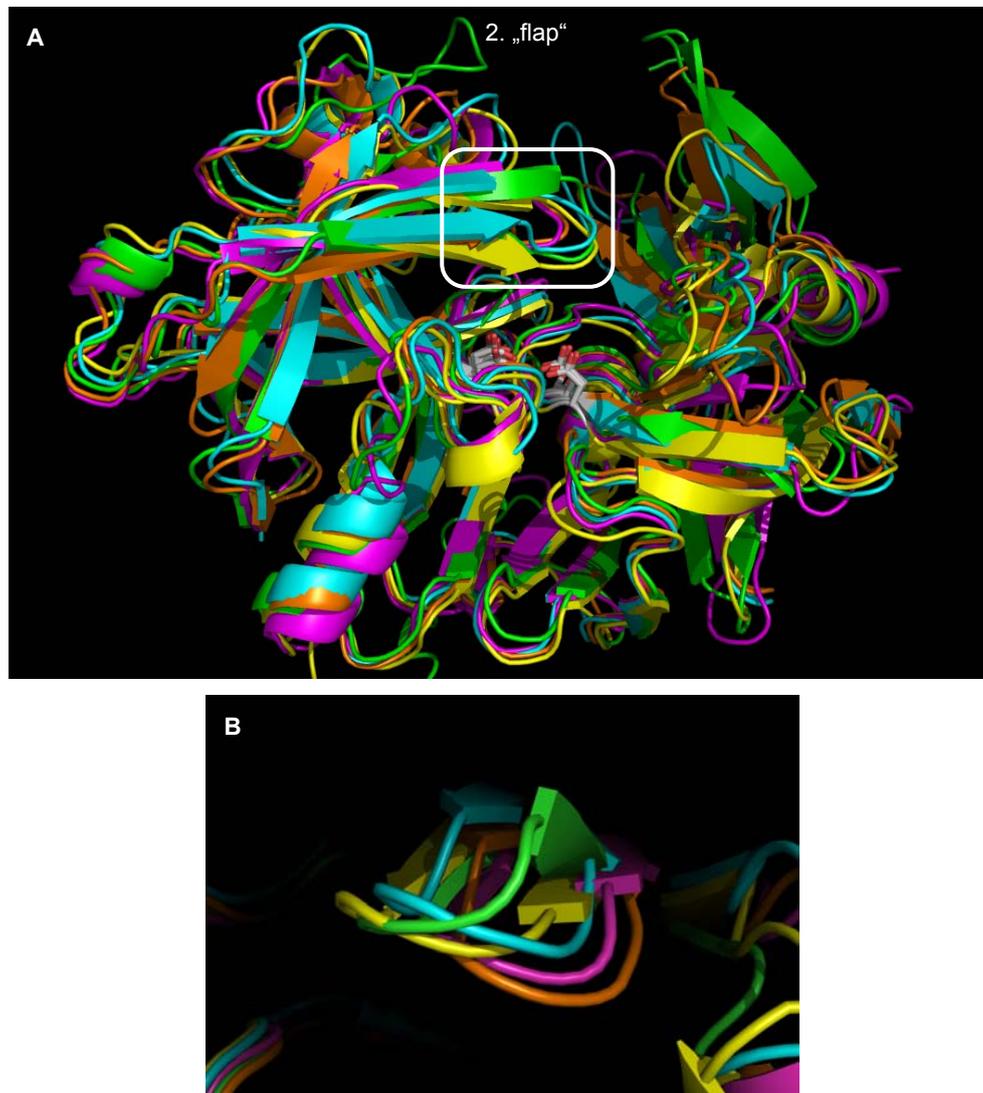


Abbildung 4: Überlagerung (A) von Pepsin (orange), Renin (gelb), CathD (türkis), Plm II (magenta) und SAP2 (grün) mit der für die SAP-Isoenzyme charakteristischen zweiten „flap“-Schleife; Haarnadelschleife über der S1-Tasche (B)

In Abbildung 5 ist die Überlagerung der Isoenzyme SAP1 (PDB: 2QZW),^[111] SAP2 (1EAG),^[104,105] SAP3 (2H6S)^[79] & SAP5 (2QZX)^[111] mit der zweiten „flap“-Schleife über der S3-Tasche sowie der Haarnadelschleife mit Asp86 über der S1-Tasche dargestellt.

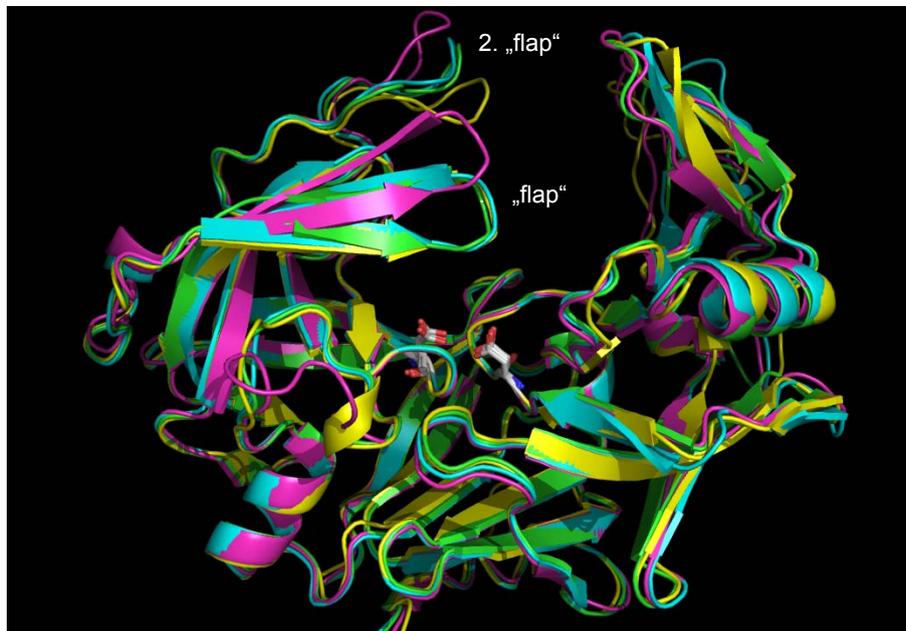


Abbildung 5: Überlagerung von SAP1 (grün), SAP2 (türkis), SAP3 (magenta) & SAP5 (gelb)

Im Gegensatz zur Familie A1 bestehen die viralen Retropepsine (Familie A2) aus zwei Monomeren, die je einen der katalytischen Aspartatreste tragen. Für die Bildung des aktiven Enzyms ist somit Dimerisierung notwendig.^[7,112] Die Stabilisierung des Homodimers erfolgt durch Überlappung eines C- mit einem N-Terminus zu einem antiparallelen β -Faltblatt sowie zweier „flap“-Regionen über dem aktiven Zentrum. Diese flexiblen Schleifen, die im offenen Zustand die Bindetasche freilegen, stabilisieren den Enzym-Substrat-Komplex, indem sie den gebundenen Liganden einschließen.^[112,113] Die geringe, aber signifikante Abweichung von der C2-Symmetrie im Homodimer ist dabei auf die Beweglichkeit der „flaps“ zurückzuführen. Allen Enzymen dieser Familie gemeinsam ist ein komplexes Gerüst konservierter Wasserstoffbrückenbindungen um das aktive Zentrum. Dieser sogenannte „fireman’s grip“ beinhaltet die Hydroxylgruppen zweier Threonin- bzw. Serin-Reste in der Triplet-Seqenz des katalytischen Zentrums Asp-Thr(Ser)-Gly. Es wurde gezeigt, dass der „fireman’s grip“ für die Stabilität des Dimers unerlässlich ist. Weiterhin zeigen Enzyme, die Threonin im „grip“ tragen, eine höhere Aktivität und eine bis zu zehnfach höhere thermodynamische Stabilität.^[112,114] Die Struktur der HIV-1-Protease mit dem antiparallelen β -Faltblatt sowie der „flap“-Region ist in Abbildung 6A dargestellt. Eine Vergrößerung des aktiven Zentrums (B) zeigt die katalytischen Aspartatreste Asp25 und Asp25' sowie die für die Stabilisierung des „fireman’s grip“ entscheidenden Threoninreste Thr26 und Thr26'. Die Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen den jeweiligen Hydroxylsauerstoffatomen und dem Amidwasserstoff im gegenüberliegenden Strang gebildet. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen werden zwi-

schen den Carbonyl-Sauerstoffen von Leu24 und den Threonin-Hydroxylwasserstoffatomen gebildet (C).^[115,116]

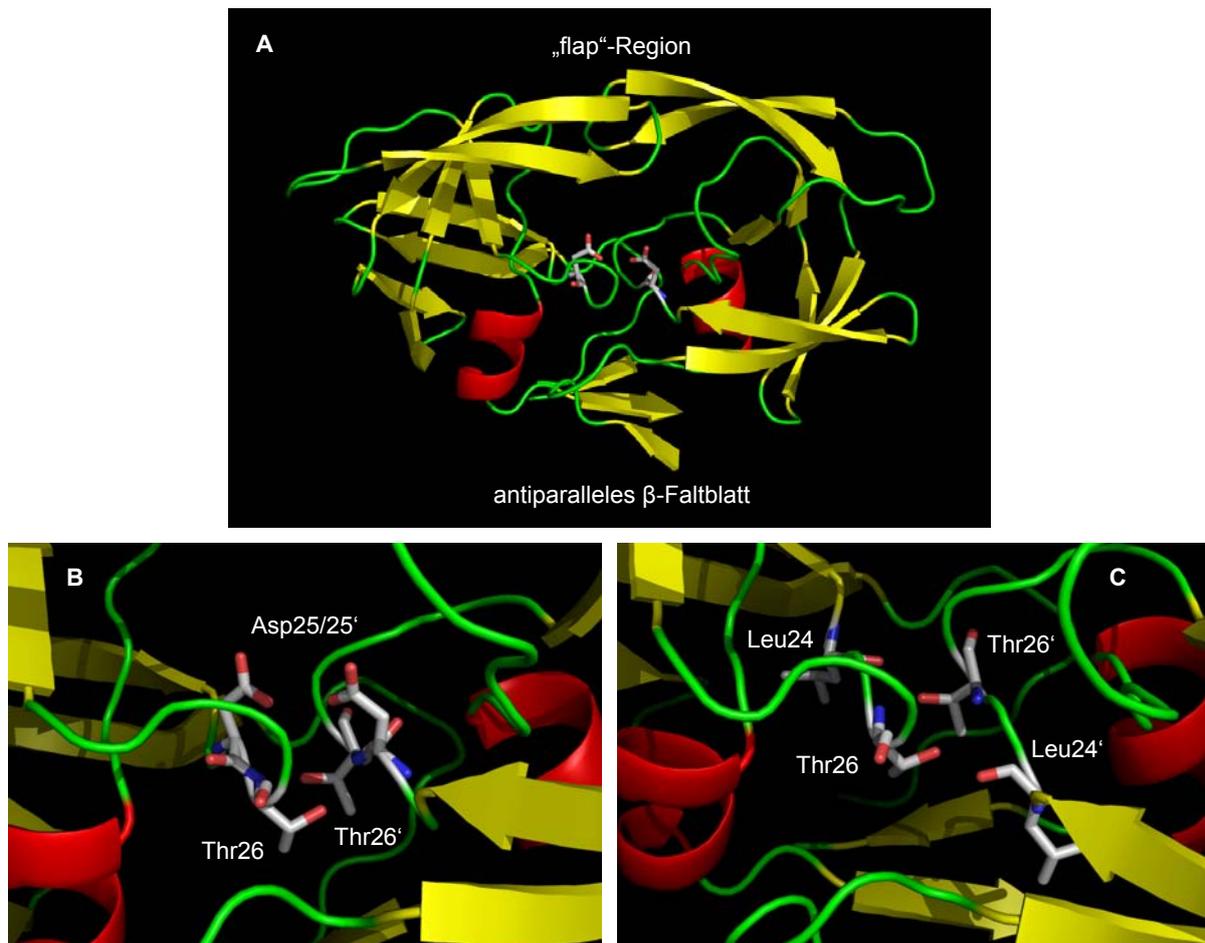
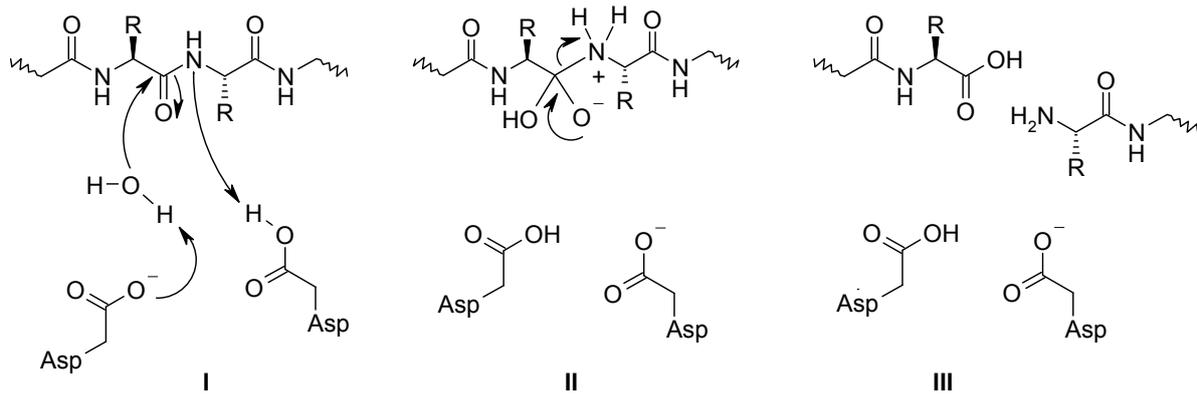


Abbildung 6: Struktur der HIV-1-Protease (A); Zoom ins aktive Zentrum (B, C) mit den für den „fireman’s grip“ verantwortlichen Aminosäuren Thr26 und Leu24

1.3 Katalysemechanismus von Aspartatproteasen

Im Gegensatz zu Serin- und Cysteinproteasen ist bei der Katalyse von Aspartatproteasen kein kovalentes Intermediat beteiligt, obwohl eine tetraedische Zwischenstufe existiert (Schema 1). Der nucleophile Angriff erfolgt über zwei simultane Protonentransfers (I). Einer verläuft von einem Wassermolekül auf die Diade der beiden katalytischen Aspartatreste, ein anderer von der Diade auf das Carbonyl-Sauerstoffatom der im Substrat zu spaltenden Peptidbindung. Dieser Säure-Base-katalysierte „push-pull“-Mechanismus führt zur Bildung einer zwitterionischen, nicht-kovalenten, tetraedischen Zwischenstufe (II), die dann in die Spaltprodukte zerfällt (III).^[8,47,117] Die Aspartatreste im regenerierten Enzym liegen dann wieder wie vor der Katalyse einfach protoniert vor.



Schema 1: Katalytischer Hydrolysemechanismus von Aspartatproteasen

Bereits in Kapitel 1.2 wurde auf Unterschiede in den Strukturen der SAP-Isoenzyme gegenüber den anderen Aspartatproteasen der Pepsin-Familie und die daraus resultierende Substratspezifität eingegangen. Wie die meisten Proteasen besitzen diese Enzyme eine Substratspezifität für die Aminosäureseitenketten von Polypeptidsubstraten. Diese wird durch die Hydrophilie der Enzymbindetaschen bestimmt.^[8,57] Von *Fusek* durchgeführte Optimierungsstudien für das peptidische SAP2-Substrat Lys-Pro-Ala-Lys-Phe | | Nph-Arg-Leu zeigten, dass eine Substitution von Arginin zu Alanin in P2' zwar die Umsatzgeschwindigkeit um das Fünffache erhöht, jedoch fällt dabei die Affinität zum Enzym um den Faktor 13 ab.^[118] Ein Austausch von Lysin nach Leucin in P2 dagegen erhöht die Umsatzgeschwindigkeit ebenso um fast das Fünffache und steigert dabei gleichzeitig die Affinität zum Enzym geringfügig. In Studien von *Koelsch* wurde die Aminosäuresequenz um die Spaltstelle in P1 und P1' näher untersucht.^[60] Hier werden von SAP2 primär große hydrophobe Reste, wie die von Phenylalanin (P1 und P1') sowie Tyrosin (P1'), bevorzugt. Zusammenfassend ist die Substratspezifität für SAP2 in Abbildung 7 dargestellt.

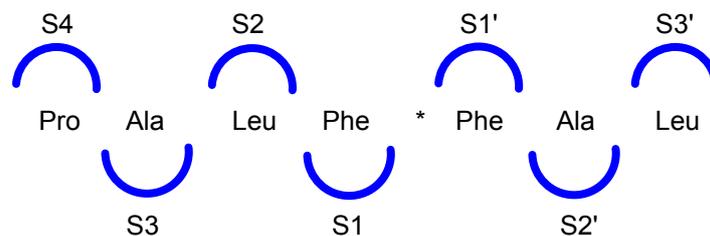


Abbildung 7: Substratspezifität der SAP2

1.4 Inhibitoren von Aspartatproteasen

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden zahlreiche potente Inhibitoren für verschiedenste Aspartatproteasen entwickelt.^[14] Zumeist wird das Design von Inhibitoren von den natürlichen peptidischen Substraten des jeweiligen Enzyms abgeleitet. Obwohl Peptide als poten-

tielle Arzneimittel eher ungeeignet sind, kann die Substratspezifität einer Protease ein Hilfsmittel für das Design von Inhibitoren darstellen.^[8,12,13,57]

So binden die meisten bislang entwickelten Inhibitoren über nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, ionische- und van-der-Waals-Wechselwirkungen) reversibel an das Enzym.^[14] Für eine effektive Hemmung muss die Affinität des Inhibitors zum Enzym höher sein als die seines natürlichen Substrats. Diese höhere Affinität kann durch den Versuch, die Anzahl der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zu maximieren, erreicht werden. Diesbezüglich hat sich die Einführung von Übergangszustandsanaloga als besonders erfolgreich erwiesen. Als solche werden funktionelle Gruppen definiert, die den tetraedischen Übergangszustand bei der enzymatischen Hydrolyse der Peptidbindung imitieren, die aber selbst nicht gespalten werden können.^[8]

Irreversible Inhibitoren tragen dagegen eine elektrophile Kopfgruppe („Warhead“), die fähig ist, mit einem Aspartatrest des aktiven Zentrums zu reagieren. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung führt dann zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms.^[8] Dabei ist eine hohe Selektivität bezüglich des Targetenzym von besonderer Wichtigkeit, um toxische Nebenwirkungen durch Reaktion mit anderen Nucleophilen oder Enzymen, die dem Inhibitor ausgesetzt sind, zu vermeiden.

1.4.1 Reversible Inhibitoren

Pepstatin A gilt als Standardinhibitor für Aspartatproteasen, die bei einem pH-Optimum zwischen 3 und 4 am aktivsten sind. Dieser Inhibitor wurde erstmals 1970 aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten isoliert^[119,120] und stellt mit seinem zentralen Statin-Baustein ein klassisches Übergangszustandsanalogon dar. Darüber hinaus verdrängt der Inhibitor das katalytisch aktive Wassermolekül aus der Bindungstasche.^[121] Aufgrund seiner geringen Selektivität und relevanten Toxizität eignet sich Pepstatin A nicht als Therapeutikum.^[117,122]

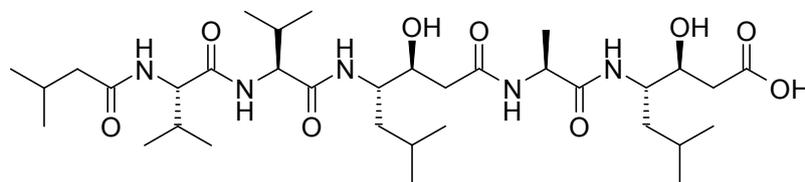


Abbildung 8: Pepstatin A

Eine der erfolgreichen Ansätze der antiviralen Therapie gegen HIV ist die sogenannte „highly active antiretroviral therapy“ (HAART), die Inhibitoren der viralen Reverse-Transkriptase und der HIV-1-Protease kombiniert.^[47,50] Unter den derzeit neun zugelassenen HIV-1-Protease-Inhibitoren findet sich mit Saquinavir ($K_i = 0.15 \text{ nM}$)^[123] auch das erste Beispiel eines in Kenntnis der Kristallstruktur der HIV-1-Protease und bekannter Inhibitoren von Renin struk-

turbasiert entwickelten Inhibitors im klinischen Einsatz.^[14,124] Weitere Inhibitoren dieser ersten Generation sind Ritonavir ($K_i = 0.17 \text{ nM}$),^[123] Indinavir ($K_i = 0.52 \text{ nM}$),^[8] Nelfinavir ($K_i = 2 \text{ nM}$)^[8] und Amprenavir ($K_i = 0.6 \text{ nM}$).^[8] Dem Problem zunehmender Resistenzen wird in der Therapie durch sogenannte Cocktails entgegengewirkt, die mehrere HIV-1-Protease-Inhibitoren enthalten. Dennoch besteht weiterhin ein dringender Bedarf an neuen Leitstrukturen.

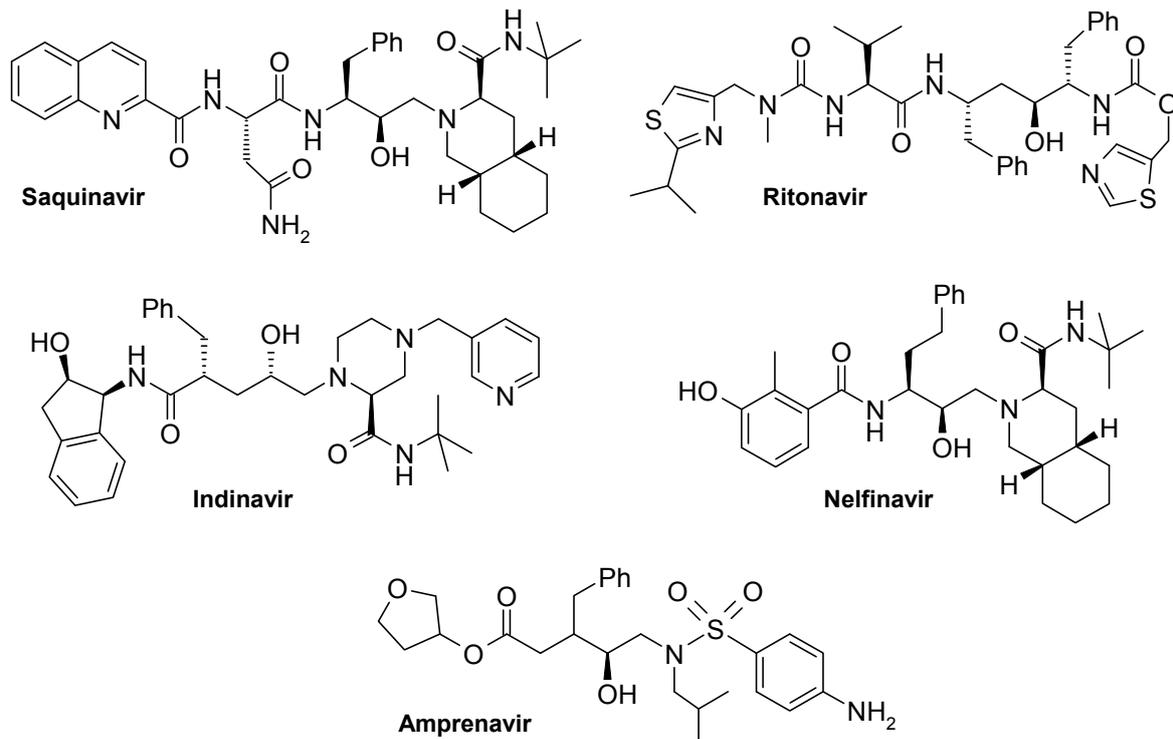


Abbildung 9: HIV-1-Protease-Inhibitoren Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir & Amprenavir

Allen vorangegangenen HIV-1-Protease-Inhibitoren gemeinsam ist die zentrale Hydroxyethyleinheit, die den tetraedischen Übergangszustand imitiert. Auf Basis dieses Analogons wurden zahlreiche weitere Inhibitoren entwickelt.^[125] In neueren Studien wurden 13-15-gliedrige strukturbasierte Cycloamide entwickelt, von denen der Makrocyclus **1** exzellente Inhibitoreigenschaften zeigt ($K_i = 0.7 \text{ nM}$).^[126] Dabei adressiert der 14-gliedrige Ring bevorzugt die S_1 - S_2 -Bindungstaschen der HIV-1-Protease. Im Weiteren wurden leicht zugängliche achirale, lineare Oligoamine als potentielle Leitstruktur für Inhibitoren vorgestellt.^[127] Eine zentrale sekundäre Aminofunktion zielt dabei auf die katalytische Diade ab. Der potenteste Vertreter dieser Reihe (**2**) hemmt die HIV-1-Protease im niedrigen mikromolaren Bereich, zeigt sich aber eher unselektiv gegenüber Plasmapepsin II und Pepsin. Als weitere Leitstruktur für HIV-1-Protease-Inhibitoren wurden C2-symmetrische Pyrrolidinderivate, die enantioselektiv aus Weinsäure dargestellt wurden, publiziert.^[47,48] Unter Einbeziehung der Co-Kristallstruktur eines Prototyps konnte in einer zweiten Generation die Affinität der Inhibitorreihe signifikant gesteigert werden. Mit der co-kristallisierten Struktur (PDB: 2QNN) des po-

tentesten Vertreters **3** ($K_i = 74 \text{ nM}$) konnten die SAR-Analysen (structure-activity relationship) bestätigt werden.^[47]

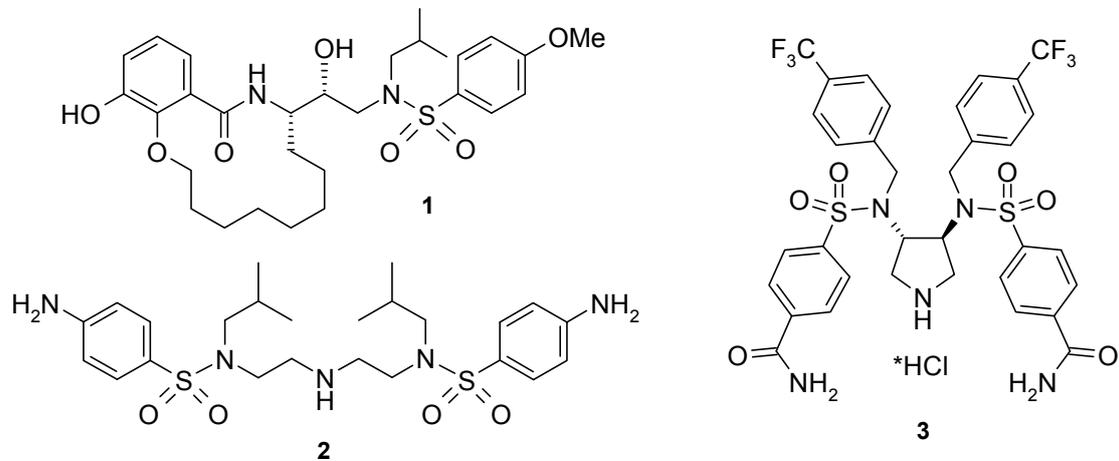


Abbildung 10: Neue HIV-1-Protease-Inhibitoren

Mit dem Hydroxyethylen-Isoster SC-5003 wurde der erste selektive peptidomimetische Inhibitor für Plasmeprin I & II, der auch gegen *P. falciparum* wirkt, dargestellt.^[128] Die Analyse der Kristallstruktur von Pepstatin A an Plm II führte zur Entwicklung des Hydroxyethylcarboxyl-Isosters **4**, das an Plm II und CathD aktiv ist und auch antiplasmodiale Aktivität aufweist.^[129]

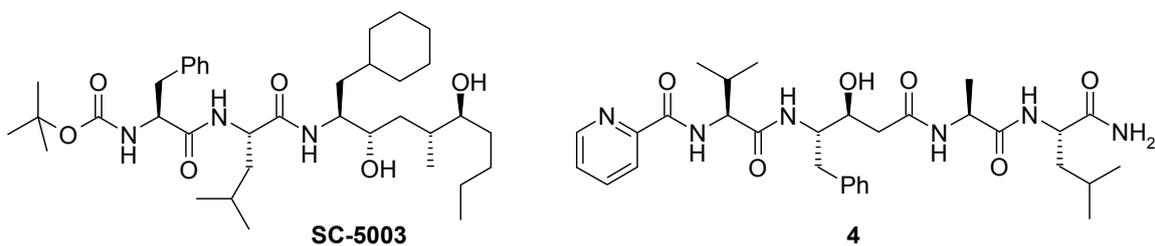


Abbildung 11: Plasmeprininhibitoren SC-5003 und 4

Als neue Leitstruktur für nicht-peptidische Plm-II- & -IV-Inhibitoren wurden computergestützt entwickelte 2,3,4,7-Tetrahydro-1*H*-azepine vorgestellt.^[33] Dabei konnten experimentell ermittelte K_i -Werte die Ergebnisse aus dem virtuellen Screening bestätigen. Das Azepin **5** hemmt Plm II & IV jeweils im niedrigen mikromolaren Bereich und wird als Prototyp für weitere Studien zur Erhöhung der Affinität herangezogen.

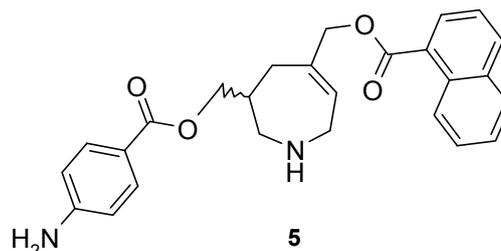


Abbildung 12: Azepinderivat 5 als neue Leitstruktur für Plm-II- & -IV-Inhibitoren

Weiterhin wurden mit den in Abbildung 13 dargestellten 4-Aminopiperidinen eine neue Klasse von Inhibitoren publiziert, die die Plasmeptase I, II & IV im niedrigen nanomolaren Bereich hemmen (Abbildung 13).^[130] Der potenteste Vertreter dieser Reihe zeigt jedoch an *P. falciparum* kaum Hemmung.

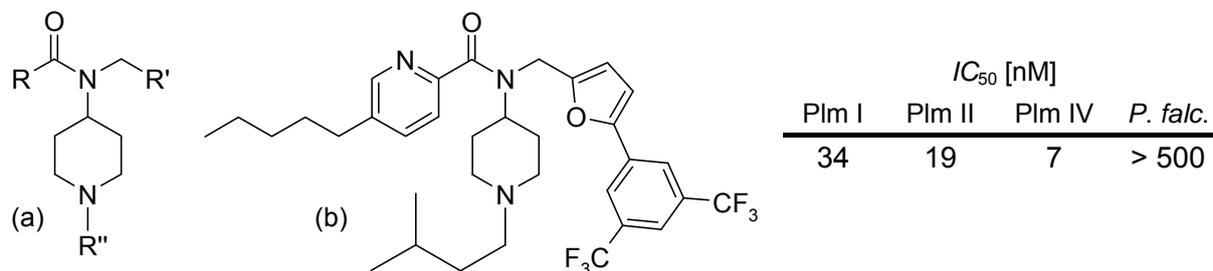


Abbildung 13: 4-Aminopiperidine (a) als neue Klasse von Plasmeptasinhibitoren am Beispiel des potentesten Vertreters (b)

Die Entwicklung von Renininhibitoren beschränkt sich zumeist auf Modifikationen von Fragmenten des natürlichen Substrats Angiotensinogen. Jedoch verhinderten neben dem hohen Peptidcharakter mit der damit verbundenen geringen Stabilität und schlechten Bioverfügbarkeit auch die hohen Kosten im Vergleich mit bereits als Blutdrucksenker im Einsatz befindlichen Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten und ACE-Inhibitoren einen klinischen Fortschritt.^[131-133] Zankiren (A-72517, $IC_{50} = 1.1$ nM), der erste peptidische Renininhibitor, hatte beispielsweise keine ausreichende Bioverfügbarkeit.^[134] Diese wurde inzwischen durch die Entwicklung von Aliskiren (SPP-100, $IC_{50} = 0.6$ nM) erreicht.^[17,135,136] Der selektive Inhibitor muss nur einmal täglich oral verabreicht werden und wurde 2007 als erster Renininhibitor zur Behandlung von Bluthochdruck zugelassen.

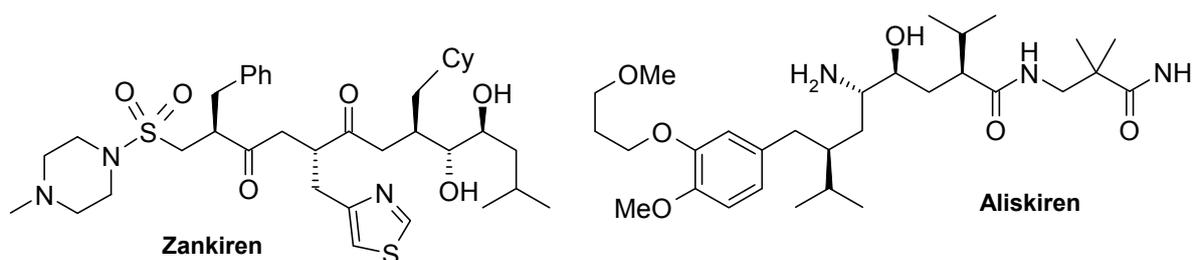


Abbildung 14: Renininhibitoren Zankiren & Aliskiren

Aufgrund seiner unsicheren Rolle als Target für die therapeutische Intervention wurden bislang eher wenige Inhibitoren für Cathepsin D entwickelt. Die Verbindung **6** ($K_i = 1.4$ nM) entstammt einer Serie strukturbasierter Inhibitoren, die sich auf die räumliche Nähe der enzymgebundenen P2- und P3'-Reste von Pepstatin A stützen. Dabei sind die drei Amidbindungen im cyclischen Inhibitor besonders proteolysestabil. Weiterhin wird durch die Cyclisierung eine Selektivität gegenüber Plm II erreicht, dessen Faltung sich für die P2- und P3'-Verlinkung ungünstig zeigt.^[129]

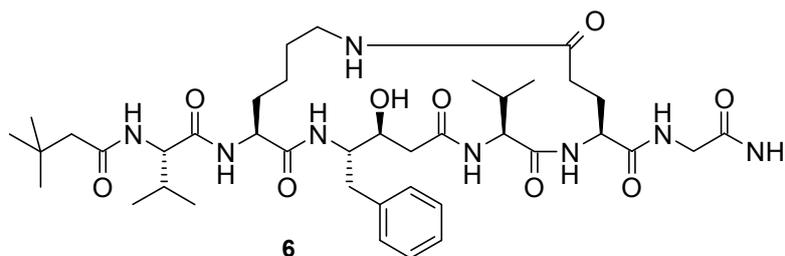


Abbildung 15: Cyclischer Cathepsin-D-Inhibitor

Ein weiterer Cathepsin-D-Inhibitor wurde mit dem Benzophenonderivat **7** ($K_i = 210$ nM) in Anlehnung an eine Leitstruktur aus dem Screening einer Bibliothek entwickelt. In SAR-Studien zeigte sich die Wichtigkeit der Hydroxyl-, *n*-Propyl- und Rhodaingruppe für die Aktivität.^[137] Bezüglich der Selektivität des Inhibitors wurden keine Untersuchungen durchgeführt. Das Statinanalogon **8** ($K_i = 110$ nM) wurde über eine kombinatorische Bibliothek von Plasmeprin-II-Inhibitoren entdeckt und hemmt CathD selektiv über Plm II.^[138] Auf einem weiteren kombinatorischen Ansatz beruhen die Hydroxyethylamin-Isostere **9** und **10** ($K_i = 9$ bzw. 0.7 nM).^[139,140] Diese Inhibitoren wurden aber nicht auf Selektivität gegenüber anderen Aspartatproteasen optimiert.

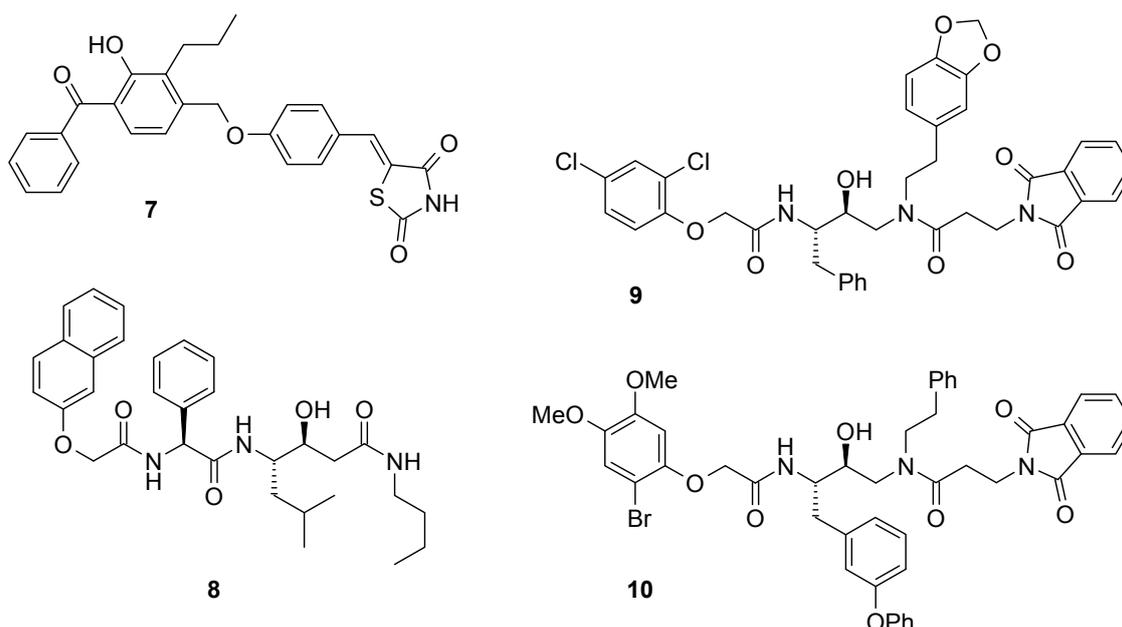


Abbildung 16: Cathepsin-D-Inhibitoren

In einer neueren Studie wurden Pepstatin-A-Konjugate mit den zellgängigen Peptiden pAntp_(43–58) (Penetratin), Tat_(49–60) und R9 (9-mer von Arginin) dargestellt. Mit Cathepsin D als bedeutender intrazellulärer Aspartatprotease im endolysosomalen Stoffwechsel wurde über dessen Hemmung seine Rolle bei zellulären Prozessen wie der Antigenprozessierung untersucht. Die Hemmung der Prozessierung des Tetanus-Toxoids durch das Pepstatin A-Penetratin-Konjugat impliziert dabei die Rolle von CathD in der Antigenprozessierung.^[141] Weiterhin besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer spezifischer Cathepsin-D-

Inhibitoren und deren therapeutischen Konsequenzen. Dies schließt auch Antikörper gegen die mitogene Funktion von extrazellulärem Procathepsin D ein.^[20]

Das Hydroxyethylen-Isoster A-70450 ist einer der ersten beschriebenen Inhibitoren der SAP2 von *C. albicans*.^[104-106,117] Der Inhibitor wurde ursprünglich für Renin ($IC_{50} = 7.1$ nM) entwickelt, zeigt aber daneben auch Aktivität an CathD ($IC_{50} = 770$ nM) und besonders an SAP2 ($K_i = 0.17$ nM).

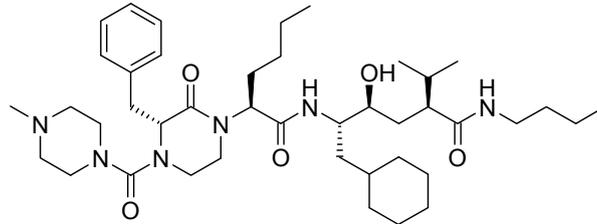


Abbildung 17: A-70450

Die Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes von A-70450 an SAP2 zeigt für die Hemmung der SAP2 relevante Enzym-Ligand Wechselwirkungen auf (Abbildung 18, PDB: 1EAG).^[104,105] Es werden Wasserstoffbrückenbindungen (grün) zu den Seitenketten-Sauerstoffatomen beider Aspartatreste des aktiven Zentrums ausgebildet. Weiterhin wird eine doppelte Wasserstoffbrücke zum Stickstoff von Gly85 sowie eine zu Thr221 gebildet. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird zu einem zwischen der S2- und S3-Tasche lokalisierten Wassermolekül ausgebildet. Die Bindung an die S1-, S2-, S1'- und S2'-Taschen (orange) wird von hydrophoben Wechselwirkungen dominiert.^[142]

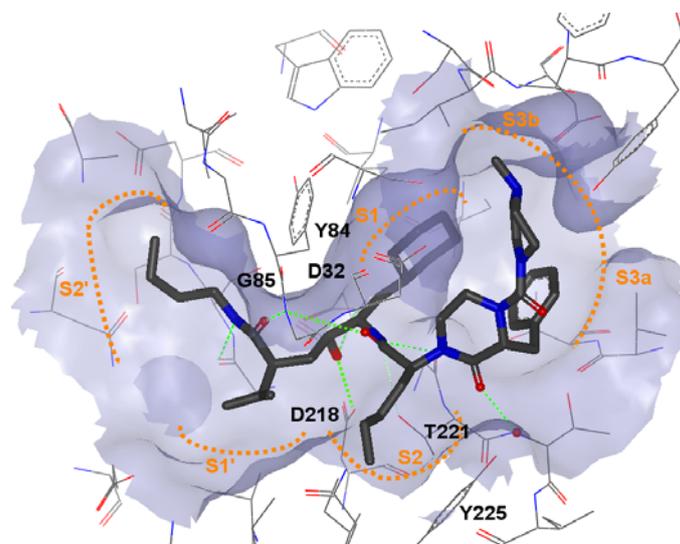


Abbildung 18: Kristallstruktur von A-70450, gebunden an SAP2 (PDB: 1EAG),^[142]
Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Eine Modifizierung der P2'-Butylgruppe in A-70450 führt zum Analogon **11** ($IC_{50} = 6.2$ nM, SAP2), das eine deutlich erhöhte Selektivität gegenüber Renin ($IC_{50} > 100$ nM) und CathD ($IC_{50} = 58$ μ M) zeigt.^[105] Das Hydroxyethylen-Isoster TS-98 hemmt unselektiv die HIV-1-

Protease und SAP2 im jeweils unteren mikromolaren Bereich.^[125]

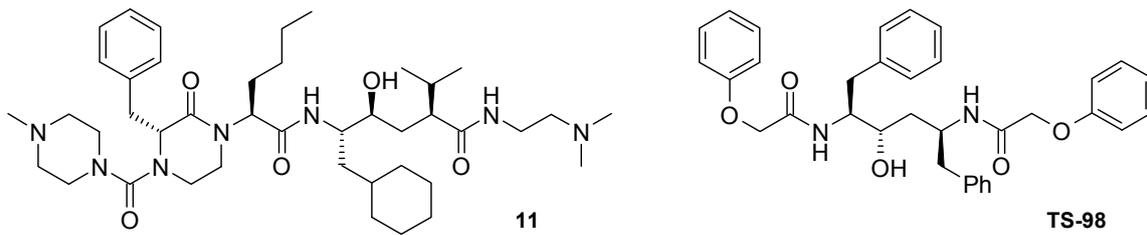


Abbildung 19: A-70450-Analogon 11 & TS-98

In Abbildung 20 sind die Strukturen der gängigen Übergangszustandsanaloga zusammengefasst, die für den Austausch einer spaltbaren Amidbindung eingesetzt werden.^[8]

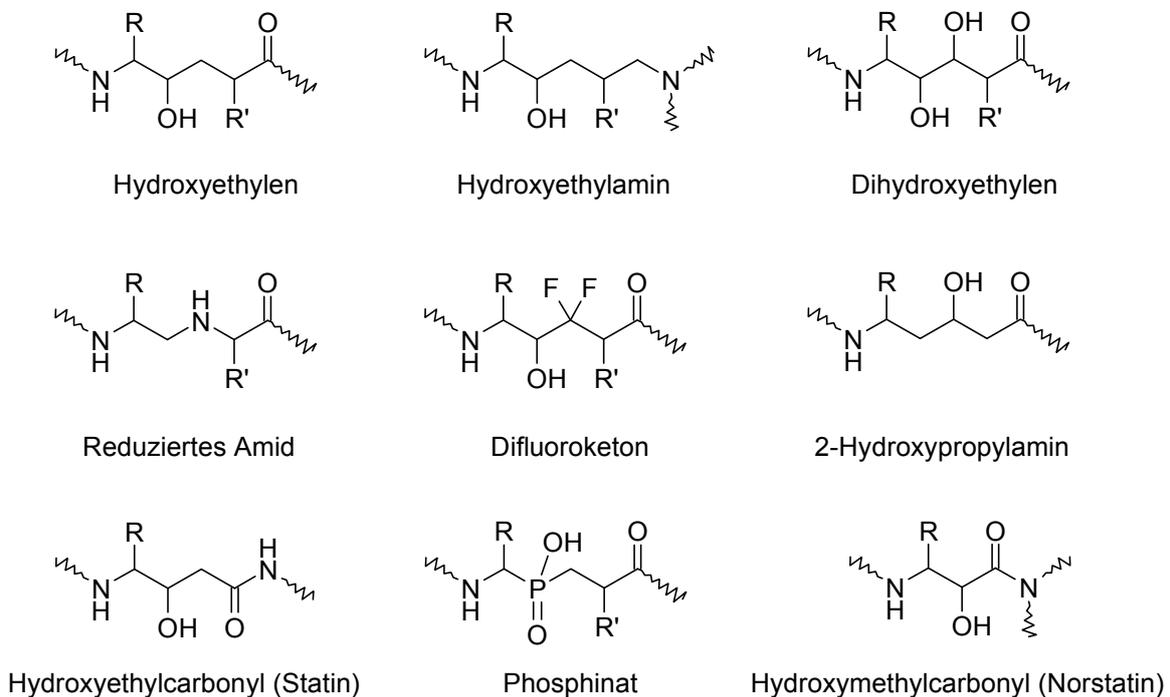


Abbildung 20: Gängige Übergangszustands-Mimetika

1.4.2 Irreversible Inhibitoren

Die Entwicklung irreversibler Inhibitoren wurde vor allem im Bereich der HIV-1-Protease-Inhibitoren vorangetrieben. Von der Ausrichtung auf das aktive Zentrum des Enzyms verspricht man sich eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Mutationen in der Protease, die zu Resistenzen führen könnte.^[143,144]

In einer Studie mit Haloperidolderivaten wurde der inhibitorische Effekt verschiedener elektrophiler Kopfgruppen auf die HIV-1-Protease getestet. Die Derivate umfassten Epoxide, Ynone und α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen.^[144] Jedoch stellte sich am Beispiel des Michael-Systems in UCSF191 heraus, dass der Inhibitor nicht wie gewünscht mit einem der

katalytischen Aspartatreste reagiert, sondern mit Cys95. Dies führte für die Ynone und α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen zu K_i -Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich. Die Epoxide waren inaktiv.

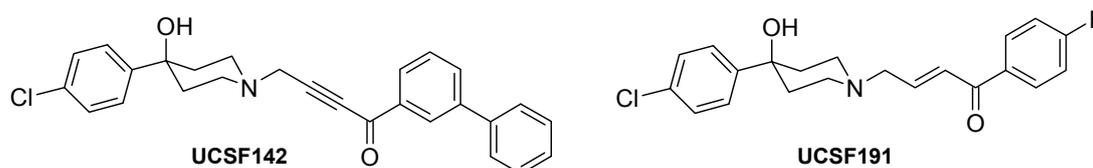


Abbildung 21: Haloperidolderivate als HIV-1-Protease-Inhibitoren

Dennoch stellten sich gerade dreigliedrige elektrophile Ringe als besonders gut geeignet für die Verwendung als Kopfgruppe irreversibler Inhibitoren heraus. Ein prominentes Beispiel aus dem Bereich der Cysteinproteasen ist das aus *Aspergillus japonicus* isolierte *trans*-Epoxysuccinylpeptid E-64, das Ausgangspunkt für die Entwicklung zahlreicher Cysteinprotease-Inhibitoren war.^[145-147] Als erster irreversibler Inhibitor von Aspartatproteasen wurde 1,2-Epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propan (EPNP) beschrieben.^[148,149] Neben Pepsin ($k_{2nd} = 2.22 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$)^[148] inaktiviert dieser schwache Inhibitor die HIV-1-Protease ($K_i = 9.9 \text{ mM}$),^[144] SIV-Protease ($K_i = 8.03 \text{ mM}$)^[150] und SAP2 ($k_{2nd} = 1083 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$).^[142]

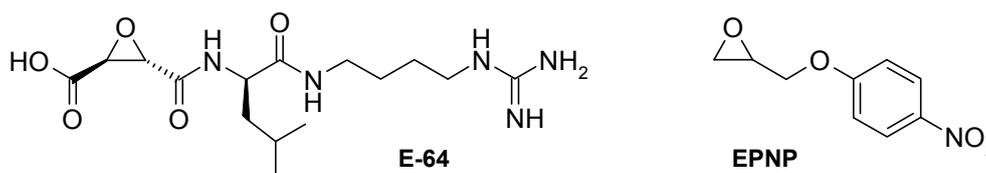
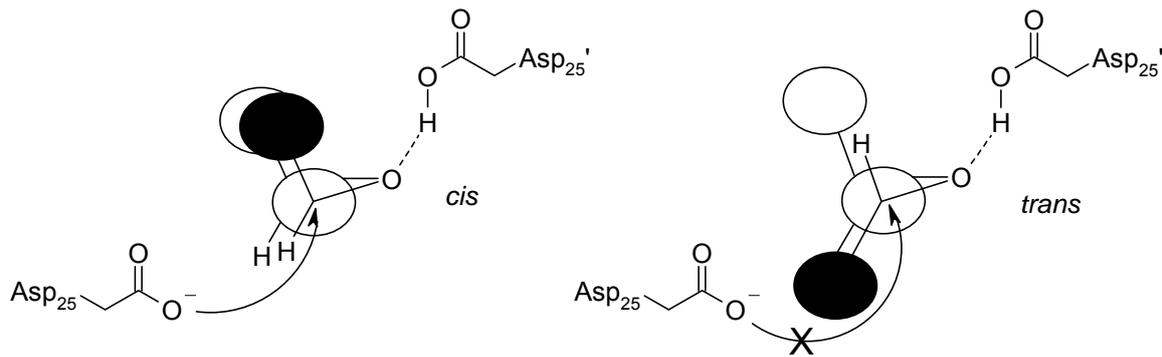


Abbildung 22: Epoxidbasierte irreversible Proteaseinhibitoren

Auf Basis von EPNP wurden weitere epoxidbasierte irreversible Aspartatprotease-Inhibitoren, besonders gegen die HIV-1-Protease, entwickelt. Dabei stellte sich eine *cis*-Konfiguration am Ring als essentiell heraus.^[51,151] Die Alkylierung des Enzyms soll nach Protonierung des Epoxidsauerstoffs durch Asp25' über einen Rückseitenangriff von Asp25 am Epoxidring erfolgen. Aus sterischen Gründen kann die katalytische Diade nur mit *cis*-konfigurierten Epoxiden reagieren (Schema 2). Selbst in Anwesenheit von Cystein-Resten erfolgt die Alkylierung bevorzugt mit den katalytischen Aspartatresten.^[51,150] Zu dieser Reihe von *cis*-konfigurierten Epoxiden gehören das Fluorenderivat **12** ($K_{i \text{ HIV-1}} = 65 \text{ }\mu\text{M}$; $K_{i \text{ SIV}} = 770 \text{ }\mu\text{M}$),^[51,152] das Tripeptidylepoxid **13** ($K_{i \text{ HIV-1}} = 20 \text{ }\mu\text{M}$)^[153] sowie die HIV-1-Inhibitoren LB71116 und LB71148 ($k_{2nd} = 10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$; $K_i = 10\text{-}50 \text{ nM}$).^[154,155]



Schema 2: Irreversible Hemmung durch *cis*-Epoxyde

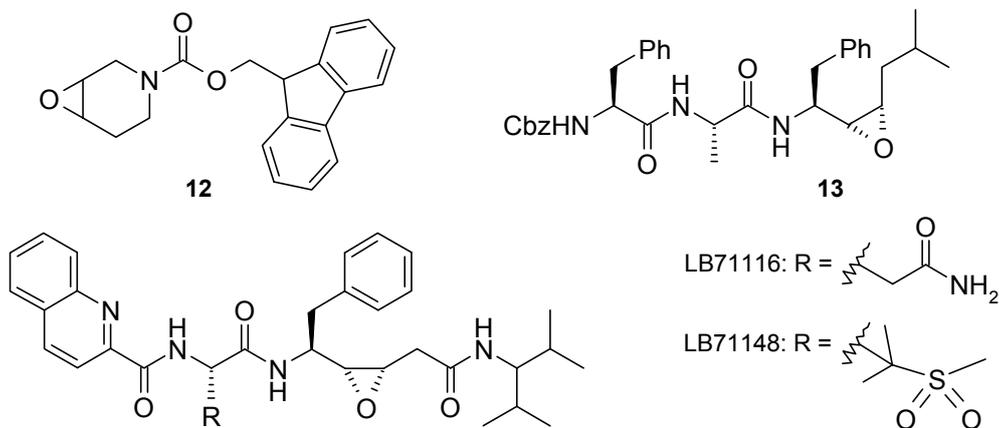


Abbildung 23: *cis*-Epoxyde als HIV-1-Inhibitoren

Der Naturstoff Miraziridin A^[156] aus dem Schwamm *Theonella mirabilis* trägt als elektrophile Kopfgruppe einen Aziridinring und hemmt unspezifisch Cystein-, Aspartat- und Serinproteasen. Dabei ist die Hemmung von Aspartatproteasen allerdings reversibler Natur und basiert auf dem Statinrest im Zentrum des Moleküls (IC_{50} Pepsin = 14 nM). Serinproteasen der Trypsin-familie werden durch die vinyloge Arginingruppe im Molekül gehemmt (IC_{50} Trypsin = 60 μ M). Cysteinproteasen werden durch den *trans*-konfigurierten Aziridinring inhibiert (k_{2nd} Cathepsin L = $6 \cdot 10^7$ $M^{-1}min^{-1}$; k_{2nd} Cathepsin B = $9 \cdot 10^5$ $M^{-1}min^{-1}$).^[157] Auf Basis der (*S,S*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure (*Streptomyces*) wurden weitere zahlreiche Derivate als irreversible Cysteinprotease-Inhibitoren entwickelt.^[147,158-161]

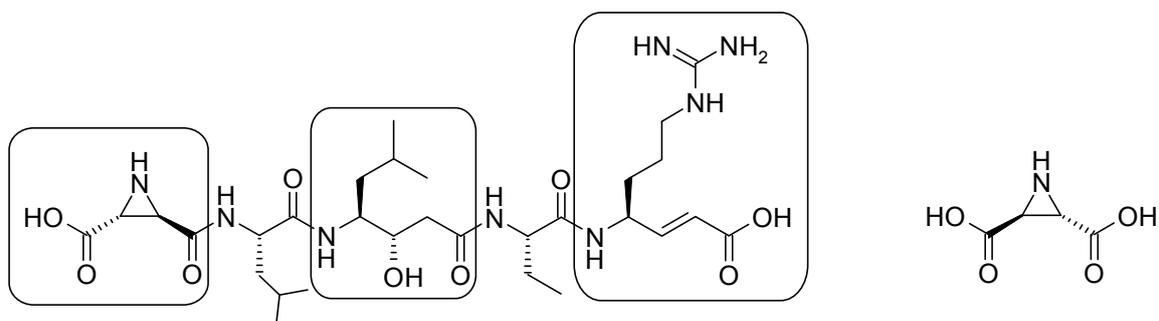


Abbildung 24: Miraziridin A & (*S,S*)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure

Analog zu *cis*-konfigurierten Epoxiden hemmen *cis*-konfigurierte Aziridine Aspartatproteasen irreversibel.^[142] Aus einer Serie von *cis*-Aziridin-2-carboxylaten als irreversible Inhibitoren der SAP2 von *C. albicans* gingen mit **A-07** und **A-08** ($k_{2nd} = 9265$ bzw. $14386 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$) zwei als Diastereomere gemischte synthetisierte 3-Phenylaziridin-2-carboxylate als potenteste Vertreter hervor.

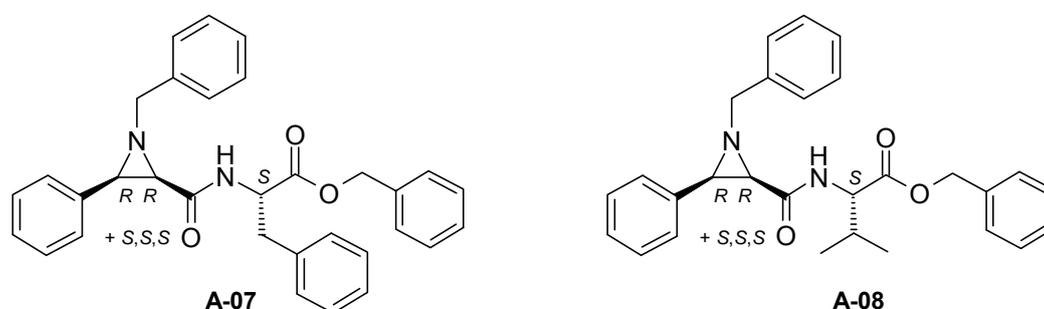


Abbildung 25: 3-Phenylaziridin-2-carboxylate als irreversible Inhibitoren der SAP2 von *C. albicans*

Verglichen mit analogen Epoxiden sind Aziridine weniger reaktionsfreudig.^[159,162] Dies kann jedoch für potentielle Inhibitoren von Vorteil sein, um unter physiologischen Bedingungen unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden und somit selektiver zu wirken. Die Inhibitoraktivität von Aziridinen kann jedoch durch Reduzierung des pH-Werts auf 4 enorm gesteigert werden, wohingegen Epoxide optimale Aktivität bei pH-Werten von 6 bis 7 zeigen.^[163] Die unterschiedlichen Reaktivitäten können ferner durch die geringere Ringspannung, die erhöhte Basizität der Aziridine sowie deren Möglichkeit, als Wasserstoffbrücken-Donor zu fungieren, erklärt werden.^[147] Weiterhin bietet sich der Aziridinstickstoff für Derivatisierungen an.

1.5 Hemmung von *Candida albicans*

Neben der Hemmung der SAP-Isoenzyme sind antifungale Wirkstoffe eine weitere Möglichkeit, *C. albicans*-Infektionen zu bekämpfen. Das erstmals 1955 beschriebene Antimykotikum Amphotericin B (*Streptomyces nodosus*) gilt noch immer als Standardtherapeutikum für invasive Pilzinfektionen.^[164-166] Der Wirkmechanismus von Amphotericin B beruht auf der Bindung an Ergosterol in der Zellmembran von Pilzen. Dies führt zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität und schließlich zum Verlust des Zellinhalts.^[167] Der limitierende Faktor im therapeutischen Einsatz von Amphotericin B ist seine nephrotoxische Wirkung. Renale Blutgefäßverengungen führen dabei zu einem Abfall der Blutzirkulation in der Niere.^[165] Die Toxizität von Amphotericin B und auftretende Resistenzen gegenüber weiteren Pharmaka erfordern daher die Entwicklung neuer Antimykotika.^[168]

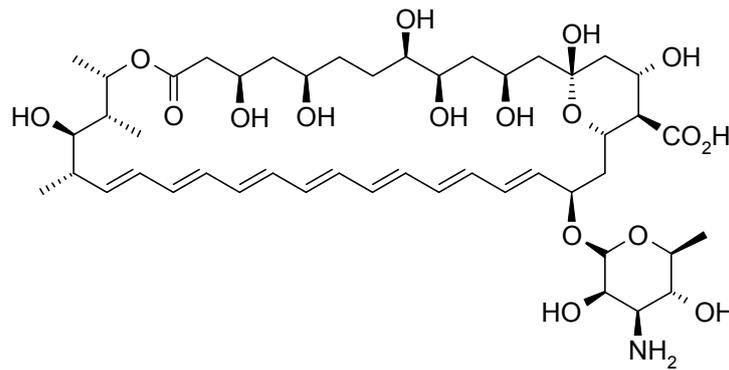
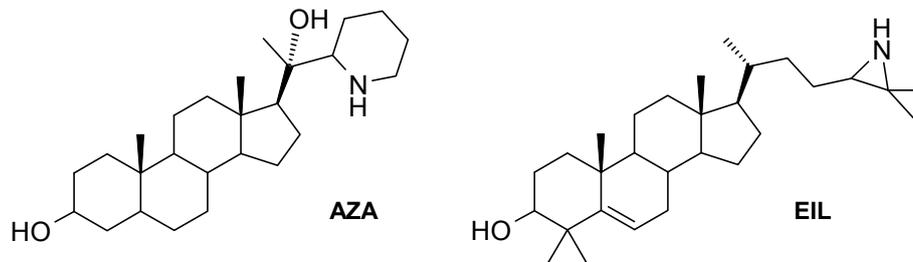


Abbildung 26: Amphotericin B

In neueren Studien wurden die Azasterole AZA und EIL als Wachstumsinhibitoren von *Candida* spp. vorgestellt (medianer IC_{50} AZA = 0.5 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} EIL = 2 $\mu\text{g/ml}$).^[167] Die Wirkung auf *Candida* spp. ist dabei auf die Hemmung der $\Delta^{24(25)}$ -Sterol Methyltransferase (24-SMT), einem Schlüsselenzym der Ergosterol-Biosynthese, zurückzuführen.

Abbildung 27: Azasterole als Wachstumsinhibitoren von *Candida* spp.

1.6 Hemmung von Parasiten

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate bei Malariainfektionen und der zunehmenden Ausbreitung von Resistenzen gegen übliche antiplasmodiale Medikamente wie Chloroquin und Pyrimethamin^[169-171] besteht weiterhin ein dringender Bedarf an neuen Wirkstoffen. Ein Ansatz in der Entwicklung potentieller Arzneistoffe gegen Malaria besteht in der Hemmung der für das Wachstum des Parasiten essentiellen Falcipaine und Plasmeppsine.^[172,173]

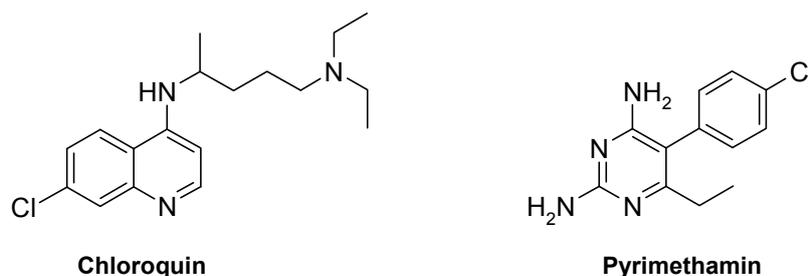


Abbildung 28: Antiplasmodiale Wirkstoffe

Daneben finden sich aber immer wieder auch neue Targets wie die Serinprotease PfSUB1

und die Cysteinprotease Dipeptidylpeptidase 3 (DPAP3), die als primäre Regler der Invasion des Parasiten gelten.^[174] Eine Hemmung dieser Enzyme führt zur Blockierung der proteolytischen Prozessierung von SERA5 (serine repeat antigen), das für die Freisetzung der Merozoiten aus den Erythrocyten verantwortlich ist.

Ein weiterer antiplasmodialer Wirkstoff ist Artemisinin, das aus der chinesischen Heilpflanze *Artemisia annua* extrahiert wird.^[175-177] Biotechnologische Ansätze, den achtmonatigen und im Vergleich zu Chloroquin zwölfmal so teuren Produktionsprozess effizienter zu gestalten, befinden sich noch in der Entwicklung. Artemisinin ($IC_{50} = 8.5 \text{ nM}$)^[172] hemmt den Chloroquin-resistenten *Plasmodium*-Stamm W2 um das Zehnfache besser als Chloroquin und heilt 90 % der Patienten innerhalb weniger Tage mit nur geringen Nebenwirkungen. Ende 2008 sind allerdings in Kambodscha bereits die ersten Fälle von Artemisinin-Resistenzen aufgetreten.^[178] Dennoch bleiben Artemisinin-basierte Kombinationstherapien derzeit das Mittel der Wahl im Kampf gegen Chloroquin-resistente Malaria.^[179,180]

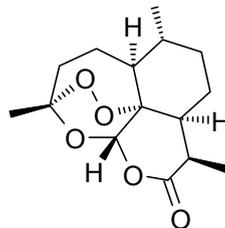


Abbildung 29: Artemisinin

Neben Malaria stellt die afrikanische Trypanosomiasis eine weitere parasitäre Tropenkrankheit dar. Diese durch *Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense* verursachte Schlafkrankheit ist im Spätstadium durch komatöse Schläfrigkeit charakterisiert und führt unbehandelt in 100 % aller Fälle zum Tod. Die Chemotherapie beschränkt sich hier auf Arzneimittel, die vor Jahrzehnten entwickelt wurden. Neben ernsthaften Nebenwirkungen und der geringen Effektivität bestehender Pharmaka führt die Entwicklung von resistenten *Trypanosoma*-Stämmen dazu, dass ein zunehmender Bedarf an neuen Arzneimitteln besteht.^[181,182] Dafür gelten die parasitären Cysteinproteasen Rhodesain (*T. b. rhodesiense*) und Brucipain (*T. b. brucei*) als vielversprechende Targets für Inhibitoren.^[183] In einem neuen Ansatz wurden peptidische Fumarsäurederivate als neue Leitstrukturen für Rhodesain- und Falcipaininhibitoren vorgestellt.^[184,185]

2 Zielsetzung

Trotz immenser Bemühungen in der Entwicklung klinisch effektiver Medikamente, die auf Aspartatproteasen abzielen, haben sich bislang lediglich HIV-1- und Renininhibitoren in der Therapie bewährt.^[127] Mit den 3-Phenylaziridin-2-carboxylaten **A-07** und **A-08**^[142] wurden neue irreversible Inhibitoren der SAP2 von *Candida albicans* vorgestellt.

In Dockingstudien wurde der Bindungsmodus für **A-07** und **A-08** simuliert (Abbildung 30).^[142] Im Vergleich zu dem größeren, reversiblen Inhibitor A-70450 (vgl. Kristallstruktur Abbildung 18, S. 18) adressieren die Liganden der beiden Aziridine in der Simulation hauptsächlich die S1-, S2-, S1'- und S2'-Taschen. So wird auch die Wasserstoffbrückenbindung zu dem konservierten Wassermolekül zwischen S2 und S3 nicht ausgebildet. Allerdings kommt es bei beiden Inhibitoren zur Bildung der Wasserstoffbrücke mit Asp218 im aktiven Zentrum sowie der doppelten Wasserstoffbrücke zu Gly85. Die Anordnung der *N*-Benzyl- und 3-Phenyl-Reste der Inhibitoren lassen auf mögliche π - π -Wechselwirkungen mit Tyr84 und Tyr225 schließen. Aus der Dockingstudie lassen sich für die jeweils am Aziridinring (*R,R*)- und (*S,S*)-konfigurierten Diastereomere keine signifikanten Unterschiede im Bindungsmodus feststellen. Abbildung 30 zeigt auch, wie der *N*-Benzyl-Substituent mit dem 3-Phenyl-Rest beim Wechsel von (*R,R*) (A) zu (*S,S*) (B) die Ausrichtung in die Bindungstaschen S1 bzw. S2 tauscht. Für die S1'-Tasche zeigt sich, dass die Seitenkette von (*S*)-Phe offensichtlich zu sperrig ist. So ragt der Phenylring etwas aus der Tasche heraus, was die etwas geringere Potenz von **A-07** gegenüber **A-08** erklären könnte. Doch auch für die Valin-Seitenkette in **A-08** zeigt sich Raum für Verbesserung. (*R*)-Val sollte besser in die Bindungstasche passen und so eine festere Bindung an das Enzym ermöglichen. Weiteres Potential, die Inhibitoren zu optimieren, besteht darin, durch Verlängerungen oder Verzweigungen des *N*-Benzyl-Substituenten die S3-Tasche des Enzyms analog zu A-70450 zu adressieren.

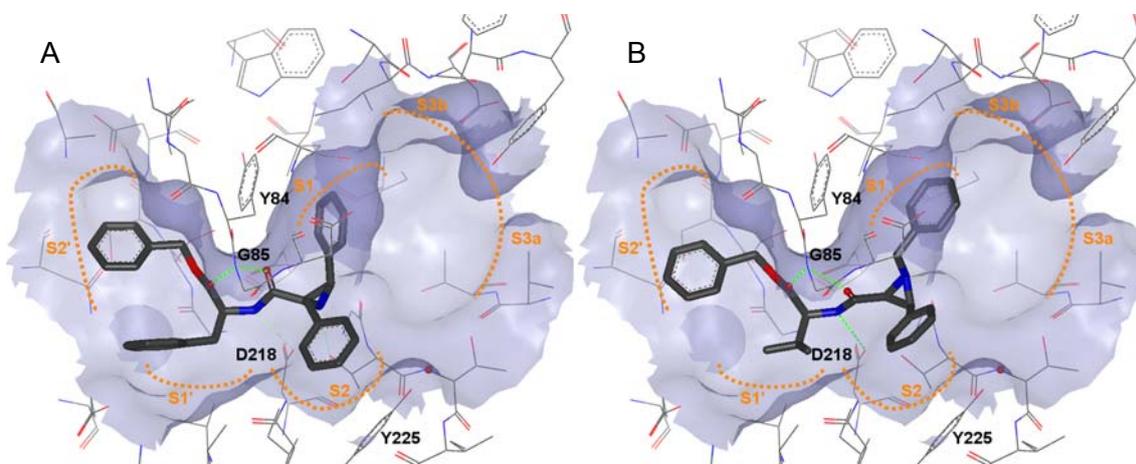


Abbildung 30: Dockingsimulation von (*R,R*)-**A-07** (A) und (*S,S*)-**A-08** (B) an SAP2;^[142]
Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Um das Potential der Inhibitoren hinsichtlich der Selektivität gegenüber anderen Aspartatproteasen einzuschätzen, wurden die Strukturen von SAP2 (PDB: 1EAG),^[104,105] Renin (1RNE),^[186] Plasmepsin II (1LEE),^[187] Pepsin (1PSO)^[188] und BACE (1W51)^[189] in MOE[®]^[190] virtuell überlagert (Abbildung 31).^[142] Durch die große Ähnlichkeit der Bindungstaschen in S1, S1' und S2' ist zunächst keine sonderliche Selektivität zu erwarten. Jedoch zeigen sich Unterschiede in der S2-Tasche. Für eine Optimierung der Inhibitoren bezüglich der Selektivität scheint, ebenso wie für deren Potenz, die Adressierung der S3b-Tasche geeignet zu sein, die in Renin und Pepsin komplett kollabiert ist. Die seit längerem bekannte Flexibilität der Bindungstaschen von Aspartatproteasen des Clans AA (Familien A1 & A2) wurde durch entsprechend unterschiedliche Kristallstrukturen von Plasmepsin II bestätigt.^[103,191,192] Weiterhin sind solche flexible Schleifen auch für andere Aspartatproteasen denkbar. Daher sollten Dockingstudien je nach Wahl der Kristallstruktur mit Vorsicht interpretiert werden.

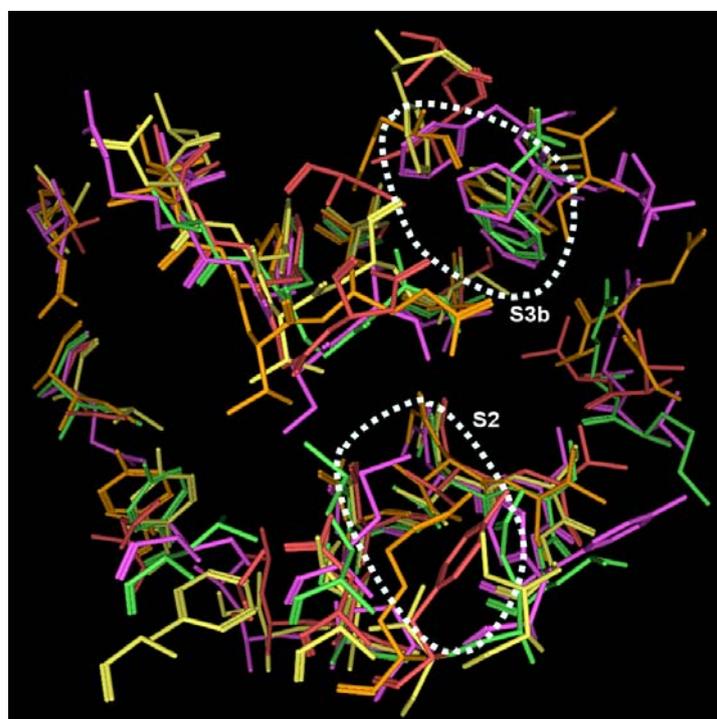


Abbildung 31: Virtuelle Überlagerung von SAP2 (rot), Renin (magenta), Plasmepsin II (gelb), Pepsin (grün) und BACE (orange);^[142] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Testung von 3-Phenylaziridin-2-carboxylaten als irreversible Inhibitoren der sekretorischen Aspartatproteasen von *Candida albicans*. Dabei sollten die Verbindungen **A-07** und **A-08** durch Variation der Reste optimiert werden (Abbildung 32). Dies beinhaltet eine vermutete bessere Adressierung der S1'-Tasche durch Umkehrung der Konfiguration der Aminosäurereste (R). Die Einführung von Alkyl-, Aryl- und Acylresten (R') verschiedener Kettenlängen sowie unterschiedlicher Verzweigungen am Aziridinstickstoff sollte den Inhibitor der S3-Tasche zugänglich machen. Weiterführende Dockingstudien lassen eine weitere Verbesserung durch Insertion von Methylengrup-

pen am Aziridinring vermuten. Dies sollte durch Synthese des entsprechenden Analogons zu **A-07** überprüft werden. Die Einführung eines Piperidinrests am Aziridinstickstoff sollte Aufschluss über eine denkbare Selektivität bzw. Bevorzugung der Inhibitoren gegenüber Plasmeptinen geben.

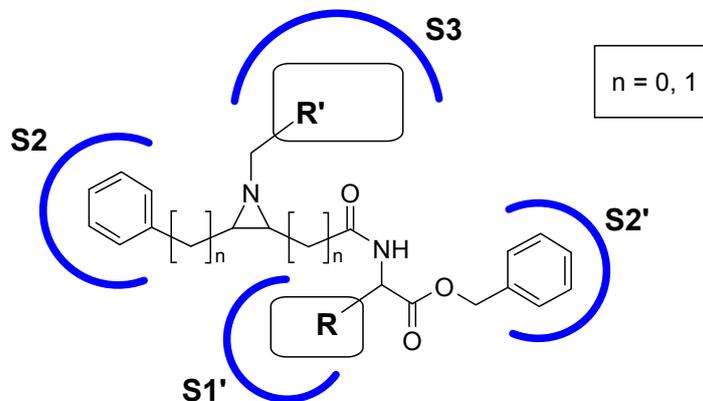


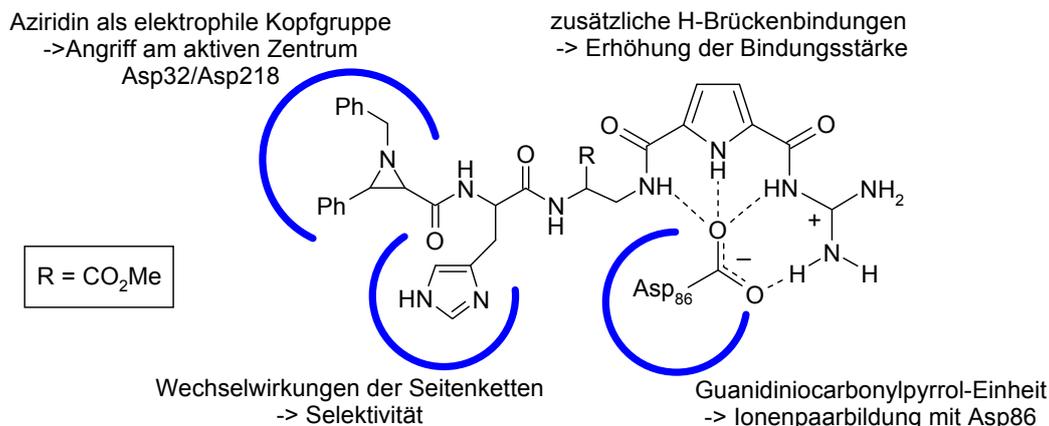
Abbildung 32: Schematischer Aufbau der zu variierenden 3-Phenylaziridin-2-carboxylate

Neben den Testungen an den SAP-Isoenzymen sollten die synthetisierten 3-Phenylaziridin-2-carboxylate auch auf Selektivität bezüglich anderer Aspartat- (Cathepsin D), Cystein- (Falcipain 2 & 3, SARS-CoV-PL^{pro}, Rhodesain) und Serinproteasen (Trypsin, Chymotrypsin) untersucht werden. Testungen an Pilzkulturen (*C. albicans*), Parasiten (*P. falciparum*, *T. brucei brucei*, *L. major*), zahlreichen Bakterien sowie toxikologische Screenings an Makrophagen sollten das inhibitorische Gesamtprofil der Verbindungen abrunden.

Weiterhin sollten durch Trennung der als Diastereomere gemischte synthetisierten 3-Phenylaziridin-2-carboxylate die Ergebnisse der Dockingsimulation bestätigt werden. Demnach müssten die einzelnen Diastereomere äquipotent hemmen. Durch HPLC-CD-Spektroskopie sollten die einzelnen Diastereomere stereochemisch analysiert werden. Dadurch können Hemmdaten exakt den verschiedenen Stereoisomeren zugeordnet werden.

Ein Ansatz, den SAP-spezifischen Asp86-Rest an der Haarnadelschleife über der S1-Tasche zu nutzen (vgl. Abbildung 4, S. 9), besteht in der Einführung einer als Carboxylatrezeptor literaturbekannten Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit.^[193-196] Diese bindet Carboxylate durch Ionenpaarbildung bis zu 30-fach stärker als die Stammverbindung, das Acetylguanidiniokation. Durch hohe Bindungskonstanten, die auch in Wasser erreicht werden, bietet sich der Einsatz dieses „Rezeptors“ auch unter physiologischen Bedingungen an. Zusätzlich zur Ionenpaarbildung bindet das Carboxylat über Wasserstoffbrückenbindungen an das Pyrrol-NH sowie an die Amidbindung des „Rezeptors“. Auf diese Weise soll die Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit selektiv an Asp86 binden und über die Verlängerung durch einen Spacer den elektrophilen Teil des Inhibitors zum aktiven Zentrum der SAP2 dirigieren. Als Spacer wurde in Anlehnung an Dockingstudien Histidin gewählt (Schema 3, Abbildung 33). Demnach sollte sich das Aziridin dem aktiven Zentrum auf bis zu 3.21 Å nähern können. Mit einem Abstand von 2.00-3.11 Å interagiert der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rest in der Simulation wie ge-

wünscht mit Asp86. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch Synthese und Testung gezeigt werden, dass diese Verbindung tatsächlich als Inhibitor der SAP2 wirkt.



Schema 3: Bindungsschema eines Aziridin-verknüpften Guanidiniocarbonylpyrrols als potentiell selektiver Inhibitor der SAP2

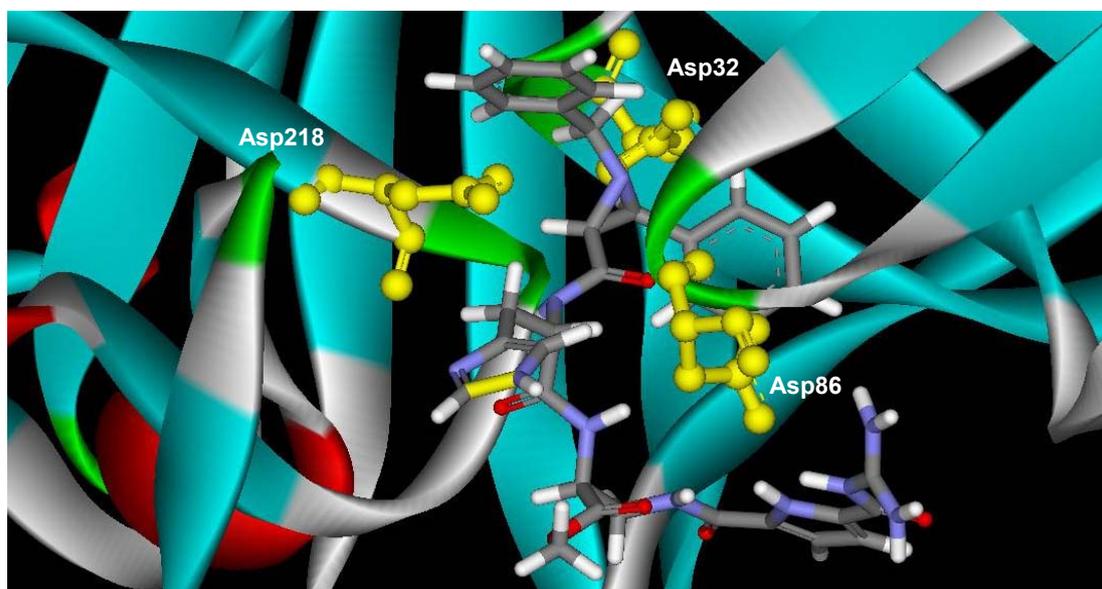


Abbildung 33: Dockingsimulation eines Aziridin-verknüpften Guanidiniocarbonylpyrrols an SAP2

Die Synthese eines mit Biotin verknüpften 3-Phenylaziridin-2-carboxylats sollte Analysen auf subzellulärer Ebene ermöglichen. Durch Bindung an Streptavidin-Konjugate können so Targetproteine identifiziert und Bindungsstellen lokalisiert werden.

