

Synthese neuer
Cystein-Protease-Inhibitoren
sowie deren
theoretische und experimentelle
Untersuchung hinsichtlich der
Struktur-Wirkungs-Beziehung

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Verena Simone Buback geb. Schulz
aus Kiel

Würzburg 2012

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

08.06.2012

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Schirmeister
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Engels

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Dr. T. Schirmeister
2. Prüfer: Prof. Dr. B. Engels
3. Prüfer: Prof. Dr. I. Fischer

Datum des Promotionskolloquiums

31.07.2012

Doktorurkunde ausgehändigt am

Inhaltsverzeichnis

Allgemeiner Teil	2
1 Einleitung	2
1.1 Proteasen	2
1.2 Vinylsulfone als Cystein-Protease-Inhibitoren . . .	7
1.3 Aziridine als Cystein-Protease-Inhibitoren	12
1.4 Theoretische Analyse und Methoden zur Vorher- sage von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen . . .	16
2 Grundlagen und Methoden	18
2.1 Theoretische Grundlagen	18
2.1.1 Dichtefunktionaltheorie	18
2.1.2 Das Continuum Solvent Modell COSMO . .	27
2.1.3 Verwendete Methoden und Programme . .	33
2.2 Kenntnisstand zur Synthese der Inhibitoren	37
2.2.1 Synthese von Vinylsulfonen	37
2.2.2 Synthese von Aziridinderivaten	40
2.3 Enzymkinetik	46
2.3.1 Verdünnungsassay	51
2.3.2 Kontinuierlicher Assay	56
2.3.3 Vergleich der Enzym-Assays	57

3	Zielsetzung und Syntheseplanung	59
4	Durchführung und Ergebnisse	62
4.1	Diskussion der theoretischen Untersuchungen von Michael-Akzeptoren	62
4.1.1	Reaktionsmechanismus: 1,4- versus 1,2-Addition	62
4.1.2	Reaktion zur Enolform (1,4-Addition) . . .	63
4.1.3	Reaktion zur Ketoform (1,2-Addition) . . .	69
4.1.4	Potentialflächen der 1,2-Addition an Vinylsulfone	82
4.1.5	Potentialfläche der 1,2-Addition an Carbonyl-Michael-System 33	103
4.2	Synthese von peptidischen Vinylsulfonen	107
4.3	Synthese von peptidischen Aziridinen	117
4.4	Untersuchung der Reaktionskinetik von Vinylsulfonen	123
4.4.1	Messungen mittels NMR — bekannte Verfahren	123
4.4.2	Messungen mittels IR	136
4.4.3	Messungen mittels NMR — neue Verfahren	144
4.5	Untersuchung der Reaktionskinetik von Aziridinen	155

4.6	Enzym-Assays	162
4.6.1	Testung von Vinylsulfonen	162
4.6.2	Testung von Aziridinen	164
4.7	Vergleich von Theorie und Experiment	169
4.7.1	Reaktivität von Vinylsulfonen in Theorie und Experiment	169
5	Zusammenfassung	177
6	Summary	185
	Experimenteller Teil	192
1	Allgemeine Vorbemerkungen	192
1.1	Verwendete Geräte	192
1.2	Chromatographische Methoden	194
1.3	Enzym-Assays	195
1.4	Chemikalien, Reagenzien	199
2	Allgemeine Synthesemethoden	201
2.1	Isocyanatbildung	201
2.2	NCO-Kupplung	201
2.3	Schutzgruppen	202
2.3.1	Hydrogenolyse	202

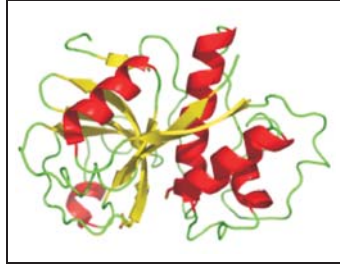
2.3.2	Methylesterhydrolyse	202
2.3.3	Tritylierung	203
2.3.4	Entfernung der Boc-Schutzgruppe	203
2.4	Reduktion mit LiAlH_4	203
2.5	Oxidation nach Swern	204
2.6	Peptidkupplungen	205
2.6.1	Peptidkupplung in der Mikrowelle	205
2.6.2	Peptidkupplungen mit DCC/HOBT	205
2.6.3	Peptidkupplungen mit PPA	206
3	Synthetisierte Verbindungen	207
	Literatur	275
	Abkürzungsverzeichnis	286
	Danksagung	292

Allgemeiner Teil

1 Einleitung

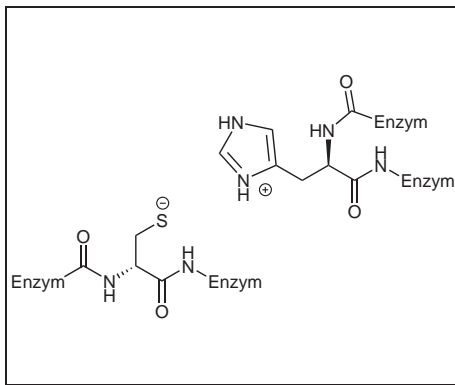
1.1 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Peptiden und Proteinen katalysieren. In Anlehnung an die reaktiven Gruppen im aktiven Zentrum werden sie in Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metallo-Proteasen unterteilt. Je nach Spaltstelle innerhalb eines Substrats lassen sich die Proteasen in Endo- und Exo-Peptidasen gruppieren. Die letzteren unterteilen sich überdies in Carboxy- und Amino-Peptidasen. [1, 2] Ein anderes Klassifizierungssystem liegt der Merops-Datenbank zu Grunde. [3] Die Merops-Datenbank verwendet eine auf der Struktur der Proteasen basierende Hierarchie, um diese zu klassifizieren. Dabei wird jede Protease aufgrund von Ähnlichkeiten in den Aminosäure-Sequenzen einer Familie zugeordnet. Sich ähnelnde Familien werden wiederum zu Clans gruppiert, die mit Indices versehen und so geordnet werden.

Papain aus *Carica papaya* [4]

Die Mehrzahl der Cystein-Proteasen gehört zur C1-Familie (Papain-Familie, benannt nach dem Prototyp Papain) des CA Clans (Cystein-Protease Clan A). Diese Familie besteht aus einer Vielzahl von Proteasen, darunter Pflanzenproteasen (z.B. Papain), humane Proteasen (z.B. Cathepsin B, L), Proteasen von Protozoen (z.B. Cruzain aus *Trypanosoma cruzi*, Falcipaine aus *Plasmodium falciparum*, Rhodesain aus *Tryposoma b. rhodensien- se*) und *Leishmania*-Cathepsine. [2, 5] Cystein-Proteasen sind im menschlichen Organismus an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. [2, 6] Dies kann unspezifischer Proteinabbau (physiologische Funktion von Cathepsin B) sein, der z.B. bei Störung des Gleichgewichts zwischen Proteasen und endogenen Inhibitoren auch zu chronischen Entzündungen führen kann (pathologischer Zustand). So fand man bei entzündlichen Gelenkerkrankungen sowohl erhöhte Werte von Cathepsin B als auch des endogenen Inhibitors Cystatin C. [7] Auch bei Parasiten, die tropische Erkrankungen wie z.B. *Malaria*, *Leishma-*

niose oder die *Afrikanische Schlafkrankheit* hervorrufen, spielen Cystein-Proteasen eine wichtige Rolle. Bei den Erregern der *Malaria* sind sie beispielsweise nicht nur verantwortlich für die Invasion in den Wirt, die Verbreitung in demselben und den Schutz vor dessen Immunsystem, sondern auch für die Ernährung des Erregers. So hydrolysieren die Falcipaine den Proteinteil des menschlichen Hämoglobins. [8–10]

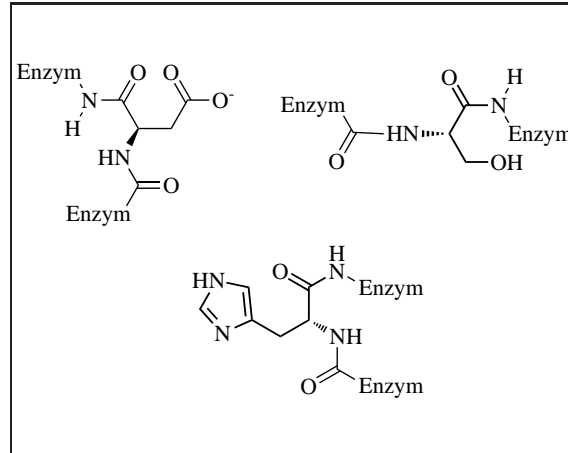


Katalytische Diade von Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen besteht aus einer katalytischen Diade der Aminosäuren Cys-His. Reaktion mit einem Substrat geschieht über einen nucleophilen Angriff des Cystein-Thiolats am Carboxyl-

kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung. Serin-Proteasen zeigen einige Ähnlichkeiten zu Cystein-Proteasen, was sich z.B. darin bemerkbar macht, dass viele Cystein-Protease-Inhibitoren auch Serin-Proteasen hemmen. Das Nucleophil ist hier anstelle eines Thiolats die Hydroxyfunktion des Serin-Restes im aktiven Zentrum der Protease. Die Aminosäuren His-Ser-Asp (Glu) machen das aktive Zentrum der Serin-Protease aus.

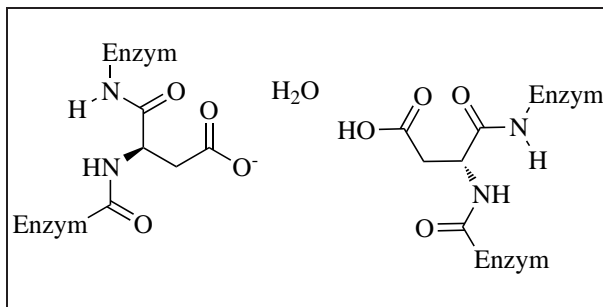
Beide Enzym-Klassen machen sich kovalente Katalyse unter intermediärer Acylenzymbildung zu Nutze. Die Thiolgruppe des Cysteins hat normalerweise einen pK_s -Wert von 8, im aktiven Zentrum der



Aktives Zentrum von Serin-Proteasen

Protease sinkt dieser allerdings auf 3 bis 4 ab. [11] Anders als im Zentrum von Cystein-Proteasen, in dem präkatalytisch ein Ionenpaar vorliegt (Imidazolium-Kation/Thiolat-Anion), tritt bei Serin-Proteasen kein solches Ionenpaar auf, sondern es liegen die neutralen Aminosäuren vor. Dadurch erklärt sich die höhere Nucleophilie von Cystein-Proteasen im Gegensatz zu Serin-Proteasen. [2] Bei der Viruserkrankung SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), die erstmals 2002 in der südchinesischen Provinz Guangdong beobachtet wurde, sind Cystein-Proteasen ebenfalls involviert. Die sogenannte Hauptprotease (M^{pro} bzw. 3C-like protease $3CL^{pro}$) ist verantwortlich für die Spaltung von Polyproteinen in funktionelle Proteine für die Virus-Replikation und somit essentiell für den gesamten Replikationszyklus des Virus. [3] Eine Inhibierung dieser Protease führt zum Stopp der

Virus-Replikation. [1] Die SARS-Protease kann als gemischt-katalytisch wirkende Protease klassifiziert werden, die sowohl Serin- als auch Cystein-Protease-typische Eigenschaften aufweist. Wie auch bei den Cystein-Proteasen der Papain-Familie besitzt M^{pro} eine katalytische Diade mit einem Cystein-Histidin-Paar (Cys-145 und His-41). [12] Im Gegensatz dazu liegt allerdings das Cystein-Histidin-Paar des aktiven Zentrums in der SARS-CoV M^{pro} nicht als Ionenpaar (HisH^+ - CysS^-) vor sondern neutral. [13]



Aktives Zentrum von Aspartat-Proteasen

Bei der *Malaria*-Erkrankung findet man auch die Beteiligung von Aspartat-Proteasen (Plasmepsine). [14] Sie spielen auch bei Er-

krankungen wie Bluthochdruck (Renin), Krebs und Alzheimer (Cathepsin D), AIDS (HIV-1 Peptidase) und *Candida-albicans*-Infektionen (sekretorische Aspartat-Proteasen, SAPs) eine Rolle. Diese Proteasen gehören den Familien Pepsin (A1), Retropepsin (A2) und der Peptidasefamilie (A3) an und enthalten zwei Asparaginsäurereste in ihrem aktiven Zentrum. Der Hydrolysemechanismus von Polypeptiden durch Aspartat-Proteasen unterscheidet sich deutlich von denen der Serin- und Cystein-

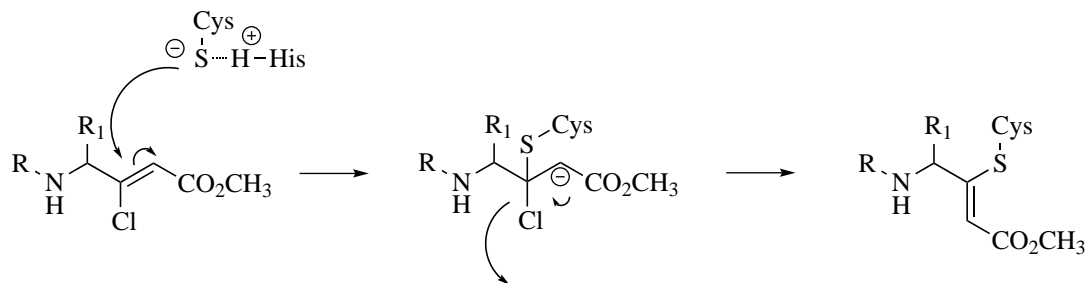
Proteasen. Die Carboxyfunktion wirkt nicht selbst als Nucleophil sondern als Lewis-Base; der nucleophile Angriff auf die zu spaltende Peptidbindung geschieht dann durch ein aktiviertes Wassermolekül. [15]

1.2 Vinylsulfone als Cystein-Protease-Inhibitoren

Um eine irreversible Hemmung von Cystein-Proteasen zu erreichen, ist es nötig, am aktiven Zentrum eine irreversible Reaktion zu erzwingen. Eine solche stellt z.B. eine Acylierungs- oder Alkylierungsreaktion dar. Vinylsulfone und die sich von ihnen ableitenden Derivate besitzen eine zur Sulfongruppe konjugierte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung und gehören somit zur Klasse der Michael-Systeme. Dieser Gruppe gehören weiterhin die α , β -ungesättigten Carbonylderivate sowie analoge Phosphonsäurederivate an. Michael-Systeme reagieren mit Nucleophilen sowohl in der klassischen Michael-Variante, der 1,4-Addition, als auch in einer 1,2-Addition an die Doppelbindung, in der der Sulfoneinheit die Rolle eines elektronenziehenden Substituenten zukommt. [16, 17] Vinylsulfone, bzw. Michael-Systeme im Allgemeinen, sind somit elektrophile Bausteine und daher potentielle Reaktionspartner für die nucleophilen Aminosäurereste im aktiven Zentrum der zu inhibierenden Proteasen. Durch die Kupplung der reaktiven

Vinylsulfonbausteine an eine die enzymatische Erkennung begünstigende Aminosäuresequenz wird ein potentieller Inhibitor erhalten.

Der Mechanismus der Inhibierung von Cystein-Protasen durch Vinylsulfone und α, β -ungesättigte Carbonylverbindungen beginnt nach dem Prinzip der Michaeladdition mit einem nucleophilen Angriff des Cys-Rests im aktiven Zentrum an das β -Kohlenstoffatom des Michael-Systems, gefolgt von einer Protonierung des nun negativ geladenen Intermediats. Aufschluss über diesen Mechanismus lieferten Arbeiten von Govardhan *et al.* mit einem Substitutionsexperiment [17] an Papain und Cath B, dessen Reaktionsverlauf in Schema 1 dargestellt ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch die



Schema 1: Substitutionsexperiment von Govardhan *et al.*

am β -Kohlenstoff platzierte gute Abgangsgruppe Cl⁻ die Notwendigkeit, einen Protonendonor zugegen zu haben, entfällt, da sich das negativ geladene Intermediat durch Elimination des Chloridions unter Rückbildung der C-C-Doppelbindung stabilisieren kann.

Die im Experiment beobachtete Menge an eliminierten Chloridionen bei 100%iger Enzymhemmung entsprach der vorhandenen Enzymkonzentration. Die beobachtete Hemmung war irreversibel wie Dialyseexperimente über 20 h bestätigen konnten. [17]

Die Nomenklatur der peptidischen Vinylsulfone ist in Abbildung 4 dargestellt. Die funktionelle Vinylsulfoneinheit wird durch VS abgekürzt.

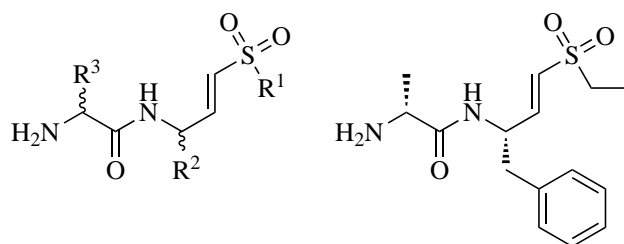


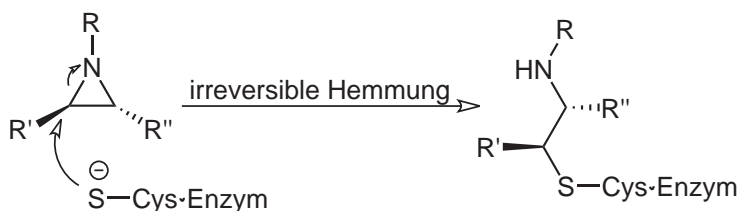
Abbildung 4: li: Allgemeine Struktur eines peptidischen Vinylsulfons, re: mit R¹ =Et, R² =Bn (→ Phe), R³ =CH₃ (→ Ala) wird diese abgekürzt mit D-Ala-L-Phe-VS-Et

Einer der ersten in der Literatur beschriebenen peptidischen Michael-Akzeptoren mit inhibitorischen Eigenschaften weist eine ungesättigte Carboxyleinheit auf. Das Fumarsäurederivat von E-64c aus *Aspergillus japonicus* [18], HO-Fum-Leu-NH(CH₂)₂CH(CH₃)₂ (mit Fum = *trans*-C(=O)-CH=CH-C(=O)-) ist ein irreversibler Inhibitor von Cathepsin B mit einer k_{app} von 625 M⁻¹ s⁻¹, Cathepsin H (k_{app} von 11 M⁻¹ s⁻¹) und Cathepsin L (k_{app} von 2272 M⁻¹ s⁻¹). [19] Eine erste Serie peptidischer Michael-System-basierter Phenylalaninderivate wurde von Hanz-

Serin-Proteasen, Metallo-Proteasen und Aspartat-Proteasen. Sie reagierten ebenfalls nicht mit Cystein-Resten außerhalb des aktiven Zentrums der Enzyme oder mit zirkulierenden niedermolekularen Thiolen wie z.B. Glutathion. Substituierte Vinylsulfone sind weniger reaktiv gegenüber Nucleophilen als die analogen Vinylketone oder -ester, [25, 26] wodurch sie als Arzneistoffe ein größeres Potential besitzen, da eine gewisse Inertheit in Abwesenheit der zu alkylierenden Nucleophile essentiell ist. Die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung mit dem aktiven Zentrum ist auch bei Vinylsulfonen erhalten. Dies ist wichtig, da der His-Rest im aktiven Zentrum bei niedrigem pH-Wert (4.5 - 6.5) protoniert vorliegt und die Cystein-Proteasen bei diesem pH-Wert am aktivsten sind. Später konnte auch die Inhibierung der Rhinovirus-C3-Protease durch Vinylsulfone gezeigt werden. [27, 28]

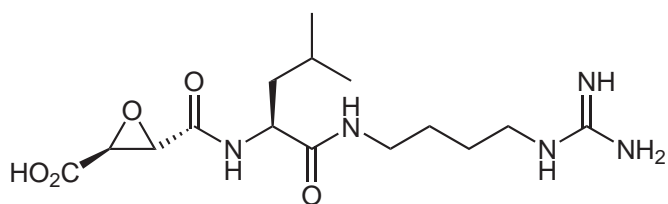
1.3 Aziridine als Cystein-Protease-Inhibitoren

Aziridine sind elektrophile Bausteine, deren Ring bei nucleophilem Angriff an einem Ringkohlenstoffatom irreversibel geöffnet wird (Schema 2).



Schema 2: Irreversible Ringöffnung von Aziridinen durch den Cystein-Rest der Protease; R, R' = Peptidketten, R'' = Säurefunktion

Sie sind daher als "warhead" von Inhibitoren geeignet. [2, 5] Die in der Natur vorkommenden Epoxysuccinylpeptide, z.B. E-64 aus *Aspergillus japonicus* [18], sind bekannt als gute Cystein-Protease-Inhibitoren. Der für die Hemmung entscheidende Baustein ist



E-64

die *trans*-Epoxybernsteinsäure. Nach der nucleophilen Ringöffnung des Epoxids durch das Cysteinat ist die Protease inaktiviert. E-64 hemmt spezifisch Cystein-Proteasen; Aspartat-, Serin- und Metallo-Proteasen werden nicht inhibiert. Innerhalb des Papain-

Clans A wird jedoch keine Selektivität beobachtet.

In Anlehnung an Epoxysuccinylpeptide haben sich Aziridinylpeptide, darunter Derivate von *trans*-Aziridin-2,3-dicarbonsäuren, in der vergangenen Zeit als wirksame Inhibitoren für Cystein-Proteasen etabliert. [29] Die Peptidkette sorgt dabei für die Erkennung durch das Enzym. Eine freie Carbonsäurefunktion am Dreiring ist bei Epoxysuccinylpeptiden und analogen *N*-unsubstituierten Aziridin-Derivaten von großer Bedeutung für die Hemmwirkung, da durch diese eine optimale Wechselwirkung mit dem Histidin-Rest des aktiven Zentrums der Protease möglich wird. Durch den Austausch des Epoxids gegen einen Aziridin-Baustein wird in das Molekül eine zusätzliche Derivatisierungsmöglichkeit eingeführt. Dies kann vor allem bei der Aufklärung von Hemmmechanismen von großem Nutzen sein. Die zusätzliche Position ermöglicht die Einführung von Markern, wie z.B. Biotin, ohne das bereits vorhandene Substitutionsmuster einschränken zu müssen. Es ist bekannt, dass Aziridin-Derivate vor allem bei niedrigem pH-Wert gute Inhibitoren sind. [29] Im neutralen und alkalischen Milieu ist der Epoxidring gegenüber nucleophilem Angriff reaktiver als der Aziridin-Baustein. Im sauren Milieu wird der Aziridin-Ring protoniert und weist somit eine ähnliche Reaktivität auf wie die Epoxid-Derivate.

Der Einsatz von irreversibel hemmenden Inhibitoren als Therapeutika wird kontrovers diskutiert. Aufgrund der Irreversibilität der Inhibierungsreaktion bleibt der Inhibitor kovalent am inaktiven Enzym gebunden, bis dieses vom Organismus abgebaut wird. Bei der kurzzeitigen Behandlung viraler, bakterieller oder parasitärer Erkrankungen können irreversible Inhibitoren ein großes Potential aufweisen, wie bereits im Fall von β -Lactam-Antibiotika gezeigt wurde. Vor allem bei den bereits genannten tropischen Krankheiten wie *Malaria*, in denen Proteasen nachweislich eine wichtige Rolle übernehmen, könnte bereits nach wenigen Tagen der Behandlung mit irreversiblen Inhibitoren ein Heilerfolg erzielt werden. In diesem Fall wäre das Risiko immunologischer Probleme, die durch die Irreversibilität der Hemmung auftreten können, sehr gering. Bei Langzeit-Behandlungen mit irreversiblen Inhibitoren, z.B. bei Arthritis, lassen sich dagegen Schädigungen des Immunsystems oftmals nicht ausschließen. [29] Es ist dann auch davon auszugehen, dass nicht nur an den Proteasen, sondern auch an anderen nucleophilen Positionen, z.B. der DNA, Alkylierungsreaktionen auftreten können. Die Cytotoxizität der Vinylsulfon- und Aziridin-Verbindungen ist daher nicht zu unterschätzen und muss genauestens untersucht werden. Sie muss im Einzelfall für jede Verbindung bestimmt werden. Oxiran-2,3-

dicarbonsäuren haben sich allerdings im Tierversuch bereits als untoxisch erwiesen. Darunter auch Loxistatin, das als Arzneistoff sogar die Klinische Phase III erreicht hat (Abbildung 6). [30, 31]

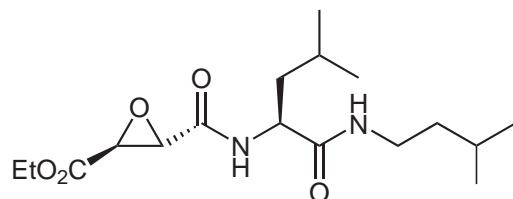


Abbildung 6: Loxistatin erreichte die Klinische Phase III

Von Takeda Chem. Ind. synthetisierte Aziridinylpeptide [32, 33] wurden ebenfalls im Tierversuch getestet und konnten mit Konzentrationen von 1 mg/kg als untoxisch eingestuft werden. Und mit Rupintrivir (CAS: 223537-30-2) ist ein irreversibler Inhibitor der humanen Rhinovirus-3C-Protease mit Michael-Akzeptor-Baustein bis in die klinische Phase II gekommen. Es ist daher zu hoffen, dass auch die in dieser Arbeit vorgestellten Substanzen wenig bis gar nicht toxisch sind, dennoch sollten sie mit größter Vorsicht gehandhabt werden, da es sich um sehr kleine Vinylsulfon- und Aziridin-Derivate handelt und das Risiko einer Cytotoxizität nicht auszuschließen ist.

1.4 Theoretische Analyse und Methoden zur Vorhersage von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen

Theoretische Studien zur Beschreibung, Erklärung oder Vorhersage von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen müssen im Fall von irreversiblen Inhibitoren sowohl nicht-kovalente Komplexbildung aus Enzym und Inhibitor als auch die nucleophile Angriffsreaktion zur endgültigen Inaktivierung des Enzyms berücksichtigen. Zwei Hemmkonstanten spielen dabei eine wichtige Rolle. Aktives Enzym und Inhibitor stehen mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex EI im Gleichgewicht (Schema 3).



Schema 3: Reaktionen zwischen Enzym und Inhibitor

Dieses wird durch die Dissoziationskonstante K_i beschrieben. Die eigentliche Inaktivierung erfolgt durch eine irreversible Reaktion des Komplexes EI zum kovalent-modifizierten Enzym E-I. Diese Reaktion wird charakterisiert durch die Geschwindigkeitskonstante der Inhibierungsreaktion k_i (Kapitel 2.3). Die erste Stufe, die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung, ist durch molekularmechanische Methoden erfassbar. Hierbei wird vorausgesagt, wie sich Inhibitor und Enzym geometrisch anordnen müssen, um eine optimale Orientierung zueinander zu erreichen. Es wird zu-

erst die Bindetasche simuliert, in die anschließend der Inhibitor eingepasst wird. Studien zu Bindungsstärken, -längen, elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen, *etc.* sind mit diesem Modell möglich. Für den zweiten Schritt, die Inaktivierung durch die Bildung der kovalenten Bindung, sind quantenchemische Methoden erforderlich, mithilfe derer die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Reaktion berechnet werden können.

2 Grundlagen und Methoden

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie ist heutzutage der wohl verbreitetste theoretische Ansatz zur Untersuchung chemischer Fragestellungen. Ihr größter Vorteil ist ihre Kosten-Effizienz.

Ein Funktional $F[f]$ ist eine mathematische Vorschrift, die einer Funktion, die von bestimmten Variablen abhängt, einen Wert zuordnet. Eine Funktion $f(x)$ hingegen ordnet den Variablen, von denen sie abhängt, einen Wert zu. Die Wellenfunktion oder die Elektronendichte eines Systems sind also Funktionen, während die Energie bei DFT von der Elektronendichte abhängt und daher ein Funktional ist.

Die Elektronendichte $\rho(\mathbf{r})$ kann definiert werden als das Integral des Quadrats der Wellenfunktion $\Psi(\mathbf{r})$ über $N - 1$ Elektronenkoordinaten. Mit anderen Worten: integriert man diese Elektronendichte $\rho(\mathbf{r})$ über den ganzen Raum, erhält man die Anzahl der Elektronen.

$$\rho(\mathbf{r}_1) = N \int |\Psi(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_N)|^2 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N \quad (1)$$

$$N = \int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2)$$

Um für ein Molekül die Energie zu berechnen, wird der Hamilton Operator aufgestellt, für den die Anzahl der Elektronen bekannt sein muss. Diese Anzahl geht wie gezeigt aus der Elektronendichte hervor. Die Elektronen eines Systems interagieren nicht nur untereinander, sondern auch mit einem sogenannten externen Potential, das in einem Molekül durch die Anziehung der Elektronen von den positiv geladenen Kernen gegeben ist. Zusätzlich werden für die Aufstellung des Hamilton Operators also die Positionen der Kerne und die Kernladungszahlen benötigt. Hohenberg und Kohn konnten zeigen, dass die Grundzustandsdichte $\rho(\mathbf{r})$ das externe Potential festlegt. Somit bestimmt die Grundzustandsdichte eines Systems komplett dessen Hamilton Operator und auch die Wellenfunktionen des Grundzustands. Diese Erkenntnis ist bekannt als das Hohenberg-Kohn-Theorem [34] und stellt die Grundlage der Dichtefunktionaltheorie dar: die Grundzustandsdichte $\rho(\mathbf{r})$ eines Systems bestimmt vollständig den Hamilton Operator, aus dem sich die Energie E_0 des elektronischen Grundzustands ergibt. Zur Berechnung der Grundzustandsenergie muss mit diesem Ansatz letztlich die Schrödinger Gleichung näherungsweise gelöst werden. Die Schwierigkeit dabei wird hauptsächlich durch den Elektronen-

Elektron-Wechselwirkungs-Term im Hamilton Operator bedingt. Unter Verwendung der Elektronendichte lässt sich der Energie-Ausdruck für ein System wie folgt aufstellen:

$$\begin{aligned} E(\rho(\mathbf{r})) &= \langle \Psi(\rho(\mathbf{r})) | \mathbf{H} | \Psi(\rho(\mathbf{r})) \rangle \\ &= T(\rho(\mathbf{r})) + E_{ee}(\rho(\mathbf{r})) + \int \rho(\mathbf{r}) V_{ne} d\mathbf{r} \end{aligned} \quad (3)$$

Die kinetische Energie der Elektronen $T(\rho(\mathbf{r}))$ sowie Energiebeiträge der Elektron-Elektron-Wechselwirkungen $E_{ee}(\rho(\mathbf{r}))$ sind unabhängig von Position und Größe der Kerne n . Diese Funktionale sind unbekannt. Um sie näherungsweise zu bestimmen, entwickelten Kohn und Sham daher die Kohn-Sham-Orbitale und die Methode des nicht-wechselwirkenden Referenzsystems, ein fiktives System, in dem die Elektronen nicht miteinander wechselwirken. [35] Für ein solches System lässt sich der Hamilton Operator als Summe von Ein-Elektronen-Operatoren schreiben. Er besitzt Eigenfunktionen, die Slater-Determinanten der jeweiligen Ein-Elektronen-Eigenfunktionen sind, und die Eigenwerte des Operators ergeben sich aus der Summe der Ein-Elektronen-Eigenwerte. Die entscheidende Annahme, die Kohn und Sham für dieses fiktive System machten, ist die, dass die Grundzustandsdichte dieses Systems dieselbe sein sollte wie für ein reales System, in dem natürlich Elektron-Elektron-Wechselwirkungen auftreten.

Ein auf diesen Überlegungen basierender Hamilton-Operator \mathbf{H}_λ mit $0 \leq \lambda \leq 1$ setzt sich also aus der kinetischen Energie der Elektronen \mathbf{T} , einem externen Potential \mathbf{V}_{ext} abhängig von λ und dem Potential zwischen Kernen und Elektronen $\lambda\mathbf{V}_{ne}$ zusammen.

$$\mathbf{H}_\lambda = \mathbf{T} + \mathbf{V}_{ext}(\lambda) + \lambda\mathbf{V}_{ne}. \quad (4)$$

Für $\lambda = 1$ ist der Operator des externen Potentials \mathbf{V}_{ext} gleich dem Potential zwischen Kernen und Elektronen \mathbf{V}_{ne} (reales System). Für λ -Werte zwischen null und eins hingegen wird angenommen, dass das externe Potential sich so anpasst, dass sich dieselbe Dichte für sowohl $\lambda = 1$ (reales System) als auch für $\lambda = 0$ (hypothetisches System ohne Elektron-Elektron-Wechselwirkungen) ergibt. Für den Fall $\lambda = 0$ führt die exakte Lösung der Schrödingergleichung einer Wellenfunktion für nicht-wechselwirkende Elektronen zu einer Slater-Determinante, aufgebaut aus Molekülorbitalen ϕ_i , für welche das Funktional der exakten kinetischen Energie \mathbf{T}_S (S für Slater-Determinante) gegeben ist als

$$\mathbf{T}_S = \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | -\frac{1}{2}\nabla^2 | \phi_i \rangle. \quad (5)$$

Gleichung 5 gilt für den Fall, dass keinerlei Wechselwirkung zwischen den Elektronen berücksichtigt wird, stellt also nur ei-

ne Näherung der tatsächlichen kinetischen Energie dar. Diese Vereinfachung ist der Schlüsselschritt der Kohn-Sham-Theorie, da die übrige kinetische Energie mit im sogenannten Austausch-Korrelations-Term $\mathbf{E}_{xc}[\rho]$ erfasst wird. $\mathbf{E}_{xc}[\rho]$ beinhaltet die Korrektur der kinetischen Energie $\Delta\mathbf{T}[\rho]$, die durch die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen in einem realen System notwendig wird, und trägt der Differenz zwischen klassischer und quantenmechanischer Elektron-Elektron-Repulsion Rechnung.

Die DFT-Energie lässt sich folglich durch den Ausdruck

$$\mathbf{E}_{DFT}[\rho] = \mathbf{T}_S[\rho] + \mathbf{E}_{ne}[\rho] + \mathbf{J}[\rho] + \mathbf{E}_{xc}[\rho] \quad (6)$$

vollständig beschreiben, mit dem Funktional der exakten kinetischen Energie \mathbf{T}_S , sowie den klassischen Coulomb-Termen für Kern-Elektron-Wechselwirkung $\mathbf{E}_{ne}[\rho]$ und Elektronen-Elektron-Wechselwirkung $\mathbf{J}[\rho]$ und dem Austausch-Korrelations-Term $\mathbf{E}_{xc}[\rho]$. Setzt man $\mathbf{E}_{DFT}[\rho]$ der exakten Energie gleich, resultiert daraus für $\mathbf{E}_{xc}[\rho]$

$$\mathbf{E}_{xc}[\rho] = (\mathbf{T}[\rho] - \mathbf{T}_S[\rho]) + (\mathbf{E}_{ee}[\rho] - \mathbf{J}[\rho]) \quad (7)$$

Der erste Klammerterm kann als kinetische Korrelationsenergie verstanden werden, während der zweite Klammerterm Austausch-

und Potential-Korrelationsenergie Rechnung trägt. Die Herausforderung bei der Kohn-Sham-Theorie besteht darin, das Austausch-Korrelations-Funktional mit Hilfe geeigneter Näherungsverfahren zu bestimmen. [36]

Näherungsverfahren zur Bestimmung des Austausch-Korrelations-Funktionals

Ein recht einfaches Näherungsverfahren ist die lokale-Spindichte Approximation (LSDA). Als Modell für LSDA wird das homogene Elektronengas in Festkörpern angenommen, da sich die daraus abgeleiteten Funktionale als einfach erwiesen haben.

$$\mathbf{E}_{xc} \approx \mathbf{E}_{xc}^{LSDA} = \int e_{xc}[\rho_\alpha, \rho_\beta] d^3\mathbf{r} \quad (8)$$

\mathbf{E}_{xc} wird also durch \mathbf{E}_{xc}^{LSDA} beschrieben, wobei ρ die Summe der Dichten von Elektronen mit verschiedenem Spin (α und β) ist. Für closed-shell Systeme geht LSDA in LDA (local density approximation) über. Mit beiden Verfahren ist die Berechnung der Austausch-Energie im Fall des nicht-wechselwirkenden Elektronengases exakt möglich. Die Korrelationsenergie lässt sich mit Hilfe klassischer Näherungsverfahren (z.B. der Monte-Carlo-Methode) numerisch berechnen. LSDA macht allerdings die Annahme, dass die Austausch-Korrelationsenergie-Dichte an jedem

Punkt des Moleküls gleich derjenigen ist, die das Elektronengas mit derselben Dichte an der betrachteten Stelle hätte. Die wenigsten Moleküle erfüllen diese Voraussetzung, daher ist der Anwendungsbereich von LSDA beschränkt. Eine realistische Beschreibung des Systems liefert eine Methode, die durch den Dichte-Gradienten angibt, wie stark sich die lokale Dichte innerhalb des Systems abhängig vom Ort ändert. Sie wird generalized gradient approximation (GGA) genannt, wobei zur Näherung der Werte eine Taylor-Reihenentwicklung durchgeführt wird. Hierbei gilt:

$$\mathbf{E}_{xc} \approx \mathbf{E}_{xc}^{GGA} = \int e_{xc}[\rho_\alpha, \rho_\beta; \nabla\rho_\alpha, \nabla\rho_\beta] d^3\mathbf{r} \quad (9)$$

Ebenso wie beim LSDA-Ansatz kann die Energie in einen Austausch- und einen Korrelationsterm aufgespalten werden.

$$\mathbf{E}_{xc} = \mathbf{E}_x^{GGA} + \mathbf{E}_c^{GGA} \quad (10)$$

Das erste bekannte GGA Austauschfunktional wurde von Becke entwickelt, nach dem die Funktionale häufig mit "B" bezeichnet werden. Einige der B-Funktionale, z.B. B88, [37] enthalten keine empirisch optimierten Parameter, andere wiederum verwenden als empirischen Parameter den Wert, der sich beim Fit der Austauschenergien der Edelgase an die exakten

Hartree-Fock-Austauschenergien ergab. Ein häufig verwendetes GGA-Korrelationsfunktional ist LYP (von Lee, Yang und Parr). [38] Es beinhaltet vier empirische Parameter, die aus der Korrelationsenergie des Heliumatoms berechnet wurden. Es ist das einzige Funktional, das den Selbst-Wechselwirkungsfehler bei Ein-Elektronensystemen aufhebt. Die Kombination beider Ansätze führt zum GGA-Funktional B-LYP. [39]

Ein weiterführender Ansatz sind sogenannte ACM, adiabatic connection methods. Die Grundidee dabei ist der Versuch, einen fließenden Übergang zwischen dem nicht-wechselwirkenden Referenzsystem von Kohn und Sham mit dem realen System herzustellen. Dazu wird der Parameter λ (mit $0 \leq \lambda \leq 1$) dazu verwendet, den Grad der elektronischen Wechselwirkung zu beschreiben.

$$\mathbf{E}_{xc} = \int_0^1 \langle \Psi(\lambda) | \mathbf{V}_{xc}(\lambda) | \Psi(\lambda) \rangle d\lambda \quad (11)$$

\mathbf{V} und Ψ als Funktionen von λ sind unbekannt, daher wird zunächst der Grenzwert für das nicht-wechselwirkende System betrachtet, in dem \mathbf{V} nur die Austausch-Komponente enthält, die aus der Antisymmetrie der Wellenfunktion resultiert. Für den Hamilton Operator des nicht-wechselwirkenden System ist die exakte Wellenfunktion die Slater-Determinante der KS-Orbitale. Der

Erwartungswert ergibt also die exakte Austauschenergie, die mit HF-Methoden unter Verwendung der KS Orbitale berechnet werden kann (E_x^{HF}). Die restliche Fläche unter der Kurve des Erwartungswerts ist nur näherungsweise bestimmbar. Sie wird dazu als eine empirische Konstante betrachtet, die optimiert wird. \mathbf{E}_{xc} wird dann beschrieben als

$$\mathbf{E}_{xc} = E_x^{HF} + z(E_{xc}^{DFT} - E_x^{HF}) \quad (12)$$

Da die ACM sowohl HF- als auch DFT-Austausch berücksichtigen, werden sie "Hybridmethoden" genannt.

Für genauere Näherungen wurden weitere zu optimierende Parameter eingefügt. Das verbreitetste Funktional ist B3-LYP von Stevens *et al.*, ein 3-Parameter-Funktional. Es liefert insgesamt sehr gute Ergebnisse, obwohl die drei verwendeten Parameter a, b und c ursprünglich von Becke für das 3-Parameter-Funktional B3PW91 optimiert wurden.

Die Austausch-Korrelationsenergie berechnet sich hierbei mit Gleichung 13 mit den empirischen Parametern $a=0.20$, $b=0.72$ und $c=0.81$.

$$\mathbf{E}_{xc}^{B3LYP} = (1 - a)\mathbf{E}_x^{LSDA} + a\mathbf{E}_x^{HF} + b\mathbf{E}_x^B + (1 - c)\mathbf{E}_c^{LSDA} + c\mathbf{E}_c^{LYP} \quad (13)$$

Ein Vorteil der Anwendung von Hybrid-Funktionalen bei der Berechnung von chemischen Reaktionen entsteht aus der Kombination von HF- und DFT-Methoden. Reaktionsbarrieren, die mittels GGA-Funktionalen berechnet wurden, sind aller Erfahrung nach etwas zu hoch, während HF-Methoden die Barrieren oft zu niedrig einschätzen. Durch die Kombination der Methoden erreicht man eine Art Korrektur der GGA-Funktionale, die oftmals eine realistischere Beschreibung der Reaktion liefert.

2.1.2 Das Continuum Solvent Modell COSMO

Die korrekte Beschreibung eines biochemischen Systems mit Hilfe von theoretischen Methoden erfordert den Einbezug der Wechselwirkungen des Systems mit dem es umgebenden Medium, welches in der Regel Wasser ist. Ist ein Stoff von einem flüssigen Medium umgeben, ändert sich dessen elektronische Struktur. Alle von der elektronischen Struktur abhängenden Eigenschaften des Systems werden also in Lösung einen leicht veränderten Erwartungswert im Vergleich zu dem der Gasphase aufweisen, z.B. ist das Dipolmoment in Lösung größer als in der Gasphase. Wie groß der Unterschied beider Werte ist, hängt von der Stärke der System-Medium-Wechselwirkungen ab. In einer einfachen Vorstellung ließe sich um das zu untersuchende System theoretisch eine beliebige Anzahl an

Wassermolekülen platzieren, die eine Hydrathülle um das System schaffen. Wird eine solche Wasser-Sphäre aus wenigen Molekülen aufgebaut, könnten jedoch lediglich Wechselwirkungen des Systems mit einzelnen Wassermolekülen beschrieben werden. Eigenschaften des umgebenden Mediums, z.B. Wasserstoffbrückenbildung und die dadurch veränderte Wechselwirkung des Systems mit dem Medium als Ganzes (bulk) würden nicht berücksichtigt werden. Durch den Zusatz mehrerer Wasser-Sphären könnte dieser Mangel etwas behoben werden, jedoch würde das insgesamt zu berechnende System samt Wassermolekülen viel komplexer und zeitaufwändiger in seiner Bearbeitung. Man bedient sich daher sogenannter Continuum Solvent Modelle (CSMs), die auf einer Randelemente-Methode basieren. [40] Diese beinhaltet, dass die Polarisierung des dielektrischen Continuum, welche durch das im Medium gelöste System erzeugt wird, durch Polarisationsladungen beschrieben wird, welche sich auf endlich-großen Oberflächenelementen im Grenzbereich zwischen System und Continuum befinden. Mit Hilfe der exakten dielektrischen Randbedingung

$$4\pi\sigma = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon} \mathbf{E} \cdot \mathbf{n} \quad (14)$$

kann die Polarisationsladungsdichte aus dem gesamten elektrostatischen Feld \mathbf{E} berechnet werden, das durch den gelösten Stoff

induziert wird. \mathbf{n} ist die Normale auf das Oberflächenelement, ϵ die Dielektrizitätskonstante.

Die Ladungsverteilung innerhalb des Systems interagiert mit derjenigen des umgebenden Solvens. In einem Continuum Modell wird anstelle der expliziten Widerspiegelung der Ladungsverteilung ein kontinuierliches elektrisches Feld angenommen, welches den statistischen Mittelwert der Solvensfreiheitsgrade im thermischen Gleichgewicht repräsentiert.

Dieses E-Feld wird in den Bereichen, in denen das zu untersuchende System Raum einnimmt, als "Reaktionsfeld" bezeichnet, da es sich direkt aus der Reaktion des Systems mit dem Medium ableitet. Das elektrische Feld in einem Punkt berechnet sich aus dem Gradienten des elektrischen Potentials in diesem Punkt. Die für die Ladungsverteilung benötigte Arbeit lässt sich aus der Wechselwirkung der Ladungsdichte ρ des Systems mit dem elektrostatischen Potential berechnen. Hierbei ist die Polarisationsenergie G die Differenz der benötigten Arbeit zur Verteilung der Ladung in der Gasphase und in Lösung.

$$G = -\frac{1}{2} \int \rho(\mathbf{r})\phi(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (15)$$

Die Ladungsdichte ρ des Systems kann abhängig vom gewählten theoretischen Modell zur Beschreibung des Systems entweder

als eine kontinuierliche Funktion von \mathbf{r} oder als diskrete Ladungspunkte repräsentiert werden. Für die Berechnung der freien Polarisationsenergie werden also nur das elektrostatische Potential in Lösung und in der Gasphase benötigt. Ersteres kann als dielektrisches Medium angenommen werden, welches durch eine Dielektrizitätskonstante charakterisiert wird.

Das elektrostatische Potential kann mit Hilfe der Poisson-Gleichung als eine Funktion der Ladungsdichte $\rho(\mathbf{r})$ und der Dielektrizitätskonstante ϵ beschrieben werden, wenn das umgebende Medium linear auf die Ladungsverteilung des eingeschlossenen Systems reagiert. Für die Poisson-Gleichung ergibt sich daraus

$$\nabla^2 \phi(\mathbf{r}) = -\frac{4\pi\rho(\mathbf{r})}{\epsilon} \quad (16)$$

Eine weitere physikalische Eigenschaft, die mit dem Lösungsprozess einher geht, ist die Kavitätsbildung. Man stellt sich vor, dass sich in einem ersten Schritt eine Kavität aus Vakuum innerhalb des Mediums ausbildet, die ein homogenes dielektrisches Medium sein soll und in die der gelöste Stoffe eingelagert wird. Die Kavitätsbildung ist ein Prozess, der Energie kostet. Es gibt also zwei zu betrachtende Regionen: eine in der Kavität und eine darum herum, die die Poisson-Gleichung wie folgt beschreibt

$$\nabla\epsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla\phi(\mathbf{r}) = -4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (17)$$

Beinhaltet das zu betrachtende System bewegliche Ionen, muss deren gegenseitige Abstoßung und ihre Bewegung in der Flüssigkeit bedacht werden. Die Verteilung der Ionen wird durch die Boltzmannverteilung beschrieben.

$$n(\mathbf{r}) = N \exp(-V(\mathbf{r})/k_B T) \quad (18)$$

Hierbei ist $n(\mathbf{r})$ die Teilchendichte der Ionen am Ort \mathbf{r} , N die Gesamtteilchendichte und $V(\mathbf{r})$ ist die notwendige Energie um das Ion von ∞ zum Ort \mathbf{r} zu bringen. Kombiniert man diese Gleichungen mit dem Ausdruck $\kappa' \sinh[\phi(\mathbf{r})]$, der mit der *Debye-Hückel*-Theorie verknüpft ist und den Radius der Ionenwolke berücksichtigt, erhält man die *Poisson-Boltzmann*-Gleichung.

$$\nabla\epsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla\phi(\mathbf{r}) - \kappa' \sinh[\phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (19)$$

Die Form der Kavität spielt bei der Berechnung der Polarisationsenergie eine entscheidende Rolle. Wird eine Ladungsverteilung der Ladung q auf einer Kugeloberfläche mit dem Radius a angenommen, ergibt sich mit dem elektrostatischen Potential $\phi = -\frac{q}{\epsilon a}$ für die Polarisationsenergie die sogenannte Born-Gleichung (in

atomaren Einheiten)

$$G = -\frac{1}{2}\left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) - \frac{q^2}{a} \quad (20)$$

Eine dipolare Ladungsverteilung mit dem Dipolmoment μ beschreibt die Kirkwood-Onsager Gleichung (in atomaren Einheiten)

$$G = -\frac{1}{2}\left[\frac{2(\epsilon - 1)}{(2\epsilon + 1)}\right]\frac{\mu^2}{a^3} \quad (21)$$

Die Born-Gleichung hängt also von einer Eigenschaft des Systems, nämlich der Ladung, ab, während die Kirkwood-Onsager-Gleichung vom Dipolmoment abhängt, das sich mit dem umgebenden Medium verändert.

Ein weitverbreitetes Modell, das den Einfluss des umgebenden Solvents auf ein System erfasst, ist das Conductor-like Screening Model COSMO. [41,42] Bei diesem Ansatz wird für das umgebende Medium eine unendliche Dielektrizitätskonstante angenommen, das Medium ist also ein Leiter und grenzt direkt an die gelöste Substanz. Dadurch verschwindet das Potential im Medium. Stattdessen entstehen Spiegelladungen q^* an der Grenzfläche zwischen Medium und Molekül. Da reale Medien keine Leiter sind, wird zur Korrektur ein Faktor eingeführt.

$$q = f * q^* \quad (22)$$

Für den Faktor f wird oft der Onsager-Faktor $\frac{2(\epsilon-1)}{2\epsilon+1}$ verwendet. Bei Cosmo wird die Oberfläche der Grenzfläche durch Überlagerung der van-der-Waals Radien der Atome definiert. Die jeweiligen Anteile der van-der-Waals-Radien, die die Oberfläche ausmachen, werden zur Näherung der Gesamtfläche in kleine Oberflächenelemente, meist Dreiecke, zerlegt.

2.1.3 Verwendete Methoden und Programme

Die kombinierte Quantenmechanik-Molecular-Modelling-Methode (QM-MM) erlaubt die explizite Behandlung der Proteinumgebung und des Lösemittels sowie die Beschreibung von kovalenten Bindungsbrüchen und -bildungen in makromolekularen Systemen. [43] Diese Rechnungen sind komplex und zeitaufwändig, geben aber ein umfassendes Bild aller Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor. Um die Relevanz der verschiedenen Struktureinheiten des Inhibitors, die an der Hemmung beteiligt sind, abzuschätzen und zu entscheiden, welche Einheiten später mittels QM-MM-Rechnungen näher untersucht werden sollten, wurden vorerst reine QM-Rechnungen an kleinen Modellsystemen vorgenommen. Der Inhibitor wurde dabei nur durch den "warhead" re-

präsentiert, der aus einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung oder einem Vinylsulfon ohne Peptidseitenkette bestand. Als Modell für den Cys-Rest des aktiven Zentrums der Protease wurde Methylthiolat herangezogen. Alle Berechnungen wurden mit dem Programmpaket TURMOBOLE [44] Version 5.8 durchgeführt. Lösemittel Effekte wurden durch das Kontinuum-Solvent-Model (COSMO mit $\epsilon = 78.39$) berücksichtigt. [41, 42] Die Einbeziehungen von entweder expliziten Molekülen Wasser ($\text{pK}_s(\text{H}_2\text{O}) \approx 15$) oder Ammoniumionen ($\text{pK}_s(\text{NH}_4^+) \approx 9.3$) simulierten Protonendonatoren, wobei NH_4^+ das eher saure pH-Optimum von Cystein-Proteasen widerspiegelte.

Strukturoptimierung Die Strukturen aller zu untersuchenden Systeme wurden auf RI-DFT-Niveau [45, 46] mit dem Funktional B-LYP [39] optimiert, das für die Bestimmung der Geometrie genau genug ist. Zur Berechnung einer genaueren Energie der Strukturen wurden im Anschluss Single-Point Rechnungen mit dem Drei-Parameter-Funktional B3-LYP [37–39] ohne RI-Behandlung durchgeführt. Für alle berechneten Systeme wurde der TZVP-Basissatz [47] verwendet.

Frequenzanalyse und Übergangzustandssuche Zur eindeutigen Identifizierung der Extrema wie Minima und Übergangszustän-

den wurden mit dem Programm NumForce, das ebenfalls im TURBOMOLE-Programm-Paket implementiert ist, Frequenzanalysen der Flächenpunkte in der Nähe der Extrema durchgeführt und die Übergangszustände gesucht. Nach deren Auffinden wurden die Energien der Strukturen an den Extrempunkten erneut mit single-point-Rechnungen bestimmt. Übergangszustände sind durch die Existenz einer negativen Frequenz charakterisiert. Animation dieser Frequenz zeigte die entstehende Bindung zwischen dem Schwefel- und dem Kohlstoffatom, sodass eindeutig der Übergangszustand der Additionsreaktion ausgemacht werden konnte.

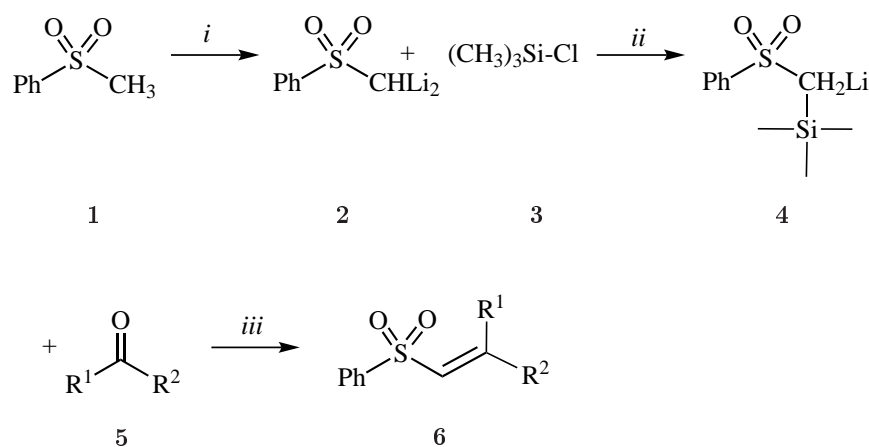
Ladungsanalyse nach Roby-Davidson Die Ladungsanalyse nach Roby-Davidson wurde mit dem Programm MOLOCH durchgeführt, welches im TURBOMOLE-Programm-Paket implementiert ist. Für die Berechnung der Ladungsverteilung wird die konvergierte SCF-Wellenfunktion zunächst als Basissatz von modifizierten Atomorbitalen geschrieben. Die sich durch die Anwendung des Ein-Teilchen-Dichteoperators ergebenden Besetzungszahlen sind die Basis für die Populationsanalyse, aus der sich die entsprechenden Teilladungen errechnen. Es werden jeweils die multi-center-korrigierten Werte angegeben.

COSMO Im Programm COSMO wurde der Wert des Dielektrikum auf $\epsilon = 78.39$ gesetzt (Dielektrizitätskonstante für Wasser), um der polaren Umgebung im Enzym Rechnung zu tragen. Für die Atomradien wurden die optimierten van-der-Waals-Radien verwendet.