Basierend auf der Postulierung eines neuen Hemmmechanismus für Aspartatproteasen (Kapitel 6.2)^[142] sollte ein olefinisches Analogon von Pepstatin A synthetisiert werden. Ein Michael-System sollte dabei als elektrophiles Zentrum für den irreversiblen Angriff der Aspartatprotease dienen. In einem Nebenprojekt sollten durch Komplementärsynthesen zu früheren Arbeiten weitere Olefine als potentielle Inhibitoren von Cysteinproteasen (Rhodesain, Falcipain 2 & 3) synthetisiert werden.^[184,185]

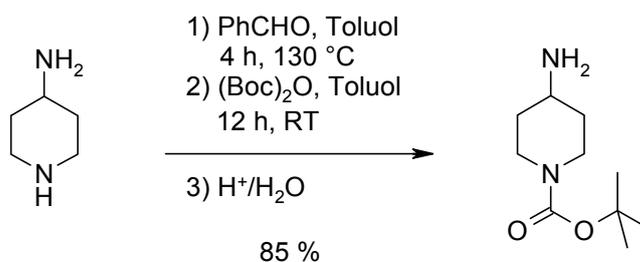
3 Synthesen

3.1 Vorstufen

Für die Synthese der 3-Phenylaziridin-2-carboxylate (s. Kapitel 3.2.1, S. 30) wurden in einigen Fällen Amine verwendet, die nicht käuflich erworben wurden. Im Folgenden werden die Synthesen dieser Amine beschrieben.

3.1.1 Synthese des 4-Aminopiperidin-Derivats

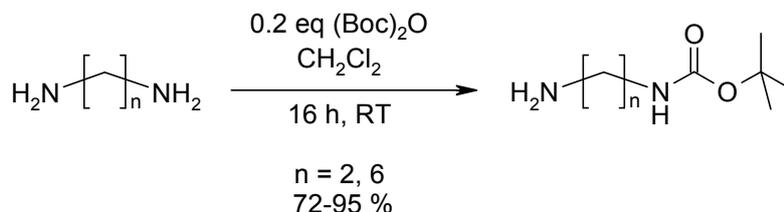
Bei der Schützung des Piperidin-Stickstoffs mit einer Boc-Gruppe wird zunächst die Amino-Gruppe mit Benzaldehyd zum Imin umgesetzt. Die anschließende Reaktion mit $(\text{Boc})_2\text{O}$ und saure Aufarbeitung führt zum gewünschten Produkt (Schema 4).^[197,198]



Schema 4: Schützung von 4-Aminopiperidin

3.1.2 Einführung einer Schutzgruppe in Diamine

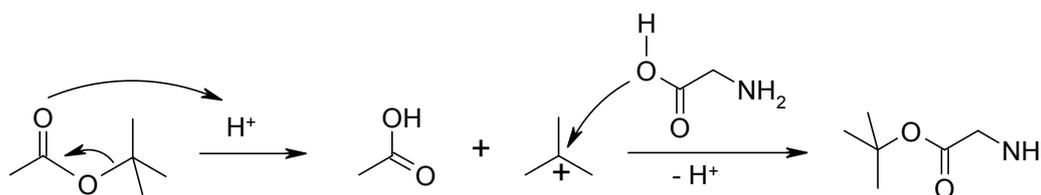
Für die Einführung nur einer Boc-Schutzgruppe in Diamine wird das entsprechende Diamin in fünffachem Überschuss vorgelegt. Bei 0 °C wird eine verdünnte $(\text{Boc})_2\text{O}$ -Lösung (Dichlormethan) sehr langsam zugetropft um eine Reaktion mit beiden Amingruppen zu vermeiden (Schema 5).^[199,200]



Schema 5: Einführung einer Schutzgruppe in Diamine

3.1.3 Glycin-*tert*-butylester

Die Veresterung von Glycin zum *tert*-Butylester wird mit Perchlorsäure in *tert*-Butylacetat durchgeführt.^[201] Dabei wird *tert*-Butylacetat am Alkyl-Sauerstoff gespalten ($A_{AL}1$) und das intermediär gebildete *tert*-Butyl-Kation von Glycin abgefangen (Schema 6).



Schema 6: Veresterung von Glycin zum *tert*-Butylester

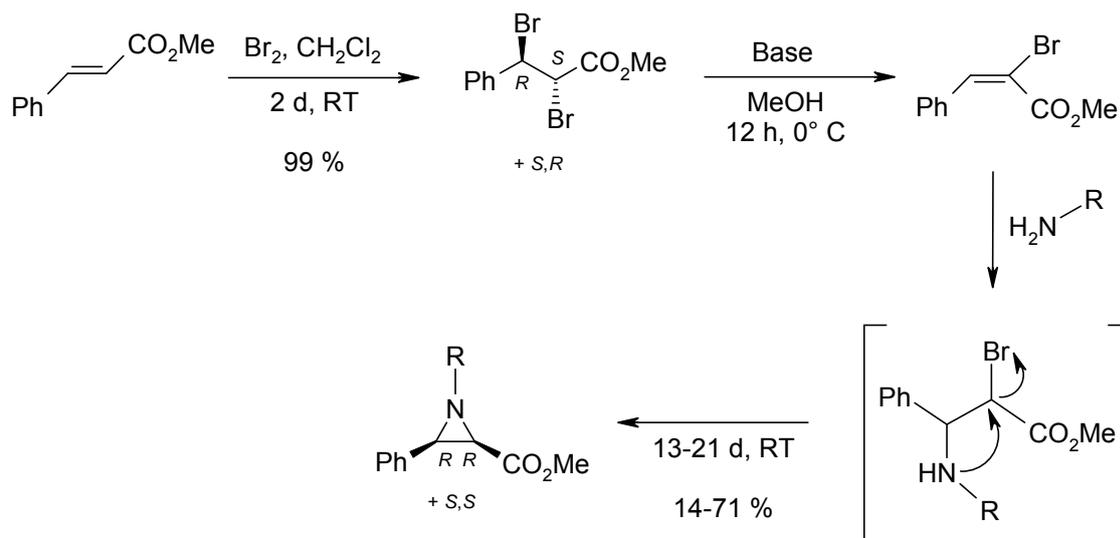
3.2 Synthese von *cis*-konfigurierten Aziridinen

Die Kenntnis der Notwendigkeit der *cis*-Konfiguration am Dreiring erfordert die selektive Synthese von *cis*-konfigurierten Aziridinen als potentielle Inhibitoren von Aspartatproteasen. Weiterhin sollte die Synthese Variationen am Stickstoff und die Verknüpfung mit Aminosäuren ermöglichen.

3.2.1 Synthese von 3-Phenylaziridin-2-carboxylaten

Die Cromwell-Synthese stellt ein geeignetes Verfahren dar, *cis*-konfigurierte Aziridin-2-carboxylate als Racemate zu erhalten (Schema 7). Zunächst wird Zimtsäuremethylester in die entsprechende Dibromverbindung überführt.^[202,203] Der Ringschluss erfolgt durch Eliminierung von Bromwasserstoff, anschließender Michaeladdition eines primärenamins und intramolekularer nucleophiler Substitution.^[204,205] Die Eliminierung wird dabei durch das Amin selbst oder durch Triethylamin initiiert. Das olefinische Zwischenprodukt kann im ¹H-NMR-Spektrum nachgewiesen werden.

Zwar erhält man mittels der Cromwell-Synthese auch bis zu 25 % des *trans*-Produkts, jedoch kann dieses durch säulenchromatographische Aufreinigung von dem racemischen *cis*-Produkt abgetrennt werden und wird im Rahmen dieser Arbeit zumeist gar nicht isoliert. Die durch Variation der Reste am primären Amin auf diesem Weg dargestellten *cis*-konfigurierten 3-Phenylaziridin-2-carboxylate sind in Tabelle 3 aufgelistet. Es werden Ausbeuten von 14-71 % erreicht.



Schema 7: Cromwell-Synthese zu racemischen *cis*-3-Phenylaziridin-2-carboxylaten

Tabelle 3: Übersicht der synthetisierten *cis*-Aziridin-2-carbonsäureester

Verbindung ^a	R	Ausbeute [%]
A-05	Bn	61
A-23 ^b	<i>iso</i> -Butyl	20
A-24 ^b	Cyclohexylmethyl	30
A-25	Hexyl	65
A-26 ^c	(<i>R</i>)-1-Phenylethyl	24
A-27 ^c	(<i>S</i>)-1-Phenylethyl	25
A-29	<i>tert</i> -Butyl	14
A-30	<i>n</i> -Butyl	71
A-49	6-Boc-aminohexyl	53
A-50	1-Methoxycarbonylmethyl	21
A-51	2-Methoxycarbonylethyl	31
A-53	1-Boc-piperidin-4-ylmethyl	52
A-54	1-Boc-piperidin-4-yl	31
A-55	Cyclohexylmethyl	41
A-64	6-Boc-aminoethyl	52
A-69	1-Boc-carbonylmethyl	14
A-70a	1-Methylbutyl	31
A-70b	1-Methylbutyl	26
A-71	2-Ethylhexyl	63
A-72a	1,4-Dimethylpentyl	38
A-72b	1,4-Dimethylpentyl	31
A-73	1-Ethylpropyl	23
A-74	1-Propylbutyl	26

^a *cis*-konfiguriert (*rac.*)

^b Synthese des Ethylesters

^c Produkt enantiomerenrein; Stereochemie am Aziridin unbekannt

Die Identifizierung der *cis*-konfigurierten Aziridine erfolgt durch Auswertung der NMR-Daten. Bei *cis*-Konfiguration erhält man für die Protonen am Aziridinring jeweils Dubletts mit Kopplungskonstanten von $J = 6.8-7.1$ zwischen 2.5 und 3.1 ppm (Diagramm 1).^[204]

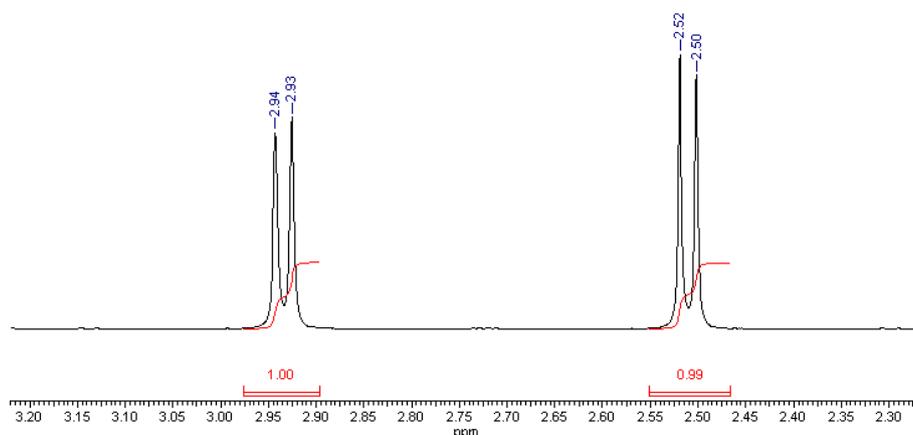
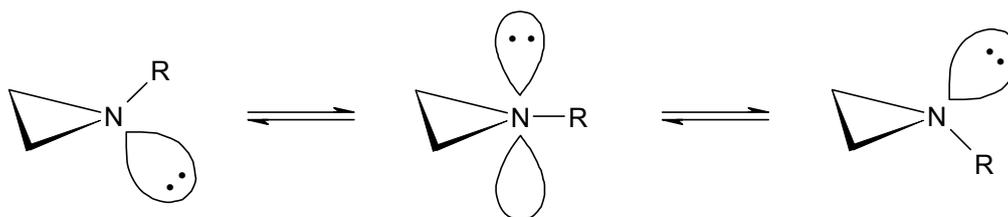


Diagramm 1: ^1H -NMR-Spektrum von A-73 mit den charakteristischen Peaks für die Protonen der *cis*-Aziridine

Das im ^1H -NMR-Spektrum aufgrund der in Aziridinen erhöhten Energiebarriere für die Inversion am Stickstoff (Schema 8) eventuell zu erwartende Auftreten von Invertomeren wird nicht beobachtet. Die Barriere erhöht sich im Vergleich zu einfachen, ungespannten sekundären Aminen ($\Delta G^\ddagger \sim 25 \text{ kJ/mol}$)^[206,207] bei Aziridinen (1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäurebenzylester: $\Delta G^\ddagger \sim 69 \text{ kJ/mol}$)^[205] um das Dreifache. Grund dafür ist die erhöhte Winkelspannung beim Durchlauf des planaren Übergangszustands. Jedoch verläuft die Inversion bei Raumtemperatur noch schnell genug, dass im ^1H -NMR-Spektrum keine Invertomere auftreten.

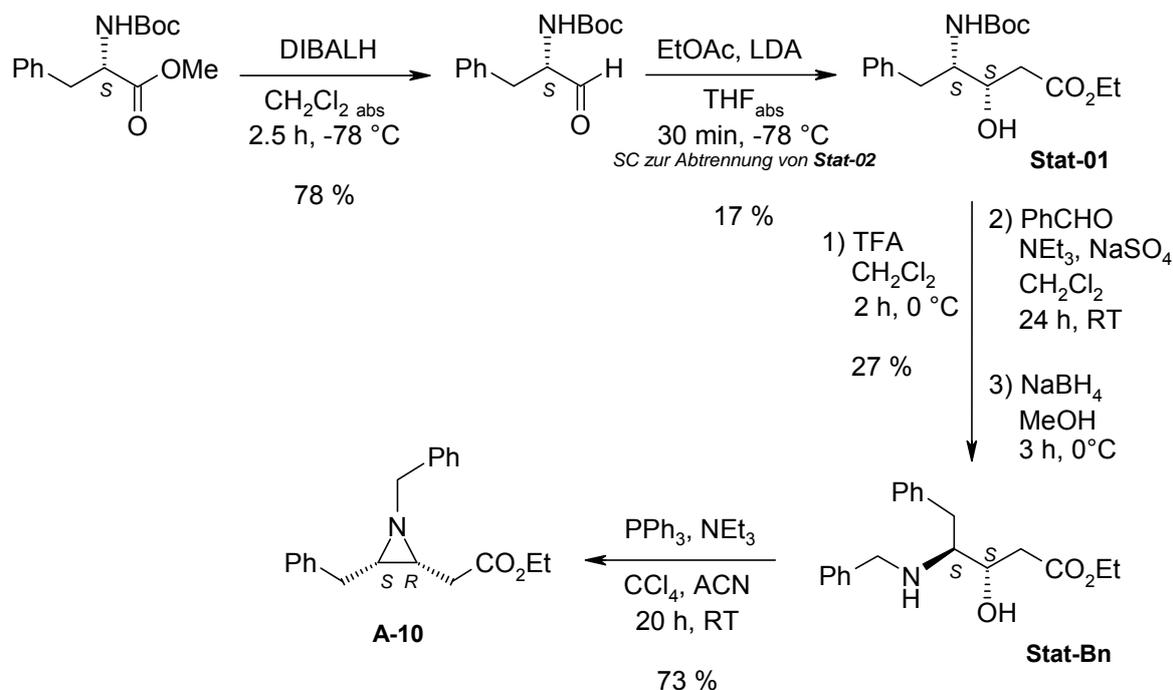


Schema 8: Inversion am Aziridinstickstoff

3.2.2 Stereoselektive Aziridinsynthese

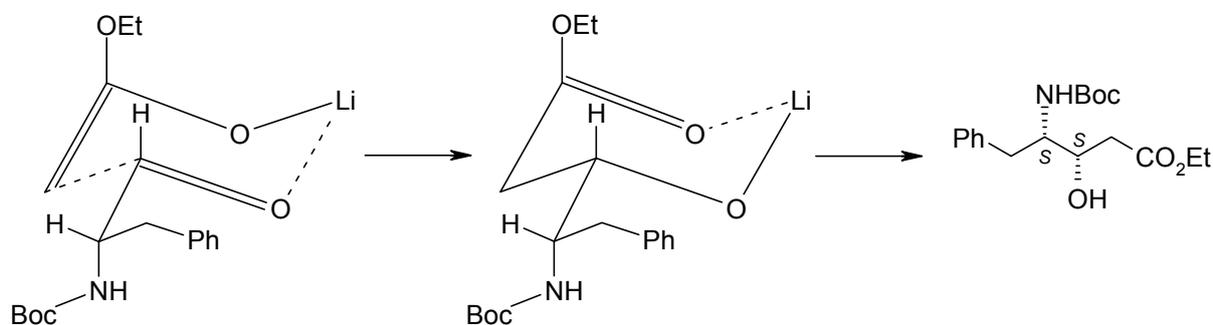
Neben den 3-Phenylaziridin-2-carboxylaten soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Einführung von Methylengruppen an den Aziridinkohlenstoffatomen die Hemmwirkung beeinflusst. Das methylenverbrückte Aziridin kann stereoselektiv synthetisiert werden (Schema 9). Dafür wird zunächst Boc-Phe-OMe mittels DIBALH zum Aldehyd reduziert.^[208] Dieser wird anschließend mit dem *in situ* mittels LDA dargestellten Enolat von Essigsäureethylester zu den diastereomeren Statinaloga **Stat-01** und **Stat-02** umgesetzt.^[209] Nach

säulenchromatographischer Abtrennung des *S,R*-Isomers (**Stat-02**) wird die Boc-Schutzgruppe des *S,S*-Isomers (**Stat-01**) abgespalten. Das Amin wird durch Umsetzung mit Benzaldehyd zum Imin und anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid benzyliert (**Stat-Bn**).^[210] Der intramolekulare Ringschluss zum Aziridin wird durch Redoxkondensation nach *Mukaiyama*^[211] erreicht und führt zum methylenverbrückten Aziridin **A-10** in einer Gesamtausbeute von 3 %.



Schema 9: Stereoselektive Synthese des methylenverbrückten Aziridins A-10

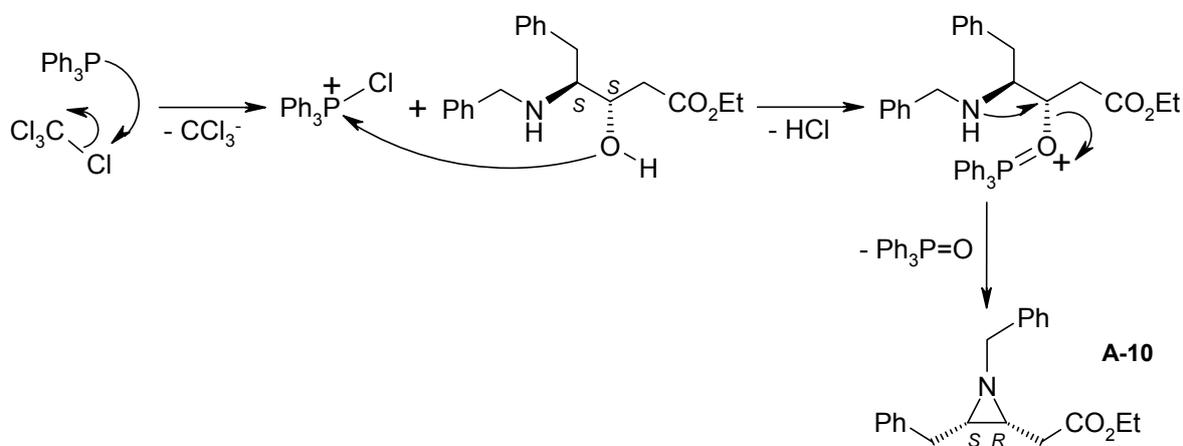
Große Verluste bei der Ausbeute entstehen bei der Bildung der diastereomeren Statinanaloge. Beim Angriff des Lithiumenolats wird an dem einfach geschützten α -Aminoaldehyd die Bildung des „anti-Felkin-Ahn“-Produkts, das zum *syn*-Statinanalogon führt, stereochemisch nur geringfügig bevorzugt (1.26:1, Schema 10).^[212]



Schema 10: „Anti-Felkin-Ahn“-Übergangszustand, Bildung des *syn*-Stininanalogons

Der Schritt zum Aziridin-Ringschluss erfolgt über eine Redoxkondensation nach *Mukaiyama* (Schema 11). Dabei wird zunächst Triphenylphosphin durch Tetrachlorkohlenstoff aktiviert und anschließend von der Hydroxygruppe nucleophil angegriffen. Unter Eliminierung von

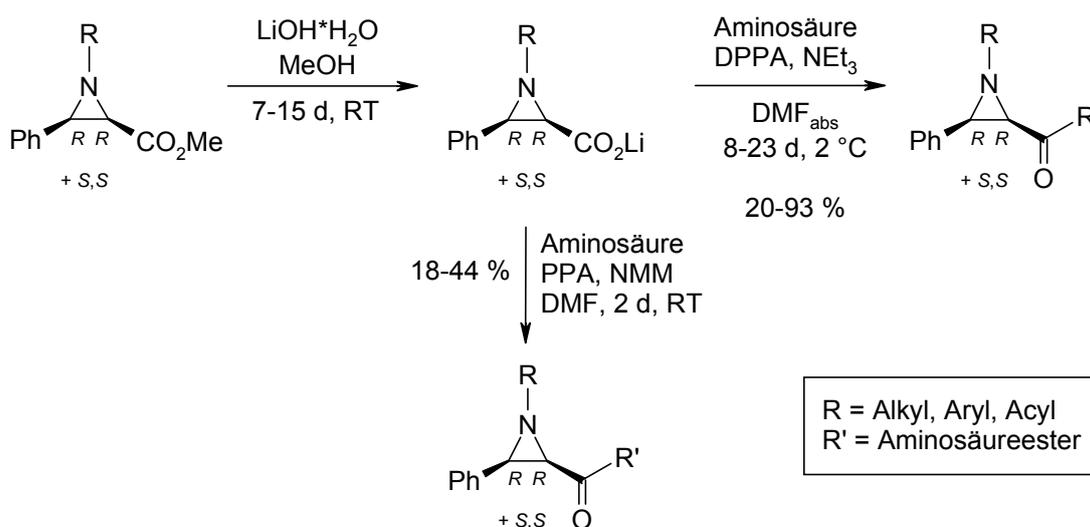
Chlorwasserstoff bildet sich die Hydroxy-aktivierte Zwischenstufe, aus der sich durch intramolekulare nucleophile Substitution der Aziridinring ausbildet. Triebkraft der Reaktion ist die Abspaltung von Triphenylphosphinoxid.^[213]



Schema 11: Redoxkondensation nach *Mukaiyama*

3.3 Aminosäure-Verknüpfung von Aziridinen

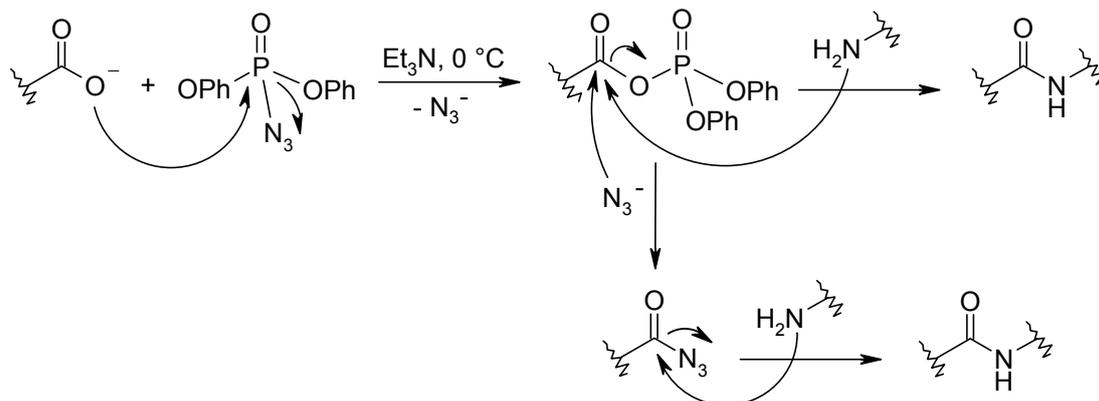
Um die erhaltenen *cis*-Aziridin-2-carbonsäureester mit Aminosäuren zu verknüpfen wird zunächst der Ester mit LiOH hydrolysiert. Die Reaktion verläuft quantitativ und wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Das erhaltene Lithiumsalz wird dann direkt mit der gewünschten Aminosäure umgesetzt (Schema 12). Für die Aktivierung des Carboxylats wird dabei auf die Peptidkuppelungsreagenzien Diphenylphosphorylazid (DPPA)^[214-216] und Propylphosphonsäureanhyd (PPA)^[217] zurückgegriffen.



Schema 12: Aminosäure-Verknüpfung von Aziridin-2-carboxylaten mit DPPA & PPA

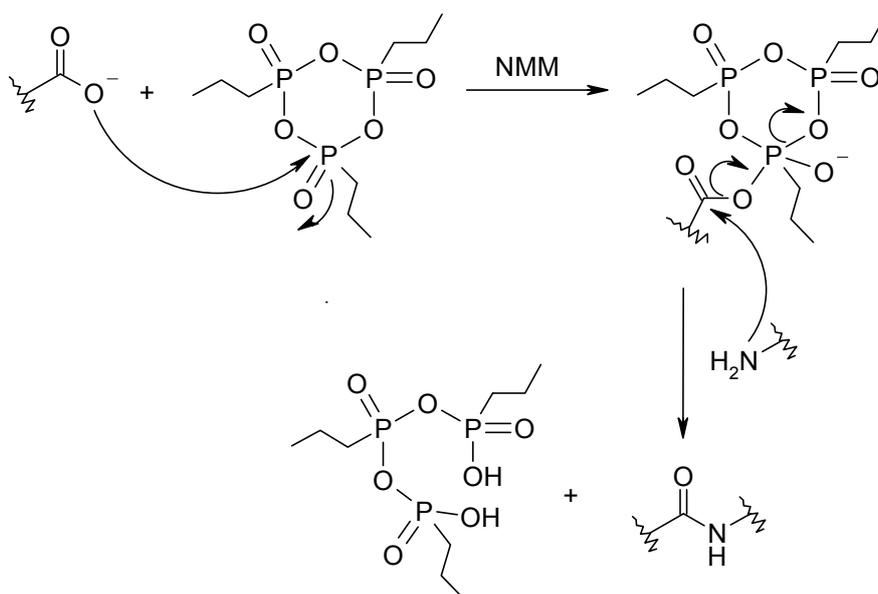
Beide Methoden stellen ein mildes Verfahren für die Peptidkupplung dar. Der Angriff des Carboxylats an DPPA generiert unter Azidabspaltung als aktivierte Zwischenstufe ein ge-

mischtes Phosphorsäureanhydrid, das entweder unter Bildung eines Säureazids oder direkt mit der Aminosäure weiterreagiert. Die Bildung des Zielpeptids erfolgt somit aus dem Phosphorsäureanhydrid oder dem Säureazid (Schema 13). DPPA-Kupplungen verlaufen bei Vermeidung eines Überschusses an Base ohne Racemisierung. Nachteile sind die geringe Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Gefahr der Bildung von Nebenprodukten aus dem Curtius-Abbau, die jedoch durch niedrige Temperaturen eingegrenzt werden kann.^[214-216]



Schema 13: DPPA-Kupplung

Bei der Peptidkupplung mit PPA wird durch den Angriff des Carboxylats ein gemischtes Phosphonsäureanhydrid als aktive Spezies generiert. Nucleophiler Angriff der Aminosäure führt zum Zerfall des Phosphonsäureanhydrid-Addukts und man erhält das gewünschte Produkt (Schema 14). Die Methode bietet den Vorteil, dass die entstandene Propylphosphonsäure durch Extraktion mit Wasser leicht entfernt und die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann.^[217] Verglichen mit DPPA verlaufen PPA-Kupplungen mit Aziridin-2-carboxylaten deutlich schneller. Jedoch sind mit DPPA durchschnittlich höhere Ausbeuten erreichbar.



Schema 14: PPA-Kupplung

In Tabelle 4 sind die auf diese Weise synthetisierten Aminosäure-verknüpften *cis*-Aziridin-2-carboxylate aufgelistet. Die zugehörigen Strukturen sind im Formelregister (Kapitel 18, S. 229) dargestellt. Durch den Einsatz der Aziridine als Racemate entstehen bei der Kupplung mit enantiomerenreinen Aminosäuren die Produkte als Diastereomeregemische. Dies führt zum Auftreten von doppelten Peak-Sätzen in den NMR-Spektren (Diagramm 2). Das jeweilige Diastereomerenverhältnis wurde durch LC-MS-Messungen oder Auswertung der Integrale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt. Die Auftrennung der erhaltenen Diastereomeregemische ist mit hydrostatischer Säulenchromatographie bislang nicht gelungen. Die Aziridine **A-36** bis **A-39** wurden durch den Einsatz enantiomerenreiner Eduktaziridine diastereomerenrein erhalten. Die Diastereomertrennung von **A-31** gelang mittels präparativer HPLC. Die übrigen Aziridine wurden nicht aufgetrennt.

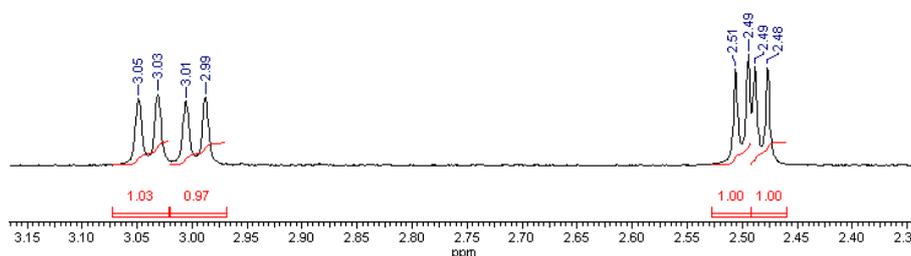


Diagramm 2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **A-82** mit den charakteristischen *cis*-Aziridin-C-H-Peaks bei doppeltem Peak-Satz

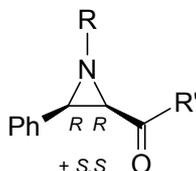


Tabelle 4: Aminosäure-verknüpfte *cis*-Aziridin-2-carboxylate

Verbindung ^a	R	R'	Methode	Ausbeute [%]
A-07 (1.1:1) ^b	Bn	(S)-PheOBn	DPPA	91
A-08 (1.4:1) ^c	Bn	(S)-ValOBn	DPPA	81
A-28 (1.1:1) ^b	Bn	(R)-PheOBn	DPPA	63
A-31 (1.5:1) ^c	Bn	(R)-ValOBn	DPPA	39
A-31a (3:1) ^b	Bn	(R)-ValOBn	DPPA	1.9
A-31b ^d	Bn	(R)-ValOBn	DPPA	0.9
A-32 (1:1) ^b	Hexyl	(S)-PheOBn	DPPA	61
A-33 (1:1.1) ^c	Hexyl	(S)-ValOBn	DPPA	58
A-34 (1:1) ^b	<i>n</i> -Butyl	(S)-PheOBn	DPPA	84
A-35 (1:1.2) ^c	<i>n</i> -Butyl	(S)-ValOBn	DPPA	68
A-36 ^d	(R)-1-Phenylethyl	(S)-PheOBn	DPPA	82
A-37 ^d	(S)-1-Phenylethyl	(S)-PheOBn	DPPA	77
A-38 ^d	(R)-1-Phenylethyl	(S)-ValOBn	DPPA	74
A-39 ^d	(S)-1-Phenylethyl	(S)-ValOBn	DPPA	73
A-40 (1:1) ^b	Bn	(S)-LeuOBn	DPPA	89
A-41	Bn	(S)-HisOMe	DPPA	n.b.

Verbindung ^a	R	R'	Methode	Ausbeute [%]
A-43 (1:1) ^b	Cyclohexylmethyl	(S)-PheOBn	DPPA	24
A-44 (1.1:1) ^c	<i>iso</i> -Butyl	(S)-ValOBn	DPPA	88
A-45 (1:1) ^c	Cyclohexylmethyl	(S)-ValOBn	DPPA	65
A-46 (1:1.1) ^b	<i>tert</i> -Butyl	(S)-PheOBn	DPPA	86
A-47 (1.1:1) ^c	<i>tert</i> -Butyl	(S)-ValOBn	DPPA	68
A-52 (1:1.1) ^c	6-Boc-aminoethyl	(S)-PheOBn	DPPA	57
A-56 (1:1) ^b	Acetyl-(S)-PheOBn	(S)-PheOBn	DPPA	77
A-57 (1:1) ^b	Cyclohexylmethyl	(R)-PheOBn	DPPA	76
A-58 (1.1:1) ^b	<i>tert</i> -Butyl	(R)-PheOBn	DPPA	66
A-59 (1:1.1) ^c	Cyclohexylmethyl	(R)-ValOBn	DPPA	65
A-60 (1.2:1) ^c	1-Boc-piperidin-4-ylmethyl	(S)-ValOBn	DPPA	73
A-61 (1:1.1) ^c	1-Boc-piperidin-4-yl	(S)-ValOBn	DPPA	85
A-62 (1:1) ^c	1-Boc-piperidin-4-ylmethyl	(S)-PheOBn	DPPA	85
A-63 (1:1.1) ^c	1-Boc-piperidin-4-yl	(S)-PheOBn	DPPA	93
A-65 (1:1.1) ^b	Acetyl-(R)-PheOBn	(R)-PheOBn	DPPA	24
A-66 (1:1.1) ^b	Acetyl-(S)-PheOMe	(S)-PheOBn	DPPA	32
A-67 (1:1.1) ^b	Acetyl-(R)-PheOMe	(R)-PheOBn	DPPA	25
A-68 (1:1.1) ^c	6-Boc-aminoethyl	(S)-PheOBn	DPPA	90
A-76a (1.1:1) ^b	1-Methylbutyl	(R)-PheOBn	PPA	44
A-76b (1:1) ^b	1-Methylbutyl	(R)-PheOBn	PPA	26
A-77a (1:1) ^c	1-Methylbutyl	(R)-ValOBn	PPA	35
A-77b (1:1) ^c	1-Methylbutyl	(R)-ValOBn	PPA	23
A-78 (1:1) ^b	2-Ethylhexyl	(R)-PheOBn	PPA	35
A-79 (1:1) ^c	2-Ethylhexyl	(R)-ValOBn	PPA	35
A-80 (1:1.1) ^b	1-Ethylpropyl	(R)-PheOBn	PPA	33
A-81 (1:1) ^c	1-Ethylpropyl	(R)-ValOBn	PPA	26
A-82 (1:1) ^b	1-Propylbutyl	(R)-PheOBn	PPA	32
A-83 (1:1.1) ^c	1-Propylbutyl	(R)-ValOBn	PPA	29
A-84 (1:1) ^b	1,4-Dimethylpentyl	(R)-PheOBn	PPA	37
A-85 (1:1) ^c	1,4-Dimethylpentyl	(R)-ValOBn	PPA	29
A-86 (1:1.1) ^b	1,4-Dimethylpentyl	(R)-PheOBn	PPA	22
A-87 (1:1) ^c	1,4-Dimethylpentyl	(R)-ValOBn	PPA	18
A-88 (1:1.1) ^b	Acetyl-(R)-ValOBn	OMe	DPPA	34
A-89 (1:1.1) ^b	Acetyl-(R)-PheOBn	OMe	DPPA	60

^a Dastereomerengemische, absolute Konfiguration des Aziridinrings ist (R,R) oder (S,S)

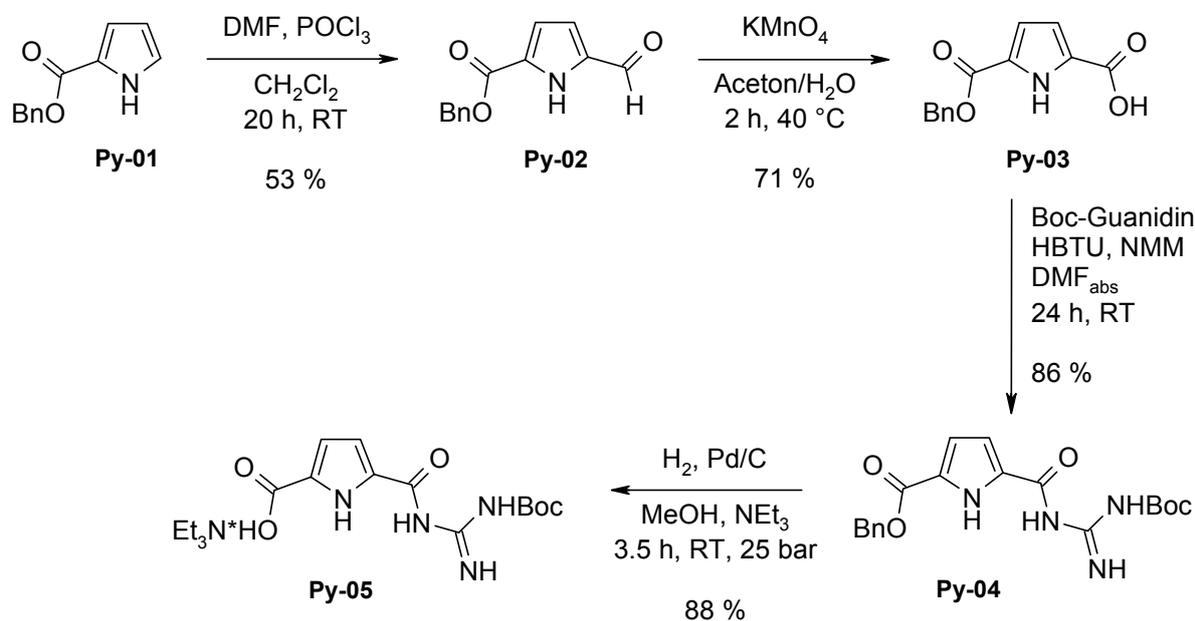
^b Diastereomenverhältnis mittels NMR bestimmt; ^c Diastereomenverhältnis mittels LC-MS bestimmt

^d diastereomenrein; Stereochemie am Aziridin unbekannt

3.4 Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrol-verknüpften Aziridins

Das Guanidiniocarbonylpyrrol-verknüpfte Aziridin **A-48** (Schema 21) wird als potentieller selektiver Inhibitor der SAP2 synthetisiert. Dafür wird zunächst der Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein aufgebaut (Schema 15). Eine klassische Vilsmeier-Reaktion von 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester **Py-01** führt zum Aldehyd **Py-02**.^[218] Oxidation mit Kalium-

permanganat zur Carbonsäure **Py-03**^[219] und anschließende Kupplung mit Boc-Guanidin *via* HBTU liefert den Guanidinocarbonylpyrrolbenzylester **Py-04**,^[220] der mittels katalytischer Hydrogenolyse über Pd/C bei 25 bar im Autoklaven zur Guanidinocarbonylpyrrolcarbonsäure **Py-05** umgesetzt wird.^[220]



Schema 15: Synthese der Guanidinocarbonylpyrrolcarbonsäure **Py-05**

Das für die Kupplung mit Boc-Guanidin verwendete Reagenz HBTU wurde früher als *O*-HBTU postuliert. Allerdings zeigten neuere Röntgenstrukturanalysen, dass zumindest im kristallinen Zustand die Guanidinioform *N*-HBTU vorliegt (Abbildung 34). Jedoch bleibt die Uroniumform *O*-HBTU die für die Peptidkupplung reaktivere Spezies.^[221]

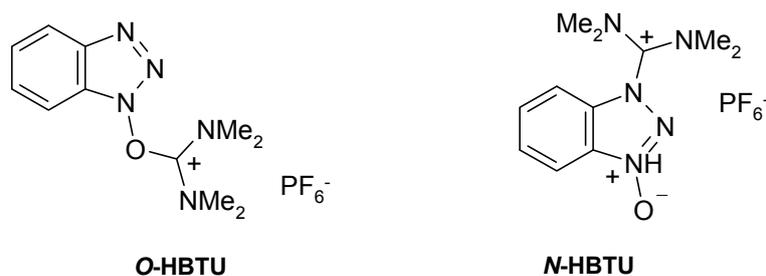
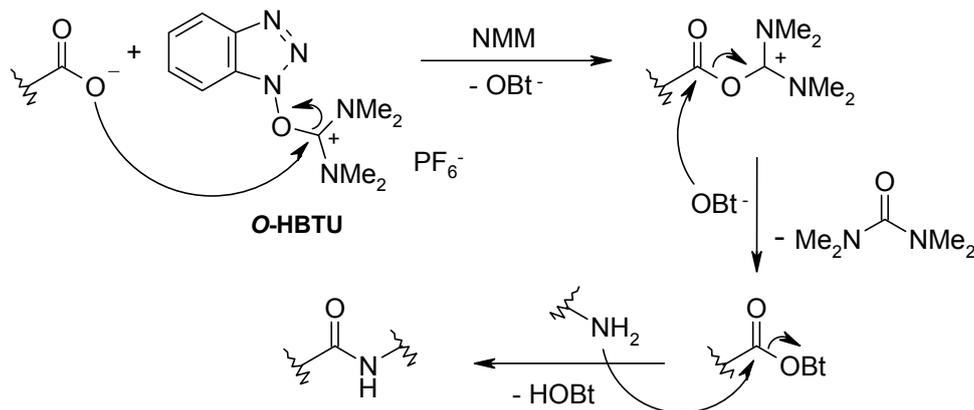


Abbildung 34: *O*- und *N*-Form von HBTU

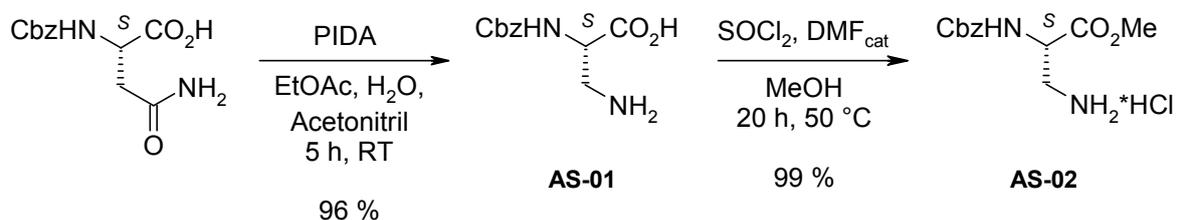
Die Peptidkupplung mit HBTU verläuft zunächst über den nucleophilen Angriff des Carboxylats unter Abspaltung von *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt). Anschließend reagiert das Intermediat mit HOBt zur aktivierten Spezies. Triebkraft hierfür ist die Bildung von Tetramethylharnstoff. Die Reaktion des Aktivesters mit dem Amin führt schließlich zum gewünschten Produkt (Schema 16).



Schema 16: HBTU-Kupplung

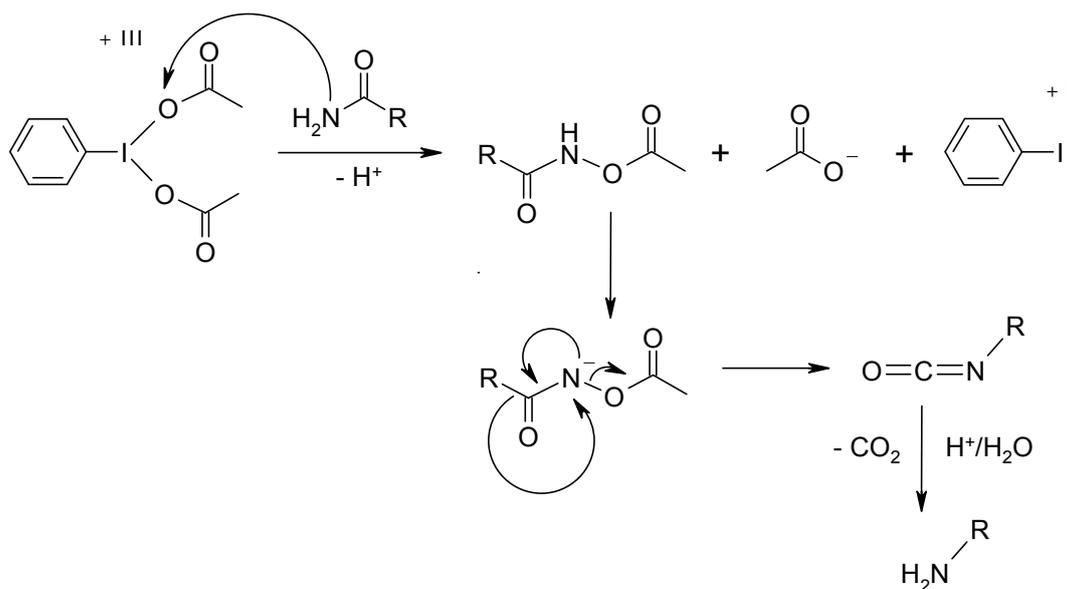
3.4.1 Synthese des Alaninderivats AS-02

Der Aminosäurespacer **AS-02** für den Guanidinocarbonylpyrrol-Baustein wird ausgehend von Cbz-Asn synthetisiert (Schema 17). Ein durch PIDA vermittelter Hofmann-Abbau führt zum Aminoalanin **AS-01**,^[222] welches nach Thionylchlorid-Aktivierung zum Alaninderivat **AS-02** verestert wird.^[223]



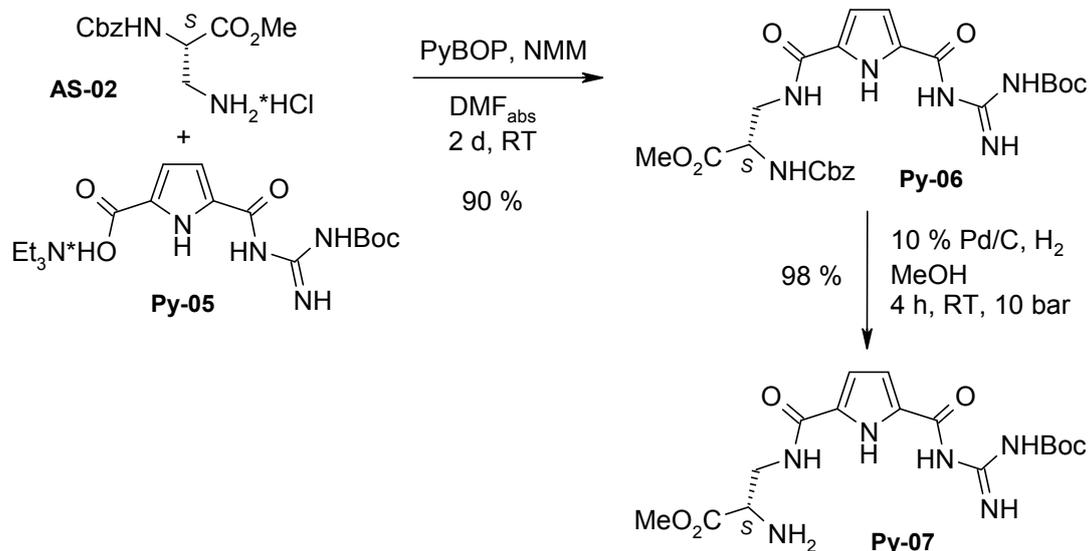
Schema 17: Darstellung des Alaninderivats AS-02

Der durch (Diacetoxiod)-benzol (PIDA) induzierte Hofmann-Abbau wurde speziell für Asparagin entwickelt und bietet gegenüber sonst üblichen Methoden neben der Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, dem Wegfall von Pyridin als Katalysator und dem Erhalt eines reinen Produkts den Vorteil, dass keine Nebenreaktionen zu Harnstoffderivaten auftreten.^[222] Dabei wird PIDA im ersten Schritt von dem Amid-Stickstoff reduziert. Die weitere Reaktion nimmt dann den für den Hofmann-Abbau üblichen Verlauf über die Isocyanat-Zwischenstufe mit abschließender Decarboxylierung der durch Hydrolyse gebildeten Carbamidsäure (Schema 18).

Schema 18: Hofmann-Abbau *via* PIDA

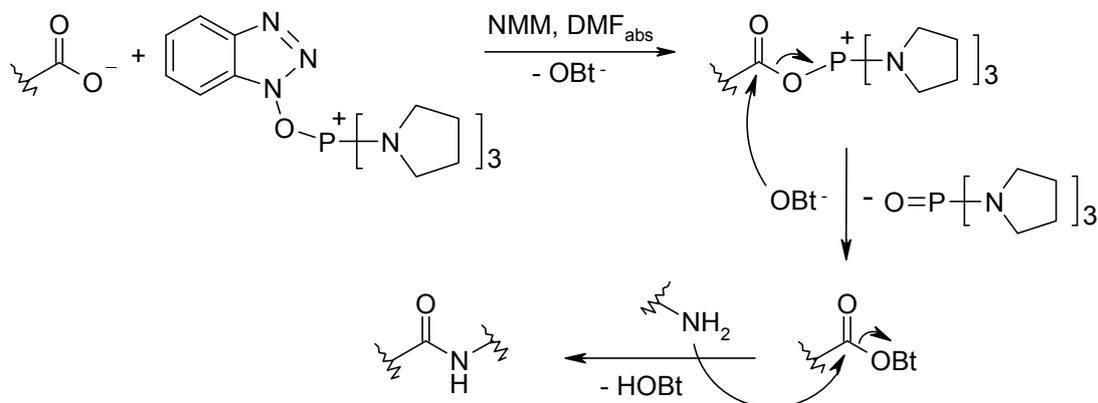
3.4.2 Verknüpfung der Guanidinocarbonylpyrrol-Einheit

Zur Fertigstellung des Guanidinocarbonylpyrrol-Bausteins wird **Py-05** mit dem Alaninderivat **AS-02** mittels PyBOP zu **Py-06** verknüpft.^[196] Abschließende katalytische Hydrogenolyse über Pd/C bei 10 bar im Autoklaven führt zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe und man erhält den fertigen Guanidinocarbonylpyrrol-Baustein **Py-07** (Schema 19).^[196]

Schema 19: Einführung des Aminosäure-Spacers zur Fertigstellung des Guanidinocarbonylpyrrol-Bausteins **Py-07**

Die Peptidkupplung mit PyBOP verläuft dabei zunächst unter Bildung eines Acyloxyphosphoniumsalz-Intermediats. Dieses zerfällt durch nucleophilen Angriff des zuvor generierten *N*-Hydroxybenzotriazols unter Abspaltung von Tripyrrolidinophosphinoxid zur aktivierten

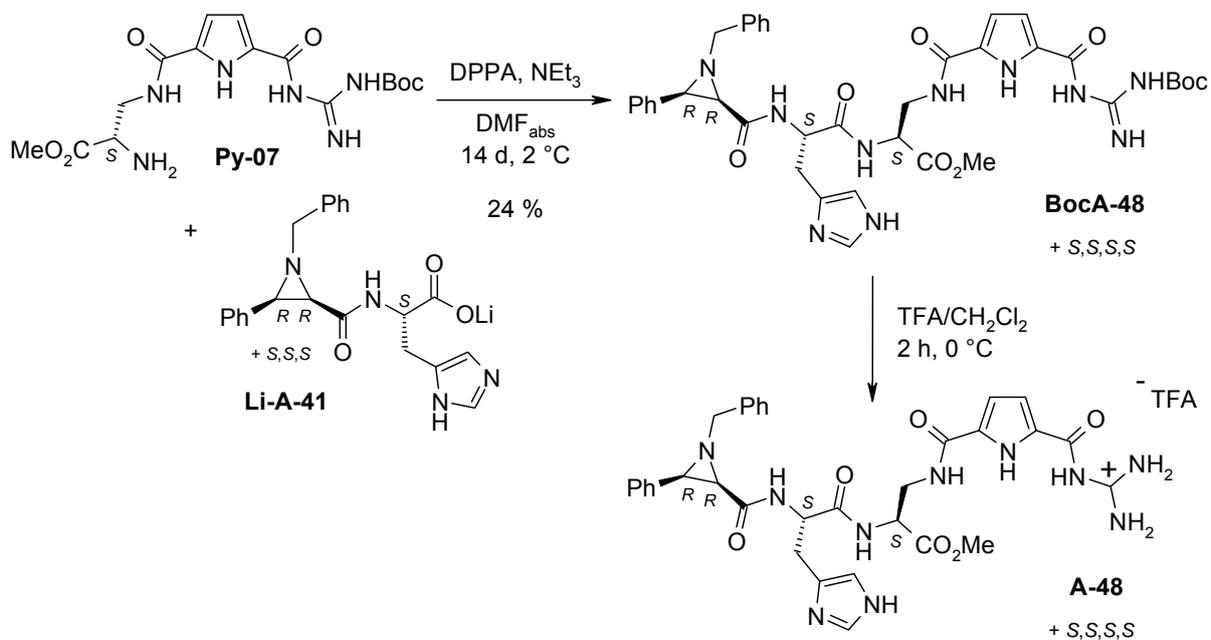
Spezies, einem Oxybenzotriazolester. Dieser reagiert anschließend mit dem Amin zum gewünschten Produkt (Schema 20).^[224,225]



Schema 20: PyBOP-Kupplung

3.4.3 Verknüpfung zum Guanidiniocarbonylpyrrol-Aziridin

Das Guanidiniocarbonylpyrrol-verknüpfte Aziridin **BocA-48** wird durch DPPA-Kupplung synthetisiert. Dafür wird das zuvor dargestellte Aminosäure-verknüpfte Aziridin **A-41** (vgl. Tabelle 4, S. 36) analog Schema 12 (S. 34) mit LiOH verseift und anschließend *via* DPPA-Kupplung mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein **Py-07** verknüpft. Die abschließende Spaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA führt zum potentiellen Inhibitor **A-48** (Schema 21).

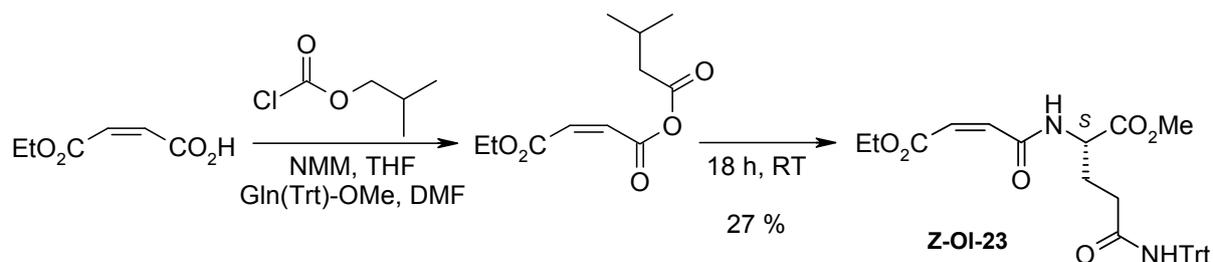


Schema 21: Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrol-Aziridins **A-48**

3.5 Olefinsynthesen

3.5.1 Synthese des *Z*-Olefins **Z-OI-23**

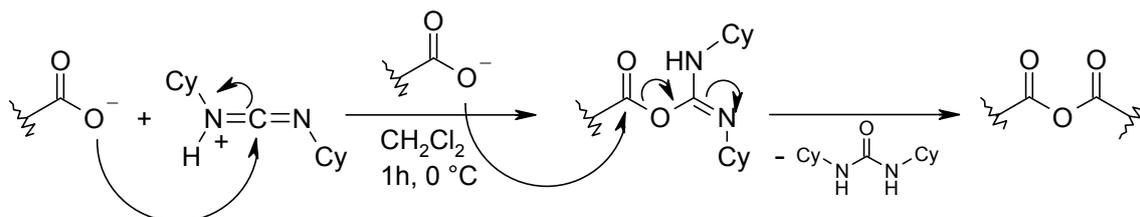
Maleinsäuremonoethylester ist durch Umsetzung von Maleinsäureanhydrid mit Ethanol leicht zugänglich. Anschließende Kupplung mit Gln(Trt)-OMe *via* Isobutylchloroformiat (IBCF) führt über ein gemischtes Anhydrid zum gewünschten Olefin **Z-OI-23** (Schema 22).^[226,227]



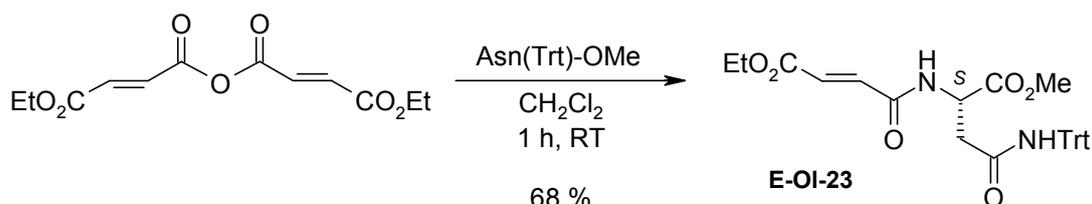
Schema 22: Darstellung von **Z-OI-23** *via* IBCF-Kupplung

3.5.2 Synthese der *E*-Olefine

Das Fumarsäurederivat **E-OI-23** wird durch Umsetzung von *in situ* generiertem Fumarsäureanhydrid mit Asn(Trt)-OMe dargestellt (Schema 24). Dabei werden 2 eq Fumarsäuremonoethylester durch klassische DCC-Kupplung zum symmetrischen Anhydrid verknüpft (Schema 23).^[225,228] Triebkraft dieser Methode ist die Bildung von 1,3-Dicyclohexylharnstoff, der aus der *O*-Acylisoharnstoff-Zwischenstufe entsteht.



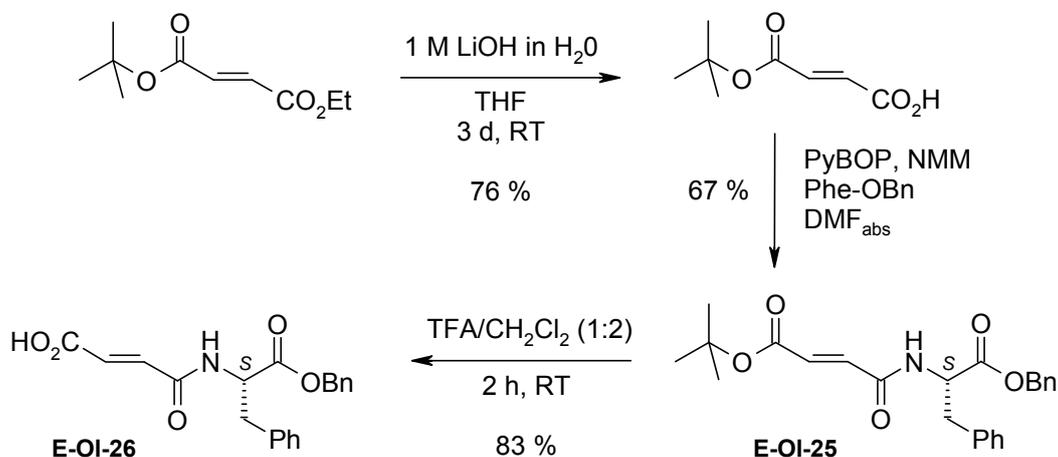
Schema 23: DCC-Kupplung zum symmetrischen Anhydrid



Schema 24: Darstellung des Fumarsäurederivats **E-OI-23**

Ein weiteres Fumarsäurederivat wird ausgehend von *tert*-Butylethylfumarat^[229,230] dargestellt. Der Ethylester wird mit 1 M wässriger LiOH-Lösung in THF verseift.^[231] Die bei den Aziridin-

2-carbonsäureestern (vgl. Kapitel 3.3, S. 34) verwendete Methode mit LiOH in Methanol führte hier nicht zum Erfolg. Die erhaltene Carbonsäure wird mittels PyBOP mit Phe-OBn zu **E-OI-25** gekuppelt.^[224,225] Abschließend wird der *tert*-Butylester mit TFA abgespalten und man erhält die Fumarsäure **E-OI-26** (Schema 25).^[232]

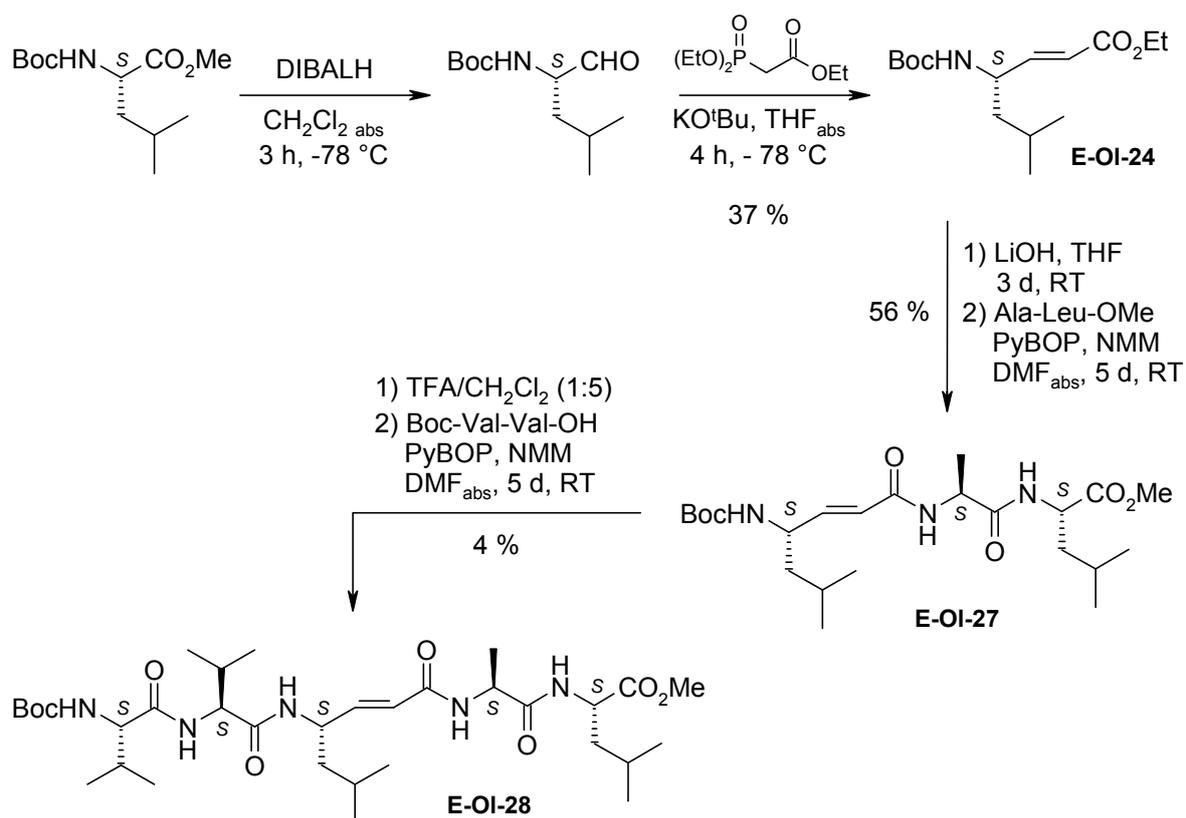


Schema 25: Darstellung der Fumarsäure **E-OI-26**

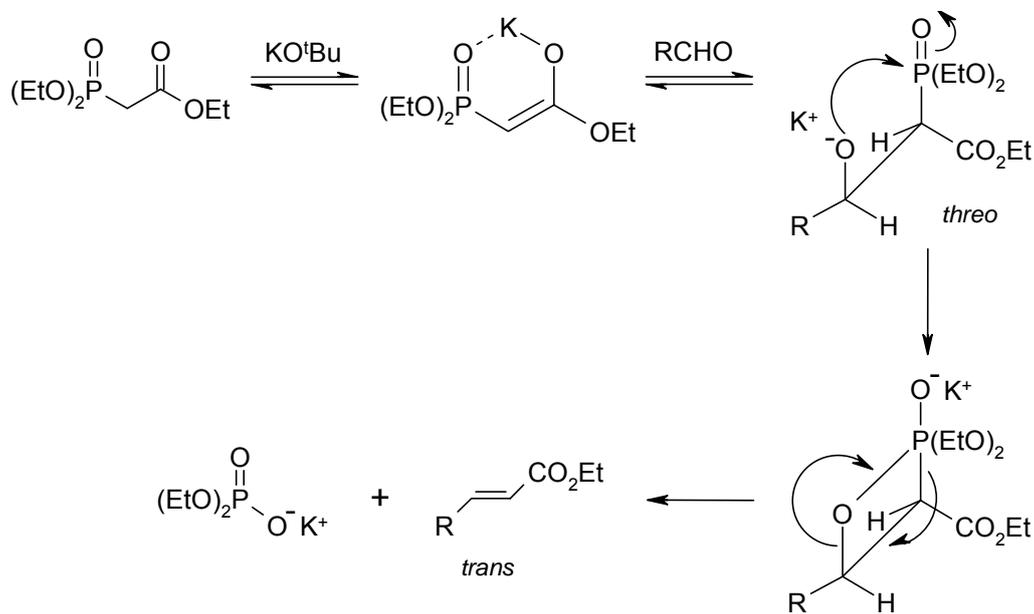
3.5.3 Synthese des Pepstatinanalogs

Ausgangspunkt der Synthese des olefinischen Analogons von Pepstatin A ist Boc-Leu-OMe, das durch DIBALH-Reduktion in den entsprechenden Aldehyd überführt wird. Anschließende Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung mit Triethylphosphonoacetat und Kalium-*tert*-butanolat bei -78 °C führt zum *trans*- α,β -ungesättigten Ester **E-OI-24**.^[233-235] Der Ethylester wird mit LiOH verseift und dann mit dem Dipeptid Ala-Leu-OMe *via* PyBOP zu **E-OI-27** gekuppelt.^[224,225] Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA^[236] wird das Amin mittels PyBOP mit Boc-Val-Val-OH gekuppelt und man erhält das Pepstatinanalogon **E-OI-28**. Die Ausbeuteverluste im letzten Schritt sind hauptsächlich während der Aufreinigung an der präparativen HPLC entstanden.

Die im ersten Schritt angewandte Horner-Wadsworth-Emmons-Variante der Wittig-Reaktion ist eine weitverbreitete Methode zur Darstellung α,β -ungesättigter Ester.^[237,238] Generell ist die Stereoselektivität bei Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen ein Resultat kinetischer oder thermodynamischer Kontrolle der Bildung der *threo*- und *erythro*-Addukte und deren Abbau zum Olefin. Im Fall des hier verwendeten Dialkylphosphonoacetats kann die Bildung des *trans*-Olefins über das thermodynamisch stabilere *threo*-Addukt erklärt werden (Schema 27).^[237]



Schema 26: Synthese des Pepstatinanalogs E-OI-28



Schema 27: Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung

3.6 Synthese des Biotin-markierten Aziridins

Für die Modifizierung des für Affinitätsstudien ausgewählten Aminosäure-verknüpften *cis*-Aziridin-2-carboxylats **A-32** wird zunächst der Grundkörper neu aufgebaut. Nur dadurch kann die Alkylkette am Aziridinstickstoff funktionalisiert werden. Das Aziridin **A-52** erfüllt diese Bedingung (Abbildung 35, Tabelle 4). Die Struktur entspricht der von **A-32** mit der Erweiterung um eine mit einer Boc-Gruppe geschützten Aminofunktion.

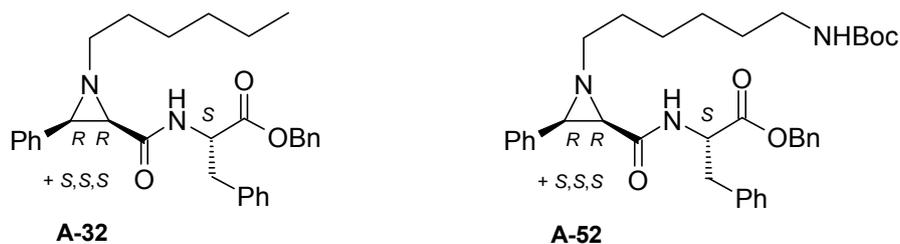
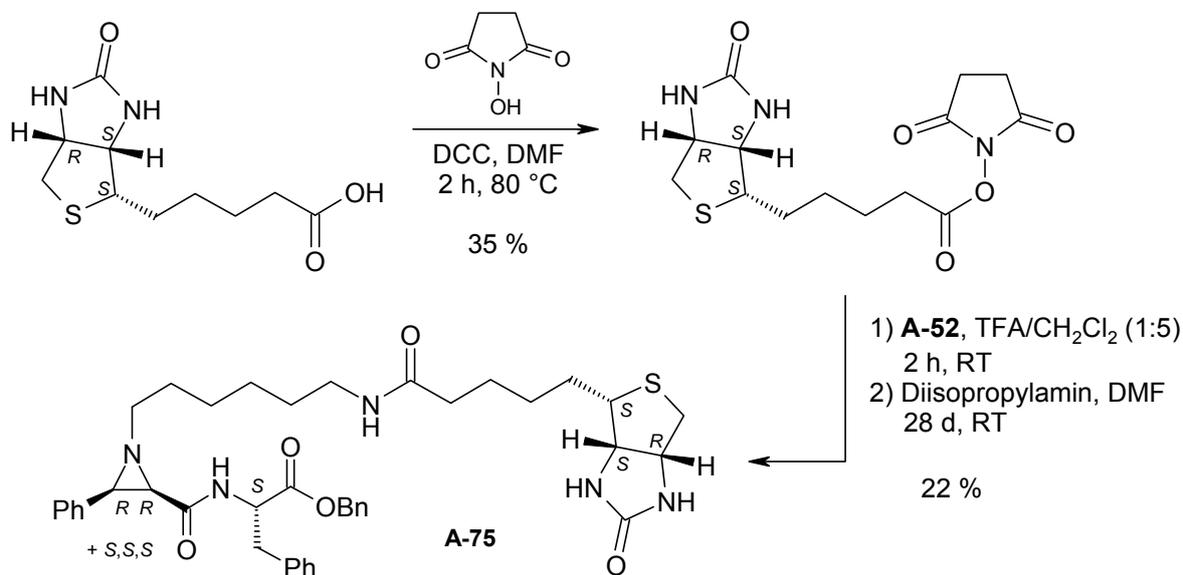


Abbildung 35: Gegenüberstellung von **A-32** mit **A-52**

Für die Einführung des Biotinrestes wird üblicherweise zunächst Biotin zum Hydroxysuccinimidester aktiviert.^[239] Diese Veresterung muss aufgrund der schlechten Löslichkeit von Biotin unter DCC-Aktivierung (vgl. Schema 23, S. 42) in heißem DMF durchgeführt werden.^[240] Das Aziridin **A-52** wird dann, nach vorheriger Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA, mit dem Hydroxysuccinimidester zu **A-75** verknüpft (Schema 28).

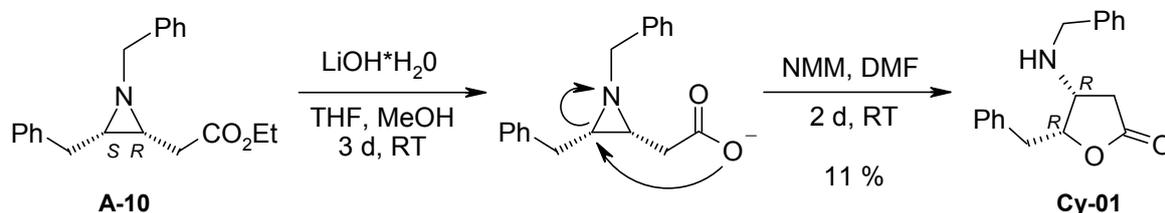


Schema 28: Synthese des Biotin-markierten Aziridins **A-75**

3.7 Cyclisierungsreaktionen

3.7.1 Lactonsynthese

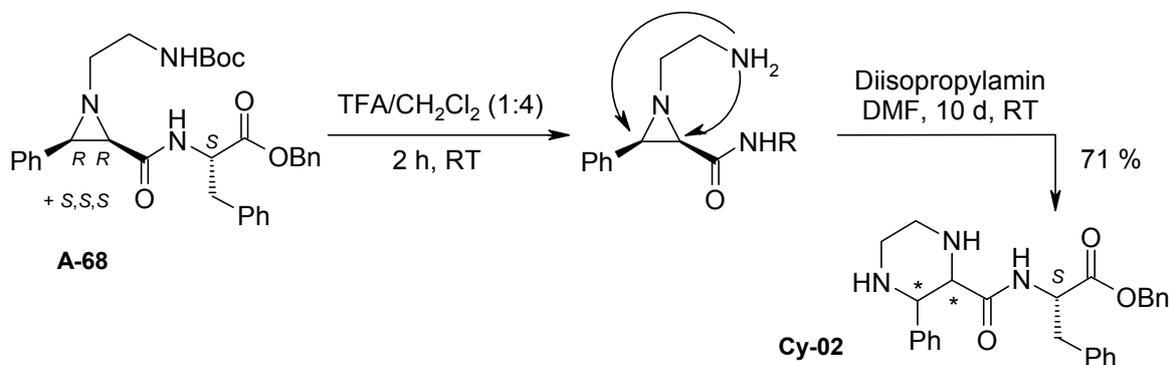
Analog zu den *cis*-Aziridin-2-carboxylaten (Schema 12, S. 34) sollte das methylenverbrückte Aziridin **A-10** (3.2.2, S. 32) mit Aminosäuren verknüpft werden. Zwar gelingt laut DC-Kontrolle der Schritt der Verseifung mit LiOH, jedoch führen die weiteren zur Aminosäure-Verknüpfung notwendigen basischen Reaktionsbedingungen in DMF zu einer intramolekularen Lactonbildung und damit verbundenen Ringöffnung des Aziridins (Schema 29). Das Lacton **Cy-01** wurde laut LC-MS-Messung mit einer Reinheit von 34 % erhalten. Es wurde, da für weitere Reaktionen nicht benötigt, jedoch nicht weiter aufgereinigt.



Schema 29: Intramolekularer Ringschluss zum Lacton Cy-01

3.7.2 Piperazinsynthese

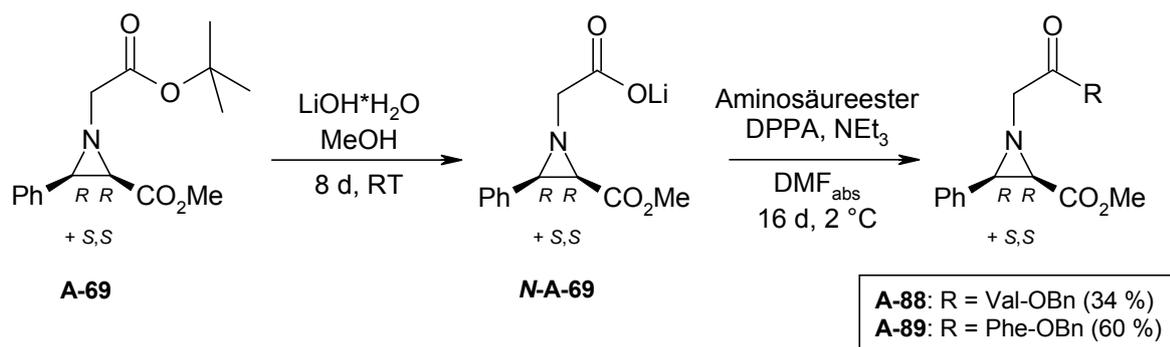
Analog zum Biotin-markierten Aziridin **A-75** sollte ein Analogon mit kürzerem Alkyl-Spacer synthetisiert werden. Dafür wird der Aziridin-2-carboxylat-Baustein **A-68** (vgl. Tabelle 4, S. 36) synthetisiert. Um die Biotin-Gruppe einzuführen, wird zunächst die Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten. Diese Reaktion gelingt laut DC-Kontrolle. Allerdings führen die zur Biotin-Kupplung notwendigen basischen Reaktionsbedingungen in DMF zu einer intramolekularen Piperazinbildung. Auch hier wird das Aziridin irreversibel geöffnet (Schema 30). Im NMR-Spektrum wird ein doppelter Peaksatz erhalten.



Schema 30: Intramolekularer Ringschluss zum Piperazin Cy-02

3.8 Darstellung von *N*-Peptidylaziridinen

Bei dem Versuch, den Aziridinmethylester **A-69** alkalisch zu hydrolysieren, kam es zur Spaltung des *tert*-Butylesters und der Bildung des entsprechenden Carboxylats **N-A-69**. Der Methylester blieb intakt. Dieses Reaktionsverhalten ist für den basenstabilen *tert*-Butylester eher ungewöhnlich. Die anschließende Peptidkupplung erfolgte somit an der CH₂-CO₂H-Funktion und lieferte die Derivate **A-88** und **A-89** (Schema 31). Die Struktur der Verbindungen wurde durch NMR- und Massenspektroskopie bestätigt.



Schema 31: Darstellung von *N*-Peptidylaziridinen

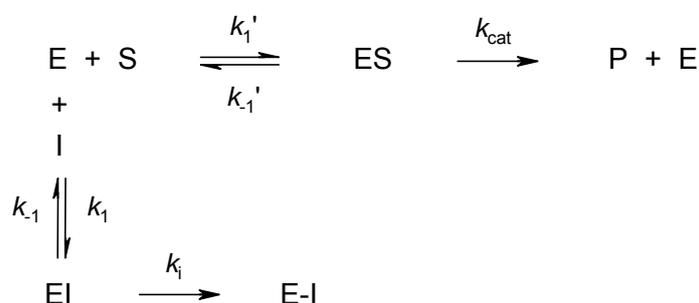
4 Enzymassays

4.1 Allgemeine Einführung

Für die *cis*-Aziridin-2-carboxylate **A-07** und **A-08** wurde eine zeitabhängige und damit irreversible Hemmung der SAP2 beobachtet.^[142] Die Inaktivierung der Enzyme verläuft unter den Assaybedingungen pseudo-erster Ordnung. Durch den Einsatz von Inhibitor im Überschuss ($[I] \gg [E]$) kann die Inhibitorkonzentration während der Reaktion als konstant angenommen werden und die Enzymaktivität nimmt exponentiell mit der Zeit ab.^[241] Im Gegensatz dazu verläuft eine reversible Hemmung zeitunabhängig. Liegt ein Fließgleichgewicht (steady-state-Bedingungen, Sättigung des Enzyms mit Substrat, $[S] \gg [E]$)^[1] vor, ändert sich die Enzymaktivität nach Einstellung des Gleichgewichts nicht mehr. Die in dieser Arbeit verwendeten Assaymethoden zur Bestimmung der Inhibitoraktivität und der Hemmkonstanten werden im Folgenden detailliert beschrieben.

4.2 Enzymkinetik

Beim klassischen Verlauf der enzymatischen Katalyse nach Michaelis-Menten^[242] kommt es beim Zusammentreffen eines Enzym- [E] mit einem Substratmolekül [S] zur reversiblen Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes [ES], der zu Enzym und Spaltprodukten [P] zerfallen kann. Konkurriert neben dem Substrat ein Inhibitor um das aktive Zentrum des Enzyms, kann es durch die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes [EI] zur kompetitiven Hemmung des Enzyms kommen. Im Fall einer irreversiblen Hemmung bildet sich anschließend die inaktive Form des Enzyms [E-I] durch eine irreversible chemische Reaktion (Schema 32).^[243,244]



Schema 32: Irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Konkurrenz mit einem Substrat.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Ist die Substratkonzentration so hoch, dass das gesamte Enzym im System als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt, so ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} erreicht. Der

K_m -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit $v_{\max}/2$ beträgt. Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} (Wechselzahl) beschrieben. Mit k_1' bzw. k_{-1}' werden die Geschwindigkeitskonstanten für Hin- bzw. Rückreaktion der reversiblen Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes bezeichnet.^[245]

$$K_m = \frac{k_{\text{cat}} + k_{-1}'}{k_1'}$$

Wenn k_{cat} dabei geschwindigkeitsbestimmend ist, stellt der K_m -Wert die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes dar: $K_m = k_{-1}'/k_1'$

Zur Beschreibung der Hemmung eines Enzyms wird häufig der IC_{50} -Wert angegeben, der die Konzentration an Inhibitor angibt, die nötig ist, um 50 % des Enzyms in einem gegebenen System zu hemmen.^[246] Er beinhaltet weder die Geschwindigkeit der Hemmung bei irreversiblen Inhibitoren, noch die der Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes und ist so lediglich für einen groben qualitativen Vergleich reversibler Inhibitoren geeignet. Bei irreversiblen Inhibitoren oder fest bindenden reversiblen Inhibitoren ist der IC_{50} -Wert von der Inkubationszeit abhängig und somit nicht aussagekräftig, solange Enzym und Inhibitor nicht vollständig miteinander reagiert haben. Andererseits entspricht der IC_{50} -Wert eines irreversiblen Inhibitors annähernd der halben aktiven Enzymkonzentration, wenn Enzym und Inhibitor vollständig miteinander reagiert haben. Für die Beschreibung der irreversiblen Hemmung eines Enzyms sind daher die Hemmkonstanten k_i , K_i , und $k_{2\text{nd}}$ (vgl. Schema 32) besser geeignet.^[3,243]

- k_i [min^{-1}]: Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I
- k_1 bzw. k_{-1} [min^{-1}]: Geschwindigkeitskonstanten für Hin- bzw. Rückreaktion der reversiblen Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes
- K_i [M]: Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes EI mit

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad \text{bzw.} \quad K_i = \frac{k_i + k_{-1}}{k_1}$$

Da die geschwindigkeitsbestimmende Konstante k_i der Bildung von E-I das Gleichgewicht $E + I = EI$ nicht beeinflusst, kann weiter vereinfacht werden:

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

- $k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]: Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung mit

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i}$$

Mit dem k_{2nd} -Wert werden somit die Bildung von EI und die Geschwindigkeit der Inaktivierung zusammengefasst. Da ein großer k_i -Wert für eine schnelle Inaktivierung und eine kleine Dissoziationskonstante K_i für eine gute Bindung des Inhibitors an das Enzym stehen, inaktiviert der Hemmstoff das Enzym umso besser, je größer der zugehörige k_{2nd} -Wert ist.^[247]

Die Gesamtkonzentration des eingesetzten Enzyms $[E]_0$ setzt sich aus der Summe der Konzentrationen aus freiem Enzym $[E]$, am Inhibitor gebundenem Enzym $[EI]$ und inaktiviertem Enzym $[E-I]$ zusammen.

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E-I]$$

Da der Inhibitor durch einen Überschuss an Substrat wieder aus der Bindung mit dem Enzym im Assoziationskomplex EI verdrängt werden kann, wird es mit dem freien Enzym E zum aktiven Enzym E_a zusammengefasst.

$$[E]_a = [E] + [EI]$$

Bei einer Inhibitorkonzentration $[I] \gg [E]_0$ gelten Bedingungen pseudo-erster Ordnung. Dabei ist die zeitliche Bildung der inaktiven Enzymform E-I proportional der Konzentration des reversiblen Komplexes $[EI]$.

$$\frac{d[E-I]}{dt} = k_i \cdot [EI]$$

Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ konstant bleibt, entspricht die Bildung des Komplexes $[E-I]$ der Abnahme an aktivem Enzym $[E]_a$.