2.2 Kenntnisstand zur Synthese der Inhibitoren

2.2.1 Synthese von Vinylsulfonen

Inhibitoren, die als reaktive Kopfgruppe ein Vinylsulfon besitzen, sind auf verschiedenen Wegen zugänglich. Eine Eintopfsynthese für den Vinylsulfonbaustein stellten *Lee et al.* 1989 vor. [48] Dabei nutzen sie eine *in situ* Wittig-Horner-Variante, um die Doppelbindung zu generieren. Allerdings waren nur einfach substituierte Vinylsulfone zugänglich, da nur reaktive Aldehyde, aber keine Ketone, zum Einbringen des Rests eingesetzt werden konnte. Eine verbesserte Variante wurde noch im selben Jahr publiziert und ist in Schema 4 dargestellt. [49]

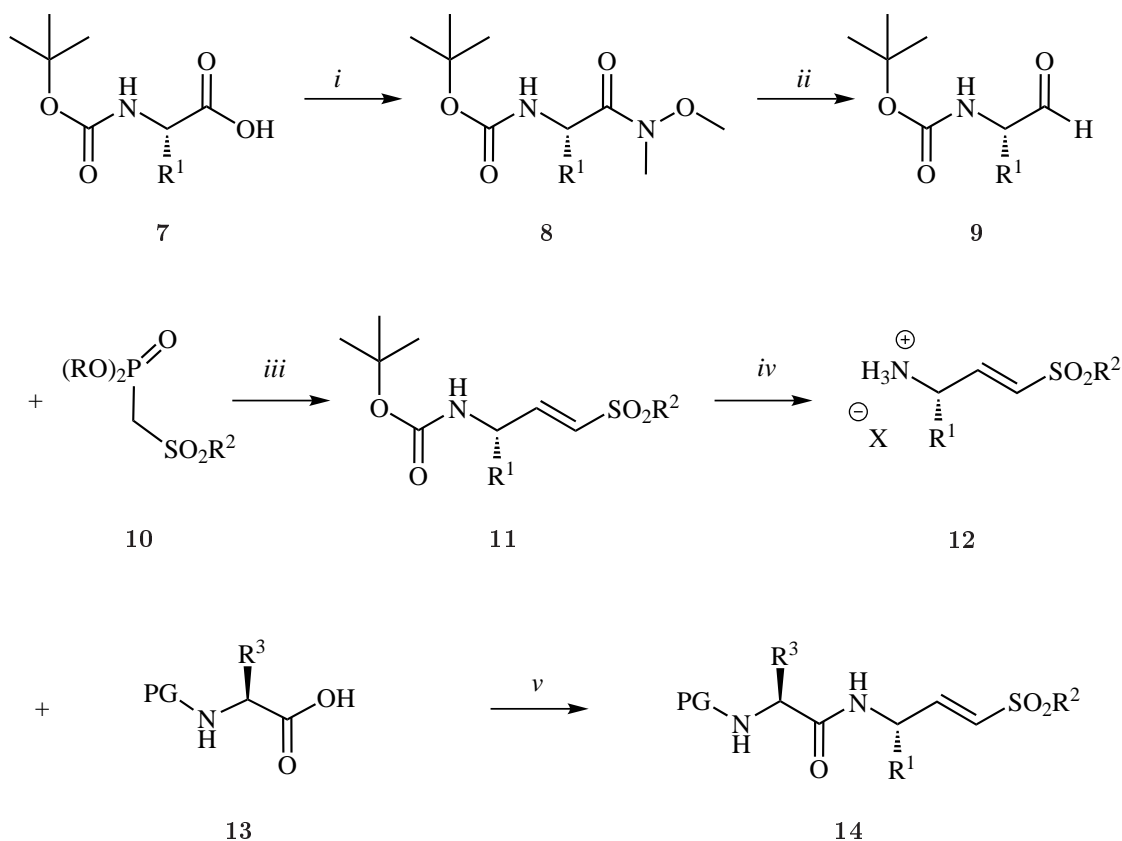


Schema 4: Eintopfsynthese von Vinylsulfonen nach *Lee et al.*: R^1 = alkyl/aryl, R^2 = H/ CH_3 /Ph; *i*) 2 eq. *n*-BuLi, THF, 0 °C; *ii*) 0 °C; *iii*) -78 °C

Phenylmethylsulfon **1** kann bei niedriger Temperatur in THF mit *n*-BuLi zweifach lithiiert werden (**2**) und reagiert mit Trime-

thylsilylchlorid **3** zum silylierten Anion **4**. Der Umsatz mit verschieden substituierten Aldehyden und Ketonen (**5**) liefert die gewünschten Vinylsulfone **6** in guten Ausbeuten. Da das silylierte Anion **4** auch als Base fungieren kann, ist der Einsatz von enolisierbaren Aldehyden und Ketonen problematisch. Die Syntheseroute bietet sich demnach nicht für die Synthese von peptidischen Vinylsulfon-basierten Protease-Inhibitoren an.

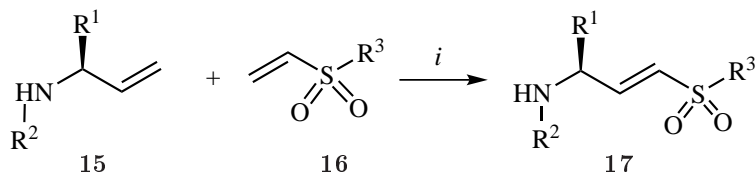
Schema 5 zeigt eine von *Palmer et al.* 1995 vorgestellte Syntheseroute zu peptidischen Vinylsulfonen. [22] Ausgehend von kommerziell erhältlichen Boc-geschützten Aminosäuren **7** sind N,O-Dimethylhydroxamate **8** zugänglich, die mithilfe von LiAlH_4 zu den korrespondierenden Aldehyden **9** reduziert werden können. Eine baseninduzierte Umsetzung nach Horner-Wadsworth-Emmons liefert den Grundbaustein für die Inhibitoren, die Vinylsulfone **11**. Freisetzung des N-Terminus (**12**) ermöglicht die Kupplung an beliebige Peptidsequenzen (**13**), die für die nötige Erkennung des peptidischen Vinylsulfons **14** im Enzym sorgen. *Palmer et al.* stellten auf diese Weise acht Protease-Inhibitoren her. Die Kopfgruppe bestand in der Regel aus Phenylvinylsulfon, das eine Peptidkette der Sequenz HomoPhe-AS-Morpholin trug. Als AS für die P_1 -Position wurden Phe, Leu, Tyr und Lys eingesetzt.



Schema 5: Synthese von peptidischen Vinylsulfonen nach *Palmer et al.*: R^1 , R^3 = AS-Seitenkette, R^2 = alkyl/aryl, $X^- = Cl^- / p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$, PG = N-terminale Schutzgruppe; *i*) CH_3NOCH_3 , DCC, TEA, DCM, 0 – 25 °C; *ii*) LiAlH_4 , THF, 0 °C; *iii*) NaH , THF, 0 – 25 °C; *iv*) HCl /Dioxan oder $p\text{-TsOH}$ /Ether; *v*) 4-Methylmorpholin, Chlorameisensäureisobutylester, THF, –10 °C

Eine elegante Synthese der Vinylsulfoneinheit, die eine Vielzahl von funktionellen Gruppen sowie ganze Peptidreste toleriert, wurde 2008 von *Ettari et al.* veröffentlicht und ist in Schema 6 dargestellt. [50] Die Aminosäurederivate **15** wurden separat hergestellt und die endständige Carboxylgruppe in eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung überführt. Auf diese Weise konnten die Aminosäurederivate **15** unter Einsatz eines Hoveyda-Grubbs

Katalysators der 2. Generation direkt mit den Vinylsulfonen **16** in einer Cross-Metathesereaktion in der Mikrowelle zu den gewünschten peptidischen Inhibitoren **17** gekuppelt werden.

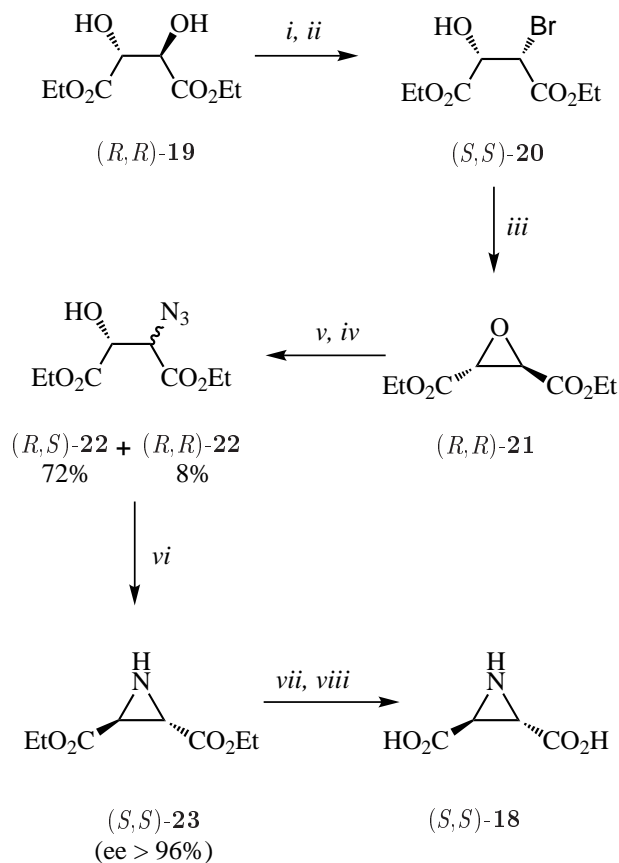


Schema 6: Cross-Metathese nach *Ettari et al.*: R¹ = CH₂CH₂Ph, R² = Benzodiazepinderivat; *i*) Hoveyda-Grubbs Katalysator der 2. Generation, DCM, 100 °C, Mikrowelle, 2 h

2.2.2 Synthese von Aziridinderivaten

Aziridin-2,3-dicarboxylate sind auf verschiedenen Wegen zugänglich. Erstmals gelang die enantioselektive Synthese von Aziridin-2,3-dicarbonsäure [(*S,S*)-**18**] [32] der Arbeitsgruppe von *Legters et al.* (Schema 7). [51]

Die *Ex-chiral*-Pool-Synthese (Schema 7) geht von kommerziell erhältlichem enantiomerenreinen L-Diethyltartrat [(*R,R*)-**19**] aus. Die Stufen *i* bis *iii* folgen der Methode von *Mori et al.* [52] und liefern das Diethyl-(2*R*,3*R*)-oxiran-2,3-dicarboxylat [(*R,R*)-**21**]. Dieses wird in den Stufen *iv* und *v* zum Azidoalkohol **22** umgesetzt, der als säulenchromatographisch leicht trennbares Diastereomergemisch anfällt. In Schritt *vi* wird aus dem entsprechenden Diastereomer (*R,S*)-**22** das Aziridin (*S,S*)-**23** gewonnen.

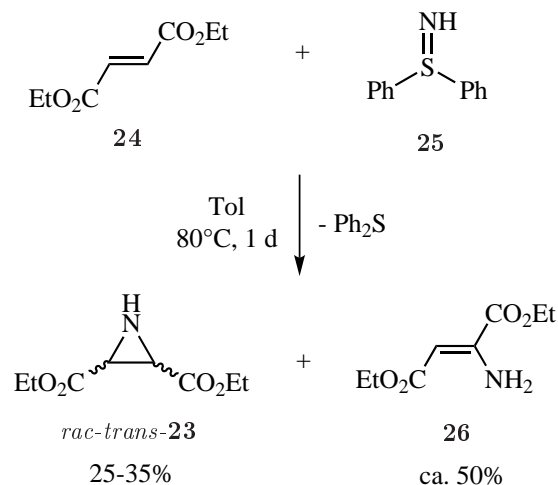


Schema 7: Synthese von $(2S,3S)$ -Aziridin-2,3-dicarbonsäure [(S,S) -**18**] nach *Legters et al.*: *i*) HBr, HOAc; *ii*) EtOH, HCl; *iii*) NaOEt, EtOH; *iv*) TMSN₃, EtOH, DMF; *v*) NH₄Cl, EtOH, H₂O; *vi*) PPh₃, DMF; *vii*) LiOH·H₂O; *viii*) H⁺

Hydrolyse (Stufen *vii* und *viii*) ergibt den Naturstoff [(S,S) -**18**]. Die Synthese umfasst acht Stufen und eine Diastereomerentrennung. Die Gesamtausbeute an Aziridin-2,3-dicarbonsäure beträgt ca. 15%.

Eine präparativ einfache Syntheseroute geht von Fumaraten, wie Diethylfumarat **24**, oder Maleinaten aus (Schema 8). Diese können mithilfe von Diphenylsulfimin (DPSI) **25** in das Aziri-

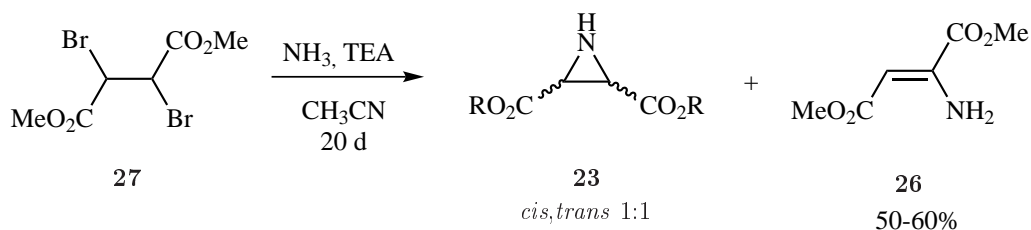
in überführt werden. [53] Als Produkte werden zu 25 – 35 %



Schema 8: Syntheseroute *via* DPSI am Beispiel von Diethylfumarat

das *trans*-Aziridin **23** in racemischer Mischung sowie zu etwa 50 % das Enamin **26** erhalten. Der erste Schritt der Reaktion kann mechanistisch als eine *Michael*-Addition an Diethylfumarat **24** betrachtet werden. Darauf folgt unter Stabilisierung des gebildeten Enols und unter Abspaltung von Diphenylsulfid direkt der Ringschluss zum Aziridin *rac-trans*-**23** (Schema 8). Aufgrund der geringen Ausbeute im Vergleich zum Nebenprodukt **26** und der notwendigen Racematspaltung ist diese Syntheseroute nicht optimal.

Eine dritte Synthese-Variante für Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivate stellt das *Cromwell*-Verfahren dar (Schema 9). [54–57] Dabei wird von Dibrombernsteinsäurediester, z. B. **27**, ausgegangen. Erhalten wird ein Gemisch der *cis*- und *trans*-konfigurierten Aziridine in annähernd gleicher Zusammensetzung. Als Haupt-

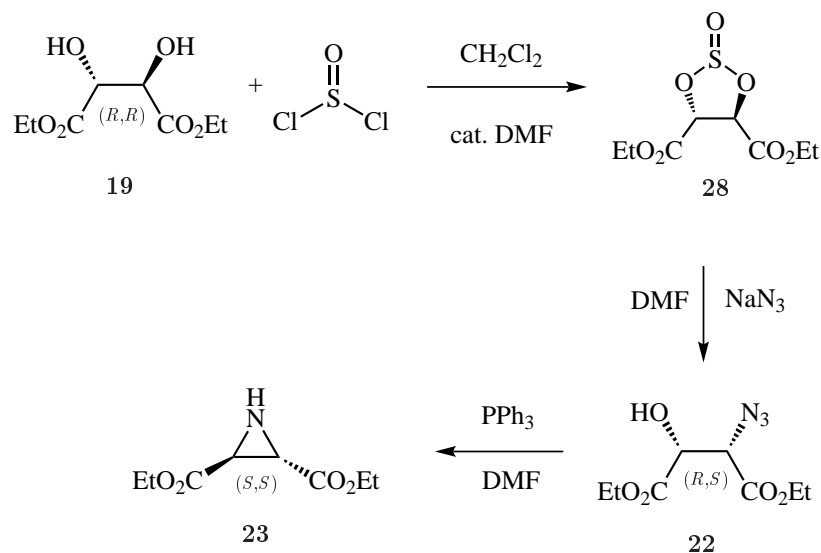


Schema 9: Bei der Cromwell-Synthese wird überwiegend das Enamin gebildet

produkt wird wie auch bei der Reaktion mit DPSI (Schema 8) zu 50 – 60 % das stabilere Enamin **26** erhalten. Amide können als weitere Nebenprodukte auftreten. Auch dieses Verfahren führt zu geringer Ausbeute und weist kaum Produkt-Selektivität auf, sodass in der vorliegenden Arbeit eine andere Syntheseroute beschrieben werden sollte.

Eine im Arbeitskreis Schirmeister optimierte, an die Synthese des enantiomerenreinen Aziridin-2,3-dicarboxylats nach *Legters et al.* [51] (Schema 7) angelehnte Variante, soll im Folgenden beschrieben werden (Schema 10). [58]

Das enantiomerenreine, kommerziell erhältliche L-Diethyltartrat **19** wird mit Thionylchlorid in Dichlormethan

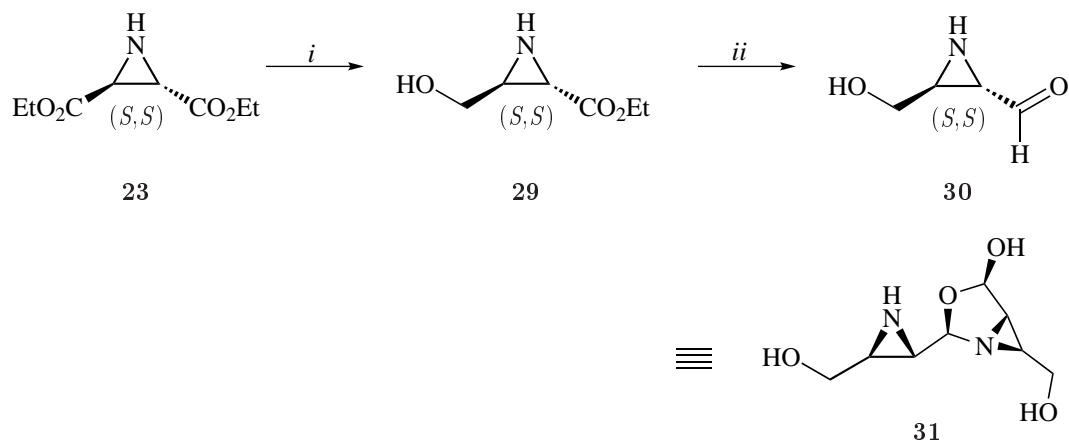


Schema 10: Optimierte Synthese des enantiomerenreinen Aziridin-2,3-dicarboxylats **23** ausgehend von L-Diethyltartrat **19**

in Gegenwart von katalytischen Mengen DMF quantitativ zum Dioxathiolan **28** umgesetzt. Dieser Fünfring lässt sich in DMF durch das nucleophile Azid-Ion unter Abspaltung von SO_2 in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion zum Azidoalkohol **22** öffnen. Dabei findet selektiv an einem der Ringkohlenstoffatome eine Inversion der Konfiguration statt. Dieser Reaktionsschritt erfolgt mit 74%iger Ausbeute. In den analogen Reaktionsschritten *iv* und *v* der Synthese von *Legters et al.* (Schema 7) wird im protischen Medium (EtOH) gearbeitet, um das Epoxid **21** in den Azidoalkohol **22** zu überführen. Aufgrund eines aciden Wasserstoffatoms kann an einem der Ringkohlenstoffe eine Epimerisierung auftreten, was dazu führt, dass Azidoalkohol **22** als Gemisch aus (*R,S*)-**22** und

(*R,R*)-**22** (72%, 8%) anfällt (Schema 7). Im aprotischen Medium DMF verläuft die Reaktion ohne Epimerisierung (Schema 10). Durch die Einführung eines Triphenylphosphinrestes wird die Hydroxyfunktion von **22** in ein gutes Nucleofug verwandelt. Der Ringschluss zum Aziridin-2,3-dicarboxylat **23** (*via Staudinger-Reaktion*) gelingt stereoselektiv unter Konfigurationsumkehr des zweiten Ringkohlenstoffatoms mit einer Ausbeute von 69%. Die Gesamtausbeute dieser neuen, stereoselektiven Synthese, die ausschließlich zum *trans*-Aziridin **23** führt, liegt bei 51% und ist somit die Methode der Wahl.

Hili et al. entwickelten daraus eine Synthese für neue Aziridin-Aldehyde als Bausteine für hochsubstituierte kleine Stickstoff-Heterozyklen (Schema 11). [59]



Schema 11: Synthese von Aziridin-Aldehyden nach *Hili et al.*: *i*) NaBH₄, EtOH, 0 °C (2 h), r.t. (15 h); *ii*) DIBAL, Tol, -78 °C, (5 h)

Mithilfe von 0.9 eq. NaBH₄ kann in EtOH selektiv ein Ester des

Aziridin-2,3-dicarboxylats **23** zur Hydroxygruppe reduziert werden (**29**). Die zweite Esterfunktion wird im nächsten Schritt einer milden Reduktion mittels DIBAL zum Aziridin-Aldehyd **30** unterworfen. Dieser dimerisiert (**31**) und ist so an Luft stabil.

2.3 Enzymkinetik

Es gibt zwei grundlegend verschiedene Mechanismen, die zur Hemmung von Proteasen führen: den reversiblen und den irreversiblen Typ. Im ersten Fall bindet der Inhibitor kovalent-reversibel oder nicht-kovalent an das Enzym. Peptidische Inhibitoren ohne funktionelle Gruppen lassen keine kovalente Bindung an das Enzym zu. Das Enzym wird zeitweise gehemmt, der Inhibitor kann jedoch wieder abdissoziieren und so aktives Enzym erneut freisetzen. Im irreversiblen Fall kommt es zu einer Inaktivierung des Enzyms. (Per Definition ist Inaktivierung gleichbedeutend mit irreversibler Hemmung.) Elektrophile Bausteine gehen zumeist kovalente Bindungen mit dem nucleophilen aktiven Zentrum des Enzyms ein, was zu dessen irreversibler Hemmung führt. Es gibt jedoch Ausnahmefälle, in denen die räumliche Anordnung von Enzym und Inhibitor so ungünstig ist, dass es nicht zur Ausbildung einer kovalenten Bindung kommen kann. Auch ist es möglich, dass nicht-kovalente oder kovalent-reversible Inhibitoren

sehr niedrige Dissoziationskonstanten K_i aufweisen und daher eine scheinbar irreversible Hemmung zeigen. Man spricht in diesem Fall von sogenannten *tight-binding* Inhibitoren. Genauere Kenntnis des tatsächlich vorliegenden Hemmmechanismus kann durch Dialyse oder Gelfiltration gewonnen werden. [60] Dabei beobachtet man nur im Fall der reversiblen Hemmung einen erneuten Anstieg der Enzymaktivität nach Dialyse oder Gelfiltration. Mithilfe von Verdünnungsassays (s. Kapitel 2.3.1) lässt sich ebenfalls auf den Hemmmechanismus schließen. [61] Durch Verdünnung wird auch die Aktivität des Enzyms um diesen Faktor reduziert. Ist die Hemmung irreversibel, nimmt die beobachtete Enzymaktivität gemäß dem Verdünnungsfaktor ab. Bei der reversiblen Hemmung kommt es zur Dissoziation von Enzym und Inhibitor, die Konzentration an freiem Enzym $[E]$ nimmt zu und eine weniger starke Reduktion der Enzymaktivität als nach Verdünnung erwartet, ist die Folge. Einen Hinweis auf den Hemmmechanismus liefert auch die Zeitabhängigkeit der Hemmung. Nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen freiem Enzym, Inhibitor und nicht-aktivem Enzym-Inhibitor-Komplex wird sich die Enzymaktivität im Falle einer reversiblen Hemmung auf einen bestimmten Wert einpendeln (Abbildung 7).

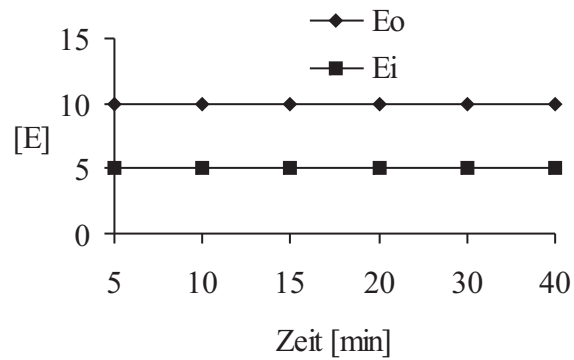


Abbildung 7: Enzymaktivität-Zeit-Diagramm im Fall reversibler Hemmung; $[E]$ = Enzymaktivität, E_0 ohne Inhibitor, E_i mit Inhibitor

Den irreversiblen Fall erkennt man an einem zeitabhängigen Abfall der Enzymaktivität, der unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung exponentiell verläuft. [60] Man bezeichnet dies daher als zeitabhängige Hemmung (Abbildung 8).

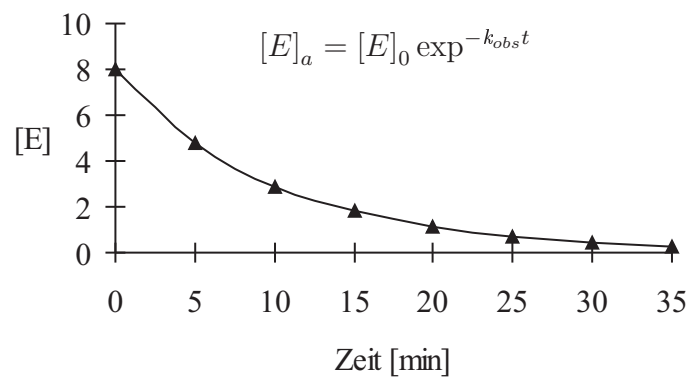


Abbildung 8: Enzymaktivität-Zeit-Diagramm im Fall irreversibler Hemmung

Von Epoxysuccinylpeptiden weiß man, dass die Hemmung der Proteasen irreversibel verläuft. Der Cys-Rest im aktiven Zentrum wird unter Ringöffnung des Epoxids irreversibel alkyliert. Da die hier beschriebenen Vinylsulfone und Aziridin-2,3-dicarboxylate sich an den bekannten Epoxysuccinylpeptiden orientieren, wird für die beiden hier diskutierten Substanzklassen eine irreversible Hemmung erwartet.

Abbildung 9 beschreibt die möglichen Reaktionen zwischen Enzym, Inhibitor und Substrat, wie sie für einen enzymatischen Assay typisch sind. [62] Enzym E und Inhibitor I stehen im Gleich-

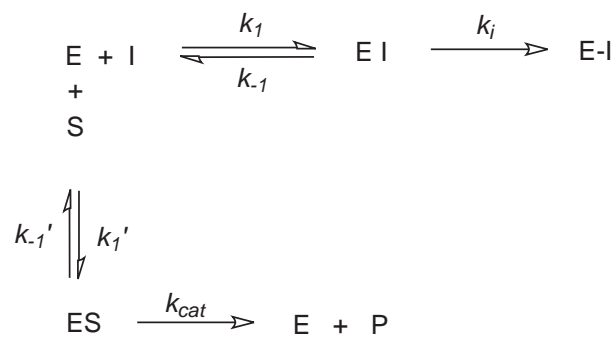


Abbildung 9: Reaktionen zwischen Enzym E, Substrat S und Inhibitor I

gewicht mit dem nicht-kovalenten Assoziationskomplex EI. Dieser reagiert in einer irreversiblen Reaktion zu einer inaktiven Enzym-Form E-I, in der der Inhibitor kovalent an das Enzym gebunden ist. Mit dem Inhibitor konkurriert das Substrat S um die Bindungsstelle des Enzyms. Dabei ist die Michaelis-Menten-Konstante K_M als Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym

eine wichtige Größe. Es bildet sich reversibel ein Enzym-Substrat-Komplex ES, welcher irreversibel unter Freisetzung des Enzyms zum Produkt P reagiert. Die Wechselzahl k_{cat} gibt die Anzahl der Umsetzungen $ES \rightarrow P$ an, die jedes aktive Zentrum pro Zeiteinheit katalysiert. Die für die irreversible Hemmung relevanten Größen sind die sogenannten Hemmkonstanten:

- k_i [min^{-1}] ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Bildung des inaktiven Enzyms E-I aus dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex EI.
- Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes wird mit K_i [M] beschrieben.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (23)$$

- k_{2nd} [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$] ist die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung und ist definiert als der Quotient aus k_i und K_i .

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} \quad (24)$$

Die Hemmkonstanten lassen sich mithilfe fluorimetrischer Assays durch Messung der Enzymaktivität in An- und Abwesenheit des Inhibitors bestimmen. Dabei sind 4-

Methylcoumarylamide geeignete Substrate zur Detektion der Zunahme der Produktkonzentration $[P]$. Zur Bestimmung der Hemmkonstanten haben sich für irreversible Inhibitoren die Methode des Verdünnungsassays nach Kitz und Wilson [61] und die des kontinuierlichen Assays nach Tian und Tsou [63] durchgesetzt.

2.3.1 Verdünnungsassay

Bei der Verdünnungsmethode wird eine konstante Enzymkonzentration mit einem Überschuss an Inhibitor inkubiert, um Bedingungen pseudo-erster Ordnung zu gewährleisten. [61] Nach bestimmten Zeitabständen t_i (5-7 Male innerhalb einer Stunde) wird ein Aliquot entnommen und die Restenzymaktivität zum Zeitpunkt t_i durch Substratzugabe bestimmt. Dabei ist darauf zu achten, dass durch Substratzugabe die Enzym-Inhibitor-Lösung mindestens um den Faktor 10 verdünnt wird, um eine Hemmung durch nicht-kovalente Assoziation des freien Inhibitors I an das Enzym E ausschließen zu können. Unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($[I] \gg [E]$) folgt die beobachtete Abnahme der Enzymaktivität einer Kinetik pseudo-erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} [min^{-1}] (Abbildung 10). [63]

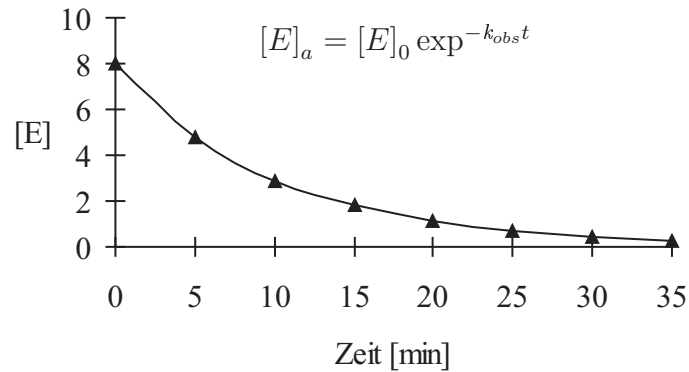


Abbildung 10: Enzymaktivität-Zeit-Diagramm im Fall der irreversibler Hemmung

Die Gesamtkonzentration an eingesetztem Enzym $[E]_0$ setzt sich aus der Summe von freiem Enzym $[E]$, nicht-kovalent gebundenem Enzym im Enzym-Inhibitor-Komplex $[EI]$ sowie inaktiviertem Enzym $[E - I]$ zusammen (Gl. 25). [60]

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E - I] \quad (25)$$

Da die Bildung des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes EI ein reversibler Prozess ist, ergibt sich die Konzentration des potentiell aktiven Enzyms $[E]_a$ aus Gleichung 26.

$$[E]_a = [E] + [EI] \quad (26)$$

Da die Konzentration des Inhibitors deutlich größer ist als die

Ausgangskonzentration des Enzyms ($[I] \gg [E]_0$), ist die Bildung des inaktivierten Enzyms $[E - I]$ proportional zur Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes $[EI]$ (Gl. 27).

$$\frac{d[E - I]}{dt} = k_i [EI] \quad (27)$$

Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ konstant bleibt, entspricht die Bildung des inaktivierten Enzyms $[E - I]$ der Abnahme an aktivem Enzym $[E]_a$ (Gl. 28).

$$\frac{d[E - I]}{dt} = -\frac{d[E]_a}{dt} = k_i [EI] \quad (28)$$

Mit den Gleichungen 26 und 29

$$[E]_a = [E] + [EI] \quad (26)$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \Leftrightarrow [E] = \frac{K_i [EI]}{[I]} \quad (29)$$

ergeben sich nach Umformung Gleichungen 30 und 31.

$$[EI] = \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (30)$$

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (31)$$

Integration von Gleichung 31 über die Zeit liefert Gleichung 32.

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_i t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (32)$$

Unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung (Gl. 33)

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -k_{obs} t \quad (33)$$

wird aus Gleichung 32 eine hyperbolische Funktion, die durch Gleichung 34

$$-k_{obs} t = -\frac{k_i t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (34)$$

oder durch Gleichung 35 beschrieben wird.

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i + [I]} \quad (35)$$

Hohe Dissoziationskonstanten K_i , schlechte Löslichkeit des Inhibitors oder schnelle Reaktionen können dazu führen, dass die Sättigungsbedingung $[I] \gg K_i$ nicht erfüllt ist. In diesen Fällen kann nur mit relativ niedrigen Inhibitorkonzentrationen unterhalb des Wertes der Dissoziationskonstanten ($[I] \ll K_i$) gearbeitet werden. Gleichung 35 vereinfacht sich dadurch zu Gleichung 36.

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{k_{obs}}{[I]} = \frac{k_i}{K_i} \quad (36)$$

Hieraus ergibt sich Gleichung 37 für die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung aus Gleichung 24:

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} \quad (24)$$

$$k_{2nd} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad (37)$$

Die Hemmkonstanten k_i und K_i sind somit nicht mehr einzeln bestimmbar.

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad (38)$$

Befindet sich zusätzlich ein um die Bindungsstelle konkurrierender Ligand in Form eines Substrates mit konstanter Konzentration $[S]$ im Reaktionsmedium, müssen - kompetitive Hemmung vorausgesetzt - alle Gleichungen um den Term $1 + \frac{[S]}{K_M}$ korrigiert werden. [64] Statt K_i wird in die apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} berechnet (Gl. 39).

$$K_{iapp} = K_i \frac{1 + [S]}{K_M} \quad (39)$$

Nach Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_M kann K_i aus Gleichung 39 durch Division durch den Term $\frac{1+[S]}{K_m}$ bestimmt werden.

2.3.2 Kontinuierlicher Assay

Die kontinuierliche Assay-Methode nach Tian und Tsou verfolgt eine andere Strategie, um die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung k_{obs} zu ermitteln. [63] Bei dieser Methode wird das Enzym mit einer Lösung aus Substrat und Inhibitor versetzt und die Produktzunahme in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dazu müssen Steady-state-Bedingungen und Bedingungen pseudoerster Ordnung erfüllt sein, d.h. Inhibitor und Substrat müssen im Überschuss vorliegen. Handelt es sich um einen irreversiblen Inhibitor wird die Produktzunahme exponentiell abnehmen und sich einem Grenzwert P_{∞} nähern (Gl. 40, Abbildung 11). [63]

$$[P]_t = [P]_{\infty} (1 - \exp^{-k_{obs}t}) \quad (40)$$

Die Messzeit beträgt in der Regel zwischen fünf und 60 Minuten und die Umsatz-Zeit-Kurve ohne Inhibitor muss über den gesamten Messzeitraum linear verlaufen. Nur dann sind Steady-state Bedingungen erfüllt. Eine Abweichung von 10% wird toleriert.

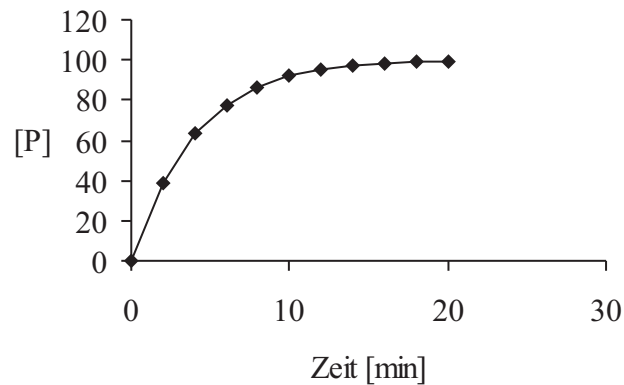


Abbildung 11: In Anwesenheit von Inhibitoren nähert sich die Produktkonzentration einem Grenzwert.

2.3.3 Vergleich der Enzym-Assays

In beiden Fällen werden zuerst unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($[I] \gg [E]$) die Hemmkonstanten pseudo-erster Ordnung k_{obs} für verschiedene Inhibitor-Konzentrationen bestimmt. Aus den k_{obs} -Werten werden dann die Hemmkonstanten k_i und K_i ermittelt. Die Methoden unterscheiden sich in der Bestimmung von k_{obs} . Ein kontinuierlicher Assay ist schneller durchzuführen als ein Verdünnungsassay. Bei langsamen Reaktionen können Steady-state-Bedingungen nicht immer erfüllt werden und die beobachtete Abnahme der Enzymaktivität ist dann auf die Abnahme der Substratkonzentration zurückzuführen und nicht auf die Hemmung des Enzyms. In diesen Fällen bietet sich der zeitauf-

wändigere Verdünnungsassay an. Damit kann zu einer bestimmten Zeit t die Enzymaktivität immer unter Steady-state Bedingungen gemessen werden. Durch eine einzige Messung ist es mit der kontinuierlichen Methode möglich mittels Gleichung 37

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad (37)$$

die inhibierende Potenz einer Substanz abzuschätzen.

Da die durchgeführten Experimente mit dem Enzymkinetik-Programm Grafit [65] durch nicht-lineare Regressionsanalyse (auf der Marquart-Methode beruhend [66]) ausgewertet werden, wird auf die Diskussion von Linearisierungsverfahren (z. B. nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee) verzichtet.

3 Zielsetzung und Syntheseplanung

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Kooperation zwischen den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Tanja Schirmeister und Prof. Dr. Bernd Engels kombinierte theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Reaktivität von Aziridinen mit unterschiedlichen Substituenten am Stickstoffatom durchgeführt. Es wurden mit geeigneten theoretischen und experimentellen Modellen das Reaktionsverhalten und die Kinetik der Reaktionen mit Thiolaten untersucht sowie die potentielle Eignung dieser Aziridine als Cystein-Protease-Inhibitoren mithilfe von enzymatischen Assays abgeschätzt. Die theoretischen und experimentellen Ergebnisse ergaben zusammen mit den erhaltenen Hemmdaten eine schlüssige Erklärungen für die Reaktivität unterschiedlich substituierter Aziridine sowie deren Eignung als Cystein-Protease-Inhibitoren. [67, 68]

Die Übertragung dieser umfassenden Untersuchung auf die Substanzklasse der Vinylsulfone ist ein langfristiges Projekt. In dieser Arbeit sollten erste theoretische und experimentelle Modelle erprobt werden, um zu sondieren, welche Methoden zielführend sein könnten.

Dazu sollte im ersten Teil der Arbeit mithilfe eines einfachen quantenmechanischen Modells der Einfluss des Substitutionsmusters an verschiedenen Michael-Akzeptoren, vor allem aber an Vinylsulfonen, auf die Kinetik der 1,2- und der 1,4-Addition von Thiolen und Thiolaten untersucht werden. Das Thiol im aktiven Zentrum der Cystein-Proteasen sollte dabei durch Methylthiolat imitiert werden. Ammonium sollte den Protonendonator Histidin simulieren.

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet die Synthese kleiner Vinylsulfonbausteine, die den theoretisch untersuchten Verbindungen ähneln. Die Bausteine sollten weiterhin an diverse Peptide gekuppelt werden, um potentielle Cystein-Protease-Inhibitoren zu erhalten. Die gewünschten Peptide sollten ebenfalls hergestellt werden. Darüber hinaus sollte das Aziridin-Projekt weiter ausgebaut werden. Die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Andrei Yudin, University of Toronto, ermöglicht den Zugang zu zwei neuen Aziridin-Derivaten. Diese sollten in dieser Arbeit synthetisiert werden und durch Kupplung an Peptide neue Cystein-Protease-Inhibitoren liefern. Die zu verknüpfenden Peptide sollten ebenfalls hergestellt werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollten die synthetisierten Verbindungen hinsichtlich der Kinetik ihrer Reaktionen mit Thiolen

und Thiolaten untersucht werden. Die erforderlichen physikalisch-chemischen Modelle sowie deren Realisierungen sollten erarbeitet werden, um die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zu ermitteln und zu vergleichen. Enzym-Assays sollten dann belegen, wie gut die in dieser Arbeit entwickelten theoretischen und experimentellen Methoden in der Lage sind, die Potenz der neuen Inhibitoren vorherzusagen.

4 Durchführung und Ergebnisse

4.1 Diskussion der theoretischen Untersuchungen von Michael-Akzeptoren

4.1.1 Reaktionsmechanismus: 1,4- versus 1,2-Addition

Die irreversible Inhibierung von Cystein-Proteasen erfolgt durch Addition des nucleophilen Cystein-Schwefels im aktiven Zentrum der Protease an einen elektrophilen Baustein, welcher die Aminosäure irreversibel alkyliert. Für die Additionsreaktion des Cystein-Thiolats an Michael-Akzeptor-basierte Inhibitoren sind zwei Reaktionsmechanismen möglich. Nach Addition des Thiolats an das β -C-Atom (C_2 in Abb. 12) der ungesättigten Verbindung bildet sich ein resonanzstabilisiertes Carbanion als mehr oder weniger stabile Zwischenstufe. Für α, β -ungesättigte Carbonylverbindungen, die eine C-C-Doppelbindung zwischen C_1 und C_2 aufweisen, ist die Stabilisierung durch die benachbarte Carbonylgruppe mit starkem -M-Effekt sehr gut. Aufgrund der nach *Pearson* präferierten hart-hart-Wechselwirkungen zwischen Sauerstoff-Anion und Proton erfolgt bei Mechanismus-Variante eins (1,4-Addition) die Protonierung am Sauerstoff (s. Abb. 12), und es kommt zur Bildung eines Enols, welches durch nachfolgende De-/Reprotonierung zur thermodynamisch stabileren Ketoform tautomerisiert.

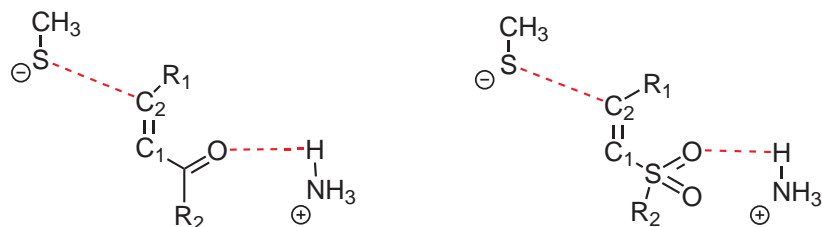


Abbildung 12: 1,4-Addition von Methylthiolat an einen Carbonyl-Michael-Akzeptor (links) und Sulfon-Michael-Akzeptor (rechts) in Gegenwart eines Ammoniummoleküls

Ein ebenfalls denkbarer Reaktionsmechanismus ist die direkte Protonierung des Carbanions (klassische 1,2-Addition an eine elektronenarme Doppelbindung), welche sofort zur energetisch günstigeren Ketoform führt (Abb 13).

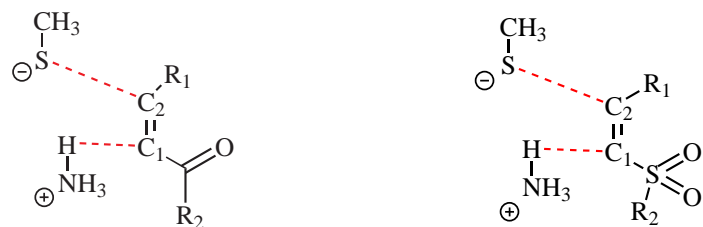


Abbildung 13: 1,2-Addition von Methylthiolat an einen Michael-Akzeptor in Gegenwart eines Ammoniummoleküls

4.1.2 Reaktion zur Enolform (1,4-Addition)

Bei der klassischen Michael-Addition nach dem 1,4-Additionsmechanismus addiert das Nucleophil an das β -Kohlenstoffatom der Verbindung, anschließend wird der Sauerstoff der Carbonyl- oder Sulfonylgruppe protoniert. Zur Untersuchung dieses Reaktionsweges wurde für die Moleküle **33** bis **42** (Abb. 14)

jeweils der Reaktionspfad einer nucleophilen Additionsreaktion mit Methylthiolat (**32**) berechnet. Die Atomabstände jeweils zwi-

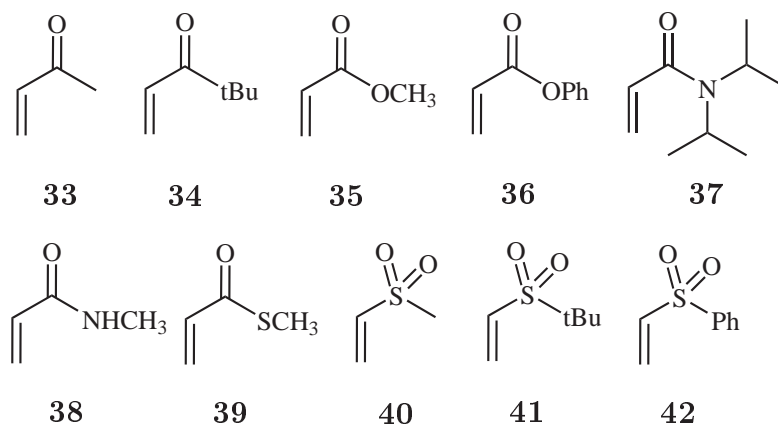


Abbildung 14: untersuchte Michael-Akzeptor-Systeme

schen dem Schwefelatom des Methylthiolats, das als Nucleophil fungiert, und dem β -Kohlenstoffatom der C-C-Doppelbindung, dem Elektrophil, wurden in Schritten von 0.1 Å von 3.0 Å bis auf 1.8 Å verringert. Als Protonendonatoren befanden sich im Fall a) zwei Wassermoleküle und im Fall b) zwei Ammoniumionen in unmittelbarer Umgebung des Carbonyl- bzw. Sulfonylsauerstoffatoms. Die Ammoniumionen sollten im Vergleich zur pH-neutralen wässrigen Umgebung das eher saure Medium des Enzyms widerspiegeln. Für eine realistischere Untersuchung der Systeme wurde zusätzlich zu den explizit verwendeten Protonendonormolekülen weiteren Lösungsmittelleffekten durch die Verwendung von COSMO Rechnung getragen. Tabelle 1 zeigt die

Ergebnisse der Angriffsreaktionen im Überblick. ΔE bezieht sich einerseits auf die Aktivierungsenergie der Additionsreaktion (hin) des Thiolats an den Michael-Akzeptor und andererseits (rück) auf die Aktivierungsenergie der Rückreaktion, also der Spaltung der zuvor gebildeten S-C-Bindung. Letztere Energiebarriere korreliert mit der benötigten Energie für einen Bindungsbruch zwischen Inhibitor und Enzym und sollte ausreichend groß sein, um eine irreversible Enzymhemmung zu erzielen.

Tabelle 1: Energien der Reaktion von Methylthiolat mit den Verbindungen **33** bis **42** im neutralen und sauren Milieu

Verb.	H_2O			NH_4^+			
	OH-Brücke in Å	ΔE in kcal mol ⁻¹		OH-Brücke in Å	Protonierung ab SC-Abstand in Å	ΔE in kcal mol ⁻¹	
		hin	rück			hin	rück
33	1.73	3	5		≤ 2.9	15	18
34	1.69	-	6	1.76	≤ 2.6	14	20
35	1.70 -1.93	12	-12	1.48-1.61 1.71 $\geq 2.7^a$		6	5
36	1.71 -1.80	-	4	1.74 ^b		6	10
37	1.62 -1.76	16	-16	1.74 ^a	≤ 2.3	12	12
38	1.64 -1.78	10	-13	1.62 $\geq 2.7^a$	≤ 2.3	-	11
39	1.70	-	6	1.5		-	4
40	1.79-1.89	7	-7	1.66-1.69 1.94 $\geq 2,5^a$		11	-11
41	1.79-1.83 ^c	7	-7	1.66-1.69		10	2
42	1.86-1.89	5	3,5	1.71-1.96		9	-9

^a H-Brücken zu beiden Ammoniumionen vom selben O-Atom aus

^b ≥ 2.5 besteht zusätzliche H-Brücke zu PhO-Sauerstoff von 2.53Å

^c ≥ 1.9 besteht zusätzliche H-Brücke zu 2. Sauerstoff von 1.92Å

Die Verbindungen **33** bis **39** sind Michaelssysteme mit einer Carbonylgruppe während Verbindungen **40** bis **42** zu den Vinylsulfonen zählen. Deutlich zeigt sich im sauren Milieu (NH_4^+) anhand des Grads der Protonierung des Additionsprodukts eine unterschiedliche Basizität (s. Tabelle 1, Spalte 6). Während einige der Carbonylverbindungen ab einem bestimmten S-C-Abstand durch ein sich in der Nähe befindliches Ammoniumion protoniert werden (Verbindungen **33**, **34**, **37** und **38**), wird trotz gleichem Substitutionsmuster (vgl. **40** mit **33** und **41** mit **34**) für keine der Vinylsulfonverbindungen ein protoniertes Produkt erhalten.

Für die Ketone **33** und **34** ist der kritische S-C-Abstand, ab dem eine Protonierung stattfindet, relativ groß (2.9 Å) gegenüber 2.3 Å für die Annäherung des Thiolats an die Amide **37** und **38**. Für die Reaktionen in wässriger Umgebung ist für keines der Moleküle eine Protonierung zu beobachten. Offenbar ist für eine Protonierung eine stärkere Säure als Wasser nötig. Vergleicht man die Energiebarrieren der Hin- und der Rückreaktionen im neutralen und im sauren Milieu, zeigen sich Unterschiede in der Reaktivität. Im Neutralen ergeben sich für die Hin- und die Rückreaktion nur sehr geringe oder gar keine Energiebarrieren. Für fast alle Verbindungen (Vgl z.B. **35** und **37**) wird allerdings die Rückreaktion, also die Eliminierung des Thiols, etwas begünstigt. Im Sauren sind

die Barrieren für die Hin- und die Rückreaktion ebenfalls niedrig. Es fällt jedoch auf, dass die Energien jeweils für Hin- und die Rückreaktionen für die Carbonylverbindungen fast identisch sind. Eine - wenn auch nur leichte - Begünstigung der Rückreaktion ist nur für die Vinylsulfone zu beobachten. Die Vinylsulfone werden in beiden Medien nicht protoniert. Dennoch lassen sich zwischen den Sauerstoffatomen und den Ammoniumionen stärkere, kürzere Wasserstoffbrückenbindungen als im wässrigen Milieu beobachten. Aus früheren Studien an Epoxiden und Aziridinen sind pH-Abhängigkeiten der Inhibierungsreaktion bekannt. [43, 68] Im Allgemeinen wurde bei niedrigerem pH-Wert, wie er auch der natürlichen Umgebung im Enzym entspricht, für Aziridine eine schnellere Inhibition beobachtet als bei neutralem pH-Wert. Für die hier untersuchten Substanzklassen kann keine ähnliche pH-Abhängigkeit der Reaktion festgestellt werden. Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch den Verlauf des Reaktionspfads bei Annäherung des Thiolatmoleküls an den β -Kohlenstoff des Carbonyl-Michael-Akzeptors. Für die weiteren Carbonylverbindungen zeichnet die Auftragung der Energiewerte ein ähnliches Bild.

Der Graph der Energiewerte von Verbindung **33** (Abb. 15) zeigt keine gleichmäßige Kurve sondern weist einen Sprung in der Energie auf. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Ab-

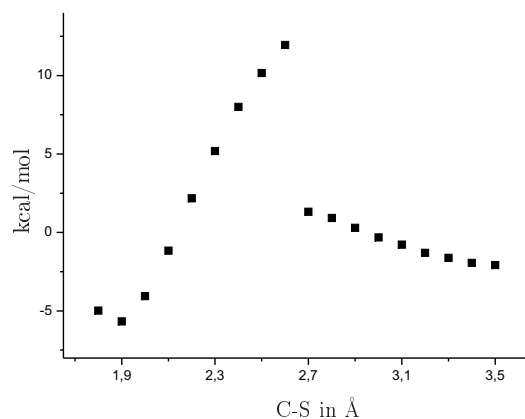


Abbildung 15: Reaktionspfad der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **33**

lauf der Reaktion nicht dem berechneten Annäherungspfad folgt. Die Berechnung eines ausreichend großen Ausschnitts der Potentialfläche ist für eine genauere Betrachtung der Reaktionen der Carbonylverbindungen notwendig.

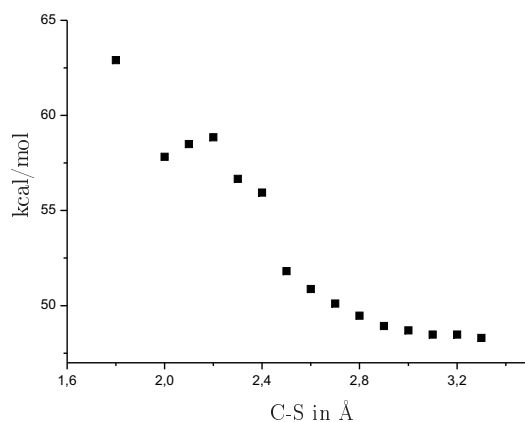


Abbildung 16: Reaktionspfad der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **41**

Der Graph in Abb. 16 zeigt den Energieverlauf der Additionsreaktion von Methylthiolat an das Vinylsulfon **41**. Er verläuft deutlich glatter als für die oben gezeigte Carbonylverbin-

dung. Für den Abstand von 1.9 Å weist er ein lokales Minimum auf. Dies könnte auf einen zweiten, parallelverlaufenden Reaktionskanal hindeuten. Da dieser Abstand allerdings einer kovalenten Schwefel-Kohlenstoff-Einfachbindung entspricht, ist auch eine stabilisierte, anionische Zwischenstufe denkbar, die eventuell erst in einem zweiten Schritt protoniert wird, da, wie in Tabelle 1 dargestellt, bei diesem S-C-Abstand keine Protonierung am Sauerstoff stattfindet. Die Graphen der übrigen Vinylsulfone zeigen denselben Verlauf.

4.1.3 Reaktion zur Ketoform (1,2-Addition)

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, werden in wässrigem Milieu die diskutierten Carbonylverbindungen gar nicht und in saurerem Medium nur einige dieser Verbindungen am Sauerstoff protoniert, obwohl sich das Thiolatmolekül bereits in einem Abstand zum β -Kohlenstoffatom befindet, der einer S-C-Einfachbindung entspricht. Vinylsulfone erfahren weder im wässrig-neutralen noch im sauren Milieu eine Protonierung. Da die Berechnung der Reaktionspfade keine eindeutigen Ergebnissen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus lieferte, wurden für die 1,2-Addition von Methylthiolat an die Verbindungen **33** bis **42** (Abb. 14, Kap. 4.1.2) jeweils Potentialflächen (PES) als Funktion des S-C₂- und C₁-H-

Abstands berechnet. Dabei wurde von der Struktur des Produkts ausgegangen, d.h. die Bindungslängen der Startgeometrie betragen 1.9 \AA für S-C₂ und 1.1 \AA für C₁-H. Zur Ermittlung der Flächenpunkte wurden dann die Bindungslängen für S-C₂ zwischen $1.8 - 3.5 \text{ \AA}$ bzw. $1.8 - 3.2 \text{ \AA}$ und für C₁-H zwischen $1.0 - 2.7 \text{ \AA}$ variiert. Als Protonendonatoren fungierten zwei Ammoniumionen, von denen eines in der Nähe des Thiolats und eines in der Nähe des α -Kohlenstoffatoms (C₁ in Abb. 17) positioniert wurden.

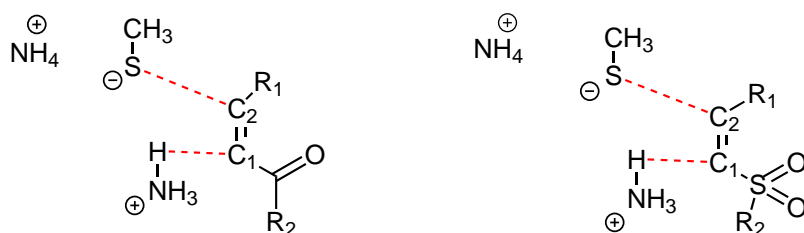


Abbildung 17: 1,2-Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor-Systeme in Gegenwart von zwei Ammoniumionen

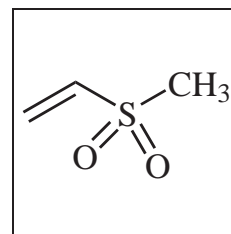
Leider konnte nur für drei der untersuchten Verbindungen eine Potentialfläche berechnet werden, bei der die Systeme an allen berechneten Flächenpunkten stabil waren und für den angenommenen Reaktionsverlauf sinnvolle Strukturen aufwiesen. Durch die uneingeschränkte Beweglichkeit der beiden Ammoniumionen waren die optimierten Strukturen aufgrund von fluktuierenden Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb einer Fläche oft nicht vergleichbar. Bei einigen Molekülen führte eine Wasserstoffbrückenbindung eines Sauerstoffatoms zu einem frei beweglichen Ammo-

niumion zur Zersetzung des Moleküls oder die Rechnungen konvergierten nicht, sodass für die Mehrzahl der Flächenpunkte kein Energiewert erhalten werden konnte und somit die Fläche nicht repräsentativ für den Verlauf der Reaktion war.

Bei den berechneten drei PES verstehen sich alle Energien relativ zur Summe der Energien aller Edukte in unendlicher Entfernung voneinander. Diese Edukt-Gesamtenergie wurde auf 0 kcal/mol gesetzt. Im Folgenden sollen die Potentialflächen für Vinylsulfon **40** und Carbonylverbindung **35** sowie für das hierzu analoge Vinylsulfon **43** diskutiert werden.