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i \cdot [EI]$$

Mit $K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \Leftrightarrow [E] = \frac{K_i \cdot [EI]}{[I]}$ und $[E]_a = [E] + [EI]$ erhält man durch Umformung:

$$[EI] = \frac{[E]_a}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{sowie} \quad -\frac{d[E]_a}{dt} = k_i \cdot \frac{[E]_a}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)}$$

Die Integration von $[E]_0$ zum Zeitpunkt $t = 0$ nach $[E]_a$ zum Zeitpunkt t liefert:

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

Die Abnahme der Enzymaktivität pro Zeiteinheit folgt einer Kinetik pseudo-erster Ordnung. Man erhält die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} :

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -k_{\text{obs}} \cdot t \Leftrightarrow [E]_a = [E]_0 \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}$$

Es ergibt sich die hyperbolische Funktion:^[243,244]

$$-k_{\text{obs}} \cdot t = -\frac{k_i \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \Leftrightarrow k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i + [I]}$$

Liegt aufgrund schlechter Löslichkeit des Inhibitors, zu hoher Geschwindigkeit der Inaktivierung oder zu hoher Dissoziationskonstanten K_i die Konzentration des Inhibitors $[I]$ unterhalb der Sättigungsbedingungen ($[I] \ll K_i$), gilt:

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

Da die Hemmkonstanten k_i und K_i so nicht mehr einzeln bestimmt werden können, wird die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung $k_{2\text{nd}}$ näherungsweise durch Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ berechnet.^[248] Konkurriert mit dem Substrat ein zweiter Ligand mit dem Inhibitor um die Bindung am Enzym, wird die Substratkonzentration und die Affinität des Substrates zum Enzym durch Einführung des scheinbaren (apparenten) K_i -Werts $K_{i\text{app}}$ mit berücksichtigt:^[243,244]

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

Die k_{obs} -Werte zur Bestimmung der Hemmkonstanten k_i , K_i , und $k_{2\text{nd}}$ werden aus dem Verdünnungsassay nach *Kitz* und *Wilson*^[249] oder dem kontinuierlichen Assay nach *Tian* und *Tsou*^[250] ermittelt. Die Hemmkonstanten k_i , K_i und $k_{2\text{nd}}$ lassen sich durch Auftragung von k_{obs} gegen die Inhibitorkonzentration $[I]$ gemäß der Gleichung $k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i + [I]}$ bestimmen.

Erfolgt die irreversible Bildung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Addukts nur sehr langsam, verläuft die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu linear. Man beobachtet eine nicht-zeitabhängige Hemmung und kann die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} so nicht mehr bestimmen. Hier wird, ebenso wie bei reversibler Hemmung, für die Auswertung der Assays die Dixongleichung verwendet:^[251]

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

Die Enzymaktivitäten mit bzw. ohne Inhibitor, v_i und v_0 , werden über die entsprechenden Umsatz-Zeit-Kurven bestimmt. Linearisierung erfolgt durch Auftragung von v_i/v_0 gegen $[I]$ und man erhält den reziproken K_i -Wert. Da es auch im Fall der nicht-zeitabhängigen Hemmung bei kompetitiver Hemmung zur Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat kommt, wird die ermittelte apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} durch Division durch den Term $(1 + [S]/K_m)$ korrigiert.

4.2.1 Verdünnungsassay nach *Kitz* und *Wilson*

Im Verdünnungsassay wird eine konstante Enzymkonzentration $[E]_0$ mit einem Überschuss an Inhibitor inkubiert ($[I] \gg [E]_0$), um Bedingungen pseudo-erster Ordnung zu gewährleisten. Nach bestimmten Zeitabständen (5-7 Messungen innerhalb von 5-60 min) wird an einem Aliquot der Inkubationslösung die Rest-Enzymaktivität bestimmt. Dafür wird der aliquote Teil mindestens um den Faktor 10 verdünnt und Substrat zugegeben. Durch die Verdünnung wird eine Hemmung durch nicht-kovalente Assoziation des freien Inhibitoranteils an das Enzym vermieden. Werden nun die Enzymaktivitäten gegen die gewählten Zeitabstände aufgetragen, so erhält man die abfallende Exponentialkurve $[E]_a = [E]_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t}$, aus der der k_{obs} -Wert für die eingesetzte Inhibitorkonzentration ermittelt werden kann. Für die Aufnahme eines $[I]$ - k_{obs} -Diagramms wird dieses Verfahren für mehrere Inhibitorkonzentrationen wiederholt.^[249]

4.2.2 Kontinuierlicher Assay nach *Tian* und *Tsou*

Beim kontinuierlichen Assay muss k_{obs} nicht aus einer Reihe verschiedener Umsatz-Zeit-Kurven bestimmt werden. Es werden vielmehr Substrat, Enzym und jeweils eine Inhibitorkonzentration gemischt und die Produktzunahme mit der Zeit registriert. Der jeweilige Einsatz von Substrat und Inhibitor im Überschuss garantiert Steady-State-Bedingungen und die quasi-konstante Aufrechterhaltung der Konzentration an $[EI]$. In Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors nimmt die Produktzunahme exponentiell ab, nähert sich einer Produktkonzentration $[P]_\infty$ und es gilt:

$$[P]_t = [P]_\infty \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$$

Ein Kontrollversuch ohne Zugabe von Inhibitor muss demnach bei der Produktzunahme über

den ganzen Messzeitraum hinweg linear verlaufen. Die Toleranzgrenze für eine Abweichung von der Linearität liegt bei 10 %. Die k_{obs} -Werte jeder Inhibitorkonzentration werden durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt.^[250]

4.3 Testungen an Aspartatproteasen

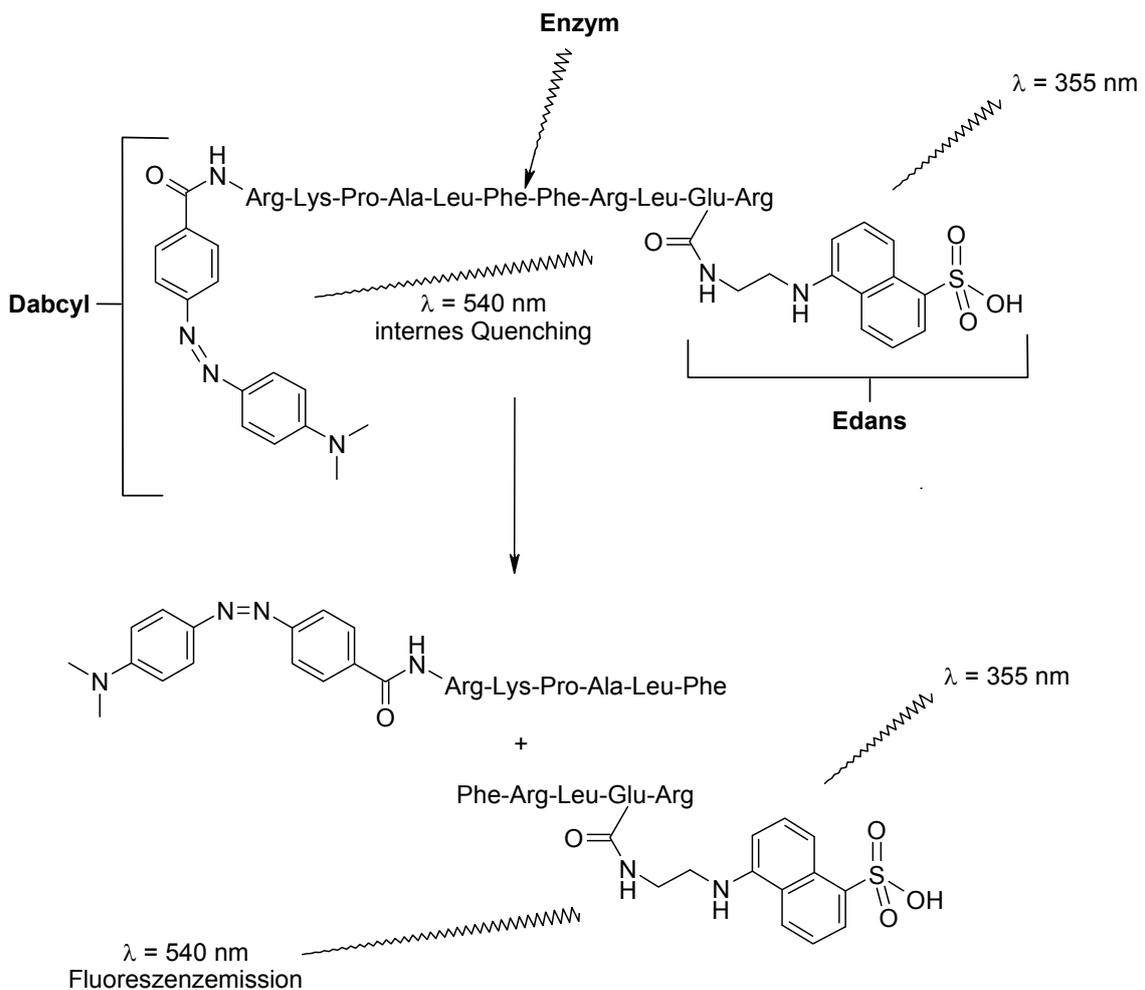
4.3.1 Testprinzip

Für die Testung der synthetisierten potentiellen Hemmstoffe auf ihre inhibitorische Aktivität wurde auf den fluorimetrischen FRET-Assay (FRET = fluorescence resonance energy transfer) nach *Dege* zurückgegriffen.^[142] Dieser basiert auf einem peptidischen FRET-Substrat mit dem Donor/Akzeptor-Paar Edans/Dabcyl. Dabei muss der Akzeptor bei derselben Wellenlänge absorbieren, bei der der Donor fluoresziert. So wird im intakten Substratmolekül die Fluoreszenzemission des Fluorophors Edans durch die räumliche Nähe des Quenchers Dabcyl intramolekular unterdrückt. Dieser Prozess wird Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt. Wird das Substrat nun von einer Protease gespalten, und somit Fluorophor und Quencher getrennt, kann die Fluoreszenzstrahlung von Edans fluoreszenzspektroskopisch gemessen werden (Schema 33).^[252,253] Je mehr Substrat gespalten wird, desto mehr Fluoreszenzstrahlung wird emittiert. Die Fluoreszenzzunahme entspricht der initialen Umsatzgeschwindigkeit und wird in der Einheit $\Delta F/\text{min}$ (Zunahme der relativen Fluoreszenzeinheiten pro min) gemessen. Wird nun die lineare Fluoreszenzzunahme einer Probe mit Inhibitor zu der einer Probe ohne Inhibitor in Relation gesetzt, lässt sich die prozentale Hemmung des Enzyms durch den Inhibitor bestimmen.

4.3.2 FRET-Substrat

Als Substrat wurde das für SAP2 optimierte Undecapeptid Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH verwendet.^[142] Das Substrat eignet sich ebenso für Enzymassays an SAP1, 3 & 8 sowie an Cathepsin D. Dabei wurde für alle genannten Enzyme die Spaltstelle zwischen den beiden hydrophoben aromatischen Aminosäuren (Phe | Phe) mittels LC-MS-Analyse bestätigt. Für den Assay wurden die Lösungen eines sterilfiltrierten *Candida-albicans*-Zellkultur-Überstandes der jeweiligen SAP-Isoenzyme bzw. wässrige Cathepsin-D-Lösung verwendet. Die Enzymlösungen wurden so verdünnt, dass die Fluoreszenzzunahme im Assay eine Steigung von $\sim 20 \Delta F/\text{min}$ erreichte. Die DMSO-Konzentration wurde bei maximal 5 % gehalten. Tabelle 5 führt die optimierten Assaybedingungen für die SAP-Isoenzyme 1, 2, 3 & 8 sowie Cathepsin D^[254] auf. Weiterhin wurden für die eingesetzten Enzyme unter Berücksichtigung des inneren Filtereffekts^[255,256] die Michaelis-Menten-

Konstanten K_m sowie die Wechselzahlen k_{cat} für das FRET-Substrat bestimmt.



Schema 33: Prinzip des FRET-Assays

Tabelle 5: Optimierte Assaybedingungen für den FRET-Assay an SAP1, 2, 3 & 8, Cathepsin D

Assaymethode	Verdünnungsassay
Volumina	40 μ l Puffer , 5 μ l Enzymlösung , 5 μ l Inhibitorlösung 145 μ l Puffer , 5 μ l Substratlösung [18.75 μ M]
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH K_m [μ M] = 7.94 (SAP1), 10.1 (SAP2), 10.9 (SAP3), 7.20 (SAP8), 7.67 (CathD)
Enzym	SAP1, 2, 3 oder 8, verdünnter <i>Candida albicans</i> -Überstand Cathepsin D, verdünntes Lyophilisat
Puffer (SAP)	50 mM Na-Citrat, pH 3.2, 50 mM NaCl
Puffer (CathD)	100 mM Na-Formiat, pH 3.7, 50 mM NaCl
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

4.3.3 Expression der SAP Isoenzyme

Die in den SAP-Enzymassays verwendeten Überstände der Isoenzyme SAP1, 2, 3 & 8 wurden aus *C.-albicans*-Stämmen gewonnen, die nach *Staub* transformiert waren.^[64] Dabei wurden die jeweils Tetracyclin-induzierbaren SAP-Gene basierend auf einer SAP2-defizienten Mutante (*sap2Δ*) konstruiert. Die transformierten Stämme wurden in einer Vorkultur über Nacht in SD Medium (6.7 g/l YNB, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose, 30 °C) kultiviert. Anschließend wurde 1:100 in YCB-BSA-Medium (23.4 g/l YNB, 4 g/l BSA, pH 4.0, 30 °C, 24 h) verdünnt und 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Expressierung der SAP wurde durch Zugabe von Doxycyclin (50 µg/ml) induziert. Zur Kontrolle wurde parallel je eine Kultur ohne Doxycyclinzugabe sowie eine Kultur mit Zugabe von Doxycyclin und dem Standardinhibitor Pepstatin A (7.3 µM) angesetzt. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀, Tabelle 6) verfolgt. Zur Reinheitsbestimmung wurden die Kulturüberstände mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 12 %) analysiert. Dabei wurden die Proteinbanden durch Coomassiefärbung visualisiert.

Tabelle 6: OD₆₀₀-Messungen von Zellkulturen ohne Doxycyclinzugabe, mit Doxycyclinzugabe, mit Zugabe von Doxycyclin und Pepstatin A

Stamm	Keine Zugabe	Doxycyclin	Doxycyclin Pepstatin A	
SC5314	38.9	28.8	2.8	Wildtyp, Positivkontrolle
SAP2MS4B	2.2	3.5	2.2	Nullmutante, Negativkontrolle
SAP1ex4A	2.7	44.2	1.9	SAP1-Mutante
SAP1ex4B	3.5	53.5	4.3	SAP1-Mutante
SAP2ex4A	3.9	38.9	3.9	SAP2-Mutante
SAP2ex4B	4.9	48.0	4.1	SAP2-Mutante
SAP3ex4A	3.4	47.1	4.0	SAP3-Mutante
SAP3ex4B	4.1	48.2	3.5	SAP3-Mutante
SAP8ex4A	3.0	48.3	4.2	SAP8-Mutante
SAP8ex4B	4.3	48.7	4.5	SAP8-Mutante

4.3.4 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m wurde bei konstanter Enzymkonzentration je zwei Messungen bei sieben unterschiedlichen Substratkonzentrationen (1 bis 17.8 µM) durchgeführt und die jeweilige initiale Umsatzgeschwindigkeit ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden um den inneren Filtereffekt korrigiert. Dabei handelt es sich um das Phänomen, dass schon bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen die Fluoreszenz des gespaltenen Produkts durch noch intaktes Substrat deutlich reduziert wird. Die Korrekturfaktoren

ren wurden durch Messung des Fluoreszenzdonors EDANS (50 μM) alleine und mit den vorher verwendeten Substratkonzentrationen unter analogen Assaybedingungen bestimmt.^[255,256] Die K_m -Werte wurden über die dementsprechend korrigierten Umsatzgeschwindigkeiten durch nicht-lineare Regression mit der Kinetiksoftware Grafit[®][257] berechnet. Um die maximalen Umsatzgeschwindigkeit v_{max} in der Einheit [$\mu\text{M}/\text{min}$] angeben zu können, wurde die Fluoreszenzzunahme auf das verwendete FRET-Substrat kalibriert. Dafür wurde die Eigenfluoreszenz des Fluoreszenzdonors EDANS bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Durch lineare Regression kann nun die Fluoreszenzzunahme in Substratumsatz umgerechnet und die Umsatzgeschwindigkeit in der Einheit $\mu\text{M}/\text{min}$ angegeben werden.

Der Quotient v_{max}/K_m („ v_{max} über K_m “), der oft auch als katalytische Effizienz oder Enzymspezifitätskonstante bezeichnet wird, entspricht der enzymatischen Anfangsgeschwindigkeit v_0 direkt nach der Vereinigung aller notwendigen Komponenten.^[258,259] Bei sehr geringen Substratkonzentrationen ist die Umsatzgeschwindigkeit proportional zur Substratkonzentration mit der Proportionalitätskonstante v_{max}/K_m . Die Konstante entspricht der Steigung der Tangente durch den Ursprung der $[S]$ - v -Kurve. Eine Übersicht über die graphische Darstellung von K_m , v_{max} und v_{max}/K_m zeigt Diagramm 3.

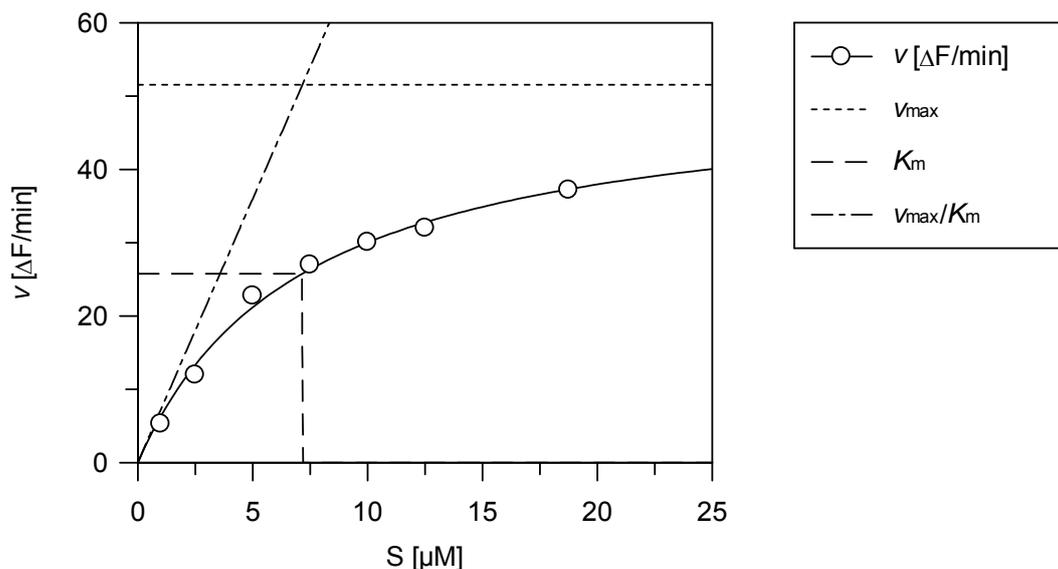


Diagramm 3: Michaelis-Menten-Kinetik am Beispiel von SAP8

4.3.5 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat}

Die Wechselzahl k_{cat} wird aus dem Quotienten aus maximaler Umsatzgeschwindigkeit v_{max} und der Konzentration an aktivem Enzym $[E_0]$ berechnet.^[260]

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[E_0]}$$

Zur Bestimmung von $[E_0]$ wurde die Methode der „active-site-titration“ basierend auf dem Prinzip fest bindender Inhibitoren gewählt.^[261-263] Dabei wird davon ausgegangen, dass der Inhibitor mit einer Dissoziationskonstante (K_i) in einer Größenordnung an das jeweilige Enzym bindet, sodass unter Assaybedingungen die Hemmung bei gleichen Konzentrationen von Enzym und Inhibitor eintritt. Die vorherige Einstellung des Gleichgewichts wird dafür natürlich vorausgesetzt. Als Maß, ob ein Inhibitor fest genug und stöchiometrisch für eine valide Titration bindet, wird der Quotient aus $[E_0]$ und K_i herangezogen.^[264] Dabei werden Werte von $[E_0]/K_i > 2$ für akzeptabel erachtet.^[261] Der Standardinhibitor für Aspartatproteasen, Pepstatin A, genügt diesen Bedingungen und wurde daher als Titrant verwendet.^[265] Die Assaybedingungen für die Titration entsprachen denen des kontinuierlichen Assays (Kapitel 4.2.2, S. 52). Auf diese Weise konnte mit derselben Messung auch der IC_{50} -Wert bestimmt werden. Bei konstanter Enzymkonzentration wurden je zwei Messungen bei sieben unterschiedlichen Konzentrationen (1 bis 50 nM) an Pepstatin A durchgeführt und die jeweilige initiale Umsatzgeschwindigkeit ermittelt. Die berechneten Enzymrestaktivitäten werden gegen die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und man erhält eine Kurve, die im Bereich niedriger Inhibitorkonzentrationen linear abfällt (Diagramm 4). Extrapoliert man den linearen Bereich auf die x-Achse, erhält man den $[E_0]$ -Wert. Studien an Cathepsin D haben ergeben, dass diese Extrapolation „per Hand“ nicht hinreichend genau ist.^[265] Daher greift man auf nicht-lineare Regression nach *Gutheil* und *Bachovchin* zurück:^[266]

$$v = SA \cdot \left\{ [E_0] - \frac{1}{2} \cdot \left[([E_0] + [I] + K_i) - \sqrt{([E_0] + [I] + K_i)^2 - 4 \cdot [E_0] \cdot [I]} \right] \right\}$$

Mit SA wird die spezifische Aktivität bezeichnet. Sie gibt die Geschwindigkeit pro Enzymeinheit an und muss zunächst abgeschätzt werden. Dafür muss vorab die Enzymkonzentration $[E_0]$ durch lineare Extrapolation bestimmt werden. Die spezifische Aktivität wird dann über die Gleichung $SA = D/[E_0]$ abgeschätzt und als konstant gesetzt, wobei D in unserem Fall der Enzymrestaktivität ohne Inhibitorzugabe entspricht (100 %). Der ungefähre K_i -Wert wird über den IC_{50} -Wert bestimmt.^[244]

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

Unter Berücksichtigung der abgeschätzten Werte für SA , $[E_0]$ und K_i erhält man durch nicht-lineare Regression mit Grafit^{®[257]} die genauen Werte für $[E_0]$ und K_i durch Iteration. Über die Konzentration an aktivem Enzym $[E_0]$ kann schließlich die Wechselzahl k_{cat} berechnet werden.

Tabelle 7 fasst die ermittelten Werte für K_m , v_{max} , k_{cat} , $[E_0]$ und K_i (Pepstatin A) für das FRET-Substrat Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH an SAP1, 2, 3 & 8 sowie Cathepsin D zusammen. In Tabelle 8 sind Literaturwerte für K_m , k_{cat} und K_i

(Pepstatin A) für die peptidischen Substrate Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu^[118] und Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu^[60] sowie die FRET-Substrate Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp^[267] und Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH₂^[254] an SAP1, 2 & 3 und Cathepsin D zusammengefasst.

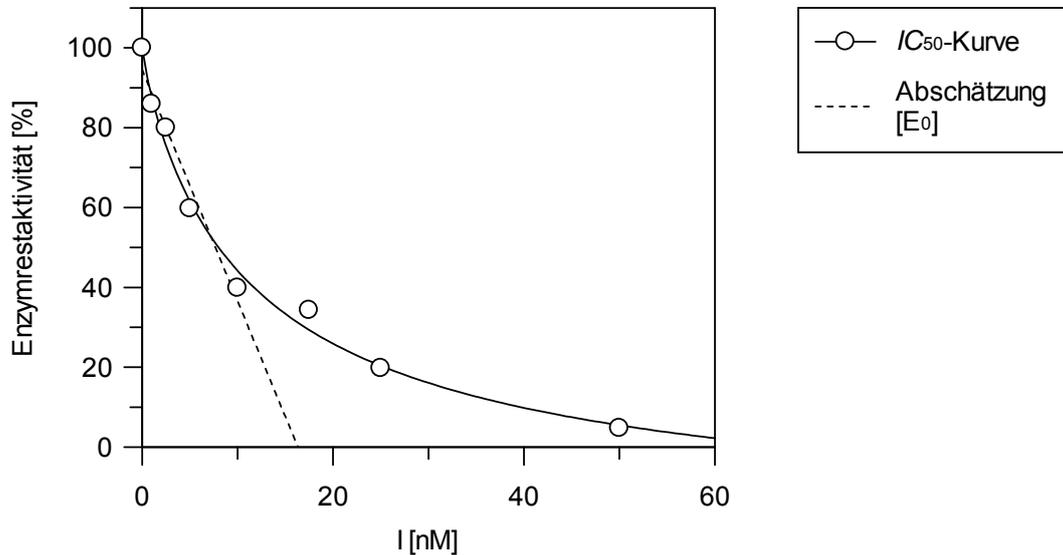


Diagramm 4: „Active-site-titration“ von SAP2 mit Pepstatin A. Graphische Abschätzung von $[E_0]$; Die genauen Werte für $[E_0]$ und K_i werden durch nicht-lineare Regression der IC_{50} -Kurve bestimmt

Tabelle 7: Kinetische Konstanten für SAP1, 2, 3 & 8 und Cathepsin D und das FRET-Substrat Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH

	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	v_{max} [μ M/min]	$[E_0]$ [nM]	K_i [nM] [#]
SAP1	7.94 ± 0.10	3.82 ± 0.46	4.34 ± 0.27	19.0 ± 1.12	4.15 ± 0.84
SAP2	10.1 ± 1.23	6.17 ± 0.52	5.57 ± 0.28	15.1 ± 0.51	2.96 ± 0.32
SAP3	10.9 ± 2.33	2.17 ± 0.24	4.61 ± 0.29	35.6 ± 1.67	2.85 ± 0.05
SAP8	7.20 ± 0.67	11.0 ± 0.91	5.09 ± 0.30	7.72 ± 0.19	0.24 ± 0.11
CathD	7.67 ± 0.03	491 ± 17.5	13.9 ± 0.49	0.47 ± 0.02	24.2 ± 16.9 [§]

[#] Pepstatin A; [§] K_i -Wert in pM; $IC_{50} = 237 \pm 16.5$ nM (gemessen); Lit.: $IC_{50} = 0.21 \pm 0.13$ μ M^[141]

Tabelle 8: Literaturwerte der kinetischen Konstanten

	K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}]	K_i [nM] [#]
SAP2 ^a	29.3 ± 7.8	5.6 ± 1.0	6.0 ± 2.3
SAP1 ^b	609 ± 70	268 ± 32	15 ± 5
SAP2 ^b	181 ± 17	307 ± 11	17 ± 3
SAP3 ^b	65 ± 4	239 ± 11	60 ± 8
CathD ^c	0.27 ± 0.03	16.25 ± 0.43	n.b.
CathD ^d	1.65 ± 0.25	66 ± 10	n.b.

^a Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu nach Fusek

^b Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu nach Koelsch

^c Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp

^d Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH₂

[#] Pepstatin A

4.3.6 Bestimmung der Inhibitoraktivitäten

Um die Aktivität der synthetisierten potentiellen Inhibitoren am jeweiligen Enzym zu ermitteln, wurde ein Screening unter den in Tabelle 5 (S. 54) dargestellten Assaybedingungen in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc®) durchgeführt. Die Zunahme der Fluoreszenz durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrates wurde bei 30 °C* an einem Varian Cary Eclipse Fluorimeter bei 540 nm detektiert (Anregung 355 nm). Die pro Ansatz eingesetzten 5 µl Enzymlösung wurden so verdünnt, dass im Assay über 10 min eine lineare Zunahme der Fluoreszenz von ~20 ΔF/min erhalten wurde. Die Endkonzentration des Substrats lag bei 18.8 µM, die der Inhibitoren bei 100 µM. Zunächst wurden 5 µl Enzymlösung mit 40 µl Puffer vorgelegt und 5 µl Inhibitorlösung bzw. DMSO (Kontrollwert) zugegeben und nach kräftigem Durchmischen 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit 145 µl Puffer verdünnt, 5 µl Substratlösung zugegeben, erneut durchmischt und die Fluoreszenzänderung über 10 min gemessen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzzunahmen mindestens zweier Messungen jeder Probe wurden zu dem DMSO-Kontrollwert in Relation gesetzt und die relative Hemmung des Inhibitors in Prozent bestimmt. Tabelle 9 und Tabelle 10 fassen die erhaltenen Screeningergebnisse an SAP1, 2, 3 & 8 sowie Cathepsin D zusammen. Neben den synthetisierten Verbindungen wurden die reversiblen HIV-1-Protease-Inhibitoren Ritonavir, Indinavir und Saquinavir getestet. Der reversible Standardinhibitor für Aspartatproteasen, Pepstatin A, wurde zur Positivkontrolle verwendet.

Aktive Verbindungen, die im Screening eine Hemmung von mehr als 60 % aufwiesen, wurden für weitere Messungen herangezogen, die im Folgenden beschrieben werden. Der Verlauf der Messkurve im Screening gab noch keinen Hinweis auf die Zeitabhängigkeit der Hemmung.

Tabelle 9: Screening an SAP2 und Cathepsin D, Hemmung in [%], [I] = 100 µM, 5 min Inkubation

Verbindung	SAP2	CathD	Verbindung	SAP2	CathD
A-48	0	53	A-78	5	97
A-49	16	21	A-79	0	100
A-50	12	36	A-80	0	93
A-51	2	35	A-81	0	95
A-52	0	36	A-82	0	86
A-53	19	21	A-83	4	97
A-54	17	9	A-84	9	97
A-76a	0	97	A-85	2	97
A-76b	3	89	A-86	3	76
A-77a	2	98	A-87	5	91
A-77b	1	97			

* Die Temperaturkonstanz wurde durch eine selbstgebaute Heizeinheit, bestehend aus Aluminiumplatte, Heizfolie mit Temperatursensor und Kontrolleinheit, eingehalten.

Tabelle 10: Screening an SAP1, 2, 3 & 8 und Cathepsin D, Hemmung in [%], [I] = 100 μ M, 5 min Inkubation

Verbindung	SAP2	CathD	SAP1	SAP3	SAP8
A-07	100	87	3	7	2
A-08	100	93	3	18	7
A-28	100	92	0	20	0
A-31	100	90	3	8	9
A-32	100	90	1	29	0
A-33	94	88	1	5	4
A-34	100	95	0	17	10
A-35	99	100	3	5	8
A-36	94	100	5	7	8
A-37	100	90	3	1	13
A-38	97	100	6	8	9
A-39	82	100	11	4	10
A-40	86	93	6	11	9
A-42	69	100	8	10	14
A-43	94	68	5	12	10
A-44	83	74	5	4	12
A-45	96	90	1	5	11
A-46	100	80	5	13	2
A-47	77	82	0	7	7
A-56	1	87	1	4	8
A-57	98	96	3	2	7
A-58	98	94	5	6	2
A-59	99	98	2	15	10
A-60	0	95	10	12	8
A-61	15	70	0	3	1
A-62	27	71	0	5	0
A-63	39	54	0	2	0
A-65	53	58	6	3	2
A-66	5	48	7	11	0
A-67	3	37	12	5	0
A-75	14	37	20	13	18
A-88	0	17	30	16	0
A-89	3	15	8	12	16
BocA-48	0	2	0	0	11
Cy-01	59	13	10	3	0
Cy-02	36	23	29	0	0
E-OI-27	6	23	0	10	11
E-OI-28	6	54	0	3	5
Indinavir	46	39	46	17	5
Ritonavir	100	100	100	82	90
Saquinavir	75	93	93	4	17

4.3.7 Verdünnungsassay zur Bestimmung von K_i , k_i , und k_{2nd}

Für aktive Verbindungen, die im Screening eine Hemmung von mehr als 60-70 % aufwiesen, wurden zur Bestimmung der Hemmkonstanten k_i , K_i , und k_{2nd} Verdünnungsassays nach *Kitz* und *Wilson* durchgeführt. Der Assay wurde unter gleichen Bedingungen wie das Screening

durchgeführt (Temperatur, Puffer, Volumina, Detektion, Substrat- und Enzymkonzentration; vgl. Kapitel 4.3.6). Der Verdünnungsassay war die Methode der Wahl, da die Umsatzkurven ohne Inhibitor nur über 20 min linear verliefen. So konnte die für irreversible Inhibitoren erwartete zeitabhängige Hemmung beobachtet werden.

Analog zum Screening wurde die Enzymrestaktivität bei sieben verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 und 100 μM (bzw. Konzentrationen zwischen 1 und 10 μM für stärker hemmende Verbindungen) und bei drei verschiedenen Inkubationszeiten (5, 20 und 35 min) bestimmt. Die Enzymrestaktivität wurde in Relation zum DMSO-Kontrollwert berechnet. Es wurden mindestens zwei Messungen pro Substanz durchgeführt.

Die k_{obs} -Werte zur Bestimmung der Hemmkonstanten k_i , K_i , und $k_{2\text{nd}}$ wurden durch Auftragung der Enzymrestaktivität gegen die Inkubationszeit für die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen aus den abfallenden Exponentialkurven einzeln berechnet (Diagramm 5):

$$[E]_a = [E]_0 \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}$$

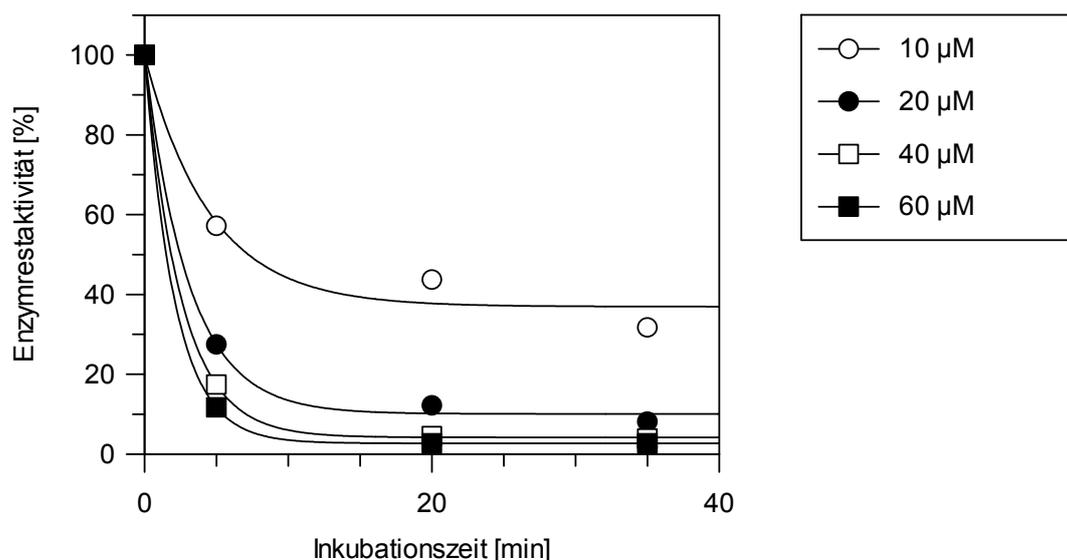


Diagramm 5: Zeit-Aktivitäts-Diagramm; Zeitabhängige Hemmung von Cathepsin D durch A-33 bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen

Die Hemmkonstanten k_i , K_i und $k_{2\text{nd}}$ lassen sich durch Auftragung von k_{obs} gegen die Inhibitorkonzentration $[I]$ und Korrektur des so erhaltenen $K_{i\text{app}}$ -Werts bestimmen (Diagramm 6):

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]}$$

Voraussetzung dafür ist, dass der Sättigungsbereich ($[I] \gg K_i$) schnell erreicht wird. So lassen sich die Parameter k_i und K_i einzeln bestimmen und es kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Hemmung aufgrund schneller Reaktion (großer k_i -Wert) oder hoher Affinität (kleine K_i -Wert) zustande kommt. Der $k_{2\text{nd}}$ -Wert errechnet sich dann durch Division:

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i}$$

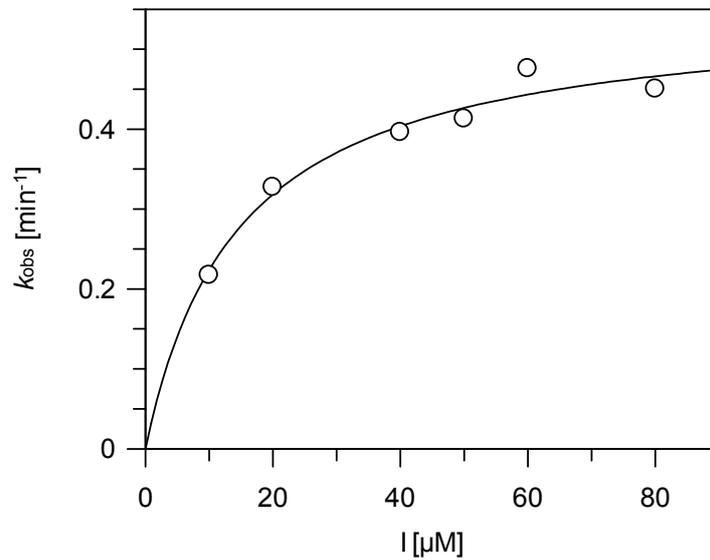


Diagramm 6: [I]- k_{obs} -Diagramm zur Bestimmung des k_{2nd} von A-33 an Cathepsin D unter Sättigungsbedingungen

Wird der Sättigungsbereich nicht erreicht ($[I] \ll K_i$), verläuft die $[I]$ - k_{obs} -Kurve linear und der k_{2nd} -Wert wird näherungsweise aus der Steigung der Geraden ermittelt. Auch dabei muss die Affinität des Substrates zum Enzym berücksichtigt werden und der K_i -Wert korrigiert werden (Diagramm 7):

$$k_{2nd} = \frac{k_{obs}}{[I]} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

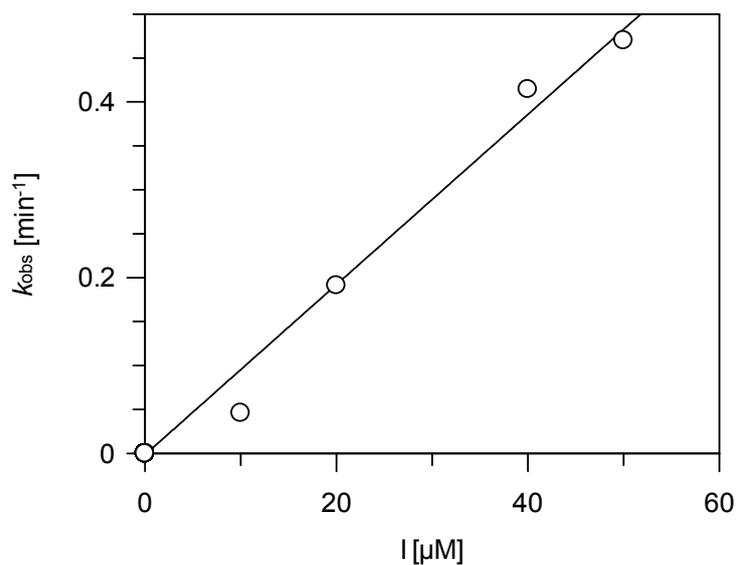


Diagramm 7: [I]- k_{obs} -Diagramm zur Bestimmung des k_{2nd} von A-28 an SAP2 mittels linearer Regression

Tabelle 11 fasst die erhaltenen k_{2nd} -Werte der aktiven Verbindungen an SAP2 und Cathepsin D zusammen. Wurden während der jeweiligen Messung Sättigungsbedingungen erreicht, sind auch die einzeln bestimmten Werte für k_i und K_i angegeben.

Tabelle 11: Hemmkonstanten k_i , K_i , und k_{2nd} an SAP2 und Cathepsin D

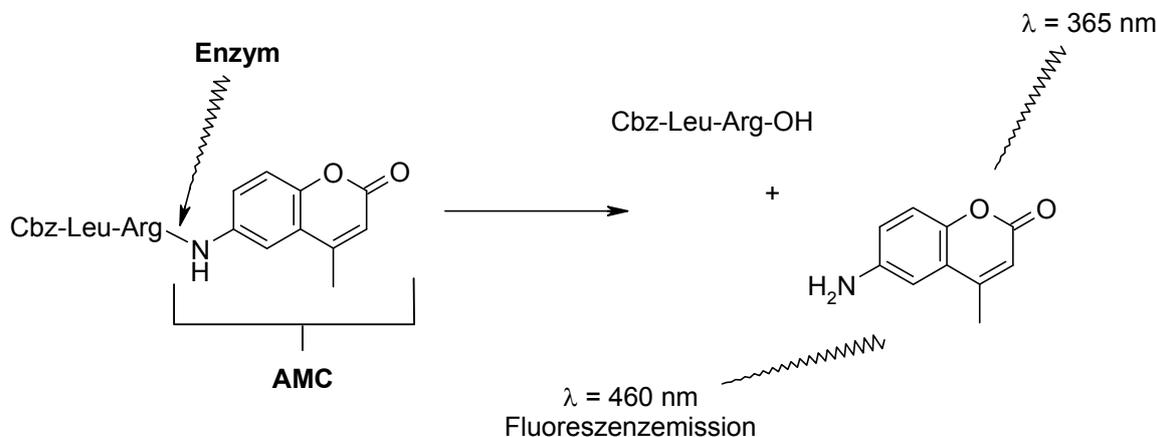
Verbindung	SAP2		CathD	
	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-07	9265 ± 811		34770 ± 6241	0.24 / 6.84
A-08	14386 ± 417		260663 ± 1020	1.17 / 4.48
A-28	60608 ± 1549		84215 ± 250	
A-31	86411 ± 9915		358848 ± 24726	0.72 / 2.00
A-31a	30589 ± 2498		49582 ± 1755	
A-31b	165855 ± 7	0.43 / 2.61	467291 ± 86259	0.51 / 1.10
A-32	29008 ± 3850		132887 ± 9225	0.92 / 6.94
A-33	14592 ± 2184		102349 ± 3787	0.64 / 6.22
A-34	19332 ± 4183		154197 ± 10497	1.20 / 7.80
A-35	7880 ± 238		109854 ± 215	1.07 / 9.78
A-36	12915 ± 2269		84512 ± 1791	
A-37	30541 ± 838		104965 ± 160	
A-38	15127 ± 658		149777 ± 14128	0.86 / 5.76
A-39	18794 ± 115		202774 ± 7686	1.27 / 6.29
A-40	11406 ± 1220		164988 ± 14089	0.87 / 5.26
A-42	32534 ± 1651		92080 ± 3778	
A-43	70343 ± 6	1.01 / 14.4	48295 ± 3540	
A-44	13778 ± 235		111572 ± 6776	0.74 / 6.63
A-45	118582 ± 14778	0.93 / 7.87	160288 ± 5715	1.26 / 7.86
A-46	44769 ± 2009		428475 ± 75158	1.65 / 3.84
A-47	17251 ± 394		22835 ± 555	
A-56			32555 ± 1143	
A-57	42156 ± 6083		469857 ± 47579	0.55 / 1.17
A-58	36628 ± 1866		936544 ± 116053	0.70 / 0.75
A-59	29738 ± 1581		923564 ± 156012	0.55 / 0.60
A-60			42985 ± 1765	
A-76a			99249 ± 4553	0.51 / 5.13
A-76b			45439 ± 3706	0.78 / 17.1
A-77a			28572 ± 1612	
A-77b			44873 ± 1471	
A-78			20942 ± 1223	
A-79			10350 ± 924	
A-80			12485 ± 583	
A-81			209364 ± 5405	1.11 / 5.28
A-82			478408 ± 37889	0.58 / 1.21
A-83			24423 ± 2557	
A-84			101700 ± 3033	1.25 / 12.3
A-85			688607 ± 4515	0.56 / 0.81
A-86			57739 ± 5805	0.29 / 5.08
A-87			175827 ± 8972	0.64 / 3.62

4.4 Testungen an Cystein- und Serinproteasen

4.4.1 Falcipain-Assay

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Philip J. Rosenthal an der University of California, San Francisco, wurden im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsaufenthaltes 127 potentielle Cysteinprotease-Inhibitoren auf ihre Aktivität gegen Falcipain 2 & 3 sowie auf antiparasitäre Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* getestet. Neben Etacrynsäurederivaten^[268] und Thiazolamiden^[269] von *Schirmeister* wurden auch Guanidin(i)ocarbonylpyrrole und -furane^[270] von *Schmuck* sowie Diazepine^[271] von *Grasso* getestet. Auf diese Resultate wird hier jedoch nicht weiter eingegangen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der synthetisierten Olefine als potentielle Cysteinprotease-Inhibitoren dargestellt. Weiterhin wurden die in dieser Arbeit als Aspartatprotease-Inhibitoren synthetisierten Aziridine an den Cysteinproteasen Falcipain 2 & 3 getestet.

Dafür wurde auf einen fluorimetrischen Assay, basierend auf dem Substrat Cbz-Leu-Arg-AMC, zurückgegriffen.^[272-274] Dabei erfolgt die Detektion der Fluoreszenzstrahlung nach Freisetzung der 7-Amino-4-methylcumaringruppe durch das Enzym (Schema 34).^[275] Das intakte Substrat zeigt lediglich schwache Fluoreszenz.



Schema 34: Abspaltung der 7-Amino-4-methylcumaringruppe von Cbz-Leu-Arg-AMC

In diesem Assay wurden die potentiellen Inhibitoren analog zum FRET-Assay zunächst mit einer Endkonzentration von 50 μM und 10 min Inkubationszeit getestet. Als Positivkontrolle wurde der irreversible Standardinhibitor für Cysteinproteasen, E-64, verwendet.^[276] Detaillierte Assaybedingungen sind in Tabelle 12 dargestellt. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse des Screenings an den für diese Arbeit relevanten Verbindungen. Für aktive Verbindungen, die eine Hemmung von mehr als 70 % aufwiesen, wurde in weiteren Messungen der IC_{50} -Wert bestimmt, was im Folgenden beschrieben wird.

Tabelle 12: Assaybedingungen für den fluorimetrischen Assay an Falcipain 2 & 3

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	128 μ l P , 21 μ l E , 1 μ l I + 49.5 μ l P , 0.5 μ l S
Substrat	Cbz-Leu-Arg AMC; [S]: 25.0 μ M; K_m [μ M]= 8.4 (FP2), 72.0 (FP3)
Enzym	Falcipain 2 oder 3, in <i>Escherichia coli</i> exprimiert
Puffer	100 mM Na-Acetat, pH 5.5, 10 mM DTT
Temperatur	37 °C
Detektion	Ex: 365 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Labsystems Fluoroskan Ascent

Tabelle 13: Screening an Falcipain 2 & 3, Hemmung in [%], [I] = 50 μ M, 5 min Inkubation

Verbindung	FP2	FP3	Verbindung	FP2	FP3
BocA-48	93	49	A-43	0	0
E-OI-23	81	0	A-44	0	0
E-OI-26	8	2	A-45	44	0
E-OI-27	0	24	A-46	17	0
E-OI-28	75	28	A-47	0	0
Z-OI-23	26	0	A-48	6	0
A-28	1	0	A-56	64	0
A-31	1	0	A-57	41	1
A-32	0	0	A-58	25	0
A-33	15	0	A-59	23	0
A-34	27	0	A-60	0	0
A-35	0	0	A-61	6	0
A-36	10	0	A-62	39	0
A-37	12	0	A-63	8	0
A-38	34	0	A-65	72	0
A-39	27	0	A-66	0	0
A-40	24	0	A-67	0	0
A-42	9	0			

4.4.2 Bestimmung von IC_{50} -Werten an Falcipain 2

Der lineare Verlauf der Messkurven, wie er im Screening beobachtet wurde, deutet im kontinuierlichen Assay auf eine zeitunabhängige, reversible Hemmung hin. So konnten mittels Verdünnungsreihen nach Gleichgewichtseinstellung die IC_{50} -Werte bestimmt werden. Dafür wurde die Enzymrestaktivität bei sieben verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zwischen 0.78 und 100 μ M (0.9 - 40000 nM für E-64) nach 10 min Inkubation bei 37 °C bestimmt. Auftragung der Enzymrestaktivität gegen die Inhibitorkonzentration liefert nach nicht-linearer Regression den IC_{50} -Wert (Diagramm 8), woraus wiederum der zugehörige K_i -Wert berechnet wurde. Tabelle 14 fasst die erhaltenen IC_{50} - und K_i -Werte an Falcipain 2 & 3 sowie relevante Konstanten (K_m , k_{cat}) für das eingesetzte Substrat zusammen.^[35,277,278]

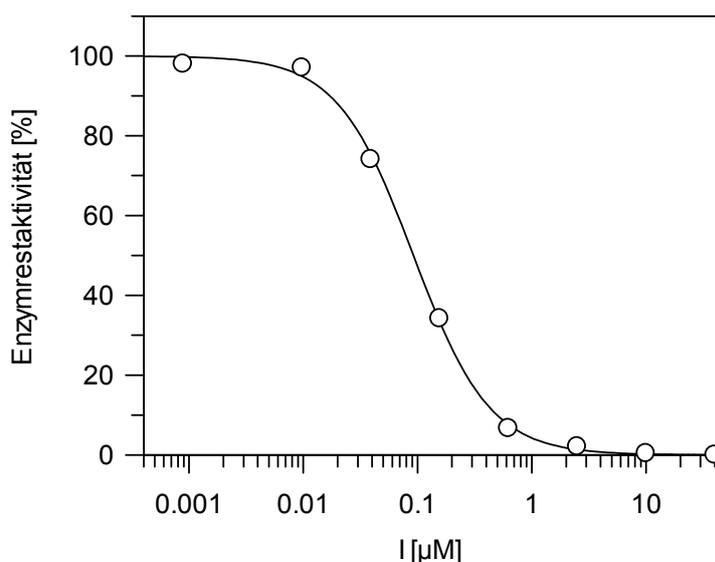


Diagramm 8: IC_{50} -Kurve von E-64 an Falcipain 2

Tabelle 14: Erhaltene IC_{50} - und K_i -Werte an Falcipain 2 & 3; Literaturwerte für K_m und k_{cat}

Falcipain 2	IC_{50} [µM]	K_i [µM]
E-OI-23	48.0 ± 2.29	12.1 ± 0.58
E-OI-28	38.4 ± 8.90	9.66 ± 2.24
BocA-48	32.7 ± 7.52	8.22 ± 1.89
A-65	11.1 ± 0.65	2.79 ± 0.16

	K_m [µM] ^a	k_{cat} [s ⁻¹] ^a	IC_{50} [nM] ^b	K_i [nM] ^b
Falcipain 2	8.4	0.884	99.6 ± 7.55	25.0 ± 1.90
Falcipain 3	72.0	0.043	293 ± 8.30	218 ± 6.16

^a Cbz-Leu-Arg-AMC

^b E-64 (gemessen, 10 min Inkubation); Literaturwerte: $0.012^{[35]}$ bzw. $0.058 \mu\text{M}^{[278]}$ (FP2), $0.032 \mu\text{M}^{[35]}$ (FP3)

4.4.3 Selektivitätsstudien an Cystein- und Serinproteasen

Um die Hemmstoffe auf Selektivität gegenüber anderen Enzymklassen zu prüfen, wurden stichprobenartig einige Aziridin-2-carboxylate gewählt und auf Aktivität gegenüber ausgesuchten Cystein- und Serinproteasen getestet. Die Auswahl der Cysteinproteasen umfasste Rhodesain,^[183] die Targetprotease von *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dem Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit, und die „papain-like“ Protease SARS-CoV-PL^{pro[279]} des SARS-Virus. Die Selektivität gegenüber Serinproteasen wurde an den beiden humanen Verdauungsenzyme Trypsin^[280] und α -Chymotrypsin^[281] getestet.

Es wurden kontinuierliche Assays zur Ermittlung der Hemmung bei Inhibitor-Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ durchgeführt. Die jeweiligen detaillierten Assaybedingungen sind in den folgen-

den Tabellen zusammengefasst:

Tabelle 15: Assaybedingungen für den Rhodesain-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	170 μ l P , 5 μ l E , 20 μ l I , 5 μ l S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC*HCl; [S]: 10.0 μ M; K_m = 827 nM
Enzym	Rhodesain, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM NaOAc, pH 5.5, 125 μ M DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Tabelle 16: Assaybedingungen für den SARS-CoV-PL^{pro}-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	160 μ l P , 10 μ l E , 20 μ l I , 10 μ l S
Substrat	Cbz-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly AMC*HOAc, [S]: 50.0 μ M; K_m = 850 μ M
Enzym	SARS-CoV-PL ^{pro} , aufgereinigte Enzymlösung
Puffer	20 mM TRIS, pH 7.5, 100 μ M EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 360 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Tabelle 17: Assaybedingungen für den Trypsin-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	174 μ l P , 4 μ l E , 20 μ l I , 4 μ l S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC*HCl; [S]: 40.0 μ M
Enzym	Trypsin, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM TRIS, pH 8.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Tabelle 18: Assaybedingungen für den Chymotrypsin-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	174 μ l P , 4 μ l E , 20 μ l I , 4 μ l S
Substrat	Succinyl-Leu-Tyr AMC; [S]: 80.0 μ M
Enzym	α -Chymotrypsin, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM TRIS, pH 8.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

In allen Assays wurden fluorimetrische Substrate verwendet, die analog Schema 34 (S. 64) auf der Abspaltung einer 7-Amino-4-methylcumaringruppe basieren. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Screenings aufgeführt. Für Chymotrypsin wurde am Aziridin **A-45** exemplarisch die IC_{50} -Werte nach verschiedenen Inkubationszeiten (5, 20 & 35 min) bestimmt (Tabelle 20). Ebenso wurden die IC_{50} -Werte für die Hemmung von Rhodesain durch **A-28** und **A-57** nach 5, 20, 35 und 50 min Inkubationszeit gemessen (Tabelle 21).

Tabelle 19: Übersicht der Screening-Ergebnisse (100 μ M) an Rhodesain, SARS-CoV-PL^{pro}, Trypsin und Chymotrypsin

	Hemmung [%]			
	SARS-CoV-PL ^{pro}	Rhodesain	Trypsin	Chymotrypsin
A-28	0	68	n.b.	n.b.
A-31	2	44	n.b.	n.b.
A-43	9	43	45	97
A-45	15	33	36	92
A-57	16	74	32	87
A-58	n.b.	n.b.	38	74
A-59	n.b.	n.b.	41	70

Tabelle 20: IC_{50} -Werte von A-45 an Chymotrypsin nach 5, 20 & 35 min Inkubation

	IC_{50} [μ M] Chymotrypsin		
	5 min	20 min	35 min
A-45	48.0 \pm 0.98	52.7 \pm 1.88	52.2 \pm 3.30

Tabelle 21: IC_{50} -Werte von A-45 an Rhodesain nach 5, 20, 35 & 50 min Inkubation

	IC_{50} [μ M] Rhodesain			
	5 min	20 min	35 min	50 min
A-28	8.40 \pm 1.16	16.4 \pm 1.36	20.8 \pm 3.67	36.1 \pm 6.31
A-57	17.3 \pm 2.34	17.3 \pm 0.26	21.7 \pm 0.97	25.0 \pm 3.58

Zusätzlich wurden an Rhodesain mögliche Inhibitor-Spaltprodukte auf ihre inhibitorischen Eigenschaften getestet. Dafür wurden (*R*)-Val-OBn und die zu **A-25** und **A-30** analogen Carbonsäuren **A-25*** und **A-30*** bei Konzentrationen von 100 μ M gescreent. Jedoch zeigte keine der Verbindungen eine relevante Hemmung (Tabelle 22, Abbildung 36).

Tabelle 22: Screening möglicher Inhibitor-Spaltprodukte an Rhodesain (100 μ M)

Rhodesain	Hemmung [%] (100 μ M)
A-25*	2
A-30*	1
(<i>R</i>)-Val-OBn	1

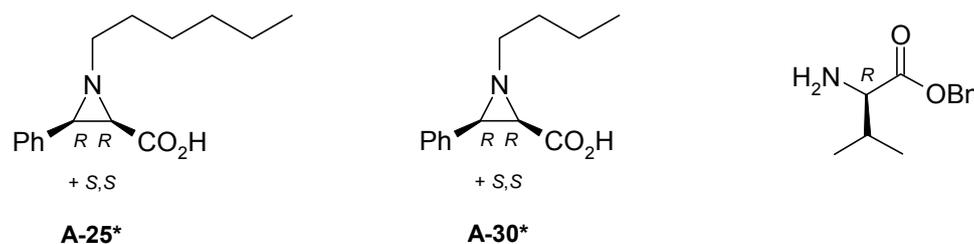


Abbildung 36: Mögliche Inhibitor-Spaltprodukte

Parallel zu den Selektivitätsstudien wurden die als potentielle Cysteinprotease-Inhibitoren synthetisierten Olefine auf ihre Aktivität an Rhodesain getestet. Ein Screening bei 100 μM ergab für diese Verbindungen jedoch keine relevante Aktivität (Tabelle 23).

Tabelle 23: Olefinscreenering an Rhodesain (100 μM)

Rhodesain	Hemmung [%] (100 μM)
E-OI-23	18
E-OI-26	10
Z-OI-23	3

4.4.4 HIV-1-Protease-Inhibitoren

Für die an SAP2 und Cathepsin D aktiven reversiblen HIV-1-Protease-Inhibitoren Ritonavir und Saquinavir (vgl. Tabelle 10, S. 60) wurde in einem zu den Assaybedingungen in Tabelle 5 (S. 54) analogen kontinuierlichen Assay die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: IC_{50} - und K_i -Werte von Ritonavir und Saquinavir

	IC_{50} [μM]		K_i [μM]	
	Ritonavir	Saquinavir	Ritonavir	Saquinavir
SAP1	13.6 \pm 0.33	> 100	4.76 \pm 0.12	n.b.
SAP2	8.64 \pm 1.34	122 \pm 1.66	3.03 \pm 0.47	42.8 \pm 0.58
SAP3	28.2 \pm 8.22	> 100	9.88 \pm 2.88	n.b.
SAP8	37.1 \pm 2.95	> 100	13.0 \pm 1.03	n.b.
CathD	0.20 \pm 0.01	40.3 \pm 0.46	0.07 \pm 0.002	14.1 \pm 0.16

5 Biochemische und biologische Untersuchungen

5.1 Einführung

Durch die Eingliederung in den Sonderforschungsbereich 630 (SFB 630) der Universität Würzburg, dessen Ziel die Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten ist, war es möglich, die synthetisierten Verbindungen im Rahmen von interdisziplinären Kooperationen auf ihre Aktivität an biologischen Systemen zu testen. Diese Testungen wurden nach den jeweiligen SOP-Arbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures) des SFB 630 (Qualitätsmanagement, PD Dr. Heike Bruhn) in den Teilprojekten Z1 (Dr. Tobias Öschlager, PD. Dr. August Stich) und B2 (Prof. Dr. Joachim Morschhäuser) durchgeführt. In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Spezies und Tests beschrieben. Weiterhin werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an der University of California, San Francisco, durchgeführt Testungen an Plasmodien beschrieben sowie die in Kooperation mit Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (SFB 630, Teilprojekt A3) durchgeführt Studien zur Proteinbindung der Hemmstoffe.

5.2 Antibakterielle Aktivität

Zusätzlich zur primären Zielsetzung wurden die synthetisierten Substanzen auch auf ihre antibakterielle Wirkung getestet. Dies beinhaltete die Untersuchung des inhibitorischen Effekts der Substanzen auf das Wachstum von Bakterien durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die MHK ist die niedrigste Konzentration einer antibiotischen Substanz, die das Keimwachstum unter Versuchsbedingungen gerade noch hemmt. Es wurde an folgenden Spezies getestet (SFB 630, Teilprojekt Z1):

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

Des Weiteren wurde der inhibitorische Effekt der Wirksubstanzen auf die Biofilmbildung von Bakterien untersucht:

- *Staphylococcus epidermidis* RP62A

Jedoch zeigten keine der getesteten Verbindungen antibakterielle Aktivität. Die minimale Hemmkonzentration lag für alle Verbindungen oberhalb der für den jeweiligen Test definierten Schwellenwerte (40-160 μM).

5.3 Antifungale Aktivität

Im Teilprojekt B1 des SFB 630 wurde der inhibitorische Effekt der Substanzen auf das Wachstum von Hefen durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) an *Candida albicans* 5314 untersucht.

Auch hier konnte den getesteten Verbindungen bei MHK-Werten von größer 40 bzw. 80 μM keine Aktivität nachgewiesen werden. In Kapitel 5.6 und 9.4 wird auf diese Ergebnisse näher eingegangen.

5.4 Antiparasitäre Aktivität

5.4.1 Hemmung von Trypanosomen und Leishmanien

Die Untersuchung des inhibitorischen Effekts der Wirksubstanzen auf trypomastigote Formen von Trypanosomen und auf Leishmania-Promastigoten (SFB 630, Teilprojekt Z1) umfasste Testungen an *Trypanosoma brucei brucei* TC 221 und *Leishmania major* MHOM/IL/81/FE/BNI.

In Tabelle 25 (S. 76) sind die erhaltenen Hemmdaten zusammengefasst.

5.4.2 Hemmung von Plasmodien

Während des bereits in Kapitel 4.4 erwähnten Forschungsaufenthaltes an der University of California, San Francisco, wurden die genannten 127 potentiellen Cysteinprotease-Inhibitoren neben ihrer Aktivität gegen Falcipain 2 & 3 auch auf antiparasitäre Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* getestet.

Dafür wurde zunächst eine Zellkultur des Chloroquin-resistenten *Plasmodium*-Stamms W2 ($IC_{50} = 73$ bzw. 90 nM)^[172,173] unter Standardbedingungen, bestehend aus einem Standard-Medium und Erythrocyten mit einem Hämatokrit-Wert von 2 % und einer Parasitämie um 1 % in einer Atmosphäre aus 3 % O₂, 6 % CO₂ und 92 % N₂, angelegt.^[282] Das Standard-Medium bestand aus sterilem, serumhaltigem (10 %) RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES, 20 mM Natriumbicarbonat-Puffer, 20 mM Glutamin und 50 g/l Gentamicin. Für die Testungen wurden die Parasiten nach 48 h mittels einer D-Sorbitol-Lösung (5 %) im Ring-Stadium bei 6-8 % Parasitämie synchronisiert. Zur Bestimmung der Parasitämie wurde ein Tropfen Erythrocy-

ten-Suspension ausgestrichen, mit Giemsa-Lösung (2 % in Phosphatpuffer, pH 7.1, Fixierung mit Methanol) angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Abbildung 37 zeigt den Blutausstrich der im Ring-Stadium synchronisierten Parasiten.

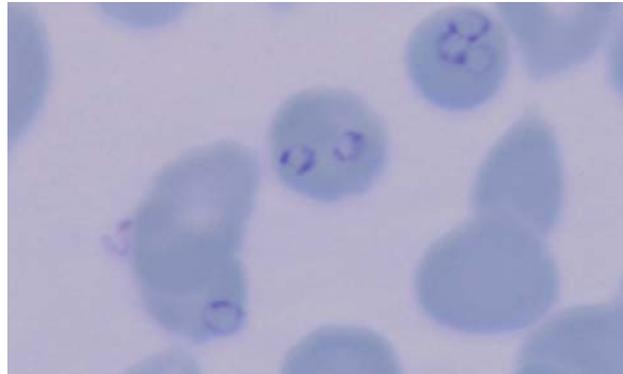


Abbildung 37: Blutausstrich im Ring-Stadium synchronisierter Parasiten bei 6-8 % Parasitämie

Anschließend wurde die Zellkultur (Parasitämie ca. 1 %) mit den Testsubstanzen in Endkonzentrationen von 10 μ M für 48 h inkubiert. Nach 48 h wurde das Serum-Medium entfernt, eine Lösung aus Formaldehyd in PBS (1 %, pH 7.4) hinzugefügt und 24 h bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Erythrocyten wurden in eine Lösung aus Triton-X-100-Lösung in PBS (0.1 %) und 1 nM YOYO-1 überführt. Die Anzahl der infizierten Erythrocyten wurde anschließend mittels einer fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS, fluorescence-activated cell sorting) ausgezählt.^[35] Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Markierung infizierter Erythrocyten mit dem DNA-Marker YOYO-1.^[283] Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch einen Laser angeregt und infizierte Erythrocyten können anhand ihrer Fluoreszenzstrahlung direkt ausgezählt werden. Durch Vergleich mit Zellkulturen, die nicht mit Inhibitor behandelt wurden, kann so die prozentuale Hemmung bestimmt werden (Abbildung 38).

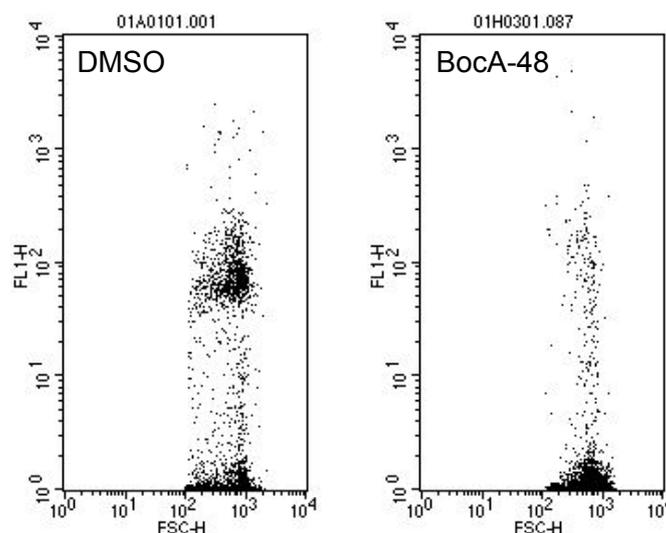


Abbildung 38: FACS-Analyse einer unbehandelten Kultur (DMSO) im Vergleich zu einer, die mit Inhibitor (BocA-48) inkubiert wurde

Die maximale DMSO-Konzentration im Assay lag bei 0.1 %. Es wurden zwei voneinander

unabhängige Assays in durchsichtigen 96-Well-Mikrotiterplatten mit einem Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Für aktive Substanzen wurde der IC_{50} -Wert durch Verdünnungsreihen analog ermittelt (Diagramm 9). Tabelle 25 (S. 76) fasst die erhaltenen Hemmdaten zusammen. Als Positivkontrolle wurde Chloroquin eingesetzt. Dabei konnte der Literaturwert für den W2-Stamm bestätigt werden ($IC_{50} = 62.2 \pm 3.04$ nM, vgl. 73 bzw. 90 nM).^[172,173]

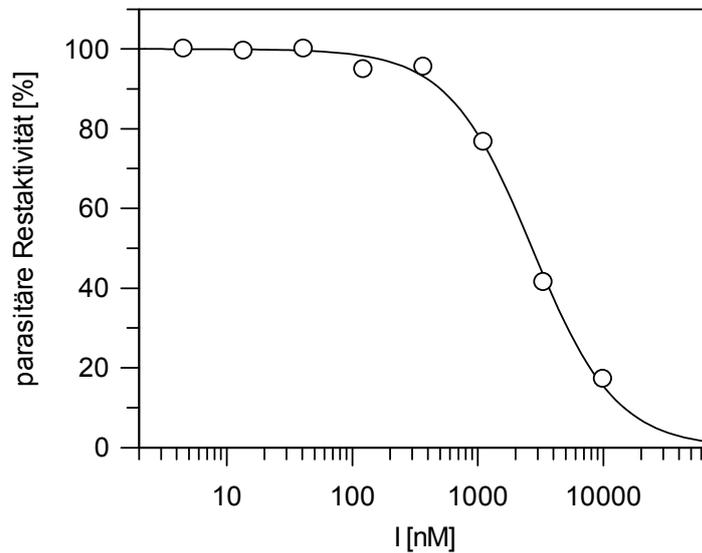


Diagramm 9: IC_{50} -Kurve von BocA-48 an *P. falciparum*

Der erythrocytäre Lebenszyklus von *P. falciparum* beginnt im 12 h andauernden Ring-Stadium. Es erfolgt die Weiterentwicklung zu Trophozoiten (24 h) und Schizonten (48 h), die nach mehrmaliger Kernteilung zahlreiche Merozoiten zum Befall neuer Erythrocyten in den Blutstrom entlassen (Abbildung 39).^[284]

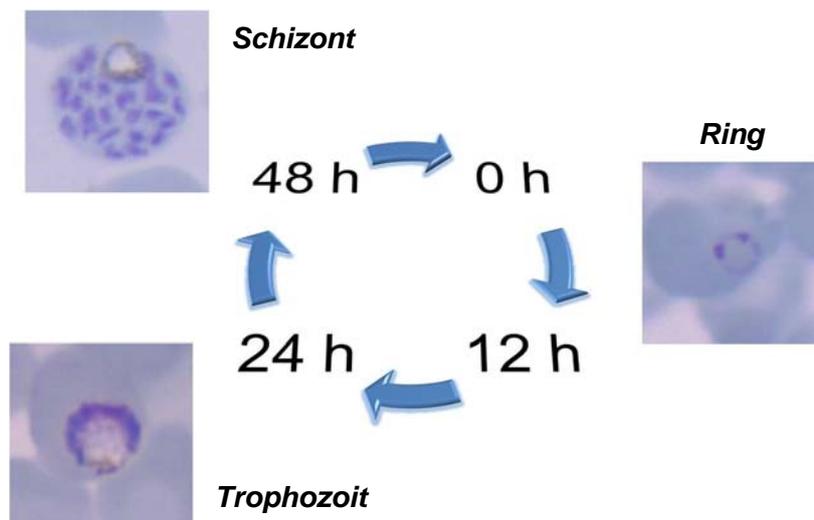


Abbildung 39: Erythrocytärer Lebenszyklus von *P. falciparum*

Abbildung 39 zeigt den beispielhaften Verlauf des Parasitenwachstums ohne äußere Einflüsse. In Abbildung 40 ist dem nun der Wachstumsverlauf gegenübergestellt, wenn die Kultur mit

dem Standardinhibitor für Cysteinproteasen E-64 (10 μM) inkubiert wurde. Dabei wirkt sich der Effekt von E-64 besonders auf die Morphologie der Nahrungsvakuole aus, in der der Parasit mit Hilfe der Falcipaine Hämoglobin für die eigene Nahrungsaufnahme abbaut.^[285] Im Trophozoiten-Stadium eines gesunden Parasits (1a) ist dies an der leeren, hellen Nahrungsvakuole erkennbar. Hier wurde das Hämoglobin bereits verdaut. Wird nun der Abbau des Hämoglobins durch Falcipaininhibitoren gehemmt (1b), zeigt sich dies an der mit Hämoglobin gefüllten, dunklen, angeschwollenen Nahrungsvakuole. Im Schizonten-Stadium zeigt sich der gesunde Parasit (2a) nach mehrmaliger Kernteilung kurz vor der Freisetzung der Merozoiten. Auch in diesem Stadium ist eine leere, helle Nahrungsvakuole erkennbar (vgl. auch Abbildung 39). Wurden die Parasiten mit E-64 inkubiert (2b), zeigt sich, dass die Entwicklung des Parasiten im Trophozoiten-Stadium praktisch zum Stillstand kommt. Die Hemmung der Falcipaine führt zum „Verhungern“ des Parasiten.

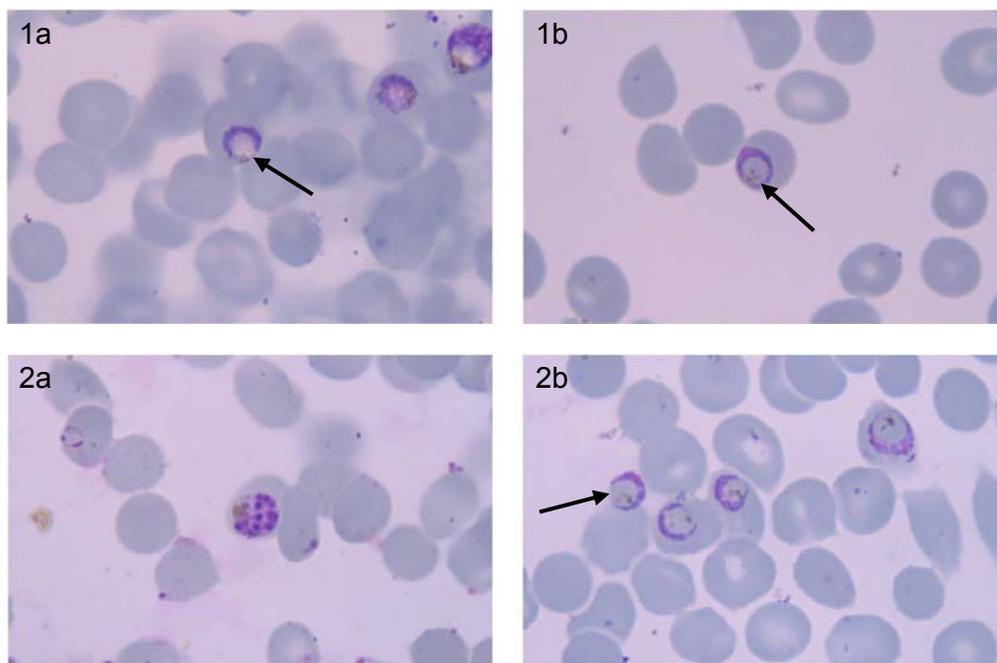


Abbildung 40: Gegenüberstellung des Trophozoiten- (1) und Schizont-Stadiums (2) einer unbehandelten (a) und einer mit E-64 (b) inkubierten *P. falciparum*-Kultur; die Pfeile markieren die Nahrungsvakuole

Die an *P. falciparum* aktiven Aziridine wurden diesen Tests unterzogen, um durch eine mögliche Veränderung der Morphologie des Parasiten Aufschluss über einen eventuellen Hemmmechanismus zu erhalten. Dafür wurden erneut im Ring-Stadium synchronisierte Erythrocyten (Parasitämie um 1 %) mit den Inhibitoren inkubiert (5.56, 16.7 & 50 μM). In für den erythrocytären Lebenszyklus der Parasiten relevanten Zeitabständen (12, 24 & 48 h) wurden Proben entnommen und mittels Giemsa-gefärbtem Blutausschlag unter dem Lichtmikroskop analysiert.

Abbildung 41 zeigt die Entwicklung des Parasiten unter dem Einfluss von **BocA-48**. Schon im Trophozoiten-Stadium lässt sich hier für alle Konzentrationen eine abnorme Entwicklung

erkennen. Der Parasit erscheint in seiner Entwicklung zurückgeblieben, selbst die Entwicklung zum Trophozoiten scheint gehemmt und es sind noch einige nicht-entwickelte Ringe sichtbar (1a). Allerdings ist auch deutlich die helle Nahrungsvakuole erkennbar (1b), was auf Falcipainaktivität hinweist. Auch im Schizonten-Stadium (2) wirken die Parasiten verkümmert und „krank“. Bei einer Inhibitorkonzentration von 16.7 μM (2a) sind sie deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Selbst bei nur noch 5.56 μM Inhibitorkonzentration (2b) ist die Entwicklung zum Schizonten deutlich gestört.

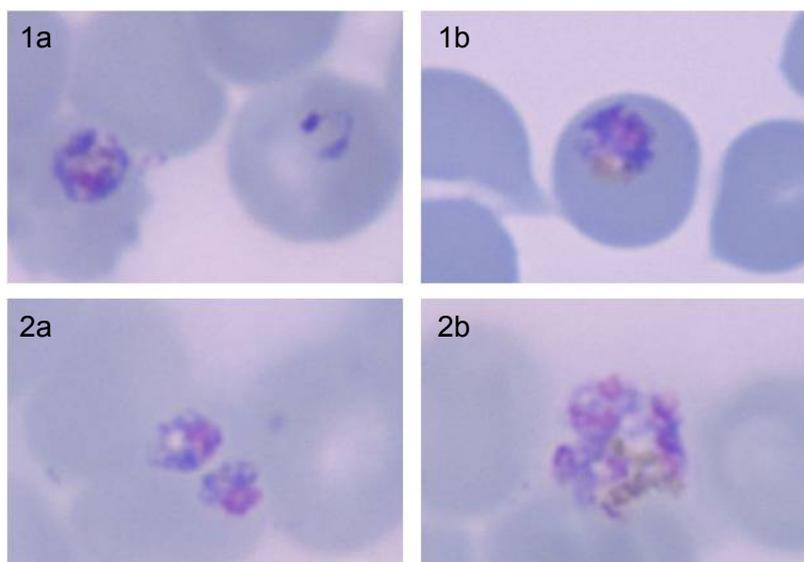


Abbildung 41: *P. falciparum*-Kultur nach Inkubation mit BocA-48 im Trophozoiten- (1) und Schizont-Stadium (2) bei Inhibitorkonzentrationen von 16.7 μM (a) und 5.56 μM (b)

Jedoch gilt sowohl für dieses Beispiel, als auch für alle anderen untersuchten Verbindungen, dass kein vakuoläres Hämoglobin, das auf eine Hemmung der Falcipaine hingedeutet hätte, erkennbar ist. Dies steht mit Ausnahme von **BocA-48** im Einklang mit den Ergebnissen der Falcipain-Enzymassays (Tabelle 13, S. 65). Auch ein auf allgemeine Cytotoxizität hinweisender Effekt der Verbindungen auf den Parasiten konnte ausgeschlossen werden (Tabelle 25).

5.5 Cytotoxizität

Die Untersuchung des cytotoxischen Effekts der Wirksubstanzen auf humane Zellen (Makrophagen J774.1, SFB 630, Teilprojekt Z1) sollte zeigen, dass die inhibitorische Wirkung einer Substanz auf Enzymhemmung beruht, und nicht auf Cytotoxizität.

In Tabelle 25 sind die an den Makrophagen sowie an den Parasiten erhaltenen Werte zusammengefasst.

Tabelle 25: Übersicht über die antiparasitäre Aktivität und Cytotoxizität der synthetisierten Verbindungen

	<i>T. brucei brucei</i>		<i>L. major</i>	<i>P. falciparum</i>		Makroph. J774.1
	<i>IC</i> ₅₀ [μM] (48 h)	<i>IC</i> ₅₀ [μM] (72 h)	<i>IC</i> ₅₀ [μM] (48 h)	Hemmung [%] (10 μM, 48 h)	<i>IC</i> ₅₀ [μM] (48 h)	<i>IC</i> ₅₀ [μM] (48 h)
A-28	27.4	30.4	> 100	55.0		38.2
A-31	22.8	29.9	44.5	65.7		36.1
A-32	27.1	30.7	46.0	66.7		35.5
A-33	21.5	30.1	38.8	78.6	6.02 ± 0.54	35.7
A-34	8.20	27.8	36.5	46.1		37.7
A-35	23.4	29.7	35.9	64.7		31.9
A-36	20.8	28.6	> 100	63.9		39.5
A-37	3.34	24.0	> 100	66.0		31.3
A-38	16.6	30.0	36.0	69.2	11.8 ± 0.79	32.0
A-39	21.9	31.4	35.3	43.7		33.6
A-40	16.1	31.2	48.9	81.8	6.95 ± 0.15	36.2
A-42	17.7	31.6	42.5	61.6		> 100
A-43	30.1	31.9	83.5	59.9		34.5
A-44	25.9	32.2	36.2	54.4		32.6
A-45	29.3	31.9	37.3	84.6	5.34 ± 0.20	33.3
A-46	21.2	32.1	37.8	53.2		34.0
A-47	19.5	31.5	39.2	46.3		32.0
A-48	> 100	32.2	> 100	36.2		> 100
BocA-48	22.2	31.4	> 100	86.0	2.85 ± 0.14	> 100
A-56	23.3 ± 2.01	30.4 ± 1.40	> 100	82.0	5.56 ± 0.73	> 100
A-57	3.57 ± 0.97	3.33 ± 0.13	45.3	72.1	7.65 ± 0.47	31.9
A-58	20.6 ± 3.95	25.6 ± 8.05	36.0	40.3		33.0
A-59	11.2 ± 5.73	16.4 ± 12.7	34.6	59.7		32.5
A-60	3.24 ± 0.20	3.31 ± 0.08	29.7	81.9	7.50 ± 0.33	35.2
A-61	2.89 ± 0.23	3.20 ± 0.12	19.2	73.1	7.74 ± 0.28	23.8
A-62	3.36 ± 0.16	3.29 ± 0.08	39.1	82.9	5.92 ± 0.09	41.7
A-63	3.19 ± 0.21	3.36 ± 0.02	24.5	84.3	6.35 ± 0.83	34.8
A-65	2.98 ± 0.11	3.25 ± 0.10	> 100	85.6	4.55 ± 0.06	> 100
A-66	5.33 ± 2.22	21.3 ± 5.79	87.6	59.8		62.9
A-67	13.4 ± 1.10	16.8 ± 0.74	92.7	59.6		54.9
Z-OI-23	25.5 ± 1.37	29.2 ± 0.97	4.81	32.3		3.27
E-OI-23	25.1 ± 1.95	29.4 ± 1.23	31.3	66.7	7.3	23.5
E-OI-26	> 100	> 100	> 100	2.3		> 100
E-OI-27	19.9 ± 6.30	17.3 ± 4.18	> 100	14.4		48.8
E-OI-28	26.7 ± 6.21	34.4 ± 4.81	> 100	59.3		> 100
A-75	4.18 ± 6.83	3.00 ± 14.98	> 100			> 100
A-76a	14.2 ± 3.71	14.6 ± 3.49	14.9			9.80
A-76b	1.42 ± 9.26	7.42 ± 1.76	62.7			44.1
A-77a	11.7 ± 4.31	11.1 ± 3.31	50.7			9.10
A-77b	9.60 ± 2.88	9.10 ± 2.08	47.8			8.80
A-78	13.4 ± 3.85	11.8 ± 2.30	> 100			7.80
A-79	8.79 ± 2.13	6.35 ± 0.53	70.6			8.80
A-80	14.0 ± 4.21	14.4 ± 3.85	23.3			8.30
A-81	11.6 ± 3.55	9.05 ± 3.79	45.8			8.85
A-82	9.00 ± 2.24	6.88 ± 0.52	49.8			8.60
A-83	13.1 ± 3.82	8.79 ± 1.53	48.8			11.8
A-84	3.64 ± 0.25	3.67 ± 0	77.8			9.20
A-85	12.4 ± 1.30	9.00 ± 3.18	45.1			9.00
A-86	10.7 ± 0.71	10.5 ± 5.37	48.2			8.85
A-87	14.2 ± 1.17	13.2 ± 3.78	40.3			8.85
A-88	2.06 ± 0.24	3.05 ± 0.22	> 100			53.2
A-89	0.62 ± 0.12	0.79 ± 0.22	61.5			48.3
Cy-01	18.6 ± 5.73	20.0 ± 6.09	> 100			45.7
Cy-02	0.69 ± 0.19	0.70 ± 0.13	53.1			54.5

5.6 Proteinbindung

In Kapitel 5.3 (S. 71) wurden Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen bezüglich der inhibitorischen Effekte auf das Wachstum von *Candida-albicans*-Zellkulturen vorgestellt. Dabei zeigte keine der Verbindungen eine Hemmung unterhalb des Schwellenwerts von 40 bzw. 80 μM . Dies überrascht besonders bei den SAP-aktiven Aminosäure-verknüpften *cis*-Aziridin-2-carboxylaten, da die Hemmung von SAP2 durchaus einen Einfluss auf das SAP2-abhängige Zellwachstum haben sollte. Dieses Phänomen trat allerdings bereits bei den ersten getesteten Inhibitoren dieser Verbindungsklasse auf. Für **A-07** und **A-08** wurde eine prozentuale Hemmung des Zellwachstums von 85 bzw. 88 % erst bei einer Inhibitorkonzentration von 500 μM erreicht.^[142] Als Kontrolle wurde Pepstatin A vermessen, welches das Zellwachstum bei 7.3 μM zu 92 % hemmt. Dabei spiegeln die zur Hemmung benötigten Konzentrationen an Pepstatin A und Aziridin (7.3 bzw. 500 μM) die unterschiedlichen Hemmkonstanten wider, die für Pepstatin A im nanomolaren und für die Aziridine im mikromolaren Bereich liegen ($K_{i \text{ PepA}} = 2.96 \text{ nM}$, $k_{2\text{nd A-08}} = 14386 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$). Eine Hemmung aufgrund toxischer Effekte wurde anhand paralleler Testungen an einer SAP2-unabhängigen Zellkultur, deren Wachstum nicht gehemmt wurde, ausgeschlossen.

Die Anwesenheit von Rinderserumalbumin (BSA) im Zellassay führte zur Hypothese, dass unter Umständen auftretende Proteinbindung der Inhibitoren ein Grund für die deutlich reduzierte Aktivität in der Zellkultur sein könnte.

Das bekannte Phänomen der Plasmaproteinbindung und dessen Ausmaß sind vor allem von pharmakokinetischem Interesse. Arzneistoffe, die im Blut an Plasmaproteine binden, sind im Rahmen des Bindungsgleichgewichts pharmakologisch nicht aktiv bzw. stehen für Targetmoleküle nicht zur Verfügung. Daher muss vor allem bei der Wahl der Dosis die Proteinbindung einbezogen werden.^[286]

Um einen möglichen Einfluss von BSA auf die Verfügbarkeit der Inhibitoren zu messen, wurden ausgewählte Inhibitoren (**A-45**, **A-58**) in Konzentrationen von 10, 20, 40, 50, 60, 80 & 100 μM erneut in einem Assay auf ihre Aktivität gegen SAP2 getestet. Die Assaybedingungen wurden analog Tabelle 5 (S. 54) mit 5 min Inkubationszeit gewählt. Allerdings wurde dem Puffer nun 0.1 % BSA zugesetzt. Tatsächlich zeigen die Inhibitoren im Assay mit BSA eine deutlich reduzierte Aktivität (Diagramm 10). Bestimmt man aus den Kurven den IC_{50} -Wert, zeigt ein Vergleich mit der Messung unter Standard-Assaybedingungen, dass die Inhibitoren bei BSA-Zugabe das Zwei- bis Fünffache ihrer Aktivität einbüßen (Tabelle 26). Jedoch ist das nur ein ungefährender Richtwert, da für zeitabhängige, irreversible Inhibitoren der IC_{50} -Wert nur eine Momentaufnahme darstellt.

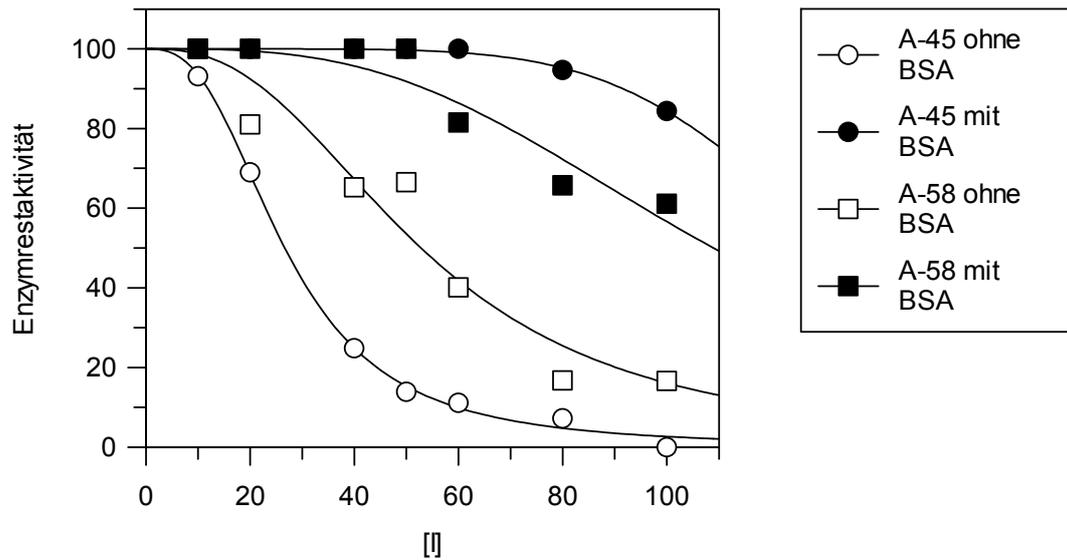


Diagramm 10: Vergleich der Hemmung von A-45 & A-58 an SAP2 nach 5 min Inkubationszeit mit und ohne Zugabe von BSA

Tabelle 26: IC_{50} -Werte von A-45 & A-58 an SAP2 nach 5 min Inkubationszeit

	A-45		A-58	
	ohne BSA	mit BSA	ohne BSA	mit BSA
IC_{50} [μ M]	26.7	133	52.8	109

Um das Maß der Proteinbindung zu bestimmen, wurden die Inhibitoren **A-58** und **A-59** sowie Saquinavir, Ritonavir und Pepstatin A in der Arbeitsgruppe von *Holzgrabe* (SFB 630, Teilprojekt A3) mittels kontinuierlicher Ultrafiltration vermessen.^[287,288] Die Methode der kontinuierlichen Ultrafiltration ermöglicht eine schnelle, automatisierte Messung über einen großen Bereich verschiedener Inhibitor-Protein-Verhältnisse. So können im Gegensatz zur diskontinuierlichen Variante der Ultrafiltration Proteinbindungen mit einem einzigen Experiment berechnet werden. Dafür wird die Ultrafiltrationszelle mit BSA-Lösung definierter Konzentration beladen und kontinuierlich Inhibitorlösung in das System gepumpt. Vom Filtrat wird an einem UV-Detektor ein Absorptions-Zeit-Diagramm aufgenommen, das eine kontinuierlich steigende Absorption anzeigt, die schließlich ein Maximum erreicht (Diagramm 11). Enthält das System kein Protein, ist diese Kurve entsprechend nach links verschoben und die Fläche zwischen den beiden Kurven wird als Maß für die Proteinbindung herangezogen.

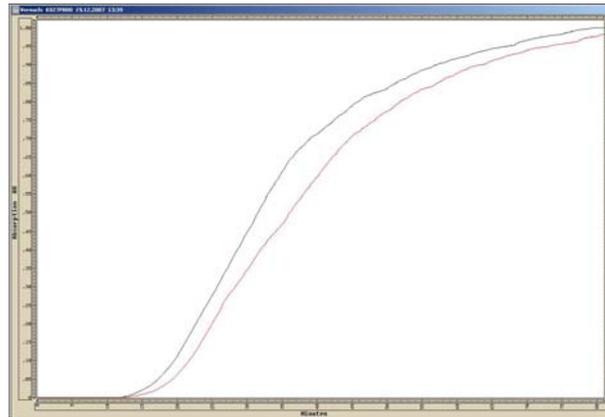


Diagramm 11: Beispielhaftes Absorptions-Zeit-Diagramm einer kontinuierlichen Ultrafiltration einer Messung mit (rot) und ohne (blau) Proteinbindung

Auf diesem Weg wurde die Zahl der Bindungsstellen mit den jeweiligen Bindungskonstanten pK_a und die prozentuale Proteinbindung berechnet.^[289] Die Werte wurden sowohl für das abhängige als auch für das unabhängige Bindungsmodell berechnet. Dabei handelt es sich um die Annahme, dass sich einzelne Bindungsstellen nicht gegenseitig beeinflussen, wenn an einer anderen bereits ein weiteres Molekül gebunden ist (unabhängig). Geht man von einer gegenseitigen Beeinflussung aus, spricht man vom abhängigen Bindungsmodell. In Tabelle 27 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 27: Zusammenstellung der Proteinbindungsdaten

	Proteinbindung [%]	unabhängige Bindungsstellen	pK_a1	pK_a2	pK_a3
A-58	24.3 ± 6.20	1.3 ± 0.4	2.67 ± 0.19	1.93 ± 0.06	
A-59	48.7 ± 5.95	1.5 ± 0.5	3.06 ± 0.24	2.68 ± 0.05	
Saquinavir	78.9 ± 2.94	1.8 ± 0.3	3.65 ± 0.10	3.34 ± 0.09	
Ritonavir	23.5 ± 5.82	1.8 ± 0.6	2.53 ± 0.23	2.16 ± 0.10	2.09 ± 0.00
Pepstatin A	36.6 ± 12.8	2.3 ± 0.8	2.79 ± 0.30	2.46 ± 0.13	2.22 ± 0.13

	Proteinbindung [%]	abhängige Bindungsstellen	pK_a
A-58	23.9 ± 6.22	1.0 ± 0.0	2.70 ± 0.15
A-59	43.2 ± 3.03	1.0 ± 0.0	3.10 ± 0.05
Saquinavir	76.5 ± 2.75	1.0 ± 0.0	3.74 ± 0.06
Ritonavir	21.8 ± 6.33	1.0 ± 0.0	2.64 ± 0.18
Pepstatin A	32.3 ± 10.5	1.0 ± 0.0	2.86 ± 0.26

Die erhaltenen Daten für die Proteinbindungen der Aziridine **A-58** und **A-59** bestätigen somit die Beobachtungen aus den Enzymassays. Da schon bei einem BSA-Gehalt von 0.1 % ein beträchtlicher Proteinanteil vorliegt, reicht die ermittelte Proteinbindung von 25 bis 50 % bereits aus, um die Ergebnisse der Enzymassays signifikant zu beeinflussen.

6 Pseudo-irreversible Hemmung

6.1 Zeitabhängige Hemmung

Bereits die Arbeit von *Degel* lieferte Indizien, dass Aziridin-2-carboxylate die SAP2 von *C. albicans* irreversibel hemmen.^[142,290] Allerdings beruht diese Vermutung lediglich auf der Beobachtung einer Zeitabhängigkeit der Hemmung. Dialyseverfahren und tryptischer Verdau als gängige Nachweismethoden der Irreversibilität waren bei dem vorliegenden System bislang aufgrund der Instabilität des Enzyms und der schlechten Löslichkeit der Inhibitoren nicht durchführbar.

Auch bei den in dieser Arbeit synthetisierten Aziridin-2-carboxylaten konnte in den Verdünnungsassays eine Zeitabhängigkeit der Hemmung beobachtet werden. Dabei war eine deutliche Zunahme der Hemmung mit steigender Inkubationszeit (5, 20, 35 min) zu beobachten. Die k_{obs} -Werte für die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen konnten aus den abfallenden Exponentialkurven berechnet werden (vgl. Kapitel 4.3.7, S. 60).

Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 50 und 65 min wurde neben dem exponentiellen Abfall der Enzymrestaktivität bis 35 min eine unerwartete Regeneration der Aktivität nach 50 min Inkubation beobachtet (Diagramm 12). Repräsentative Tests von **A-31** mit Inkubationszeiten bis zu 140 min zeigten, dass sich die Enzymrestaktivität nach Regenerierung bei 50-65 min auf ein konstantes Plateau einpendelt. Jedoch würde eine solche zeitunabhängige Hemmung eher auf einen reversiblen Hemmmechanismus hinweisen und im Widerspruch zum Kurvenverlauf bis 35 min stehen. Dies legte nahe, dass im Verlauf der Inkubation der Inhibitor chemisch verändert wird und erforderte eine detaillierte Aufklärung des Hemmmechanismus.

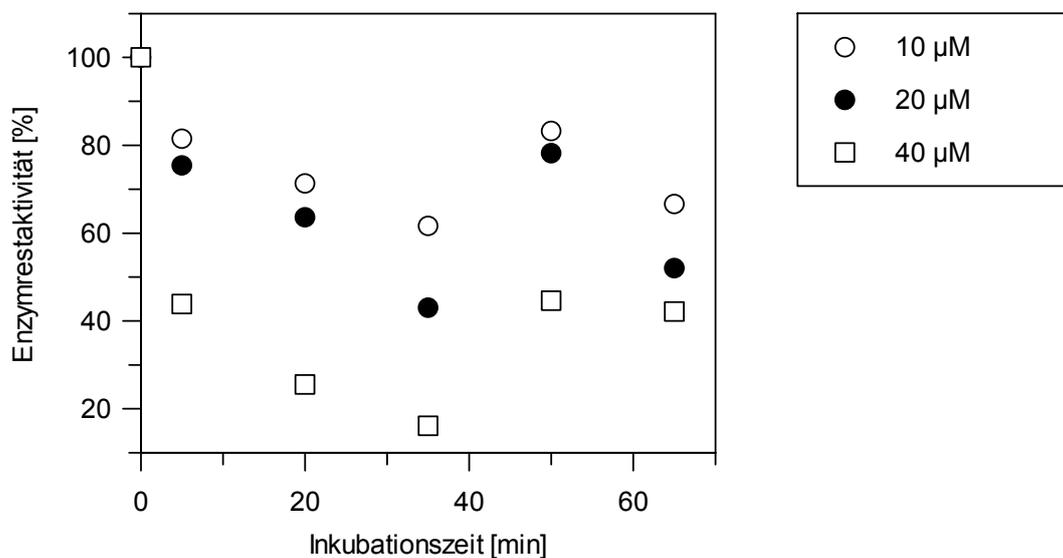
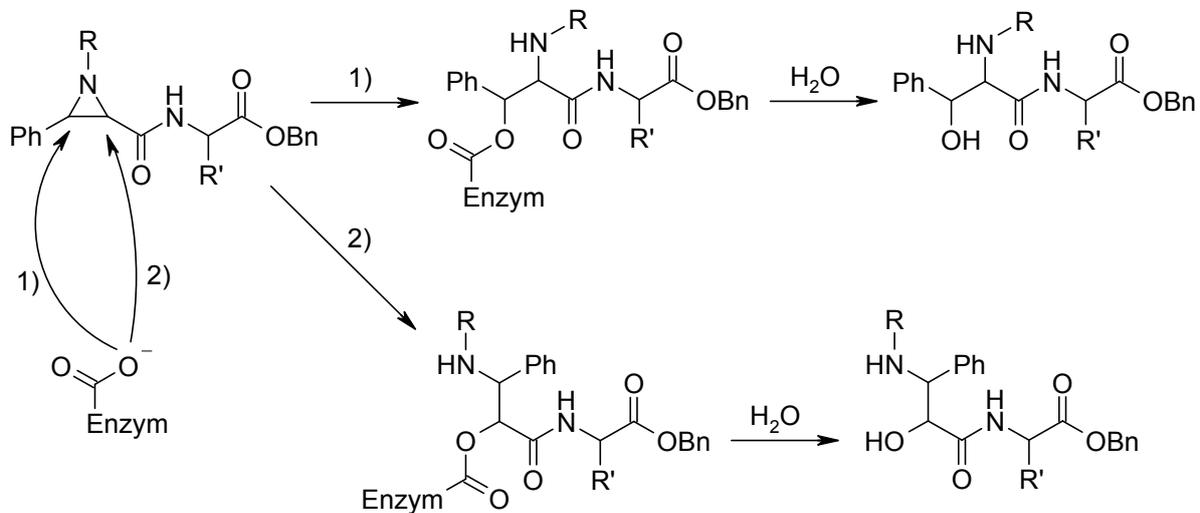


Diagramm 12: Zeitabhängige Hemmung von A-31 an SAP2 (5, 20, 35, 50, 65 min Inkubation)

6.2 Aufklärung des Hemmmechanismus

6.2.1 Hemmung von Aspartatproteasen

Der in Diagramm 12 dargestellte Kurvenverlauf der zeitabhängigen Hemmung von **A-31** an SAP2 führte zur Hypothese, dass das Additionsprodukt der Reaktion zwischen Inhibitor und Enzym, ein Ester der Asparaginsäure, unter den sauren Assaybedingungen (pH 3.2) womöglich wieder hydrolysiert wird (Schema 35). Dies würde zur Regeneration des aktiven Zentrums führen und einen Aminoalkohol freisetzen, der die Protease als Übergangszustandsanalogon reversibel hemmen könnte.



Schema 35: Mögliche Hydrolyse der kovalenten Bindung zwischen einer Aspartatprotease und einem Aziridin-2-carboxylat

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde in einem separaten Experiment SAP2 unter Assaybedingungen mit **A-31** inkubiert und anschließend einer LC-MS-Analyse unterworfen. Dafür wurden 870 μl Puffer (Na-Citrat-Puffer, pH 3.2) vorgelegt und 50 μl SAP2-Enzymlösung (Verdünnung eines *C.-albicans*-Zellkultur-Überstandes, Aktivität analog Assaybedingungen mit einer Steigung von $\sim 20 \Delta F/\text{min}$) sowie 50 μl Inhibitorlösung (4 mM in Acetonitril) zugegeben. Daraus ergab sich eine Inhibitorendkonzentration von 286 μM . Sieben solcher Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert. Der Proteinanteil wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten (15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min) über einen Spritzenfilter (0.2 μm) entfernt und das Filtrat sofort mittels LC-MS vermessen. Parallel wurden 4 Proben analog ohne Enzym inkubiert (15, 30, 60, 120 min) und mittels LC-MS analysiert. In den erhaltenen Massenspektren wurde tatsächlich der dem postulierten Aminoalkohol entsprechende Massenpeak gefunden ($m/z = 461.4 [M+H]^+$, Abbildung 42, Diagramm 14)

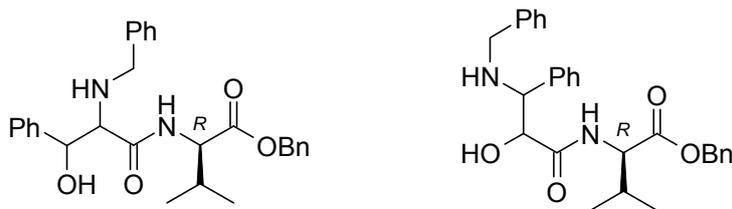


Abbildung 42: Mögliche Hydrolyseprodukte der kovalenten Bindung zwischen einer Aspartatprotease und dem Aziridin-2-carboxylat A-31

Die Auswertung der zugehörigen UV-Chromatogramme ergab eine Zunahme des Hydrolyseprodukts mit zunehmender Inkubationszeit. Dafür wurden die Integrale der Peaks von intaktem Aziridin und Hydrolyseprodukt in den Chromatogrammen (215 nm) ins Verhältnis gesetzt. Allerdings konnte auch in den Experimenten, in denen der Inhibitor ohne Enzym inkubiert wurde, mit durchschnittlich 4.1 ± 0.7 % das Hydrolysespaltprodukt nachgewiesen werden. Dabei wurde allerdings keine Zunahme mit der Zeit beobachtet. In Diagramm 13 ist die prozentuale Zunahme des Hydrolyseprodukts aus den SAP2-Experimenten mit der Inkubationszeit dargestellt. Die Werte wurden dabei um die 4.1 % Hydrolyse unter Assaybedingungen korrigiert. Die relativ niedrigen Werte des Hydrolyseanteils sind durch die hohe Endkonzentration des eingesetzten Inhibitors (286 μM) zu erklären. Diese Konzentration wurde gewählt, um eine Detektion mittels LC-MS zu gewährleisten und übersteigt die Enzymkonzentration $[E_0]$ um ein vielfaches (vgl. Tabelle 7, S. 58).

Der für irreversible Inhibitoren ungewöhnliche Kurvenverlauf der zeitabhängigen Hemmung wurde auch bei den Enzymassays mit Cathepsin D beobachtet. Daher wurden acht analoge Ansätze (870 μl Na-Formiat-Puffer, pH 3.7; 50 μl Cathepsin D Enzymlösung; 50 μl Inhibitorlösung **A-31**, 4 mM in Acetonitril, Inhibitorendkonzentration: 286 μM) bei 30 °C inkubiert, nach verschiedenen Inkubationszeiten (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 min) entnommen und mittels LC-MS analysiert. Auch in diesem Test wurden vergleichbare Ergebnisse bezüglich der quantitativen Zunahme des Hydrolyseprodukts beobachtet. In Diagramm 13 ist auch dieser Hydrolyseverlauf graphisch dargestellt.

Aus den UV-Chromatogrammen ist weiterhin zu entnehmen, dass neben den Basisliniengetrenten Peaks für die beiden Diastereomere von **A-31** auch das Hydrolyseprodukt als Doppelpack auftritt (Diagramm 14). Binden beide Diastereomere kovalent am Enzym, müssen bei der Hydrolyse zwei diastereomere Spaltprodukte entstehen, vorausgesetzt es wird nur eine der beiden kovalenten Angriffsmöglichkeiten bevorzugt (vgl. Schema 35, Angriff 1 oder 2).

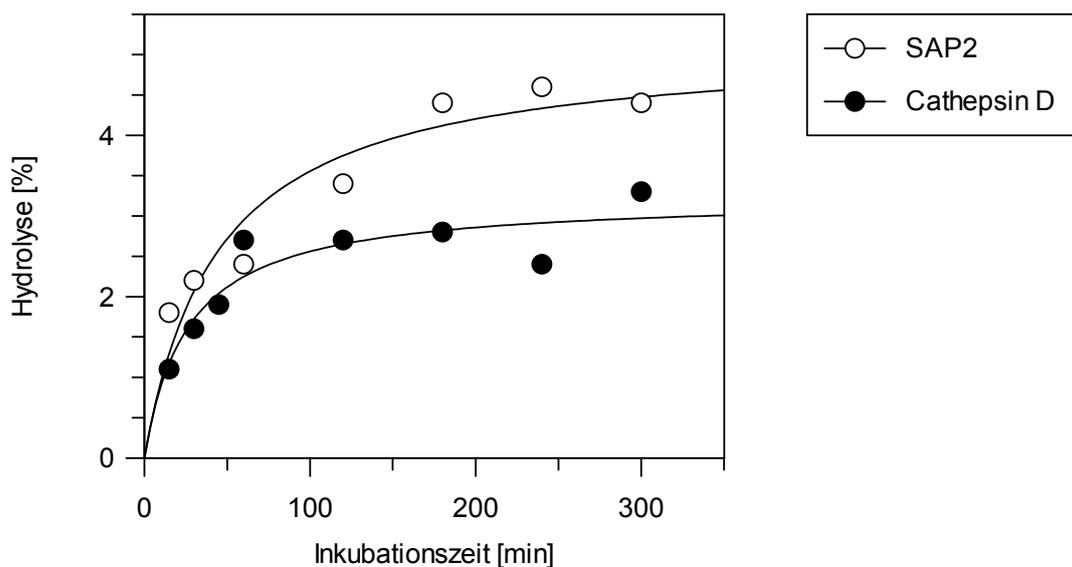


Diagramm 13: Inkubation von A-31 mit SAP2 und Cathepsin D; prozentuale Zunahme des Hydrolyseprodukts mit zunehmender Inkubationszeit

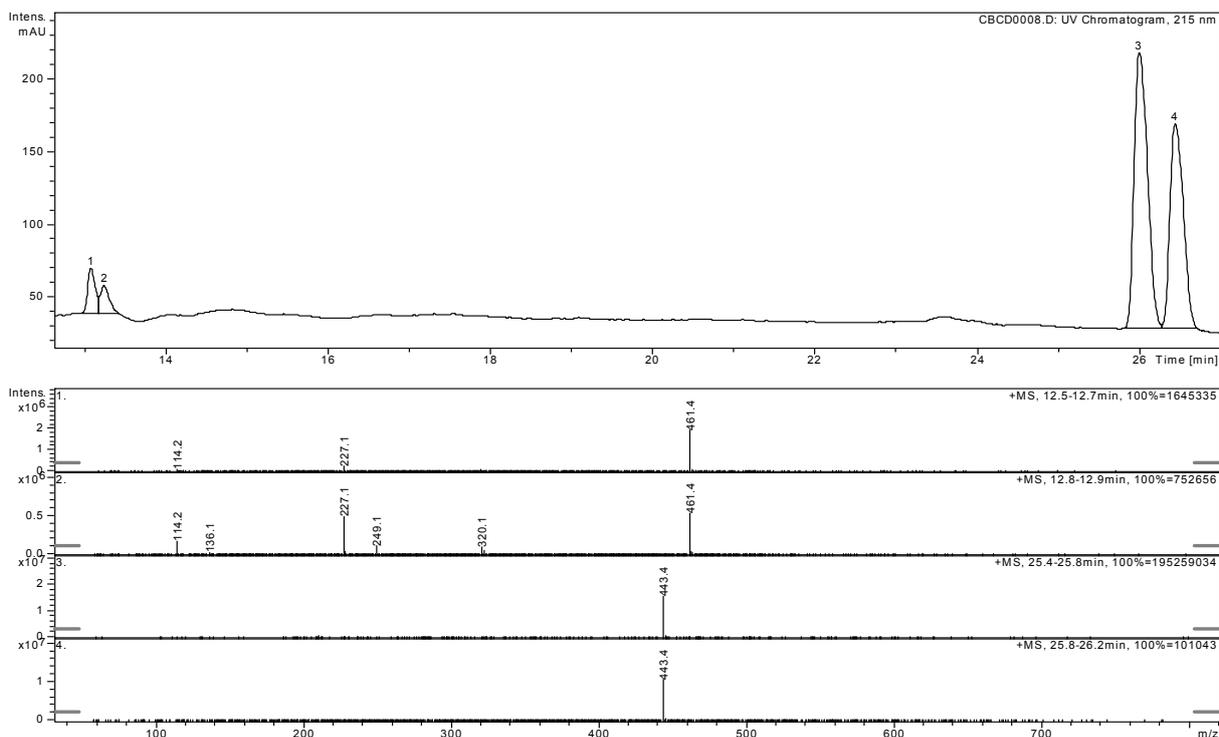


Diagramm 14: UV-Chromatogramm mit den zugehörigen Massespektren nach 300 minütiger Inkubation von A-31 mit Cathepsin D; Peak 1 & 2: Aminoalkohol; Peak 3 & 4: A-31

Um die Autohydrolyse unter Assaybedingungen auf einem weiteren Weg auszuschließen wurde das intakte Aziridin **A-31** in 250 μ l Acetonitril- d_3 gelöst und mit 500 μ l Puffer (50 mM, d_3 -Essigsäure- d , NaOD, NaCl) versetzt (**A-31**-Endkonzentration: 4.52 mM). Nach definierten Zeitabständen (10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 300 min) wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Mischung aufgenommen (Diagramm 15). Der Vergleich der Integrale der Dublett-Peaks der Aziridin-Ringprotonen (δ [ppm] 3.10, 3.14, 3.68, 3.73) mit denen der Valin- CH_3 -Gruppen

(δ [ppm] 1.02) als internem Standard ergab keine signifikanten Unterschiede. Somit konnte auch mittels NMR-Spektroskopie keine signifikante Ringöffnung unter Assaybedingungen ohne Enzymzugabe beobachtet werden.

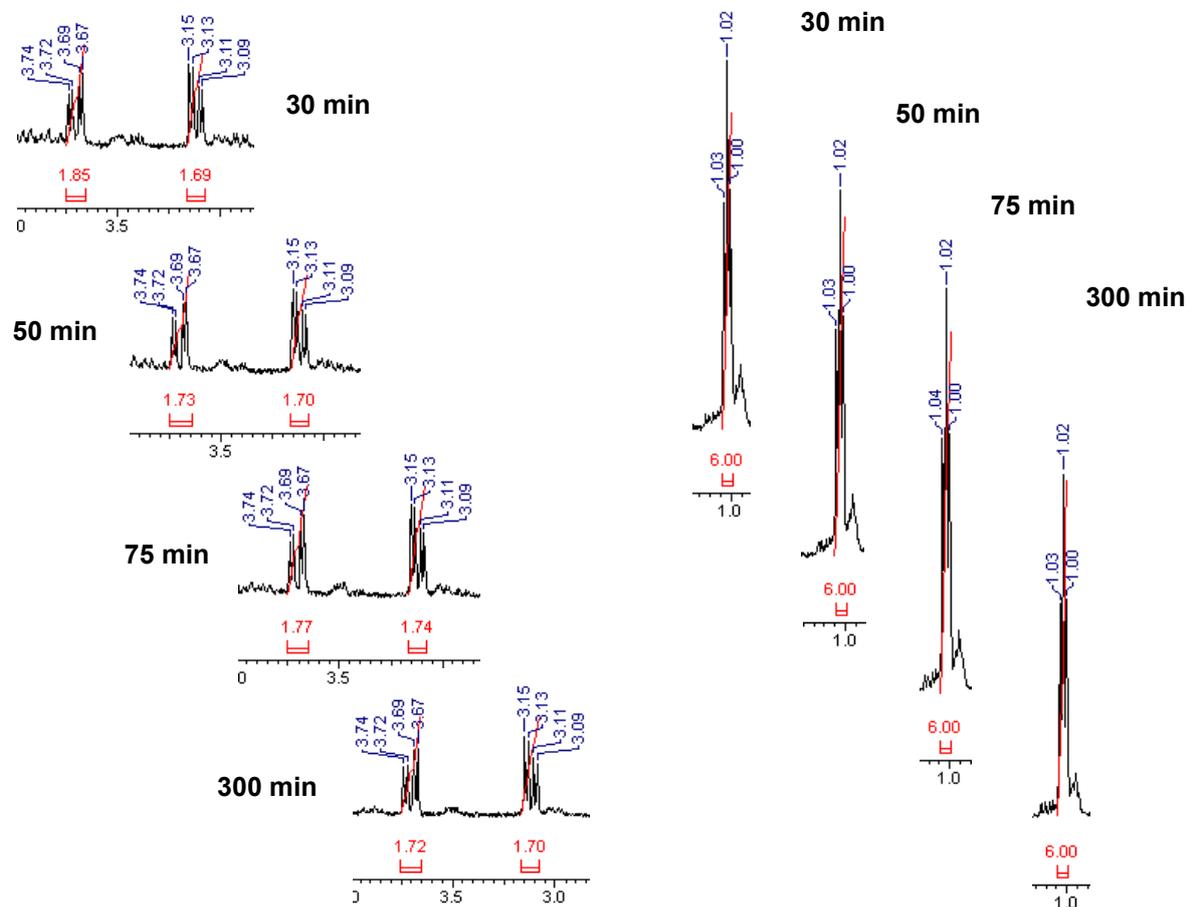
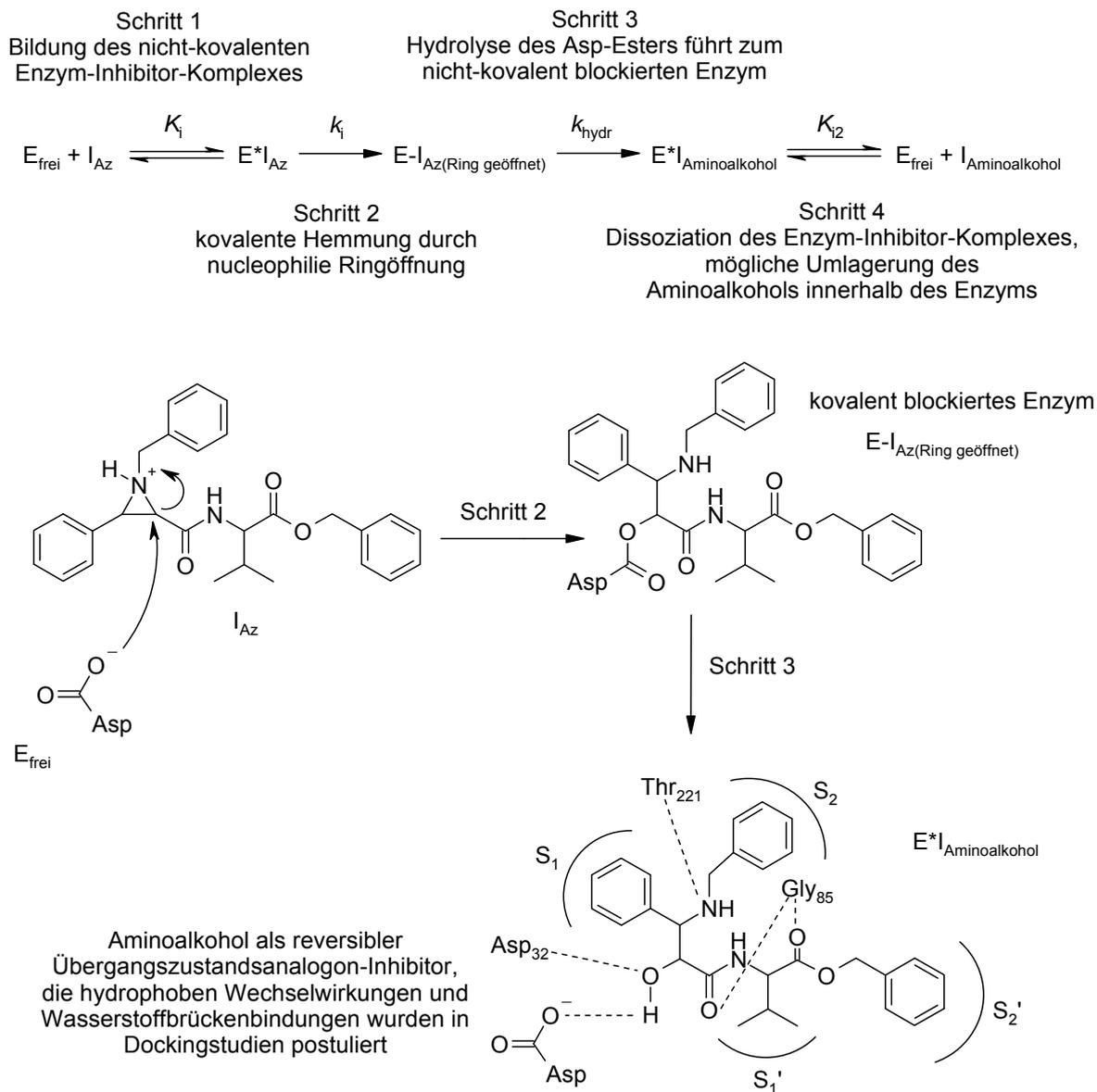


Diagramm 15: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren von A-31 in deuteriertem Acetatpuffer nach 30, 50, 75 & 300 min Inkubation; die angezeigten Integrale sind den Aziridin-Ringprotonen und dem internen Valin-Standard zuzuordnen

Anhand dieser kann ein pseudo-irreversibler Mechanismus für die Hemmung der SAP2 und Cathepsin D durch Aziridin-2-carboxylate postuliert werden (Schema 36). Die Hemmung verläuft nach der Bildung des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (Schritt 1) zunächst über einen nucleophilen Angriff des Aspartatrests am Aziridinring. Dies führt zur kovalenten Hemmung des Enzyms durch nucleophile Ringöffnung (Schritt 2). Dabei konnte bislang nicht geklärt werden, an welcher Stelle dieser Angriff stattfindet. Für den Zeitraum der kovalenten Hemmung können die Hemmkonstanten K_i und k_i bestimmt werden. Die anschließende Hydrolyse des Aspartatesters führt zum Aminoalkohol, der möglicherweise das Enzym als Übergangszustandsanalogon nicht-kovalent hemmt (Schritt 3). Die in Schema 36 gezeigten hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen wurden in Dockingstudien postuliert (siehe Kapitel 7). Die Geschwindigkeitskonstante k_{hydr} für die Hydrolyse des Aspartatesters sowie die Dissoziationskonstante K_{i2} für den reversibel bindenden Aminoalkohol können im Rahmen des Enzymassays nicht bestimmt werden.



Schema 36: Postulierter pseudo-irreversibler Mechanismus für die Hemmung der SAP2 und Cathepsin D durch Aziridin-2-carboxylate

Im Gegensatz zu anderen reversiblen Inhibitoren, die aufgrund ihrer OH-Gruppe als Übergangszustandsanaloga wirken, wird im vorliegenden Fall der Inhibitor erst im aktiven Zentrum durch das Enzym selbst produziert. Dass ein solcher Hemmmechanismus bislang nicht für Inhibitoren anderer Aspartatproteasen, die auf Epoxiden basieren, beschrieben wurde, liegt möglicherweise an den sauren Assaybedingungen für SAP2 und Cathepsin D, die die Esterhydrolyse begünstigen.

6.2.2 Hemmung von Cystein- und Serinproteasen

Für die Aufklärung des Hemmmechanismus der an Rhodesain, Trypsin und Chymotrypsin getesteten Aziridin-2-carboxylate (Kapitel 4.4.3, S. 66) wurden analog separate Inkubations-

experimente ausgewählter Inhibitoren (286 μM) mit den jeweiligen Proteasen unter Assaybedingungen durchgeführt. Parallel wurden die Inhibitoren ohne Enzym in der jeweiligen Pufferlösung inkubiert. Anschließende LC-MS-Analyse der von Protein befreiten Lösungen sollte über die Identifizierung möglicher Spaltprodukte Aufschluss über die Art der Hemmung geben. Tabelle 28 fasst die Experimente zusammen.

Tabelle 28: Übersicht der Inkubationsexperimente

Enzym	Inhibitor	Inkubation [min]
Rhodesain	A-57	5, 60, 120
Trypsin	A-43	10, 60
	A-45	10, 60
Chymotrypsin	A-43	10, 60
	A-45	10, 60

Die LC-MS-Analyse der Inkubationsexperimente ohne Enzymzugabe zeigte keine Veränderung der Inhibitoren. Auch der bei Aspartatproteasen auftretende Aminoalkohol wurde nicht gefunden. Ebenso konnten in den Experimenten mit Trypsin und Chymotrypsin keine Spaltprodukte nachgewiesen werden. Somit kann die nicht-zeitabhängige Hemmung der Serinproteasen als reversibel eingestuft werden.

Bei der Inkubation von **A-57** mit Rhodesain wurden dagegen in der LC-MS-Analyse zwei Spaltprodukte identifiziert, deren Massenpeaks der zu **A-57** analogen Aziridin-2-carbonsäure (256.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$) und (*R*)-Val-OBn (282.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) entsprechen. Dies entspricht einer Spaltung des Inhibitors an der Amidbindung. Parallel dazu wurde ein Screening mit den zu **A-25** und **A-30** analogen Carbonsäuren und (*R*)-Val-OBn durchgeführt, die jedoch keine Aktivität an Rhodesain zeigten und somit nicht für die Hemmung verantwortlich sind. Die Hemmung von Rhodesain zeigte einen zur irreversiblen Hemmung umgekehrten zeitabhängigen Verlauf (Tabelle 21, S. 68). Die IC_{50} -Werte nehmen mit steigender Inkubationszeit zu. Somit kann die Hemmung von Rhodesain als „alternative Substrathemmung“^[291] eingestuft werden. Das Enzym wird dabei solange von dem Inhibitor blockiert bis die Spaltung vollständig verlaufen ist (Abbildung 43). Ungewöhnlicherweise wird im vorliegenden Beispiel eine (*R*)-konfigurierte Aminosäure vom Enzym gespalten. Dieser Test wurde bislang jedoch noch nicht mit einem (*S*)-Aminosäure-verknüpften Inhibitor durchgeführt.

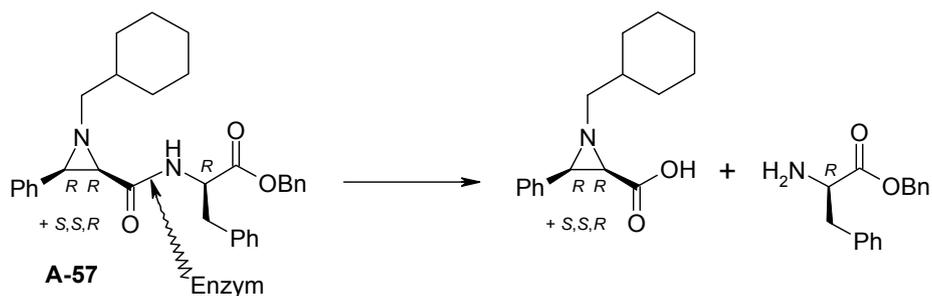


Abbildung 43: Prinzip der „alternativen Substrathemmung“

6.3 pH-Abhängigkeit der Hemmung

Die Enzymassays an SAP2 werden bei niedrigen pH-Werten durchgeführt. Dies entspricht dem Optimum der Enzymaktivität, die bei SAP2 ein Maximum bei pH-Werten von 3.5 bis 3.8 aufweist.^[60,70] Auch die Bedingungen, unter denen die SAP-Isoenzyme exprimiert werden, erfordern eine acide Umgebung. So produziert während einer *Candida*-Infektion der Pilz saure Nischen, die die Aktivität der SAP-Isoenzyme begünstigen.^[57]

Im Gegensatz zu Inhibitoren, die auf Epoxiden basieren, stellt der Aziridinstickstoff ein basisches Zentrum dar. Bereits quantenchemische Berechnungen^[292] und Experimente^[160] mit Aziridinen als Inhibitoren von Cysteinproteasen zeigten, dass deren Potenz in saurem Medium aus thermodynamischer und kinetischer Sicht stark erhöht wird. Daher könnten Aziridin-basierte Inhibitoren als eine Art „prodrugs“ wirken, die in saurem Medium aktiviert werden. Die pH-Abhängigkeit der Hemmung von Aziridin-2-carboxylaten an SAP2 wurde durch Messung der Enzymrestaktivität analog zu den Screening-Bedingungen bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.6, S. 59). Die Inhibitoren wurden in Acetatpuffer bei sieben verschiedenen pH-Werten (3.2, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 7.0) vermessen (Tabelle 29, Diagramm 16).

Tabelle 29: Übersicht über das pH-abhängige Screening

Inhibitor	Konzentration	Inkubationszeit
A-31	50 μ M	5 min
EPNP	100 μ M	30 min
Pepstatin A	50 nM	5 min

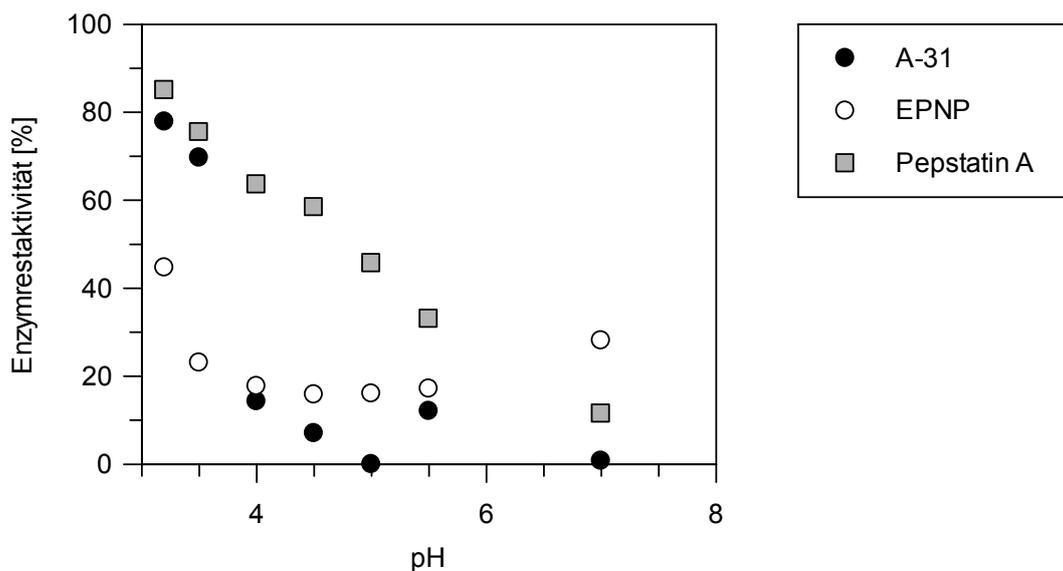
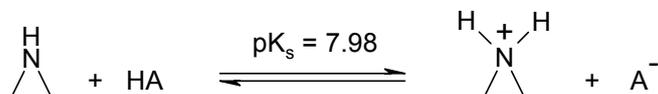


Diagramm 16: pH-abhängiges Screening an SAP2

Neben **A-31** wurden der irreversible, aber schwache Aspartatprotease-Inhibitor EPNP^[144,149] sowie Pepstatin A getestet. Wie erwartet zeigen **A-31** und EPNP bei pH 3.2 die höchste Ak-

tivität. Zwar ist das Aziridin ($pK_s = 7.98$) weniger basisch als aliphatische sekundäre Amine (vgl. Dimethylamin, $pK_s = 10.87$), unter Assaybedingungen liegt der Heterocyclus aber auf jeden Fall protoniert vor (Schema 37). Die Protonierung des Stickstoffs stabilisiert den Übergangszustand der nucleophilen Ringöffnung.^[206,207]



Schema 37: Säure-Base-Reaktion von Aziridin

Bemerkenswert ist der deutliche Abfall der Inhibitoraktivität bereits bei einer Erhöhung des pH-Werts auf 4.0. Die Aktivität des reversiblen Inhibitors Pepstatin A nimmt hingegen linear mit der Erhöhung des pH-Werts ab. Allerdings wird dieser als Übergangszustandsanalogon wirkende Inhibitor auch nicht durch Protonierung aktiviert.

7 Dockingstudien

Dockingstudien an **A-31** und dem daraus durch Hydrolyse der irreversiblen Hemmstufe entstehenden Aminoalkohol sollten die Bindungsmodi des Inhibitors in der SAP2-Bindungstasche aufklären. Daraus sollten Erkenntnisse über den in Kapitel 6.2 (S. 81) postulierten pseudo-irreversiblen Hemmmechanismus gewonnen werden. Die Docking-Simulationen wurden in der Arbeitsgruppe von *Baumann* (Institut für Pharmazeutische Chemie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig) an der Röntgenstruktur von SAP2 (PDB: 1EAG)^[104,105] unter Benutzung von Schrödinger Glide^{®[293]} durchgeführt. Für **A-31** wurden beide Diastereomere unter Berücksichtigung der Inversion am Aziridinstickstoff (Schema 8, S. 32) für die Berechnungen herangezogen. In einer Simulation wurde der intakte Inhibitor in die Bindetasche gelegt, um die Positionierung der Liganden im aktiven Zentrum vor dem nucleophilen Angriff des Aspartatrests darzustellen. Der pH-Bereich von 5 ± 2 sollte die Assaybedingungen abdecken, aber auch lokale basische Bereiche im Protein erlauben. Die Aziridinstickstoffatome wurden erwartungsgemäß protoniert vorhergesagt. Es wird angenommen, dass während der Proteolyse einer der beiden Aspartatreste des aktiven Zentrums protoniert vorliegt, für SAP2 ist aber nicht bekannt, welcher. Daher wurden auch hier beide möglichen Fälle simuliert. Das Docking lieferte ähnliche Ergebnisse, wobei Asp32 in der protonierten Form geringfügig stabiler wirkte. Weiterhin liegt Asp32 etwas tiefer in der Tasche und sollte daher bevorzugt in der protonierten Form vorliegen. Alle folgenden Abbildungen wurden demzufolge mit Asp218 als Nucleophil in der deprotonierten Form erstellt. Für die intakte Form des Inhibitors wurden nur Ergebnisse in Betracht gezogen, in denen die Aziridinkohlenstoffatome nicht weiter als 3.5 Å von dem deprotonierten Aspartatrest entfernt waren.

Zusätzlich wurden die jeweils 40 höchsten Docking-Scores visuell auf Enzym-Ligand-Wechselwirkungen abgeglichen, wie sie nach *Cutfield*^[104] und *Abad-Zapatero*^[105] für den reversiblen Inhibitor A-70450 (Abbildung 18, S. 18) beschrieben wurden. Die Ergebnisse wurden in OpenEye VIDA2^{®[294]} visualisiert. Für **A-31** wurde ein zu **A-07** und **A-08** (vgl. Abbildung 30, S. 25) analoger Bindungsmodus gefunden (Abbildung 44A). Neben der Bildung einer doppelten Wasserstoffbrückenbindung zu Gly85 und den potentiellen π - π -Wechselwirkungen mit Tyr84 und Tyr225 kommt es besonders in S1' und S2' durch den Austausch zu (*R*)-Valin zu starken van-der-Waals-Kontakten.

Die Dockingsimulationen für den nach Ringöffnung hydrolysierten Aminoalkohol (Abbildung 44B, vgl. auch Schema 36, S. 85) ergaben ein ähnliches Bindungsmuster wie das der intakten Form von **A-31**. Das durch die Ringöffnung entstandene sekundäre Amin bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zu Thr 122 aus. Somit bedarf es für den Inhibitor keiner nennenswerten Umlagerung nach Ringöffnung und Esterhydrolyse. Ferner bildet die

durch Hydrolyse entstandene Hydroxygruppe Wasserstoffbrückenbindungen zu beiden Aspartatresten des aktiven Zentrums. Somit könnte der Aminoalkohol als vollwertiges Übergangszustandsanalogon wirken, das die SAP2 reversibel hemmt.

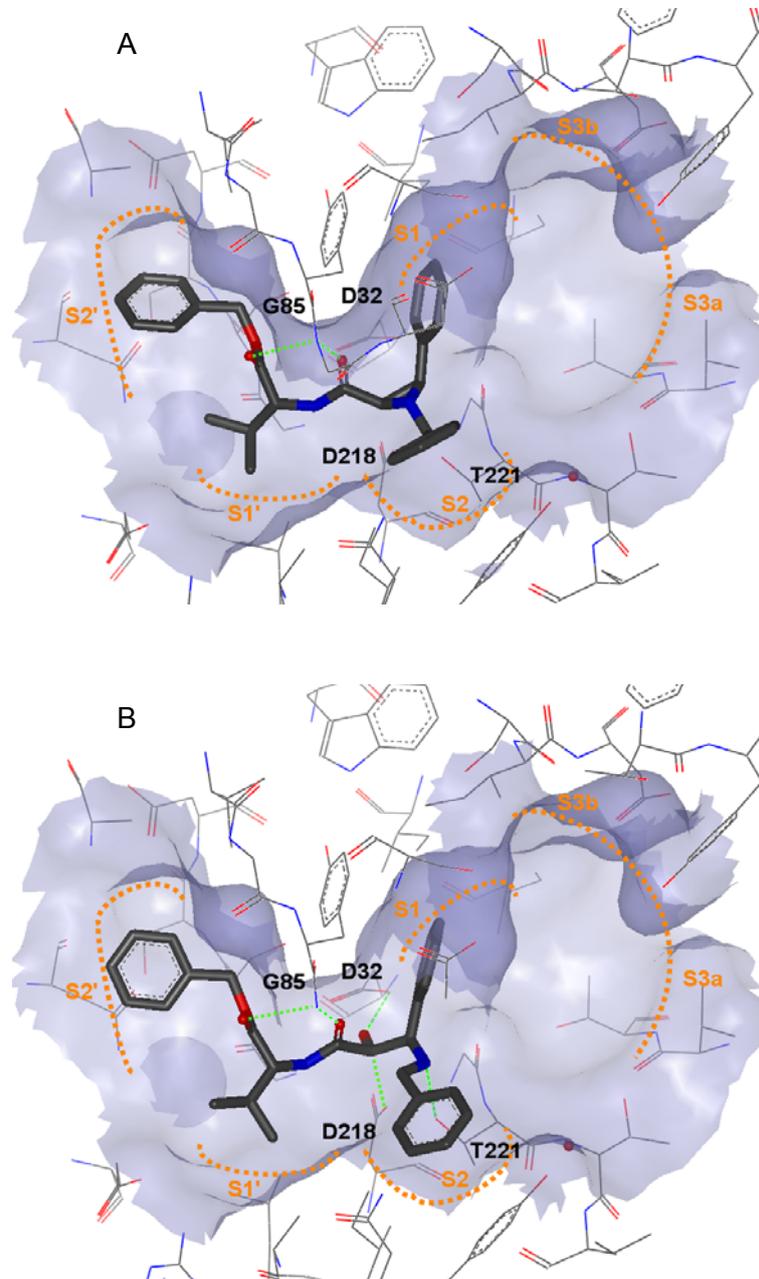


Abbildung 44: Dockingsimulation von A-31 (A) und dem nach Ringöffnung durch Hydrolyse entstandenem Aminoalkohol (B) an SAP2;^[142] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

8 Affinitätsstudien mit Streptavidin-Konjugaten

In einer Kooperation mit *Leippe* und *Gelhaus* (Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel) wurden Bindungsstudien mit dem Biotin-markierten Aziridin **A-75** an *P. falciparum* durchgeführt. Dafür wurde das Aminosäure-verknüpfte *cis*-Aziridin-2-carboxylat **A-32** (Kapitel 3.6, S. 45) über eine Amino-Alkylkette mit Biotin verknüpft. Dies ermöglicht die Bindung an Streptavidin-Konjugate für weiterführende Analysen auf subzellulärer Ebene. Dieses Prinzip ist in Abbildung 46 dargestellt. Der Inhibitor bindet mit seinem elektrophilen Aziridin-„Warhead“ (W) an das Target (T). An die Biotingruppe (B) können nun aufgrund ihrer hohen Affinität zu Streptavidin (S) beispielsweise Konjugate mit Fluorophoren (F) gebunden werden.^[295,296] So kann durch Affinitäts-Fluoreszenz-Mikroskopie das Target im Parasiten visualisiert werden. Die Bindung an eine Streptavidin-Matrix ermöglicht dagegen die Identifizierung von Targetproteinen durch Affinitätschromatographie.^[297]

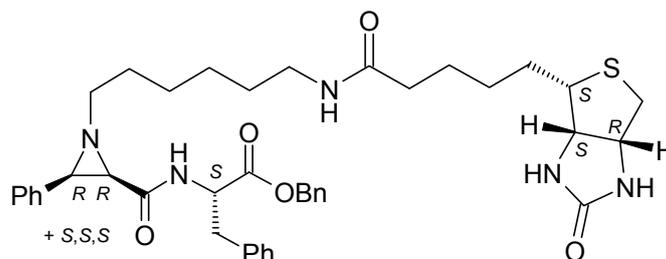


Abbildung 45: Biotin-markiertes Aziridin A-75



Abbildung 46: Bindung eines Streptavidin-Konjugats an einen Biotin-verknüpften Inhibitor; (T) Target; (W) Inhibitor-„Warhead“; (B) Biotin; (S) Streptavidin; (F) Fluorophor

Den Bindungsstudien voraus ging die Untersuchung des Biotin-markierten Aziridins **A-75** bezüglich seines inhibitorischen Effekts auf *P. falciparum*-Zellkulturen (Stamm FCBR). Dafür wurde ein neuartiger Assay angewandt, der auf der fluorimetrischen Messung des DNA-Gehalts einer *P. falciparum*-Zellkultur durch den Einsatz des membranimpermeablen Farbstoffs SYTOX[®] Green basiert.^[298,299] Dabei erzielte **A-75** in den Viabilitätsassays einen IC_{50} -Wert von 3.59 μ M (48 h Inkubation). Damit zeigt das Biotin-markierte Aziridin eine etwas höhere Potenz als sein nicht-biotinyliertes Analogon **A-32** (66.7 % Hemmung bei 10 μ M nach

48 h Inkubation, vgl. Kapitel 5.4.2, S. 71). Folglich war der Inhibitor **A-75** für Affinitätsstudien an *P. falciparum* geeignet.

8.1 Einfluss auf die Morphologie des Parasiten

Zunächst wurden Studien zum Effekt von **A-75** auf die Morphologie des Parasiten durchgeführt. Dafür wurde eine im Trophozoiten-Stadium mit Gelafundin^[300] angereicherte *P.-falciparum*-Zellkultur (60-70 % Parasitämie) mit dem Inhibitor (10 μ M) für 6 h inkubiert. Ein Blutausstrich wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei wurde ein Anschwellen der Nahrungsvakuole beobachtet. Die helle Färbung deutet jedoch darauf hin, dass Hämoglobin durch Falcipaine abgebaut wurde (Abbildung 47,^[301] vgl. auch Abbildung 40, S: 74).

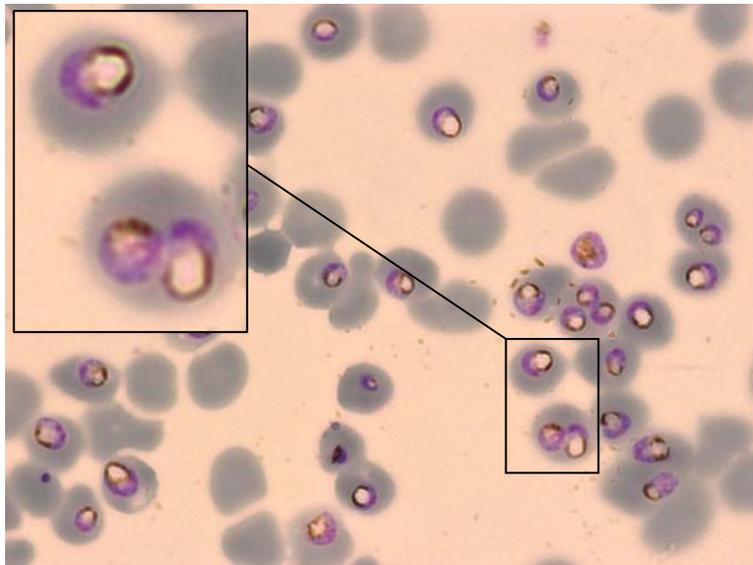


Abbildung 47: Effekt von A-75 auf die Morphologie von *P. falciparum*; Wiedergabe nach Lit. [301] mit Genehmigung von Dr. Christoph Gelhaus, Universität Kiel

8.2 Affinitäts-Fluoreszenz-Markierung

Für die Lokalisierung des intrazellulären Wirkorts von **A-75** wurde erneut eine im Trophozoiten-Stadium angereicherte *P.-falciparum*-Zellkultur unter analogen Bedingungen mit dem Inhibitor (10 μ M, 6 h) inkubiert. Es wurde ein Blutausstrich angefertigt und die Zellen fixiert (Formaldehyd in PBS, 2.5 %, pH 7.2). Anschließend wurde der Objektträger über Nacht bei 4 °C mit einer Streptavidin-DyLightTM549-Konjugat-Lösung (0.2 % in PBS, 5 % BSA, pH 7.2) sowie für die Affinitäts-Fluoreszenz-Markierung 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Hoechst-33258-Lösung (3 μ g/ml in PBS, pH 7.2) inkubiert.^[302] Der Nachweis der Inhibitoren erfolgte über das Streptavidin-DyLightTM549-Konjugat. Der Farbstoff erscheint bei Anregung

unter dem Fluoreszenzmikroskop rot. Die Zellkerne der Parasiten dagegen erscheinen durch Markierung mit dem Farbstoff Hoechst33258 blau. Als Kontrollansatz wurde eine Zellkultur mit Biotin (100 μM) inkubiert.

Die roten Signale in Abbildung 48^[301] zeigen, dass der Inhibitor von den Parasiten aufgenommen wurde. Dies ist bei der Biotin-Kontrollmessung nicht der Fall. Im Cytosol der infizierten Erythrocyten wurde, ebenso wie in nicht-infizierten Blutzellen, kein Inhibitor lokalisiert. Der Inhibitor erscheint homogen im Cytoplasma des Parasiten verteilt. Die nur sehr schwache Markierung im Bereich der Nahrungsvakuole deutet darauf hin, dass der Inhibitor von dieser nicht aufgenommen wurde.

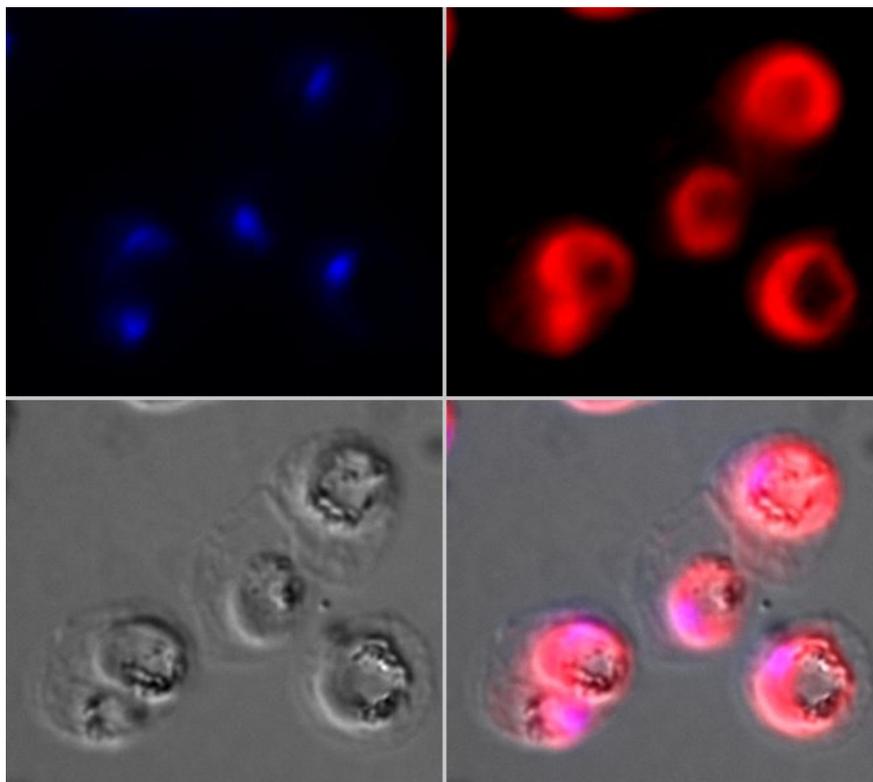


Abbildung 48: Affinitäts-Fluoreszenz-Markierung von A-75 in *P. falciparum*; (A) durch Hoechst33258 markierte DNA (blau); (B) durch DyLightTM549-Streptavidin-Konjugat markierter Inhibitor; (C) Differential-Interference-Contrast-Ansicht; (D) Colokalisation von DNA und Inhibitor Wiedergabe nach Lit. [301] mit Genehmigung von Dr. Christoph Gelhaus, Universität Kiel

8.3 Affinitätschromatographie

Zur Identifizierung der Zielmoleküle, an die der Inhibitor im Parasiten bindet, wurde erneut eine zur Affinitäts-Fluoreszenz-Markierung analoge Zellkultur mit dem Inhibitor (10 μM , 6 h) inkubiert. Wiederum wurde zur Kontrolle eine Zellkultur mit Biotin (100 μM) inkubiert, um unspezifische Markierungen auszuschließen. Die Extrakte wurden mittels Größenausschluss-Chromatographie von überschüssigem Inhibitor gereinigt und anschließend mit Streptavidin-Matrix (*Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles*) inkubiert, um mittels Affinitäts-

chromatographie daraus die Biotin-markierten Proteine zu reinigen. Diese wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert. Auf dem Western-Blot der SDS-Gele wurden mit Hilfe eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats (Proteinmarker *SeeBlue[®] Plus2*) nur die Biotin-markierten Banden sichtbar gemacht. Dabei wurden vor allem plasmodiale Proteine identifiziert (Tabelle 30), darunter Hitzeschockproteine und Proteine des Cytoskeletts sowie Hämoglobin. Die Markierung der plasmodialen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) wurde sowohl im Ansatz mit Inhibitor, als auch in der Biotin-Kontrolle gefunden. In Übereinstimmung mit der Inaktivität von **A-75** an den Aspartatproteasen SAP2 und Cathepsin D konnten mittels Affinitätschromatographie auch die Plasmepepsine und Falcipaine als mutmaßliche Targetenzyme ausgeschlossen werden.

Tabelle 30: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus der Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Säulenmatrix; Identifizierung über NCBI Datenbank, Suchmaschine MASCOT V 2.0

Identifiziertes Protein	bisher in folgenden Spezies identifiziert
heat shock protein 86	<i>Plasmodium falciparum</i>
heat shock 70 kda protein, putative	<i>Plasmodium knowlesi strain H</i>
S-adenosylhomocysteine hydrolase	<i>Plasmodium falciparum</i>
ornithine aminotransferase, putative	<i>Plasmodium knowlesi strain H</i>
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>
GTP-binding nuclear protein	<i>Plasmodium berghei strain ANKA</i>
hemoglobin alpha 1 globin chain	<i>Homo sapiens</i>
sieben weitere, nicht identifizierte Proteine	

8.4 Bindungsstellenanalyse

Um mögliche Bindungsstellen in Aspartatproteasen zu identifizieren und damit Aufschluss über einen möglichen Wirkmechanismus von **A-75** zu erhalten, wurde der potentielle Aspartatprotease-Inhibitor (50 μ M) für 30 min mit 30 μ l Pepsin-Lösung (1 mg/ml, CAPS-Puffer, 20 mM, pH 2.5) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente DMSO (50 μ M). Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die erhaltenen Massenspektren wurden auf Peaks durchsucht, die einem Peptidfragment inklusive dem gebundenen Inhibitor entsprachen. Jedoch konnte keine der vorhergesagten Massen gefunden und daher keine Aussage über die Bindungsstellen getroffen werden.

9 Diskussion

9.1 Struktur-Wirkungsbeziehung an Aspartatproteasen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der literaturbekannten Aziridin-2-carboxylate **A-07** und **A-08**^[142,303] hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität an SAP2. Dafür wurden neue Aziridin-2-carboxylate mit unterschiedlichen Aminosäureresten synthetisiert. Daneben wurden Alkyl-, Aryl- und Acylreste verschiedener Kettenlängen sowie unterschiedlicher Verzweigungen am Aziridinstickstoff eingeführt (vgl. Abbildung 32, S. 27). Dies führte zu 20 neuen SAP2-aktiven Inhibitoren. Zwölf dieser Verbindungen zeigten mit k_{2nd} -Werten von 7880 bis 32534 M⁻¹min⁻¹ zu **A-07** und **A-08** vergleichbare Hemmkonstanten. Für acht Verbindungen wurde eine signifikante Verbesserung der Hemmwirkung beobachtet, die im Folgenden detailliert diskutiert wird.

Aus den Dockingstudien von **A-07** und **A-08** an SAP2 (Abbildung 30, S. 25) ging hervor, dass ein Austausch der (S)- gegen die entsprechende (R)-Aminosäure die hydrophobe Wechselwirkung mit der S1'-Tasche verbessern sollte. Dies wird mit den Analoga **A-28** und **A-31** bestätigt, die um den Faktor sechs erhöhte k_{2nd} -Werte zeigen (Abbildung 49, Tabelle 31). Weiterhin gelang für **A-31** die präparative Anreicherung (**A-31a**, 3:1) bzw. Trennung (**A-31b**) der Diastereomergemische mittels HPLC. Dabei zeigt das Diastereomer **A-31b** die fünffache Aktivität im Vergleich zum angereicherten Diastereomer **A-31a**. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Dockingsimulationen, die für die (R,R)- und (S,S)-konfigurierten Aziridine keine signifikanten Unterschiede im Bindungsmodus vermuten lassen.

Aus den Variationen der Reste am Aziridinstickstoff gingen mit den Cyclohexylmethyl- (**A-43**, **A-45**) und *tert*-Butyl-verknüpften (**A-46**) Analoga zu **A-07** und **A-08** Verbindungen hervor, die zu einer signifikanten Steigerung der Hemmwirkung führen (Abbildung 50, Tabelle 32). Dabei erhöht der Cyclohexylmethylrest am Aziridinstickstoff die Inhibition um den Faktor sieben. Von den *tert*-Butyl-Derivaten zeigt lediglich das Phenylalanin-verknüpfte Aziridin **A-46** eine erhöhte Potenz (Faktor 4). Diese Beobachtung lässt für die *tert*-Butyl-substituierten Aziridine bereits auf einen veränderten Bindungsmodus schließen, bei dem der (S)-Phe-Rest günstigere Wechselwirkungen eingehen kann. Den Cyclohexylmethyl- und *tert*-Butyl-substituierten Aziridinen gemeinsam ist ein Abfall der Hemmwirkung nach Inversion ihrer Aminosäurereste (**A-43**, **A-45**, **A-46** vs. **A-57**, **A-59**, **A-58**). Auch diese Beobachtung kann nicht in Übereinstimmung mit dem ursprünglichen Bindungsmodus stehen, der eine Bevorzugung der (R)-Aminosäuren postuliert.

Neben den Messungen an SAP2 wurden die synthetisierten Verbindungen an Cathepsin D getestet. Dabei zeigten alle Inhibitoren einen deutlich höheren inhibitorischen Effekt gegen

CathD als gegen SAP2. Neben den Prototypen **A-07** und **A-08** führte die Testreihe zu 36 neuen CathD-aktiven Aziridin-2-carboxylaten. Davon zeigen 25 mit k_{2nd} -Werten von 10350 bis 202774 $M^{-1}min^{-1}$ eine vergleichbare Hemmwirkung wie die Ausgangsverbindungen. Im Folgenden werden die Struktur-Wirkungsbeziehungen von elf Verbindungen detailliert diskutiert.

Analog zu den Ergebnissen an SAP2 wird für die (*R*)-Aminosäureanaloga von **A-07** und **A-08** (**A-28**, **A-31**) eine verbesserte Hemmwirkung beobachtet (Faktor 4 bis 7, Tabelle 31). Ebenso zeigt das Diastereomer **A-31b** eine deutlich höhere Aktivität als **A-31a** (Faktor 10).

Die Cyclohexylmethyl-verknüpften Analoga von **A-07** und **A-08** (**A-43**, **A-45**) zeigen kaum eine Steigerung des inhibitorischen Effekts an CathD (Tabelle 32). Dagegen führt das *tert*-Butyl-verknüpfte Analogon von **A-07** (**A-46**) zu einer Steigerung der Hemmung um den Faktor 12. Weiterhin werden für diese 1-Alkylaziridine nach Inversion der Aminosäurereste Verbesserungen der inhibitorischen Potenz um den Faktor 2 bis 10 beobachtet. Werden bei den 1-Alkylaziridinen von SAP2 noch die (*S*)-Aminosäurereste bevorzugt, so bewirkt bei **A-57**, **A-58** und **A-59** die (*R*)-Konfiguration der Aminosäure eine deutliche Affinitätssteigerung an CathD. Dabei werden für **A-58** und **A-59** K_i -Werte im nanomolaren Bereich erzielt.

Die Alkyl-substituierten Aziridine der Reihe **A-76a** bis **A-87** waren im Screening an SAP2 nicht aktiv. Diese Verbindungen mit verzweigten Alkylketten unterschiedlichster Stereochemie zeigen dagegen Aktivität an CathD. Dabei ragen die (*R*)-Valin-verknüpften Verbindungen **A-81**, **A-82** und **A-85** heraus, die K_i -Werte von 0.81 bis 5.28 μM erreichen (Abbildung 51, Tabelle 33). Im Gegensatz zu den anderen CathD-aktiven Verbindungen korreliert diese Hemmung nicht mit einer Aktivität an SAP2.

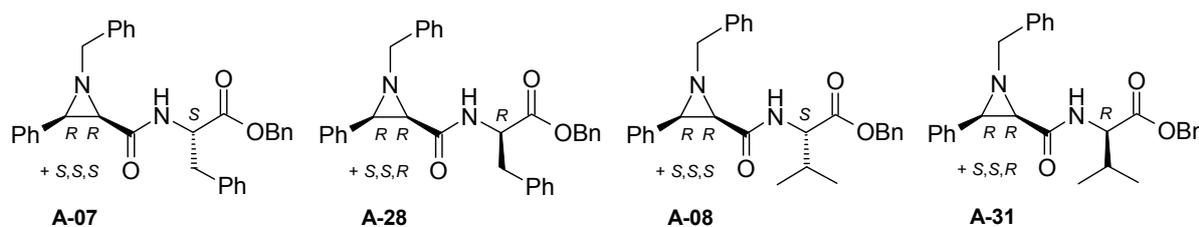


Abbildung 49: (*R*)-Aminosäureanaloga von **A-07** und **A-08**

Tabelle 31: Gegenüberstellung der k_{2nd} -Werte der (*R*)-Aminosäureanaloga von **A-07** und **A-08** an SAP2 und Cathepsin D

	SAP2		CathD	
	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-07	9265 \pm 811		34770 \pm 6241	0.24 / 6.84
A-28	60608 \pm 1549		260663 \pm 1020	1.17 / 4.48
A-08	14386 \pm 417		84215 \pm 250	
A-31	86411 \pm 9915		358848 \pm 24726	0.72 / 2.00
A-31a	30589 \pm 2498		49582 \pm 1755	
A-31b	165855 \pm 7	0.43 / 2.61	467291 \pm 86259	0.51 / 1.10

Zusammenfassend bestätigen die Messungen an SAP2 und CathD jeweils die aus den Dockingstudien an SAP2 postulierten Annahmen, dass eine Inversion der Konfiguration der Aminosäurereste von **A-07** und **A-08** zu einer Verbesserung der Hemmwirkung führt. Diese Korrelation findet sich auch bei den Cyclohexylmethyl- und *tert*-Butyl-verknüpften Aziridinen für die Hemmung an CathD. An SAP2 führt die Inversion der Aminosäuren für diese Verbindungen dagegen zu einem Verlust an Aktivität. Weiterhin widerlegen übereinstimmend für SAP2 und CathD die signifikant unterschiedlichen Hemmkonstanten der getrennten Diastereomere die Theorie des äquivalenten Bindungsmodus der (*R,R*)- und (*S,S*)-konfigurierten Inhibitoren. Allerdings müssen solche Aussagen bezüglich der Dockingstudien mit Vorsicht formuliert werden, da bei Aspartatproteasen des Clans AA (Familien A1 & A2) die Bindungstasche oft von flexiblen Schleifen überlagert ist.^[191] Daher sind für genaue Aussagen über den Bindungsmodus nur die jeweiligen Kristallstrukturen der Enzym-Inhibitor-Komplexe aussagekräftig.

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse überrascht die Inaktivität der Alkyl-substituierten Aziridine der Reihe **A-76a** bis **A-87** an SAP2, da bislang eine CathD-Hemmung immer mit einer SAP2-Hemmung korrelierte. Diese Ergebnisse müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Wie in Kapitel 5.6 (S. 77) beschrieben, weisen die Aziridine eine Proteinbindung von 24 bis 49 % auf. In Anwesenheit von BSA sinkt ihre Aktivität (Diagramm 10, S. 78). Die Hemmdaten der mit verzweigten Alkylketten substituierten Aziridine wurden mit einer neuen Charge SAP2 erhalten. Die Anzucht von *C. albicans* zur Gewinnung der SAP2 erfolgt in BSA-Medium, das normalerweise zum Zeitpunkt der Entnahme des Überstandes laut SDS-PAGE-Analyse vollständig verbraucht ist. Möglicherweise war dies bei der verwendeten Charge jedoch nicht der Fall, sodass in der Enzymlösung noch eine gewisse Restkonzentration an BSA enthalten war. Dafür spricht auch, dass an dieser neuen Charge frühere Inhibitoren ebenfalls nicht mehr die volle Aktivität zeigten.

Zusammen mit der eben beschriebenen SAP2-Charge wurden auch die Isoenzyme SAP1, 3 & 8 zu Verfügung gestellt. Da diese Enzyme analog gewonnen wurden, ist durchaus denkbar, dass die Inhibitoren durch mögliche Restproteine abgefangen werden und damit keine Aktivität im Screening zeigen können. Deshalb bedarf es auch hier einer Bestätigung der Hemmdaten an einer neuen Charge der Isoenzyme. Somit bleibt vorerst unklar, ob die synthetisierten Aziridin-2-carboxylate selektiv nur SAP2 oder auch deren Isoenzyme 1, 3 & 8 hemmen.

Die Analyse der absoluten Konfiguration der einzelnen Diastereomere am Aziridinring erfolgt derzeit im AK *Bringmann* mittels HPLC-CD-Spektroskopie. Endgültige Ergebnisse lagen zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit allerdings noch nicht vor.

9.2 Pseudo-irreversible Hemmung

In Kapitel 6.2 (S. 81) wurde die Aufklärung des pseudo-irreversiblen Hemmmechanismus der Aziridin-2-carboxylate an SAP2 und CathD beschrieben. Die Dockingsimulationen an **A-31** und dem korrespondierenden Aminoalkohol schlagen dabei einen analogen Bindungsmodus für den intakten Inhibitor und sein Hydrolyseprodukt vor. Die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung der neuen Derivate hat jedoch Widersprüche zu den Dockingergebnissen aufgezeigt (Kapitel 9.1). Daher muss für diese Verbindungen von einem abweichenden Bindungsmodus ausgegangen werden, der sich dann auch auf den jeweilig korrespondierenden Aminoalkohol auswirken sollte. Dockingstudien der potentesten Inhibitoren an SAP2 und CathD sollten weitere Erkenntnisse über den Bindungsmodus geben. Ferner bleibt unklar, an welchem der beiden Aziridinkohlenstoffatome die Aspartatprotease angreift. Durch die als Diastereomere eingetzten Inhibitoren sind vier Isomere des Aminoalkohols denkbar. In parallelen Arbeiten im AK *Schirmeister* wurde der erste der möglichen Aminoalkohole von **A-31** synthetisiert. Durch Probleme bei der Aufreinigung konnten dafür allerdings noch keine zuverlässigen Hemmdaten erhalten werden.

Ein Projekt mit *Klebe* soll durch Co-Kristallisation eines Inhibitors mit SAP2 weiteren Aufschluss über den Bindungsmodus geben. Möglicherweise kann so auch eine Kristallstruktur des Aminoalkohols erhalten und der postulierte Hemmmechanismus bestätigt werden.

9.3 Selektivitätsstudien an Cystein- und Serinproteasen

In Selektivitätsstudien (Kapitel 4.4, S. 64) wurden die synthetisierten Aziridin-2-carboxylate an Cystein- und Serinproteasen getestet. Wie erwartet zeigen die Verbindungen mit Ausnahme von **A-65** keine Aktivität an SARS-CoV-PL^{pro} sowie Falcipain 2 & 3. Der mit zwei (*R*)-Phe-OBn-Resten ausgestattete Inhibitor hemmt Falcipain 2 ($K_i = 2.79 \mu\text{M}$) selektiv gegenüber SAP2 und CathD (53 bzw. 58 % Hemmung bei 100 μM) und wurde im Weiteren nicht detailliert untersucht.

Überraschenderweise zeigen die stichprobenartig ausgewählten Aziridin-2-carboxylate im Screening an Rhodesain moderate Aktivität. Die im Vergleich zu irreversiblen Inhibitoren inverse Zeitabhängigkeit der IC_{50} -Werte führte zusammen mit LC-MS-Studien zur Aufklärung des Hemmmechanismus. Dabei wird der Inhibitor von Rhodesain an der Amidbindung gespalten (Abbildung 43, S. 86). Diese Art der temporären Enzymhemmung wird als „alternative Substrathemmung“ bezeichnet. Die resultierenden Spaltprodukte zeigen keine Inhibitoreigenschaften, wodurch die steigenden IC_{50} -Werte mit der Inkubationszeit erklärbar sind. Der Inhibitor verdrängt zunächst das Substrat vom Enzym. Nach erfolgter Inhibitorspaltung regeneriert sich das Enzym und kann wieder Substrat hydrolysieren.

Bei den Serinproteasen steht einer geringen, vernachlässigbaren Aktivität an Trypsin im Screening ausgewählter Aziridin-Inhibitoren eine relevante Hemmung an Chymotrypsin gegenüber. IC_{50} -Werte nach verschiedenen Inkubationszeiten zeigen eine nicht-zeitabhängige Hemmung von Chymotrypsin (Tabelle 20, S. 68). In Übereinstimmung mit der LC-MS-Analyse, die keine Inhibitorspaltung aufzeigt, kann die Trypsin- und Chymotrypsinhemmung als reversibel eingestuft werden.

Während Trypsin für die S1-Tasche basische Aminosäuren wie Arginin bevorzugt, besitzt Chymotrypsin eine Substratspezifität für aromatische und sperrige Aminosäuren, wie Phe, Tyr, Leu oder Met.^[304] Dies kann eine Begründung für die Affinität der Aziridin-2-carboxylate zu Chymotrypsin sein.

Eine grundsätzliche Steigerung der Selektivität und Affinität der Inhibitoren an SAP2 sollte durch die Adressierung der S3b-Tasche erreicht werden. Dafür scheinen die bislang durchgeführten Substitutionen am Aziridinstickstoff aber noch nicht auszureichen. Eine Tendenz zur Erhöhung der Hemmwirkung scheint durch Alkylsubstitution möglich. Die Einführung von Aminosäuren oder Piperidinresten führte dagegen zu einem Abfall der Enzymaffinität.

9.4 Hemmung von Mikroorganismen

In Kapitel 5.4.2 (S. 71) wurde für die antiplasmodial aktiven Aziridin-2-carboxylate ein Zusammenhang mit einer Falcipainhemmung ausgeschlossen. Einen Hinweis auf die Ursache der Wachstumshemmung von *P. falciparum* könnten die Aziridine **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63** liefern. Sie alle tragen am Aziridinstickstoff einen Piperidinrest (Abbildung 52). Da 4-Aminopiperidine als potente Inhibitoren der Plasmeptine I, II & IV gelten,^[130] könnte die Hemmung von *P. falciparum* mit einer Plasmeptinhemmung korrelieren. Zwar sind die Aziridin-2-carboxylate **A-07** und **A-08** inaktiv an Plasmeptin II,^[142] aufgrund der Piperidin-Struktureinheit und der Inaktivität an SAP2 und CathD könnten **A-60** bis **A-63** aber als potentiell selektive Plasmeptininhibitoren wirken und damit auch den antiplasmodialen Effekt auslösen. Ebenso kann allgemeine Cytotoxizität der getesteten Verbindungen als Grund für die Hemmung der Parasiten ausgeschlossen werden (Tabelle 25, S. 76). Testungen ausgewählter Aziridine an verschiedenen Plasmeptinen werden gegenwärtig in der Arbeitsgruppe von *Dunn* (University of Florida) durchgeführt.