Vinylsulfon **40**

Der weiße Pfeil in Abbildung 18 zeigt den Verlauf der Reaktion von Vinylsulfon **40** mit Methylthiolat in Anwesenheit von zwei Ammoniumionen. Der Reaktionspfad verläuft ausgehend von den Edukten nicht direkt diagonal über den berechneten Flächenausschnitt zum Produkt, sondern in einem Bogen, der einen Angriff des Nucleophils am β -Kohlenstoff mit verzögerter Protonierung des α -Kohlenstoffatoms vorraussagt. Obwohl der Übergangszustand am Rand des berechneten Flächenausschnitts liegt, wird er korrekt



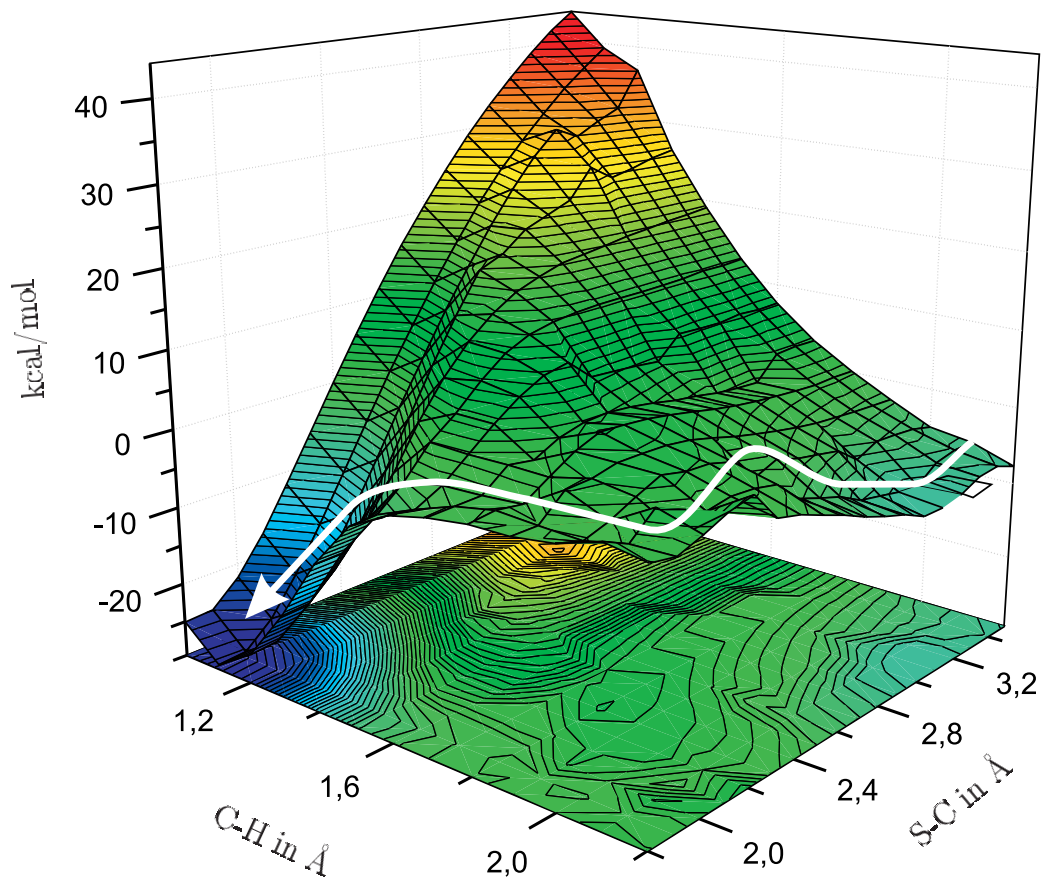


Abbildung 18: PES von Methylthiolat und Vinylsulfon **40** in Anwesenheit von zwei Ammoniumionen

wiedergegeben (Vgl. Abb. 27, Kapitel 4.1.4; dort ist der Angriff von Methylthiolat an Vinylsulfon **40** in Gegenwart von nur einem Ammoniummolekül dargestellt. Der C-H-Abstand wurde bis zu 3.0 Å abgebildet, es zeigt sich derselbe Reaktionsverlauf.)

Die Reaktion verläuft über einen Übergangszustand, in dem die Bindungslängen für die S-C₂-Bindung 2.11 Å und für den C₁-H-Abstand 2.14 Å betragen. Das attackierte Kohlenstoffatom ist nicht mehr planar, sondern schon leicht tetraedrisch, die Wasser-

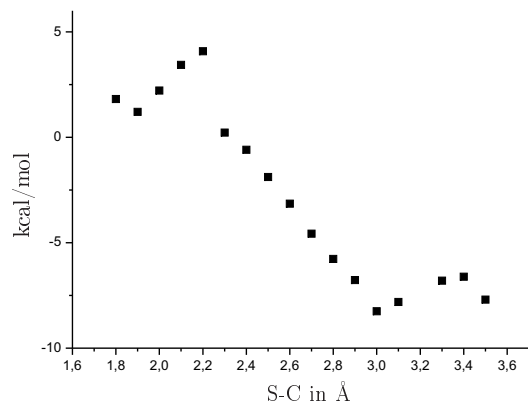


Abbildung 19: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat **32** an Michael-Akzeptor **40** bei konstantem CH-Abstand von 2.2 Å.

stoffatome der endständigen CH₂-Gruppe weisen nur einen Winkel von 110° statt 120° auf. Der TS wird nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Michael-Akzeptor stabilisiert. Das zweite Ammoniummolekül befindet sich 4.2 Å vom Thiolat entfernt. Ein carbanionischer Zwischenzustand ist nicht stabil sondern reagiert direkt zum Additionsprodukt weiter. Die Bindungslängen im Produkt betragen für die S-C₂-Bindung 1.87 Å und für den C₁-H-Abstand 1.1 Å. Es sind keine Wasserstoffbrücken zum zweiten Ammoniummolekül ausgeprägt. Die Aktivierungsenergie für die Hinreaktion beträgt 12.3 kcal/mol. Die Darstellung der Fläche (Abb. 18) und auch die Schnitte durch die Fläche (Abb. 19 und Abb. 20) sind nicht "glatt", sondern weisen Unebenheiten auf. Diese können z.B. entstehen, wenn die berechneten Energien zu leicht unterschiedlichen Strukturen gehören, d.h. wenn nicht nur

die gewollte Strukturänderung (Änderung der Bindungslänge) die Energie verändert hat sondern auch z.B. eine fluktuierende Position des zweiten Ammoniummoleküls (Vgl. Kapitel 4.1.4). Durch das Inbetrachtziehen von nur einem Ammoniummolekül konnten deutlich "glattere" Flächen erhalten werden.) Die zu überwindende Energiebarriere auf der Angriffstrajektorie zwischen 3.6 Å und 3.0 Å (z.B. Abb. 19) ergibt sich aus einer Rotation der Methylgruppe am Thiol. Die für die Rückreaktion benötigte Energie für die Dissoziation des Thiolats vom Produkt zurück zum Vinylsulfon beträgt 33.3 kcal/mol zusätzlich zur artifiziellen Rotationsenergie.

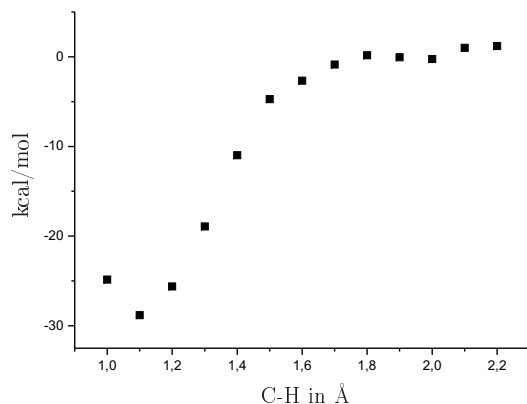


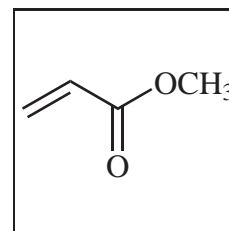
Abbildung 20: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **40** bei konstantem Abstand S-C-Abstand von 1.9 Å.

Diese Energiebarriere ist ausreichend hoch, um von einer bei Raumtemperatur irreversiblen Reaktion zu sprechen. Man würde mit der elektrophilen Kopfgruppe **40** also vermutlich einen

irreversiblen Inhibitor designen können.

Carbonylverbindung 35

Der weiße Pfeil in Abbildung 21 beschreibt den Verlauf der Reaktion von Carbonylverbindung **35** mit Methylthiolat in Anwesenheit von zwei Am-



moniumionen. Im Unterschied zu Verbindung **40** konnte diese PES nur im Bereich von $SC=2.7 \text{ \AA}$ bis $SC=2.2 \text{ \AA}$ berechnet werden. Wie auch bei der vorherigen Verbindung, zeigt die PES ein tiefliegendes Energieminimum bei einem S-C-Abstand von 1.9 \AA und einem C-H-Abstand von 1.1 \AA . Dieses Energieminimum liegt circa 15 kcal/mol tief relativ zu den Edukten.

Der Reaktionspfad führt ausgehend von den Edukten über eine carbanionische Zwischenstufe, deren Protonierung zum Produkt barrierefrei möglich ist. Die Aktivierungsbarriere der Hinreaktion kann aufgrund des zu geringen Flächenausschnitts nicht genau bestimmt werden. Die Aktivierungsenergie der Rückreaktion beträgt mindestens 25 kcal/mol . Auch ein mit dieser elektrophilen Kopfgruppe versehener Inhibitor sollte also bei Raumtemperatur ein Enzym irreversibel hemmen.

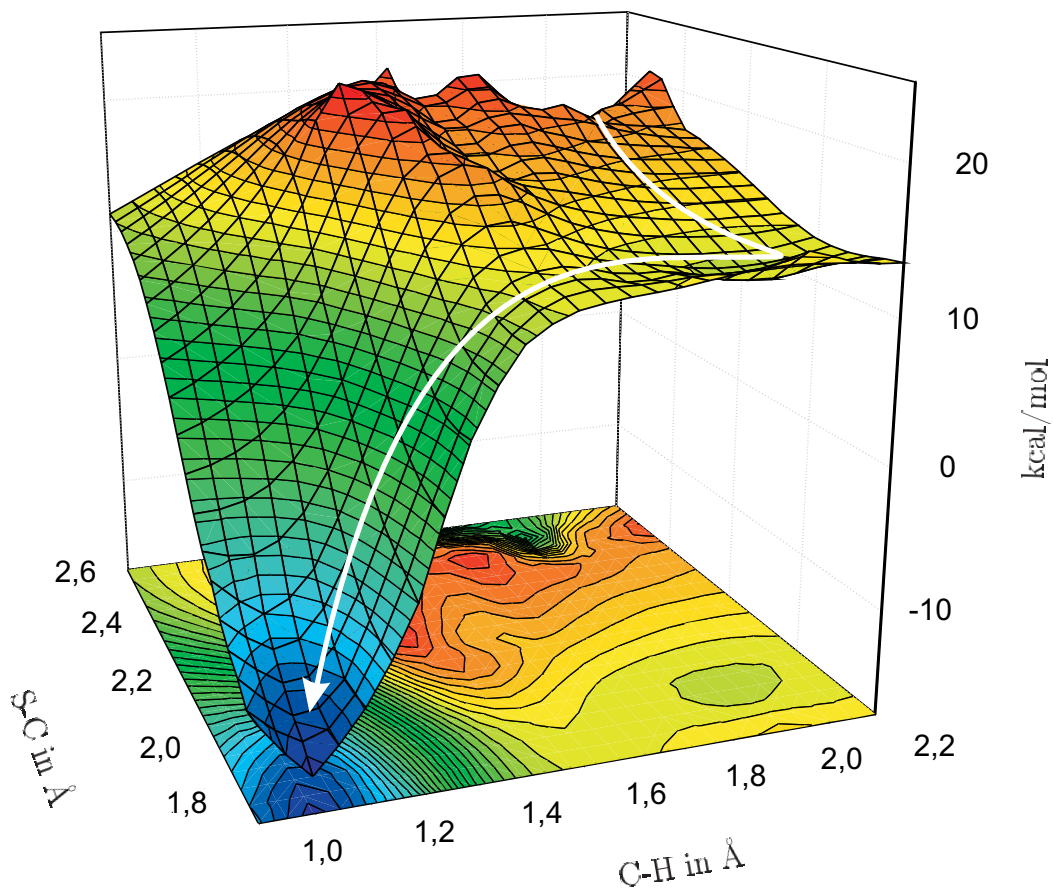


Abbildung 21: PES von Methylthiolat und Carbonylverbindung **35** in Anwesenheit von zwei Ammoniumionen

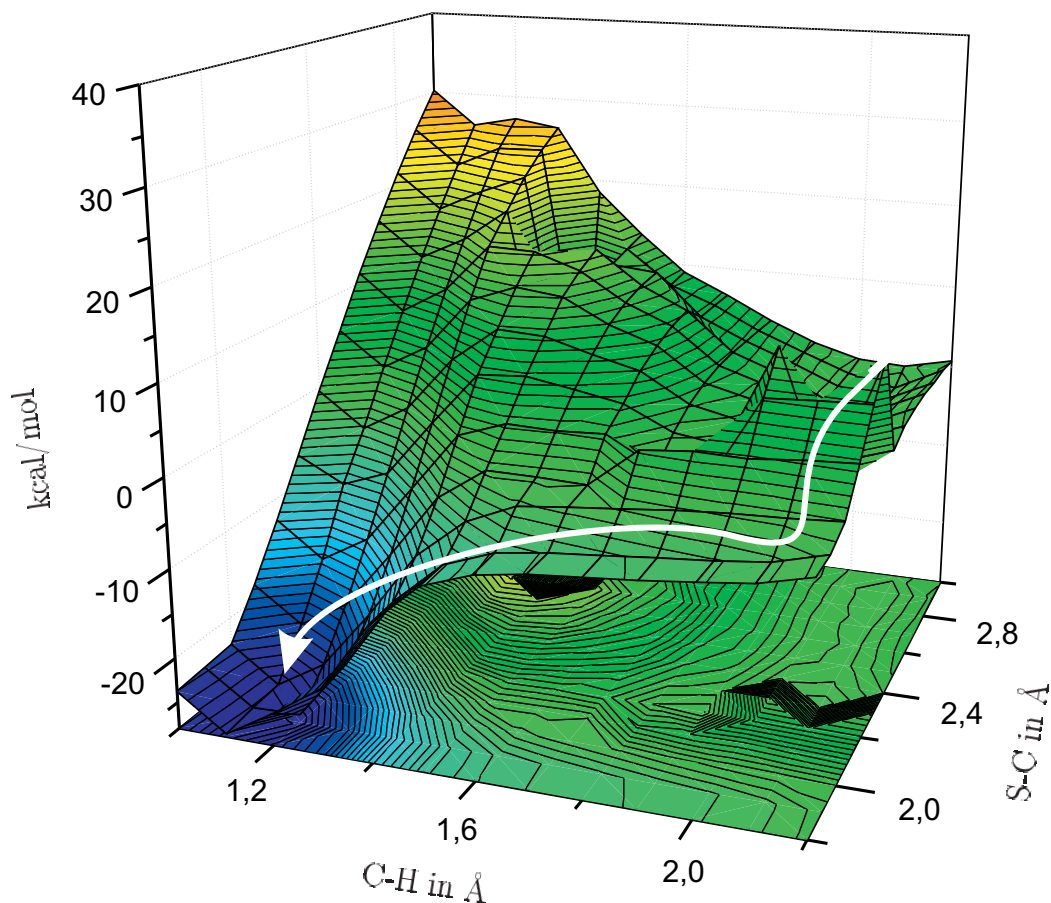
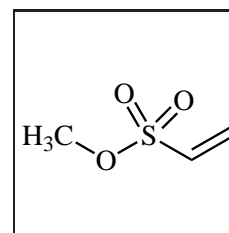


Abbildung 22: PES von Methylthiolat und Vinylsulfon **43** in Anwesenheit von zwei Ammoniumionen

Vinylsulfon **43**

Der weiße Pfeil zeigt den Verlauf der analogen Vinylsulfonverbindung **43** (Grafik 22). Wie auch Vinylsulfon **40** verläuft bei dieser Reaktion der Reaktionspfad über eine carbanionische Zwischenstufe, die barrierefrei zum Additionsprodukt reagiert.



Auch bei dieser Vinylsulfon-Verbindung lässt die Energiebar-

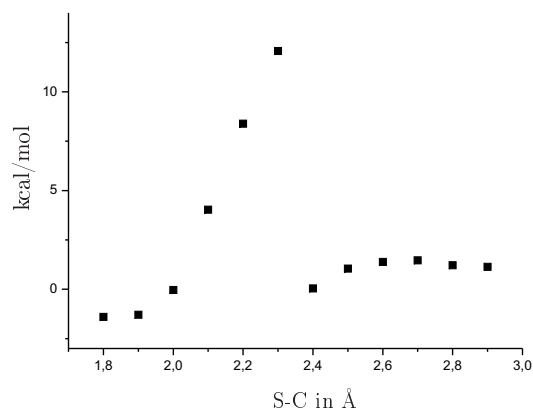


Abbildung 23: S-C-Reaktionspfad der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **43**

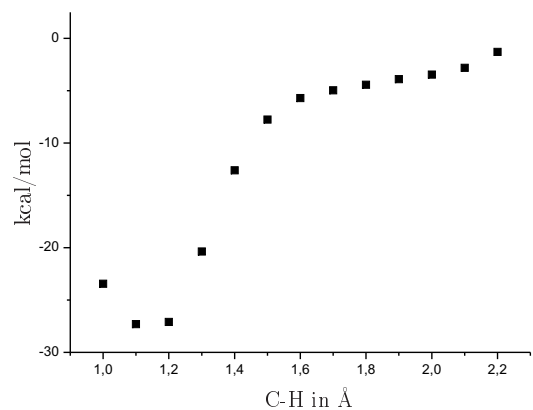


Abbildung 24: C-H-Reaktionspfad der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **43**

riere von über 30 kcal/mol für die Rückreaktion auf eine irreversible Hemmung des Enzyms schließen.

Vergleicht man Vinylsulfon **43** mit Vinylsulfon **40**, sieht man anhand der sich ähnelnden PES, dass derselbe Reaktionsmechanismus vorliegt. Carbonylverbindung **35** weist ein analoges Substitutionsmuster zu Vinylsulfon **43** auf: neben der Vinyleinheit tragen beide Verbindungen dieselbe funktionelle Gruppe, die Me-

thoxyfunktion. Obwohl die berechneten PES-Ausschnitte einige Unterschiede aufweisen (Vgl. Regionen um die Flächenpunkte SC/CH (2.4/1.2) und (1.9/2.0)), ist ein ähnlicher Reaktionsmechanismus möglich. Im Fall der Carbonylverbindung scheint die Bildung eines Carbanions wahrscheinlich, obgleich sich dieses nicht in einem isolierten lokalen Energieminimum befindet, sondern durch barrierefreie Protonierung sofort das stabilere Additionsprodukt erhalten wird, welches dem benachbarten tieferliegenden Energieminimum entspricht. Derselbe Reaktionsverlauf wird von der PES für das methoxy-substituierte Vinylsulfon vorausgesagt.

Für beide Verbindungen wurde mit der Roby-Davidson-Methode, die in Turbomole implementiert ist, eine Partialladungsanalyse durchgeführt, welche die unterschiedliche Partialladungsverteilung in den Edukten und den potentiell entstehenden Carbanionen widerspiegelt (Abb. 25).

Bei der Carbonylverbindung steigt durch den Angriff des Methylthiolats die negative Partialladung am α -Kohlenstoffatom (= Carbanion) von -0.11 auf -0.39 etwa auf das Vierfache an. Zusätzlich erhöht sich die negative Partialladung am Carbonylsauerstoffatom nach dem Angriff des Methylthiolats etwa um die Hälfte. Die Partialladung am Carbonylkohlenstoff, welches zwischen Sau-

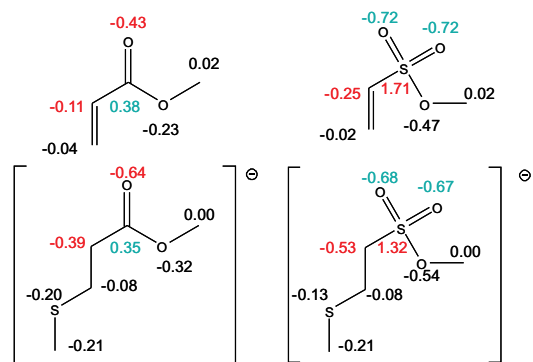


Abbildung 25: Ladungsverteilung jeweils für den neutralen und den anionischen Zustand der Verbindungen **35** (li) und **43** (re)

erststoffatom und Carbanion liegt, bleibt hingegen unverändert. Die Partialladungsverteilung lässt in diesem Fall auf gute Mesomeriestabilisierung schließen, die ein relativ stabiles Anion zur Folge hat. Eine Protonierung könnte sowohl am Sauerstoff als auch am α -Kohlenstoffatom erfolgen. Wie die Rechnungen in Kapitel 4.1.2 ergeben haben, findet jedoch im Fall der methoxy-substituierten-Carbonylverbindung **35** keine Protonierung am Sauerstoff statt.

Anders verhält es sich beim Vinylsulfon. Während sich nach dem Angriff des Methylthiolats die negative Ladung am α -Kohlenstoffatom etwa verdoppelt, bleiben die Partialladungen an allen Sauerstoffatomen der benachbarten Sulfongruppe unverändert. Der Schwefel hingegen verringert seine positive Partialladung. Dies lässt sich durch eine lediglich induktive Stabilisierung der anionischen Zwischenstufe erklären, die im Vergleich zu mesomeren Effekten weniger stark stabilisierend

ist. Da die Ladung nicht in die Sulfoneinheit delokalisiert wird, ist in keinem Fall eine Protonierung am Sauerstoff zu erwarten. Zur Bildung des gewünschten Produktes erfolgt eine Protonierung des α -Kohlenstoffatoms. Beim Vergleich der PES von methyl-substituierter (**43**) und methoxy-substituierter (**40**) Sulfon-Verbindung lassen sich keine Unterschiede im Reaktionsverlauf durch den Einfluss unterschiedlicher Substituenten an der Sulfonfunktion erkennen. Beide Verbindungen reagieren ohne große Barriere zum energetisch günstigeren Additionsprodukt. Ein nucleophiler Angriff ohne Protonenquelle für eine Aktivierung des Systems in der Nähe scheint für diese Verbindung durchaus denkbar, da die carbanionische Zwischenstufe barrierefrei zum Produkt reagiert und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der nucleophile Angriff des Methylthiolats ist.

Bei den Berechnungen bzw. dem Versuch der Berechnung der PES für alle Verbindungen **33** bis **42** (Abb. 14), wurde beobachtet, dass für den postulierten 1,2-Additionsmechanismus lediglich ein explizites Ammoniumion zur Protonierung vonnöten ist. Das zweite Ammoniummolekül störte im besten Fall nicht (s. Kapitel 4.1.2, Vinylsulfone **40** bis **43**), in allen anderen Fällen führt die Anwesenheit zu Komplikationen bei den Rechnungen. Aufgrund der freien Beweglichkeit des zweiten Ammoniumions kam

es zu fluktuierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasserstoffen am Ammonium-Stickstoff und verschiedenen Sauerstoff- und Stickstoffatomen in den untersuchten Molekülen, sodass die Strukturen innerhalb einer PES nicht miteinander vergleichbar waren. Teilweise, vor allem bei den Molekülen **36**, **37** und **38** waren die entstandenden Wasserstoffbrückenbindungen so stark, dass es zur Zersetzung des Moleküls unter Eliminierung der Alkohol- oder Aminkomponente kam. Nur durch Festlegung zusätzlicher Randbedingungen, welche das zweite Ammoniumion in seinen Freiheitsgraden deutlich einschränkten, konnten vernünftige Rechenergebnisse für diese Moleküle erzielt werden, bei denen die Systeme an allen Flächenpunkten stabil und vergleichbar waren. Dieselben Ergebnisse wie mit dieser erzwungenen Starrheit lassen sich jedoch einfacher durch Entfernen des zweiten Ammoniumions erzielen. Daher wurden die folgenden PES-Berechnungen in Anwesenheit nur eines expliziten Ammoniumions durchgeführt.

4.1.4 Potentialflächen der 1,2-Addition an Vinylsulfone

Die Berechnungen der PES für die nachfolgenden Verbindungen wurden auf dem selben Theorieniveau durchgeführt wie die bisherigen Berechnungen, mit dem Unterschied, dass für diese Systeme nur ein Ammoniumion als Protonendonator zur Verfügung

gestellt wurde. Es befand sich in unmittelbarer Nähe zum α -Kohlstoffatom des Michael-Akzeptors, um das entstehende Carbanion protonieren zu können. Die PES wurden sowohl von der Produkt- als auch von der Eduktstruktur ausgehend berechnet, um die richtige Angriffstrajektorie des Methylthiolats zu erhalten.

Die von der Produktstruktur ausgehend berechnete Potentialfläche des Systems aus Methylthiolat und Methylvinylsulfon **40** zeigt eine deutliche Kante in der Fläche (Abb. 26).

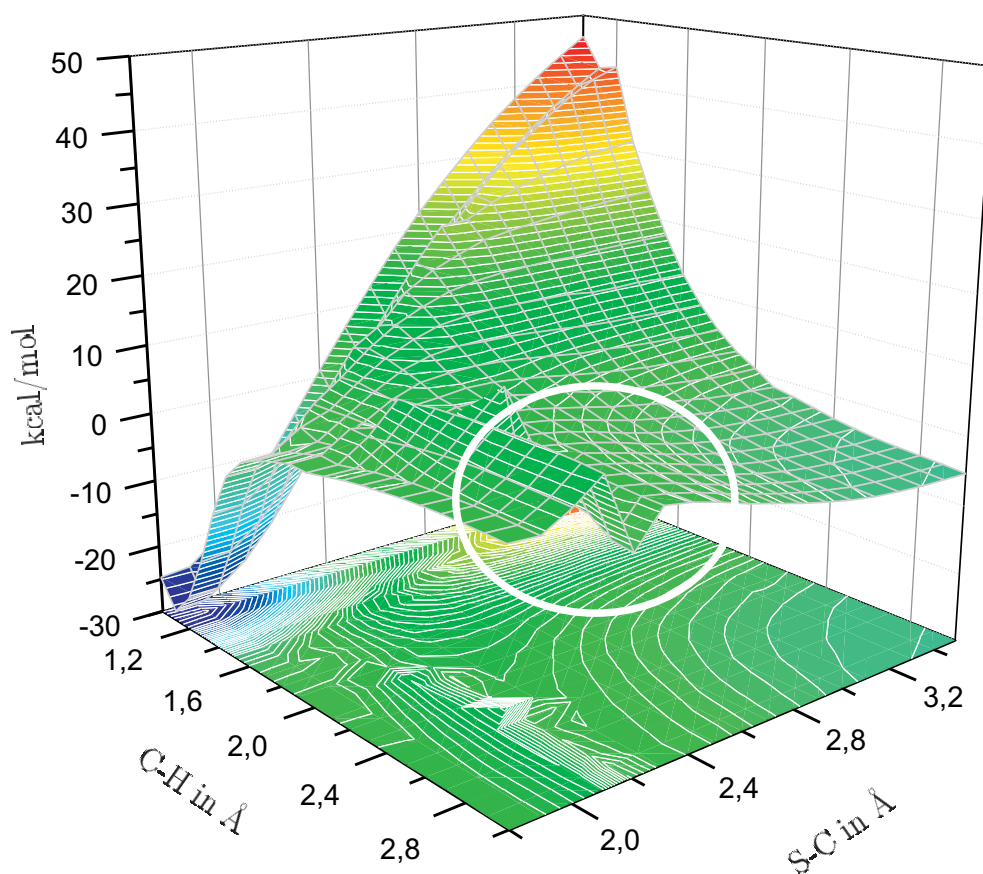


Abbildung 26: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS- CH_3 **40** mit Kante

Diese ergibt sich aus einer veränderten Position des Methylthiolat-Moleküls bezüglich des Michael-Akzeptors. Offenbar ist die Orientierung des Thiolats im Produkt-System anders als in größerer Entfernung.

Die Potentialfläche wurde daher nochmals berechnet, diesmal ausgehend von der Eduktstruktur, d.h. die Start-Bindungslängen betragen 3.5 \AA für die S-C₂-Bindung bzw. 3.0 \AA für die C₁-H-Bindung (Abb. 27). Der Wert Null entspricht der Summe der

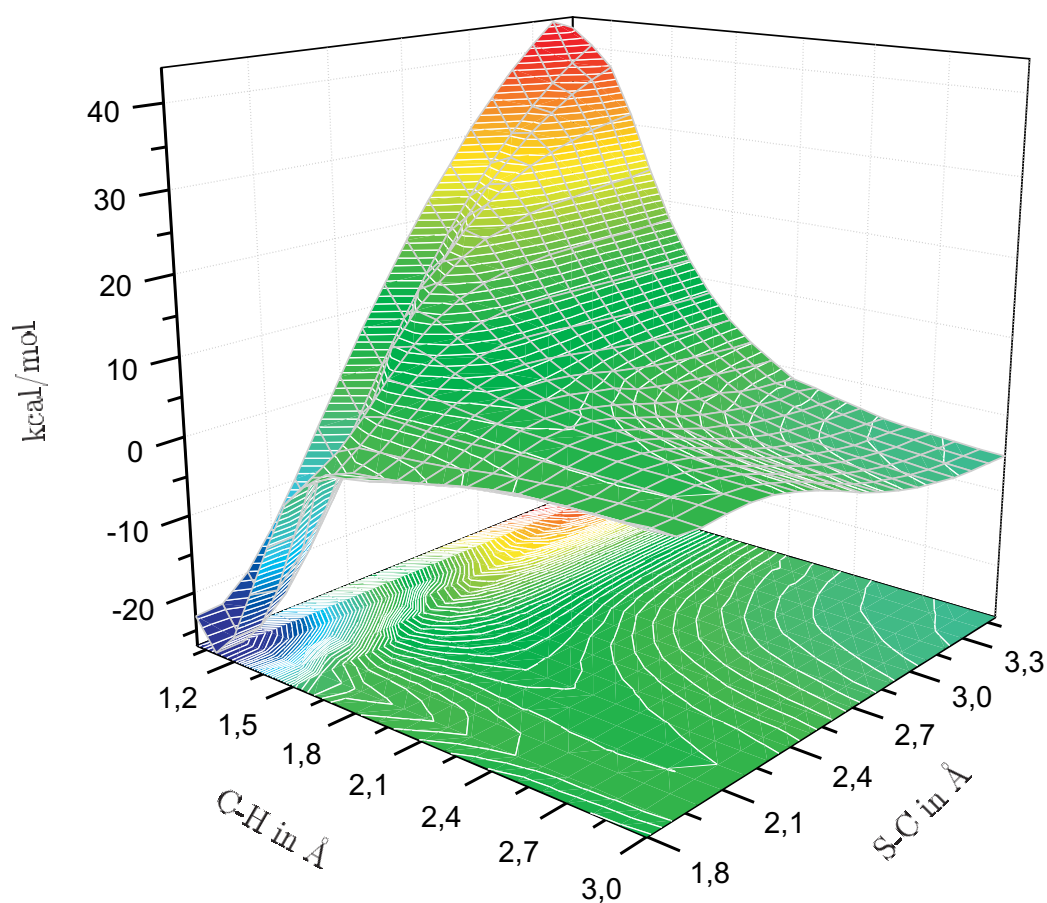


Abbildung 27: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS-CH₃ 40

Energien aller Edukte in unendlich weiter Entfernung zueinander. Der Graph macht deutlich, dass bei Annäherung der einzelnen Substanzen offenbar zunächst, also sobald eine gegenseitige Wahrnehmung der Reaktionspartner erfolgt ist, eine Erniedrigung der Energie stattfindet (s. Abb. 28). Die Region um Flächenpunkt SC/CH (3.5/3.0) weist eine Energie unterhalb der definierten Edukt-Gesamtenergie, also unterhalb von 0, auf. Dies lässt sich durch energetisch günstige Wechselwirkungen zwischen den Reaktanden erklären, es bildet sich also eine Art Reaktionskomplex (Abb. 28).

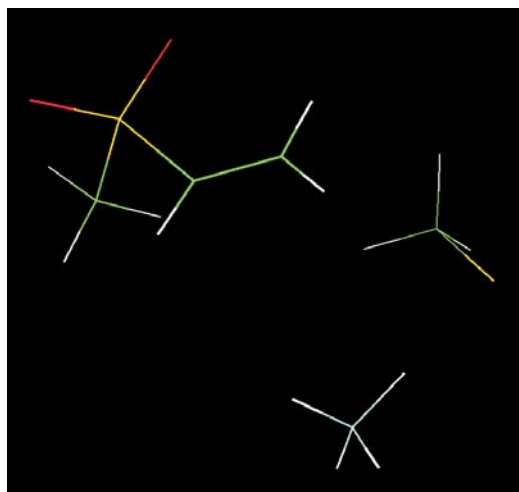


Abbildung 28: Reaktionskomplex von Methylthiolat und Vinylsulfon **40**

In diesem befindet sich das Schwefelatom (gelb) des Methylthiolats 4.13 Å entfernt vom C₂-Atom (grün) des Vinylsulfons, bildet aber eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zu einem H-Atom (weiß) des Ammoniumions (1.93 Å). Dieses ist wie-

derum 3.59 Å vom C₁-Atom entfernt.

Aus dem Reaktionskomplex heraus ist auf der Potentialfläche (Abb. 27) eine Reaktionskoordinate entlang des S-C₂-Abstands erkennbar. Der Pfad für den konstanten C₁-H-Abstand von 3.0 Å ist in Abbildung 29 dargestellt.

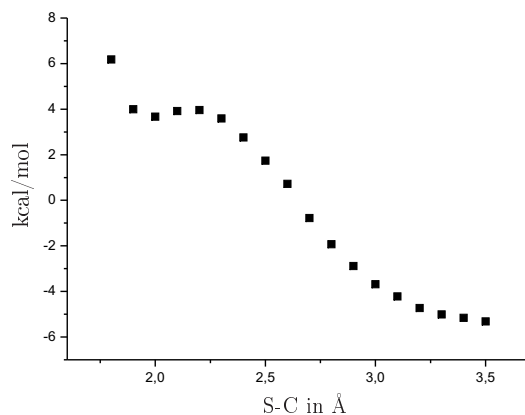


Abbildung 29: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor VS-CH₃ **40** bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

Die Aktivierungsenergie für diese Reaktion beträgt 10.3 kcal/mol. Der Übergangszustand liegt bei einem S-C₂-Abstand von 2.2 Å und einem C₁-H-Abstand von 3.0 Å.

Sowohl C₁ als auch C₂ sind im TS nicht mehr planar, sondern haben bereits eine leicht tetraedrische Geometrie angenommen (Abb. 30), die Wasserstoffatome z.B. der endständigen CH₂-Gruppe weisen nur noch einen Winkel von 111° statt 120° auf. Die Entfernung zwischen Thiolat und Ammoniumion hat sich unwesentlich vergrößert (2.11 Å). Aus dem Übergangszustand ver-

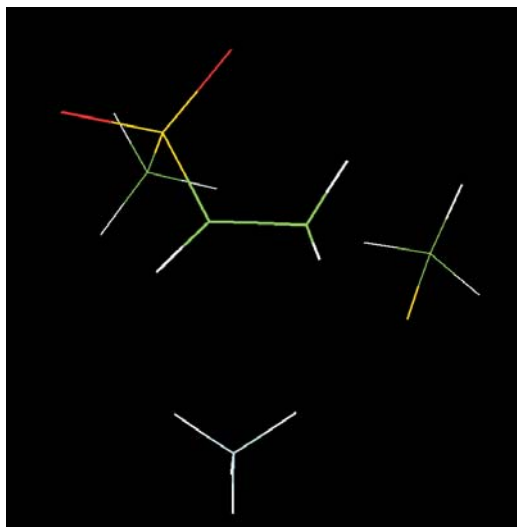


Abbildung 30: Übergangszustand der Reaktion von Methylthiolat und Vinylsulfon **40**

läuft die Reaktion barrierefrei zum Produkt wie in Abb. 31 gezeigt.

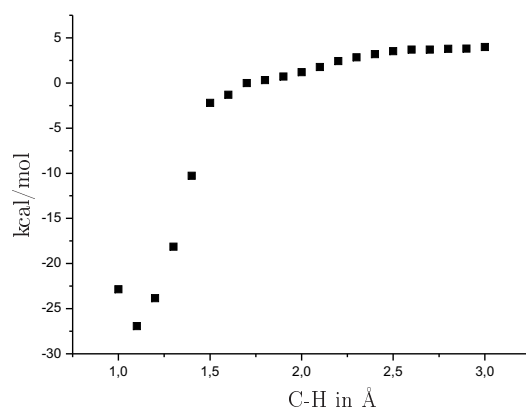


Abbildung 31: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat **32** an Michael-Akzeptor VS-CH₃ **40** bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

Im Produkt finden sich für die S-C₂-Bindung eine Länge von 1.87 Å und für die C₁-H-Bindung eine Länge von 1.10 Å (s. Abb. 32). Das Produkt wird nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Der Verlauf der Additionsreaktion von Methylthiolat

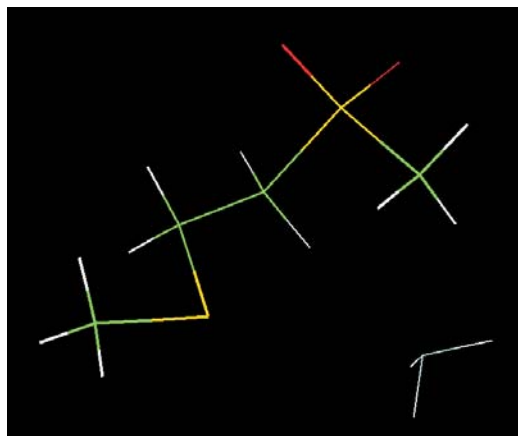


Abbildung 32: Produkt der Reaktion von Methylthiolat und Vinylsulfon **40**

an Vinylsulfon **40** ist charakteristisch für die Additionsreaktionen an alle untersuchten Vinylsulfone. Die Energien und Lagen der Übergangszustände sind daher in Tabelle 2 aufgeführt. Je nach Substituent können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Vinylsulfon und Ammoniumion die Reaktionsenergien beeinflussen. Tabelle 3 zeigt daher die unterschiedlichen Geometrien der Strukturen und die während der Reaktion auftretenden H-Brücken. Die entsprechenden Graphen und Molekülgeometrien befinden sich zu Vergleichszwecken direkt im Anschluss an die Tabellen und nicht in seinem separaten Anhang.

Anhand von Tabelle 2 lassen sich die Unterschiede in den Reaktionsverläufen in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster diskutieren. Die Carbonylverbindung nimmt dabei eine Sonderstellung ein und wird in Kapitel 4.1.5 separat diskutiert.

Tabelle 2: Relative Energien der Additionsreaktion vom Methylthiolat an Vinylsulfone in kcal/mol

	Name	Reaktionskomplex	Anion	Produkt	TS (SC/CH)	ΔE_a (hin)	ΔE_a (rück)
1	VS-CH ₃	- 6.4	- ^a	-27.3	3.9	10.3	21.0
2	VS-OCH ₃	- 7.5 ^b	-8.3 ^b	-29.2	-3.8	3.7	25.4
3	VS-Ph	- 9.7 ^b	- ^a	-25.8	2.64 ^b	12.4	16.1
4	VS-OPh	- 6.8 ^b	- ^c	-27.4	-3.8 ^b	3.0	23.6
5	VS-NH ₂	- 8.3	-2.3	-28.6	-0.7	7.6	27.8
6	CH ₃ -VS-CH ₃	- 5.2	- ^a	-18.5	11.2	16.5	23.7
7	V-S(=O)CH ₃	- 45.9	- ^d	-66.2	-26.2	19.7	40.0
8	V-C(=O)CH ₃	- 9.3 ^b	-14.3	-24.3	-9.3	0.01	21.3

a relaxiert zu Reaktionskomplex

b Wasserstoffbrückenbindung zwischen NH₄⁺ und C/S=(O)-Sauerstoff

c Abspaltung der Alkoholkomponente von der Sulfongruppe

d relaxiert zu Produkt

e zusätzlicher TS -3.0 kcal/mol bei SC(1.9)/CH(1.6)

Auffällig ist zunächst, dass das bei der Addition des Methylthiolats an die Vinylsulfone vermeintlich entstehende Anion (SC(1.9)/CH(3.0)) bei den meisten Verbindungen nicht gefunden wird. Während die alkyl- bzw. aryl-substituierten Vertreter (Einträge 1/6 und 3) wieder zum Reaktionskomplex relaxieren, kommt es bei der phenoxy-substituierten Verbindung (Eintrag 4) zur Abspaltung der Alkoholkomponente und somit zur Zersetzung des Moleküls. Die methoxy-substituierte Verbindung sowie das Sulfonamid (Einträge 2 und 5) stabilisieren das entstehende Anion durch eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ammoniumion, wobei das Amid-Anion energetisch oberhalb des zugehörigen Reaktionskomplexes liegt. Das Anion der Sulfoxidverbindung (Eintrag 7) reagiert sofort zum Produkt weiter.

Die Bildung aller Additionsprodukte geht mit einem großen Energiegewinn für die Systeme einher und liefert stabile Produkte, die sich in Minima auf der Potentialfläche der Reaktionen befinden. Keines der gezeigten Produkte geht Wasserstoffbrückenbindungen zum übrigen Ammoniakmolekül ein.

Die Energien der Rückreaktionen betragen bis auf die Reaktion mit VS-Ph mehr als 20 kcal/mol. Es ist also von einer bei Raumtemperatur irreversiblen Reaktion auszugehen. Lediglich Phenylvinylsulfon **42** (Eintrag 3) weist mit nur 16.1 kcal/mol eine etwas

geringere Barriere für die Rückreaktion auf.

Die Übergangszustände der einzelnen Reaktionen ähneln sich in ihrer Lage bezüglich der Gesamtreaktion. Die beteiligten Kohlenstoffatome sind nicht mehr planar sondern weisen bereits eine leicht tetraedrische Geometrie auf (Vgl. Abbildungen der jeweiligen TS und Tabelle 3). Die Übergangszustände der beiden phenylsubstituierten Komponenten sind durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Einträge 3 und 4).

Vergleicht man die Aktivierungsenergien aller Reaktionen, lässt sich die folgende Reihenfolge aufstellen: $V-C(=O)-CH_3 < VS-OPh = VS-OCH_3 < VS-NH_2 < VS-CH_3 < VS-Ph < CH_3-VS-CH_3 < V-S(=O)-CH_3$. Die Aktivierungsenergien hängen über die Arrhenius-Gleichung

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

mit der Reaktionsgeschwindigkeit zusammenhängen. Unter der Annahme, dass der A-Faktor (Arrhenius-Faktor) für alle betrachteten Moleküle gleich ist, können die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten k bestimmt werden. Z.B. ergibt sich somit, dass die Reaktionsgeschwindigkeit k der Reaktion von Methylthiolat mit VS-OPh (Eintrag 4) etwa um einen Faktor 3.26 schneller sein sollte als für diejenige mit VS-OCH₃. Da die Genauigkeit für die Berech-

nungsmethode der Aktivierungsenergie jedoch etwa im Bereich von 1 kcal/mol [69] liegt, ergibt sich für den Fehler in der relativen Geschwindigkeit mit $\Delta E_a = 1$ kcal/mol bereits ein Faktor 3. Das Beispiel der Vinylsulfonsäureester macht deutlich, dass aus den erhaltenen Aktivierungsenergien sehr drastische Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit berechnet würden. Es wird daher auf die Berechnung der relativen Geschwindigkeiten verzichtet, stattdessen wird nur der Trend für die Reaktivitätsreihenfolge aufgezeigt: klassische Carbonyl-Michaelverbindung (Eintrag 8) sollten schneller als die diskutierten Vinylsulfone reagieren. Weiterhin ist festzustellen, dass der TS im Gegensatz zum Reaktionskomplex keine Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken erfährt und die Energien der Strukturen somit nicht quantitativ vergleichbar sind. Die Sulfonsäureester (Einträge 2 und 4) reagieren schneller als die übrigen Sulfonderivate, wobei die Art der Alkoholkomponente keine Rolle zu spielen scheint. Die Übergangszustände werden im Vergleich zu den alkyl/aryl-Analoga etwas früher, d.h. bei einem längeren S-C₂-Abstand erreicht. Auch in diesem Fall muss allerdings beachtet werden, dass im Fall der Methoxyverbindung (Eintrag 2) der TS nicht durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, wie dies für alle anderen betrachteten Zustände der Fall ist. Das Sulfonamid (Eintrag 5) und die alkyl/aryl-substituierte Verbindun-

gen (Einträge 1 und 3) reagieren deutlich langsamer, wobei der Arylrest zusätzlich zu einer leichten Verlangsamung führt. Unklar bleibt, ob dies ein elektronischer Effekt ist oder durch die zunehmende Größe des Substituenten beeinflusst wird, zumal eine gegenläufige Reihenfolge für die OMe/OPh-Komponenten gefunden wird. Ein zusätzlicher Substituent an der Doppelbindung (Eintrag 6) erschwert den nucleophilen Angriff erheblich, was sich in der stark erhöhten Aktivierungsenergie zeigt. In den letzten vier Fällen sind die jeweils zu vergleichenden Strukturen im selben Maße mit Wasserstoffbrücken abgedeckt, sodass der energetische Vergleich der Strukturen verlässlich erscheint. Schlusslicht der Reihenfolge bildet das Sulfoxid (Eintrag 7).

In Tabelle 3 sind die Geometrien der Strukturen während der Reaktion aufgeführt. Die Längen der C-C-Doppelbindung ($C_2=C_1$) in den Reaktionskomplexen sowie die der C-C-Einfachbindung (C_2-C_1) liegen für alle Verbindungen im Bereich der klassischen Werte für Alkene (1.34) bzw. für Alkane (1.54) und sind daher der Übersichtlichkeit halber nicht separat aufgeführt. Ebenfalls nicht aufgeführt sind die Winkel zwischen den Substituenten der sp^2 - und sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatome in den Reaktionskomplex- und Produktstrukturen, die wie erwartet 120° bzw. dem Tetraederwinkel entsprechen.

Tabelle 3: Bindungslängen [\AA] und -winkel [$^\circ$] der bei der Addition von Methylthiolat

Verbindung	Struktur	S-C ₂	C ₂ -C ₁	\angle SC ₂ C ₁	\angle HC ₂ H	C ₁ -H	S-HN	SO-HN	HN-HN
1 VS-CH ₃	Komplex	4.13				3.59	1.93		
	TS	2.20	1.45	120°	111°	3.19	2.11		
	Anion Produkt	- 1.87				1.10	4.19		
2 VS-OCH ₃	Komplex	3.34				3.13	1.97	2.05	
	TS	2.40	1.40	120°	114°	3.00	2.09	1.87	
	Anion Produkt	1.96 1.86				3.17 1.10	2.35 5.07	1.73 4.34	
3 VS-Ph	Komplex	4.76				4.23	1.99	1.92	
	TS	2.30	1.42	121°	112°	3.00	4.60	1.67	
	Anion Produkt	- 1.86				1.10	5.10		
4 VS-OPh	Komplex	3.12				3.17	2.00	1.96	
	TS	2.50	1.39	118°	116°	3.45	2.12	1.85	
	Anion Produkt	- 1.86				1.10	5.02	4.30	
5 VS-NH ₂	Komplex	3.60				3.25	2.00		2.04
	TS	2.26	1.40	120°	115°	3.00	2.23		1.84
	Anion Produkt	2.02 1.82				3.26 1.10	2.34 5.11		1.78 3.86
6 CH ₃ -VS-CH ₃	Komplex	7.27				8.37	1.98		
	TS	2.59	1.40	116°	113°	3.20	2.11	3.60	
	Anion Produkt	- 1.89				1.10	4.37	5.13	
7 V-S(=O)CH ₃	Komplex	4.94				3.00	1.91	4.75	
	TS	2.33	1.42	120°	111°	2.88	2.27		
	Anion Produkt	- 1.87				1.10	5.27	5.75	
8 V-C(=O)CH ₃	Komplex	3.03				3.30	2.09	1.81	
	TS (2.3/3.0)	2.17	1.42	115°	113°	3.00	2.30	1.52	
	Anion TS (1.9/1.6) Produkt	1.94 2.90 1.86				2.98 1.74 1.10	2.47 2.96 4.78	1.38 3.03 4.26	

a Der Wert bezieht sich auf den Winkel \angle HC₂C_{Methylgruppe}

In allen Strukturen der Reaktionskomplexe stabilisieren sich das Methylthiolat und das Ammoniumion durch eine Wasserstoffbrücke. Die S-H-Bindung beträgt für diese H-Brücke ca. 2 Å. Die Entfernung dieses Systems zu den Michael-Akzeptor-Verbindungen variiert allerdings. Die alkyl-/aryl-substituierten Sulfone (Einträge 1/6 und 3) sowie das Sulfoxid (Eintrag 7) liegen mit mehr als 4 Å bzw. fast 5 Å (Eintrag 7) deutlich weiter von dem Methylthiolat entfernt als die übrigen Verbindungen (Entfernung ca. 3.0 – 3.5 Å). Die Komplexstrukturen der Einträge 1, 5 und 7 werden nicht durch Wasserstoffbrücken von ca. 2 Å stabilisiert.

In den Übergangszuständen variierten die Längen für die S-C₂-Bindung von 2.17 – 2.50 Å und die der C₁-H-Bindung von 3.00 – 3.19 Å. Die Längen der C₂-C₁-Bindungen liegen mit ca. 1.40 Å ziemlich genau zwischen denen von Kohlenstoff-Doppel- und -Einfachbindungen. Auch die Geometrie des attackierten Kohlenstoffatoms bezeugt den Übergangszustand. Statt eines Winkels von 120° wie in den planaren Ausgangsstrukturen, finden sich zwischen den beiden Wasserstoffatomen am C₂ Winkel von 116° bis 111°. Es deutet sich also bereits die Tetraedergeometrie am C₂ an. Eintrag 1 und 4 zeigen besonders gut die erwartete Relation zwischen C₂-C₁-Bindungslänge und HC₂H-Winkel. Eine kürzere Bindung (1.39 Å, Eintrag 4) entspricht einem früheren

Übergangszustand, in dem der HC_2H -Winkel eher noch der planaren Struktur entspricht (116° , Eintrag 4), während ein später TS bereits mehr Charakter einer C-C-Einfachbindung (1.45 \AA , Eintrag 1) und eine tetraedrische Umgebung um C_2 aufweist (111° , Eintrag 1). Die gefundenen Werte für die übrigen Vinylsulfone bestätigen diesen Trend. Für das sterisch gehinderte System (Eintrag 6) ergibt sich durch die Abstoßung zwischen der Methylgruppe am C_2 und am angreifenden Schwefelatom eine kleinerer Winkel für $\text{HC}_2\text{C}_{\text{Methylgruppe}}$ als für eine Verbindung mit HC_2H .

Der Angriff des Methylthiolat auf die vinylische Einheit verläuft bei den Vinylsulfonen unter einem Winkel von 120° . Bei Verbindung $\text{CH}_3\text{-VS-CH}_3$ (Eintrag 6) beträgt der Angriffswinkel nur 116° , was vermutlich auf einer sterischen Abstoßung durch die Methylsubstitution an der Vinyleinheit beruht. Der Angriffswinkel von 115° auf das Carbonyl-Michaelsystem hingegen lässt sich eher durch einen elektronischen Effekt erklären, da kein großer Substituent die Angriffstrajektorie beeinflusst. Wie bereits in der Gegenüberstellung der Ladungsverteilung für Carbonyl- und Vinylsulfon-Michael-Akzeptoren im anionischen Zustand gezeigt wurde (Abb. 25, Kapitel 4.1.3), tritt bei den Carbonylsystemen eine stärkere Konjugation auf als bei den Vinylsulfonen.

Eine andere zugrunde liegende elektronische Struktur verändert die Geometrie des LUMOs und verursacht somit den abweichenden Angriffswinkel.

Das Sulfonamid (Eintrag 5) nimmt eine Sonderstellung bei den diskutierten Verbindungen ein, da für dieses Moleküle keine Wasserstoffbrücken zwischen dem Ammoniumion und dem Sauerstoffatom beobachtet werden. Stattdessen finden sich für alle Strukturen im Verlauf der Reaktion starke Wechselwirkungen mit dem Stickstoff der Amidfunktion. Dies ist insofern überraschend, da der Amidstickstoff in Carbonylamiden aufgrund der Delokalisation der Elektronen des lonepairs am Stickstoff in die Carbonylgruppe hinein kaum basisch ist. Offensichtlich weist die Sulfonamidbindung weniger Delokalisation auf. Eine geringere Neigung der Sulfoneinheit zur Konjugation ist bereits bei der Untersuchung der Ladungsverteilung während der Addition von Methylthiolat an Vinylsulfone diskutiert worden (Abb. 25, Kapitel 4.1.3).

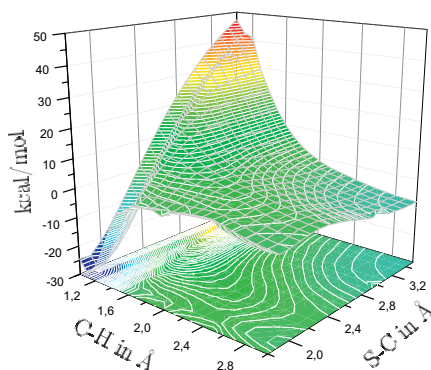
VS-NH₂

Abbildung 33: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS-NH₂

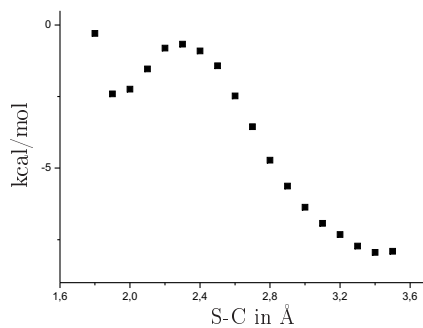


Abbildung 34: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-NH₂ bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

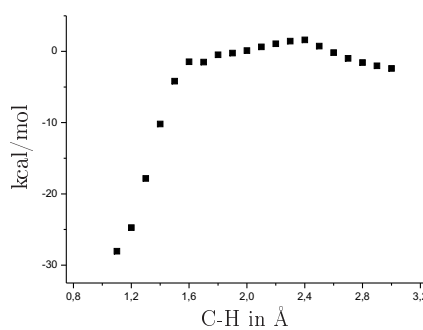


Abbildung 35: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-NH₂ bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

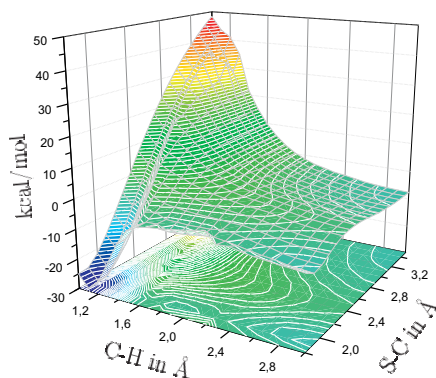
VS-OCH₃

Abbildung 36: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS-OCH₃

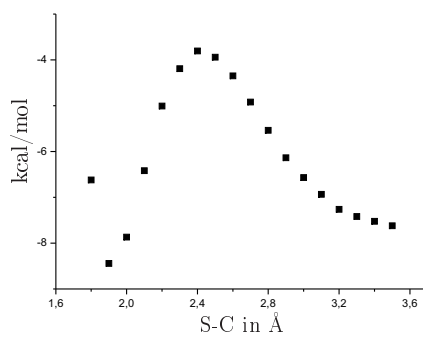


Abbildung 37: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-OCH₃ bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

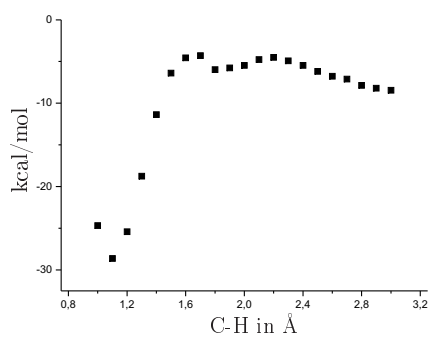


Abbildung 38: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-OCH₃ bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

VS-Ph

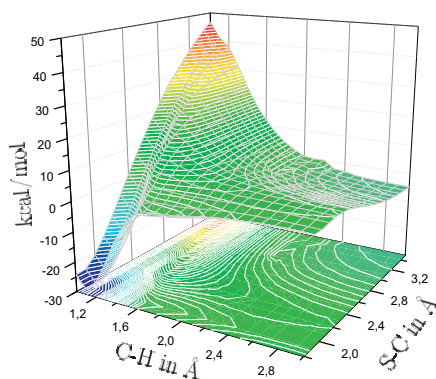


Abbildung 39: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS-Ph

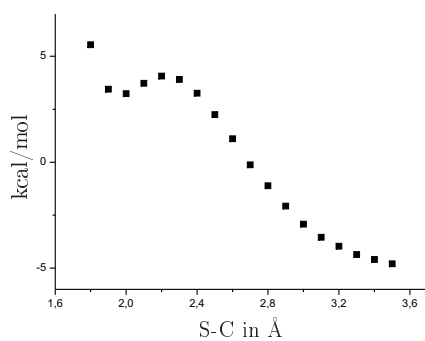


Abbildung 40: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-Ph bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å

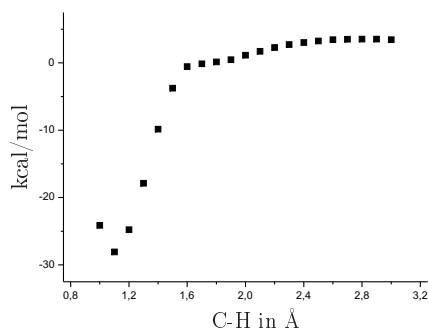


Abbildung 41: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-Ph bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

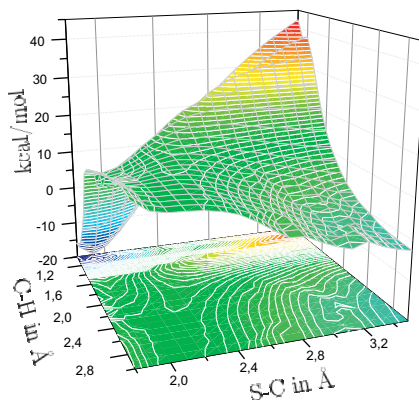
$\text{CH}_3\text{-VS-CH}_3$ 

Abbildung 42: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an $\text{CH}_3\text{-VS-CH}_3$

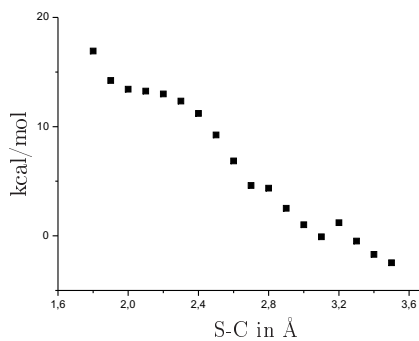


Abbildung 43: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an $\text{CH}_3\text{-VS-CH}_3$ bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

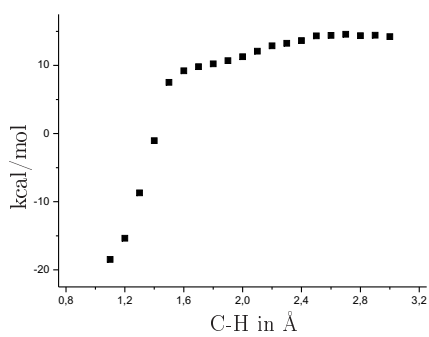


Abbildung 44: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an $\text{CH}_3\text{-VS-CH}_3$ bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

VS-OPh

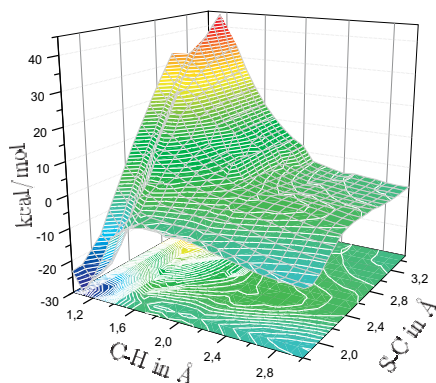


Abbildung 45: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an VS-OPh

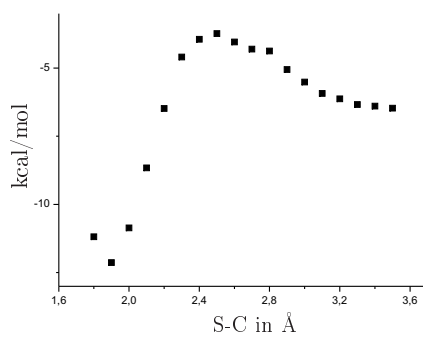


Abbildung 46: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-OPh bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

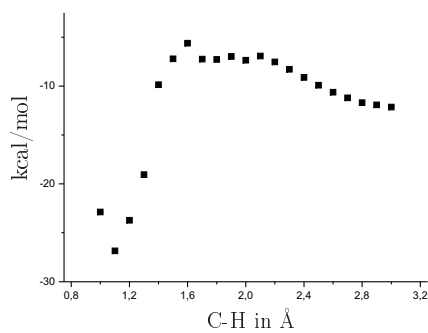


Abbildung 47: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-OPh bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

4.1.5 Potentialfläche der 1,2-Addition an Carbonyl-Michael-System **33**

Die Potentialfläche der Additionsreaktion des Methylthiolats an die Carbonylverbindung **33** unterscheidet sich in ihrer Form deutlich von den bisher gezeigten Flächen für die Vinylsulfone (Abb. 48).