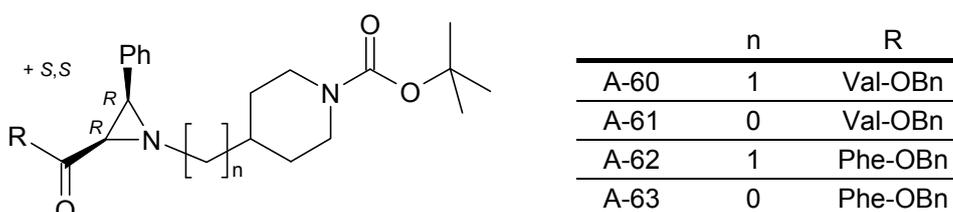


Abbildung 52: Piperidin-Aziridine **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63**

Weiterhin wurden die synthetisierten Substanzen an Trypanosomen und Leishmanien getestet. Dabei korreliert die antitrypanosomale Aktivität ($IC_{50} \approx 20\text{-}30 \mu\text{M}$) zumeist mit einer Cytotoxizität an Makrophagen ($IC_{50} \approx 20\text{-}40 \mu\text{M}$, Tabelle 25, S. 76). Leishmanien werden gleichermaßen gehemmt ($IC_{50} \approx 30\text{-}50 \mu\text{M}$). Einige Verbindungen zeigen jedoch eine deutlich erhöhte Aktivität an Trypanosomen (Tabelle 34), die nicht mehr ausschließlich auf toxische Effekte zurückzuführen ist. Darunter finden sich erneut die antiplasmodialen Verbindungen **A-60** bis **A-63** sowie das selektiv Falcipain-2-aktive **A-65**. Mit **A-57**, einem der besseren CathD-Inhibitoren, den invers Aminosäure-verknüpften **A-88** & **A-89** sowie dem Piperazin **Cy-02** finden sich weitere antitrypanosomale Verbindungen, die bis in den dreistelligen nanomolaren Bereich hemmen. Die antiparasitäre Wirkung übertrifft die Toxizität an Makrophagen dabei um Faktoren von 10 bis 75 und könnte mit einer Hemmung von Rhodesain korrelieren. Allerdings stehen diese Testungen am Enzym noch aus.

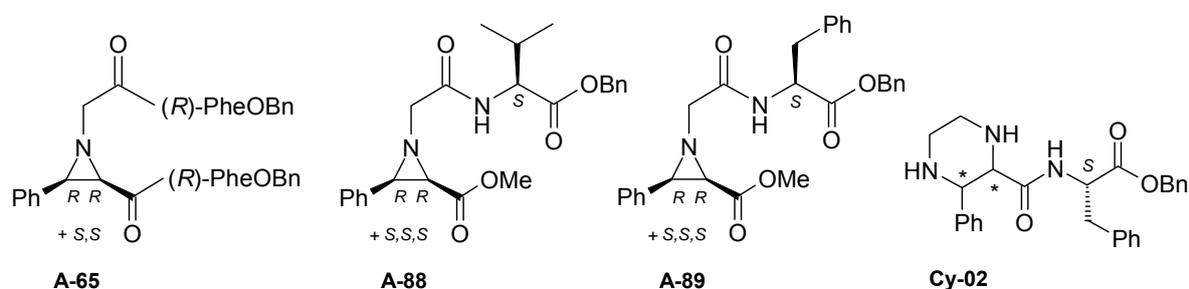


Abbildung 53: Antitrypanosomale Verbindungen

Tabelle 34: Antitrypanosomale Verbindungen und ihre Aktivität gegen Leishmanien sowie die Cytotoxizität an Makrophagen

	<i>T. brucei brucei</i>		<i>L. major</i>	Makrophagen
	IC_{50} [μM] (48 h)	IC_{50} [μM] (72 h)	IC_{50} [μM] (48 h)	IC_{50} [μM] (48 h)
A-60	3.24 ± 0.20	3.31 ± 0.08	29.7	35.2
A-61	2.89 ± 0.23	3.20 ± 0.12	19.2	23.8
A-62	3.36 ± 0.16	3.29 ± 0.08	39.1	41.7
A-63	3.19 ± 0.21	3.36 ± 0.02	24.5	34.8
A-65	2.98 ± 0.11	3.25 ± 0.10	> 100	> 100
A-88	2.06 ± 0.24	3.05 ± 0.22	> 100	53.2
A-89	0.62 ± 0.12	0.79 ± 0.22	61.5	48.3
Cy-02	0.69 ± 0.19	0.70 ± 0.13	53.1	54.5

Die Ergebnisse an den *C.-albicans*-Zellkulturen wurden bereits im Rahmen der Proteinbindungsbestimmung (Kapitel 5.6, S. 77) diskutiert.

9.5 Nebenprojekte

Das Aziridin-verknüpfte Guanidiniocarbonylpyrrol **A-48** zeigt nicht die in Dockingstudien postulierte inhibitorische Wirkung, die durch eine Adressierung des SAP-spezifischen Asp86-Rests zustande kommen sollte. Parallel dazu stellte sich das mit einer Boc-Gruppe geschützte Guanidiniocarbonylpyrrol **BocGu-03** aus früheren Arbeiten als Leitstruktur für eine neue Klasse von Falcipaininhibitoren mit antiplasmodialer Aktivität heraus, die von *Schmuck* weiterentwickelt werden.^[305,306] Analog zeigt **BocA-48**, das mit einer Boc-Gruppe geschützte Derivat von **A-48**, Aktivität an Falcipain 2 und an Plasmodien. (Tabelle 35) Allerdings konnte die mikroskopische Untersuchung der Morphologie von *P. falciparum* keinen Zusammenhang zwischen der antiplasmodialen Wirkung und der Falcipainhemmung nachweisen.

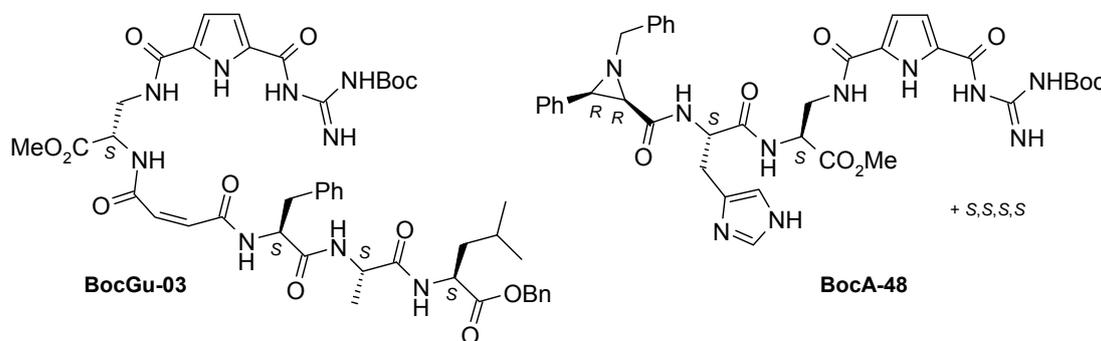


Abbildung 54: BocGu-03 als Leitstruktur für eine neue Klasse von Falcipaininhibitoren mit dem Aziridin-verknüpften Vertreter BocA-48

Tabelle 35: Geschützte Guanidiniocarbonylpyrrole als Falcipaininhibitoren

	Falcipain 2 K_i [μM]	Falcipain 3 K_i [μM]	<i>P. falciparum</i> IC_{50} [μM]
BocGu-03	0.78	2.97	1.7
BocA-48	8.22	n.i.	2.85

Die Synthese des Biotin-verknüpften Aziridin-2-carboxylats **A-75** ermöglichte durch Bindung an Streptavidin-Konjugate eine subzelluläre Analyse des Einflusses des Inhibitors auf die Morphologie von *P. falciparum*. Ein mutmaßliches Zielenzym konnte dabei jedoch nicht identifiziert werden. Der Inhibitor findet sich im Cytosol des Parasiten wieder. Aufschluss über den Wirkmechanismus konnte nicht erhalten werden.^[301] Weiterhin erfährt die Nahrungsvakuole des Parasiten durch **A-75** eine atypische Verformung.

Das olefinische Pepstatinanalogon **E-OI-28** zeigte keine Aktivität an Aspartatproteasen. Somit geht das Michael-System nicht die gewünschte irreversible Reaktion mit dem Enzym ein. Auch die Peptidsequenz scheint für eine reversible Hemmung an Aspartatproteasen ungeeignet zu sein. Überraschenderweise zeigte sich der Inhibitor mit einem K_i -Wert von 9.66 μM

moderat aktiv an Falcipain 2.

Die als Komplementär-Inhibitoren zu früheren Arbeiten synthetisierten Olefine zeigten kaum Aktivität an Falcipain und Rhodesain.^[185] An **E-OI-23** wurde gezeigt, dass die Einführung einer Trityl-Gruppe speziell bei Asparagin- und Glutamin-substituierten Fumarsäurederivaten zu einer Steigerung der Aktivität an Falcipain 2 und Plasmodien führt. Die freie Carbonsäure in **E-OI-26** und die *Z*-Konfiguration in **Z-OI-23** erwiesen sich dagegen im Vergleich zu entsprechenden Analoga als nachteilig für die inhibitorische Wirkung.

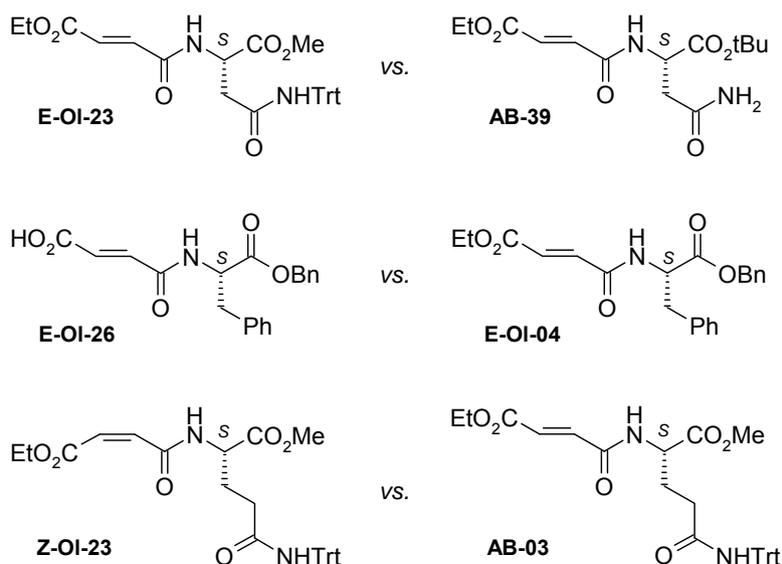


Abbildung 55: Gegenüberstellung komplementärer olefinischer Inhibitoren

Tabelle 36: Gegenüberstellung der Hemmkonstanten komplementärer olefinischer Inhibitoren

<i>K_i</i> [μM]	<i>K_i</i> [μM]			<i>I</i> C ₅₀ [μM]	
	FP2	FP3	Rhodesain	<i>P. falc.</i>	<i>T. br. br.</i>
E-OI-23	12.1	n.i.	n.i.	7.3	25.1
AB-39	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
E-OI-26	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
E-OI-04	4.7	65.9	7.6	n.i.	0.25
Z-OI-23	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	25.5
AB-03	3.3	14.7	1.4	4.7	31.0

10 Zusammenfassung

Candida albicans gehört zu den für den Menschen fakultativ pathogenen Hefepilzen. Der normalerweise harmlose Begleiter der humanen Mikroflora findet sich hauptsächlich auf Schleimhäuten der Mundhöhle und des Magen-Darm-Trakt sowie in der vaginalen Flora. Menschen, deren Immunsystem aufgrund von Krankheiten oder Operationen geschwächt ist, sind jedoch besonders anfällig für Infektionen, die durch den Pilz hervorgerufen werden können. Neben oberflächlichen kann es dabei auch zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen kommen, die nicht selten zum Tod des Patienten führen.

Durch ein zunehmendes Auftreten von Resistenzen gegen gebräuchliche Pharmaka besteht aktuell ein dringender Bedarf an neuen Wirkstoffen gegen *Candida*. Die zehn vom Hefepilz exprimierte sekretorische Aspartatproteasen (SAP1-10), die als wichtige Virulenzfaktoren gelten, stellten sich dabei zunehmend als vielversprechende Targets heraus.

Das Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der literaturbekannten *cis*-konfigurierten 3-Phenylaziridin-2-carboxylate **A-07** und **A-08** als irreversible Inhibitoren der SAP-Isoenzyme. Die Variation der Substituenten am Aziridinstickstoff für die Adressierung der S3-Tasche im Enzym erfolgte durch Alkyl-, Aryl- und Acylreste (Abbildung 57). Die Aminosäureester wurden in Konfiguration und Art der Seitenkette modifiziert, um eine Verbesserung der Anpassung an die S1'-Tasche zu ermöglichen.

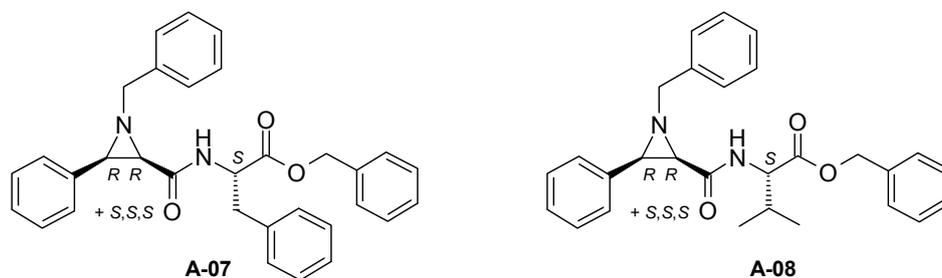
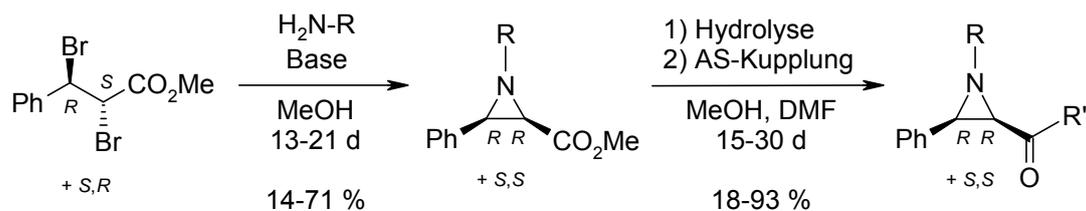


Abbildung 56: 3-Phenylaziridin-2-carboxylate als irreversible Inhibitoren der SAP2 von *C. albicans*

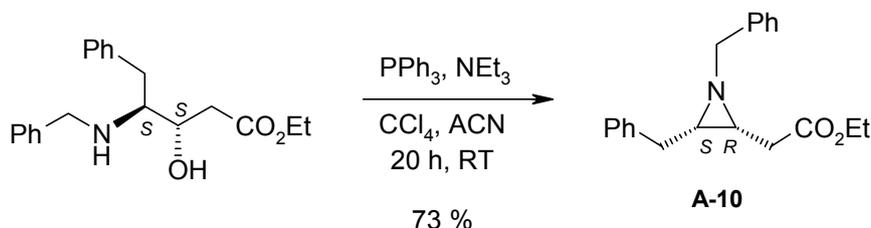


Abbildung 57: Schematischer Aufbau der synthetisierten *cis*-3-Phenylaziridin-2-carboxylate

Die *cis*-3-Phenylaziridin-2-carboxylate wurden durch Cromwell-Synthese als Racemate erhalten (Schema 38). Aminosäure- und Peptidkupplungen erfolgten mit gängigen Kupplungsreagenzien (PPA, DPPA). Die stereoselektive Synthese des methylenverbrückten Aziridin-2-carboxylats **A-10** erfolgte durch Redoxkondensation nach *Mukaiyama* (Schema 39).



Schema 38: Cromwell-Synthese mit anschließender Aminosäurekupplung



Schema 39: Redoxkondensation nach Mukaiyama

Die synthetisierten Verbindungen wurden in einem fluorimetrischen FRET-Assay auf ihre inhibitorische Wirkung gegen SAP2 getestet. Dabei war das im FRET-Assay bislang an SAP2 verwendete Substrat Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH auch für Testungen an SAP1, 3 & 8 sowie Cathepsin D geeignet. Neben den jeweiligen K_m -Werten konnten für diese Enzyme auch die zugehörigen k_{cat} -Werte bestimmt werden. Zur Bestimmung der Hemmkonstanten wurde für die aktiven Verbindungen ein Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson durchgeführt. 20 der 46 Aziridin-2-carboxylate erreichten an SAP2 k_{2nd} -Werte von mindestens $7880 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Die mit k_{2nd} -Werten von 60608 bis $118582 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ potentesten Verbindungen wurden durch (*R*)-Aminosäuresubstitution (**A-28**, **A-31**) bzw. durch Cyclohexylmethyl-Verknüpfung am Aziridinstickstoff (**A-43**, **A-45**) erhalten. Für die einzelnen Diastereomere von **A-31**, **A-31a** und **A-31b**, wurde eine signifikant unterschiedliche Hemmwirkung festgestellt.

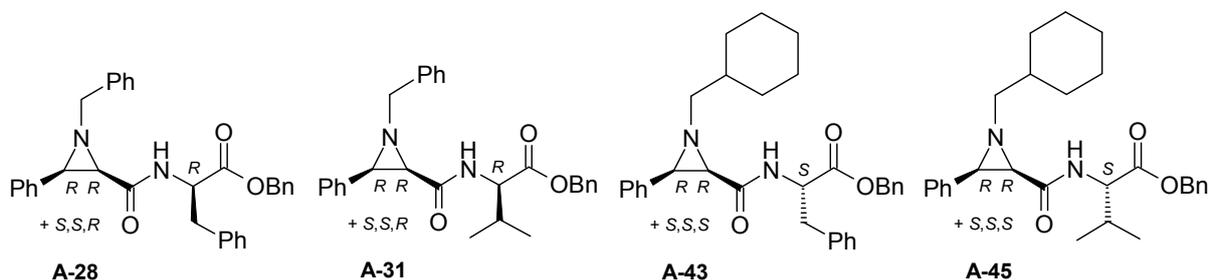


Abbildung 58: Übersicht der aktivsten SAP2-Inhibitoren

Tabelle 37: Hemmkonstanten der aktivsten SAP2-Inhibitoren

SAP2	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-28	60608 ± 1549	
A-31	86411 ± 9915	
A-31a	30589 ± 2498	
A-31b	165855 ± 7	0.43 / 2.61
A-43	70343 ± 6	1.01 / 14.4
A-45	118582 ± 14778	0.93 / 7.87

Die Inhibitoren zeigten eine zeitabhängige Hemmung, die nach ca. 30 min Inkubationszeit jedoch wieder schwächer wurde. LC-MS- und NMR-Studien lassen einen pseudo-irreversiblen Hemmmechanismus vermuten: Der Inhibitor bindet zunächst irreversibel unter Ringöffnung des Aziridins an das Enzym. Der entstehende Ester wird danach unter den sauren Assaybedingungen wieder hydrolysiert. Der resultierende Aminoalkohol bindet anschließend als Übergangszustandsanalogon reversibel an das Enzym.

Selektivitätsstudien an Cathepsin D zeigten für 36 der 46 Aziridin-2-carboxylate k_{2nd} -Werte von 10350 bis 936544 $M^{-1}min^{-1}$. Damit sind die Verbindungen an CathD aktiver als an SAP2. Die 1-Cyclohexylmethyl-verknüpften Aziridine wiesen auch an CathD die höchsten k_{2nd} -Werte auf, wenngleich sich dabei die (*R*)-Konfiguration der Aminosäurereste (**A-57**, **A-59**) als die aktivere Variante herausstellte. Mit dem (*R*)-Phe-substituierten 1-*tert*-Butylaziridin **A-58** erreichte der potenteste Vertreter der Reihe bereits einen K_i -Wert im dreistelligen nanomolaren Bereich. Ebenso wurden für die (*R*)-Aminosäure-Analoga von **A-07** und **A-08** (**A-28**, **A-31**) erhöhte Hemmkonstanten erhalten. Wie SAP2 wird auch CathD durch die (an)getrennten Diastereomere **A-31a** und **A-31b** signifikant unterschiedlich stark inhibiert. Mit den (*R*)-Valin-verknüpften Aziridinen **A-81**, **A-82** und **A-85** fanden sich aktive verzweigt-Alkyl-substituierte CathD-Inhibitoren.

Tabelle 38: Hemmkonstanten der aktivsten CathD-Inhibitoren

CathD	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-28	260663 ± 1020	1.17 / 4.48
A-31	358848 ± 24726	0.72 / 2.00
A-31a	49582 ± 1755	
A-31b	467291 ± 86259	0.51 / 1.10
A-57	469857 ± 47579	0.55 / 1.17
A-58	936544 ± 116053	0.70 / 0.75
A-59	923564 ± 156012	0.55 / 0.60
A-81	209364 ± 5405	1.11 / 5.28
A-82	478408 ± 37889	0.58 / 1.21
A-85	688607 ± 4515	0.56 / 0.81

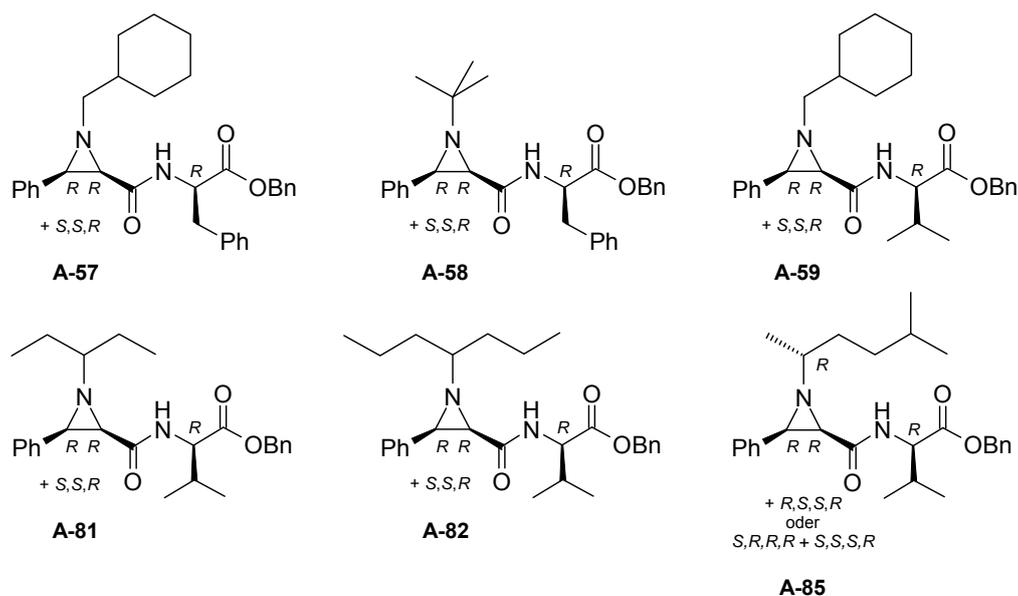
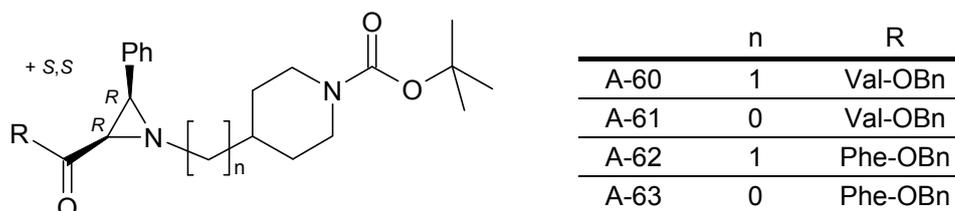


Abbildung 59: Übersicht der aktivsten CathD-Inhibitoren

In weiteren Selektivitätsstudien an Cysteinproteasen erwiesen sich die Aziridin-2-carboxylate als inaktiv gegenüber SARS-CoV-PL^{pro} sowie Falcipain 2 & 3. Dagegen wird Rhodesain im Vergleich zur irreversiblen Hemmung, die an SAP2 und CathD beobachtet wurde, invertzeitabhängig gehemmt. Durch LC-MS-Studien konnte der Mechanismus als „alternative Substrathemmung“ aufgeklärt werden. Der Inhibitor wird von Rhodesain an der Amidbindung gespalten, wodurch das Enzym temporär blockiert wird. An der Serinprotease Trypsin zeigten die Aziridin-2-carboxylate eine geringe Aktivität. Dagegen wird Chymotrypsin, das für seine S1-Tasche aromatische und sperrige Aminosäuren wie Phe, Tyr, Leu oder Met bevorzugt, reversibel mit IC_{50} -Werten im mittleren zweistelligen mikromolaren Bereich gehemmt. Testungen zur Wachstumshemmung von *Plasmodium falciparum* erbrachten zwölf aktive Verbindungen mit IC_{50} -Werten von 2.85 bis 11.8 μ M. Dabei wurden Selektivitätsindizes von 3 bis 35 gegenüber einer toxischen Wirkung an Makrophagen erreicht. Die Piperidin-verknüpften Aziridine **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63** hemmen dabei nur Plasmodien. SAP2 und CathD wurden nicht inhibiert.

Abbildung 60: Antiplasmodiale Piperidin-Aziridine **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63**

An Leishmanien zeigten die Verbindungen keine Aktivität, die nicht auf toxische Effekte zurückzuführen wäre ($IC_{50} \approx 30$ - 50μ M). Dagegen werden Trypanosomen mit IC_{50} -Werten von 0.62 bis 3.36 μ M gehemmt. Die aktivsten dieser Verbindungen weisen Selektivitätsindizes

von 10 bis 75 auf. Unter diesen antitrypanosomalen Wirkstoffen finden sich die antiplasmodial aktiven Verbindungen **A-60** bis **A-63**, der selektive Falcipain-2-Inhibitor **A-65**, einer der besseren CathD-Inhibitoren, **A-57**, sowie die Aminosäure-verknüpften **A-88** & **A-89** und das Piperazin **Cy-02**.

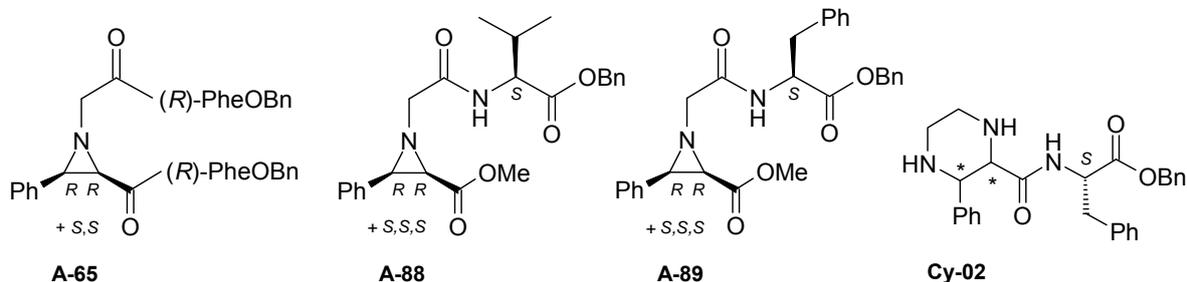


Abbildung 61: Antitrypanosomale Verbindungen

Testungen an *Candida-albicans*-Zellkulturen verliefen dagegen selbst bei SAP2-aktiven Verbindungen negativ. Dies kann auf die Neigung der Aziridin-2-carboxylate zur Proteinbindung zurückgeführt werden. Da BSA für das Wachstum der Zellkulturen essentiell ist, konnten so bislang keine verlässlichen Werte ermittelt werden.

In einem Nebenprojekt wurde das Pepstatinanalogen **E-OI-28** synthetisiert, das an Aspartatproteasen keine, an Falcipain 2 jedoch geringe Aktivität zeigte ($K_i = 9.66 \mu\text{M}$).

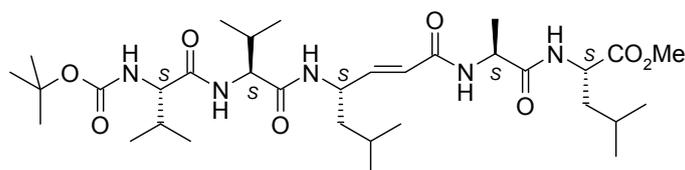


Abbildung 62: Pepstatinanalogen E-OI-28

Durch die Synthese des Aziridin-verknüpften Guanidiniocarbonylpyrrols **A-48** sollte der SAP-spezifische Asp86-Rest adressiert werden. Die Verbindung zeigte jedoch keine Aktivität. Allerdings reiht sich das mit einer Boc-Gruppe geschützte Derivat **BocA-48** in eine neue Klasse von Falcipaininhibitoren mit antiplasmodialer Aktivität, die von *Schmuck* weiterentwickelt werden, ein.

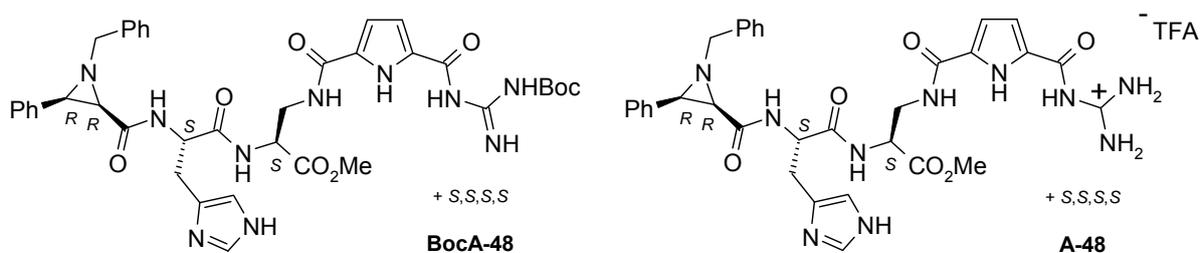


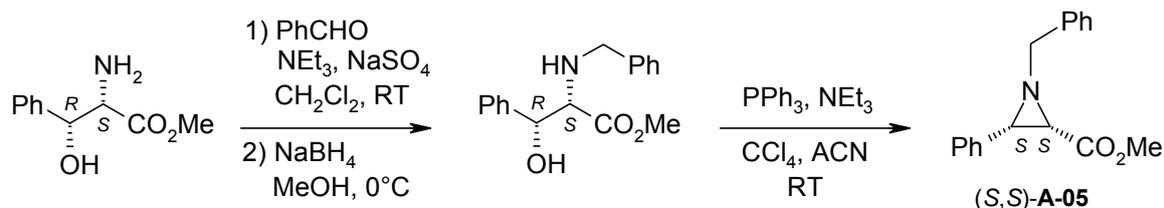
Abbildung 63: Guanidin(i)carbonylpyrrole A-48 & BocA-48

11 Ausblick

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen leiten sich potentielle neue Projekte ab, in denen die weiterhin offenen bzw. neuen Fragestellungen bearbeitet werden könnten.

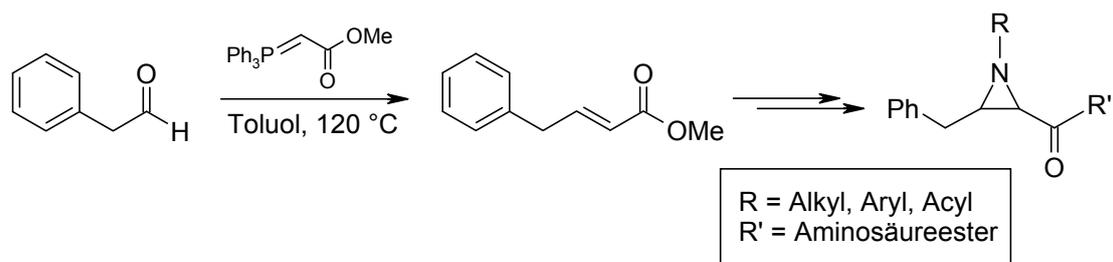
Allen voran steht die Analyse der absoluten Konfigurationen der einzelnen Diastereomere am Aziridinring aus, die derzeit in der Arbeitsgruppe *Bringmann* mittels HPLC-CD-Spektroskopie durchgeführt wird. Mit diesen Daten können u.a. die absoluten Konfigurationen der Stereozentren der mittels HPLC (an)getrennten Diastereomere der Verbindung **A-31** aufgeklärt werden. Ebenso können dann die Konfigurationen der enantiomerenrein synthetisierten Aziridine **A-26** und **A-27** sowie der daraus abgeleiteten Verbindungen **A-36** bis **A-39** bestimmt werden.

Da die bei der Aminosäureverknüpfung erhaltenen Diastereomeregemische mittels präparativer HPLC nur mit mäßiger Ausbeute getrennt werden konnten, sollten von den aktivsten Verbindungsgemischen die einzelnen Diastereomere stereoselektiv synthetisiert werden. Dies wäre durch Redoxkondensation nach *Mukaiyama* möglich. Ausgehend von (*R,S*)- oder (*S,R*)-3-Phenylserinmethylester könnten durch reduktive Aminierung und anschließende Redoxkondensation (vgl. Schema 11, S. 34) die *cis*-konfigurierten Aziridin-Grundbausteine selektiv in (*S,S*)- oder (*R,R*)-Konfiguration erhalten werden (Schema 40). Der Rest am Aziridinstickstoff kann dabei durch die Wahl des Aldehyden variiert werden. Die Synthese der Inhibitoren erfolgt dann durch Aminosäureverknüpfung analog Schema 12 (S. 34).



Schema 40: Stereoselektive Synthese von Aziridin-2-carboxylaten

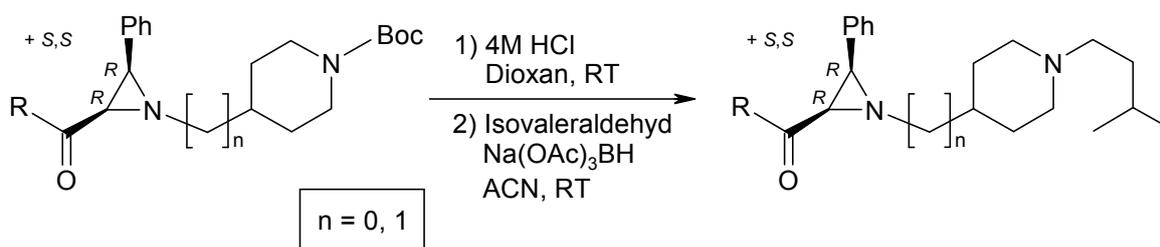
Der Versuch, das methylenverbrückte Aziridin **A-10** alkalisch zu hydrolysieren, führte durch intramolekularen Ringschluss zum Lacton **Cy-01** (vgl. Schema 29, S. 46). Die Bildung des Fünfrings wird durch die Methylenbrücke in 2-Position möglich. Verzichtet man auf diese, wäre die Insertion einer Methylenbrücke in 3-Position durch Wittig-Reaktion von Phenylacetaldehyd mit Methyl-(triphenylphosphoranylidene)-Acetat denkbar.^[307] Das resultierende Olefin könnte *via* Cromwell-Synthese zum Aziridin geschlossen werden und in Folgereaktionen mit Aminosäuren zu potentiellen einfach-methylenverbrückten Inhibitoren verknüpft werden (Schema 41). Eine Variation der Reste in 3-Position wäre durch die entsprechende Auswahl an Aldehyden denkbar. Ein Nachteil dieser Synthese besteht darin, dass die Produkte erneut nur als Diastereomeregemische erhalten werden.



Schema 41: Mögliche Synthese von einfach methylenverbrückten Aziridin-2-carboxylaten

Für die Aminosäureverknüpfung der neuen Aziridin-2-carboxylate wurden analog zu **A-07** und **A-08** Phenylalanin und Valin gewählt, die ähnlich affine Inhibitoren hervorbrachten. Eine Verknüpfung mit Leucin erbrachte keine Verbesserung der Hemmung. Studien von *Koelsch* zur Substratspezifität von SAP2 zeigten für die S1-Tasche neben Phe eine Bevorzugung von Tyrosin,^[60] das bislang nicht mit den Aziridinen verknüpft wurde. Durch Tyrosinverknüpfung analog Schema 12 (S. 34) könnten evtl. neue Erkenntnisse über die Affinität der Inhibitoren zum Enzym gewonnen werden.

Die Piperidin-verknüpften Aziridine **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63** wurden in Anlehnung an literaturbekannte 4-Aminopiperidine (vgl. Abbildung 13, S. 16)^[130] synthetisiert und hemmen das Wachstum vom *P. falciparum* und *T. brucei brucei*, nicht jedoch SAP2 und CathD. Da die 4-Aminopiperidine neben den Plasmodien auch die Plasmepsine I, II & IV hemmen, wäre für die bislang nicht an Plasmepsin getesteten Piperidin-verknüpften Aziridine ein Zusammenhang denkbar. Die an Plasmepsin aktivsten 4-Aminopiperidine tragen in 1-Position einen Isoamylrest. Dieser könnte bei den Aziridinen durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Piperidinstickstoff und anschließender reduktiver Aminierung mit Isovaleraldehyd eingeführt werden (Schema 42). So könnte durch Vergleich der Hemmdaten die Relevanz der Isoamylgruppe für die Hemmung studiert werden.



Schema 42: Einführung einer Isoamylgruppe am Piperidinstickstoff

In den Selektivitätsstudien zeigten die Aziridin-2-carboxylate einen höheren inhibitorischen Effekt gegen Cathepsin D als gegen SAP2. Da Cathepsin D bei Krebserkrankungen und der Alzheimer-Demenz eine Rolle spielt, sollten in diesem Zusammenhang weitere Studien erfolgen. Selektivitätsstudien gegen nicht-pathogene Aspartatproteasen wie Pepsin stehen außerdem noch aus.

In Kapitel 9.4 (S. 100) wurde die antitrypanosomale Wirkung der Aziridin-2-carboxylate diskutiert. Die aktivsten Verbindungen erreichten dabei IC_{50} -Werte von 0.62 bis 3.36 μM . Testungen an *Rhodesain* könnten hier erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der antiparasitären Wirkung und einer potentiellen Aktivität am Enzym geben.

In der Arbeitsgruppe von *Klebe* werden derzeit Versuche durchgeführt, ein Aziridin-2-carboxylat mit SAP2 zur Kristallisation zu bringen. Von einer Kristallstruktur wird die Bestätigung des postulierten pseudo-irreversiblen Hemmmechanismus erwartet.

12 Summary

Candida albicans is one of the most common fungal pathogens of human beings. Usually, *Candida* species reside as commensal organisms as part of the normal microflora, predominantly colonizing the mucosal surfaces of the oral cavity, the gastrointestinal tract or the vaginal flora. However, notably in immunosuppressed individuals, *C. albicans* can evolve into an opportunistic pathogen, causing superficial as well as life-threatening systemic infections with high mortality.

Increasing resistances to current drug therapies demand research for new antifungal pharmaceuticals. The secreted aspartic proteases (SAP1-10), encoded by ten different sap genes, were discovered as key virulence factors and hence are considered to be potential targets for new antimycotic drugs.

The goal of the present work was the improvement of the known *cis*-configured 3-phenylaziridine-2-carboxylates **A-07** and **A-08** as irreversible inhibitors of the SAP isoenzymes. In order to address their S3 pocket, the substituent at the aziridine-nitrogen was modified (alkyl, aryl and acyl residues, Figure 2). Furthermore, various amino acid esters (D, L) were included in order to improve their fit into the S1' pocket.

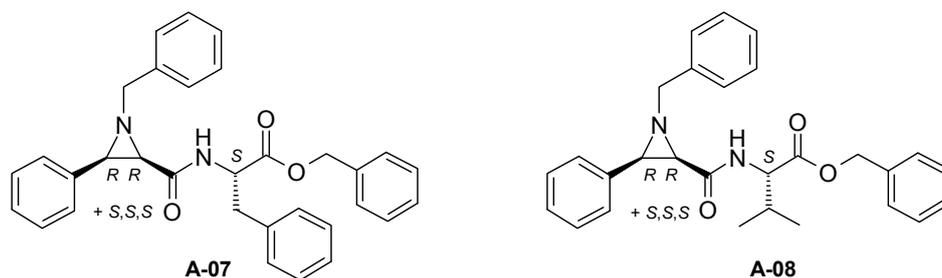
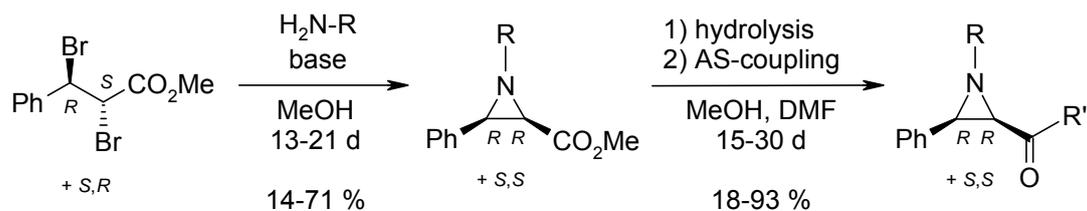


Figure 1: 3-Phenylaziridine-2-carboxylates as irreversible inhibitors of the SAP2 from *C. albicans*

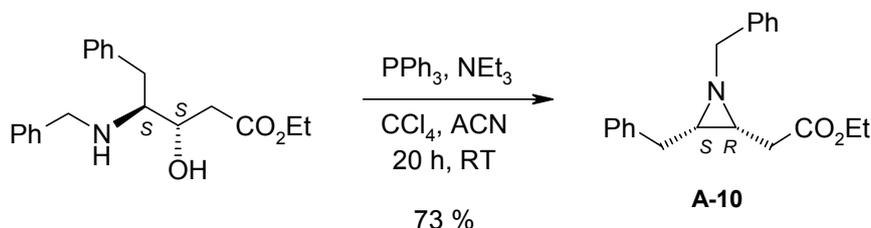


Figure 2: Schematic representation for the synthesized *cis*-3-phenylaziridine-2-carboxylates

The *cis*-3-phenylaziridine-2-carboxylates were obtained as racemates *via* Cromwell synthesis (Scheme 1). Amino acid and peptide coupling reactions were performed with common coupling reagents (PPA, DPPA). The stereoselective synthesis of the methylene-bridged aziridine-2-carboxylate **A-10** was achieved *via* redox condensation according to *Mukaiyama* (Scheme 2).



Scheme 1: Cromwell synthesis followed by amino acid coupling



Scheme 2: Redox condensation according to Mukaiyama

The synthesized compounds were tested for inhibition of SAP2 by using a fluorometric FRET assay using Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-ArgOH as substrate. This substrate, designed for SAP2, was found to be also suitable for assays with SAP1, 3 & 8 and Cathepsin D. Additionally, the corresponding K_m - and k_{cat} values were determined.

For the determination of the inhibition constants of the active compounds a dilution assay according to *Kitz and Wilson* was performed. 20 of the 46 aziridine-2-carboxylates yielded $k_{2\text{nd}}$ values of at least $7880 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ against SAP2. With $k_{2\text{nd}}$ values between 60608 and $118582 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, the most potent compounds were achieved with (*R*)-amino acids (**A-28**, **A-31**) and by cyclohexylmethyl substitution of the aziridine-nitrogen (**A-43**, **A-45**). Significantly different inhibition potencies were found for the single diastereomers of **A-31**, **A-31a** and **A-31b**.

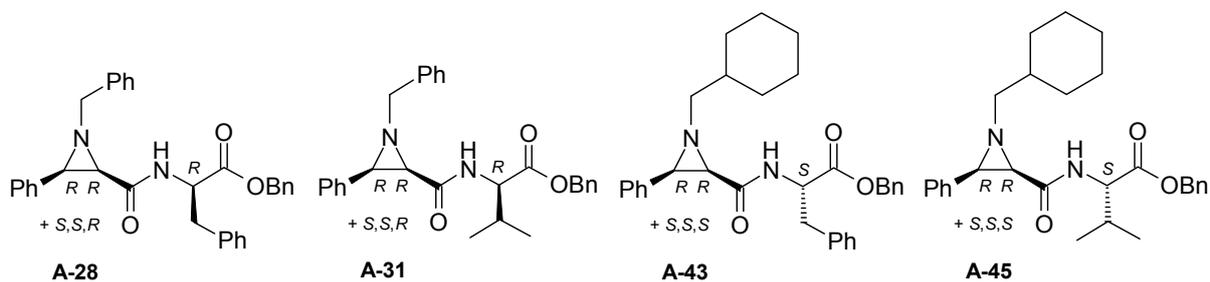


Figure 3: Overview of the most active SAP2 inhibitors

Table 1: Inhibition constants of the most active SAP2 inhibitors

SAP2	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-28	60608 ± 1549	
A-31	86411 ± 9915	
A-31a	30589 ± 2498	
A-31b	165855 ± 7	0.43 / 2.61
A-43	70343 ± 6	1.01 / 14.4
A-45	118582 ± 14778	0.93 / 7.87

The inhibitors showed a time-dependent inhibition that decreased after 30 min incubation time. LC-MS and NMR studies suppose a pseudo-irreversible mechanism of inhibition: First, the inhibitor irreversibly binds to the enzyme under ring opening of the aziridine. Then the generated ester is hydrolyzed under the acidic assay conditions. The resulting amino alcohol subsequently could bind as a transition-state mimetic inhibitor to the enzyme.

In selectivity studies on CathD 36 of the 46 aziridine-2-carboxylates showed k_{2nd} values between 10350 and 936544 $M^{-1}min^{-1}$. Thus, the compounds show higher activity against CathD than against SAP2. Again, the 1-cyclohexylmethyl-substituted aziridines show the highest k_{2nd} values. However, in these cases the compounds with (*R*)-configured amino acid residues are the more active ones (**A-57**, **A-59**). With the (*R*)-Phe-substituted 1-*tert*-butylaziridine **A-58**, the most active compound reached a K_i value in the nanomolar region. Similarly to the results obtained for SAP2, the (*R*)-amino acid analogues to **A-07** and **A-08** (**A-28**, **A-31**) show higher inhibition constants. Again, the separated diastereomers **A-31a** and **A-31b** display significantly different inhibition potencies. With the (*R*)-valin linked aziridines **A-81**, **A-82** and **A-85** a highly active group of alkyl-substituted inhibitors with branched side-chains was found.

Table 2: Inhibition constants of the most active CathD inhibitors

CathD	k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]	k_i [min^{-1}] / K_i [μM]
A-28	260663 ± 1020	1.17 / 4.48
A-31	358848 ± 24726	0.72 / 2.00
A-31a	49582 ± 1755	
A-31b	467291 ± 86259	0.51 / 1.10
A-57	469857 ± 47579	0.55 / 1.17
A-58	936544 ± 116053	0.70 / 0.75
A-59	923564 ± 156012	0.55 / 0.60
A-81	209364 ± 5405	1.11 / 5.28
A-82	478408 ± 37889	0.58 / 1.21
A-85	688607 ± 4515	0.56 / 0.81

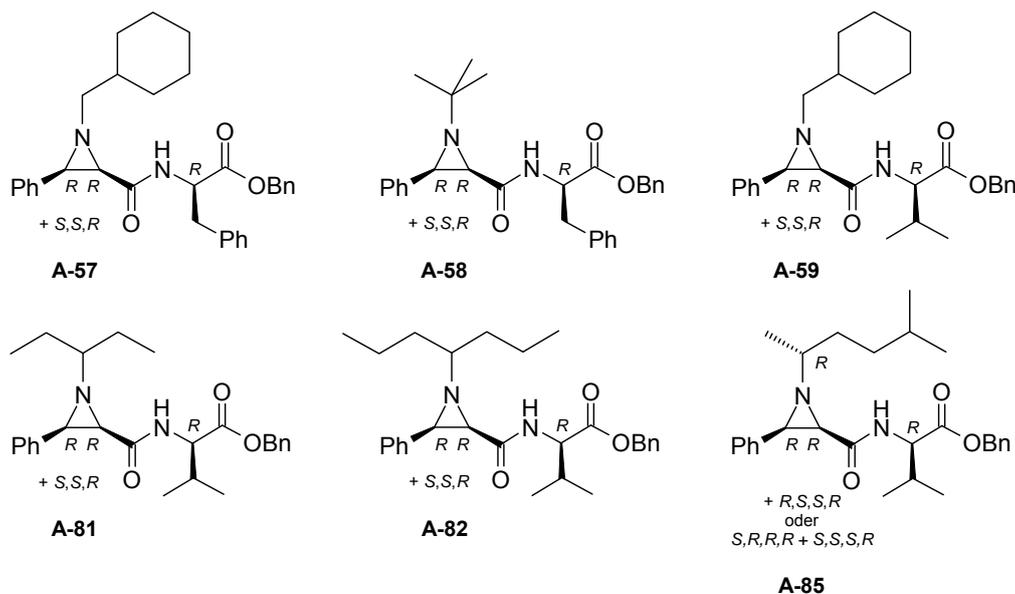


Figure 4: Overview of the most active CathD inhibitors

In further selectivity studies with cysteine proteases the aziridine-2-carboxylates showed no activity against SARS-CoV-PL^{PTO} as well as against falcipains 2 & 3. In contrast to the irreversible mode of action found for SAP2 and CathD, rhodesain is inhibited in an inverse-time dependent manner. LC-MS studies revealed the mechanism as “alternate substrate inhibition”. The amide bond of the inhibitor is cleaved by rhodesain, which temporally blocks the enzyme. Against the serine protease trypsin the aziridine-2-carboxylates only showed weak activity. Chymotrypsin, which prefers aromatic or bulky amino acid residues like Phe, Tyr, Leu or Met for its S1 pocket, is reversibly inhibited with IC_{50} values in the micromolar range. In growth assays with *Plasmodium falciparum* twelve compounds showed antiparasitic activities with IC_{50} values between 2.85 and 11.8 μM reaching selectivity indices of 3 to 35 over general toxicity on macrophages. This series includes the piperidine-linked aziridines **A-60**, **A-61**, **A-62** & **A-63** which only inhibit plasmodia. SAP2 and CathD were not inactivated.

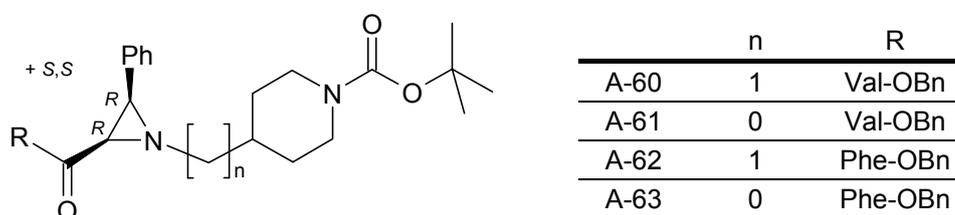


Figure 5: Antiplasmodial piperidine aziridines A-60, A-61, A-62 & A-63

The activity against leishmania ($IC_{50} \approx 30\text{--}50 \mu\text{M}$) may solely be due to general toxicity ($IC_{50} \approx 20\text{--}40 \mu\text{M}$ against macrophages). On the other hand, trypanosomes were inhibited with IC_{50} values of 0.62 to 3.36 μM with the most active compounds reaching selectivity indices of 10 to 75. These antitrypanosomal compounds include the antiparasitic aziridines **A-60**, **A-61**,

A-62 & **A-63**, the selective falcipain 2 inhibitor **A-65**, one of the better CathD inhibitors, **A-57**, and the amino acid-linked aziridines **A-88** & **A-89** as well as the piperazine **Cy-02**.

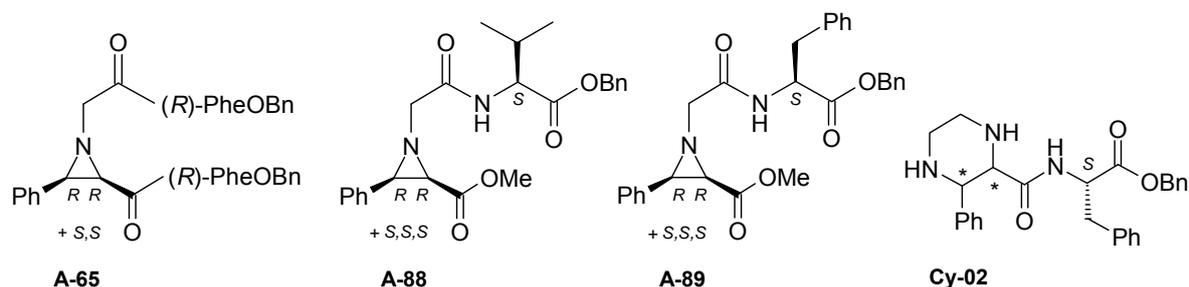


Figure 6: Antitrypanosomal compounds

Tests on *Candida albicans* cell cultures were negative even with the most active SAP2 inhibitors. This can be due to the aziridines' protein binding affinity. Since BSA is essential for the culture growth, no valid data has been obtained until now.

In a smaller project the pepstatin analogue **E-OI-28** was synthesized, showing no activity against aspartic proteases, but weak activity against falcipain 2 ($K_i = 9.66 \mu\text{M}$).

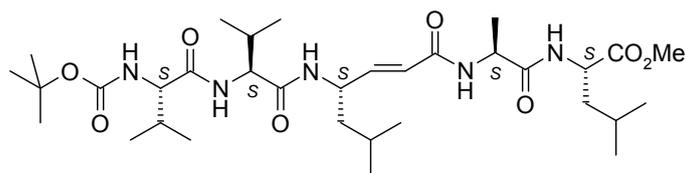


Figure 7: Pepstatin analogue E-OI-28

With the synthesis of the aziridine-linked guanidiniocarbonyl pyrrole **A-48** the SAP2 unique Asp86 residue should be addressed. However, the compound did not show any activity.

In contrast, the *N*-Boc-protected derivative **BocA-48** was found to be a novel falcipain inhibitor with antiplasmodial activity.

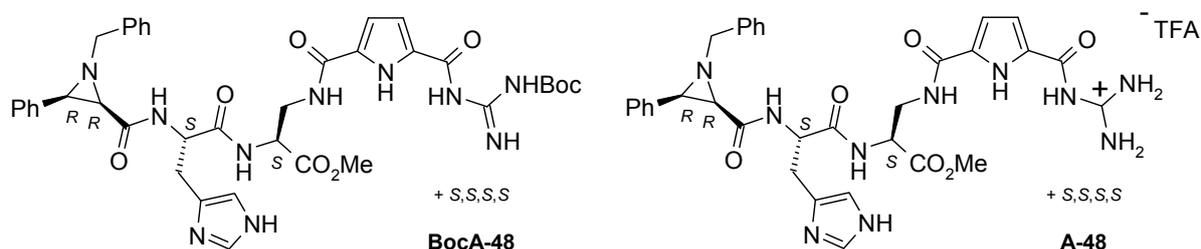


Figure 8: guanidine(i)ocarbonyl pyrroles A-48 & BocA-48

The antiplasmodial biotin-linked aziridine-2-carboxylate **A-75** enabled subcellular analyses *via* introduction of streptavidin conjugates. A putative target enzyme could not be detected.

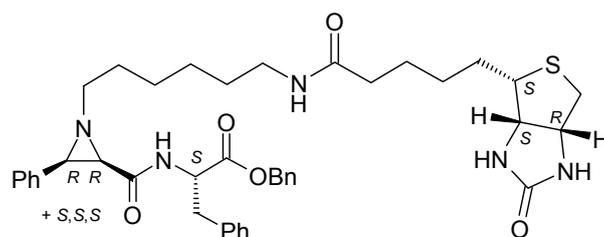


Figure 9: Biotin-linked aziridine-2-carboxylate A-75

Furthermore, a series of fumaric and maleic acid derivatives (**E-OI-23**, **E-OI-26**, **Z-OI-23**) were synthesized as cysteine protease inhibitors complementary to former projects. The olefins only showed weak activity against falcipains and rhodesain. In **E-OI-23** the introduction of a trityl group led to an increase of activity against falcipain 2 and plasmodia.

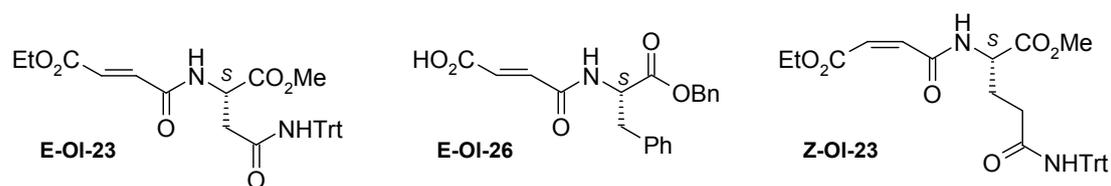


Figure 10: Complementary olefinic inhibitors

Experimenteller Teil

13 Allgemeine Angaben

13.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden

Schmelzpunkte (Smp.)

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

Infrarotspektroskopie (IR)

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

Spezifische Drehwerte

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

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

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

Als Standard für die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösemittels [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 2.50 \text{ ppm}$] und bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren dessen ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 39.52 \text{ ppm}$].

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, b = breit.

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

Konnten die Signale einzelnen Diastereomeren zugeordnet werden, so erfolgt dies mit den Bezeichnungen „dia a“ und „dia b“.

Massenspektrometrie (MS)

Die Aufnahmen der ESI-Massenspektren und die LC-MS-Analysen erfolgten an einer Agilent 1100 LC/MSD-Trap ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von Agilent.

Die LC-MS-Analysen wurden auf einer Phenomenex Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18 Säule (4.6 x 150 mm), mit einem Gradient von 40% Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure über 5 min, 40% auf 95% Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure über 25 min und weitere 15 min bei 95 %Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure, Fluss von 600 μ l/min und UV-Detektion bei 215 oder 254 nm durchgeführt. Die Kapillarensparnung betrug dabei standardmäßig 2.6 kV und als Trockengas diente N₂. Gemessen wurde im positiven Modus.

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

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F254 der Firma Merck verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Ehrlich's Reagenz (Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/MeOH [3/7]; Detektion durch Erhitzen auf ca. 150 °C) oder Ioddampf. Die Laufmittelzusammensetzungen sind in Volumenteilen angegeben.

Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm mesh) bzw. Flash-Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm mesh) der Firma Merck verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen sind in Volumenteilen angegeben.

13.2 Enzyme, Substrate, Zellkulturen und Synthesechemikalien

Enzyme

SAP1, 2, 3 & 8 (<i>Candida albicans</i>)	Prof. Dr. J. Morschhäuser, Würzburg
Cathepsin D (bovine Milz)	Calbiochem
Falcpain 2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Prof. Dr. P. Rosenthal, UCSF, USA
Falcpain 3 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Prof. Dr. P. Rosenthal, UCSF, USA
Rhodesain	Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg
SARS-CoV-PL ^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker, Würzburg
Trypsin (boviner Pankreas)	Merck
α -Chymotrypsin (boviner Pankreas)	Fluka

Substrate

Cbz-Leu-Arg-AMC	Bachem
Cbz-Phe-Arg-AMC	Bachem
Succinyl-Leu-Tyr-AMC	Bachem
Cbz-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC*HOAc	Bachem
DabcyL-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH	GenScript Corporation, New Jersey, USA

Synthesechemikalien

Amine	Acros, Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, TCI-GR
Aminosäuren	Aldrich, Bachem, GL Biochem (Shanghai) Ltd.
Biotin	Iris Biotech
DPPA, Monoethylfumarat	Merck
HOSuc, IBCF	Aldrich
Pd-C 10% typ E 10 N/D	Degussa
PPA (Allessan [®] CAP)	AllessaChemie
PyBOP	GL Biochem (Shanghai) Ltd.
LiOH*H ₂ O, Ph ₃ P, PIDA	Fluka

13.3 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösemittel wurden zuvor durch Destillation über gängigen Trockenmitteln (Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4Å, Calciumchlorid, Natriumsulfat, Kaliumcarbonat) gereinigt und getrocknet. Absolute Lösemittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmitteln (Natrium, Phosphorpentoxid, Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4 Å, Kaliumhydroxid oder Natrium aufbewahrt. Als Schutzgas wurde, sofern nötig, Stickstoff verwendet.

13.4 Fluorimetrische Enzym-Assays

Alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Screeningergebnisse und Hemmkonstanten wurden jeweils durch die Aufnahme von mindestens zwei Messreihen bestimmt.

Verwendete Abkürzungen: E = Enzymlösung; S = Substratlösung; P = Puffer; I = Inhibitorlösung oder DMSO.

Enzymlösungen wurden so verdünnt, dass mit 5 µl im Assay eine Steigung von ~20 ΔF/min erhalten wird. Die Assays wurden in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc[®]) durchgeführt.

Geräte: (1) Cary Eclipse Fluorimeter von Varian mit *microplate reader* und Heizeinheit.

(2) Labsystems Fluoroskan Ascent.

SAP-Assay

Assaymethode	Verdünnungsassay
Volumina	40 µl P , 5 µl E , 5 µl I + 145 µl P , 5 µl S
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH; [S]: 18.8 µM; K_m [µM]= 7.94 (SAP1), 10.1 (SAP2), 10.9 (SAP3), 7.20 (SAP8)
Enzym	SAP1, 2, 3 oder 8, verdünnter Überstand einer entsprechenden <i>C.-albicans</i> -Kultur
Puffer	50 mM Na-Citrat, pH 3.2, 50 mM NaCl
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Cathepsin-D-Assay

Assaymethode	Verdünnungsassay
Volumina	40 µl P , 5 µl E , 5 µl I + 145 µl P , 5 µl S
Substrat	Dabcyl-Arg-Lys-Pro-Ala-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Glu(EDANS)-Arg-OH; [S]: 18.8 µM; K_m = 7.67 µM
Enzym	Cathepsin D, verdünntes Lyophilisat
Puffer	100 mM Na-Formiat, pH 3.7, 50 mM NaCl
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 355 nm / Em: 540 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Falcipain-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	128 µl P , 21 µl E , 1 µl I + 49.5 µl P , 0.5 µl S
Substrat	Cbz-Leu-Arg AMC; [S]: 25.0 µM; K_m [µM]= 8.4 (FP2), 72.0 (FP3)
Enzym	Falcipain 2 oder 3, aus <i>Escherichia coli</i> exprimiert
Puffer	100 mM Na-Acetat, pH 5.5, 10 mM DTT
Temperatur	37 °C
Detektion	Ex: 365 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Labsystems Fluoroskan Ascent

Rhodesain-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	170 µl P , 5 µl E , 20 µl I , 5 µl S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC*HCl; [S]: 10.0 µM; K_m = 827 nM
Enzym	Rhodesain, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM NaOAc, pH 5.5, 125 µM DTT, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

SARS-CoV-PL^{pro}-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	160 μ l P , 10 μ l E , 20 μ l I , 10 μ l S
Substrat	Cbz-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly AMC*HOAc, [S]: 50.0 μ M; K_m = 850 μ M
Enzym	SARS-CoV-PL ^{pro} , aufgereinigte Enzymlösung
Puffer	20 mM TRIS, pH 7.5, 100 μ M EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 360 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Trypsin-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	174 μ l P , 4 μ l E , 20 μ l I , 4 μ l S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC*HCl; [S]: 40.0 μ M
Enzym	Trypsin, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM TRIS, pH 8.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

Chymotrypsin-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	174 μ l P , 4 μ l E , 20 μ l I , 4 μ l S
Substrat	Succinyl-Leu-Tyr AMC; [S]: 80.0 μ M
Enzym	α -Chymotrypsin, verdünntes Lyophilisat
Puffer	50 mM TRIS, pH 8.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Gerät	Varian Cary Eclipse

13.5 Zellkultur-Assay

Plasmodium-falciparum-Zellkultur-Assay

Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Parasit	<i>Plasmodium falciparum</i> , W2, MRA-157 Synchronisierung im Ring-Stadium mit <i>D</i> -Sorbitol-Lösung (5 %)
Erythrocyten	6-8 % Parasitämie
Medium	RPMI 1640, 10 % humanes Serum
Puffer	25 mM HEPES, 20 mM Natriumbicarbonat
Nahrung	Glutamin
Antibiotikum	50g/l Gentamicin
Indikator	Phenolrot
Volumina	100 µl Serum-Medium + I + 100 µl Serum mit infizierten RBCs (4% Hämatocrit)
Temperatur	37 °C
Inkubation	48 h
Atmosphäre	3 % O ₂ , 6 % CO ₂ , 92 % N ₂
Fixierung	Entfernen des Medium, 200 µl Formaldehyd in PBS (1 %, pH 7.4), 24 h
Detektion	5 µl fixierte RBCs + 150 µl Triton-X-100-Lösung in PBS (0.1 %), 1 nM YOYO-1 fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS, fluorescence-activated cell sorting): Becton Dickinson FACSort; Roboter: Cytex Development AMS Loader für 96-Well-Mikrotiterplatten, Cell Quest 5.2.1 für Apple G5 System V.4.2

13.6 Enzym-Gewinnung

Gewinnung der SAP-Isoenzyme

Stämme	SC5314, SAP2MS4B, SAP1ex4A, SAP1ex4B, SAP2ex4A, SAP2ex4B, SAP3ex4A, SAP3ex4B, SAP8ex4A, SAP8ex4B
Vorultur	SD Medium (6.7 g/l YNB, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose, 30°C, 24 h)
Inkubation	YCB-BSA Medium (23.4 g/l YNB, 4 g/l BSA, pH 4.0, 30 °C, 24 h)
Induktion	Doxycyclin (50 µg/ml)

14 Allgemeine Synthesemethoden

14.1 Aziridinsynthesen

14.1.1 Methode A1: Aziridinsynthese nach *Cromwell*

Zu einer Lösung aus 2,3-Dibromzimtsäureester (1 eq) in Methanol oder Dichlormethan wird bei 0 °C Amin (1.1-3.6 eq) sowie bei Bedarf NEt_3 (1.8-2 eq) zugetropft und 13-21 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Solvens wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.^[204,205]

14.1.2 Methode A2: Redoxkondensation nach *Mukaiyama*

Triphenylphosphin (3 eq) wird in Acetonitril/Tetrachlorkohlenstoff (4/1) gelöst und 30 min gerührt. Zur gelben Lösung wird eine Lösung aus *N*-Benzyl-geschütztem Aminosäurealkohol (1 eq) und NEt_3 (3 eq) in Acetonitril getropft und 20 h bei RT gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.^[211]

14.2 Peptidkupplungen

14.2.1 Methode B1: Kupplung mit DPPA

Eine Suspension aus Carboxylat bzw. Carbonsäure (1 eq), DPPA (1.1 eq), NEt_3 (2.1-2.2 eq) und Amin (1 eq) wird unter Stickstoffatmosphäre in DMF_{abs} für 1 d bei 0 °C und weitere 2-22 d im Kühlraum (~ 2 °C) gerührt. Die Lösung wird in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[214-216]

14.2.2 Methode B2: Kupplung mit PPA

Eine Lösung aus Carboxylat (1 eq), PPA in DMF (1.5 eq, 50 %), NMM (1.2 eq) und Amin (1 eq) wird 2 d bei RT gerührt. Die Lösung wird in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über

Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[217]

14.2.3 Methode B3: Kupplung mit HBTU

Eine Lösung aus Carbonsäure (1 eq), HBTU (1.1 eq) und NMM (2.1 eq) in DMF_{abs} wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach 30 min wird Amin (2 eq) zugegeben und 24 h gerührt. Die Lösung wird unter starkem Rühren in Wasser getropft. Die entstandene Suspension wird dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[221,308]

14.2.4 Methode B4: Kupplung mit PyBOP

Eine Lösung aus Carbonsäure (1 eq), PyBOP (1 eq) und NMM (2.1 eq) in DMF_{abs} wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach 30 min wird Amin (1 eq) zugegeben und 2-5 d gerührt. Die Lösung wird in Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[224,225]

14.2.5 Methode B5: Peptidkupplung über das symmetrische Anhydrid

Eine Lösung aus Carbonsäure (2.2 eq) in Dichlormethan wird bei 0 °C mit DCC (1.1 eq) versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Der ausgefallene *N,N*-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Filtrat zur *C*-geschützten Aminosäure (1 eq) getropft. Die Lösung wird 1 h bei RT gerührt, in Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC gereinigt.^[225,228]

14.2.6 Methode B6: Kupplung mit IBCF

Zu einer Lösung aus Carbonsäure (1 eq) in THF werden bei -15 °C in fünfminütigem Abstand NMM (1.1 eq), IBCF (1.1 eq) und Aminosäure (1 eq) in DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wird anschließend 1 h bei -15 °C, 2 h bei 0 °C und 18 h bei RT gerührt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über

Natriumsulfat getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels SC gereinigt.^[226,227]

14.3 Esterhydrolysen

14.3.1 Methode C1: Hydrolyse mit Lithiumhydroxid in Methanol

Zu einer Lösung aus Methyl- oder Ethylester (1 eq) in Methanol wird bei 0 °C LiOH·H₂O (1.05 eq) gegeben und 7-15 d bei RT gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt. Man erhält das Lithiumcarboxylat, das ohne Charakterisierung weiter umgesetzt wird.^[160]

14.3.2 Methode C2: Hydrolyse mit Lithiumhydroxid in THF

Zu einer Lösung aus Methyl- oder Ethylester (1 eq) in THF wird bei 0 °C wässrige LiOH-Lösung (1 M, 1.1 eq) getropft und 3 d bei RT gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt.^[231]

14.4 Carbonsäurederivatisierung

14.4.1 Methode D1: Veresterung zum Benzylester

Zu einer Lösung aus Carbonsäure (1 eq) und *p*-Toluolsulfonsäure (1.2 eq) in Toluol wird Benzylalkohol (4.8 eq) gegeben und 4 h bei 130°C über einem Wasserabscheider gerührt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Diethylether digeriert. Der erhaltene Benzylester wird abfiltriert und über Calciumchlorid i. Vak. getrocknet.^[309]

14.4.2 Methode D2: Veresterung zum Methylester

Die Carbonsäure (1 eq) wird in Methanol gelöst. Bei 0 °C wird Thionylchlorid (1.1 eq) zuge tropft und 20 h bei RT gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt.^[223]

14.4.3 Methode D3: Veresterung zum *tert*-Butylester

Eine Lösung aus Aminosäure (1 eq), *tert*-Butylacetat (100 eq) und Perchlorsäure (1.1 eq) wird 4 d bei RT gerührt. Es wird auf 0 °C abgekühlt und mit wässriger HCl (0.5 M) extrahiert.

Die wässrige Phase wird mit NaHCO_3 und NaOH neutralisiert (pH 8) und mit Ethylacetat extrahiert. Das Solvens wird i. Vak. entfernt.^[201]

14.5 Schutzgruppen

14.5.1 Methode E1: Hydrogenolyse von Benzylestern

Der Benzylester (1 eq) wird in Methanol gelöst. Zu der Lösung wird Pd/C und Triethylamin (1.5 eq) gegeben und 3.5 h bei 10 bar hydrogenolysiert. Der Pd/C-Katalysator wird über Celite[®] filtriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen werden vereinigt und das Solvens i. Vak. entfernt.^[215]

14.5.2 Methode E2: Spaltung von *tert*-Butylestern

Der *tert*-Butylester (1 eq) wird in einem Dichlormethan/TFA-Gemisch (~2/1) bei 0 °C gelöst und 2 h bei 0 °C sowie weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit Wasser digeriert, das Produkt abfiltriert und über Calciumchlorid i. Vak. getrocknet.^[232]

14.5.3 Methode E3: Spaltung der Cbz-Schutzgruppe

Das Cbz-geschützte Amin (1 eq) wird in Methanol gelöst. Zu der Lösung wird Pd/C gegeben und 4 h bei Raumtemperatur bei 10 bar hydrogenolysiert. Die Lösung wird über Celite[®] filtriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen werden vereinigt und das Solvens i. Vak. entfernt.^[215]

14.5.4 Methode E4: Entschützung von *N*-Boc-Aminosäuren oder -Peptiden mit TFA

Das mit einer Boc-Gruppe geschützte Peptid bzw. die Aminosäure (1 eq) wird in einem Dichlormethan/TFA-Gemisch (~5/1) bei 0 °C gelöst und 2 h bei 0 °C sowie weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Um restliche TFA zu entfernen wird der Rückstand mehrmals erneut in Dichlormethan aufgenommen und das Lösemittel i. Vak. entfernt.^[236]

14.5.5 Methode E5: Einführung der Boc-Schutzgruppe bei Aminen

Das Amin (1 eq) und Natriumhydrogencarbonat (2.2 eq) werden in Wasser gelöst. Unter Eiskühlung wird eine Lösung $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 eq) in Dioxan zugetropft. Die Lösung wird 20 h bei Raumtemperatur gerührt und das Solvens anschließend i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt.^[215]

14.5.6 Methode E6: Einführung einer Boc-Schutzgruppe bei Diaminen

Zu einer Lösung aus Diamin (5 eq) in Dichlormethan wird bei 0 °C sehr langsam eine Lösung aus $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1 eq) in Dichlormethan getropft. Die Lösung wird bei RT über Nacht gerührt und filtriert. Das Filtrat wird konzentriert, in Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.^[199,200]

14.5.7 Methode E7: Einführung einer Boc-Schutzgruppe bei Aminopiperidin

Zu einer Lösung aus 4-Aminopiperidin (1 eq) in Toluol wird Benzaldehyd gegeben und 4 h am Wasserabscheider refluxiert. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt, $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.1 eq) zugegeben und 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in wässriger KHSO_4 -Lösung (1 M) aufgenommen und 90 min gerührt. Es wird Wasser zugegeben und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die Wasserphase wird mit Kaliumhydroxid auf pH = 10 eingestellt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethan-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.^[197,198]

14.5.8 Methode E8: N-Benzilylierung von Aminosäuren

Zu einer Lösung aus Aminosäure und NEt_3 (4 eq) in Dichlormethan wird Natriumsulfat (3 eq) und Benzaldehyd (1 eq) gegeben und 24 h bei RT gerührt. Es wird filtriert und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, bei 0 °C portionsweise Natriumborhydrid zugegeben und 3 h bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird mit Wasser gequench und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[210]

14.6 Olefinsynthesen

14.6.1 Methode F1: Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung

Unter Schutzgasatmosphäre werden Triethylphosphonoacetat (1.3 eq) und Kalium-*tert*-butanolat (1.3 eq) in THF_{abs} vorgelegt und 5 min gerührt. Die Reaktionslösung wird auf -78 °C abgekühlt und der Aldehyd (1.0 eq) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt und dabei auf RT erwärmt, es wird gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt. Man erhält das *E*-konfigurierte Olefin.^[233-235]

14.6.2 Methode F2: Maleinsäurehalbester aus Maleinsäureanhydrid

Zu einer Lösung aus Maleinsäureanhydrid (1 eq) und Alkohol (1 eq) in Dichlormethan wird bei 0 °C NEt₃ (1.1 eq) gegeben und die Mischung 3 h bei 0 °C und 1 d bei RT gerührt. Die Lösung wird auf Wasser gegossen und die Phasen werden getrennt. Anschließend wird die wässrige Phase mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH 2) und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.^[310]

14.7 Diverse Synthesen

14.7.1 Methode G1: Bromierung von Zimtsäure

Zu einer Lösung aus Zimtsäure in Dichlormethan wird bei 0 °C Brom zugetropft und 2 d bei RT gerührt. Die Lösung wird mit gesättigter Thiosulfat-Lösung gewaschen und das Solvens i. Vak. entfernt.^[203]

14.7.2 Methode G2: Formylierung *via* Vilsmeier-Reaktion

Zur Darstellung des Vilsmeier-Reagenzes wird bei 10 °C Phosphorylchlorid (2 eq) zu DMF (5 eq) getropft und 30 min gerührt. Die orange Lösung wird bei -20 °C langsam zu einer Lösung aus Aromat (1 eq) in Dichlormethan getropft und 4 h bei 0 °C sowie weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung

zugegeben und 15 min refluxiert. Die Lösung wird filtriert und die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[218]

14.7.3 Methode G3: Oxidation zur Carbonsäure

Zu einer Lösung aus Aldehyd (1 eq) in Aceton wird bei Raumtemperatur über 45 min eine Suspension aus Kaliumpermanganat (2 eq) in Aceton/Wasser (1:1) getropft. Die Lösung wird 1 h bei 40 °C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wird Natriumdithionit (ca. 0.1 eq) zugegeben, die Lösung über Celite® filtriert und mit wässriger NaOH-Lösung (5 %) nachgewaschen. Das Filtrat wird mit wässriger HCl-Lösung (5 %) angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit wässriger HCl-Lösung (5 %) gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet.^[311]

14.7.4 Methode G4: Hofmann-Abbau mit PIDA

Eine Lösung aus Amin (1 eq), PIDA (1.2 eq), Ethylacetat, Acetonitril und Wasser wird 30 min bei 15 °C gerührt. Es wird weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt, die Lösung auf 5 °C abgekühlt und filtriert. Der Feststoff wird mit Diethylether gewaschen und i. Vak. bei 50 °C getrocknet.^[222]

14.7.5 Methode G5: Reduktion zum Aldehyd

Unter Schutzgasatmosphäre wird zu einer Lösung aus Methylester (1.0 eq) in abs. Dichlormethan bei -78 °C langsam eine Lösung aus DIBALH in Cyclohexan (1 M, 2.5 eq) getropft und weitere 2.5 h bei -78 °C gerührt. Es wird Methanol zugetropft, wobei die Reaktionsmischung auf RT erwärmt wird. Die Lösung wird in Na/K-Tartrat-Lösung (10 %) gegossen und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser, gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird bei Bedarf säulenchromatographisch gereinigt.^[208,312]

14.7.6 Methode G6: Statinsynthese

Zu einer Lösung aus 1.5 eq Diisopropylamin (1.5 eq) in THF_{abs} wird bei -30 °C *n*Butyllithium (1.5 eq) getropft und 1 h bei -30 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf -78 °C gekühlt und Ethylacetat (1.5 eq) zugegeben. Nach 30 min wird eine Lösung aus Aldehyd in THF_{abs} zugegeben. Die Lösung wird für 30 min bei -78 °C gerührt und anschließend mit HCl (1 M) gequenchet, auf pH 2 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch in die Diastereomeren aufgetrennt und gereinigt.^[209]

14.7.7 Methode G7: Biotinylierung

G7a: Biotin (1 eq), *N*-Hydroxysuccinimid (1.3 eq) und DCC (1 eq) werden in 80 °C heißem DMF gelöst und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert, eingeengt und aus Isopropanol umkristallisiert. Man erhält den Succinimdester als Präzipitat.

G7b: Die Boc-Schutzgruppe des Aziridins wird nach Methode E4 abgespalten. Das erhaltene Amin wird in DMF_{abs} gelöst. Es wird Diisopropylamin (1.1 eq) und *D*-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimidester zugegeben und 4 Wochen bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.^[239,240]

15 Synthেসেব্রসক্রিফটেন

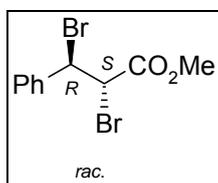
Alle Lithiumsalze wurden nach Methode C1 aus den entsprechenden Aziridinen dargestellt und ohne Charakterisierung direkt mit den Aminosäuren umgesetzt.

Wurden Produkte als Diastereomerenmischungen erhalten, gelten die analytischen Daten für das Produktgemisch. Konnten einzelne Diastereomere im NMR- oder LC-MS-Spektrum identifiziert werden, werden die zugehörigen Daten mit „dia a“ und „dia b“ gekennzeichnet. Die Diastereomerenverhältnisse wurden durch LC-MS-Messungen oder Auswertung der Integrale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt und sind in Tabelle 4 (S. 36) aufgeführt. Wurden Diastereomerenmischungen präparativ getrennt, ist dies explizit angegeben.

Die Reinheiten der Endstufen wurden mittels LC-MS-Messung bestimmt und sind jeweils in Klammern hinter der Retentionszeit aufgeführt. Bei Diastereomerenmischungen, deren Chromatogramme eine Grundlinientrennung aufwiesen, wird die Reinheit kumulativ angegeben.

15.1 Diverse Bausteine

15.1.1 (2R,3S)+(2S,3R)-2,3-Dibromzimsäuremethylester



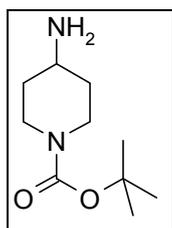
Methode: G1 (2 d, RT).

Ansatz: 12.0 g (74.0 mmol) Zimsäuremethylester, 4.17 ml (81.4 mmol) Brom, 80 ml Dichlormethan.

Ausbeute: 23.6 g, 73.3 mmol, 99 %, grauer Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[202,203]

15.1.2 4-Aminopiperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester



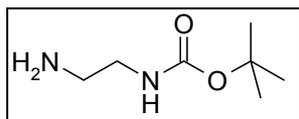
Methode: E7 (4 h, 130 °C).

Ansatz: 2.73 g (27.3 mmol) 4-Aminopiperidin, 2.76 ml (27.3 mmol) Benzaldehyd, 6.55 g (30.0 mmol) (Boc)₂O, 50 ml Toluol.

Ausbeute: 4.65 g, 23.1 mmol, 85 %, gelbes Harz.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[197,198]

15.1.3 N-Boc-1,2-ethandiamin



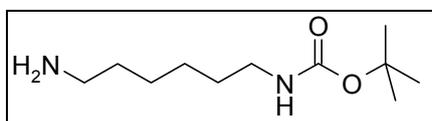
Methode: E6 (16 h, RT).

Ansatz: 5.03 ml (75.0 mmol) Ethandiamin, 3.27 g (15.0 mmol) (Boc)₂O, 60 ml Dichlormethan.

Ausbeute: 1.72 g, 10.8 mmol, 72 %, farbloses Öl.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[200]

15.1.4 N-Boc-1,6-hexandiamin



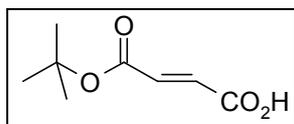
Methode: E6 (16 h, RT).

Ansatz: 26.0 g (224 mmol) Hexandiamin, 9.78 g (44.8 mmol) (Boc)₂O, 110 ml Dichlormethan.

Ausbeute: 9.21 g, 42.6 mmol, 95 %, farbloses Öl.

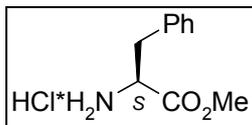
Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[199]

15.1.5 (E)-3-(tert-Butoxycarbonyl)acrylsäure



Methode: C2 (3 d, RT).