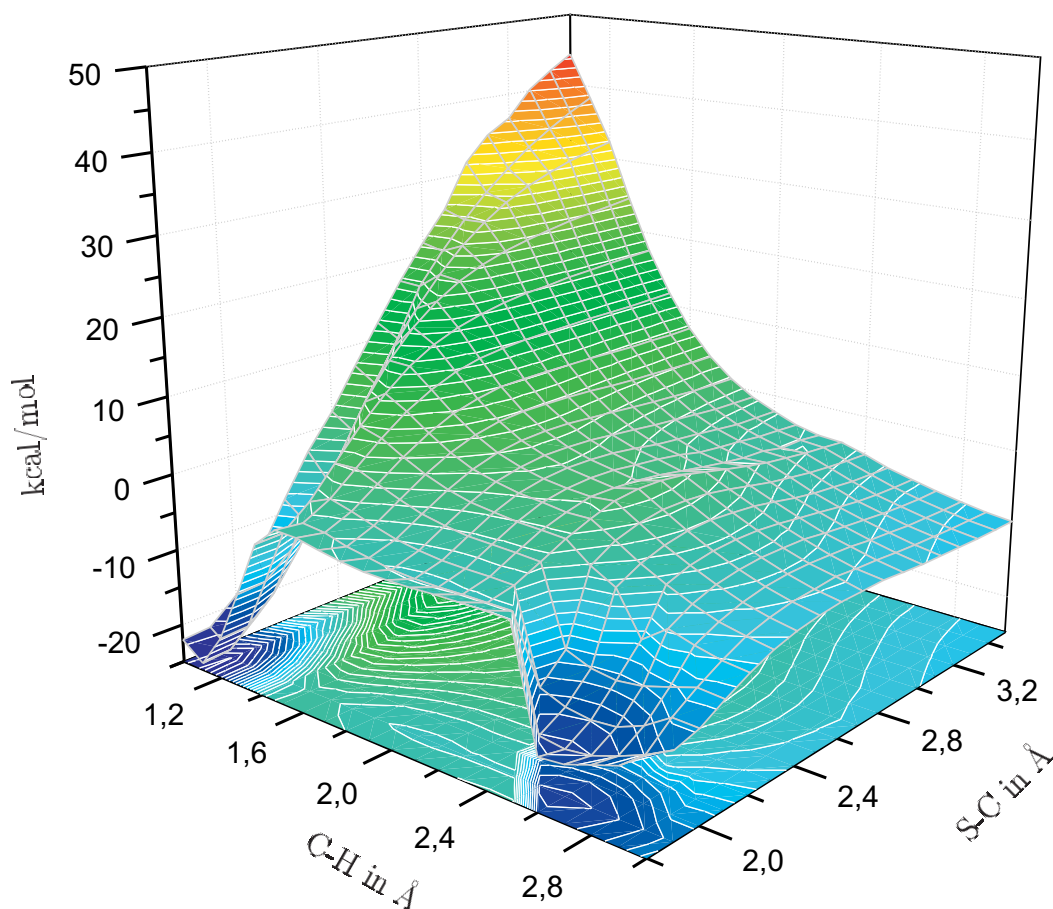
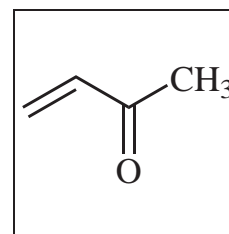


Abbildung 48: Potentialfläche der Additionsreaktion von Methylthiolat an Carbonyl-Michael-Akzeptor V-CO-CH₃ **33**

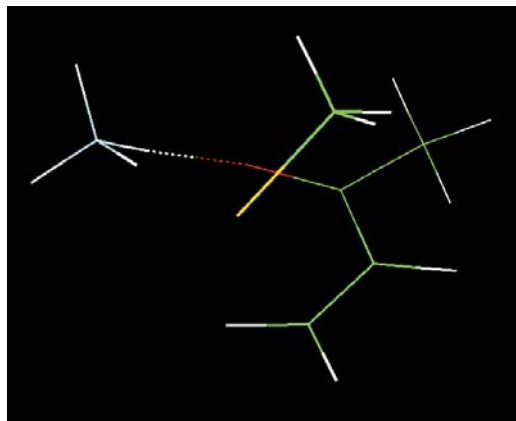


Abbildung 49: Reaktionskomplex von Methylthiolat und Carbonyl-Michael-Akzeptor **33**

Der Reaktionskomplex (Abb. 49) ist wie bei den Vinylsulfonen durch starke Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Der Reaktionspfad verläuft ähnlich wie bei den Vinylsulfonen parallel zur S-C-Achse. Es fällt allerdings ein starker Energiegewinn bei kürzeren S-C-Abständen auf (Abb. 50).

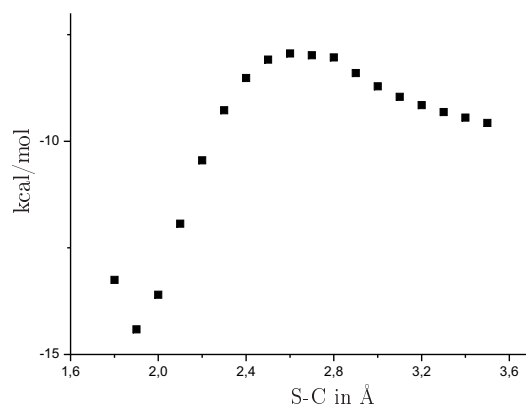


Abbildung 50: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an Carbonyl-Michael-Akzeptor **33** bei konstantem CH-Abstand von 3.0 Å.

Dieser resultiert aus einer Protonierung des in der Reaktion entstehenden Anions (Abb. 51) am Sauerstoff (Abb. 52), die die-

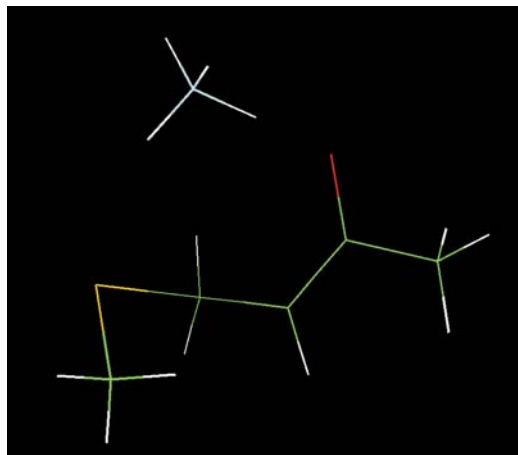


Abbildung 51: Anion von Methylthiolat und Carbonyl-Michael-Akzeptor **33**

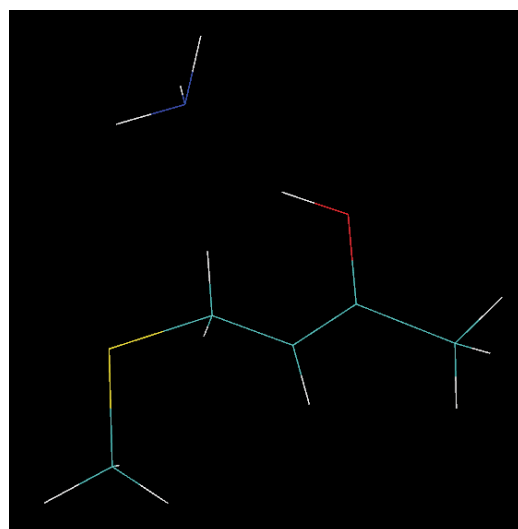


Abbildung 52: Protonierung am Sauerstoff

sen besonderen Energiegewinn mit sich bringt. Dadurch erklärt sich auch der relativ holprige Pfad für die Weiterreaktion zum am α -C-Atom protonierten Produkt, der einen Sprung in der Energiebarriere aufweist (Abb. 53).

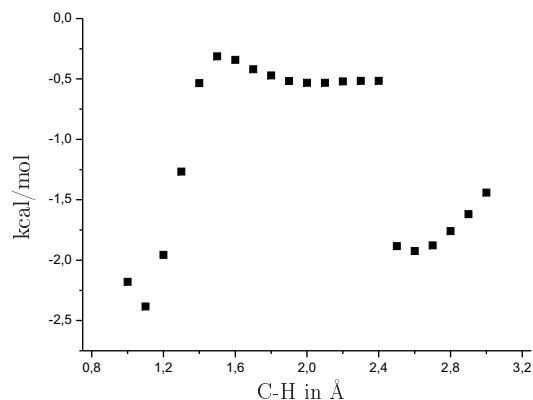


Abbildung 53: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an Michael-Akzeptor **33** bei konstantem SC-Abstand von 1.9 Å.

Der Übergangszustand für diesen Pfad hin zum 1,2-Additionsprodukt liegt bei SC(1.9 Å)/CH(1.6 Å). Die animierte Darstellung der Normalmoden zeigt die spontane Protonierung der anionischen Verbindung am α -C-Atom. Der Übergangszustand entlang der S-C-Achse bei einem CH-Abstand von 3.0 Å befindet sich bei SC(2.3 Å)/CH(3.0 Å). Ob dies allerdings der Übergangszustand für die 1,2-Additionsreaktion ist, scheint fragwürdig. Es scheint eher so, dass hier ein zwei-stufiger Mechanismus zur 1,2-Additionsprodukt-Struktur vorliegt, bei dem zunächst die 1,4-Addition mit der Protonierung am Sauerstoff stattfindet.

Der Vergleich der theoretischen Berechnungen mit den experimentell gewonnenen Daten erfolgt in Kapitel 4.7.1.

4.2 Synthese von peptidischen Vinylsulfonen

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, lassen sich nach *Ettari et al.* peptidische Vinylsulfone mithilfe der Cross-Metathesereaktion darstellen. [50] Die Ausgangsverbindungen sind zwei unterschiedlich modifizierte Aminosäuren, die zu einem Dipeptid verknüpft werden, welches dann an ein kommerziell erhältliches oder selbst synthetisiertes Vinylsulfon gekuppelt wird.

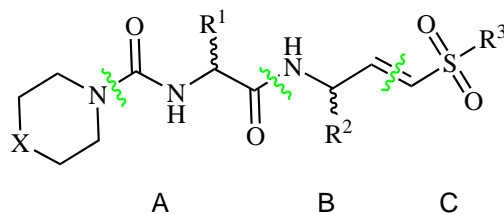
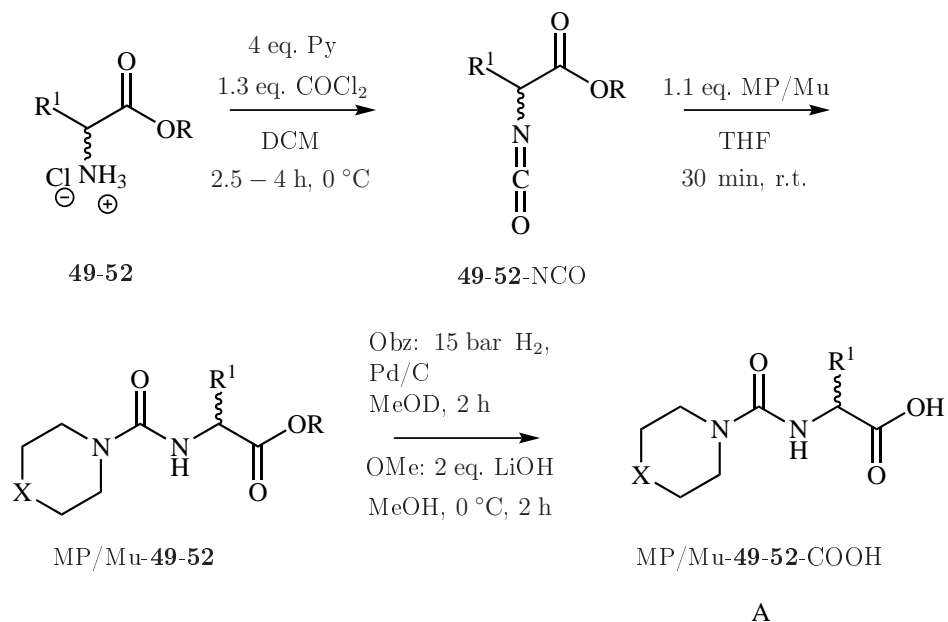


Abbildung 54: Allgemeine Struktur der peptidischen Vinylsulfone mit X= NMe \rightarrow MP, O \rightarrow Mu; $R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow$ D/L-Leu, Bn \rightarrow D/L-Phe; $R^2 = \text{Bn} \rightarrow$ L-Phe, $\text{CH}_2\text{Bn} \rightarrow$ D/L-HomoPhe; $R^3 = \text{Me, Ph, OMe, OPh, NMe}_2$

In Abbildung 54 ist die allgemeine Struktur der anvisierten peptidischen Vinylsulfone dargestellt. Wird X mit O oder NMe substituiert, erhält man als Endgruppen Morpholin (Mu) oder 4-Methylpiperazin (MP). Diese werden an die Aminosäuren D/L-Leu ($R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr}$) oder D/L-Phe ($R^1 = \text{Bn}$) gekuppelt und bilden den Baustein A. Baustein B enthält entweder die Aminosäure L-Phe ($R^2 = \text{Bn}$) oder L/D-HomoPhe ($R^2 = \text{CH}_2\text{Bn}$). Als Vinylsulfonreste R^3 wurden Me, Ph, OMe, OPh und NMe_2 eingesetzt. Die Syntheserouten der einzelnen Bausteine A, B und C sollen im

Folgenden separat diskutiert werden.

Synthese von Baustein A



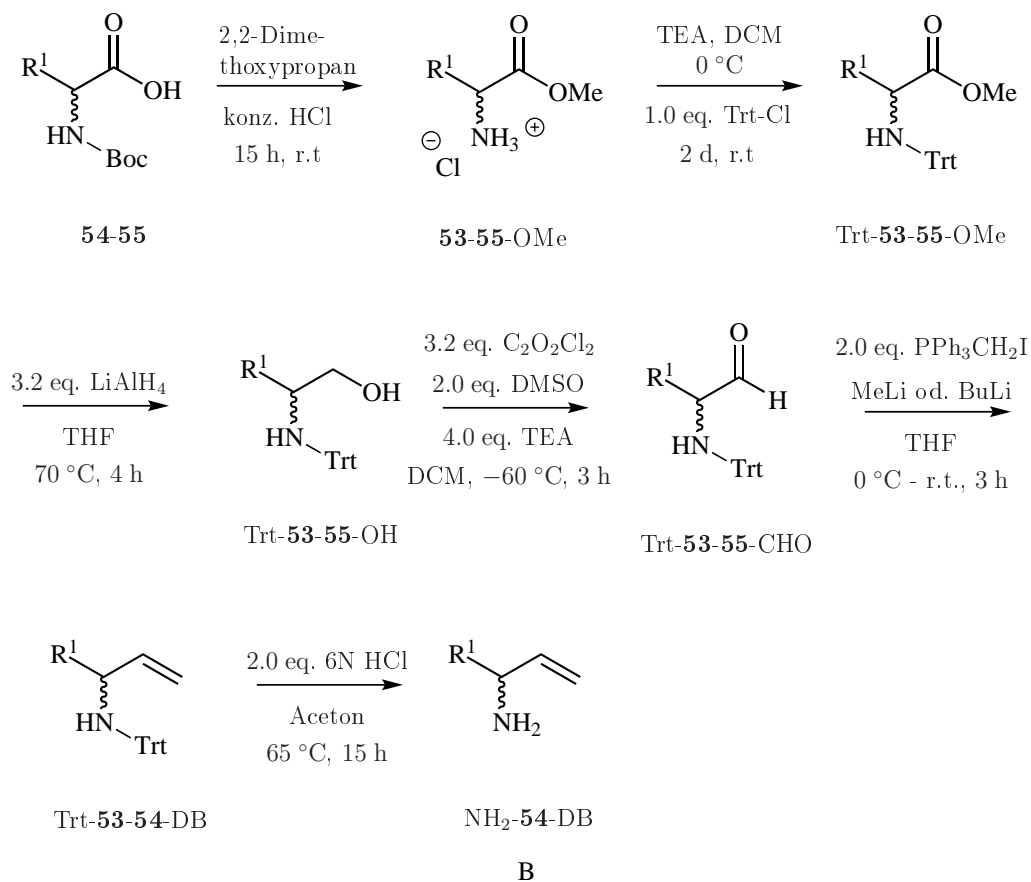
Schema 12: Synthese von Baustein A; R= Bn (Me bei D-Phe), X= NMe → MP, O → Mu; R¹= Bn → L/D-Phe (**49/50**), CH₂Pr → L/D-Leu (**51/52**)

Schema 12 zeigt die allgemeine Syntheseroute für Baustein A, die Verbindungen MP/Mu-**49-52**-COOH. Ausgehend von den kommerziell erhältlichen C-terminal-geschützten Aminosäure-Hydrochloriden L/D-Phe·HCl (R= Bn/Me, **49/50**) und L/D-Leu·HCl (R= Bn, **51/52**) konnten nach der Methode von *Novick et al.* [70] die Isocyanate **49-52**-NCO in guten Ausbeuten (~75%) dargestellt werden. Phosgen wurde in einer 20%igen Lösung

in Toluol eingesetzt und war somit gut zu handhaben. Anfangs wurden die erhaltenen Isocyanate mit einer Kugelrohrdestillation aufgereinigt. Bald stellte sich jedoch heraus, dass die erhaltenen Rohprodukte wenig stabil waren und daher eine schnelle Umsetzung der gründlichen Aufreinigung vorzuziehen war. Die Isocyanate **49-52-NCO** wurden sowohl mit 4-Methylpiperazin als auch Morpholin zu den Verbindungen MP/Mu-**49-52** umgesetzt. Dabei erwiesen sich die Phenylalanin-Isocyanate als die reaktiveren Verbindungen und lieferten MP/Mu-**49** und MP/Mu-**50** mit guten bis sehr guten Ausbeuten (61-96%). Die Ausbeuten an Mu-**51**, Mu-**52** und MP-**52** waren mit 39% bzw. je 21% eher gering. MP-**51** konnte nicht erhalten werden. Die Methylester MP/Mu-**50** konnten leicht mit 2.0 eq. LiOH oder NaOH in MeOH verseift werden. Die korrespondierenden Säuren MP/Mu-**50-COOH** wurden in Ausbeuten von 72 und 97% erhalten. Die Benzylester der übrigen Verbindungen MP/Mu-**49-52** wurden einer Hydrogenolyse über 2 h bei 5 – 15 bar unterworfen. Die Hydrogenolyse von Mu-**52** gelang nicht, es wurde stattdessen teilweise die Morpholineinheit abgespalten. Im Fall von Mu-**49** wurde die erfolgreich freigesetzte Säure Mu-**49-COOH** während der Reaktion mit dem Lösemittel Methanol verestert. Die Säuren MP-**49-COOH**, Mu-**51-COOH** und MP-**52-COOH** wurden in

Ausbeuten von 40 - 78% erhalten. Die erhaltenen Verbindungen MP/Mu-**49-52**-COOH bilden die Bausteine A.

Synthese von Baustein B



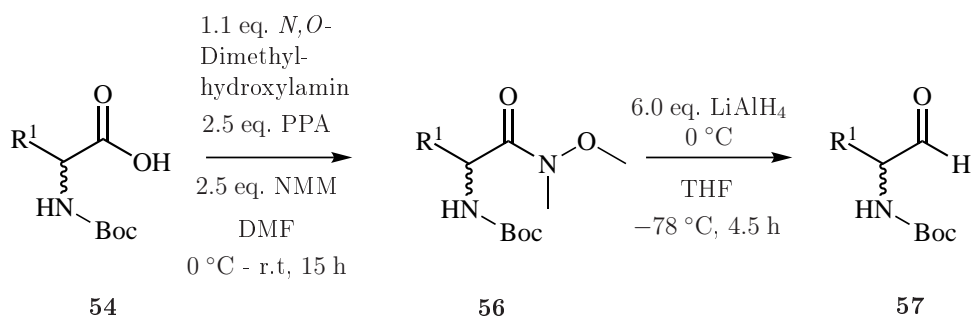
Schema 13: Synthese von Baustein B; $\text{R}^1 = \text{Bn} \rightarrow \text{L-Phe}$ (**53**), $\text{CH}_2\text{Bn} \rightarrow \text{L/D-HomoPhe}$ (**54/55**)

In Schema 13 ist die Synthese von Baustein B dargestellt, der aus den Aminosäuren L-Phe oder L/D-HomoPhe **53-55** besteht. L-Phe war als Methylester vorrätig, wohingegen die Me-

thylester **54-OMe** und **55-OMe** aus den kommerziell erhältlichen N-terminal-geschützten Aminosäuren Boc-L/D-HomoPhe **54-55** dargestellt wurden. Während der Veresterung der freien Säure von **54-55** mit 2,2-Dimethoxypropan im sauren Milieu wurde gleichzeitig die Boc-Schutzgruppe abgespalten, und die entsprechenden Methylester (**54-55-OMe**) wurden als Hydrochloride in sehr guten Ausbeuten (92-98%) erhalten. Im nächsten Schritt sollte die stabilere Trt-Schutzgruppe am Stickstoffatom eingeführt werden. Die besten Ausbeuten (89-91%) an Trt-**53-55-OMe** sind erzielt worden, wenn zuvor durch Zugabe von TEA die Aminofunktion aus den Hydrochloriden freigesetzt wurde. Die Reaktionsbedingungen der Reduktion von Trt-**53-OMe** zum Alkohol mit LiAlH_4 werden von *Dellaria et al.* [71] mit einer Reaktionsdauer von einer Stunde bei 0 °C bis Raumtemperatur beschrieben. Für die Reduktion von Trt-**54-55-OMe** mussten die Reaktionsbedingungen allerdings verschärft werden; ein Erhitzen der Reaktionsmischung zum Sieden über 4 h war erforderlich. Eine tiefe Rotfärbung der Reaktionsmischung ließ das Entstehen der Alkohole Trt-**53-55-OH** erkennen. Dennoch waren die Ausbeuten nur mäßig ($\leq 64\%$). Es folgte eine Swern-Oxidation mit $\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$, DMSO und TEA in trockenem DCM. Wichtig ist dabei, unter wasserfreien Bedingungen und Inertgas-Atmosphäre zu arbeiten und die Temperatur relativ

niedrig um die $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu halten, damit keine Oxidation zur Säure stattfinden kann. Die erhaltenen Aldehyde Trt-**53-54**-CHO wurden je nach Reinheit der Rohprodukte säulenchromatographisch aufgereinigt oder ohne weitere Aufreinigung sofort umgesetzt.

Ursprünglich war eine kürzere Syntheseroute nach *Palmer et al.* [22] bis zur Aldehydstufe geplant (Schema 14).



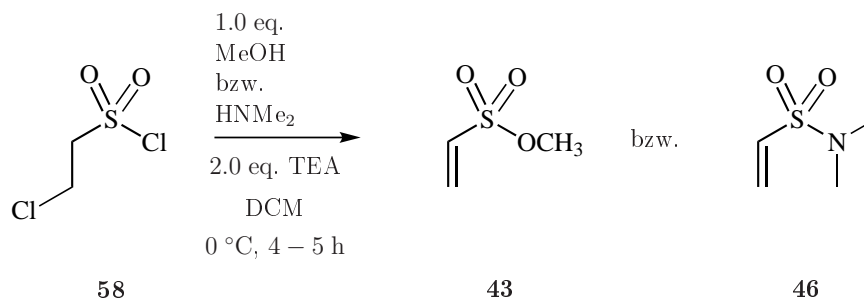
Schema 14: Alternativroute zur Aldehydstufe; $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{Bn} \rightarrow \text{L-HomoPhe}$

Hierbei wurde ebenfalls von Verbindung **54** ausgegangen, die mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin und PPA unter basischen Bedingungen zu Verbindung **56** umgesetzt wurde, welche in sehr guter Ausbeute (92%) erhalten wurde. Die Reduktion zum Aldehyd **57** gelang einmal mit einer Ausbeute von 38%. Da das Ergebnis nicht reproduziert werden konnte, wurde die in Schema 13 dargestellte Route weiterverfolgt. Zu einer Suspension aus $\text{PPh}_3\text{CH}_2\text{I}$ in trockenem THF (Schema 13) wurde BuLi bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ hinzugegeben, bis eine klare, orangefarbene Lösung entstand. Anders als anfangs angenommen, war dieser Farbumschlag von großer Bedeu-

tung und musste ggf. durch Mehrzugabe von Base (teilweise bis zu 42 eq=10 mL.) herbeigeführt werden. Die Färbung wird durch die Bildung des erforderlichen Dianions hervorgerufen. Für diese Reaktion ist die Qualität von BuLi entscheidend. Wurde älteres BuLi verwendet, wurde das gewünschte Produkt meist nicht erhalten. Wurde BuLi im Überschuss (s.o.) eingesetzt, kam es teilweise zu einer Nebenreaktion von BuLi mit THF und das gewünschte Produkt Trt-**53**-DB entstand nur zu 0.6%. Diese Nebenreaktion konnte durch den Einsatz von MeLi vermieden werden. Nach dem Auftreten des Farbumschlags wurde weitere 10 min gerührt und beobachtet, ob der Farbumschlag erhalten blieb. Erst dann konnten die Verbindungen Trt-**53-55**-CHO vorsichtig hinzugegeben werden. Nach 3 h wurden die Reaktionen beendet. Es konnten auf diese Weise die Verbindungen Trt-**53**-DB und Trt-**54**-DB mit Ausbeute von 11% und 48% erhalten werden. Verbindung Trt-**55**-DB wurde nicht erhalten. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde Verbindung Trt-**53**-DB nicht weiter umgesetzt. Die Abspaltung der Tritylschutzgruppe wurde durch Erhitzen in Aceton unter Rückfluss im stark sauren Milieu erreicht. Eine Aufreinigung von NH₂-**53-55**-DB ist zwar beschrieben [50], wird aber von der Autorin nicht empfohlen. NH₂-**54**-DB wurde daher direkt weiter umgesetzt.