1.83 g (9.14 mmol) *tert*-Butylethylfumarat,^[229,230] 403 mg (9.60 mmol) LiOH·H₂O,

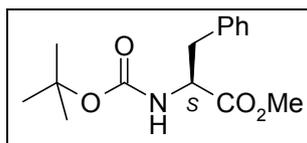
15.1.8 Phe-OMe

Methode: D2 (20 h, RT).

10.0 g (60.5 mmol) Phenylalanin, 7.15 ml (98.0 mmol) Thionylchlorid, 80 ml Methanol.

Ausbeute: 12.9 g, 59.9 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturangaben.^[313]

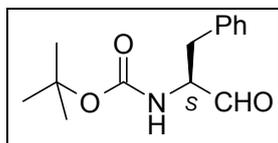
15.1.9 Boc-Phe-OMe

Methode: E5 (20 h, RT).

12.9 g (59.9 mmol) HCl*Phe-OMe, 11.1 g (133 mmol) Natriumhydrogencarbonat, 14.4 g (65.9 mmol) (Boc)₂O, 60 ml Wasser, 40 ml Dioxan.

Ausbeute: 16.6 g, 59.3 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturangaben.^[313]

15.1.10 Boc-Phe-CHO

Methode: G5 (4 h, -78 °C).

16.6 g (59.3 mmol) Boc-Phe-OMe, 148 ml (148 mmol, 1 M) DIBALH in Cyclohexan, 80 ml CH₂Cl₂ abs.

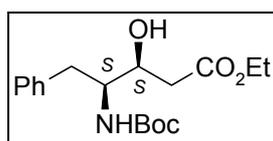
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [8/1].

Ausbeute: 11.5 g, 46.3 mmol, 78 %, farbloses Harz.

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

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[208]

15.1.11 (3S,4S)-4-Boc-amino-3-hydroxy-5-phenyl-pentansäureethylester (Stat-01)



Methode: G6 (30 min, -30 °C; 1 h, -78 °C).

11.5 g (46.3 mmol) Boc-Phe-CHO, 27.8 ml (69.5 mmol, 2.5 M) Butyllithium in Hexan, 9.77 ml (69.5 mmol) Diisopropylamin, 4.53 ml (69.5 mmol) Ethylacetat, 100 ml THF_{abs}.

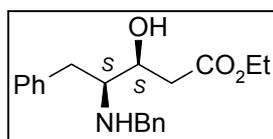
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

Ausbeute: 2.73 g, 8.09 mmol, 17 %, farbloses Harz.

R_f: 0.56 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[209]

15.1.12 (3S,4S)-4-Benzylamino-3-hydroxy-5-phenylpentansäureethylester (Stat-Bn)



Methode: E4 (4 h)

1.10 g (3.26 mmol) **Stat-01**, 8 ml Dichlormethan, 2 ml TFA.

Das erhaltene braune Öl wurde ohne Charakterisierung direkt weiter umgesetzt:

Methode: E8 (24 h, RT)

1.15 g (3.26 mmol) **Stat-01***TFA, 1.81 ml (13.0 mmol) NEt₃, 1.39 g (9.78 mmol) Natriumsulfat, 330 µl (3.26 mmol) Benzaldehyd, 8 ml Dichlormethan, 123 mg (3.26 mmol) Natriumborhydrid, 10 ml Methanol.

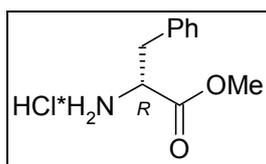
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 290 mg, 0.98 mmol, 27 %, orangebraunes Öl.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^[290]

15.1.13 (R)-Phe-OMe*HCl



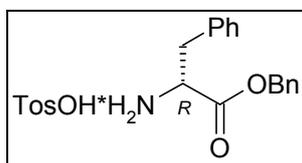
Methode: D2 (16 h, RT).

Ansatz: 393 mg (2.38 mmol) (R)-Phe-OH, 278 µl (3.81 mmol) Thionylchlorid, 15 ml Methanol.

Ausbeute: 505 mg, 2.36 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[313]

15.1.14 (R)-Phe-OBn*pTosOH



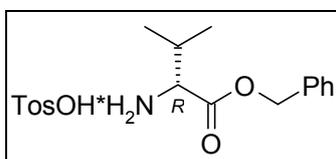
Methode: D1 (4 h, 130°C).

Ansatz: 1.98 g (12.0 mmol) (R)-Phe-OH, 2.51 g (13.2 mmol) pTosOH*H₂O, 5.61 ml (54.0 mmol) Benzylalkohol, 50 ml Toluol.

Ausbeute: 4.04 g, 9.45 mmol, 79 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[313]

15.1.15 (R)-Val-OBn*pTosOH



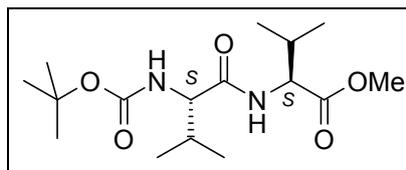
Methode: D1 (4 h, 130°C).

Ansatz: 2.00 g (17.1 mmol) (*R*)-Valin, 3.90 g (20.5 mmol) *p*TosOH·H₂O, 8.53 ml (82.0 mmol) Benzylalkohol, 70 ml Toluol.

Ausbeute: 5.31 g, 14.0 mmol, 82 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[313]

15.1.16 Boc-Val-Val-OMe



Methode: B1 (2 d, RT).

1.09 g (5.00 mmol) Boc-Val-OH, 0.84 g (5.00 mmol) Val-OMe·HCl, 1.62 ml (7.50 mmol) DPPA, 1.46 ml (10.5 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

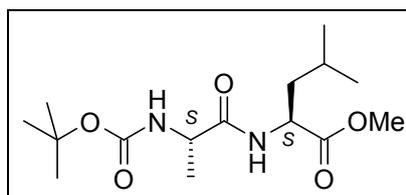
SC (Cyclohexan/Ethylacetat [4/1]).

Ausbeute: 626 mg, 1.89 mmol, 38 %, farbloses Harz.

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[313]

15.1.17 Boc-Ala-Leu-OMe



Methode: B1 (2 d, RT).

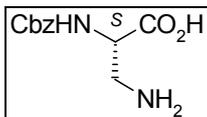
0.95 g (5.0 mmol) Boc-Ala-OH, 0.91 g (5.0 mmol) Leu-OMe·HCl, 1.62 ml (7.50 mmol) DPPA, 1.46 ml (10.5 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC (Cyclohexan/Ethylacetat [3/2]).

Ausbeute: 1.22 g, 3.86 mmol, 77 %, farbloses Harz.

R_f: 0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[313]

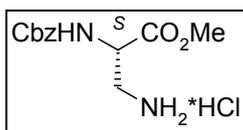
15.1.18 N_{α} -Cbz- β -amino-(S)-alanin (AS-01)

Methode: G4 (5 h, RT).

Ansatz: 5.00 g (18.8 mmol) Cbz-Asn, 7.26 g (22.5 mmol) PIDA, 60 ml Ethylacetat, 60 ml Acetonitril, 30 ml Wasser.

Ausbeute: 4.29 g, 18.0 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[222]

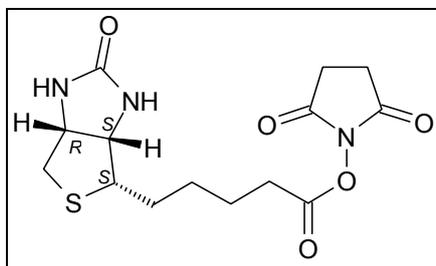
15.1.19 N_{α} -Cbz- β -amino-(S)-alaninmethylesterhydrochlorid (AS-02)

Methode: D2 (20 h, RT).

Ansatz: 4.28 g (18.0 mmol) **AS-01**, 1.45 ml (19.8 mmol) Thionylchlorid, 2 Tropfen DMF, 50 ml Methanol.

Ausbeute: 5.15 g, 17.8 mmol, 99 %, hellgelber Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[313]

15.1.20 *D*-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimidester

Methode: G7a (2 h, 80 °C) .

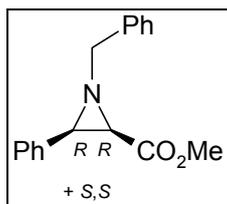
Ansatz: 1.00 g (4.10 mmol) *D*-Biotin, 610 mg (5.30 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 0.85 g (4.10 mmol) DCC, 70 ml DMF.

Ausbeute: 490 mg, 1.44 mmol, 35 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[239,240]

15.2 Aziridin-Bausteine

15.2.1 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-05)



Methode: A1 (13 d, RT).

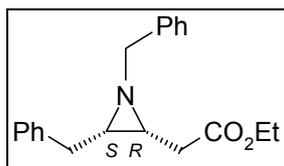
5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 6.11 ml (55.9 mmol) Benzylamin, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

Ausbeute: 2.52 g, 9.43 mmol, 61 %, hellgelbes Harz.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[205]

15.2.2 ((2*R*,3*S*)-1,3-Dibenzylaziridin-2-yl)-essigsäureethylester (A-10)



Methode: A2 (24 h, RT).

290 mg (0.89 mmol) **Stat-Bn**, 368 μ l (2.66 mmol) NEt₃, 698 mg (2.66 mmol) Triphenylphosphin, 2 ml Tetrachlorkohlenstoff, 8 ml Acetonitril.

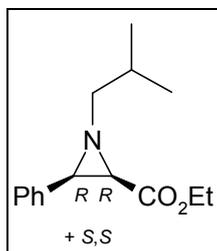
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 201 mg, 0.65 mmol, 73 %, gelbes Harz.

R_f: 0.61 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[290]

15.2.3 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Isobutyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäureethylester (A-23)



Methode: A1 (15 d, RT).

3.41 g (10.2 mmol) 2,3-Dibromzimtsäureethylester, 1.15 ml (11.2 mmol) Isobutylamin, 2.50 ml (18.3 mmol) NEt₃, 40 ml Dichlormethan.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [12/1].

Ausbeute: 497 mg, 2.01 mmol, 20 %, gelbes Öl.

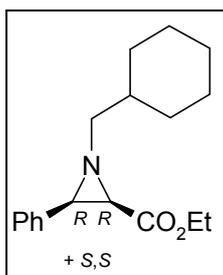
R_f: 0.28 (Cyclohexan/Ethylacetat [11/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.95 (m, 3H, CH₂CH₃), 0.99 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1.98 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.12 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Et, *J* = 6.9 Hz), 2.63 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 2.87 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.93 (m, 2H, CH₂CH₃), 7.19-7.44 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 13.98 (CH₂CH₃), 20.90 (CH(CH₃)₂), 29.03 (CH(CH₃)₂), 46.11 (Azi-CH-CO₂Et), 48.26 (Azi-CH-Ph), 60.62 (CH₂CH₃), 68.69 (CH₂CH(CH₃)₂), 127.34, 127.83, 127.94 (Ar-CH), 135.51 (Ar-C_q), 170.76 (CO₂Et).

Die übrigen analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[314]

15.2.4 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäureethylester (A-24)



Methode: A1 (15 d, RT).

2.40 g (7.14 mmol) 2,3-Dibromzimtsäureethylester, 0.83 ml (7.86 mmol) 1-Cyclo-

hexylmethylamin, 1.30 ml (12.9 mmol) NEt_3 , 25 ml Dichlormethan.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

Ausbeute: 607 mg, 2.11 mmol, 30 %, gelbes Harz.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [10/1]).

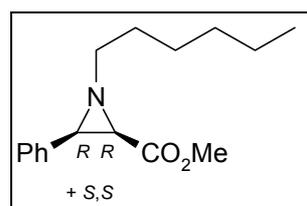
$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$: -0.3° [$c = 0.75$, CHCl_3].

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2923 (s, C-H), 2852 (m, C-H), 1748 (s, CO_2Et), 1450 (m, Ph), 1176 (s, CO_2Et), 738 (m, Ph), 698 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.94 (t, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 0.98-1.29 (m, 5H, Cy- CH_2), 1.65-1.92 (m, 6H, Cy- CH_2 , Cy- CH), 2.16 (m, 1H, CH_2Cy), 2.43 (d, 1H, Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Et}$, $J = 6.8$ Hz), 2.61 (m, 1H, CH_2Cy), 2.85 (d, 1H, Azi- CH-Ph , $J = 6.8$ Hz), 3.93 (m, 2H, CH_2CH_3), 7.19-7.42 (m, 5H, Ar- CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 13.96 (CH_2CH_3), 26.07 (Cy- CH_2), 29.75 (Cy- CH_2), 31.56 (Cy- CH_2), 38.48 (Cy- CH), 46.17 (Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Et}$), 48.30 (Azi- CH-Ph), 60.59 (CH_2CH_3), 67.73 (CH_2Cy), 127.31, 127.84, 127.94 (Ar- CH), 135.52 (Ar- C_q), 168.50 (CO_2Et).

15.2.5 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Hexyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-25)



Methode: A1 (13 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 7.35 ml (55.9 mmol) Hexylamin, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [8/1].

Ausbeute: 2.63 g, 10.1 mmol, 65 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$: 0.1° [$c = 1.09$, CHCl_3].

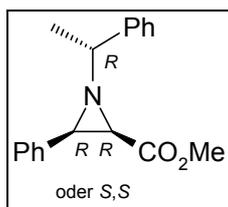
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2930 (s, C-H), 2857 (m, C-H), 1749 (s, CO_2Me), 1439 (m, Ph), 1173 (s,

CO₂Me), 737 (m, Ph), 698 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.87 (t, 3H, Hex-CH₃, *J* = 6.9 Hz), 1.25-1.41 (m, 6H, Hex-CH₂), 1.58-1.77 (m, 2H, Hex-CH₂), 2.30 (m, 1H, N-CH₂), 2.49 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, *J* = 6.8 Hz), 2.76 (m, 1H, N-CH₂), 2.88 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.47 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.20-7.41 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.04 (Hex-CH₃), 22.56 (Hex-CH₂), 26.95 (Hex-CH₂), 29.33 (Hex-CH₂), 31.75 (Hex-CH₂), 45.91 (Azi-CH-CO₂Me), 48.16 (Azi-CH-Ph), 51.76 (CO₂CH₃), 60.96 (N-CH₂), 127.45, 127.77, 127.95 (Ar-CH), 135.46 (Ar-C_q), 168.93 (CO₂Me).

15.2.6 (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-3-Phenyl-1-((*R*)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonsäuremethylester (A-26)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 1.98 ml (23.3 mmol) (*R*)-1-Phenylethylamin, 4.30 ml (31.0 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [15/1].

Ausbeute: 1.04 g, 3.70 mmol, 24 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

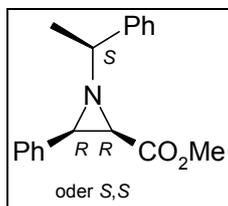
[α]_D^{20 °C}: -27.2° [c = 1.00, CHCl₃].

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964 (w, C-H), 1741 (s, CO₂Me), 1441 (w, Ph), 1201 (s, CO₂Me), 736 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.53 (d, 3H, N-CHCH₃, *J* = 6.1 Hz), 2.53 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, *J* = 6.9 Hz), 2.91 (q, 1H, N-CH, *J* = 6.6 Hz), 3.12 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.43 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.22-7.56 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 23.89 (N-CHCH₃), 45.46 (Azi-CH-CO₂Me), 48.27 (Azi-CH-Ph), 51.65 (CO₂CH₃), 69.40 (N-CH), 126.74, 127.20, 127.56, 127.86, 128.04, 128.50 (Ar-CH), 135.51 (Ar-C_q-Azi), 143.63 (Ar-C_q-CHCH₃), 168.43 (CO₂Me).

15.2.7 (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-3-Phenyl-1-((*S*)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonsäuremethylester (A-27)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 1.98 ml (23.3 mmol) (*S*)-1-Phenylethylamin, 4.30 ml (31.0 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [13/1].

Ausbeute: 1.07 g, 3.81 mmol, 25 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

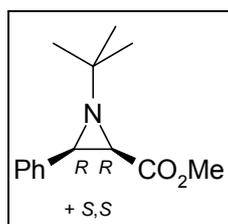
[α]_D^{20 °C}: 34.5° [c = 0.74, CHCl₃].

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2961 (w, C-H), 1740 (s, CO₂Me), 1440 (w, Ph), 1200 (s, CO₂Me), 737 (m, Ph), 695 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.53 (d, 3H, N-CHCH₃, J = 6.5 Hz), 2.53 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, J = 6.8 Hz), 2.91 (q, 1H, N-CH, J = 6.6 Hz), 3.12 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.9 Hz), 3.43 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.27-7.52 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 23.90 (N-CHCH₃), 45.47 (Azi-CH-CO₂Me), 48.27 (Azi-CH-Ph), 51.65 (CO₂CH₃), 69.40 (N-CH), 126.74, 127.20, 127.55, 127.86, 128.04, 128.50, 130.34 (Ar-CH), 135.52 (Ar-C_q-Azi), 143.63 (Ar-C_q-CHCH₃), 168.42 (CO₂Me).

15.2.8 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-*tert*-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-29)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 5.84 ml (55.9 mmol) *tert*-Butylamin, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [15/1].

Ausbeute: 495 mg, 2.12 mmol, 14 %, gelbes Öl.

R_f: 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

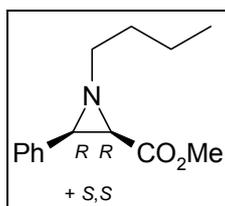
$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -0.4° [c = 0.82, CHCl₃].

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2967 (m, C-H), 1752 (s, CO₂Me), 1439 (m, Ph), 1198 (s, CO₂Me), 730 (m, Ph), 698 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.11 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 2.72 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, *J* = 6.6 Hz), 3.20 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.6 Hz), 3.46 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.19-7.45 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.34 (^tBu-CH₃), 39.19 (Azi-CH-CO₂Me), 41.29 (Azi-CH-Ph), 51.70 (CO₂CH₃), 53.76 (N-C(CH₃)), 127.30, 127.86, 127.91 (Ar-CH), 136.28 (Ar-C_q), 169.60 (CO₂Me).

15.2.9 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-30)



Methode: A1 (13 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 5.84 ml (55.9 mmol) *n*-Butylamin, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [15/1].

Ausbeute: 2.57 g, 11.0 mmol, 71 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

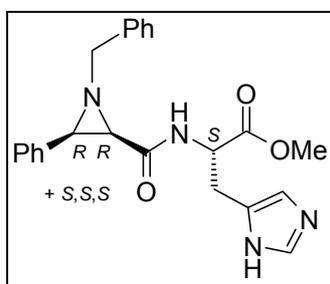
$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: 0.1° [c = 0.80, CHCl₃].

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2868 (w, C-H), 1750 (s, CO₂Me), 1439 (m, Ph), 1172 (s, CO₂Me), 736 (m, Ph), 696 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.92 (t, 3H, Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, J = 7.3 Hz), 1.35-1.46 (m, 2H, Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 1.58-1.75 (m, 2H, Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.31 (m, 1H, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.50 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}_2\text{Me}$, J = 6.8 Hz), 2.78 (m, 1H, $\text{N-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.89 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$, J = 6.8 Hz), 3.47 (s, 3H, $\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 7.20-7.40 (m, 5H, Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.10 (Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.51 (Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 31.53 (Bu- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45.92 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}_2\text{Me}$), 48.16 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 51.78 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 60.64 ($\text{N-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 127.46, 127.78, 127.97 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.46 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 168.94 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Me}$).

15.2.10 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-(3H-imidazol-4-yl)-propionsäuremethylester (A-41)



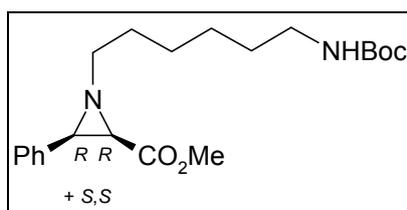
Methode: B1 (7 d, 2 °C).

1.30 g (5.00 mmol) **Li-A-05**, 1.21 g (5.00 mmol) His-OMe, 1.19 ml (5.50 mmol) DPPA, 1.46 ml (10.5 mmol) NEt_3 , 25 ml DMF_{abs} .

SC (Chloroform/Methanol [9/1]).

Ausbeute: 833 mg, 2.06 mmol, 37 %, gelbes Harz, keine weitere Charakterisierung, das Produkt wurde nach Methode C1 hydrolysiert und in der Synthese von **BocA-48** eingesetzt (s. Kap. 15.6.7, S. 214).

15.2.11 (2R,3R)+(2S,3S)-1-(6-tert-Butoxycarbonylaminohexyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-49)



Methode: A1 (21 d, RT).

5.80 g (18.0 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 4.28 g (19.8 mmol) *N*-Boc-

1,6-hexandiamin, 7.49 ml (54.0 mmol) NEt_3 , 150 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [8/1].

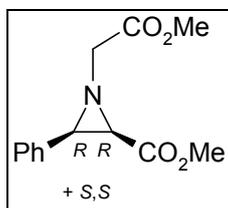
Ausbeute: 3.62 g, 9.62 mmol, 53 %, oranges Öl.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.29-1.75 (m, 8H, Hex- CH_2), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.30 (m, 1H, $N\text{-CH}_2$), 2.49 (d, 1H, Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$, $J = 6.8$ Hz), 2.74 (m, 1H, $N\text{-CH}_2$), 2.88 (d, 1H, Azi- CH-Ph , $J = 6.8$ Hz), 3.09 (d, 2H, Hex- $\text{CH}_2\text{-MHBoc}$), 3.47 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.48 (s, 1H, $N\text{HBoc}$), 7.20-7.41 (m, 5H, Ar- CH).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.81-30.09 (4C, Hex- CH_2), 28.57 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.64 (Hex- $\text{CH}_2\text{-MHBoc}$), 46.02 (Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$), 48.25 (Azi- CH-Ph), 51.88 (CO_2CH_3), 60.85 ($N\text{-CH}_2$), 79.17 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.58, 127.85, 128.07 (Ar- CH), 135.48 (Ar- C_q), 156.11 (Boc- C=O), 168.95 (CO_2Me).

15.2.12 (2R,3R)+(2S,3S)-1-Methoxycarbonylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-50)



Methode: A1 (15 d, RT).

4.83 g (15.0 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 3.14 g (22.5 mmol) Glycine-esterhydrochlorid, 7.27 ml (52.5 mmol) NEt_3 , 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

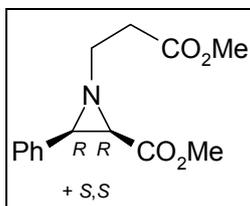
Ausbeute: 778 mg, 3.12 mmol, 21 %, oranges Öl.

R_f: 0.14 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.67 (d, 1H, Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$, $J = 7.1$ Hz), 3.08 (d, 1H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 3.33 (m, 1H, $N\text{-CH}_2$), 3.48 (s, 3H, Azi- CO_2CH_3), 3.51 (m, 1H, $N\text{-CH}_2$), 3.75 (s, 3H, CO_2CH_3), 7.22-7.44 (m, 5H, Ar- CH).

¹³C-NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 45.46 (Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$), 48.10 (Azi- CH-Ph), 52.05 (Azi- CO_2CH_3), 52.19 (CO_2CH_3), 60.14 ($N\text{-CH}_2$), 127.80-128.55 (Ar- CH), 134.44 (Ar- C_q), 168.21 (Azi- CO_2Me), 169.77 (Methyl- CO_2Me).

15.2.13 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-51)



Methode: A1 (18 d, RT).

4.83 g (15.0 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 2.76 g (19.8 mmol) β -Alaninmethylesterhydrochlorid, 7.27 ml (52.5 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

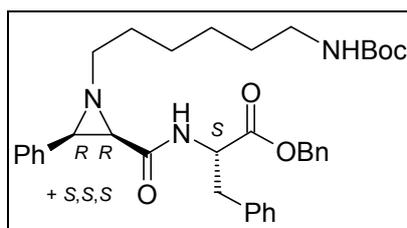
Ausbeute: 1.24 g, 4.71 mmol, 31 %, rotbraunes Öl.

R_f: 0.15 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.60 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, J = 7.0 Hz), 2.70 (m, 1H, N-CH₂), 2.73 (m, CH₂-CO₂Me), 2.99 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 3.06 (m, 1H, N-CH₂), 3.47 (s, 3H, Azi-CO₂CH₃), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.21-7.36 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 34.30 (CH₂-CO₂Me), 45.82 (Azi-CH-CO₂Me), 48.14 (Azi-CH-Ph), 51.70 (Azi-CH-CO₂CH₃), 51.82 (Ethyl-CO₂CH₃), 55.52 (N-CH₂), 127.56-127.95 (Ar-CH), 134.88 (Ar-C_q), 168.41 (Azi-CO₂Me), 172.29 (CO₂Me).

15.2.14 (S)-2-[(2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-(6-*tert*-Butoxycarbonylamino)hexyl]-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino}-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-52)



Methode: B1 (8 d, 2 °C).

1.00 (2.71 mmol) Li-A-49, 0.80 g (2.71 mmol) Phe-OBn⁺HCl, 0.64 ml (2.98 mmol)

DPPA, 0.83 ml (5.96 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

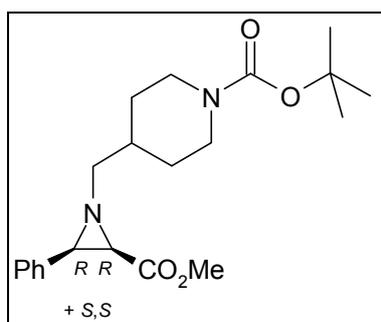
Ausbeute: 923 mg, 1.54 mmol, 57 %, gelbes Öl.

R_f: 0.29 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.29-1.71 (m, 8H, Hex-CH₂), 1.43 (s, 18H, 2 x C(CH₃)₃), 2.23, 2.50 (m, 2 x 1H, Phe-β-CH₂), 2.42, 2.44 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, *J* = 7.4 Hz), 2.46, 2.60 (m, 2 x 1H, *N*-CH₂), 2.92, 2.96 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.05 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 3.11 (m, 2H, Hex-CH₂-MHBoc), 4.54 (m, 2H, 2 x Phe-α-CH), 4.92, 5.15 (s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.78, 6.86 (2 x d, 2 x 1H, *NH*, *J* = 8.2 Hz), 6.94-7.40 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.76-30.18 (4C, Hex-CH₂), 28.59 (C(CH₃)₃), 37.96, 38.42 (Phe-β-CH₂), 40.83 (Hex-CH₂-MHBoc), 46.39, 46.99 (Azi-CH-CO₂Me), 47.90, 48.09 (Azi-CH-Ph), 52.66, 52.82 (Phe-α-CH), 59.70, 59.76 (*N*-CH₂), 66.88, 67.01 (OBn-CH₂), 79.02 (C(CH₃)₃), 126.94-129.53 (Ar-CH), 135.00-135.91 (6 x Ar-C_q), 167.77-171.62 (6 x C=O).

15.2.15 4-((2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-2-Methoxycarbonyl-3-phenylaziridin-1-ylmethyl)-piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (A-53)



Methode: A1 (18 d, RT).

4.19 g (13.0 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 3.06 g (14.3 mmol) *tert*-Butyl-4-(aminomethyl)piperidin-1-carboxylat, 3.78 ml (27.3 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

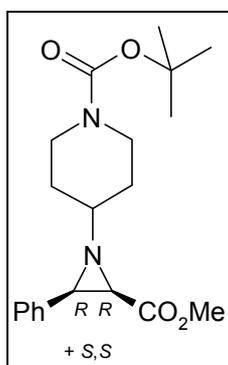
Ausbeute: 2.45 g, 6.80 mmol, 52 %, gelbes Harz.

R_f: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.20 (m, 1H, Pip- $\underline{\text{CH}}$), 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 1.82 (m, 4H, Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 2.25 (m, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}_2$ -Pip), 2.49 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}$ - CO_2Me , $J = 6.8$ Hz), 2.67 (m, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}_2$ -Pip), 2.87 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}$ -Ph, $J = 6.8$ Hz), 3.47 (s, 3H, $\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_3$), 4.11 (m, 4H, Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 7.23-7.39 (m, 5H, Ar- $\underline{\text{CH}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.60 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 30.54 (Pip- $\underline{\text{CH}}$), 37.00 (Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 43.97 (Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 46.28 (Azi- $\underline{\text{CH}}$ - CO_2Me), 48.40 (Azi- $\underline{\text{CH}}$ -Ph), 51.88 ($\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_3$), 66.65 (Azi- $\underline{\text{CH}}_2$ -Pip), 79.41 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.65, 127.82, 128.09 (Ar- $\underline{\text{CH}}$), 135.16 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 154.97 (Pip- $\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 168.67 (Azi- $\underline{\text{CO}}_2\text{Me}$).

15.2.16 4-((2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-2-Methoxycarbonyl-3-phenylaziridin-1-yl)-piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (A-54)



Methode: A1 (18 d, RT).

4.44 g (13.8 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 3.06 g (15.2 mmol) *tert*-Butyl-4-aminopiperidin-1-carboxylat, 4.02 ml (29.0 mmol) NEt_3 , 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

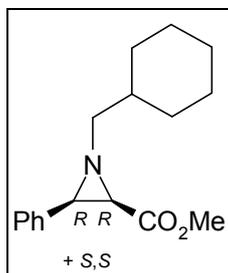
Ausbeute: 1.62 g, 4.33 mmol, 31 %, oranges Harz.

R_f : 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 1.75 (m, 1H, Pip- $\underline{\text{CH}}$), 2.55 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}$ - CO_2Me , $J = 6.8$ Hz), 2.99 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{CH}}$ -Ph, $J = 6.8$ Hz), 3.07 (m, 4H, Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 3.47 (s, 3H, $\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_3$), 3.95 (m, 4H, Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 7.22-7.39 (m, 5H, Ar- $\underline{\text{CH}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.61 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 30.90 (Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 41.78 (Pip- $\underline{\text{CH}}_2$), 44.92 (Azi- $\underline{\text{CH}}$ - CO_2Me), 47.24 (Azi- $\underline{\text{CH}}$ -Ph), 51.91 ($\text{CO}_2\underline{\text{CH}}_3$), 65.80 (Pip- $\underline{\text{CH}}$), 79.63 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.70, 127.83, 128.14 (Ar- $\underline{\text{CH}}$), 135.40 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 155.00 (Pip- $\underline{\text{CO}}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 168.74 (Azi- $\underline{\text{CO}}_2\text{Me}$).

15.2.17 (2R,3R)+(2S,3S)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-55)



Methode: A1 (1 d, 75 °C).

3.0 g (9.32 mmol) 2,3-Dibromzimtsäureethylester, 1.33 ml (10.3 mmol), 1-Cyclohexylmethylamin, 2.33 ml (16.8 mmol) NEt_3 , 50 ml Methanol.

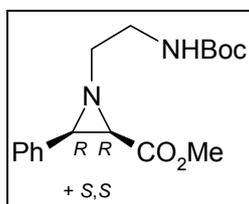
SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9/1].

Ausbeute: 1.05 g, 3.84 mmol, 41 %, gelbes Harz.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.93-1.31 (m, 5H, Cy-CH_2), 1.64-1.90 (m, 6H, Cy-CH_2 , Cy-CH), 2.18, 2.60 (m, 2 x 1H, CH_2Cy), 2.46 (d, 1H, $\text{Azi-CH-CO}_2\text{Me}$, $J = 6.8$ Hz), 2.86 (d, 1H, Azi-CH-Ph , $J = 6.8$ Hz), 3.46 (s, 3H, CO_2CH_3), 7.21-7.41 (m, 5H, Ar-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.35, 26.89, 31.82 (Cy-CH_2), 38.76 (Cy-CH), 46.43 ($\text{Azi-CH-CO}_2\text{Me}$), 48.70 (Azi-CH-Ph), 52.01 (CO_2CH_3), 68.06 (CH_2Cy), 127.68, 128.12, 128.21 (Ar-CH), 135.74 (Ar-C_q), 169.19 (CO_2Me).

15.2.18 (2R,3R)+(2S,3S)-1-(2-tert-Butoxycarbonylaminoethyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-64)



Methode: A1 (15 d, RT).

3.16 g (9.82 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 1.72 g (10.8 mmol) *N*-Boc-1,2-ethandiamin, 4.08 ml (29.5 mmol) NEt_3 , 75 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [8/1].

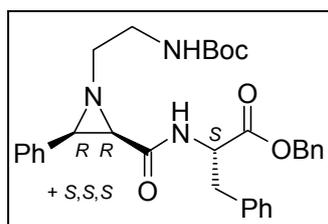
Ausbeute: 1.65 g, 5.15 mmol, 52 %, gelbes Öl.

R_f: 0.11 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.57, 2.79 (m, 2H, N-CH₂), 2.58 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, J = 6.8 Hz), 2.97 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 3.40 (m, 2H, CH₂-NHBoc), 3.50 (s, 3H, CO₂CH₃), 5.07 (s, 1H, NHBoc), 7.22-7.39 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.50 (C(CH₃)₃), 40.30 (CH₂-NHBoc), 45.88 (Azi-CH-CO₂Me), 47.81 (Azi-CH-Ph), 51.94 (CO₂CH₃), 59.39 (N-CH₂), 79.42 (C(CH₃)₃), 127.69, 127.74, 128.13 (Ar-CH), 135.95 (Ar-C_q), 156.01 (Boc-C=O), 168.45 (CO₂Me).

15.2.19 (S)-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-1-(2-tert-Butoxycarbonylaminoethyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino}-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-68)



Methode: B1 (16 d, 2 °C).

804 mg (2.58 mmol) **Li-A-64**, 751 mg (2.58 mmol) Phe-OBn*HCl, 0.67 ml (3.09 mmol) DPPA, 0.79 ml (5.67 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 1.26 g, 2.32 mmol, 90 %, hellgelbes Harz.

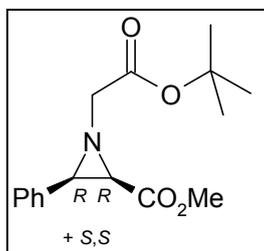
R_f: 0.13 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.46, 1.47 (2 x s, 18H, 2 x C(CH₃)₃), 2.36, 2.59, 3.01 (m, 4H, 2 x Phe-β-CH₂), 2.42, 2.44 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-CO₂Me, J = 7.2 Hz), 2.67 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 2.97, 3.03 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.32 (m, 2 x 2H, CH₂-NHBoc), 4.55 (m, 2H, 2 x Phe-α-CH), 4.93, 5.03 (s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.70 (m, 2H, 2 x NH), 6.97-7.36 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.55 (C(CH₃)₃), 38.19 (Phe-β-CH₂), 40.64 (CH₂-NHBoc), 46.68, 47.16 (Azi-CH-CO₂Me), 47.50, 48.07 (Azi-CH-Ph), 52.64, 52.77 (Phe-α-CH), 58.77, 59.15 (N-CH₂), 66.92, 67.18 (OBn-CH₂), 79.73 (C(CH₃)₃),

127.05-129.48 (Ar-CH), 135.08-135.83 (6 x Ar-C_q), 166.95-171.51 (6 x C=O).

15.2.20 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-*tert*-Butoxycarbonylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-69)



Methode: A1 (15 d, RT).

4.05 g (12.6 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 1.82 g (13.9 mmol) Glycin-*tert*-butylester, 4.42 ml (31.5 mmol) NEt₃, 90 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [8/1].

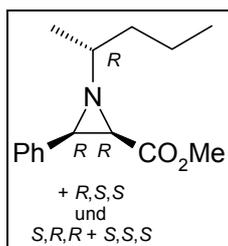
Ausbeute: 527 g, 1.81 mmol, 14 %, gelbes Harz.

R_f: 0.24 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.63 (d, 1H, Azi-CH-CO₂Me, *J* = 7.1 Hz), 3.06 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 3.17, 3.44 (m, 2H, *N*-CH₂), 3.48 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.22-7.46 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.19 (C(CH₃)₃), 45.52 (Azi-CH-CO₂Me), 48.23 (Azi-CH-Ph), 51.99 (CO₂CH₃), 61.36 (*N*-CH₂), 81.92 (C(CH₃)₃), 127.72, 127.97, 128.04 (Ar-CH), 134.71 (Ar-C_q), 168.34, 168.42 (2 x C=O).

15.2.21 1-(1-Methylbutyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-70a+b)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 2.01 ml (17.1 mmol)

2-Aminopentan (*rac.*), 4.51 ml (32.6 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

Die zueinander diastereomeren Enantiomerenpaare (*R,R,R/S,S,S* & *R,S,S/S,R,R*) wurden säulenchromatographisch getrennt:

A-70a

Ausbeute: 645 mg, 2.61 mmol, 31 %, orangefarbenes Öl.

R_f: 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.96 (t, 3H, CH₂CH₃, *J* = 7.3 Hz), 1.24 (d, 3H, CH₃CH, *J* = 6.0 Hz), 1.42 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.56, 1.73 (m, 2H, CHCH₂), 1.70 (m, 1H, CH₃CH), 2.57 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.9 Hz), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.49 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.25-7.41 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.50 (CH₂CH₃), 19.62 (CH₂CH₃), 20.00 (CH₃CH), 38.78 (CHCH₂), 46.18 (Azi-CH-CO), 46.78 (Azi-CH-Ph), 51.88 (CO₂CH₃), 65.58 (CH₃CH), 127.51, 127.90, 128.09 (Ar-CH), 135.86 (Ph-C_q), 169.16 (CO₂CH₃).

A-70b

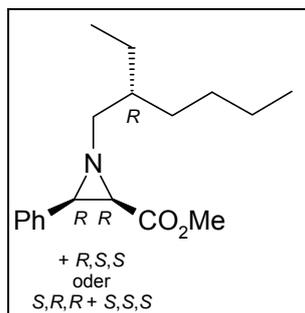
Ausbeute: 546 mg, 2.21 mmol, 26 %, orangefarbenes Öl.

R_f: 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₂CH₃, *J* = 7.4 Hz), 1.22 (d, 3H, CH₃CH, *J* = 6.0 Hz), 1.35 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.60 (m, 2H, CHCH₂), 1.68 (m, 1H, CH₃CH), 2.47 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.8 Hz), 2.97 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.8 Hz), 3.46 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.21-7.40 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.49 (CH₂CH₃), 19.45 (CH₂CH₃), 19.54 (CH₃CH), 39.03 (CHCH₂), 44.76 (Azi-CH-CO), 48.58 (Azi-CH-Ph), 51.86 (CO₂CH₃), 65.76 (CH₃CH), 127.51, 127.91, 128.06 (Ar-CH), 135.76 (Ph-C_q), 169.23 (CO₂CH₃).

15.2.22 1-(2-Ethylhexyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-71)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 2.79 ml (17.1 mmol) 2-Ethyl-1-hexylamin (*rac.*), 4.51 ml (32.6 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

Es konnte nur eines der Diastereomerenpaare als Racemat isoliert werden.

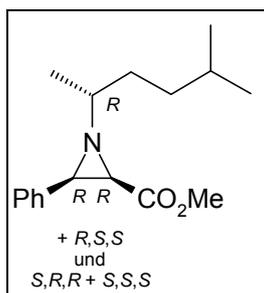
Ausbeute: 2.83 g, 9.78 mmol, 63 %, braunes Öl.

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.89 (m, 2 x 6H, CH₂CH₂CH₃, CH₃CHCH₂), 1.26-1.64 (m, 2 x 9H, CH₃CH₂CHCH₂CH₂CH₂CH₃), 2.27, 2.63 (2 x m, 2 x 2H, Azi-N-CH₂), 2.47 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, J = 6.8 Hz), 2.87 (d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.9 Hz), 3.47 (s, 6H, CO₂CH₃), 7.20-7.41 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 11.08 (CH₃CHCH₂), 14.20 (CH₂CH₂CH₃), 23.12 (CH₂CH₂CH₃), 24.69 (CH₃CH₂CH), 28.96 (CH₂CH₂CH₃), 31.27 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 39.98 (CH₃CH₂CH), 46.36 (Azi-CH-CO), 48.51 (Azi-CH-Ph), 51.75 (CO₂CH₃), 64.42 (Azi-N-CH₂), 127.45, 127.96, (Ar-CH), 135.65 (Ph-C_q), 169.10 (CO₂CH₃).

15.2.23 1-(1,4-Dimethylpentyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-72a+b)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 2.58 ml (17.1 mmol) 2-Amino-5-methylhexan (*rac.*), 4.51 ml (32.6 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

Die zueinander diastereomeren Enantiomerenpaare (*R,R,R/S,S,S* & *R,S,S/S,R,R*) wurden säulenchromatographisch getrennt:

A-72a

Ausbeute: 896 mg, 3.25 mmol, 38 %, orangefarbenes Öl.

R_f: 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.90 (d, 6H, CH(CH₃)₂, *J* = 6.5 Hz), 1.22 (d, 3H, CH₃CH, *J* = 5.8 Hz), 1.24 (m, 2H, CH₃CHCH₂CH₂), 1.54 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.51-1.68 (m, 2H, CH₃CHCH₂), 1.63 (m, 1H, CH₃CH), 2.54 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.9 Hz), 2.92 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 3.47 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.23-7.39 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 19.92 (CH₃CH), 22.52, 23.00 (CH(CH₃)₂), 28.44 (CH(CH₃)₂), 34.20 (CH₃CHCH₂), 35.48 (CH₃CHCH₂CH₂), 46.08 (Azi-CH-CO), 46.92 (Azi-CH-Ph), 51.88 (CO₂CH₃), 66.13 (CH₃CHCH₂), 127.51, 127.91, 128.09 (Ar-CH), 135.86 (Ph-C_q), 169.16 (CO₂CH₃).

A-72b

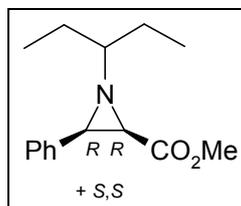
Ausbeute: 733 mg, 2.66 mmol, 31 %, orangefarbenes Öl.

R_f: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.84 (d, 3H, CH(CH₃)₂, *J* = 6.6 Hz), 0.85 (d, 3H, CH(CH₃)₂, *J* = 6.5 Hz), 1.21 (m, 2H, CH₃CHCH₂CH₂), 1.22 (d, 3H, CH₃CH, *J* = 5.8 Hz), 1.50 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.45-1.68 (m, 2H, CH₃CHCH₂), 1.64 (m, 1H, CH₃CH), 2.47 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.9 Hz), 2.98 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.9 Hz), 3.46 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.21-7.39 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 19.42 (CH₃CH), 22.54, 22.86 (CH(CH₃)₂), 28.33 (CH(CH₃)₂), 34.45 (CH₃CHCH₂), 35.37 (CH₃CHCH₂CH₂), 44.74 (Azi-CH-CO), 48.58 (Azi-CH-Ph), 51.86 (CO₂CH₃), 66.18 (CH₃CHCH₂), 127.51, 127.91, 128.05 (Ar-CH), 135.78 (Ph-C_q), 169.25 (CO₂CH₃).

15.2.24 (2R,3R)+(2S,3S)-1-(1-Ethylpropyl)-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-73)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 1.98 ml (17.1 mmol) 3-Pentylamin, 4.51 ml (32.6 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

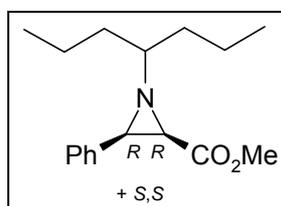
Ausbeute: 884 mg, 3.57 mmol, 23 %, orangefarbenes Öl.

R_f: 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.93 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.5 Hz), 0.99 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 15.2 Hz), 1.51 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 1.66 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.51 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 6.8 Hz), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 3.47 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.20-7.41 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 10.51 (CH₂CH₃), 26.47, 26.76 (CH₂CH₃), 45.56 (Azi-CH-CO), 47.40 (Azi-CH-Ph), 51.83 (CO₂CH₃), 72.28 (CH₂CHCH₂), 127.46, 127.95, 128.02 (Ar-CH), 135.83 (Ph-C_q), 169.20 (CO₂CH₃).

15.2.25 (2R,3R)+(2S,3S)-3-Phenyl-1-(1-propylbutyl)-aziridin-2-carbonsäuremethylester (A-74)



Methode: A1 (15 d, RT).

5.00 g (15.5 mmol) 2,3-Dibromzimtsäuremethylester, 2.55 ml (17.1 mmol) 4-Heptylamin, 4.51 ml (32.6 mmol) NEt₃, 100 ml Methanol.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [20/1].

Ausbeute: 1.10 g, 4.01 mmol, 26 %, orangefarbenes Öl.

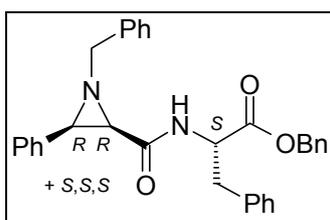
R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [5/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.86 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 14.6 Hz), 0.94 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.3 Hz), 1.40 (m, 4H, CH₃CH₂), 1.60 (m, 5H, CH₂CHCH₂, CH₂CHCH₂, CH₂CHCH₂), 2.51 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 6.8 Hz), 2.93 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.9 Hz), 3.47 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.22-7.43 (m, 5H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.64, 14.69 (CH₂CH₃), 19.44 (CH₂CH₃), 36.74, 37.06 (CH₂CHCH₂), 45.72 (Azi-CH-CO), 47.47 (Azi-CH-Ph), 51.84 (CO₂CH₃), 69.52 (CH₂CHCH₂), 127.46, 127.93, 128.04, 128.21, 128.58 (Ar-CH), 135.85 (Ph-C_q), 169.20 (CO₂CH₃).

15.3 Aziridin-Endstufen

15.3.1 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-07)



Methode: B1 (20 d, 2 °C).

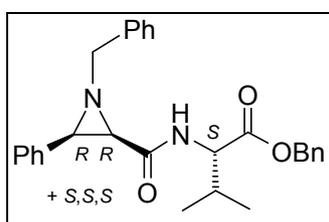
259 mg (1.00 mmol) **Li-A-05**, 292 mg (1.00 mmol) Phe-OBn·HCl, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 447 mg, 0.91 mmol, 91 %, hellgelbes Harz.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[303]

15.3.2 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-methylbutansäurebenzylester (A-08)



Methode: B1 (20 d, 2 °C).

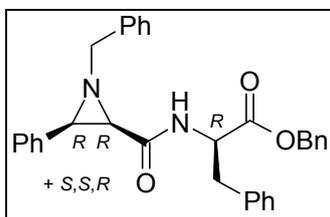
259 mg (1.00 mmol) **Li-A-05**, 380 mg (1.00 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 359 mg, 0.81 mmol, 81 %, hellgelbes Harz.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[303]

15.3.3 (R)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-28)



Methode: B1 (21 d, 2 °C).

244 mg (0.94 mmol) **Li-A-05**, 423 mg (0.99 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 0.23 ml (1.03 mmol) DPPA, 0.14 ml (0.99 mmol) NEt₃, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 292 mg, 0.60 mmol. 63 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: 9.6° [c = 0.80, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₀N₂O₃, 490.61; gef.: 491.4 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 22.9 min (100 %).

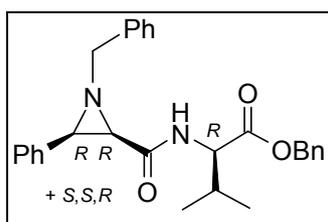
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3263 (w, CO-NH), 2932 (w, C-H), 1739 (m, CO₂Bn), 1673 (s, CO-NH), 1505 (m, Ph), 1173 (m, CO₂Bn), 738 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.23 (m, 1H, Phe-β-CH₂), 2.52 (m, 1H, Phe-β-CH₂), 2.64 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO-NH, J = 7.0 Hz, 7.0 Hz), 2.94 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 3.15 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.54 (m, 1H, N-CH₂), 3.73 (m, 2H, N-CH₂), 3.94 (m 1H, N-CH₂), 4.52 (m, 2H, Phe-α-CH), 4.89 (s, 2H, OBn-CH₂), 4.99 (s, 2H, OBn-CH₂), 7.05-7.42 (m, 40H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 38.26, 38.45 (Phe-β-CH₂), 46.04, 46.67 (Azi-CH-

CO-NH), 47.75, 47.99 (Azi-CH-Ph), 52.64, 52.75 (Phe- α -CH), 63.20, 63.38 (*N*-CH₂), 66.75, 66.91 (OBn-CH₂), 126.88-129.34 (Ar-CH), 135.54 (Ar-C_q-Azi), 135.16 (Ar-C_q-OBn), 135.77 (Ar-C_q-Phe), 137.72 (Ar-C_q-*N*-CH₂Ph), 167.07, 167.42 (CO-NH), 170.27, 171.13 (CO₂Bn).

15.3.4 (R)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-31)



Methode: B1 (21 d, 2 °C).

389 mg (1.50 mmol) **Li-A-05**, 311 mg (1.50 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 0.36 ml (1.65 mmol) DPPA, 0.44 ml (3.15 mmol) NEt₃, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 261 mg, 0.59 mmol, 39 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: 13.4° [c = 0.88, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₀N₂O₃, 442.56; gef.: 443.3 [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 22.2 min (59.2 %); dia b: R_t = 22.6 min (40.8 %); Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3391 (w, CO-NH), 2964 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1674 (m, CO-NH), 1511 (w, Ph), 1186 (m, CO₂Bn), 1147 (m, CO₂Bn), 738 (m, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.70, 0.73 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, *J* = 6.9 Hz), 1.95 (m, 1H, Val- β -CH), 2.64 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 3.17 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.4 Hz), 3.57, 3.97 (2 x d, 2H, *N*-CH₂-Ph), 4.18 (m, 1H, Val- α -CH), 4.96 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.88 (d, 1H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.11-7.43 (m, 15H, Ar-CH).

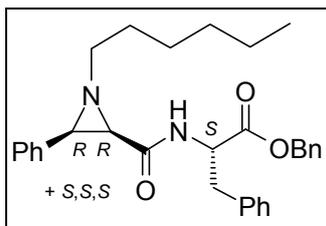
dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.22, 0.36 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, *J* = 6.8 Hz), 1.72 (m, 1H, Val- β -CH), 2.64 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 3.19 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 8.5 Hz), 3.65, 3.92 (2 x d, 2H, *N*-CH₂-Ph), 4.34 (m, 1H, Val- α -CH), 5.13 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.78 (d, 1H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.11-7.43 (m, 15H, Ar-CH).

Ar-CH).

^{13}C -NMR: dia a: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.69, 18.72 (Val- γ -CH₃), 31.86 (Val- β -CH), 46.97 (Azi-CH-CO-NH), 48.18 (Azi-CH-Ph), 56.48 (Val- α -CH), 63.41 (N-CH₂), 66.63 (OBn-CH₂), 127.50-128.75 (Ar-CH), 134.78 (Ar-C_q-Azi), 135.59 (Ar-C_q-OBn), 137.82, 137.97 (Ar-C_q-N-CH₂-Ph), 167.28 (CO-NH), 170.79 (CO₂Bn).

dia b: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.08, 18.28 (Val- γ -CH₃), 31.27 (Val- β -CH), 46.66 (Azi-CH-CO-NH), 48.03 (Azi-CH-Ph), 56.76 (Val- α -CH), 63.41 (N-CH₂), 66.96 (OBn-CH₂), 127.50-128.75 (Ar-CH), 134.78 (Ar-C_q-Azi), 135.59 (Ar-C_q-OBn), 137.82, 137.97 (Ar-C_q-N-CH₂-Ph), 167.72 (CO-NH), 171.61 (CO₂Bn).

15.3.5 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Hexyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenylpropansäurebenzylester (A-32)



Methode: B1 (18 d, 2 °C).

380 mg (1.50 mmol) **Li-A-25**, 438 mg (1.50 mmol) Phe-OBn*HCl, 0.36 ml (1.65 mmol) DPPA, 0.44 ml (3.15 mmol) NEt_3 , 20 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 446 mg, 0.92 mmol, 61 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ °C}}$: -12.0° [c = 1.01, CHCl_3].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$, 484.64; gef.: 485.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: R_t = 24.6 min (100 %).

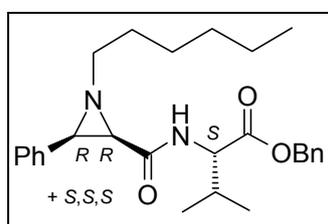
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3387 (w, CO-NH), 2964 (m, C-H), 2857 (w, C-H), 1741 (m, CO₂Bn), 1674 (m, CO-NH), 1506 (w, Ph), 1176 (m, CO₂Bn), 740 (m, Ph), 697 (s, Ph).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.89-0.93 (m, 2 x 3H, Hex-CH₃), 1.32-1.68 (m, 8 x 2H, Hex-CH₂), 2.23 (m, 1H, Phe- β -CH₂), 2.49 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 2.42, 2.44 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.47-2.56, 2.41-2.64 (m, 2H, N-CH₂-Hex), 2.92, 2.95 (2 x d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.0 Hz), 3.01 (m, 1H, Phe- β -CH₂), 4.49-4.56

(m, 1H, Phe- α -CH), 4.91, 4.98 (s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.80, 6.86 (d, 2 x 1H, NH, $J = 8.3$ Hz, 8.1 Hz), 7.12-7.34 (m, 15H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.21 (Hex-CH₃), 22.70, 27.11, 29.60, 31.88 (Hex-CH₂), 38.43 (Phe- β -CH₂), 46.41, 47.00 (Azi-CH-CO), 47.91, 48.10 (Azi-CH-Ph), 52.66, 52.91 (Phe- α -CH), 59.90 (N-CH₂), 66.85, 66.97 (OBn-CH₂), 127.81-129.53 (Ar-CH), 135.10 (Ar-C_q-Azi), 135.27 (Ar-C_q-OBn), 135.98 (Ar-C_q-Phe), 167.51, 167.90 (CO-NH), 170.46, 171.35 (Phe-C=O).

15.3.6 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Hexyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-33)



Methode: B1 (18 d, 2 °C).

380 mg (1.50 mmol) **Li-A-25**, 569 mg (1.50 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.36 ml (1.65 mmol) DPPA, 0.44 ml (3.15 mmol) NEt₃, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 381 mg, 0.87 mmol, 58 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -8.7° [c = 0.78, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₇H₃₆N₂O₃, 436.60; gef.: 437.4 [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 24.1 min (47.9 %); dia b: R_t = 24.5 min (52.1 %), $\Sigma = 100$ %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3388 (w, CO-NH), 2930 (m, C-H), 2857 (w, C-H), 1738 (m, CO₂Bn), 1676 (m, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1182 (m, CO₂Bn), 1148 (m, CO₂Bn) 738 (m, Ph), 697 (s, Ph).

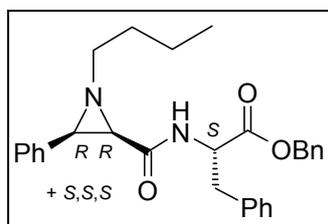
¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.21, 0.36 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, $J = 7.0$ Hz), 0.91 (t, 3H, Hex-CH₃), 1.32-1.62 (m, 4 x 2H, Hex-CH₂), 1.64-1.76 (m, 1H, Val- β -CH), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO, $J = 7.1$ Hz), 2.59-2.68 (m, 1H, N-CH₂-Ph), 2.97 (d, 1H, Azi-CH-Ph, $J = 7.1$ Hz), 4.34 (m, 1H, Val- α -CH), 5.13 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.74 (d, 1H, NH, $J = 9.1$ Hz), 7.13-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.82, 0.84 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 4.8 Hz), 0.91 (t, 3H, Hex-CH₃), 1.32-1.62 (m, 4 x 2H, Hex-CH₂), 1.99 (m, 1H, Val- β -CH), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.48-2.55 (m, 1H, N-CH₂-Ph), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.18 (m, 1H, Val- α -CH), 4.95 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.91 (d, 1H, NH, J = 8.8 Hz), 7.13-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: dia a: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.20 (Hex-CH₃), 17.05, 18.26 (Val- γ -CH₃), 27.08, 27.19, 31.88, 31.93 (Hex-CH₂), 29.67 (Val- β -CH), 46.88 (Azi-CH-CO-NH), 48.07 (Azi-CH-Ph), 56.56 (Val- α -CH), 59.91 (N-CH₂), 66.93 (OBn-CH₂), 127.37-128.68 (Ar-CH), 135.19 (Ar-C_q-Azi), 135.75 (Ar-C_q-OBn), 168.15 (CO-NH), 170.80 (CO₂Bn).

dia b: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.20 (Hex-CH₃), 17.96, 18.83 (Val- γ -CH₃), 27.08, 27.19, 31.88, 31.93 (Hex-CH₂), 29.60 (Val- β -CH), 46.88 (Azi-CH-CO-NH), 48.07 (Azi-CH-Ph), 56.68 (Val- α -CH), 60.04 (N-CH₂), 66.58 (OBn-CH₂), 127.37-128.68 (Ar-CH), 135.19 (Ar-C_q-Azi), 135.60 (Ar-C_q-OBn), 167.83 (CO-NH), 171.70 (CO₂Bn).

15.3.7 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropansäurebenzylester (A-34)



Methode: B1 (18 d, 2 °C).

338 mg (1.50 mmol) **Li-A-30**, 438 mg (1.50 mmol) Phe-OBn·HCl, 0.36 ml (1.65 mmol) DPPA, 0.44 ml (3.15 mmol) NEt₃, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 577 mg, 1.26 mmol, 84 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -11.7° [c = 0.90, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₂N₂O₃, 456.59; gef.: 457.4 [M+H]⁺.

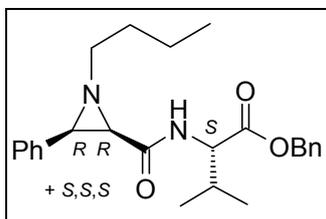
LC-MS: R_t = 23.1 min (100 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2960 (w, C-H), 2920 (w, C-H), 1740 (m, CO₂Bn), 1673 (m, CO-NH), 1506 (m, Ph), 1178 (m, CO₂Bn), 739 (m, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.92-0.97 (m, 2 x 3H, Bu-CH₃), 1.39-1.46 (m, 2 x 2H, Bu-CH₂CH₃), 1.55-1.64 (m, 2 x 2H, Bu-CH₂CH₂CH₃), 2.24, 2.48 (m, 2 x 1H, Phe- β -CH₂), 2.42, 2.44 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 2.42-2.63 (m, 2 x 2H, *N*-CH₂-Bu), 2.92, 2.95 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 3.00 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 4.49-4.56 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.92, 4.98 (s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.80, 6.86 (d, 2 x 1H, NH, *J* = 8.3 Hz, 8.1 Hz), 7.12-7.34 (m, 15H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.20 (Bu-CH₃), 20.57 (Bu-CH₂CH₃), 31.71 (Bu-CH₂CH₂CH₃), 38.41 (Phe- β -CH₂), 46.40, 47.00 (Azi-CH-CO-NH), 47.92, 48.10 (Azi-CH-Ph), 52.66, 52.90 (Phe- α -CH), 59.52 (*N*-CH₂), 66.86, 66.99 (OBn-CH₂), 126.94-129.53 (Ar-CH), 135.08 (Ar-C_q-OBn), 135.26 (Ar-C_q-Azi), 135.90 (Ar-C_q-Phe), 167.52, 167.91 (CO-NH), 170.45 (Phe-C=O).

15.3.8 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-methylbutansäurebenzylester (A-35)



Methode: B1 (18 d, 2 °C).

338 mg (1.50 mmol) **Li-A-30**, 569 mg (1.50 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.36 ml (1.65 mmol) DPPA, 0.44 ml (3.15 mmol) NEt₃, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 417 mg, 1.02 mmol, 68 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -9.6° [c = 0.80, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₅H₃₂N₂O₃, 408.55; gef.: 409.4 (dia a); 409.3 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 22.3 min (46.0 %); dia b: R_t = 22.8 min (54.0 %), Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2960 (m, C-H), 2920 (w, C-H), 1738 (m, CO₂Bn), 1676 (m, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1183 (m, CO₂Bn), 1149 (m, CO₂Bn) 738 (m, Ph),

697 (s, Ph).

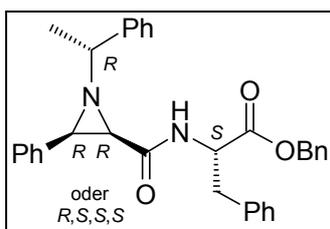
¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.21, 0.36 (2 x d, 2 x 3H, Val-γ-CH₃, J = 6.8 Hz), 0.94-0.98 (m, 3H, Bu-CH₃), 1.43-1.52 (m, 2H, Bu-CH₂CH₃), 1.60-1.66 (m, 2H, Bu-CH₂CH₂CH₃), 1.66-1.76 (m, 1H, Val-β-CH), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.46-2.64 (m, 2H, N-CH₂-Bu), 2.98 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.34 (m, 1H, Val-α-CH), 5.13 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.74 (d, 1H, NH, J = 9.1 Hz), 7.13-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.82, 0.84 (2 x d, 2 x 3H, Val-γ-CH₃, J = 4.8 Hz), 0.94-0.98 (m, 3H, Bu-CH₃), 1.43-1.52 (m, 2H, Bu-CH₂CH₃), 1.60-1.66 (m, 2H, Bu-CH₂CH₂CH₃), 1.97-2.03 (m, 1H, Val-β-CH), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.46-2.64 (m, 2H, N-CH₂-Bu), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.19 (m, 1H, Val-α-CH), 4.95 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.91 (d, 1H, NH, J = 8.8 Hz), 7.13-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: dia a: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.17 (Bu-CH₃), 17.05, 18.26 (Val-γ-CH₃), 20.62 (Bu-CH₂CH₃), 31.24 (Bu-CH₂CH₂CH₃), 31.74 (Val-β-CH), 46.88 (Azi-CH-CO-NH), 48.07 (Azi-CH-Ph), 56.68 (Val-α-CH), 59.57 (N-CH₂), 66.60 (OBn-CH₂), 127.37-128.68 (Ar-CH), 135.19 (Ar-C_q-Azi), 135.59 (Ar-C_q-OBn), 167.79 (CO-NH), 170.80 (CO₂Bn).

dia b: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.17 (Bu-CH₃), 17.93, 18.81 (Val-γ-CH₃), 20.62 (Bu-CH₂CH₃), 31.24 (Bu-CH₂CH₂CH₃), 31.80 (Val-β-CH), 47.03 (Azi-CH-CO-NH), 48.07 (Azi-CH-Ph), 56.68 (Val-α-CH), 59.70 (N-CH₂), 66.95 (OBn-CH₂), 127.37-128.68 (Ar-CH), 135.19 (Ar-C_q-Azi), 135.75 (Ar-C_q-OBn), 168.13 (CO-NH), 170.80 (CO₂Bn).

15.3.9 (S)-3-Phenyl-2-[[[(2R,3R)/(2S,3S)-3-phenyl-1-((R)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino]-propansäurebenzylester (A-36)



Methode: B1 (6 d, 2 °C).

273 mg (1.00 mmol) **Li-A-26**, 292 mg (1.00 mmol) Phe-OBn·HCl, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 415 mg, 0.82 mmol, 82 %, farbloses Harz.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -32.2° [c = 1.03, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₃H₃₂N₂O₃, 504.63; gef.: 505.4 [M+H]⁺.

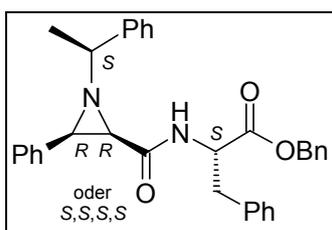
LC-MS: R_t = 23.7 min (100 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3390 (w, CO-NH), 3040 (w, C-H), 1738 (m, CO₂Bn), 1673 (m, CO-NH), 1505 (m, Ph), 1174 (m, CO₂Bn), 739 (m, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.58 (d, 3H, PhCH-CH₃, J = 6.1 Hz), 2.17-2.48 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 2.51 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz), 2.89-2.94 (m, 1H, PhCH-CH₃), 3.18 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.0 Hz), 4.46-4.52 (m, 1H, Phe-α-CH), 4.95 (m, 2H, OBn-CH₂), 6.84 (d, 1H, NH, J = 8.6 Hz), 7.07-7.47 (m, 20H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 23.90 (PhCH-CH₃), 38.60 (Phe-β-CH₂), 45.86 (Azi-CH-CO), 48.08 (Azi-CH-Ph), 52.77 (Phe-α-CH), 66.91 (OBn-CH₂), 69.01 (Azi-CH-CH₃), 126.81-129.19 (Ar-CH), 135.27 (Ar-C_q-OBn), 135.64 (Ar-C_q-Phe), 135.99 (Ar-C_q-Azi), 143.09 (Ar-C_q-CH-CH₃), 167.33 (CO-NH), 171.09 (CO₂Bn).

15.3.10 (S)-3-Phenyl-2-[[[(2R,3R)/(2S,3S)-3-phenyl-1-((S)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino]-propansäurebenzylester (A-37)



Methode: B1 (6 d, 2 °C).

273 mg (1.00 mmol) **Li-A-27**, 292 mg (1.00 mmol) Phe-OBn*HCl, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 389 mg, 0.77 mmol, 77 %, farbloses Harz.

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: 0.0° [c = 0.76, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{33}H_{32}N_2O_3$, 504.63; gef.: 505.4 $[M+H]^+$.

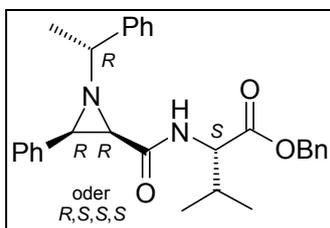
LC-MS: $R_t = 23.6$ min (100 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3391 (w, CO-NH), 3040 (w, C-H), 1740 (m, CO₂Bn), 1673 (m, CO-NH), 1505 (m, Ph), 1175 (m, CO₂Bn), 739 (m, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.53 (d, 3H, PhCH-CH₃), 2.53 (d, 1H, Azi-CH-CO, $J = 6.8$ Hz), 2.77-2.92 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 2.89 (m, 1H, PhCH-CH₃), 3.12 (d, 1H, Azi-CH-Ph, $J = 7.0$ Hz), 4.35 (m, 1H, Phe- α -CH), 4.89 (m, 2H, OBn-CH₂), 6.80 (d, 1H, NH), 7.11-7.35 (m, 20H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 23.31 (PhCH-CH₃), 38.58 (Phe- β -CH₂), 46.35 (Azi-CH-CO), 48.03 (Azi-CH-Ph), 52.87 (Phe- α -CH), 66.85 (OBn-CH₂), 69.08 (Azi-CH-CH₃), 126.94-129.39 (Ar-CH), 135.08 (Ar-C_q-OBn), 135.35 (Ar-C_q-Phe), 135.86 (Ar-C_q-Azi), 143.16 (Ar-C_q-CH-CH₃), 167.24 (CO-NH), 170.38 (CO₂Bn).

15.3.11 (S)-3-Methyl-2-{[(2R,3R)/(2S,3S)-3-phenyl-1-((R)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino}-butansäurebenzylester (A-38)



Methode: B1 (7 d, 2 °C).

273 mg (1.00 mmol) **Li-A-26**, 380 mg (1.00 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 340 mg, 0.74 mmol, 74 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -35.9° [$c = 0.73$, CHCl₃].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{29}H_{32}N_2O_3$, 456.59; gef.: 457.4 (dia a); 457.3 (dia b) $[M+H]^+$.

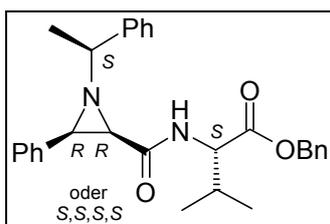
LC-MS: $R_t = 23.5$ min (98.6 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3395 (w, CO-NH), 2965 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1675 (m, CO-NH), 1514 (m, Ph), 1149 (m, CO₂Bn), 737 (m, Ph), 697 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.21, 0.32 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ - CH_3 , J = 6.9 Hz), 1.59 (m, 3H, PhCH- CH_3), 1.65-1.73 (m, 1H, Val- β - CH), 2.51 (d, 1H, Azi- CH-CO , J = 7.1 Hz), 2.95 (m, 1H, PhCH- CH_3), 3.20 (d, 1H, Azi- CH-Ph , J = 6.9 Hz), 4.30 (m, 1H, Val- α - CH), 5.11 (s, 2H, CO_2 - CH_2 -Ph), 6.81 (d, 1H, NH , J = 9.3 Hz), 7.22-7.48 (m, 15H, Ar- CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 16.97, 18.28 (Val- γ - CH_3), 24.04 (PhCH- CH_3), 31.47 (Val- β - CH), 46.30 (Azi- CH-CO), 48.39 (Azi- CH-Ph), 56.58 (Val- α - CH), 66.90 (OBn- CH_2), 69.23 (Azi- CH-CH_3), 126.90-128.76 (Ar- CH), 135.64 (Ar- C_q -OBn), 135.67 (Ar- C_q -Azi), 143.17 (Ar- C_q -CH- CH_3), 167.55 (CO-NH), 171.54 (CO_2 Bn).

15.3.12 (S)-3-Methyl-2-[(2R,3R)/(2S,3S)-3-phenyl-1-((S)-1-phenylethyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino}-butansäurebenzylester (A-39)



Methode: B1 (7 d, 2 °C).

273 mg (1.00 mmol) **Li-A-27**, 380 mg (1.00 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt_3 , 15 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 333 mg, 0.73 mmol, 73 %, farbloses Harz.

R_f : 0.22 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -1.0° [c = 1.01, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$, 456.59; gef.: 457.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: R_t = 23.1 min (100 %).

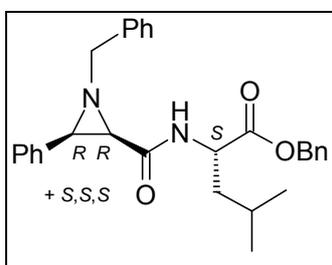
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3393 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO_2 Bn), 1676 (m, CO-NH), 1512 (m, Ph), 1147 (m, CO_2 Bn), 747 (m, Ph), 695 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.66, 0.67 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ - CH_3 , J = 6.9 Hz), 1.59 (d, 3H, PhCH- CH_3 , J = 6.6 Hz), 1.87-1.95 (m, 1H, Val- β - CH), 2.54 (d, 1H, Azi- CH-CO , J = 7.0 Hz), 2.91 (m, 1H, PhCH- CH_3), 3.17 (d, 1H, Azi- CH-Ph ,

$J = 7.1$ Hz), 4.14 (m, 1H, Val- α -CH), 4.96 (m, 2H, CO₂-CH₂-Ph), 6.85 (d, 1H, NH, $J = 9.0$ Hz), 7.16-7.45 (m, 15H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.44, 18.46 (Val- γ -CH₃), 22.98 (PhCH-CH₃), 31.69 (Val- β -CH), 46.46 (Azi-CH-CO), 48.16 (Azi-CH-Ph), 56.20 (Val- α -CH), 66.50 (OBn-CH₂), 68.96 (Azi-CH-CH₃), 126.81-128.66 (Ar-CH), 135.02 (Ar-C_q-OBn), 135.49 (Ar-C_q-Azi), 143.21 (Ar-C_q-CH-CH₃), 167.01 (CO-NH), 170.66 (CO₂Bn).

15.3.13 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-4-methylpentansäurebenzylester (A-40)



Methode: B1 (7 d, 2 °C).

389 mg (1.50 mmol) **Li-A-05**, 590 mg (1.50 mmol) Leu-OBn**p*TosOH, 357 μ l (1.65 mmol) DPPA, 437 μ l (3.15 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 612 mg, 1.34 mmol, 89 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -24.1° [c = 1.02, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₂N₂O₃, 456.59; gef.: 457.4 (dia a); 457.3 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 22.7 min (81.7 %); dia b: R_t = 22.9 min (18.3 %), Σ = 100 %.

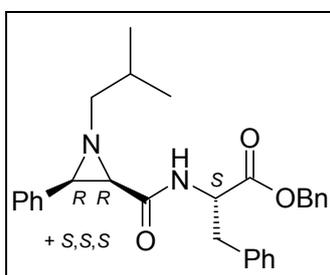
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3389 (w, CO-NH), 2957 (w, C-H), 1739 (m, CO₂Bn), 1673 (s, CO-NH), 1515 (m, Ph), 1152 (m, CO₂Bn), 736 (s, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.53, 0.55 (2 x d, 2 x 3H, Leu- δ -CH₃, $J = 6.2$ Hz), 0.79 (d, 6H, Leu- δ -CH₃, $J = 6.3$ Hz), 0.93, 1.17 (2 x m, 2 x 1H, Leu- β -CH₂), 1.31 (m, 2H, Leu- γ -CH), 1.17 (m, 2H, Leu- β -CH₂), 2.63, 2.64 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, $J = 7.1$ Hz), 3.15, 3.17 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, $J = 7.7$ Hz), 3.64, 3.90 (2 x m, 2 x 2H, N-CH₂-Ph), 4.35 (m, 2H, Leu- α -CH), 4.93 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 5.11 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.60, 6.77 (2 x d, 2 x 1H, NH, $J = 8.8$ Hz), 7.12-7.44 (m, 30H, Ar-

CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 21.32, 22.07 (Leu-δ-CH₃), 23.71, 24.52 (Leu-γ-CH), 41.42, 41.92 (Leu-β-CH₂), 46.20, 46.71 (Azi-CH-CO-NH), 47.80, 48.03 (Azi-CH-Ph), 50.07 (Leu-α-CH), 63.23 (*N*-CH₂), 66.55, 66.84 (OBn-CH₂), 127.37-128.62 (Ar-CH), 135.10 (Ar-C_q-Azi), 135.48 (Ar-C_q-OBn), 137.69 (Ar-C_q-*N*-CH₂-Ph), 166.93 (CO-NH), 172.58 (CO₂Bn).

15.3.14 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Isobutyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenyl-propionsäurebenzylester (A-42)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

225 mg (1.00 mmol) **Li-A-23**, 306 mg (1.05 mmol) Phe-OBn⁺HCl, 238 μl (1.10 mmol) DPPA, 145 μl (1.05 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7/1].

Ausbeute: 93.0 mg, 0.20 mmol, 20 %, farbloses Öl.

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -18.8° [c = 0.97, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₂N₂O₃, 456.59; gef.: 457.4 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 26.8 min (96.3 %).

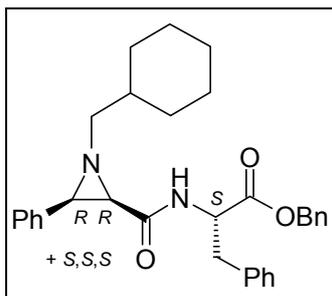
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2956 (w, C-H), 1740 (m, CO₂Bn), 1674 (s, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1175 (m, CO₂Bn), 740 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.98 (m, 2 x 6H, *iso*-butyl-CH₃), 1.87 (m, 2 x 1H, *iso*-butyl-CH), 2.25-2.54 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 2.35 (m, 2H, *iso*-butyl-CH₂), 2.44 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 2.95 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.9 Hz), 3.01 (m, 2H, *iso*-butyl-CH₂), 4.51 (m, 2 x 1H, Phe-α-CH), 4.92, 4.99 (2 x s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.82, 6.89 (2 x d, 2 x 1H, *NH*, *J* = 8.0 Hz), 7.09-7.41 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 21.04 (*iso*-butyl-CH₃), 29.07 (*iso*-butyl-CH), 38.41

(Phe- β -CH₂), 46.64 (Azi-CH-CO), 47.97 (Azi-CH-Ph), 52.74 (Phe- α -CH), 67.03 (OBn-CH₂), 67.89 (*iso*-butyl-CH₂), 127.07-129.53 (Ar-CH), 135.32 (Ar-C_q-OBn), 135.84 (Ar-C_q-Phe), 136.59 (Ar-C_q-Azi), 167.84 (CO-NH), 171.31 (CO₂Bn).

15.3.15 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-43)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

265 mg (1.00 mmol) **Li-A-24**, 306 mg (1.05 mmol) Phe-OBn*HCl, 238 μ l (1.10 mmol) DPPA, 145 μ l (1.05 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9/1].

Ausbeute: 120 mg, 0.24 mmol, 24 %, farbloses Öl.

R_f: 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -10.3° [c = 0.96, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₆N₂O₃, 496.66; gef.: 497.4 [M+H]⁺.

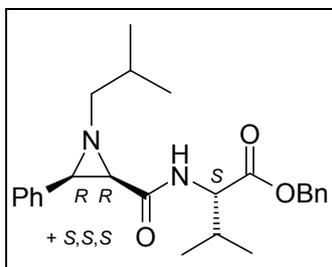
LC-MS: R_t = 24.8 min (95.2 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3384 (w, CO-NH), 2923 (w, C-H), 1741 (m, CO₂Bn), 1675 (s, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1175 (m, CO₂Bn), 740 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.97-1.92 (m, 2 x 11H, Cy-CH_x), 2.24-2.55 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 2.30-2.46 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 2.42 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.90, 2.94 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.01 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 4.50 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.91, 5.00 (2 x s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.81, 6.95 (2 x d, 2 x 1H, NH, J = 7.9 Hz), 6.98-7.39 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.07, 26.60, 31.57 (Cy-CH₂), 38.48 (Cy-CH), 38.55 (Phe- β -CH₂), 46.58 (Azi-CH-CO), 48.01 (Azi-CH-Ph), 52.78 (Phe- α -CH), 66.64 (N-CH₂), 66.91 (OBn-CH₂), 126.88-129.40 (Ar-CH), 135.21 (Ar-C_q-OBn), 135.57 (Ar-C_q-Phe), 135.84 (Ar-C_q-Azi), 167.49 (CO-NH), 170.33 (CO₂Bn).

15.3.16 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Isobutyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-methylbutansäurebenzylester (A-44)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

244 mg (1.08 mmol) **Li-A-23**, 410 mg (1.08 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 257 μ l (1.19 mmol) DPPA, 329 μ l (2.38 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 388 mg, 0.95 mmol, 88 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.24 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D²⁰: -22.8° [c = 0.96, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₅H₃₂N₂O₃, 408.55; gef.: 409.4 (dia a); 409.3 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 22.6 min (53.1 %); dia b: R_t = 23.0 min (46.9 %), Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3391 (w, CO-NH), 2961 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1676 (s, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1149 (m, CO₂Bn), 739 (s, Ph), 697 (s, Ph).

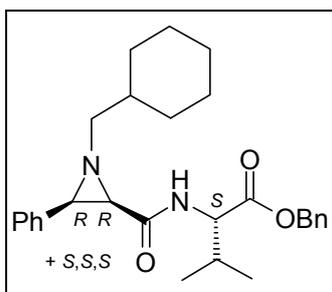
¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.21, 0.38 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 7.0 Hz), 1.00-1.10 (m, 6H, *iso*-butyl-CH₃), 1.75 (m, 1H, Val- β -CH), 1.93 (m, 1H, *iso*-butyl-CH), 2.35-2.49 (m, 2H, N-CH₂), 2.45 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.99 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.35 (m, 1H, Val- α -CH), 5.12 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.76 (d, 1H, NH, J = 9.1 Hz), 7.12-7.39 (m, 10H, Ar-CH).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.83, 0.84 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 5.5 Hz), 1.00-1.10 (m, 6H, *iso*-butyl-CH₃), 1.93 (m, 1H, *iso*-butyl-CH), 2.01 (m, 1H, Val- β -CH), 2.35-2.49 (m, 2H, N-CH₂), 2.50 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.95 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.19 (m, 1H, Val- α -CH), 4.95 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.96 (d, 1H, NH, J = 8.9 Hz), 7.12-7.39 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.02, 17.93, 18.27, 18.83 (Val- γ -CH₃), 20.94, 21.05 (*iso*-butyl-CH₃), 29.13 (*iso*-butyl-CH₂), 31.25 (Val- β -CH), 47.17 (Azi-CH-CO-NH), 48.04 (Azi-CH-Ph), 56.68 (Val- α -CH), 66.97 (OBn-CH₂), 68.02 (N-CH₂),

127.65-128.69 (Ar-CH), 135.08 (Ar-C_q-Azi), 135.56 (Ar-C_q-OBn), 168.07 (CO-NH), 171.66 (CO₂Bn).

15.3.17 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-45)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

168 mg (0.63 mmol) **Li-A-24**, 244 mg (0.63 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 150 μ l (0.69 mmol) DPPA, 183 μ l (1.32 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 183 mg, 0.41 mmol, 65 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -15.3° [c = 1.02, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₆N₂O₃, 448.61; gef.: 449.4 (dia a); 449.4 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 24.3 min (48.4 %); dia b: R_t = 24.6 min (49.7 %), Σ = 98.1 %.

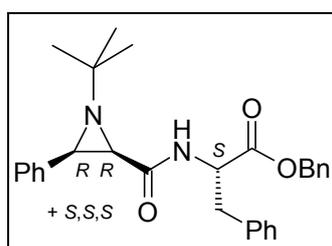
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2925 (w, C-H), 1738 (m, CO₂Bn), 1676 (s, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1148 (m, CO₂Bn), 736 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.22, 0.37 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 6.9 Hz), 0.91-1.97 (m, 11H, Cy-CH_x), 1.72 (m, 1H, Val- β -CH), 2.31-2.53 (m, 2H, N-CH₂), 2.43 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz), 2.98 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.34 (m, 1H, Val- α -CH), 5.12 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.77 (d, 1H, NH, J = 9.1 Hz), 7.12-7.38 (m, 10H, Ar-CH).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.82, 0.84 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 6.9 Hz), 0.91-1.97 (m, 11H, Cy-CH_x), 2.01 (m, 1H, Val- β -CH), 2.31-2.53 (m, 2H, N-CH₂), 2.43 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 6.9 Hz), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 4.20 (m, 1H, Val- α -CH), 4.97 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.96 (d, 1H, NH, J = 8.1 Hz), 7.12-7.38 (m, 10H, Ar-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.07, 17.85, 18.29, 18.81 (Val- γ - CH_3), 26.23, 26.70, 31.70, 31.77 (Cy- CH_x), 37.84 (Val- β - CH), 47.19, 47.51 (Azi- CH-CO-NH), 47.99, 48.21 (Azi- CH-Ph), 56.50 (Val- α - CH), 66.61 (OBn- CH_2), 66.93 (N - CH_2), 127.85-128.69 (Ar- CH), 135.13 (Ar- C_q -Azi), 135.59 (Ar- C_q -OBn), 168.11 (CO-NH), 171.65 (CO_2Bn).

15.3.18 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-tert-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-46)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

225 mg (1.00 mmol) **Li-A-29**, 292 mg (1.00 mmol) Phe-OBn*HCl, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt_3 , 15 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 392 mg, 0.86 mmol, 86 %, gelbes Öl.

R_f: 0.19 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{°C}}$: -20.5° [$c = 1.03$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$, 456.59; gef.: 457.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: R_t = 22.8 min (100 %).

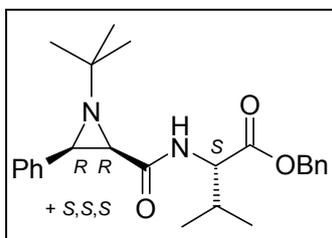
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3379 (w, CO-NH), 2966 (w, C-H), 1740 (m, CO_2Bn), 1673 (s, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1174 (m, CO_2Bn), 740 (s, Ph), 697 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.07 (s, 2 x 9H, (CH_3)₃), 2.24-2.55 (m, 2H, Phe- β - CH_2), 2.68 (d, 2 x 1H, Azi- CH-CO , $J = 6.8$ Hz), 2.95-3.06 (m, 2H, Phe- β - CH_2), 3.21, 3.26 (2 x d, 2 x 1H, Azi- CH-Ph , $J = 6.7$ Hz), 4.53 (m, 2 x 1H, Phe- α - CH), 4.92, 4.98 (2 x s, 2 x 2H, OBn- CH_2), 6.74, 6.98 (2 x m, 2 x 1H, NH), 7.10-7.38 (m, 30H, Ar- CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.58, 26.96 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 38.11 (Phe- β - CH_2), 40.36 (Azi- CH-CO), 41.28 (Azi- CH-Ph), 52.67 (Phe- α - CH), 53.29 (N - $\text{C}(\text{CH}_3)$), 66.75 (OBn- CH_2), 126.82-129.50 (Ar- CH), 135.15 (Ar- C_q -OBn), 135.52 (Ar- C_q -Phe),

135.93 (Ar- \underline{C}_q -Azi), 167.85, 168.26 (\underline{CO} -NH), 170.26, 171.19 (\underline{CO}_2 Bn).

15.3.19 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-tert-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-methylbutansäurebenzylester (A-47)



Methode: B1 (10 d, 2 °C).

225 mg (1.00 mmol) **Li-A-29**, 380 mg (1.00 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 0.24 ml (1.10 mmol) DPPA, 0.31 ml (2.20 mmol) NEt₃, 15 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 279 mg, 0.68 mmol, 68 %, gelbes Öl.

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

[α]_D^{20 °C}: -18.1° [c = 1.15, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₅H₃₂N₂O₃, 408.55; gef.: 409.4 (dia a); 409.4 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 22.2 min (52.9 %); dia b: R_t = 22.6 min (47.1 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3382 (w, CO-NH), 2965 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1676 (s, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1148 (m, CO₂Bn), 736 (s, Ph), 697 (s, Ph).

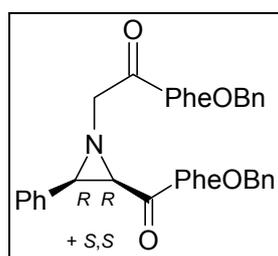
¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.20, 0.36 (2 x d, 2 x 3H, Val-γ- \underline{CH}_3 , J = 6.8 Hz), 1.13 (s, 9H, (\underline{CH}_3)₃), 1.76 (m, 1H, Val-β- \underline{CH}), 2.72 (d, 1H, Azi- \underline{CH} -CO, J = 6.7 Hz), 3.28 (d, 1H, Azi- \underline{CH} -Ph, J = 6.8 Hz), 4.37 (m, 1H, Val-α- \underline{CH}), 5.12 (m, 2H, CO₂ \underline{CH}_2 Ph), 6.92 (d, 1H, \underline{NH} , J = 9.16 Hz), 7.12-7.40 (m, 10H, Ar- \underline{CH}).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.81, 0.83 (m, 6H, Val-γ- \underline{CH}_3), 1.13 (s, 9H, (\underline{CH}_3)₃), 2.01 (m, 1H, Val-β- \underline{CH}), 2.70 (d, 1H, Azi- \underline{CH} -CO, J = 6.8 Hz), 3.25 (d, 1H, Azi- \underline{CH} -Ph, J = 6.8 Hz), 4.20 (m, 1H, Val-α- \underline{CH}), 4.94 (s, 2H, CO₂ \underline{CH}_2 Ph), 7.06 (d, 1H, \underline{NH} , J = 9.1 Hz), 7.12-7.40 (m, 10H, Ar- \underline{CH}).

¹³C-NMR: dia a: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 16.92, 18.27 (Val-γ- \underline{CH}_3), 26.71 (^tBu- \underline{CH}_3), 31.90 (Val-β- \underline{CH}), 40.42 (Azi- \underline{CH} -CO-NH), 41.46 (Azi- \underline{CH} -Ph), 56.60 (Val-α- \underline{CH}), 66.56 (OBn- \underline{CH}_2), 127.29-129.14 (Ar- \underline{CH}), 135.54 (Ar- \underline{C}_q -Azi), 135.74 (Ar- \underline{C}_q -OBn), 168.22 (\underline{CO} -NH), 170.80 (\underline{CO}_2 Bn).

dia b: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.83, 18.83 (Val- γ -CH₃), 26.71 (^tBu-CH₃), 31.90 (Val- β -CH), 40.42 (Azi-CH-CO-NH), 41.46 (Azi-CH-Ph), 56.45 (Val- α -CH), 66.56 (OBn-CH₂), 127.29-129.14 (Ar-CH), 135.74 (Ar-C_q-Azi), 136.33 (Ar-C_q-OBn), 168.56 (CO-NH), 171.72 (CO₂Bn).

15.3.20 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-(((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-methyl]-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-56)



Methode: B1 (18 d, 2 °C).

233 mg (1.00 mmol) **Li-A-50**, 613 mg (2.10 mmol) Phe-OBn^{*}HCl, 476 μ l (2.20 mmol) DPPA, 430 μ l (3.10 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

Ausbeute: 389 mg, 0.77 mmol, 77 %, oranges Harz.

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -7.2° [c = 0.92, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₄₃H₄₁N₃O₆, 695.82; gef.: 696.5 [M+H]⁺.

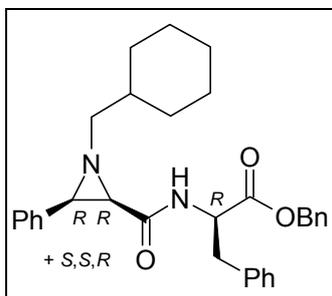
LC-MS: R_t = 26.3 min (100 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2927 (w, C-H), 1737 (m, C=O), 1523 (m, Ph), 1171 (m, C-O), 737 (s, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.30, 2.56, 2.82, 3.06, 3.19 (m, 2 x 2H, Phe- β -CH₂), 2.57 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, J = 7.2 Hz), 2.98, 3.08 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.9 Hz), 3.11, 3.38 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 4.60, 4.92 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.98, 5.14 (m, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.53 (d, 2H, 2 x NH), 7.08-7.39 (m, 50H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 37.97, 38.18 (Phe- β -CH₂), 46.67 (Azi-CH-CO), 48.80 (Azi-CH-Ph), 53.21, 53.46 (Phe- α -CH), 62.10, 62.41 (N-CH₂), 67.25, 67.57 (OBn-CH₂), 127.24-129.63 (Ar-CH), 135.52-136.14 (Ar-C_q), 165.96-171.40 (C=O).

15.3.21 (R)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-57)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

170 mg (0.64 mmol) **Li-A-55**, 274 mg (0.64 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 151 μ l (0.70 mmol) DPPA, 186 μ l (1.34 mmol) NEt₃, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 240 mg, 0.48 mmol, 76 %, hellgelbes Öl.

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

[α]_D^{20 °C}: 0.92° [c = -7.2, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₆N₂O₃, 496.66; gef.: 497.5 [M+H]⁺.

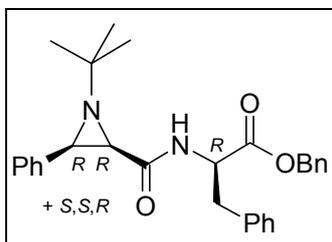
LC-MS: R_t = 29.6 min (97.4 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2922 (m, C-H), 1740 (m, CO₂Bn), 1674 (s, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1174 (m, CO₂Bn), 740 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.96-1.91 (m, 2 x 11H, Cy-CH_x), 2.24-2.55 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 2.30-2.46 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 2.42 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, J = 6.8 Hz), 2.90, 2.95 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 3.00 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 4.50 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.91, 5.00 (2 x s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.81, 6.87 (2 x d, 2 x 1H, NH, J = 7.9 Hz), 6.98-7.36 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.05-31.65 (Cy-CH₂), 38.25 (Cy-CH), 38.45, 38.53 (Phe- β -CH₂), 46.56, 47.12 (Azi-CH-CO), 47.99, 48.14 (Azi-CH-Ph), 52.63, 52.76 (Phe- α -CH), 66.73 (N-CH₂), 66.88 (OBn-CH₂), 126.86-129.38 (Ar-CH), 134.93-135.81 (Ar-C_q), 167.47, 167.77 (CO-NH), 170.30, 171.18 (CO₂Bn).

15.3.22 (R)-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-1-tert-Butyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-58)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

171 mg (0.76 mmol) **Li-A-29**, 324 mg (0.76 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 180 μ l (0.84 mmol) DPPA, 161 μ l (1.60 mmol) NEt₃, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 228 mg, 0.50 mmol, 66 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: 23.7° [c = 1.09, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₉H₃₂N₂O₃, 456.59; gef.: 457.5 [M+H]⁺.

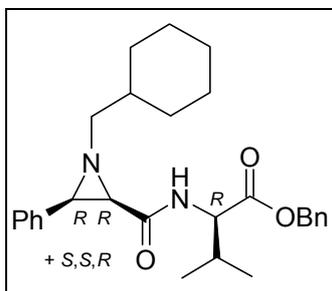
LC-MS: R_t = 26.9 min (95.9 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2965 (w, C-H), 1740 (m, CO₂Bn), 1673 (s, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1174 (m, CO₂Bn), 740 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.07 (s, 2 x 9H, (CH₃)₃), 2.25, 2.52 (m, 2 x 1H, Phe- β -CH₂), 2.68 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.8 Hz), 2.94-3.08 (m, 2H, Phe- β -CH₂), 3.21, 3.26 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.9 Hz), 4.53 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.91, 4.98 (2 x s, 2 x 2H, OBn-CH₂), 6.74, 6.97 (2 x m, 2 x 1H, NH), 7.10-7.38 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.55, 26.96 (^tBu-CH₃), 38.10, 38.33 (Phe- β -CH₂), 39.86, 40.35 (Azi-CH-CO), 41.22, 41.28 (Azi-CH-Ph), 52.45, 52.67 (Phe- α -CH), 53.25, 53.28 (C(CH₃)), 66.75, 66.88 (OBn-CH₂), 126.82-129.50 (Ar-CH), 135.14-136.18 (Ar-C_q), 167.86, 168.27 (CO-NH), 170.25, 171.18 (CO₂Bn).

15.3.23 (R)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-Cyclohexylmethyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-methylbutansäurebenzylester (A-59)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

241 mg (0.91 mmol) **Li-A-55**, 345 mg (0.91 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 216 μ l (1.00 mmol) DPPA, 267 μ l (1.91 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 183 mg, 0.41 mmol, 65 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: 18.1° [c = 1.10, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₆N₂O₃, 448.61; gef.: 449.5 (dia a); 449.5 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 29.6 min (47.3 %); dia b: R_t = 30.0 min (52.7 %), Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3389 (w, CO-NH), 2924 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1678 (s, CO-NH), 1508 (m, Ph), 1150 (m, CO₂Bn), 739 (s, Ph), 697 (s, Ph).

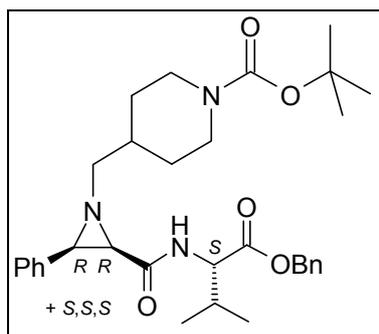
¹H-NMR: dia a: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.22, 0.37 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, *J* = 6.8 Hz), 1.01-1.95 (m, 11H, Cy-CH_x), 1.73 (m, 1H, Val- β -CH), 2.31-2.53 (m, 2H, N-CH₂), 2.43 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.8 Hz), 2.98 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.34 (m, 1H, Val- α -CH), 5.12 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.77 (d, 1H, NH, *J* = 9.3 Hz), 7.11-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

dia b: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.82, 0.84 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, *J* = 6.9 Hz), 1.01-1.95 (m, 11H, Cy-CH_x), 2.01 (m, 1H, Val- β -CH), 2.31-2.53 (m, 2H, N-CH₂), 2.43 (d, 1H, Azi-CH-CO, *J* = 6.8 Hz), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.20 (m, 1H, Val- α -CH), 4.97 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.96 (d, 1H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.11-7.37 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.05-18.80 (Val- γ -CH₃), 26.21-31.97 (Cy-CH_x), 38.72, 38.83 (Val- β -CH), 47.19, 47.50 (Azi-CH-CO-NH), 47.97, 48.19 (Azi-CH-Ph), 56.49, 56.69 (Val- α -CH), 66.60 (OBn-CH₂), 66.93 (N-CH₂), 127.35-128.68

(Ar-CH), 135.12-135.71 (Ar-C_q), 167.71, 168.09 (CO-NH), 170.77, 171.63 (CO₂Bn).

15.3.24 4-[(2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-2-((*S*)-1-Benzylloxycarbonyl-2-methylpropylcarbamoyl)-3-phenylaziridin-1-ylmethyl]-piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (A-60)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

391 mg (1.13 mmol) **Li-A-53**, 429 mg (1.13 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 268 μ l (1.24 mmol) DPPA, 329 μ l (2.37 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 455 mg, 0.83 mmol, 73 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

[α]_D^{20 °C}: -14.5° [c = 1.08, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₄₃N₃O₅, 549.72; gef.: 450.4 (dia a); 450.4 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 27.0 min (53.3 %); dia b: R_t = 27.7 min (45.4 %), Σ = 98.7 %.

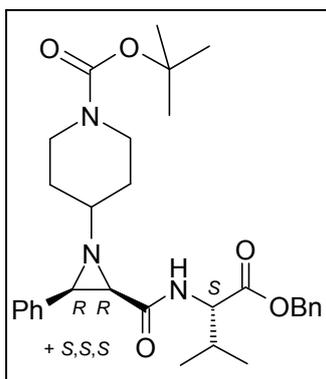
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3389 (w, CO-NH), 2929 (w, C-H), 1737 (m, NCO₂), 1679 (s, CO-NH), 1511 (m, Ph), 1145 (s, CO₂Bn), 736 (s, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.21, 0.36 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 6.9 Hz), 0.81, 0.83 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ -CH₃, J = 6.8 Hz), 1.20, 1.84, 2.73, 4.13 (m, 2 x 9H, Pip-CH₂), 1.43, 1.47 (2 x s, 2 x 9H, C(CH₃)₃), 1.73, 2.00 (m, 2 x 1H, Val- β -CH₂), 2.46, 2.72 (m, 2 x 2H, Azi-CH₂-Pip), 2.47 (d, 2H, Azi-CH-CO₂Me, J = 6.8 Hz), 2.96, 3.01 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 4.17, 4.35 (m, 2 x 1H, Val- α -CH), 4.97 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 5.12 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.71, 6.89 (2 x d, 1H, NH, J = 9.2 Hz), 7.14-7.37 (m, 20H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 16.99-18.78 (Val- γ -CH₃), 27.05, 28.60 (C(CH₃)₃),

30.67-43.58 (Pip- $\underline{C}H_x$), 31.25 (Val- β - $\underline{C}H$), 47.14, 47.37 (Azi- $\underline{C}H$ -CO₂Me), 48.13, 48.26 (Azi- $\underline{C}H$ -Ph), 56.51, 56.64 (Val- α - $\underline{C}H$), 65.73 (N- $\underline{C}H_2$), 66.69, 67.01 (OBn- $\underline{C}H_2$), 79.45, 79.52 ($\underline{C}(\underline{C}H_3)_3$), 127.51-128.71 (Ar- $\underline{C}H$), 134.74-135.51 (Ar- \underline{C}_q), 154.93 (Pip- $\underline{C}O_2C(\underline{C}H_3)_3$), 167.36, 167.77 (Azi- $\underline{C}=\underline{O}$), 170.77, 171.68 ($\underline{C}O_2$ Bn).

15.3.25 4-[(2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-2-((*S*)-1-Benzylloxycarbonyl-2-methylpropylcarbamoyl)-3-phenylaziridin-1-yl]-piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (A-61)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

296 mg (0.81 mmol) **Li-A-54**, 307 mg (0.81 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 192 μ l (0.89 mmol) DPPA, 236 μ l (1.70 mmol) NEt₃, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 367 mg, 0.68 mmol, 85 %, hellgelbes Harz.

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

[α]_D^{20 °C}: -10.8° [c = 1.01, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₄₁N₃O₅, 535.69; gef.: 536.5 (dia a); 536.4 (dia b) [M+H]⁺.

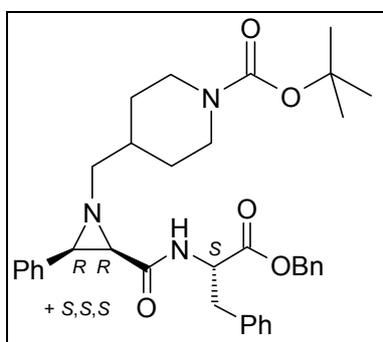
LC-MS: dia a: R_t = 26.3 min (51.6 %); dia b: R_t = 26.9 min (48.4 %), Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2968 (w, C-H), 1738 (m, CO₂Bn), 1680 (s, CO-MH), 1513 (m, Ph), 1143 (s, CO₂Bn), 737 (s, Ph), 698 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.19, 0.34 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ - $\underline{C}H_3$, *J* = 7.0 Hz), 0.80, 0.82 (2 x d, 2 x 3H, Val- γ - $\underline{C}H_3$, *J* = 7.1 Hz), 1.25, 1.84, 3.07, 3.95 (m, 2 x 9H, Pip- $\underline{C}H_x$), 1.49 (2 x s, 2 x 9H, C($\underline{C}H_3$)₃), 1.76, 2.01 (m, 2 x 1H, Val- β - $\underline{C}H$), 2.53, 2.55 (2 x d, 2 x 1H, Azi- $\underline{C}H$ -CO₂Me, *J* = 6.8 Hz), 3.10 (d, 2H, 2 x Azi- $\underline{C}H$ -Ph, *J* = 6.8 Hz), 4.19, 4.36 (m, 2 x 1H, Val- α - $\underline{C}H$), 4.94 (s, 2H, CO₂ $\underline{C}H_2$ Ph), 5.11 (m, 2H, CO₂ $\underline{C}H_2$ Ph), 6.69, 6.85 (2 x d, 1H, *NH*, *J* = 9.1 Hz), 7.14-7.36 (m, 20H, Ar- $\underline{C}H$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 16.92-18.85 (Val- γ - CH_3), 27.05, 28.62 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.19 (Val- β - CH), 30.90, 41.64 (Pip- CH_2), 45.96 (Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$), 47.16 (Azi- CH-Ph), 56.52, 56.65 (Val- α - CH), 64.64, 64.77 (Pip- CH), 66.66, 67.06 (OBn- CH_2), 79.79 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.58-128.65 (Ar- CH), 134.84-135.52 (Ar- C_q), 154.86 (Pip- $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 167.37, 167.72 (Azi- C=O), 170.67 (CO_2Bn).

15.3.26 4-[(2R,3R)+(2S,3S)-2-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-3-phenylaziridin-1-ylmethyl]-piperidin-1-carbonsäure-tert-butylester (A-62)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

350 mg (0.99 mmol) **Li-A-53**, 289 mg (0.99 mmol) Phe-OBn*HCl, 236 μl (1.09 mmol) DPPA, 288 μl (2.08 mmol) NEt_3 , 10 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

Ausbeute: 505 mg, 0.85 mmol, 85 %, hellgelbes Harz.

R_f : 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -10.3° [$c = 1.46$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5$, 597.76; gef.: 598.4 (dia a); 598.6 (dia b) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

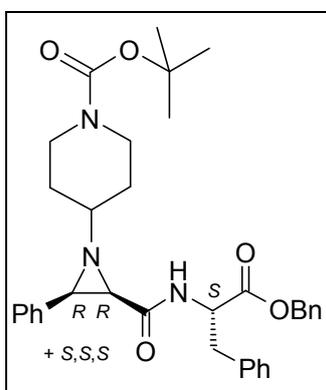
LC-MS: dia a: $R_t = 27.2$ min (49.5 %); dia b: $R_t = 27.5$ min (48.4 %), $\Sigma = 97.9$ %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3390 (w, CO-NH), 2928 (w, C-H), 1740 (m, CO_2Bn), 1678 (s, CO-NH), 1506 (m, Ph), 1169 (s, CO_2Bn), 733 (s, Ph), 698 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.19, 1.74, 2.68, 4.10 (m, 2 x 9H, Pip- CH_x), 1.48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.26, 2.60, 3.01 (m, 4H, Phe- β - CH_2), 2.35, 2.46 (m, 4H, Azi- CH_2 -Pip), 2.44 (d, 2H, Azi- $\text{CH-CO}_2\text{Me}$, $J = 7.1$ Hz), 2.93, 2.98 (2 x d, 2 x 1H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 4.50 (m, 2H, Val- α - CH), 4.93, 5.00 (2 x s, 2 x 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6.74, 6.80 (2 x d, 1H, NH , $J = 7.7$ Hz), 7.12-7.35 (m, 30H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 27.03, 28.60 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 30.55, 36.87, 43.99 (Pip- $\underline{\text{C}}\text{H}_x$), 38.87 (Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.63, 47.15 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ - CO_2Me), 48.16, 48.28 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph), 52.68, 52.74 (Phe- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 65.67, 65.86 (N - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 66.91, 67.06 (OBn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 79.47 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.10-129.44 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 134.63-135.82 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 154.91 (Pip- $\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 167.17, 167.57 (Azi- $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 170.40, 171.24 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Bn}$).

15.3.27 4-[(2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-2-((*S*)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-3-phenylaziridin-1-yl]-piperidin-1-carbonsäure-*tert*-butylester (A-63)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

261 mg (0.71 mmol) **Li-A-54**, 207 mg (0.71 mmol) Phe-OBn*HCl, 169 μl (0.78 mmol) DPPA, 207 μl (1.49 mmol) NEt_3 , 8 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

Ausbeute: 386 mg, 0.66 mmol, 93 %, hellgelbes Harz.

R_f : 0.28 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -9.4° [$c = 1.18$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$, 583.73; gef.: 584.4 (dia a); 584.4 (dia b) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: dia a: $R_t = 26.4$ min (51.0 %); dia b: $R_t = 26.7$ min (48.3 %), $\Sigma = 99.3$ %.

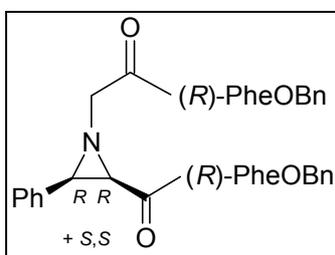
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3385 (w, CO-NH), 2934 (w, C-H), 1741 (m, CO_2Bn), 1678 (s, CO-NH), 1510 (m, Ph), 1142 (s, CO_2Bn), 737 (s, Ph), 698 (s, Ph).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.51 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 1.72, 1.83, 3.10, 3.61, 3.81 (m, 2 x 9H, Pip- $\underline{\text{C}}\text{H}_x$), 2.26, 2.61, 3.04 (m, 4H, Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.50 (2 x d, 2 x 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Pip, $J = 7.1$ Hz), 3.02, 3.05 (2 x d, 2 x 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph, $J = 7.0$ Hz), 4.52 (m, 2H, Val- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.94, 5.00 (2 x s, 2 x 2H, $\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 6.70, 6.78 (2 x d, 1H,

NH , $J = 7.6$ Hz), 7.11-7.37 (m, 30H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 26.94, 28.51 (C(CH_3)₃), 30.73, 41.74, 64.10 (Pip- CH_x), 37.90, 38.05 (Phe- β - CH_2), 45.38, 46.04 (Azi- CH -CO₂Me), 47.05, 47.09 (Azi- CH -Ph), 52.47 (Phe- α - CH), 66.91, 67.00 (OBn- CH_2), 79.55 (C(CH_3)₃), 126.96-129.39 (Ar- CH), 134.62-135.61 (Ar- C_q), 154.68 (Pip- CO_2 C(CH_3)₃), 166.87, 167.49 (Azi- $C=O$), 170.15, 171.11 (CO_2 Bn).

15.3.28 (R)-2-((2R,3R)+(2S,3S)-1-(((R)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-methyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-65)



Methode: B1 (12 d, 2 °C).

170 mg (0.73 mmol) **Li-A-50**, 655 mg (1.53 mmol) (R)-Phe-OBn*TosOH, 347 μ l (1.61 mmol) DPPA, 314 μ l (2.26 mmol) NEt₃, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [2/1].

Ausbeute: 121 mg, 0.17 mmol, 24 %, gelbes Harz.

R_f: 0.16 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_D^{20}$: 11.1° [c = 0.54, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₄₃H₄₁N₃O₆, 695.82; gef.: 696.5 [M+H]⁺.

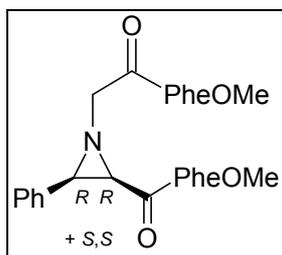
LC-MS: R_t = 26.2 min (95.9 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3055 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1674 (m, CO-NH), 1519 (m, Ph), 1171 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 695 (s, Ph).

1H -NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.33, 2.55, 2.85, 2.96, 3.09 (m, 2 x 2H, Phe- β - CH_2), 2.58 (d, 2 x 1H, Azi- CH -CO, $J = 7.1$ Hz), 2.99, 3.08 (2 x d, 2 x 1H, Azi- CH -Ph, $J = 7.0$ Hz), 3.03, 3.13, 3.19, 3.37 (m, 2 x 2H, N- CH_2), 4.59, 4.90, 5.00 (m, 2 x 1H, Phe- α - CH), 4.99, 5.15 (m, 2 x 2H, OBn- CH_2), 6.51 (d, 2H, 2 x NH , $J = 8.1$ Hz), 7.08-7.40 (m, 50H, Ar- CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 37.80, 38.17 (Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.67, 48.01 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 48.63, 49.98 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 53.02, 53.64 (Phe- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 61.97, 62.27 (N - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 67.07, 67.36 (OBn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 127.32-129.45 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.14-135.94 (Ar- $\underline{\text{C}}_{\text{q}}$), 163.34-171.60 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$).

15.3.29 (S)-2-((2R,3R)+(2S,3S)-1-(((S)-1-Methoxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-methyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäuremethylester (A-66)



Methode: B1 (12 d, 2 °C).

145 mg (0.62 mmol) **Li-A-50**, 279 mg (1.30 mmol) Phe-OMe*HCl, 295 μl (1.36 mmol) DPPA, 266 μl (1.92 mmol) NEt_3 , 8 ml DMF_{abs} .

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

Ausbeute: 107 mg, 0.20 mmol, 32 %, gelbes Harz.

R_f : 0.05 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -5.2° [$c = 0.54$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$, 543.63; gef.: 544.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: $R_t = 20.2$ min (98.4 %).

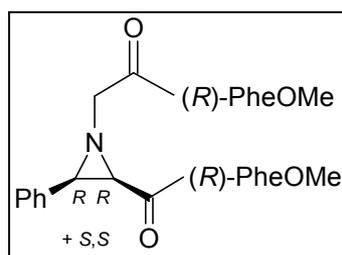
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3317 (w, CO-NH), 2922 (m, C-H), 1737 (m, CO_2Me), 1661 (m, CO-NH), 1520 (m, Ph), 1195 (m, CO_2Me), 697 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.35, 2.57, 2.91, 3.06, 3.16 (m, 2 x 2H, Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.60 (d, 2 x 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}$, $J = 7.0$ Hz), 3.00, 3.08 (2 x d, 2 x 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$, $J = 7.0$ Hz), 3.04, 3.16, 3.20, 3.35 (m, 2 x 2H, N - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.50, 3.56, 3.66, 3.73 (4 x 3H, $\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4.55, 4.87, 4.98 (m, 2 x 1H, Phe- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 6.51 (m, 2H, 2 x $\underline{\text{N}}\text{H}$), 7.09-7.30 (m, 30H, Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 37.74, 37.96, 38.06, 38.22 (Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.44, 47.71 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 48.12, 48.48 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 52.04, 52.10, 52.28, 52.40

(CO₂CH₃), 52.80, 52.92, 53.08, 53.45 (Phe-α-CH), 61.83, 62.14 (N-CH₂), 126.98-129.27 (Ar-CH), 133.78-135.96 (Ar-C_q), 165.64-168.66 (Azi-C=O), 171.00-171.69 (CO₂CH₃).

15.3.30 (R)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-(((R)-1-Methoxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-methyl]-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäuremethylester (A-67)



Methode: B1 (12 d, 2 °C).

182 mg (0.78 mmol) **Li-A-50**, 352 mg (1.64 mmol) (R)-Phe-OMe*HCl, 315 µl (1.72 mmol) DPPA, 285 µl (2.42 mmol) NEt₃, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

Ausbeute: 108 mg, 0.20 mmol, 25 %, gelbes Harz.

R_f: 0.05 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

[α]_D^{20 °C}: 8.1° [c = 0.58, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₃N₃O₆, 543.63; gef.: 544.4 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 20.2 min (97.5 %).

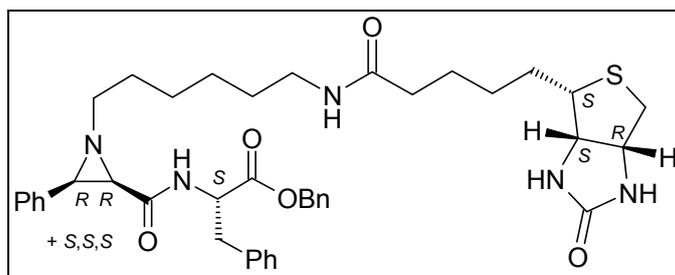
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3287 (w, CO-NH), 2921 (m, C-H), 1737 (m, CO₂Me), 1660 (m, CO-NH), 1521 (m, Ph), 1195 (m, CO₂Me), 747 (m, Ph), 697 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.36, 2.56, 2.91, 3.05, 3.19 (m, 2 x 2H, Phe-β-CH₂), 2.60 (d, 2 x 1H, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz), 3.00, 3.08 (2 x d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 3.04, 3.15, 3.20, 3.35 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 3.50, 3.56, 3.66, 3.73 (4 x 3H, CO₂CH₃), 4.55, 4.87, 4.98 (m, 2 x 1H, Phe-α-CH), 6.50 (m, 2H, 2 x NH), 7.10-7.32 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 37.86, 38.09, 38.18, 38.34 (Phe-β-CH₂), 46.57, 47.84 (Azi-CH-CO), 48.23, 48.61 (Azi-CH-Ph), 52.15, 52.23, 52.40, 52.52 (CO₂CH₃), 52.93, 53.04, 53.20, 53.57 (Phe-α-CH), 61.97, 62.27 (N-CH₂), 127.11-129.40 (Ar-CH), 133.45-136.09 (Ar-C_q), 165.76-168.77 (Azi-C=O), 171.12-171.79

(CO_2CH_3).

15.3.31 (S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-{6-[5-((3aS,4S,6aR)-2-Oxohexahydrothieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoylamino]-hexyl}-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-75)



Methode: G7b (28 d, RT).

245 mg (0.40 mmol) **A-52-NH₂*TFA**, 125 mg (0.40 mmol) *D*-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimidester, 61.8 μl (0.44 mmol) Diisopropylamin, 6 ml DMF_{abs} .

SC: Chloroform/Methanol [8/1].

Ausbeute: 65.0 mg, 89.5 μmol , 22 %, farbloses Harz.

R_f : 0.08 (Chloroform/Methanol [8/1]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: n.b.

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$, 725.96; gef.: 726.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: n.b.

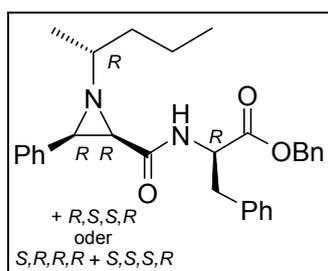
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3263 (w, CO-NH), 2900 (w, C-H), 1737 (m, CO_2Bn), 1645 (m, CO-NH), 1190 (m, CO_2Bn), 671 (m, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.02-1.76 (m, 2 x 14H, Hex- CH_2 , Bio- CH_2), 2.16 (m, 2 x 2H, Bio- $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 2.23 (m, 2 x 2H, Hex- N-CH_2), 2.68 (m, 2 x 1H, Azi- CH-CO), 2.84 (m, 2 x 1H, Azi- CH-Ph), 3.03 (m, 2 x 2H, Phe- $\beta\text{-CH}_2$), 3.15 (m, 2 x 5H, Hex- $\text{CH}_2\text{-NH}$, Bio- CH_2 , Bio- CH), 4.25, 4.42 (2 x m, 2 x 2H, Bio- CH), 4.87 (m, 2 x 1H, Phe- $\alpha\text{-CH}$), 5.08 (m, 2 x 2H,), 5.61 (br, 2H, Hex- NH), 6.10, 6.35 (2 x br, 2 x 2H, Bio- NH), 6.91-7.38 (m, 30H, Ar- CH), 7.58, 7.65 (2 x d, 2 x 1H, Phe- NH , $J = 8.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.66-29.72 (Hex- CH_2 , Bio- CH_2), 36.01 (Bio- $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 37.26 (Phe- $\beta\text{-CH}_2$), 38.04 (Bio- CH_2), 39.37 (Hex- $\text{CH}_2\text{-NH}$), 40.54 (Azi- CH), 48.53 (Hex- N-CH_2), 52.99 (Phe- $\alpha\text{-CH}$), 55.63, 60.18, 61.82 (Bio- CH),

67.14 (OBn-CH₂), 126.09-129.33 (Ar-CH), 135.11-140.81 (Ar-Cq), 163.93 (Bio-C=O), 171.07-173.17 (C=O).

15.3.32 2-[[1-(1-Methylbutyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (**A-76a**)



Methode: B2 (2 d, RT).

312 mg (1.31 mmol) **Li-A-70a**, 558 mg (1.31 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 1.14 ml (1.96 mmol) PPA (50 % in DMF), 0.17 ml (1.57 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 269 mg, 0.57 mmol, 44 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: 18.6° [c = 0.69, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₀H₃₄N₂O₃, 470.62; gef.: 471.5 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 28.1 min (94.6 %).

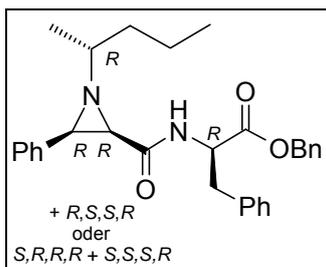
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2930 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1179 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.87 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.4 Hz), 0.97 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz), 1.17 (d, 3H, CH₃CH, J = 6.3 Hz), 1.23 (d, 3H, CH₃CH, J = 6.3 Hz), 1.34-1.94 (m, 2 x 1H, 2 x 2H, 2 x 2H, CHCH₂CH₂), 2.22, 2.47, 3.00 (m, 2 x 2H, Phe-β-CH₂), 2.49 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.51 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.94 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.3 Hz), 2.99 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.8 Hz), 4.54 (m, 2 x 1H, Phe-α-CH), 4.91, 4.98 (2 x s, 2 x 2H, CO₂CH₂Ph), 6.85 (d, 1H, NH, J = 8.6 Hz), 6.87 (d, 1H, NH, J = 8.1 Hz), 6.93-7.43 (m, 2 x 15H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.44, 14.63 (CH₂CH₃), 19.11, 19.44, (CH₂CH₃), 19.94, 20.03 (CH₃CH), 38.30, 38.47 (Phe-β-CH₂), 38.53, 38.83 (CH₂CH₂CH₃),

46.46, 46.50 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-CO}$), 46.69, 46.93 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 52.58, 52.88 (Phe- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 63.97, 64.23 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}$), 66.84, 66.94 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 126.88-129.35 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.30-135.99 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}_{\text{q}}$), 167.65, 167.98 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{O}$), 170.35, 171.20 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

15.3.33 2-[[1-(1-Methylbutyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-76b)



Methode: B2 (2 d, RT).

273 mg (1.11 mmol) **Li-A-70b**, 472 mg (1.11 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 0.97 ml (1.67 mmol) PPA (50 % in DMF), 0.15 ml (1.33 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 134 mg, 0.29 mmol, 26 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: 21.9° [c = 0.57, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₀H₃₄N₂O₃, 470.62; gef.: 471.5 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 28.0 min (97.6 %).

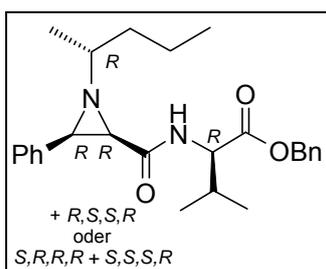
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2947 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1179 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.3 Hz), 0.93 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.4 Hz), 1.09 (d, 3H, CH₃CH, J = 6.3 Hz), 1.13 (d, 3H, CH₃CH, J = 6.3 Hz), 1.32-1.83 (m, 2 x 1H, 2 x 2H, 2 x 2H, CHCH₂CH₂), 2.27, 2.50, 3.00 (m, 2 x 2H, Phe- β -CH₂), 2.42 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz), 2.43 (d, 1H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.99 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.05 (d, 1H, Azi-CH-Ph, J = 6.6 Hz), 4.55 (m, 2 x 1H, Phe- α -CH), 4.93 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.98 (s, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.88 (d, 1H, NH, J = 8.6 Hz), 6.90 (d, 1H, NH, J = 8.1 Hz), 6.97-7.42 (m, 2 x 15H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.49, 14.53 (CH₂CH₃), 19.19, 19.23 (CH₂CH₃),

19.26, 19.51 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$), 38.26, 38.49 (Phe- β - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 39.11, 39.16 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45.36, 45.77 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO), 47.97, 48.31 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph), 52.53, 52.91 (Phe- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 64.18, 64.28 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}$), 66.88, 66.98 ($\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 126.91-129.61 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.24-136.04 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 167.55, 168.05 (Azi- $\underline{\text{C}}\text{O}$), 170.40 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

15.3.34 3-Methyl-2-[[1-(1-methylbutyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-butansäurebenzylester (A-77a)



Methode: B2 (2 d, RT).

312 mg (1.31 mmol) **Li-A-70a**, 495 mg (1.31 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 1.14 ml (1.96 mmol) PPA (50 % in DMF), 0.17 ml (1.57 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 190 mg, 0.45 mmol, 35 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.54 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 15.7° [c = 0.7, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₆H₃₄N₂O₃, 422.57; gef.: 423.5 (dia a); 423.4 (dia b) [M+H]⁺.

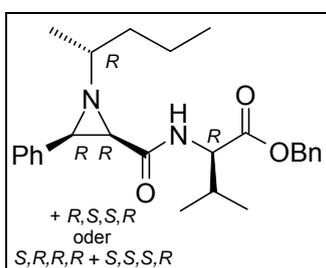
LC-MS: dia a: R_t = 28.1 min (48.6 %); dia b: R_t = 28.3 min (50.3 %), Σ = 98.9 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2947 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1172 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.27 (2 x d, 6H, Val- γ -($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂, *J* = 6.9 Hz, 6.9 Hz), 0.82 (2 x d, 6H, Val- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, *J* = 7.1 Hz, 6.9 Hz), 0.91 (t, 3H, CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, *J* = 7.2 Hz), 0.94 (t, 3H, CH₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, *J* = 7.2 Hz), 1.23 (d, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$, *J* = 6.4 Hz), 1.25 (d, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$, *J* = 6.4 Hz), 1.32-1.89 (m, 2 x 1H, 2 x 2H, 2 x 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.72, 2.01 (m, 2 x 1H, Val- β - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 2.51 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO, *J* = 7.1 Hz), 2.53 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO, *J* = 6.8 Hz), 2.97 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph, *J* = 7.1 Hz), 3.00 (d, 1H, Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.20, 4.36 (m, 2 x 1H, Val- α - $\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.93 (m, 2H, CO₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 5.12 (m, 2H, CO₂ $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 6.77 (d, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$, *J* = 9.4 Hz), 6.92 (d, 1H, $\underline{\text{N}}\text{H}$, *J* = 9.1 Hz), 7.09-7.43 (m, 2 x 10H, Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.47, 14.50 (CH_2CH_3), 16.96, 17.77, 18.25, 18.82 (Val- CH_3), 19.17, 19.24 (CH_2CH_3), 20.06, 20.09 (CH_3CH), 31.25, 31.89 (Val- $\beta\text{-CH}$), 38.59, 38.99 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 46.52, 46.60 (Azi- CH-CO), 47.07, 47.21 (Azi- CH-Ph), 56.47, 56.64 (CH_3CH), 64.01, 64.16 (Val- $\alpha\text{-CH}$), 66.57, 66.92 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 127.11-128.68 (Ar- CH), 135.41-135.96 (Ar- C_q), 167.87, 168.19 (Azi- CO), 170.77, 170.59 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

15.3.35 3-Methyl-2-[[1-(1-methylbutyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-butansäurebenzylester (A-77b)



Methode: B2 (2 d, RT).

273 mg (1.11 mmol) **Li-A-70b**, 419 mg (1.11 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 0.97 ml (1.67 mmol) PPA (50 % in DMF), 0.15 ml (1.33 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 107 mg, 0.25 mmol, 23 %, hellgelbes Harz.

R_f : 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: 21.7° [$c = 0.69$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$, 422.57; gef.: 423.5 (dia a); 423.4 (dia b) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: dia a: $R_t = 28.0$ min (50.0 %); dia b: $R_t = 28.4$ min (48.1 %), $\Sigma = 98.1$ %.

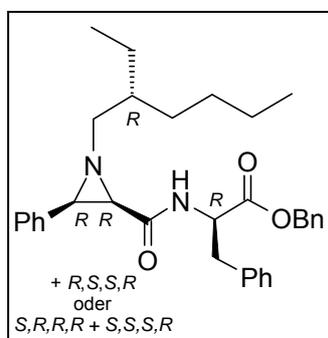
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3379 (w, CO-NH), 2947 (w, C-H), 1737 (m, CO_2Bn), 1674 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1172 (m, CO_2Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.29 (2 x d, 3H, Val- CH_3 , $J = 6.8$ Hz, 7.1 Hz), 0.83 (2 x d, 3H, Val- CH_3 , $J = 6.8$ Hz, 8.4 Hz), 0.92 (2 x t, 2 x 3H, CH_2CH_3), 1.15 (d, 3H, CH_3CH , $J = 6.1$ Hz), 1.20 (d, 3H, CH_3CH , $J = 6.3$ Hz), 1.34-1.66 (m, 2 x 1H, 2 x 2H, 2 x 2H, CHCH_2CH_2), 1.80, 2.02 (2 x m, 2 x 1H, Val- $\beta\text{-CH}$), 2.44 (d, 1H, Azi- CH-CO , $J = 7.0$ Hz), 2.45 (d, 1H, Azi- CH-CO , $J = 7.1$ Hz), 3.05 (d, 1H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 3.06 (d, 1H, Azi- CH-Ph , $J = 7.1$ Hz), 4.21, 4.37 (m, 1H, Val- $\alpha\text{-CH}$), 4.95-5.18 (m, 2 x 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6.79 (d, 1H, NH, $J = 9.3$ Hz), 6.96

(d, 1H, NH , $J = 9.3$ Hz), 7.16-7.37 (m, 2 x 10H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.52 (CH₂CH₃), 16.97, 17.81 (Val-CH₃), 18.25, 18.86 (CH₂CH₃), 19.33, 19.50 (CH₃CH), 31.27, 31.88 (Val- β -CH), 39.19, 39.22 (CH₂CH₂CH₃), 45.83 (Azi-CH-CO), 48.09, 48.27 (Azi-CH-Ph), 55.47, 55.64 (CH₃CH), 64.21, 64.36 (Val- α -CH), 66.59, 66.98 (CO₂CH₂Ph), 127.11-128.69 (Ar-CH), 135.35-135.91 (Ar-C_q), 167.88, 168.27 (Azi-CO), 170.86, 170.65 (CO₂CH₂Ph).

15.3.36 2-[[1-(2-Ethylhexyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-78)



Methode: B2 (2 d, RT).

300 mg (1.07 mmol) **Li-A-71**, 457 mg (1.07 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 940 μ l (1.61 mmol) PPA (50 % in DMF), 141 μ l (1.28 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 188 mg, 0.37 mmol, 35 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 18.5° [c = 0.53, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₃H₄₀N₂O₃, 512.70; gef.: 513.6 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 31.4 min (100 %).

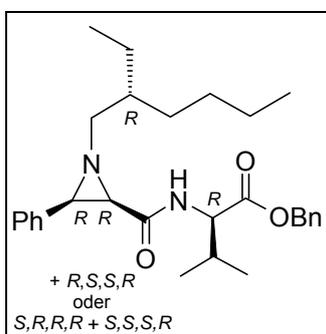
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3385 (w, CO-NH), 2928 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1489 (m, Ph), 1181 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

1H -NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.90 (m, 12H, 4 x CH₃), 1.24-1.57 (m, 16H, 2 x CH₃CH₂CHCH₂CH₂CH₂), 1.51 (m, 2H, 2 x CH₃CH₂CH), 2.25, 2.54, 3.02 (m, 4H, 2 x Phe- β -CH₂), 2.28-2.66 (m, 4H, 2 x *N*-CH₂), 2.45 (m, 2H, 2 x Azi-CH-CO), 2.94 (m, 2H, Azi-CH-Ph), 4.51 (m, 2H, 2 x Phe- α -CH), 4.92, 4.99 (s, 4H, 2 x

$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6.80 (m, 1H, NH), 6.88 (m, 1H, NH), 6.75-7.40 (m, 30H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 11.04 (CHCH_2CH_3), 14.26 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.15-31.53 (CH_2), 38.32 (Phe- β - CH_2), 39.99, 40.11 (CHCH_2CH_3), 46.74, 47.28 (Azi- CH-CO), 48.06, 48.25 (Azi- CH-Ph), 52.73, 52.85 (Phe- α - CH), 63.12 (N-CH_2), 66.83, 66.98 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 126.97-129.49 (Ar- CH), 135.29-135.91 (Ar- C_q), 167.88 (Azi- CO), 170.38, 171.23 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

15.3.37 2-[[1-(2-Ethylhexyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-79)



Methode: B2 (2 d, RT).

320 mg (1.14 mmol) **Li-A-71**, 433 mg (1.14 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 998 μl (1.71 mmol) PPA (50 % in DMF), 151 μl (1.37 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 183 mg, 0.39 mmol, 35 %, hellgelbes Harz.

R_f : 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 14.6° [$c = 0.7$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$, 464.65; gef.: 465.5 (dia a); 465.5 (dia b) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: dia a: $R_t = 31.0$ min (48.8 %); dia b: $R_t = 31.3$ min (49.2 %), $\Sigma = 98.0$ %.

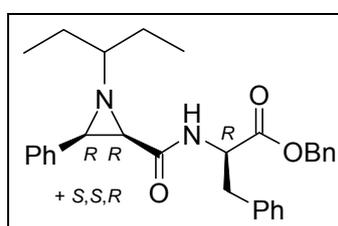
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3388 (w, CO-NH), 2928 (w, C-H), 1737 (m, CO_2Bn), 1666 (m, CO-NH), 1489 (m, Ph), 1172 (m, CO_2Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.22, 0.38 (2 x d, 6H, Val- CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 0.83 (2 x d, 6H, Val- CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 0.93 (m, 12H, 4 x CH_3), 1.27-1.60 (m, 16H, 2 x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (m, 2H, 2 x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$), 1.73, 2.02 (2 x m, 2H, Val- β - CH), 2.35-2.58 (m, 4H, 2 x N-CH_2), 2.45 (2 x d, 2H, Azi- CH-CO , $J = 6.9$ Hz), 2.97 (m, 2H, Azi- CH-Ph), 4.21, 4.33 (m, 2H, 2 x Val- α - CH), 4.96, 5.13 (m, 4H, 2 x

$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6.75, 6.93 (2 x d, 2H, $N\text{H}$, $J = 9.0$ Hz), 7.11-7.39 (m, 30H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 11.22 (CHCH_2CH_3), 14.28 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 17.02, 18.28, 18.83 (Val- CH_3), 23.22-31.23 (CH_2), 31.62, 32.01 (Val- β - CH), 40.04, 40.31 (CHCH_2CH_3), 47.24 (Azi- CH -CO), 48.18 (Azi- CH -Ph), 56.69 (Val- α - CH), 63.11 (N - CH_2), 66.59, 66.91 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 127.13-128.68 (Ar- CH), 135.62-137.83 (Ar- C_q), 168.10 (Azi- CO), 170.69 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

15.3.38 (R)-2-[[[(2R,3R)+(2S,3S)-1-(1-Ethylpropyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-80)



Methode: B2 (2 d, RT).

300 mg (1.25 mmol) **Li-A-73**, 534 mg (1.25 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 1.10 ml (1.88 mmol) PPA (50 % in DMF), 165 μl (1.50 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 195 mg, 0.41 mmol, 33 %, hellgelbes Harz.

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

$[\alpha]_D^{20}$: 20.6° [$c = 0.78$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$, 470.62; gef.: 471.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: $R_t = 28.1$ min (97.7 %).

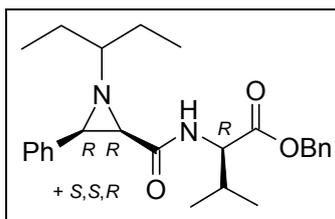
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3379 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO_2Bn), 1666 (m, CO-NH), 1489 (m, Ph), 1179 (m, CO_2Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.90 (m, 12H, 4 x CH_3), 1.47-1.73 (m, 8H, 2 x CH_2CHCH_2), 1.51 (m, 2H, 2 x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$), 2.26, 2.53, 3.04 (m, 4H, 2 x Phe- β - CH_2), 2.47 (2 x d, 2H, Azi- CH -CO, $J = 7.1$ Hz), 2.99 (2 x d, 2H, Azi- CH -Ph, $J = 7.1$ Hz), 4.54 (m, 2H, 2 x Phe- α - CH), 4.93, 4.98 (2 x s, 4H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6.84, 6.89 (2 x d, 2H, $N\text{H}$, $J = 9.1$ Hz), 6.75-7.38 (m, 30H, Ar- CH).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 9.69, 10.10 (CH_3), 25.54-26.20 (CH_2CH_3), 38.27, 38.43 (Phe- β - CH_2), 45.96, 46.41 (Azi- CH -CO), 47.09, 47.33 (Azi- CH -Ph), 52.66,

52.82 (Phe- α -CH), 66.90 (CO₂CH₂Ph), 70.62, 70.80 (N-CH), 126.95-129.56 (Ar-CH), 135.27-136.00 (Ar-C_q), 167.65, 168.00 (Azi-CO), 170.44, 171.25 (CO₂CH₂Ph).

15.3.39 (R)-2-[[[(2R,3R)+(2S,3S)-1-(1-Ethylpropyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-81)



Methode: B2 (2 d, RT).

305 mg (1.27 mmol) **Li-A-73**, 482 mg (1.27 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 1.12 ml (1.91 mmol) PPA (50 % in DMF), 167 μ l (1.52 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 139 mg, 0.33 mmol, 26 %, hellgelbes Harz.

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

$[\alpha]_D^{20}$: 20.2° [c = 0.51, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₆H₃₄N₂O₃, 422.57; gef.: 423.5 (dia a); 423.4 (dia b) [M+H]⁺.

LC-MS: dia a: R_t = 28.0 min (48.4 %); dia b: R_t = 28.3 min (50.6 %), Σ = 99.0 %.

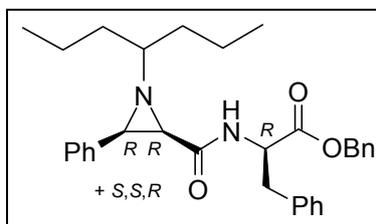
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1496 (m, Ph), 1172 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.20, 0.37 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.9 Hz), 0.83 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.9 Hz), 0.97 (m, 12H, 4 x CH₃), 1.53-1.78 (m, 10H, 2 x CH₂CHCH₂), 1.73, 2.02 (2 x m, 2H, Val- β -CH), 2.50 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, *J* = 6.9 Hz), 3.02 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.21, 4.37 (m, 2H, 2 x Val- α -CH), 4.95, 5.12 (m, 4H, 2 x CO₂CH₂Ph), 6.77, 6.96 (2 x d, 2H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.11-7.40 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 10.18, 10.28 (CH₃), 16.98-18.87 (Val-CH₃), 25.74-26.36 (CH₂CH₃), 31.27, 31.99 (Val- β -CH), 46.44 (Azi-CH-CO), 47.27 (Azi-CH-Ph), 56.65 (Val- α -CH), 66.61, 66.97 (CO₂CH₂Ph), 70.77, 70.93 (N-CH), 127.13-128.72 (Ar-CH), 135.62-135.93 (Ar-C_q), 168.24 (Azi-CO), 170.83

(CO₂CH₂Ph).

15.3.40 (R)-3-Phenyl-2-[[[(2R,3R)+(2S,3S)-3-phenyl-1-(1-propylbutyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino]-propionsäurebenzylester (A-82)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-74**, 428 mg (1.00 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 160 mg, 0.32 mmol, 32 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.56 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: 18.7° [c = 0.71, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₈N₂O₃, 498.67; gef.: 499.6 [M+H]⁺.

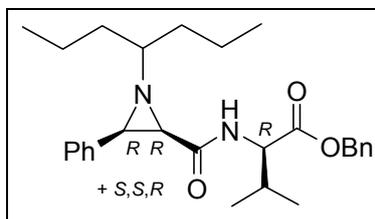
LC-MS: R_t = 29.2 min (84.1 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-MH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-MH), 1507 (m, Ph), 1178 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.90 (m, 12H, 4 x CH₃), 1.38 (m, 8H, 4 x CH₂CH₃), 1.50 (m, 8H, 4 x CHCH₂), 1.69 (m, 2H, 2 x CH), 2.24, 2.50, 3.02 (m, 4H, 2 x Phe- β -CH₂), 2.47 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 2.99 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.51 (m, 2H, 2 x Phe- α -CH), 4.92, 4.98 (2 x s, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.83, 6.88 (2 x d, 2H, NH, *J* = 8.6 Hz), 6.75-7.37 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.61-14.79 (CH₃), 18.76-19.27 (CH₂CH₃), 35.86-36.63 (CHCH₂), 38.36, 38.47 (Phe- β -CH₂), 46.07, 46.39 (Azi-CH-CO), 47.16, 47.49 (Azi-CH-Ph), 52.66, 52.90 (Phe- α -CH), 66.87, 66.96 (CO₂CH₂Ph), 68.00, 68.22 (N-CH), 126.93-129.53 (Ar-CH), 135.27-136.02 (Ar-C_q), 167.73, 168.02 (Azi-CO), 170.40, 171.23 (CO₂CH₂Ph).

15.3.41 (R)-3-Methyl-2-[(2R,3R)+(2S,3S)-3-phenyl-1-(1-propylbutyl)-aziridin-2-carbonyl]-amino}-butansäurebenzylester (A-83)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-74**, 380 mg (1.00 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 131 mg, 0.29 mmol, 29 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 14.9° [c = 0.53, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₈N₂O₃, 450.63; gef.: 451.5 (dia a); 451.5 (dia b) [M+H]⁺.

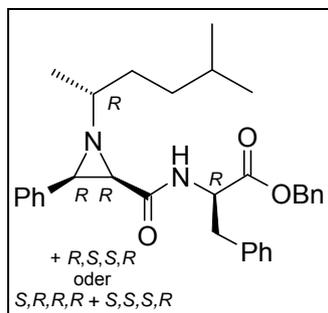
LC-MS: dia a: R_t = 29.5 min (41.3 %); dia b: R_t = 29.8 min (46.4 %), Σ = 97.9 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1172 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.19, 0.36 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.9 Hz), 0.83 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.8 Hz), 0.91 (m, 12H, 4 x CH₃), 1.44 (m, 8H, 4 x CH₂CH₃), 1.59 (m, 8H, 4 x CHCH₂), 1.74 (m, 2H, 2 x CH), 1.75, 2.03 (2 x m, 2H, Val-β-CH), 2.49 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, *J* = 7.1 Hz), 3.02 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.21, 4.36 (m, 2H, 2 x Val-α-CH), 4.95, 5.12 (2 x s, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.77, 6.95 (2 x d, 2H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.12-7.40 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 10.18, 10.28 (CH₃), 16.86-18.12 (Val-CH₃), 18.67, 18.80 (CH₂CH₃), 31.17, 31.81 (Val-β-CH), 35.93, 36.56 (CHCH₂), 46.44 (Azi-CH-CO), 47.16 (Azi-CH-Ph), 56.33, 56.52 (Val-α-CH), 66.47, 66.79 (CO₂CH₂Ph), 67.93 (N-CH), 127.46-128.59 (Ar-CH), 135.24, 135.48 (Ar-C_q), 168.12, 168.97 (Azi-CO), 170.58, 170.82 (CO₂CH₂Ph).

15.3.42 2-[[1-(1,4-Dimethylpentyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-84)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-72a**, 428 mg (1.00 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 186 mg, 0.37 mmol, 37 %, hellgelbes Harz.

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

$[\alpha]_D^{20}$: 20.9° [c = 0.56, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₂H₃₈N₂O₃, 498.67; gef.: 499.6 [M+H]⁺.

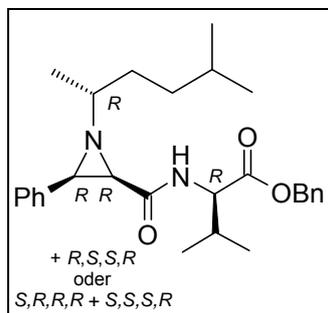
LC-MS: R_t = 29.3 min (99.4 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3382 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1178 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.85, 0.93 (4 x d, 12H, 2 x CH(CH₃)₂, J = 6.6 Hz), 1.18, 1.24 (2 x d, 6H, CH₃CH, J = 6.3 Hz), 1.18-1.73 (m, 10H, CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 1.77 (m, 2H, 2 x CH₃CH), 2.23, 2.46, 3.01 (m, 4H, 2 x Phe- β -CH₂), 2.51 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, J = 7.0 Hz), 2.97 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, J = 6.9 Hz), 4.54 (m, 2H, 2 x Phe- α -CH), 4.89, 4.96 (2 x s, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.85, 6.87 (2 x d, 2H, NH, J = 8.6 Hz), 6.71-7.39 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 19.92, 20.08 (CH₃CH), 22.61-22.97 (CH(CH₃)₂), 28.33, 28.43 (CH(CH₃)₂), 34.09-35.37 (CH₂CH₂), 38.47, 38.55 (Phe- β -CH₂), 46.46-46.88 (Azi-CH-CH), 52.64, 52.91 (Phe- α -CH), 64.40, 64.77 (CH₃CH), 66.63, 66.93 (CO₂CH₂Ph), 126.89-129.50 (Ar-CH), 135.32-136.02 (Ar-C_q), 167.68, 167.96 (Azi-CO), 170.40, 171.20 (CO₂CH₂Ph).

15.3.43 2-[[1-(1,4-Dimethylpentyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-85)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-72a**, 380 mg (1.00 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 129 mg, 0.29 mmol, 29 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 15.0° [c = 0.52, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₈N₂O₃, 450.63; gef.: 451.5 (dia a); 451.5 (dia b) [M+H]⁺.

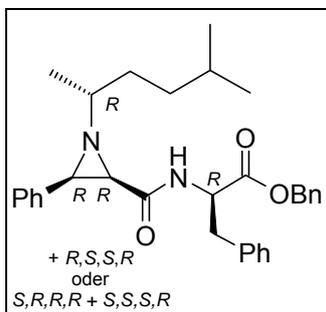
LC-MS: dia a: R_t = 29.3 min (50.2 %); dia b: R_t = 29.7 min (49.8 %), Σ = 100 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3385 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1666 (m, CO-NH), 1504(m, Ph), 1172 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 695 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.19, 0.34 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.8 Hz), 0.83 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 6.9 Hz), 0.89 (2 x d, 12H, 2 x CH(CH₃)₂, *J* = 6.6 Hz), 1.24 (2 x d, 6H, CH₃CH, *J* = 5.8 Hz), 1.25-1.68 (m, 10H, CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 1.74 (m, 2H, 2 x CH₃CH), 1.80, 2.01 (2 x m, 2H, Val- β -CH), 2.53 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, *J* = 6.9 Hz), 2.98 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, *J* = 6.9 Hz), 4.20, 4.35 (m, 2H, 2 x Val- α -CH), 4.93, 5.12 (m, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.79, 6.92 (2 x d, 2H, NH, *J* = 9.2 Hz), 7.10-7.41 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.00-18.90 (Val-CH₃), 20.12, 20.25 (CH₃CH), 22.64-22.81 (CH(CH₃)₂), 28.38, 28.57 (CH(CH₃)₂), 31.31, 31.98 (Val- β -CH), 34.14-35.08 (CH₂CH₂), 46.44, 46.60 (Azi-CH-CO), 47.11, 47.27 (Azi-CH-Ph), 56.47, 56.63 (Val- α -CH), 64.50, 64.60 (CH₃CH), 66.58, 66.90 (CO₂CH₂Ph), 127.13-128.71 (Ar-CH), 135.41-135.96 (Ar-C_q), 167.92, 168.19 (Azi-CO), 170.77, 171.56 (CO₂CH₂Ph).

15.3.44 2-[[1-(1,4-Dimethylpentyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-phenylpropionsäurebenzylester (A-86)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-72b**, 428 mg (1.00 mmol) (*R*)-Phe-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 111 mg, 0.37 mmol, 22 %, hellgelbes Harz.

R_f : 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 20.2° [c = 0.65, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $C_{32}H_{38}N_2O_3$, 498.67; gef.: 499.6 [M+H]⁺.

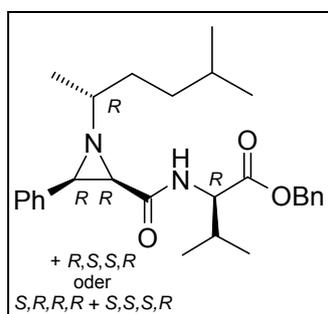
LC-MS: R_t = 29.2 min (95.9 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3381 (w, CO-NH), 2967 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1665 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1180(m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.85, 0.90 (4 x d, 12H, 2 x CH(CH₃)₂, J = 6.4 Hz), 1.09, 1.13 (2 x d, 6H, CH₃CH, J = 6.4 Hz), 1.15-1.68 (m, 10H, CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 1.71 (m, 2H, 2 x CH₃CH), 2.26, 2.50, 3.02 (m, 4H, 2 x Phe- β -CH₂), 2.43 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, J = 7.1 Hz), 2.97 (m, 2H, 2 x Azi-CH-Ph), 4.55 (m, 2H, 2 x Phe- α -CH), 4.84, 4.88 (2 x s, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.84, 6.88 (2 x d, 2H, NH, J = 8.1 Hz), 6.74-7.39 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 19.26, 19.54 (CH₃CH), 22.55-22.90 (CH(CH₃)₂), 28.37, 28.43 (CH(CH₃)₂), 34.57-35.11 (CH₂CH₂), 38.26, 38.48 (Phe- β -CH₂), 45.48, 45.79 (Azi-CH-CO), 47.98, 48.30 (Azi-CH-Ph), 52.53, 52.90 (Phe- α -CH), 64.61, 64.77 (CH₃CH), 66.88, 66.99 (CO₂CH₂Ph), 127.08-129.61 (Ar-CH), 135.24-135.84 (Ar-C_q), 167.58, 168.06 (Azi-CO), 170.40, 171.30 (CO₂CH₂Ph).

15.3.45 2-[[1-(1,4-Dimethylpentyl)-3-phenylaziridin-2-carbonyl]-amino]-3-methylbutansäurebenzylester (A-87)



Methode: B2 (2 d, RT).

267 mg (1.00 mmol) **Li-A-72b**, 380 mg (1.00 mmol) (*R*)-Val-OBn**p*TosOH, 876 μ l (1.50 mmol) PPA (50 % in DMF), 132 μ l (1.20 mmol) NMM, 7 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [6/1].

Ausbeute: 79.0 mg, 0.18 mmol, 18 %, hellgelbes Harz.

R_f: 0.53 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: 18.9° [c = 0.56, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₈N₂O₃, 450.63; gef.: 451.5 (dia a); 451.5 (dia b) [M+H]⁺.

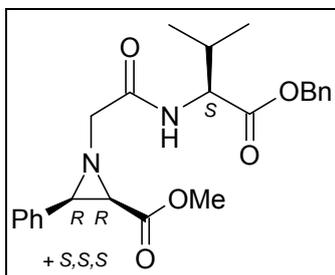
LC-MS: dia a: R_t = 29.4 min (47.9 %); dia b: R_t = 29.7 min (50.1 %), Σ = 98.0 %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3379 (w, CO-NH), 2947 (w, C-H), 1737 (m, CO₂Bn), 1667 (m, CO-NH), 1504 (m, Ph), 1172 (m, CO₂Bn), 747 (m, Ph), 696 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.19, 0.37 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 7.0 Hz), 0.82 (2 x d, 6H, Val-CH₃, *J* = 7.1 Hz), 0.88 (2 x d, 12H, 2 x CH(CH₃)₂, *J* = 6.6 Hz), 1.18 (2 x d, 6H, CH₃CH, *J* = 6.0 Hz), 1.19-1.70 (m, 10H, CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 1.73 (m, 2H, 2 x CH₃CH), 1.78, 2.01 (2 x m, 2H, Val- β -CH), 2.45 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO, *J* = 7.0 Hz), 3.06 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, *J* = 7.1 Hz), 4.21, 4.37 (m, 2H, 2 x Val- α -CH), 4.95, 5.12 (m, 4H, CO₂CH₂Ph), 6.78, 6.94 (2 x d, 2H, NH, *J* = 9.1 Hz), 7.12-7.39 (m, 30H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 16.98-18.88 (Val-CH₃), 19.52 (CH₃CH), 22.60, 22.91 (CH(CH₃)₂), 28.40 (CH(CH₃)₂), 31.27, 31.90 (Val- β -CH), 34.65, 35.18 (CH₂CH₂), 45.86 (Azi-CH-CO), 48.10 (Azi-CH-Ph), 56.65 (Val- α -CH), 64.85 (CH₃CH), 66.60, 66.99 (CO₂CH₂Ph), 127.13-128.72 (Ar-CH), 135.38-135.94 (Ar-C_q), 167.91, 168.29 (Azi-CO), 170.88, 171.68 (CO₂CH₂Ph).

15.3.46 (2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-[(*S*)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-methylpropyl-carbamoyl]-methyl]-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-88)



Methode: B1 (16 d, 2 °C).

Bei dem Versuch, **A-69** (Kapitel 15.2.20, S. 154) nach Methode C1 zu hydrolysieren kam es zur Spaltung des *tert*-Butylesters und der Bildung des entsprechenden Carboxylats **N-A-69**. Der Methylester blieb intakt, die Peptidkupplung erfolgte an der CH₂-CO₂H-Funktion.

370 mg (1.31 mmol) **N-A-69**, 496 mg (1.31 mmol) Val-OBn**p*TosOH, 312 µl (1.44 mmol) DPPA, 381 µl (2.75 mmol) NEt₃, 12 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

Ausbeute: 191 mg, 0.45 mmol. 34 %, farbloses Öl.

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: -6.5° [c = 0.52, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₄H₂₈N₂O₅, 424.50; gef.: 425.3 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 21.9 min (99.7 %).

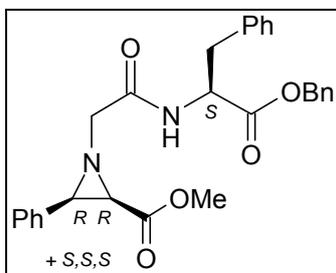
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3371 (w, CO-NH), 2955 (w, C-H), 1713 (m, CO₂Bn), 1514 (m, Ph), 1180 (m, CO₂Bn), 725 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.89 (m, 2 x 6H, Val-CH₃), 2.23 (m, 2 x 1H, Val-β-CH), 2.66 (2 x d, 2H, Azi-CH-CO₂Me, J = 7.1 Hz), 3.05, 3.60 (2 x m, 4H, N-CH₂), 3.09, 3.16 (2 x d, 2H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.50, 3.51 (2 x s, 6H, CO₂CH₃), 4.62 (m, 2 x 1H, Val-α-CH), 5.16 (m, 2 x 2H, OBn-CH₂), 7.23-7.43 (m, 20H, Ar-CH), 7.71, 7.83 (2H, NH, J = 8.7 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.12-19.01 (Val-CH₃), 30.67, 30.93 (Val-α-CH), 46.71, 47.10 (Azi-CH-Ph), 47.35, 47.45 (Azi-CH-CO₂Me), 52.02, 52.07 (CO₂CH₃), 57.13, 57.18 (Val-α-CH), 61.57, 61.60 (N-CH₂), 66.87 (OBn-CH₂), 127.31-128.57 (Ar-CH), 133.82-135.57 (Ar-C_q), 167.46, 167.51 (CO₂Me), 169.35, 169.46 (CO-

NH), 171.24, 171.28 (CO₂Bn).

15.3.47 (2R,3R)+(2S,3S)-1-(((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethyl-carbamoyl)-methyl]-3-phenylaziridin-2-carbonsäuremethylester (A-89)



Methode: B1 (16 d, 2 °C).

Bei dem Versuch, **A-69** nach Methode C1 zu hydrolysieren kam es zur Spaltung des *tert*-Butylesters und der Bildung des entsprechenden Carboxylats **N-A-69**. Der Methylester blieb intakt, die Peptidkupplung erfolgte an der CH₂-CO₂H-Funktion.

143 mg (0.50 mmol) **N-A-69**, 146 mg (0.50 mmol) Phe-OBn*HCl, 119 µl (0.55 mmol) DPPA, 146 µl (1.05 mmol) NEt₃, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

Ausbeute: 142 mg, 0.30 mmol. 60 %, farbloses Öl.

R_f: 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D^{20 °C}: -12.2° [c = 0.54, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₈H₂₈N₂O₅, 472.55; gef.: 473.3 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 22.6 min (95.1 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3348 (w, CO-NH), 2924 (w, C-H), 1713 (m, CO₂Bn), 1515 (m, Ph), 1179 (m, CO₂Bn), 696 (s, Ph).

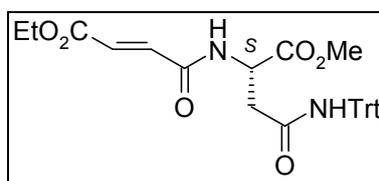
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.52, 2.60 (2 x d, 2H, Azi-CH₂-CO₂Me, J = 7.0 Hz, 7.1 Hz), 2.92-3.37 (m, 2 x 2H, Phe-β-CH₂), 2.93, 3.58 (m, 2 x 2H, N-CH₂), 3.08 (d, 2 x 1H, Azi-CH-Ph, J = 7.1 Hz), 3.39, 3.42 (2 x s, 6H, CO₂CH₃), 4.92, 5.01 (2 x m, 2H, Phe-α-CH), 5.14 (m, 2 x 2H, OBn-CH₂), 7.05-7.38 (m, 30H, Ar-CH), 7.89, 7.93 (2H, NH, J = 7.9 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 37.74, 37.97 (Phe-β-CH₂), 46.38, 46.68 (Azi-CH-Ph), 47.46, 47.57 (Azi-CH-CO₂Me), 51.97, 52.05 (CO₂CH₃), 53.29, 53.53 (Phe-α-

$\underline{\text{C}}\text{H}$), 61.25, 63.33 ($N\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 67.20, 67.33 ($\text{OBn-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 127.04-129.37 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 133.99-136.11 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}_q$), 167.33, 167.57 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Me}$), 169.08, 169.23 ($\underline{\text{C}}\text{O-NH}$), 170.96, 171.08 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Bn}$).

15.4 E-Olefine

15.4.1 (E)-3-[(S)-1-Methoxycarbonyl-2-(tritylcarbamoyl)-ethylcarbamoyl]-acrylsäureethylester (E-OI-23)



Methode: B5 (1 h, 0°C).

0.93 g (6.45 mmol) Fumarsäuremonoethylester, 0.67 g (3.22 mmol) DCC, 1.06 g (2.93 mmol) Asn(Trt)-OMe, 70 ml Dichlormethan.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

Ausbeute: 1.03 g, 2.00 mmol, 68 %, farbloser Feststoff.

Schmp.: 173-174 °C

R_f: 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

$[\alpha]_D^{20}$: -6.5° [c = 0.89, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₂N₂O₆, 514.58; gef.: 537.4 [M+Na]⁺.

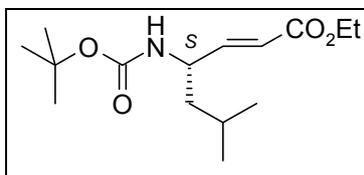
LC-MS: R_t = 21.9 min (100 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1724 (w, CO₂R), 1649 (m, CO-NH), 1524 (w, Ph), 1167 (w, CO₂R), 977 (w, C=C), 700 (m, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.32 (m, 3H, CO₂CH₂CH₃), 2.80, 3.13 (m, 2 x 1H, Asn- β -CH₂), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.25 (m, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.88 (m, 1H, Asn- α -CH), 6.74 (s, 1H, CO-NH), 6.76 (d, 1H, CH=CH-CO₂Et), 6.84 (d, 1H, CH-CO₂Et), 7.15 (m, 1H, Trt-NH), 7.27 (m, 15H, Trt-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.28 (CO₂CH₂CH₃), 38.11 (Asn- β -CH₂), 49.32 (Asn- α -CH), 52.96 (CO₂CH₃), 61.30 (CO₂CH₂CH₃), 71.13 (Trt- $\underline{\text{C}}_q$), 127.37-128.72 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 131.10 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH-CO}_2\text{Et}$), 135.80 ($\underline{\text{C}}\text{H-CO}_2\text{Et}$), 144.30 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 163.46 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O}$), 165.37 (CO₂CH₂CH₃), 169.55 (CO₂Me), 170.97 (Trt- $\underline{\text{C}}\text{O}$).

15.4.2 (E)-(S)-4-tert-Butoxycarbonylamino-6-methylhept-2-ensäureethylester (E-OI-24)



Methode: F1 (4 h, -78 °C).

2.58 ml (13.0 mmol) Triethylphosphonoacetat, 1.46 g (13.0 mmol) Kalium-*tert*-butanolat 2.17 g (10.0 mmol) Boc-Leu-CHO (s. Kap. 15.1.7), 40 ml THF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [10/1].

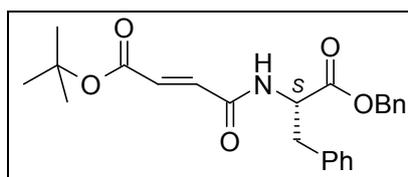
Ausbeute: 1.06 g, 3.71 mmol, 37 %, farbloses Harz.

R_f: 0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat [2/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 399.69 MHz): δ [ppm] = 0.93 (d, 6H, 2 x Leu-CH₃, J = 6.5 Hz), 1.28 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃, J = 7.2 Hz), 1.37 (m, 2H, Leu-β-CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.68 (m, 1H, Leu-γ-CH), 4.18 (q, 2H, CO₂CH₂CH₃, J = 7.1 Hz), 4.33 (s, 1H, Leu-α-CH), 4.45 (s, 1H, NH), 5.91 (d, CH=CH-CO₂Et, J = 15.7 Hz), 6.82 (dd, CH=CH-CO₂Et, J = 15.7 & 5.6 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.61 MHz): δ [ppm] = 14.38 (CO₂CH₂CH₃), 22.85 (Leu-CH₃), 24.87 (Leu-γ-CH), 28.50 (C(CH₃)₃), 44.02 (Leu-β-CH₂), 49.94 (Leu-α-CH), 60.55 (CO₂CH₂CH₃), 79.81 (C(CH₃)₃), 120.58 (CH=CH-CO₂Et), 149.01 (CH=CH-CO₂Et), 155.21 (CO-NH), 166.53 (CO₂Et).

15.4.3 (E)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-acrylsäure-*tert*-butylester (E-OI-25)



Methode: B4 (3 d, RT).

0.60 g (3.48 mmol) (E)-3-(*tert*-Butoxycarbonyl)acrylsäure, 1.90 g (3.65 mmol) PyBOP, 0.80 ml (7.31 mmol) NMM, 1.02 g (3.48 mmol) Phe-OBn·HCl, 20 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5/1].

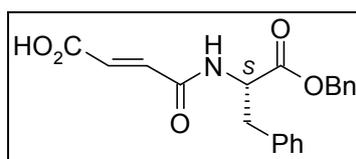
Ausbeute: 0.95 g, 2.32 mmol, 67 %, farbloses Harz.

R_f: 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.17 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 5.00 (m, 1H, Phe-α-CH), 5.17 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.17 (d, 1H, NH, J = 7.6 Hz), 6.73 (d, 2H, CH=CH, J = 7.8 Hz), 6.96-6.99, 7.21-7.38 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.61 MHz): δ [ppm] = 28.15 (C(CH₃)₃), 37.80 (Phe-β-CH₂), 53.53 (Phe-α-CH), 67.67 (CO₂CH₂Ph), 81.89 (C(CH₃)₃), 127.37-129.45 (Ar-CH), 133.19, 134.60 (CH=CH), 135.02 (Ar-C_q, CO₂Bn), 135.44 (Ar-C_q, Phe), 163.44, 164.63 (CO), 171.09 (CO₂Bn).

15.4.4 (E)-3-((S)-1-Benzoyloxycarbonyl-2-phenylethylcarbamoyl)-acrylsäure (E-OI-26)



Methode: E2 (2 h, RT).

190 mg (0.46 mmol) **E-OI-25**, 4 ml Dichlormethan, 2 ml TFA.

Ausbeute: 136 mg, 0.38 mmol, 83 %, farbloser Feststoff.

Schmp.: 166-168 °C

R_f: 0.18 (Chloroform/Methanol [4/1]).

[α]_D^{20 °C}: -15.9° [c = 0.89, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₂N₂O₆, 353.38; gef.: 354.2 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 17.6 min (100 %).

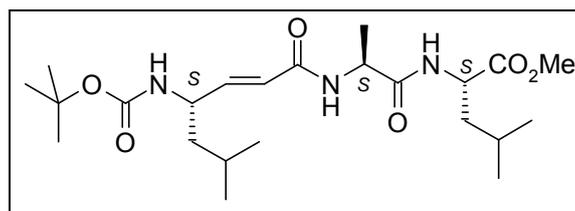
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1734 (w, CO₂Bn), 1695 (w, COOH), 1651 (m, CO-NH), 1533 (w, Ph), 1187 (w, CO₂Bn), 988 (w, C=C), 748 (w, Ph), 697 (w, Ph).

¹H-NMR: (d₆-DMSO, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.05 (m, 2H, Phe-β-CH₂), 4.64 (m, 1H, Phe-α-CH), 5.10 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 6.49, 6.95 (2 x d, 2 x 1H, CH=CH, J = 15.5 Hz), 7.19-7.37 (m, 10H, Ar-CH), 8.99 (d, 1H, NH, J = 7.6 Hz), 12.92 (b, 1H, COOH).

¹³C-NMR: (d₆-DMSO, 100.61 MHz): δ [ppm] = 36.55 (Phe-β-CH₂), 53.98 (Phe-α-CH), 66.12

(CO₂CH₂Ph), 126.61-129.02 (Ar-CH), 130.44, 135.89 (CH=CH), 135.63 (Ar-C_q, CO₂Bn), 136.77 (Ar-C_q, Phe), 163.17 (CO-NH), 166.22 (COOH), 170.94 (CO₂Bn).

15.4.5 (S)-2-[(S)-2-((E)-(S)-4-tert-Butoxycarbonylamino-6-methylhept-2-enoylamino)-propionylamino]-4-methylpentansäuremethylester (E-OI-27)



Methode: B4 (5 d, RT).

Die Hydrolyse von **E-OI-24** erfolgte quantitativ nach Methode C2, die Spaltung der Boc-Schutzgruppe von **Boc-Ala-Leu-OMe** quantitativ nach Methode E4. Die Produkte wurden ohne Charakterisierung eingesetzt.

245 mg (0.95 mmol) **E-OI-24-COOH**, 314 mg (0.95 mmol) **Ala-Leu-OMe*TFA**, 544 mg (1.05 mmol) PyBOP, 313 µl (2.85 mmol) NMM, 10 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].

Ausbeute: 244 mg, 0.54 mmol, 56 %, farbloser Feststoff.

R_f: 0.24 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

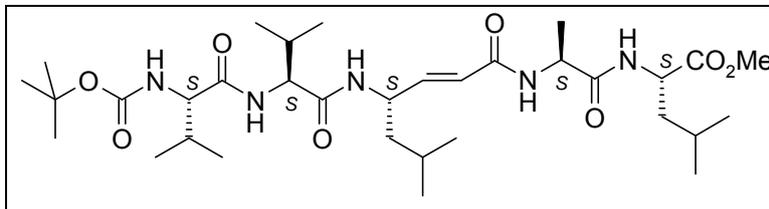
LOOP-ESI-MS: ber. f. C₂₃H₄₁N₃O₆, 455.60; gef.: 456.2 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 20.7 min (96.9 %).

¹H-NMR: (CDCl₃, 399.69 MHz): δ [ppm] = 0.93 (m, 12H, 4 x Leu-CH₃), 1.36, 1.52, 1.65 (m, 4H, 2 x Leu-β-CH₂), 1.41 (d, 3H, Ala-CH₃, J = 7.1 Hz), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.64 (m, 2H, 2 x Leu-γ-CH), 3.74 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.31 (m, 1H, Ala-α-CH), 4.41 (br, 1H, Ala-NH), 4.58 (m, 2H, 2 x Leu-α-CH), 5.90 (d, CH=CH-C=O, J = 15.5 Hz), 6.09, 6.42 (2 x d, 2 x 1H, 2 x Leu-NH, J = 6.9 & 8.1 Hz), 6.70 (dd, CH=CH-C=O, J = 15.2 & 6.1 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.61 MHz): δ [ppm] = 18.33 (Ala-CH₃), 21.98, 22.91 (Leu-CH₃), 24.97 (Leu-γ-CH), 28.54 (C(CH₃)₃), 41.46, 44.17 (Leu-β-CH₂), 48.80, 51.03 (Leu-α-CH), 50.04 (Ala-α-CH), 52.46 (CO₂CH₃), 80.45 (C(CH₃)₃), 122.65 (CH=CH-C=O), 151.16 (CH=CH-C=O), 165.32 (CH=CH-C=O), 172.09 (Ala-C=O), 173.23 (CO₂Me).

15.4.6 (S)-2-((S)-2-((E)-((S)-4-(((S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-methylbutyrylamino)-3-methylbutyrylamino]-6-methylhept-2-enoylamino)-propionylamino)-4-methylpentansäuremethylester (E-OI-28)



Methode: B4 (5 d, RT).

die Spaltung der Boc-Schutzgruppe von **E-OI-27** erfolgte quantitativ nach Methode E4. Das Produkt wurde ohne Charakterisierung eingesetzt.

150 mg (0.32 mmol) **E-OI-27-NH₂*TFA**, 101 mg (0.32 mmol) Boc-Val-Val-OH, 183 mg (0.35 mmol) PyBOP, 106 μ l (0.96 mmol) NMM, 8 ml DMF_{abs}.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1/1].

HPLC (präparativ): Acetonitril-Wasser-Gradient [0-5 min: 30 %, 5-25 min: 30-85 %]

Ausbeute: 9 mg, 13.8 μ mol, 4 %, farbloser Feststoff.

Schmp.: 239 °C

R_f: 0.16 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/4]).

$[\alpha]_D^{20}$: n.b.

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₃H₅₉N₅O₈, 653.87; gef.: 654.4 [M+H]⁺.

LC-MS: R_t = 20.4 min (96.8 %).

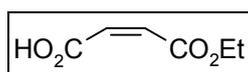
¹H-NMR: (CDCl₃, 399.69 MHz): δ [ppm] = 0.90 (m, 24H, 4 x Leu-CH₃, 4 x Val-CH₃), 1.37, 1.50, 1.68 (m, 4H, 2 x Leu- β -CH₂), 1.40 (d, 3H, Ala-CH₃, J = 6.8 Hz), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.65 (m, 2H, 2 x Leu- γ -CH), 2.17 (m, 2H, 2 x Val- β -CH), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.99, 4.31 (m, 2H, 2 x Val- α -CH), 4.57 (m, 1H, Leu- α -CH-CO₂Me), 4.71 (m, 1H, CH-C=C), 4.90 (m, 1H, Ala- α -CH), 5.49 (m, 1H, NH_{Boc}), 6.14 (d, CH=CH-C=O, J = 15.5 Hz), 6.79 (dd, CH=CH-C=O, J = 15.2 & 7.4 Hz), 6.95 (br, 1H, Ala-NH), 7.06 (br, 1H, Val-NH), 7.40 (br, 1H, Leu-NH), 7.50 (br, 1H, C=C-CH-NH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.61 MHz): δ [ppm] = 18.26 (Ala-CH₃), 19.34, 19.57 (Val-CH₃), 22.15, 22.87 (Leu-CH₃), 24.97 (Leu- γ -CH), 28.51 (C(CH₃)₃), 29.85 (Val- β -CH), 41.30,

44.18 (Leu-β-CH₂), 48.60 (Ala-α-CH), 48.69, 51.09 (Leu-α-CH), 52.36 (CO₂CH₃), 59.31, 60.76 (Val-α-CH), 80.43 (C(CH₃)₃), 123.38 (CH=CH-C=O), 144.36 (CH=CH-C=O), 165.45-175.60 (C=O).

15.5 Z-Olefine

15.5.1 Maleinsäuremonoethylester



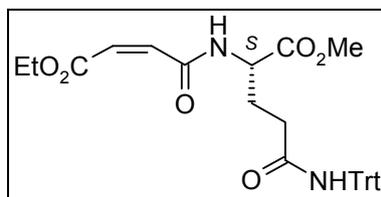
Methode: F2 (3 h, 0°C; 1 d, RT).

0.49 g (5.00 mmol) Maleinsäureanhydrid, 0.29 ml (5.00 mmol) EtOH, 0.76 ml (5.50 mmol) NEt₃, 50 ml Dichlormethan.

Ausbeute: 552 mg, 3.83 mmol, 77 %, hellgelbes Öl.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[313]

15.5.2 (S)-2-((Z)-3-Ethoxycarbonylacryloylamino)-4-(trityl-carbamoyl)-butansäuremethylester (Z-OI-23)



Methode: B6 (18 h, RT).

0.20 g (1.39 mmol) Maleinsäuremonoethylester, 0.17 ml (1.53 mmol) NMM, 0.20 ml (1.53 mmol) IBCF, 0.52 g (1.39 mmol) Gln(Trt)-OMe, 7.5 ml THF, 7.0 ml DMF.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [2/1].

Ausbeute: 198 mg, 0.37 mmol, 27 %, farbloser Feststoff.

Schmp.: 144 °C

R_f: 0.09 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

[α]_D²⁰: -6.6° [c = 1.09, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₂N₂O₆, 528.61; gef.: 529.0 [M+H]⁺.

LC-MS: $R_t = 21.3$ min (100 %).

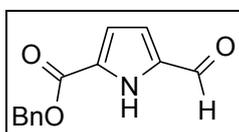
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1740 (w, CO_2R), 1651 (w, CO-NH), 1526 (w, Ph), 1173 (w, CO_2R), 748 (w, C=C), 699 (w, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.25 (m, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J = 7.1$ Hz), 2.00, 2.30 (m, 2 x 1H, $\text{Gln-}\beta\text{-CH}_2$), 2.36, 2.51 (m, 2 x 1H, $\text{Gln-}\gamma\text{-CH}_2$), 3.72 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.09 (m, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.66 (m, 1H, NH-CH), 6.12 (d, 1H, $\text{CH-CO}_2\text{Et}$, $J = 12.7$ Hz), 6.29 (d, 1H, $\text{CH=CH-CO}_2\text{Et}$, $J = 12.7$ Hz), 7.08 (s, 1H, Trt-NH), 7.25 (m, 15H, Trt-CH), 8.11 (d, 1H, CO-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.02 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.64 ($\text{Gln-}\beta\text{-CH}_2$), 33.35 ($\text{Gln-}\gamma\text{-CH}_2$), 51.99 (NH-CH), 52.56 (CO_2CH_3), 61.48 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 70.58 (Trt-C_q), 126.24 ($\text{CH-CO}_2\text{Et}$), 126.95-128.74 (Ar-CH), 136.91 ($\text{CH=CH-CO}_2\text{Et}$), 144.69 (Ar-C_q), 164.29 (NH-CO), 165.80 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 171.03 (Trt-CO), 172.03 (CO_2Me).

15.6 Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein

15.6.1 5-Formyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (Py-02)



Methode: G2 (20 h, RT).

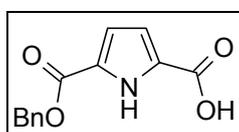
5.59 ml (59.6 mmol) Phosphorylchlorid, 11.6 ml (149 mmol) DMF, 6.82 g (29.8 mmol) 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester **Py-01**, 125 ml Dichlormethan.

Flash-SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4/1].

Ausbeute: 3.63 g, 15.8 mmol, 53 %, cremefarbener Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[218]

15.6.2 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäuremonobenzylester (Py-03)



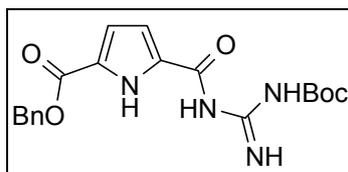
Methode: G3 (2 h, 40 °C).

3.63 g (15.8 mmol) **Py-02** in 20 ml Aceton, 4.99 g (31.6 mmol) Kaliumpermanganat in 60 ml Aceton/Wasser (1:1).

Ausbeute: 1.93 g, 7.87 mmol, 71 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[219]

15.6.3 5-[*N*-Boc-guanidinocarbonyl]-1*H*-pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (**Py-04**)



Methode: B3 (24 h, RT).

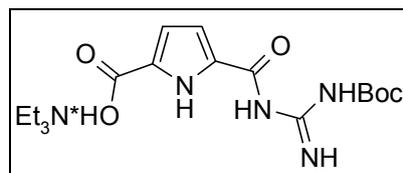
1.93 g (7.87 mmol) **Py-03**, 3.28 g (8.66 mmol) HBTU, 1.82 ml (16.5 mmol) NMM, 20 ml DMF_{abs}, 2.51 g (15.74 mmol) Boc-Guanidin.

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [2/1].

Ausbeute: 2.61 g, 6.76 mmol, 86 %, farbloser Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[220]

15.6.4 5-[*N*-Boc-guanidinocarbonyl]-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure (**Py-05**)

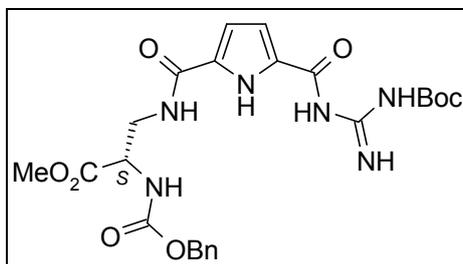


Methode: E1 (3.5 h, RT).

2.92 g (7.56 mmol) **Py-04**, 750 mg Pd/C, 1.57 ml (11.3 mmol) NEt₃, 50 ml Methanol.

Ausbeute: 2.97 g, 7.48 mmol, 99 %, hellgrauer Feststoff.

Die analytischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[220]

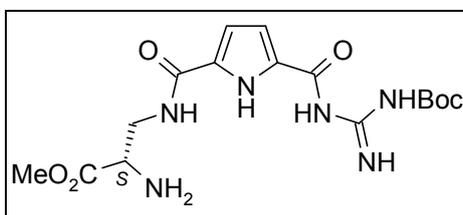
15.6.5 (S)-2-Cbz-3-({5-[N-Boc-guanidinocarbonyl]-1H-pyrrol-2-carbonyl}-amino)-propionsäuremethylester (Py-06)

Methode: B4 (2 d, RT).

2.15 g (5.41 mmol) **Py-05**, 1.56 g (5.41 mmol) **AS-02**, 2.81 g (5.41 mmol) PyBOP,
1.25 ml (11.3 mmol) NMM, 20 ml DMF_{abs}.

Ausbeute: 2.58 g, 4.86 mmol, 90 %, hellgelber Feststoff.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[196]

15.6.6 (S)-2-Amino-3-({5-[N-Boc-guanidinocarbonyl]-1H-pyrrol-2-carbonyl}-amino)-propionsäuremethylester (Py-07)

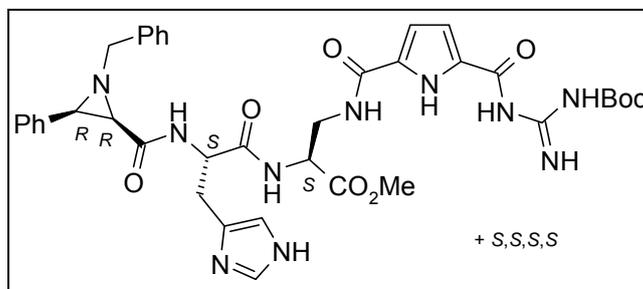
Methode: E3 (4 h, RT).

2.58 g (4.86 mmol) **Py-06**, 486 mg Pd/C, 30 ml Methanol.

Ausbeute: 1.89 g, 4.76 mmol, 98 %, hellgrauer Feststoff.

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.^[196]

15.6.7 (S)-3-({5-[(N-Boc-guanidinocarbonyl]-1H-pyrrol-2-carbonyl)-amino]-2-[(S)-2-(((2R,3R)+(2S,3S)-1-benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino)-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionylamino]-propionsäuremethylester (BocA-48)



Methode: B1 (14 d, 2 °C).

575 mg (1.45 mmol) **Li-A-41**, 575 mg (1.45 mmol) **Py-07**, 345 μ l (1.60 mmol) DPPA, 422 μ l (3.05 mmol) NEt_3 , 15 ml DMF_{abs} .

SC (Cyclohexan/Aceton [1/1])

MPLC (Cyclohexan/Aceton [2/1-1/10]).

Ausbeute: 263 mg, 0.34 mmol, 24 %, gelber Feststoff.

Schmp.: 210 °C

R_f : 0.18 (Aceton).

$[\alpha]_D^{20}$: 0.8° [$c = 1.11$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$, 768.84; gef.: 769.4 (dia a); 769.4 (dia b) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

LC-MS: dia a: $R_t = 4.3$ min (94.2 %); dia b: $R_t = 6.1$ min (5.2 %).

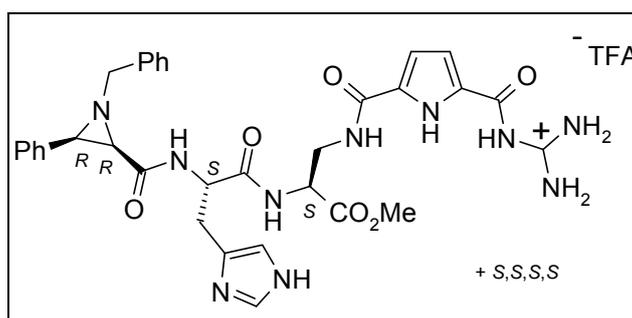
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2933 (w, C-H), 1727 (w, CO_2Bn), 1633 (m, CO-MH), 1522 (m, Ph), 1148 (s, C=O), 746 (m, Ph), 698 (m, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.32 (m, 1H, His- β - CH_2), 2.62 (m, 1H, Azi- CH-CO), 2.94 (m, 1H, His- β - CH_2), 3.11 (m, 1H, Azi- CH-Ph), 3.43 (m, 1H, Bn- CH_2), 3.50 (m, 1H, CH_2), 3.65 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.78 (m, 1H, CH_2), 3.96 (m, 1H, Bn- CH_2), 4.24 (m, 1H, His- α - CH), 4.53 (m, 1H, CH), 6.63, 6.74 (m, 2 x 1H, Pyrrol- CH), 6.79-7.50 (m, 12H, Ar- CH), 8.45, 8.54, 9.03, 10.57, 12.47 (br, 5 x 1H NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 28.10 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.79 (His- β - CH_2), 40.53 (CH_2), 46.10 (Azi- CH-CO-MH), 47.78 (Azi- CH-Ph), 52.69 (His- α - CH), 52.87 (CH), 63.04

(Bn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 83.20 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 112.26, 114.06 (Pyrrol- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 127.67-128.68 (Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}$), 135.11, 137.70 (Ar- $\underline{\text{C}}_q$), 161.19-171.22 ($\underline{\text{C}}\text{O}$).

15.6.8 (S)-3-({5-[(Guanidiniocarbonyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonyl]-amino}-2-[(S)-2-[[((2*R*,3*R*)+(2*S*,3*S*)-1-benzyl-3-phenylaziridin-2-carbonyl)-amino]-3-(1*H*-imidazol-4-yl)-propionylamino]-propionsäuremethylester-trifluoracetat (A-48)



Methode: E4 (2 h, RT).

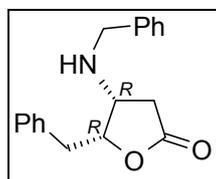
110 mg (0.14 mmol) **BocA-48**, 6 ml Dichlormethan/TFA [1/1].

Ausbeute: 107 mg, 0.44 mmol, 98 %, gelbes Harz.

Keine weitere Charakterisierung. Die Verbindung wurde nach Synthese direkt im Enzymassay eingesetzt.

15.7 Cyclisierungsreaktionen

15.7.1 (4*R*,5*R*)-5-Benzyl-4-benzylaminodihydrofuran-2-on (Cy-01)



Methode: C2 (3 d, RT).

201 mg (0.65 mmol) **A-10**, 28.6 mg (0.68 mmol) LiOH·H₂O, 8 ml THF, 2 ml Methanol, 1 Tropfen Wasser.

Laut DC-Kontrolle gelingt der Schritt der Hydrolyse von **A-10** mit LiOH. Das Produkt wird ohne Charakterisierung weiter umgesetzt. Der Versuch der Kupplung mit einer Aminosäure nach Methode B1 führt zur intramolekularen Lactonbildung.

89.7 μl (0.82 mmol) NMM, 5 ml DMF, 2 d, RT.

Ausbeute: 58.0 mg, 0.21 mmol, 32 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/2]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: 9.1° [c = 0.65, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. C₁₈H₁₉NO₂, 281.36; gef.: 282.2 [M+H]⁺.

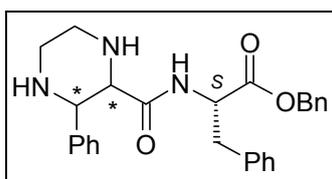
LC-MS: R_t = 2.1 min (34.3 %).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3300 (w, NH), 2928 (w, C-H), 1737 (w, CO₂-Alkyl), 1676 (m, C=O), 1519 (w, Ph), 1172 (m, CO₂-Alkyl), 747 (m, Ph), 698 (s, Ph).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.48 (m, 2H, CH₂COO), 2.85, 3.01 (m, 2 x 1H, PhCH₂CH), 3.68 (m, 1H, CHCH₂), 3.71 (m, 1H, CHCHO), 3.76, 5.07 (m, 2 x 1H, PhCH₂NH), 7.10-7.36 (m, 10H, Ar-CH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz): δ [ppm] = 33.37 (PhCH₂CH), 36.26 (CH₂COO), 44.52 (PhCH₂NH), 62.14 (CHCHO), 75.17 (CHCH₂), 126.65-129.62 (Ar-CH), 136.65, 137.95 (Ar-C_q), 172.91 (C=O).

15.7.2 (S)-3-Phenyl-2-[(3-phenylpiperazin-2-carbonyl)-amino]-propionsäurebenzylester (Cy-02)



Methode: E4 (2 h, RT).

466 mg (0.86 mmol) **A-68**, 8 ml Dichlormethan, 2 ml TFA.

Laut DC-Kontrolle gelingt die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von **A-68**. Das Produkt wird ohne Charakterisierung weiter umgesetzt. Der Versuch der anschließenden Biotinylierung nach Methode G7b führt zur intramolekularen Piperazinbildung.

242 μl (1.72 mmol) Diisopropylamin, 7 ml DMF, 10 d, RT.

Ausbeute: 271 mg, 0.61 mmol, 71 %, hellgelbes Öl.

R_f: 0.12 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20\text{ }^\circ\text{C}}$: -7.1° [$c = 0.62$, MeOH].

LOOP-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$, 443.55; gef.: 558.5 (dia a); 558.5 (dia b) $[\text{M}+\text{H}^+\text{TFA}]^+$.

LC-MS: dia a: $R_{\text{t}} = 12.2$ min (54.9 %); dia b: $R_{\text{t}} = 12.6$ min (42.4 %), $\Sigma = 97.3$ %.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3309 (w, CO-NH), 2924 (w, C-H), 1737 (m, CO_2Bn), 1660 (m, CO-NH), 1515 (m, Ph), 1178 (m, CO_2Bn), 747 (m, Ph), 698 (s, Ph).

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.30, 2.45, 2.66 3.04 (4 x m, 8H, CH_2CH_2), 2.92-3.25 (m, 2 x 2H, Phe- β - CH_2), 3.16 (m, 2 x 1H, CH-Ph), 4.83, 4.95 (m, 2 x 1H, Phe- α - CH), 5.04 (m, 2 x 1H, m, 2 x 1H, CH-CO), 5.12, 5.20 (m, 2 x 2H, OBn-CH_2), 7.11, 7.67 (d, 2 x 1H, NH , $J = 8.6$), 6.88-7.37 (m, 30H, Ar-CH), 7.36 (m, 2 x 1H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ [ppm] = 36.72-39.98 (Phe- β - CH_2), 47.02, 47.57 (CH_2CH_2), 52.83, 53.32 (Phe- α - CH), 67.96 (OBn-CH_2), 68.55 (CH-Ph), 73.62, 73.87 (CH-CO), 127.23-129.45 (Ar-CH), 171.90-172.57 (C=O).

Appendix

16 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/ Chemikalie	Erklärung
	markiert die Spaltstelle im Substrat
abs	absolut
Abz	<i>o</i> -Aminobenzoessäure
ACN	Acetonitril
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Ar	Aryl, Aromat, aromatisch
AS	Aminosäure(n), 3-Buchstaben-Code, (<i>S</i>)-konfiguriert, (<i>R</i>)-AS werden explizit bezeichnet, in Abb. kann abweichend auch der 1-Buchstaben-Code verwendet werden
Azi	Aziridin
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Brij 35	Polyoxyethylen(23)laurylether
BSA	Rinderserumalbumin
CathD	Cathepsin D
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Circular-Dichroismus
CDCl ₃	Deuteriochloroform
Cy	Cyclohexyl
Da	Dalton
d ₆ -DMSO	Deuterodimethylsulfoxid
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIBALH	Diisobutylaluminiumhydrid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DTT	Dithiothreitol
EDDnp	<i>N</i> -[2,4-Dinitrophenyl]-ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
Em	Emission

eq	Äquivalent(e)
Ex	Anregung (excitation)
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
Hex	Hexyl
HOAc	Essigsäure
i. Vak.	im Vakuum
IBCF	Isobutylchloroformiat
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Mca	7-Methoxycoumarin-4-ylacetyl
n.b.	nicht bestimmt
n.i.	nicht aktiv
NEt ₃	<i>N,N,N</i> -Triethylamin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
Nph	4-Nitrophenylalanin
PBS	Pufferlösung, phosphate buffered saline
Pd/C	Palladium-Aktivkohle (10% Pd)
PDB	Protein Data Bank
PIDA	(Diacetoxyiod)-benzol
Plm	Plasmepsin
PPA	Propylphosphonsäureanhydrid
<i>p</i> TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
PyBop	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
RBCs	Erythrocyten, red blood cells
RPMI 1640	Zellkulturmedium
SAP	sekretorische Aspartatprotease
SC	Säulenchromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
Schmp.	Schmelzpunkt
YNB	yeast nitrogen base, ohne Aminosäuren
YOYO-1	Fluoreszenzfarbstoff, DNA-Marker

17 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer *Biochemie*, 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2003.
- [2] E. C. Webb, NC-IUBMB *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2. Aufl., Academic Press, San Diego, 1992.
- [3] H.-H. Otto, T. Schirmeister *Chem. Rev.* 1997, 97, 133-171.
- [4] N. D. Rawlings, F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong, A. J. Barrett *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, D320-D325.
- [5] B. Pillai, M. M. Cherney, K. Hiraga, K. Takada, K. Oda, M. N. G. James *J. Mol. Biol.* 2007, 365, 343-361.
- [6] A. J. O'Donoghue, C. S. Mahon, D. H. Goetz, J. M. O'Malley, D. M. Gallagher, M. Zhou, P. G. Murray, C. S. Craik, M. G. Tuohy *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 29186-29195.
- [7] N. D. Rawlings, A. J. Barrett *Biochem. J.* 1993, 290, 205-218.
- [8] D. Leung, G. Abbenante, D. P. Fairlie *J. Med. Chem.* 2000, 43, 305-341.
- [9] C. Seife *Science* 1997, 277, 1602-1603.
- [10] E. E. Kim, C. T. Baker, M. D. Dwyer, M. A. Murcko, B. G. Rao, R. D. Tung, M. A. Navia *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 1181-1182.
- [11] I. Schechter, A. Berger *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967, 27, 157-162.
- [12] M. H. V. Van Regenmortel *J. Mol. Recognit.* 1999, 12, 1-2.
- [13] D. P. Fairlie, J. D. A. Tyndall, R. C. Reid, A. K. Wong, G. Abbenante, M. J. Scanlon, D. R. March, D. A. Bergman, C. L. L. Chai, B. A. Burkett *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1271-1281.
- [14] C. Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, M. Rao *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2003, 38, 89-119.
- [15] J. Hill, L. Phylip *FEBS Lett.* 1997, 409, 357-360.
- [16] M. James *Structure and Function of Aspartic Protease: Retroviral and Cellular Enzymes*, Plenum Press, New York, 1998.
- [17] J. M. Wood, C. R. Schnell, F. Cumin, J. Menard, R. L. Webb *J. Hypertens.* 2005, 23, 417-426.
- [18] J. Rahuel, V. Rasetti, J. Maibaum, H. Rueger, R. Goschke, N. C. Cohen, S. Stutz, F. Cumin, W. Fuhrer, J. M. Wood, M. G. Grutter *Chem. Biol.* 2000, 7, 493-504.
- [19] A. Haque, N. L. Banik, S. K. Ray *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* 2008, 7, 270-277.
- [20] P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008, 68, 12-28.
- [21] R. Castino, C. Peracchio, A. Salini, G. Nicotra, N. F. Trincerri, M. Démoz, G. Valente, C. Isidoro *J. Cell. Mol. Med.* 2009, 13, 1096-1109.
- [22] A. Hasilik, E. F. Neufeld *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 4946-4950.
- [23] S. C. Fortenberry, J. S. Schorey, J. M. Chirgwin *J. Cell. Sci.* 1995, 108, 2001-2006.
- [24] M. Fusek, V. Vetvicka *Biochem. J.* 1994, 303, 775-780.
- [25] V. Vetvicka, J. Vetvickova, M. Fusek *Cancer Lett.* 1994, 79, 131-135.
- [26] V. Vetvicka, J. Vetvickova, M. Fusek *Cancer Lett.* 1998, 129, 55-59.
- [27] V. Vetvicka, J. Vetvickova, M. Fusek *Prostate* 2000, 44, 1-7.
- [28] L. B. Bazzett, C. S. Watkins, C. Gercel-Taylor, D. D. Taylor *Gynecol. Oncol.* 1999, 74, 181-187.
- [29] V. Vetvicka, J. Vetvickova, P. Benes *Anticancer Res.* 2004, 24, 2739-2743.
- [30] A. Vashishta, S. S. Ohri, M. Proctor, M. Fusek, V. Vetvicka *Anticancer Res.* 2006, 26, 4163-4170.
- [31] F. Hof, A. Schütz, C. Fähr, S. Meyer, D. Bur, J. Liu, D. E. Goldberg, F. Diederich *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2138-2141.
- [32] K. Hidaka, T. Kimura, Y. Tsuchiya, M. Kamiya, A. J. Ruben, E. Freire, Y. Hayashia, Y. Kiso *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 3048-3052.
- [33] T. Luksch, N.-S. Chan, S. Brass, C. A. Sotriffer, G. Klebe, W. E. Diederich *Chem-MedChem* 2008, 3, 1323-1336.

- [34] World Health Organization (WHO), World malaria report 2008.
- [35] P. S. Sijwali, K. Kato, K. B. Seydel, J. Gut, J. Lehman, M. Klemba, D. E. Goldberg, L. H. Miller, P. J. Rosenthal *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *101*, 8721-8726.
- [36] R. Banerjee, J. Liu, W. Beatty, L. Pelosof, M. Klemba, D. E. Goldberg *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, *99*, 990-995.
- [37] K. K. Eggleston, K. L. Duffin, D. E. Goldberg *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 32411-32417.
- [38] M. Klemba, I. Gluzman, D. E. Goldberg *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 43000-43007.
- [39] I. Y. Gluzman, S. E. Francis, A. Oksman, C. E. Smith, K. L. Duffin, D. E. Goldberg *J. Clin. Invest.* 1994, *93*, 1602-1608.
- [40] G. H. Coombs, D. E. Goldberg, M. Klemba, C. Berry, J. Kay, J. C. Mottram *Trends Parasitol.* 2001, *17*, 532-537.
- [41] M. E. Drew, R. Banerjee, E. W. Uffman, S. Gilbertson, P. J. Rosenthal, D. E. Goldberg *J. Biol. Chem.* 2008, *283*, 12870-12876.
- [42] J. A. Bonilla, P. A. Moura, T. D. Bonilla, C. A. Yowell, D. A. Fidock, J. B. Dame *Int. J. Parasitol.* 2007, *37*, 317-327.
- [43] J. A. Bonilla, T. D. Bonilla, C. A. Yowell, H. Fujioka, J. B. Dame *Mol. Microbiol.* 2007, *65*, 64-75.
- [44] P. S. Sijwali, J. Koo, N. Singh, P. J. Rosenthal *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, *150*, 96-106.
- [45] I. D. Kerr, J. H. Lee, K. C. Pandey, Amanda Harrison, M. Sajid, P. J. Rosenthal, L. S. Brinen *J. Med. Chem.* 2009, *52*, 852-857.
- [46] L. Slutsker, B. J. Marston *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007, *20*, 3-10.
- [47] A. Blum, J. Böttcher, A. Heine, G. Klebe, W. E. Diederich *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 2078-2087.
- [48] J. Böttcher, A. Blum, S. Dörr, A. Heine, W. E. Diederich, G. Klebe *ChemMedChem* 2008, *3*, 1337-1344.
- [49] F. Lebon, M. Ledecq *Curr. Med. Chem.* 2000, *7*, 455-477.
- [50] X. Wu, P. Öhrngren, J. K. Ekegren, J. T. Unge, T. K. Unge, H. Wallberg, B. Samuelsson, A. Hallberg, M. Larhed *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 1053-1057.
- [51] P. S. Caldera, Z. Yu, R. M. A. Knegtel, F. McPhee, A. L. Burlingame, C. S. Craik, I. D. Kuntz, P. R. O. d. Montellano *Bioorg. & Med. Chem.* 1997, *5*, 2019-2027.
- [52] F. Van Heuverswyn, Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B. F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E. Mpoudi Ngolle, P. M. Sharp, G. M. Shaw, E. Delaporte, B. H. Hahn, M. Peeters *Nature* 2006, *444*, 164.
- [53] P. M. Sharp, G. M. Shaw, B. H. Hahn *J. Virol.* 2005, *79*, 3891-3902.
- [54] B. F. Keele, F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. Mpoudi Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Y. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters, B. H. Hahn *Science* 2006, *313*, 523-526.
- [55] L. J. Abu-Raddad, P. Patnaik, J. G. Kublin *Science* 2006, *314*, 1603-1606.
- [56] M. R. Kanya, A. F. Gasasira, A. Yeka, N. Bakyaite, S. L. Nsoya, D. Francis, P. J. Rosenthal, G. Dorsey, D. Havlir *J. Infect. Dis.* 2006, *193*, 9-15.
- [57] J. R. Naglik, S. J. Challacombe, B. Hube *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, *67*, 400-428.
- [58] P. Staib, M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, J. Morschhäuser *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, *97*, 6102-6107.
- [59] I. Pichova, L. Pavlickova, J. Dostal, E. Dolejsi, O. Hruskova-Heidingsfeldova, J. Weber, T. Ruml, M. Soucek *Eur. J. Biochem.* 2001, *268*, 2669-2677.
- [60] G. Koelsch, J. Tang, J. A. Loy, M. Monod, K. Jackson, S. I. Foundling, X. Lin *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 2000, *1480*, 117-131.
- [61] F. Staib *Sabouraudia* 1965, *4*, 187-193.
- [62] J. R. Perfect *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, *40*, 1577-1583.
- [63] J. R. Naglik, G. Newport, T. C. White, L. L. Fernandes-Naglik, J. S. Greenspan, D. Greenspan, S. P. Sweet, S. J. Challacombe, N. Agabian *Infect. Immun.* 1999, *67*, 2482-2490.
- [64] P. Staib, U. Lermann, J. Blaß-Warmuth, B. Degel, R. Würzner, M. Monod, T. Schirmeister, J. Morschhäuser *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, *52*, 146-156.

- [65] A. R. Colina, F. Aumont, N. Deslauriers, P. Belhumeur, L. d. Repentigny *Infect. Immun.* 1996, *64*, 4514-4519.
- [66] J. Morschhäuser, R. Virkola, T. K. Korhonen, J. Hacker *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, *153*, 349-355.
- [67] H. J. Watts, F. S. Cheah, B. Hube, D. Sanglard, N. A. Gow *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, *159*, 129-135.
- [68] J. Naglik, A. Albrecht, O. Bader, B. Hube *Cell. Microbiol.* 2004, *6*, 915-926.
- [69] M. Schaller, B. Hube, M. W. Ollert, W. Schäfer, M. B.-v. Zepelin, E. Thoma-Greber, H. C. Korting *J. Investig. Dermatol.* 1999, *112*, 383-386.
- [70] D. Backman, U. H. Danielson *Biochim. Biophys. Acta* 2003, *1646*, 184-195.
- [71] M. Schaller, H. C. Korting, W. Schäfer, J. Bastert, W. C. Chen, B. Hube *Mol. Microbiol.* 1999, *34*, 169-180.
- [72] M. Schaller, C. Schackert, H. C. Korting, E. Januschke, B. J. Hube *Invest. Dermatol.* 2000, *114*, 712-717.
- [73] D. Skrbec, D. Romeo *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, *297*, 1350-1353.
- [74] Y.-C. Chen, C.-C. Wu, W.-L. Chung, F.-J. S. Lee *Microbiol.* 2002, *148*, 3743-3754.
- [75] B. Hube, M. Monod, D. A. Schofield, A. J. Brown, N. A. Gow *Mol. Microbiol.* 1994, *14*, 87-99.
- [76] A. Schweizer, S. Rupp, B. N. Taylor, M. Röllinghoff, K. Schröppel *Mol. Microbiol.* 2000, *38*, 435-445.
- [77] A. Felk, M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schäfer, B. Hube *Infect. Immun.* 2002, *70*, 3689-3700.
- [78] A. Albrecht, A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. d. Groot, D. MacCallum, F. C. Odds, W. Schäfer, F. Klis, M. Monod, B. Hube *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 688-694.
- [79] C. Borelli, E. Ruge, M. Schaller, M. Monod, H. C. Korting, R. Huber, K. Maskos *Proteins* 2007, *68*, 738-748
- [80] F. C. Odds *Microbiology* 2008, *154*, 3245-3246.
- [81] B. N. Taylor, H. Hannemann, M. Sehnal, A. Biesemeier, A. Schweizer, M. Röllinghoff, K. Schröppel *Infect. Immun.* 2005, *73*, 7061-7063.
- [82] M. Monod, B. Hube, D. Hess, D. Sanglard *Microbiology* 1998, *144*, 2731-2737.
- [83] J. R. Naglik, D. Moyes, J. Makwana, P. Kanzaria, E. Tsihlaki, G. Weindl, A. Tappuni, A. Rodgers, A. Woodman, S. J. Challacombe, M. Schaller, B. Hube *Microbiology* 2008, *154*, 3266-3280.
- [84] F. De Bernardis, M. Boccanera, D. Adriani, E. Spreghini, G. Santoni, A. Cassone *Infect. Immun.* 1997, *65*, 3399-3405.
- [85] M. Kretschmar, B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof, T. Nichterlein *Infect. Immun.* 1999, *67*, 6637-6642.
- [86] A. M. Edison, M. Manning-Zweerink *Infect. Immun.* 1988, *56*, 1388-1390.
- [87] K. Fallon, K. Bausch, J. Noonan, E. Huguenel, P. Tamburini *Infect. Immun.* 1997, *65*, 551-556.
- [88] F. J. Palella, Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Sat-ten, D. J. Aschman, S. D. Holmberg *N. Engl. J. Med.* 1998, *338*, 853-860.
- [89] A. Gruber, C. Speth, E. Lukasser-Vogl, R. Zangerle, M. Borg-von Zepelin, M. P. Dierich, R. Wurzner *Immunopharmacology* 1999, *41*, 227-234.
- [90] M. Borg-von Zepelin, I. Meyer, R. Thomssen, R. Wurzner, D. Sanglard, A. Telenti, M. Monod *J. Investig. Dermatol.* 1999, *113*, 747-751.
- [91] J. Bektić, C. P. Lell, A. Fuchs, H. Stoiber, C. Speth, C. Lass-Flörl, M. B.-v. Zepelin, M. P. Dierich, R. Wurzner *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001, *31*, 65-71.
- [92] G. Smolenski, P. A. Sullivan, S. M. Cutfield, J. F. Cutfield *Microbiology* 1997, *143* (Pt. 2), 349-356.
- [93] M. Borg-von Zepelin, S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard, M. Monod *Mol. Microbiol.* 1998, *28*, 543-554.
- [94] R. Rüchel *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *659*, 99-113.
- [95] P. Staib, M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, J. Morschhäuser *Mol. Microbiol.* 2002, *44*, 1351-1366.

- [96] J. Tang, M. N. G. James, I. N. Hsu, J. A. Jenkins, T. L. Blundell *Nature* 1978, 271, 618-621.
- [97] D. R. Davies *Annu. Rev. Biophys. Biomol.* 1990, 19, 189-215.
- [98] N. D. Rawlings, A. J. Barrett *Methods Enzymol.* 1995, 248, 105-120.
- [99] J. Symersky, M. Monod, S. I. Foundling *Biochemistry* 1997, 36, 12700-12710.
- [100] PyMOL Version 0.99rc6, DeLano Scientific LCC., Pao Alto, USA, 2006.
- [101] M. Fujinaga, M. M. Chernaia, N. I. Tarasova, S. C. Mosimann, M. N. James *Protein Sci.* 1995, 4, 960-972
- [102] E. T. Baldwin, T. N. Bhat, S. Gulnik, M. V. Hosur, R. C. Sowder II, R. E. Cachau, J. Collins, A. M. Silva, J. W. Erickson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6796-6800.
- [103] O. A. Asojo, S. V. Gulnik, E. Afonina, B. Yu, J. A. Ellman, T. S. Haque, A. M. Silva *J. Mol. Biol.* 2003, 327, 173-181
- [104] S. M. Cutfield, E. J. Dodson, B. F. Anderson, P. C. Moody, C. J. Marshall, P. A. Sullivan, J. F. Cutfield *Structure* 1995, 3, 1261-1271.
- [105] C. Abad-Zapatero, R. Goldman, S. W. Muchmore, C. Hutchins, K. Stewart, J. Navaza, C. D. Payne, T. L. Ray *Protein Sci.* 1996, 5, 640-652.
- [106] K. Stewart, C. Abad-Zapatero *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 941-948.
- [107] A. R. Colina, F. Aumont, N. Deslauriers, P. Belhumeur, L. de Repentigny *Infect. Immun.* 1996, 64, 4514-4519.
- [108] L. de Repentigny, F. Aumont, K. Bernard, P. Belhumeur *Infect. Immun.* 2000, 68, 3172-3179.
- [109] R. C. Goldman, D. J. Frost, J. O. Capobianco, S. Kadam, R. R. Rasmussen, C. Abad-Zapatero *Infect. Agents Dis.* 1995, 4, 228-247.
- [110] R. Röchel *Microbiol. Sci.* 1986, 3, 16-319.
- [111] C. Borelli, E. Ruge, J. H. Lee, M. Schaller, A. Vogelsang, M. Monod, H. C. Korting, R. Huber, K. Maskos *Proteins* 2008, 72, 1308-1319
- [112] M. Ingr, T. Uhlíkova, K. Strisovsky, E. Majerova, J. Konvalinka *Protein Sci.* 2003, 12, 2173-2182.
- [113] H. O. Andersson, K. Fridborg, S. Löwgren, M. Alterman, A. Mühlman, M. Björnsne, N. Garg, I. Kvarnström, W. Schaal, B. Classon, A. Karlen, U. H. Danielsson, G. Ahlsen, U. Nillroth, L. Vrang, B. Öberg, B. Samuelsson, A. Hallberg, T. Unge *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 1746-1758.
- [114] J. M. Louis, R. Ishima, I. Nesheiwat, L. K. Pannell, S. M. Lynch, D. A. Torchia, A. M. Gronenborn *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 6085-6092.
- [115] L. Pearl, T. Blundell *FEBS Lett.* 1984, 174, 96-101.
- [116] L. H. Pearl, W. R. Taylor *Nature* 1987, 329, 351-354.
- [117] S. K. P. Kumar, V. M. Kulkarni *Bioorg & Med. Chem.* 2002, 10, 1153-1170.
- [118] M. Fusek, E. A. Smith, M. Monod, B. M. Dunn, S. I. Foundling *Biochemistry* 1994, 33, 9791-9799.
- [119] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi *J. Antibiotics* 1970, 23, 259-262.
- [120] H. Morishima, T. Takita, T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa *J. Antibiotics* 1970, 23, 263-265.
- [121] D. H. Rich *J. Med. Chem.* 1985, 28, 263-273.
- [122] A. Semenov, J. E. Olson, P. J. Rosenthal *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 2254-2258.
- [123] R. M. Klabe, L. T. Bacheler, P. J. Ala, S. Erickson-Viitanen, J. L. Meek *Biochemistry* 1998, 37, 8735-8742.
- [124] D. J. Kempf, H. L. Sham *Curr. Pharm. Design* 1996, 2, 225-246.
- [125] A. Tossi, F. Benedetti, S. Norbedo, D. Skrbec, F. Bertib, D. Romeoa *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 4719-4727.
- [126] A. K. Ghosh, L. M. Swanson, H. Cho, S. Leshchenko, K. A. Hussain, S. Kay, D. E. Walters, Y. Koh, H. Mitsuya *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3576-3585.
- [127] A. Blum, J. Böttcher, B. Sammet, T. Luksch, A. Heine, G. Klebe, W. E. Diederich *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 8574-8586.

- [128] S. Francis, I. Gluzman, A. Oksman, A. Knickerbocker, R. Mueller, M. Bryant, D. Sherman, D. Russell, D. Goldberg *EMBO J.* 1994, 13, 306-317.
- [129] A. M. Silva, A. Y. Lee, S. V. Gulnik, P. Maier, J. Collins, T. N. Bhat, P. J. Collins, R. E. Cachau, K. E. Luker, I. Y. Gluzman, S. E. Francis, A. Oksman, D. E. Goldberg, J. W. Erickson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 10034-10039.
- [130] C. Boss, O. Corminboeuf, C. Grisostomi, S. Meyer, A. F. Jones, L. Prade, C. Binkert, W. Fischli, T. Weller, D. Bur *ChemMedChem* 2006, 1, 1341-1345.
- [131] S. H. Rosenberg In *Progress in Medicinal Chemistry*; G. P. Ellis, D. K. Luscombe, Eds.; Elsevier Science: New York, 1995; Vol. 32, p 37-115.
- [132] H. D. Kleinert *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1995, 9, 645-655.
- [133] B. Dahlöf, R. B. Devereux, S. E. Kjeldsen, S. Julius, G. Beevers, U. de Faire, F. Fyhrquist, H. Ibsen, K. Kristiansson, O. Lederballe-Pedersen, L. H. Lindholm, M. S. Nieminen, P. Omvik, S. Oparil, H. Wedel *Lancet* 2002, 359, 995-1003.
- [134] J. Menard, R. S. Boger, D. M. Moyse, T. T. Guyene, H. N. Glassman, H. D. Kleinert *Circulation* 1995, 91, 330-338.
- [135] A. H. Gradman, R. E. Schmieder, R. L. Lins, J. Nussberger, Y. Chiang, M. P. Bedigian *Circulation* 2005, 111, 1012-1018.
- [136] J. A. Staessen, Y. Li, T. Richart *Lancet* 2006, 368, 1449-1456.
- [137] C. A. Whitesitt, R. L. Simon, J. K. Reel, S. K. Sigmund, M. L. Phillips, J. K. Shadle, L. J. Heinz, G. A. Koppel, D. C. Hunden, S. L. Lifer, D. Berry, J. Ray, S. P. Little, X. D. Liu, W. S. Marshall, J. A. Panetta *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 2157-2162.
- [138] C. D. Carroll, H. Patel, T. O. Johnson, T. Guo, M. Orlowski, Z. M. He, C. L. Cavallaro, J. Guo, A. Oksman, I. Y. Gluzman, J. Connelly, D. Chelsky, D. E. Goldberg, R. E. Dolle *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 2315-2320.
- [139] E. K. Kick, D. C. Roe, A. G. Skillman, G. Liu, T. J. Ewing, Y. Sun, I. D. Kuntz, J. A. Ellman *Chem. Biol.* 1997, 4, 297-307.
- [140] C. E. Lee, E. K. Kick, J. A. Ellman *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 9735-9747.
- [141] N. Zaidi, T. Burster, V. Sommandas, T. Herrmann, B. O. Boehm, C. Driessen, W. Voelter, H. Kalbacher *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 364, 243-249.
- [142] B. Degel, P. Staib, S. Rohrer, J. Scheiber, E. Martina, C. Büchold, K. Baumann, J. Morschhäuser, T. Schirmeister *ChemMedChem* 2008, 3, 302-315.
- [143] D. D. Richman *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 33, 149-164.
- [144] R. Salto, L. M. Babe, J. Li, J. R. Rose, Z. Yu, A. Burlingame, J. J. D. Voss, Z. Sui, P. Ortiz de Montellano, C. S. Craik *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 10691-10698.
- [145] K. Hanada, T. M., M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka *Agric. Biol. Chem.* 1978, 42, 523-528.
- [146] K. Hanada, M. Tamai, S. Ohmura, J. Sawada, T. Seki, I. Tanaka *Agric. Biol. Chem.* 1978, 42, 529-536.
- [147] T. Schirmeister, A. Klockow *Mini Rev. Med. Chem.* 2003, 3, 585-596.
- [148] J. Tang, , *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 4510-4517.
- [149] K. C. S. Chen, J. Tang *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 2566-2574.
- [150] R. B. Rose, J. R. Rose, R. Salto, C. S. Craik, R. M. Stroud *Biochemistry* 1993, 32, 12498-12507.
- [151] C. S. Lee, N. Choy, C. Park, H. Choi, Y. C. Son, S. Kim, J. H. Ok, H. Yoon, S. C. Kim *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 589-594.
- [152] Z. Yu, P. Caldera, F. McPhee, J. J. D. Voss, P. R. Jones, A. L. Burlingame, I. D. Kuntz, C. S. Craik, P. R. Ortiz de Montellano *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 5846-5856.
- [153] S. K. Grant, M. L. Moore, S. A. Fakhouryd, T. A. Tomaszek, T. D. Meek *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992, 2, 1441-1445.
- [154] S. Ro, S.-G. Baek, B. Lee, C. Park, N. Choy, C. S. Lee, Y. C. Son, H. Choi, J. S. Koh, H. Yoon, S. C. Kim, J. H. Ok *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 2423-2426.
- [155] S. Ro, S.-G. Baek, B. Lee, J. H. Ok *J. Peptide Res.* 1999, 54, 242-248.
- [156] Y. Nakao, M. Fujita, K. Warabi, S. Matsunaga, N. Fusetani *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 10462-10463.
- [157] N. Schaschke *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 855-857.

- [158] H. Naganawa, N. Usui, T. Takita, M. Hamada, H. Umezawa *J. Antibiot.* 1975, 28, 828-829.
- [159] T. Schirmeister *J. Med. Chem.* 1999, 42, 560-572.
- [160] T. Schirmeister, M. Peric *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1281-1291.
- [161] A. Breuning, R. Vicik, T. Schirmeister *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, 14, 3301-3312.
- [162] V. Martichonok, C. Plouffe, A. C. Storer, R. Menard, J. Jones *B. J. Med. Chem.* 1995, 38, 3078-3085.
- [163] J. P. Meara, D. H. Rich *J. Med. Chem.* 1996, 39, 3357-3366.
- [164] E. Borowski, J. Zieliński, T. Ziminski, L. Falkowski, P. Kolodziejczyk, J. Golik, E. Jeczek *Tetrahedron Lett.* 1970, 45, 3909-3914.
- [165] M. Tiphine, V. Letscher-Bru, R. Herbrecht *Transpl. Infect. Dis.* 1999, 1, 273-283.
- [166] S. H. Alves, E. Boff, P. Pozzatti, L. A. Scheid, E. de Loreto, L. T. Ottoneli Oliveira, V. Aquino, L. C. Severo, J. M. Santurio *Mycopathologia* 2009, 167, 65-71.
- [167] K. Ishida, J. C. Fernandes Rodrigues, M. D. Ribeiro, T. V. Machado Vila, W. de Souza, J. A. Urbina, C. V. Nakamura, S. Rozental *BMC Microbiol.* 2009, 9, 74-85.
- [168] H. W. Boucher, A. H. Groll, C. C. Chiou, T. J. Walsh *Drugs* 2004, 64, 1997-2020.
- [169] W. Peters *Br. Med. J.* 1971, 2, 95-98.
- [170] A. P. Hall *Br. Med. J.* 1976, 1, 323-328.
- [171] J. K. Baird *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1565-1577.
- [172] A. Singh, P. J. Rosenthal *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 35236-35241.
- [173] J. M. Reynolds, K. E. Bissati, J. Brandenburg, A. Günzl, C. B. Mamoun *BMC Clin. Pharmacol.* 2007, 7, 13-18.
- [174] S. Arastu-Kapur, E. L. Ponder, U. P. Fonovic, S. Yeoh, F. Yuan, M. Fonovic, M. Grainger, C. I. Phillips, J. C. Powers, M. Bogoyo *Nat. Chem. Biol.* 2008, 4, 203-213.
- [175] M. Enserink *Science* 2005, 7, 33.
- [176] D. A. Drubin, J. C. Way, P. A. Silver *Genes Dev.* 2007, 21, 242-254.
- [177] G. Schmid, W. Hofheinz *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 624-625.
- [178] H. Noedl, Y. Se, K. Schaecher, B. L. Smith, D. Socheat, M. M. Fukuda *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 2619-2620.
- [179] G. D. Shanks *J. Postgrad. Med.* 2006, 52, 277-280.
- [180] P. B. S. Asih, R. M. Dewi, S. Tuti, M. Sadikin, W. Sumarto, B. Sinaga, A. J. A. M. van der Ven, R. W. Sauerwein, D. Syafruddin *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80, 914-918.
- [181] C. R. Caffrey, S. Scory, D. Steverding *Curr. Drug Targets* 2000, 1, 155-162.
- [182] J. M. Sternberg *Parasite Immunol.* 2004, 26, 469-476.
- [183] C. R. Caffrey, E. Hansell, K. D. Lucas, L. S. Brinen, A. A. Hernandez, J. N. Cheng, S. L. Gwaltney, W. R. Roush, Y. D. Stierhof, M. Bogoyo, D. Steverding, J. H. McKerrow *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001, 118, 61-73.
- [184] U. Machon, C. Büchold, M. Stempka, T. Schirmeister, C. Gelhaus, M. Leippe, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Kisker, M. Leyh, C. Schmuck *J. Med. Chem., in revision.*
- [185] A. Breuning, B. Degel, F. Schulz, C. Büchold, M. Stempka, U. Machon, S. Heppner, C. Gelhaus, M. Leippe, M. Leyh, C. Kisker, J. Rath, A. Stich, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Schmuck, T. Schirmeister *J. Med. Chem., submitted.*
- [186] J. Rahuel, J. P. Priestle, M. G. Grütter *J. Struct. Biol.* 1991, 107, 227-236.
- [187] O. A. Asojo, E. Afonina, S. V. Gulnik, B. Yu, J. W. Erickson, R. Randad, D. Medjahed, A. M. Silva *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2002, 58, 2001-2008.
- [188] M. Fujinaga, M. M. Chernaia, N. I. Tarasova, S. C. Mosimann, M. N. James *Protein Sci.* 1995, 4, 960-972.
- [189] S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C. W. Murray, J. Yon *J. Mol. Biol.* 2004, 343, 407-416.
- [190] *MOE Molecular Operating Environment* Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Canada, 2006.
- [191] M. G. Bursavich, D. H. Rich *J. Med. Chem.* 2002, 45, 541-558.
- [192] J. C. Clemente, L. Govindasamy, A. Madabushi, S. Z. Fisher, R. E. Moose, C. A. Yowell, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, M. Agbandje-McKenna, J. B. Dame, B. M. Dunn, R. McKenna *Acta Crystallogr.* 2006, D62, 246-252.
- [193] C. Schmuck *Chem. Commun.* 1999, 843-844.

- [194] C. Schmuck *Chem. Eur. J.* 2000, 6, 709-718.
- [195] C. Schmuck, W. Wienand *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 452-459.
- [196] C. Schmuck, L. Geiger *Chem. Commun.* 2005, 772-774.
- [197] B. Miriyala, S. Bhattacharyya, J. S. Williamson *Tetrahedron* 2004, 60, 1463-1471.
- [198] P. D. Jones, H.-J. Tsai, Z. N. Do, C. Morisseau, B. D. Hammock *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 5212-5216.
- [199] C. Dardonville, C. Fernandez-Fernandez, S.-L. Gibbons, G. J. Ryan, N. Jagerovic, A. M. Gabilondo, J. J. Meana, L. F. Callado *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 6570-6580.
- [200] D. Jaramillo, N. J. Wheate, S. F. Ralph, W. A. Howard, Y. Tor, J. R. Aldrich-Wright *Inorg. Chem.* 2006, 45, 6004-6013.
- [201] E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator, T. Sokolowska *Liebigs Ann. Chem.* 1961, 646, 134-136.
- [202] A. Michael *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1901, 34, 3640-3666.
- [203] H. McNab, R. G. Tyas *J. Org. Chem.* 2007, 72, 8760-8769.
- [204] P. Davoli, I. Moretti, F. Prati, H. Alper *J. Org. Chem.* 1999, 64, 518-521.
- [205] P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre *Tetrahedron* 2001, 57, 1801-1812.
- [206] T. L. Gilchrist *Heterocyclenchemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 1995.
- [207] T. Eicher, S. Hauptmann *The Chemistry of Heterocycles*, Thieme Stuttgart, New York, 1995.
- [208] J. You, A. E. Wroblewski, J. G. Verkade *Tetrahedron* 2004, 60, 7877-7883.
- [209] D. H. Rich, E. T. Sun *J. Med. Chem.* 1980, 23, 27-33.
- [210] J. M. Chalker, A. Yang, K. Deng, T. Cohen *Org. Lett.* 2007, 9, 3825-3828.
- [211] M.-C. Wang, X.-H. Hou, C.-X. Chi, M.-S. Tang *Tetrahedron: Asymmetry* 2006, 17, 2126-2132.
- [212] C. Gennari, D. Moresca, A. Vulpetti, G. Pain *Tetrahedron* 1997, 53, 5593-5608.
- [213] R. Brückner *Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 2 Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2000.
- [214] M. Bodanszky *Principles of Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993.
- [215] M. Bodanszky, A. Bodanszky *The Practice of Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994.
- [216] J. Jones *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, VCH, Weinheim, 1995.
- [217] H. Wissmann, H.-J. Kleiner *Angew. Chem.* 1980, 92, 129-130.
- [218] L. Noss, P. A. Liddell, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 458-465.
- [219] C. Nativi, M. Cacciarini, O. Francesconi, A. Vacca, G. Moneti, A. Ienco, S. Roelens *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 4377-4385.
- [220] C. Schmuck, T. Rehm, L. Geiger, M. Schäfer *J. Org. Chem.* 2007, 72, 6162-6170.
- [221] L. A. Carpino, P. Henklein, B. M. Foxman, I. Abdelmoty, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, C. Mügge *J. Org. Chem.* 2001, 66, 5245-5247.
- [222] L.-h. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. Yin *J. Org. Chem.* 1997, 62, 6918-6920.
- [223] A. Pal, Y. K. Ghosh, S. Bhattacharya *Tetrahedron* 2006, 63, 7334-7348.
- [224] J. Costa, E. Frérot, P. Jouin *J. Org. Chem.* 1994, 59, 2437-2446.
- [225] S.-Y. Han, Y.-A. Kim *Tetrahedron* 2004, 60, 2447-2467.
- [226] M. Rodriguez, M. Llinares, S. Doulut, A. Heitz, J. Martinez *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 923-926.
- [227] D. V. Kuklev, W. L. Smith *J. Lipid Res.* 2003, 44, 1060-1066.
- [228] B. J. Balcom, N. O. Petersen *J. Org. Chem.* 1989, 54, 1922-1927.
- [229] B. Neises, W. Steglich *Org. Synth.* 1985, 63, 183-184.
- [230] P. Zaderenko, M. C. Lopez, P. Ballesteros *J. Org. Chem.* 1996, 61, 6825-6828.
- [231] K.-P. Karen, G. Massiot *J. Heterocycl. Chem.* 1995, 32, 1309-1315.
- [232] A. Kuhn, H. Kunz *Angew. Chem.* 2007, 119, 458-462.
- [233] Q. Meng, M. Hesse *Tetrahedron* 1991, 41, 6251-6264.
- [234] T. Ohba, E. Ikeda, J. Wakayama, H. Takei *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996, 6, 219-224.
- [235] W. V. Murray, P. K. Mishra, S. Sun, A. Maden *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 7389-7392.

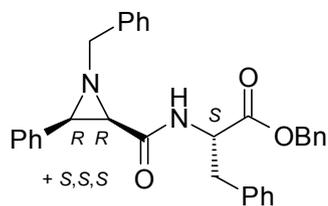
- [236] D. M. Shendage, R. Froehlich, G. Haufe *Org. Lett.* 2004, 6, 3675-3678.
- [237] K. Ando *J. Org. Chem.* 1997, 62, 1934-1939.
- [238] K. Ando, T. Oishi, M. Hiram, H. Ohno, T. Ibuka *J. Org. Chem.* 2000, 65, 4745-4749.
- [239] R. Kottani, R. A. Valiulin, A. G. Kutateladze *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 13917-13921.
- [240] R. von Grünigen, G. Siglmüller, A. Papini, K. Köcher, B. Traving, W. Göhring, L. Moroder *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1991, 372, 163-172.
- [241] F. Sicilio, M. D. Peterson *J. Chem. Educ.* 1961, 38, 576-577.
- [242] L. Michaelis, M. L. Menten *Biochem. Z.* 1913, 49, 333-369.
- [243] H. Bisswanger *Enzymkinetik*, 3 Aufl., WILEY-VCH, Weinheim, 2000.
- [244] J. G. Bieth *Methods Enzymol.* 1995, 248, 59-84.
- [245] S. W. Runge, B. J. F. Hill, W. M. Moran *CBE Life Sci. Educ.* 2006, 5, 348-352.
- [246] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff *Biochem. Pharmacol. Dec 1;(23):3099-108.* 1973, 22, 3099-3108.
- [247] T. Schirmeister *Habilitationsschrift*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 1999.
- [248] T. Schirmeister *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 2647-2651.
- [249] R. Kitz, I. B. Wilson *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 3245-3249.
- [250] W.-X. Tian, C.-L. Tsou *Biochemistry* 1982, 21, 1028-1032.
- [251] M. Dixon *Biochem. J.* 1953, 55, 170-171.
- [252] G. T. Wang, E. Matayoshi, H. J. Huffaker, G. A. Krafft *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 6493-6496.
- [253] C. Garcia-Echeverria, D. H. Rich *FEBS Lett.* 1992, 197, 100-102.
- [254] N. E. Goldfarb, M. T. Lam, A. K. Bose, A. M. Patel, A. J. Duckworth, B. M. Dunn *Biochemistry* 2005, 44, 15725-15733.
- [255] Y. Liu, W. Kati, C.-M. Chen, R. Tripathi, A. Molla, W. Kohlbrenner *Anal. Biochem.* 1999, 267, 331-335.
- [256] R. G. Kruger, P. Dostal, D. G. McCafferty *Anal. Biochem.* 2004, 326, 42-48.
- [257] *GraFit* Version 5.0.13, Erithacus Software Ltd., London, UK, 2006.
- [258] R. K. Scopes *Clin. Chim. Acta* 1995, 237, 17-23.
- [259] S. Schnell, P. K. Maini *Comments Theor. Biol.* 2003, 8, 169-187.
- [260] S. George, M. Chellapandian, B. Sivasankar, P. V. Sundaram *Bioprocess Eng.* 1996, 15, 311-315.
- [261] C. G. Knight *Methods Enzymol.* 1995, 248, 85-101.
- [262] Y. S. Cheng, F. H. Yin, S. Foundling, D. Blomstrom, C. A. Kettner *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 9660-9664.
- [263] K. Brocklehurst, M. Resmini, C. M. Topham *Methods* 2001, 24, 153-167.
- [264] A. Goldstein *J. Gen. Physiol.* 1944, 27, 529-580.
- [265] C. G. Knight, A. J. Barrett *Biochem. J.* 1976, 155, 117-125.
- [266] W. G. Gutheil, W. W. Bachovchin *Biochemistry* 1993, 32, 8723-8731.
- [267] D. C. Pimenta, A. Oliveira, M. A. Juliano, L. Juliano *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 2001, 1544, 113-122.
- [268] U. Käppler, T. Schirmeister *Med. Chem.* 2005, 1, 361-370.
- [269] C. J. Helal, M. A. Sanner, C. B. Cooper, T. Gant, M. Adam, J. C. Lucas, Z. Kang, S. Kupchinsky, M. K. Ahlijanian, B. Tate, F. S. Menniti, K. Kelly, M. Peterson *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5521-5525.
- [270] 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.
- [271] R. Ettari, E. Nizi, M. E. Di Francesco, M.-A. Dude, G. Pradel, R. Vicik, T. Schirmeister, N. Micale, S. Grasso, M. Zappala *J. Med. Chem.* 2008, 51, 988-996.
- [272] Y. A. Sabnis, P. V. Desai, P. J. Rosenthal, M. A. Avery *Protein Sci.* 2003, 12, 501-509.
- [273] M. K. Ramjee, N. S. Flinn, T. P. Pemberton, M. Quibell, Y. Wang, J. P. Watts *Biochem. J.* 2006, 399, 47-57.
- [274] 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.

- [275] P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow, D. Rasnick, J. H. Leech *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989, 35, 177-184.
- [276] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, D. Turk, L. Moroder *Bioorg. Med. Chem.* 1997, 5, 1789-1797.
- [277] P. S. Sijwali, B. R. Shenai, J. Gut, A. Singh, P. J. Rosenthal *Biochem. J.* 2001, 360, 481-489.
- [278] J. N. Domínguez, C. León, J. Rodrigues, N. Gamboa de Domínguez, J. Gut, P. J. Rosenthal *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3654-3658.
- [279] K. Ratia, K. S. Saikatendu, B. D. Santarsiero, N. Barretto, S. C. Baker, R. C. Stevens, A. D. Mesecar *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 5717-5722.
- [280] H. D. Bartunik, L. J. Summers, H. H. Bartsch *J. Mol. Biol.* 1989, 210, 813-828.
- [281] V. Schellenberger, U. Schellenberger, Y. V. Mitin, H.-D. Jakubke *Eur. J. Biochem.* 1990, 187, 163-167.
- [282] K. Moll, I. Ljungström, H. Perlmann, A. Scherf, M. Wahlgren *Methods in Malaria Research*, 5. Aufl. Manassas, Paris, 2008.
- [283] D. Marie, D. Vaultot, F. Partensky *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1649-1655.
- [284] P. J. Rosenthal *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 1829-1836.
- [285] J. N. Dominguez, S. Lopez, J. Charris, L. Iarruso, G. Lobo, A. Semenov, J. E. Olson, P. J. Rosenthal *J. Med. Chem.* 1997 1997, 40, 2726-2732.
- [286] W. E. Lindup, M. C. Orme *Br. Med. J.* 1981, 282, 212-214.
- [287] G. Zlotos, M. Oehlmann, P. Nickel, U. Holzgrabe *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18, 847-858.
- [288] A. Heinze, U. Holzgrabe *Int. J. Pharm.* 2006, 311, 108-112.
- [289] P. Nickel, R. Schlerf *Pharm. Ztg.* 1983, 128, 1234-1238.
- [290] B. Degel *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 2006.
- [291] A. G. Marangoni *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, Wiley, New York, 2003.
- [292] H. Helten, T. Schirmeister, B. Engels *J. Phys. Chem. A* 2004, 108, 7691-7701.
- [293] *Glide* Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2007.
- [294] *VIDA2* OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, 2006.
- [295] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogyo *Trends Cell Biol.* 2004, 14, 29-35.
- [296] S. Lyonnais, L. Goux-Capes, C. Escude, D. Cote, A. Filoramo, J.-P. Bourgoin *Small* 2008, 4, 442-446.
- [297] C. Gelhaus, R. Vicik, R. Hilgenfeld, C. L. Schmidt, M. Leippe, T. Schirmeister *Biol. Chem.* 2004, 385, 435-438.
- [298] A. Evers, Heppner, S., Leippe, M., Gelhaus, C. *Biol. Chem.* 2008, 389, 1523-1525.
- [299] C. Gelhaus, Jacobs, T., Andrä, J., Leippe, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 1713-1720.
- [300] A. Kilejian *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4650-4653.
- [301] A. Evers *Diplomarbeit*, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 2008.
- [302] C. Gelhaus, R. Vicik, T. Schirmeister, M. Leippe *Biol. Chem.* 2005, 386, 499-502.
- [303] E. Martina, N. Stiefl, B. Degel, F. Schulz, A. Breuning, M. Schiller, R. Vicik, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 5365-5369.
- [304] E. Clynen, L. Schoofs, M. Salzet *Medicinal Chemistry Reviews* 2005, 2, 197-206.
- [305] C. Büchold *Diplomarbeit*, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 2006.
- [306] U. Machon *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 2008.
- [307] S. Sato, M. Tetsuhashi, K. Sekine, H. Miyachi, M. Naito, Y. Hashimoto, H. Aoyama *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 4685-4698.
- [308] P. Li, J.-C. Xu *Tetrahedron* 2000, 56, 4437-4445.
- [309] K. Kurita, T. Nishibori, M. Harata *Biomacromolecules* 2002, 3, 705-709.
- [310] Z. Ma, J.-S. Taylor *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 2501-2510.
- [311] P. Barker, P. Gendler, H. Rapoport *J. Org. Chem.* 1978, 43, 4849-4853.
- [312] D. H. Rich, E. T. Sun, A. S. Boparai *J. Org. Chem.* 1978, 43, 3624-3626.
- [313] H. Friebolin *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [314] S. D. Sharma, S. Kanwar, S. Rajpoot *J. Heterocycl. Chem.* 2006, 43, 11-19.

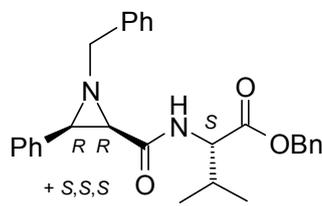
18 Formelregister

Aziridin-Endstufen

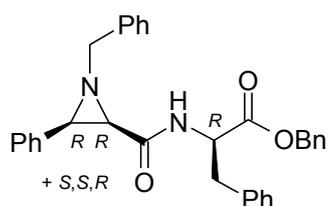
A-07



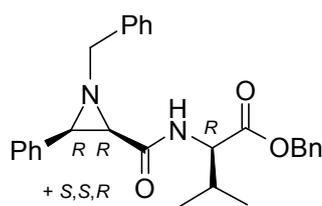
A-08



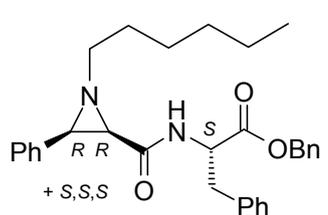
A-28



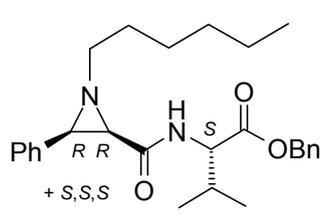
A-31



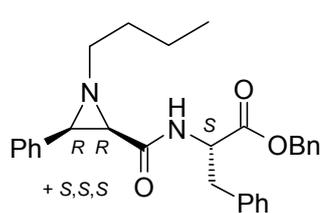
A-32



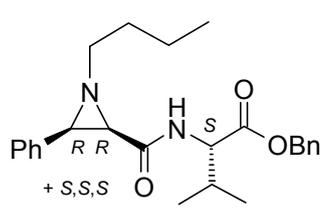
A-33



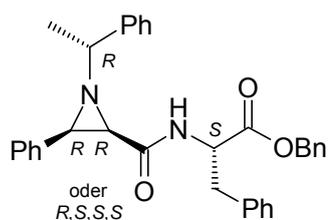
A-34



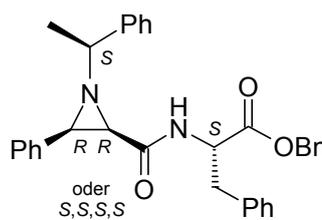
A-35



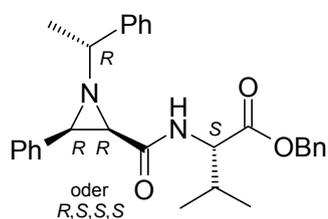
A-36



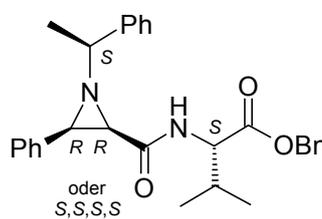
A-37



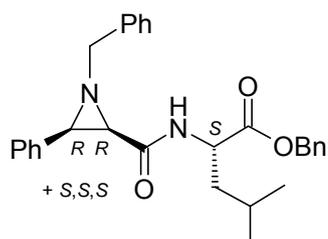
A-38



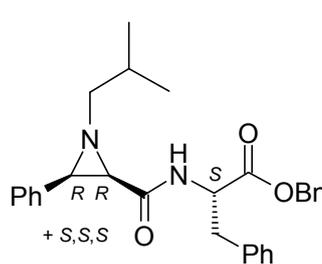
A-39



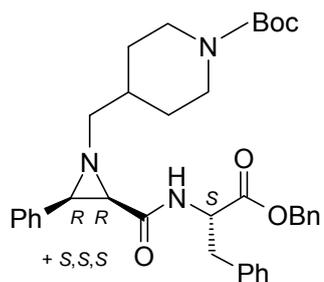
A-40



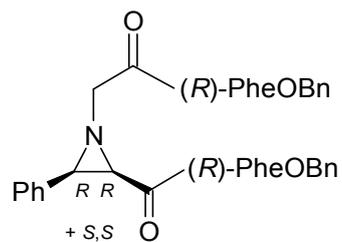
A-42



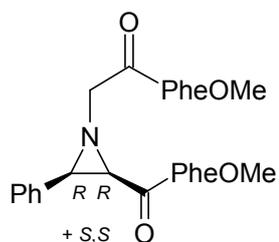
A-62



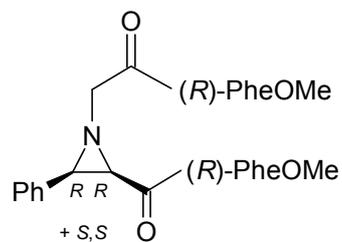
A-65



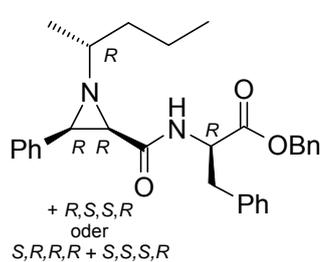
A-66



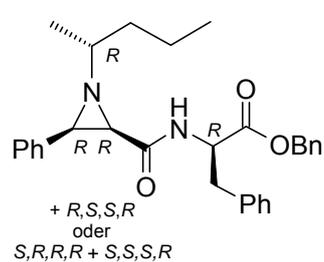
A-67



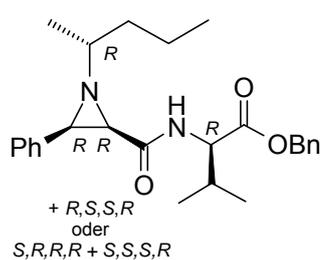
A-76a



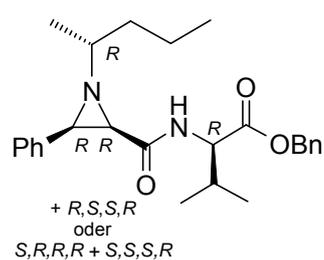
A-76b



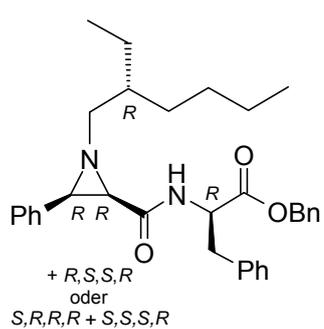
A-77a



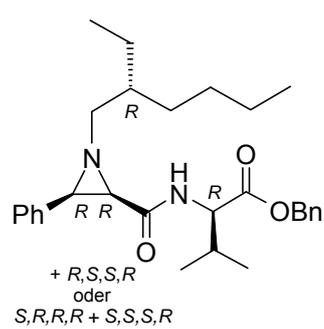
A-77b



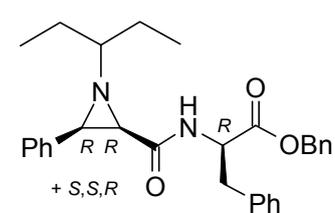
A-78



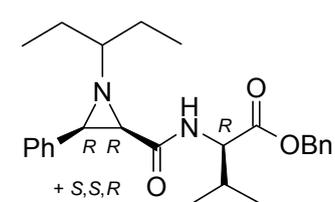
A-79



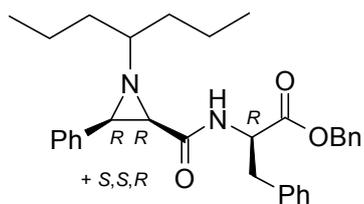
A-80



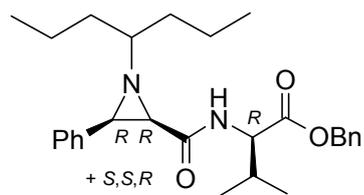
A-81



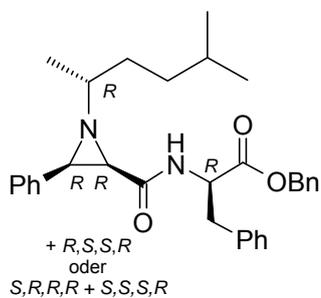
A-82



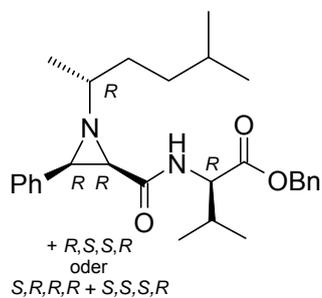
A-83



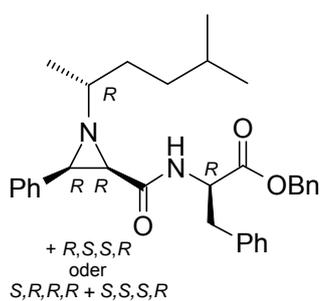
A-84



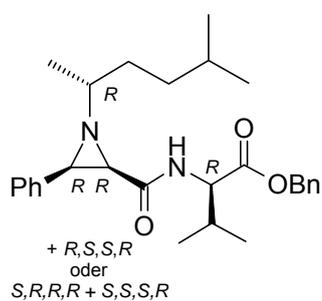
A-85



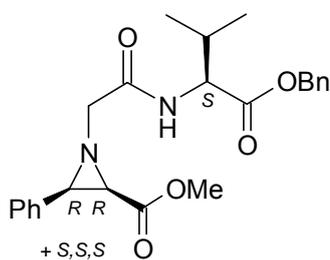
A-86



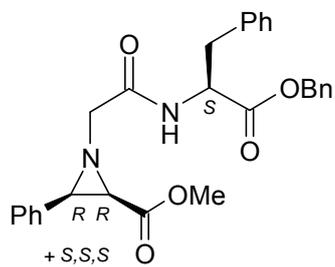
A-87



A-88

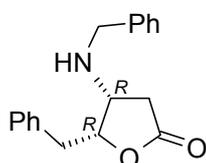


A-89

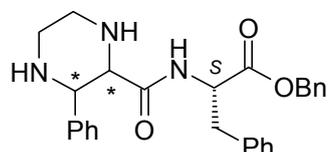


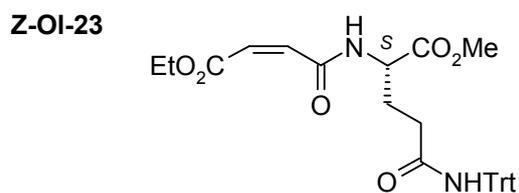
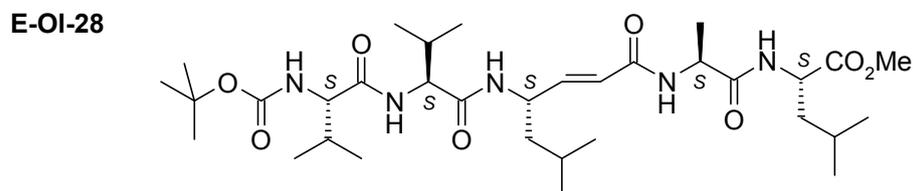
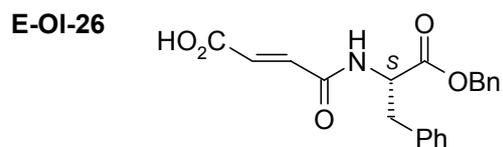
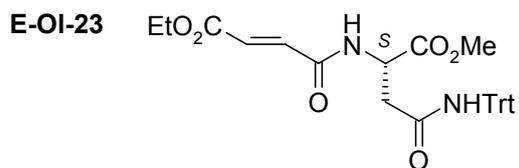
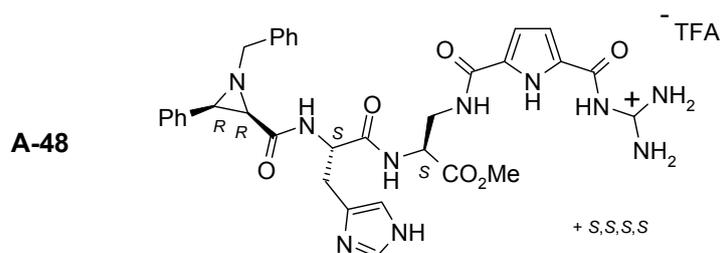
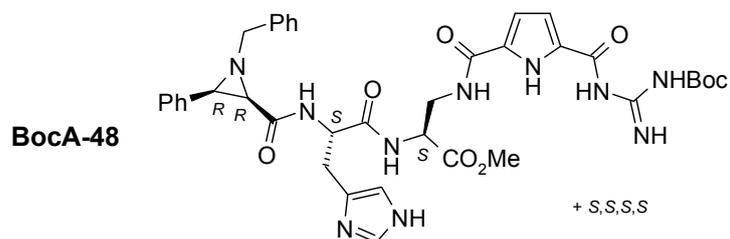
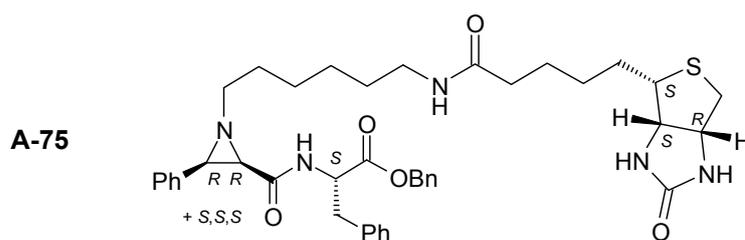
Heterocyclen

Cy-01



Cy-02



OlefineGuanidin(i)ocarbonylpyrrol-verknüpfte AziridineBiotin-verknüpftes Aziridin

19 Veröffentlichungen

19.1 Publikationen

„Cis-configured aziridines are new pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of *Candida albicans* Secreted Aspartic Protease 2”

B. Degel, P. Staib, S. Rohrer, J. Scheiber, E. Martina, C. Büchold, K. Baumann, J. Morschhäuser, T. Schirmeister *ChemMedChem* **2008**, 3, 302-315.

„On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences”

U. Machon, C. Büchold, M. Stempka, T. Schirmeister, C. Gelhaus, M. Leippe, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Kisker, M. Leyh, C. Schmuck. *J. Med. Chem.*, *in revision*.

„Michael-acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids”

A. Breuning, B. Degel, F. Schulz, C. Büchold, M. Stempka, U. Machon, S. Heppner, C. Gelhaus, M. Leippe, M. Leyh, C. Kisker, J. Rath, A. Stich, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Schmuck, T. Schirmeister *J. Med. Chem.*, *submitted*.

19.2 Vorträge

Inhibitoren für Aspartatproteasen mit maßgeschneiderten Bindungsstellen, Doktoranden-seminar, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, **2006**, Würzburg.

Inhibitors of aspartic proteases with customised binding motives, DPhG-Doktorandentagung, **2006**, Heroldsberg.

Inhibitors of aspartic proteases with customised binding motives, Second Joint Ph.D. Students Meeting: New Trends in Infectious Disease Research, **2006**, Heidelberg.

From *cis*-configured aziridines as aspartic protease inhibitors to a new class of falcipain inhibitors, 3rd Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630 & SFB 544, **2007**, Retzbach.

Antimalarial effects of protease inhibitors on *Plasmodium falciparum* and falcipain 2 & 3, Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of California, **2008**, San Francisco, CA, USA.

Proteases as targets for new antiinfective compounds, 4th Joint Ph.D Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 766, 544, **2008**, Kloster Bronnbach

Synthese und Testung von *cis*-konfigurierten Aziridinen als pseudo-irreversible Inhibitoren der sekretorischen Aspartatproteasen von *Candida albicans*, Doktorandenseminar, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, **2009**, Würzburg.

19.3 Posterpräsentationen

Inhibitors for aspartic proteases with customised binding motives, 1st International symposium: Novel Agents Against Infectious Diseases - An Interdisciplinary Approach, **2006**, Würzburg.

Electrophiles and guanidiniocarbonyl pyrroles: New binding motives for inhibitors of aspartic proteases, Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry" of the GDCh-division "Medizinische Chemie" and the DPhG-division "Pharmazeutische/Medizinische Chemie", **2006**, Frankfurt.

Aspartic protease inhibitors with customised binding motives, Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG-Jahrestagung), Joint Meeting with the Czech Pharmaceutical Society and the Hungarian Society for Pharmaceutical Sciences, **2006**, Marburg.

Cis-configured aziridines as aspartic acid protease inhibitors, 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, **2007**, Patras, Griechenland.

Guanidincarbonyl pyrroles: a new class of reversible falcipain 2 inhibitors, 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, **2007**, Patras, Griechenland.

Cis-configured aziridines as aspartic acid protease inhibitors, Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), **2007**, Würzburg.

Cis-configured aziridines as pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of aspartic proteases, 4th Summer School Medicinal Chemistry, **2008**, Regensburg.

Cis-configured aziridines as pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of aspartic proteases, Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), **2008**, Würzburg.