Synthese von Baustein C

Die Vinylsulfone **40**, **42** und **45** mit den Resten Me, Ph, OPh sind kommerziell erhältlich. Daher wurden nur die Bausteine C mit den Resten OMe (**43**) und NMe₂ (**46**) synthetisiert (Schema 15).

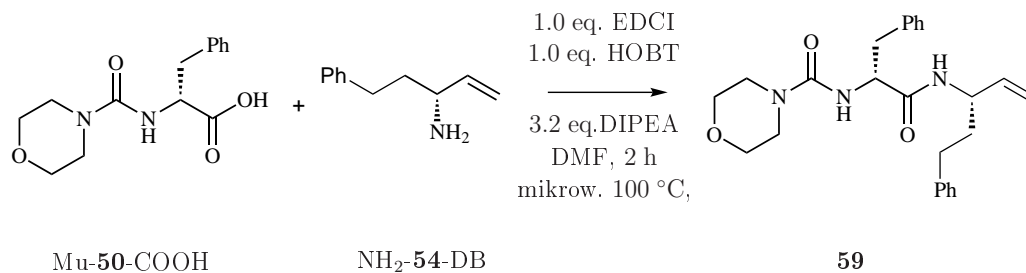


Schema 15: Synthese von Baustein C: Vinylsulfone mit den Resten OMe (**43**) bzw. NMe₂ (**46**)

Das hochgiftige 2-Chlorethylsulfonylchlorid **58**, das mit äußerster Vorsicht gehandhabt werden musste, wurde in DCM gelöst und mit dem Reagenz (MeOH bzw. HNMe₂) versetzt. Vorsichtig wurde während einer Stunde bei 0 °C TEA zugetropft und weitere 2 h gerührt. Das Sulfonat **43** konnte mit einer Ausbeute von 48% und das Sulfonamid **46** mit einer Ausbeute von 76% erhalten werden.

Kupplung der Bausteine A und B

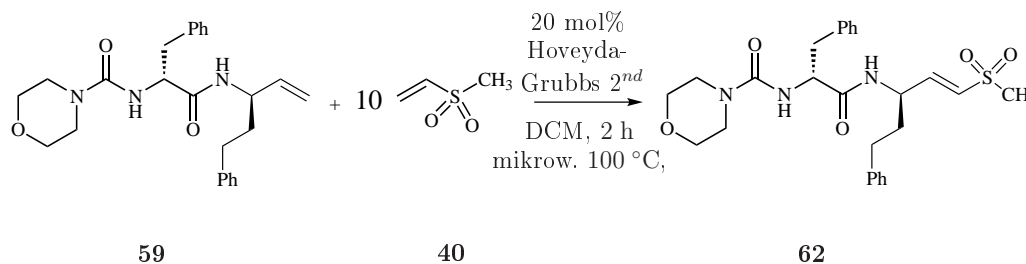
Schema 16 zeigt die Reaktionsbedingungen der Peptidkupplung von Baustein A an Baustein B am Beispiel von Mu-D-Phe-L-HomoPhe-DB **59**. Baustein A (Mu-**50**-COOH) wurde mittels



Schema 16: Peptidkuppung der Bausteine A und B in der Mikrowelle am Beispiel von Mu-D-Phe-L-HomoPhe-DB **59**

EDCI, einem Carbodiimid, aktiviert und mithilfe von HOBT unter basischen Bedingungen an die Aminofunktion des HomoPhe-Derivats NH₂-**54**-DB gekuppelt. Die Reaktion wurde bei 100 °C in DMF in der Mikrowelle durchgeführt, sodass die Reaktionszeit nur 2 h betrug. **59** wurde zu 38% erhalten. Auf diese Weise konnten auch MP-D-Phe-L-HomoPhe-DB **60** (24%) und Mu-L-Leu-L-HomoPhe-DB **61** (27%) synthetisiert werden.

Cross-Metathesereaktion zum peptidischen Vinylsulfon



Schema 17: Cross-Metathesereaktion des Dipeptids **59** mit Vinylsulfon **40** in der Mikrowelle am Beispiel von Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **62**

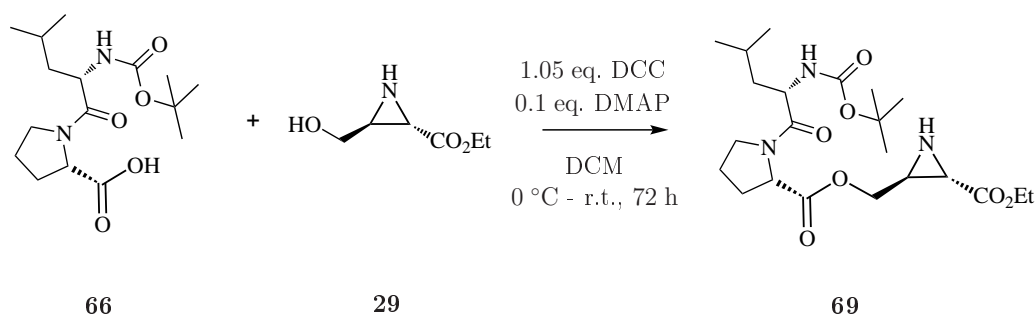
Die reaktive Kopfgruppe (Baustein C) der anvisierten Inhibitoren wurde im letzten Schritt durch eine Cross-Metathesereaktion

eingeführt. Schema 17 zeigt die Reaktion am Beispiel von Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **62**. Das Dipeptid **59** und das Vinylsulfon **40**, welches in 10-fachem Überschuss eingesetzt wurde, wurden in DCM *gradient grade* vorgelegt und mit der halben Menge an Hoveyda-Grubbs-Katalysator der 2. Generation für eine Stunde in der Mikrowelle bei 100 °C zur Reaktion gebracht. Der Katalysator wird u.a. durch die Morpholineinheit vergiftet, sodass nach einer Stunde die zweite Hälfte der benötigten Katalysatormenge hinzugegeben wurde und die Reaktion für eine weitere Stunde durchgeführt wurde. War mittels DC kein vollständiger Umsatz zu sehen, konnte die Reaktion für eine weitere Stunde mit zusätzlicher Menge an Katalysator fortgeführt werden. Mit dieser Methode konnten die peptidischen Inhibitoren Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **62** und MP-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **63** hergestellt werden. Sie wurden allerdings auch mittels HPLC-Aufreinigung nicht in ausreichender Reinheit für enzymatische Assays erhalten, da ein Großteil der im Überschuss eingesetzten Vinylsulfon-Verbindung **40** co-eluierte und nicht abgetrennt werden konnte. Eine Cross-Metathese von Mu-L-Leu-L-HomoPhe-DB **61** an Vinylphenylsulfonat **45** gelang nicht. *Ettari* (Università degli Studi di Messina) vermutet aufgrund eigener, noch nicht veröffentlichter Ergebnisse, dass Vinylsulfonate sowie Sulfonamide zu wenig reaktiv für diese

Cross-Metathesereaktion sind.

4.3 Synthese von peptidischen Aziridinen

Der Aziridinbaustein **29** stellt die reaktive Kopfgruppe der in dieser Arbeit behandelten peptidischen Aziridin-basierten Inhibitoren dar und wurde mit der in Schema 11 (Kapitel 2.2.2) beschriebenen Synthese in guten Ausbeuten ($\sim 70\%$) erhalten. Die Verknüpfung mit den Peptiden Z-Pro-Leu **64**, Z-Phe-Ala **65** und Boc-Leu-Pro **66** sollte über die freie Hydroxyfunktion erfolgen und ist am Beispiel von Boc-Leu-Pro **66** in Schema 18 dargestellt.

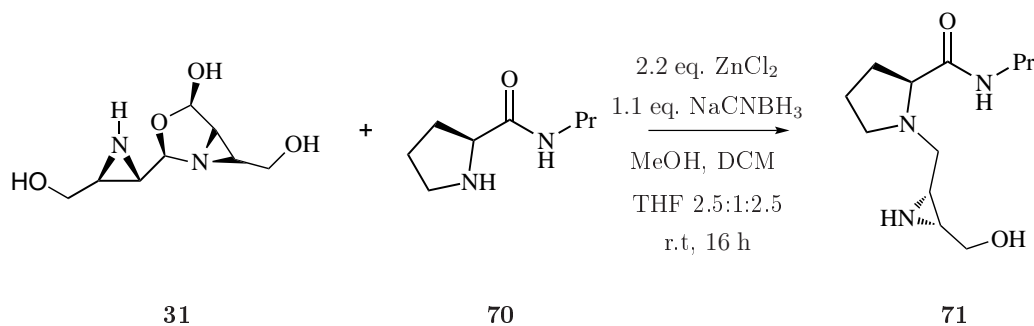


Schema 18: Synthese von peptidischen Aziridinen am Beispiel von Boc-Leu-Pro-Azi **69**

Die Säurefunktion der Peptide wurde mit DCC für den Angriff des mittelstarken OH-Nucleophils des Aziridins aktiviert. DMAP wurde als nucleophiler Katalysator hinzugefügt. Für einen vollständigen Umsatz war eine lange Reaktionszeit von mind. 72 h vonnöten. Die Produkte Z-Pro-Leu-Azi **67**, Z-Phe-Ala-Azi **68** und

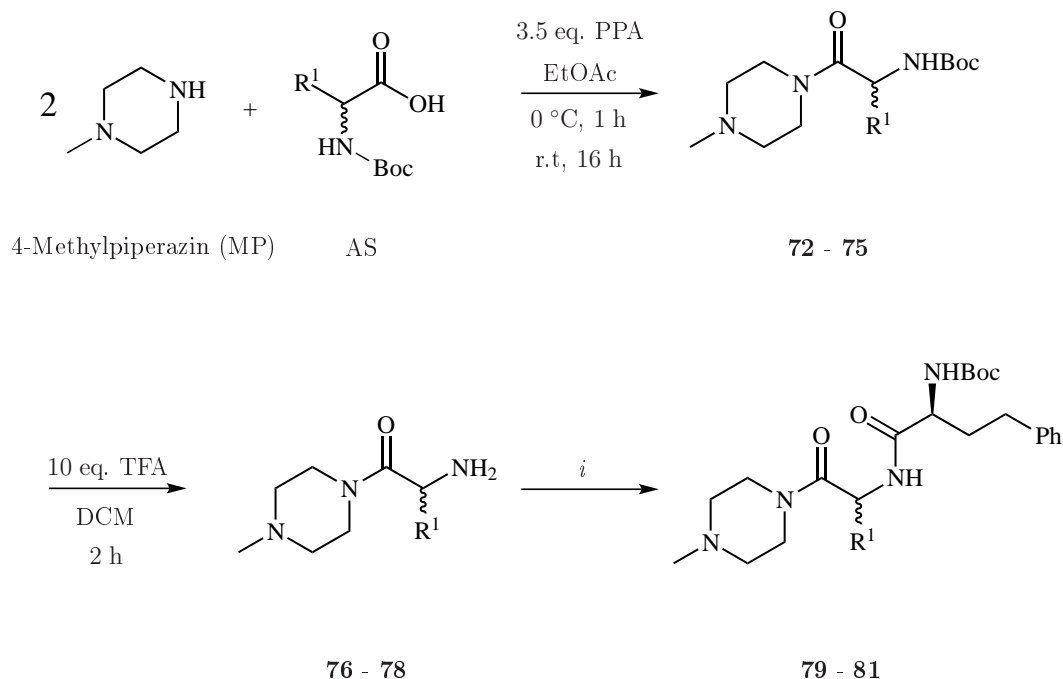
Boc-Leu-Pro-Azi **69** wurden in Ausbeuten von 32%, 25% und 49% nach Aufreinigung mittels HPLC erhalten.

Aziridin **29** wurde mittels DIBAL laut Schema 11 (Kapitel 2.2.2) zum Aziridin-Aldehyd reduziert, welcher als Dimer **31** (Schema 11, Kapitel 2.2.2) vorliegt. Die erfolgreiche Synthese wurde durch die Signale des Dimers ($242 = \text{Dimer}^+\text{K}$) und des Hemiacetals ($135 = \text{Hemiacetal}^+\text{H}$) in der Massenspektrometrie nachgewiesen. Die weitere Umsetzung des Aziridin-Aldehyds **31** mit diversen Peptiden sollte über eine reduktive Aminierung zu neuen Inhibitoren führen. Es wurde zunächst eine Testreaktion mit dem Prolin-Derivat **70** durchgeführt (Schema 19). Als eher weniger reaktives Amin sollte die Kupplung mit **70** Aufschluss geben über die Reaktionsfähigkeit des Aziridin-Aldehyds **31** mit größeren Peptiden. Die Testreaktion verlief erfolgreich, wie das massenspektroskopische Signal des Produkts **71** ($276 = \text{M}^+\text{H}$) belegte.



Schema 19: Reduktive Aminierung von **31** mit Prolin-Derivat **70** als Testreaktion für die Kupplung größerer Peptide

Für die Kupplung weiterer Peptide an Aziridin-Aldehyd **31** oder auch an die Esterfunktion von Aziridin **29** wurden die Peptide **79** - **81** auf die in Schema 20 gezeigte Weise hergestellt.



Schema 20: Synthese von Peptiden **79** - **81** zur Verknüpfung mit den Aziridinen **29** oder **30**; $R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow$ L/D-Leu (**72**, **76**, **79/73**, **77**, **80**), Bn \rightarrow L/D-Phe (**74**, **78**, **81/75**); *i*) 1.0 eq. HOBT, 1.05 eq. DCC, 3.5 eq. NMM, THF, 0 °C - r.t. (17 h) (**80**, **81**); 1.0 eq. PyBOB, 2.0 eq. DIPEA, DCM, 0 °C - r.t., 10 d (**79**)

Die kommerziell erhältlichen N-terminal-geschützten Aminosäuren L/D-Leu-Boc und L/D-Phe-Boc (**AS**) wurden mithilfe von PPA mit 4-Methylpiperazin zu den Verbindungen **72** - **75** umgesetzt, die in schlechten bis mäßigen (8 - 57 %) Ausbeuten erhalten wurden. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge wurde MP-D-Phe-Boc **75** nicht weiter umgesetzt. Nach Freiset-

zung der Aminfunktion sollten die Amine **76** - **78** an kommerziell erhältliches N-terminal-geschütztes Boc-L-HomoPhe gekuppelt werden.

Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen ausprobiert (Tabelle 4), bis die Produkte **79** - **81** erhalten werden konnte. Die Produktbildungen waren von vielen Nebenreaktionen begleitet, sodass die gewünschten Substanzen **79** - **81** nur in geringer Reinheit und in geringen Ausbeuten erhalten wurden (Tabelle 4).

Die säulenchromatographische Isolierung von Verbindung MP-D-Leu-HomoPhe-Boc **80** war erfolgreich. Dies belegt das NMR-Spektrum der isolierten Fraktion 3, welche nur einen DC-Spot enthielt, der mit Ninhydrin reagierte. Allerdings war das zu dem Zeitpunkt verwendete Cyclohexan durch den Hersteller kontaminiert. Das NMR-Spektrum zeigte die charakteristischen starken Signale der Verunreinigungen, die für die scheinbar enorme Ausbeute (250%) verantwortlich waren. Nach einem zweiten Aufreinigungsschritts von **80** mittels Extraktion und Säulenchromatographie unter Verwendung von Wasser, Ethanol, Dichlormethan und Ethylacetat konnten nur Zersetzungsprodukte isoliert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen zur Kupplung von HomoPhe-Boc an die Amine **76 - 78**

	Reagenzien	Resultat
79	HATU, DIPEA, CHCl ₃ , 100 °C, 2 h mikrowelle	kein Produkt ^a
79	PPA, NMM, DMF, 0 °C - r.t., 72 h	kein Produkt ^b
79	PyBOB, DIPEA, DCM, 0 °C - r.t., 10 d	158% Rohprodukt
80	DCC, HOBT, NMM, THF, 0 °C - r.t., 15 h	250% nach SC ^c
81	DCC, HOBT, NMM, THF, 0 °C - r.t., 15 h	3.4% ^d

a ggf. Prod entstanden, aber 14 Spots auf dem DC, keine Trennung möglich

b Edukt mit 39% nach Säulen zurückgewonnen

c inkl. Verunreinigung aus Cy, nur Isolieren von Zersetzungsprodukten nach weiterer Aufreinigung

d Rohausbeute: 106%, ggf. Zersetzung während Aufreinigung

Verbindung MP-L-Phe-HomoPhe-Boc **81** wurde zu 106% roh erhalten, das Rohprodukt zeigte 10 Spots auf dem DC. Da das NMR-Spektrum des Rohprodukts den Eindruck einer guten Ausbeute erweckte, wurde eine umfangreiche säulenchromatographische Aufreinigung mittels Gradienten von sehr unpolar (Pentan) bis polar (EtOH) angestrengt. Das Produkt **81** wurde dennoch nur in sehr geringer Ausbeute isoliert (3.4%), konnte aber mit-

tels Massenspektrometrie bestätigt werden. Verbindung MP-L-Leu-HomoPhe-Boc **79** wurde auf verschiedenen Wegen versucht darzustellen. Nachdem mit der gängigen Kupplungsmethode unter Verwendung von PPA lediglich das Edukt zurückgewonnen werden konnte (Tabelle 4), wurden andere Reagenzien gewählt. Da Kupplungen von HomoPhe an Peptide mittels HATU in der Mikrowelle als erfolgreich beschrieben sind [50], wurde diese Variante versucht. Sie blieb allerdings ohne nachhaltigen Erfolg, da ein Produktgemisch entstand, das nicht aufzutrennen war. Eine Kupplung über einen Zeitraum von 10 d mit PyBOB erwies sich letztlich als zielführend, wie das NMR-Spektrum des Rohprodukts und Signale im Massenspektrum bewiesen. Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten wurde dieses Synthese-Projekt jedoch nicht weiter verfolgt.

4.4 Untersuchung der Reaktionskinetik von Vinylsulfonen

4.4.1 Messungen mittels NMR — bekannte Verfahren

Die Untersuchung der Kinetik der Reaktionen von Vinylsulfonen mit Proteasen kann mit fluorimetrischen Assays erfolgen. Zusätzliche Studien sind in Modellversuchen möglich, in denen niedermolekulare Thiole oder Thiolate als Nucleophile eingesetzt werden und dann spektroskopisch der Reaktionsverlauf der Addition an die Doppelbindung der Vinylsulfone verfolgt wird. In Enzym-Assays und *in vivo* verlaufen derartige Reaktionen nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, da das Enzym E im Vergleich zum Inhibitor I im Unterschuss vorliegt ($[E] \ll [I]$), und sich somit die Konzentration von I während der Reaktion kaum ändert. In Modellreaktionen lassen sich beliebige Konzentrationsverhältnisse $\frac{[E]}{[I]}$ bzw. $\frac{[T]}{[I]}$ mit T= Thiol(at) einstellen, sodass die Addition an eine Doppelbindung zusätzlich als eine Reaktion mit einer Kinetik zweiter Ordnung untersucht werden kann. [72, 73] Vinylsulfon und Thiol oder Thiolat liegen dann in etwa gleicher Konzentration vor und beeinflussen über diese die Reaktionsgeschwindigkeit.

Theorie zur Kinetik 2. Ordnung: [72]

Ist eine Reaktion



bezüglich der Ausgangsverbindungen A und B jeweils 1. Ordnung und insgesamt 2. Ordnung, gilt mit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 :

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_2 [A] [B] \quad (42)$$

Da der Verbrauch eines Teilchens A von der Ausgangskonzentration $[A]_0$ auch den Verbrauch eines Teilchens B von $[B]_0$ mit sich zieht, lässt sich ersetzen:

$$[A]_0 - [A] = [B]_0 - [B] \quad (43)$$

bzw.

$$[B] = [A] + [B]_0 - [A]_0 \quad (44)$$

Nach Integration der Gleichung 42 über die Zeit t ergibt sich

$$\ln \frac{[A]}{[B]} = \ln \frac{[A]_0}{[B]_0} + ([A]_0 - [B]_0)k_2t \quad (45)$$

Trägt man nun $\ln \frac{[A]}{[B]}$ gegen die Zeit t auf, muss sich eine Gerade mit einer Steigung proportional zu k_2 ergeben, falls eine Kinetik 2. Ordnung vorliegt (Abbildung 55). Die Geschwindigkeitskonstante

k_2 lässt sich aus der Steigung der Geraden durch Division durch den Term $([A]_0 - [B]_0)$ berechnen. Ergibt sich bei der Auftragung der gemessenen Werte in der angegebenen Weise keine Gerade, lässt sich eine Kinetik 2. Ordnung ausschließen.

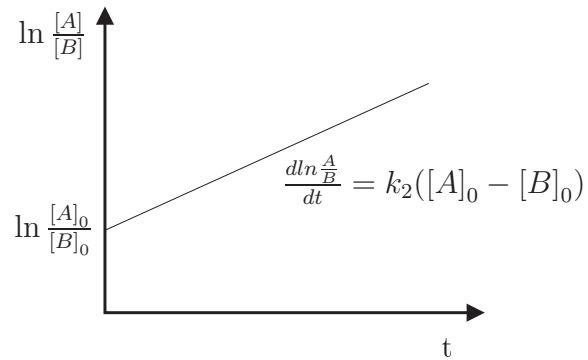


Abbildung 55: Auftragung des Reaktionsverlaufs einer Reaktion 2. Ordnung gegen die Zeit

Theorie zur Kinetik pseudo-erster Ordnung: [72]

Kann bei einer Reaktion zweiter Ordnung erreicht werden, dass die Konzentration eines der beiden Reaktanden, z. B. $[B]$, konstant ist oder im Überschuss vorliegt, sodass sich dessen Konzentration während der Reaktion kaum verändert, kann man ein Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung annehmen. Gleichung 42

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_2 [A] [B]$$

vereinfacht sich mit

$$[B] \approx [B]_0 = \textit{konstant} \quad (46)$$

zu

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_2' [A] \quad (47)$$

mit

$$k_2' = k_2 [B]_0 \approx k_2 [B] \quad (48)$$

Integration von Gleichung 47 liefert

$$A = A_0 \exp^{-k_2' t} \quad (49)$$

Linearisierung führt zu

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_2' t \quad (50)$$

Aus der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung k_2' kann durch Division durch die Ausgangskonzentration des Reaktionspartners im Überschuss, $[B]_0$, die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 bestimmt werden.

Parameterbestimmung mit dem Levenberg-Marquart-Algorithmus: [66, 74]

Anstelle einer graphischen Auftragung der linearisierten Daten, ist auch eine nicht-lineare Parameteroptimierung an die experimentellen Daten möglich. Diese Methode ist aufgrund ihrer besseren Resultate zu bevorzugen, da der Messfehler bei der verwendeten Methode der NMR-Spektroskopie unabhängig von der Zeit t des Experiments, und somit auch unabhängig von der Größe des eigentlichen Messsignals ist. Für den Fit an eine Reaktion 2. Ordnung wurde die Formel

$$I(t) = p \cdot \frac{1}{(k_2 \cdot t + \frac{1}{[A_0]})} - o \quad (51)$$

verwendet. Dabei ist I die Intensität bzw. das Integral des gemes-

senen Signals, k_2 die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, t die Messzeit, A_0 die anfangs eingesetzte Konzentration, o der Offset, der eventuelles Rauschen berücksichtigt, und p ein Proportionalitätsfaktor, der den direkten Einsatz der Integralwerte anstelle einer separat daraus berechneten Konzentration in die Formel ermöglicht.

Für den Fit an eine Reaktion 1. Ordnung wurde die Formel

$$I(t) = p \cdot e^{\frac{-t}{\tau}} + o \quad (52)$$

verwenden. Dabei ist o der Offset, p der Proportionalitätsfaktor und τ die Zeitkonstante, die mit der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung k_1 in folgender Beziehung steht:

$$\tau = \frac{1}{k_1} \quad (53)$$

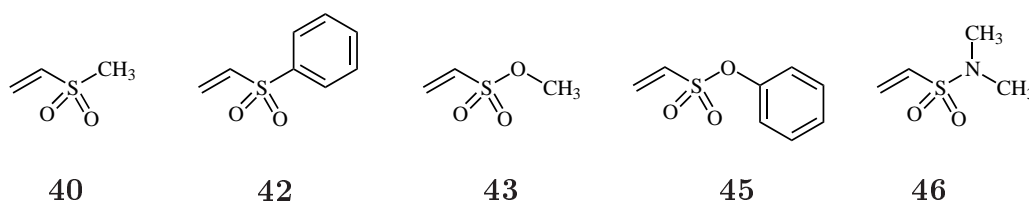


Abbildung 56: untersuchte Vinylsulfone

Das Verhalten der Substanzen **40**, **42**, **43**, **45** und **46** in Gegenwart eines Schwefel-Nucleophils sollte sowohl als Reaktion nach pseudoerster Ordnung und als auch als Reaktion nach zweiter Ordnung

mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht werden. Als Modell für die Cystein-Protease sollte ein geeignetes Thiol verwendet werden. Für alle im Folgenden beschriebenden Reaktionsbedingungen wurden jeweils parallel Stabilitätsmessungen durchgeführt, um den Einfluss der Umgebung auf die Reaktion auszuschließen. Es wurde explizit die Stabilität der Vinylsulfone sowie die der Thiole bei den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ausgetestet, um eine eindeutige Korrelation der beobachteten Abnahme der Signale mit der ablaufenden Additionsreaktion zu gewährleisten.

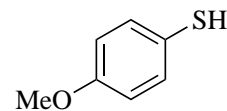
Um das aktive Zentrum der Protease zu simulieren, müsste ein Thiol mit einem pK_s -Wert von etwa 3-4 in wässrigem Milieu verwendet werden. Diesen pK_s -Wert weist z. B. *p*-Nitrothiophenol auf. Dennoch ist dieses Thiol für die Modellreaktion völlig ungeeignet, da durch den -M-Effekt der Nitrogruppe in *para*-Position die Nucleophilie des Thiolats stark herab gesetzt ist. Es wurde stattdessen *p*-Methoxythiophenol **47** in einem 50 mM Phosphatpuffer, bestehend aus Kaliumdihydrogenphosphat und Kaliumhydrogenphosphat, mit $\text{pH} = 7.6$ in D_2O verwendet. Der pK_s -Wert der Thiolgruppe liegt bei 7.4-7.8. [75] Nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (54)$$

liegt bei diesem pH-Wert das Thiol etwa zu 50% deprotoniert vor und weist dann eine noch höhere Nucleophilie auf. Die Wahl des Thiols stellt einen Kompromiss dar. Es wurde mit diesem Thiol eines gewählt, dessen pK_s -Wert gerade so niedrig ist, das bei einem pH-Wert von 7.6 mindestens 50% deprotoniert vorliegen. Saurere Bedingungen würden zur Protonierung des Thiolats führen und die Nucleophilie herabsetzen. Außerdem sollte das Thiol NMR-spektroskopisch gut analysierbar sein. *p*-Methoxythiophenol wurde aus diesen Gründen bereits in früheren Untersuchungen [5, 68, 75] erfolgreich als Modell-Thiol eingesetzt.

Messungen mit *p*-Methoxythiophenol 47 in Phosphatpuffer

In einem NMR-Röhrchen wurde die Reaktion von *p*-Methoxythiophenol 47 und Methylvinylsulfon 40 in einem 50 mM Phosphatpuffer von pH=7.6 angesetzt und der Reaktionsverlauf anhand der



p-Methoxythiophenol 47

Änderung der Integrale des vinylichen Protons von Methylvinylsulfon 40 bei 6.505 ppm verfolgt. Die Konzentrationen des Sulfons und des Thiophenols betragen je 1.25 mM. Abbildung 57 zeigt die beobachtete Änderung des Integrals des vinylichen Protons mit der Zeit. Es ist in keinem Zeitintervall

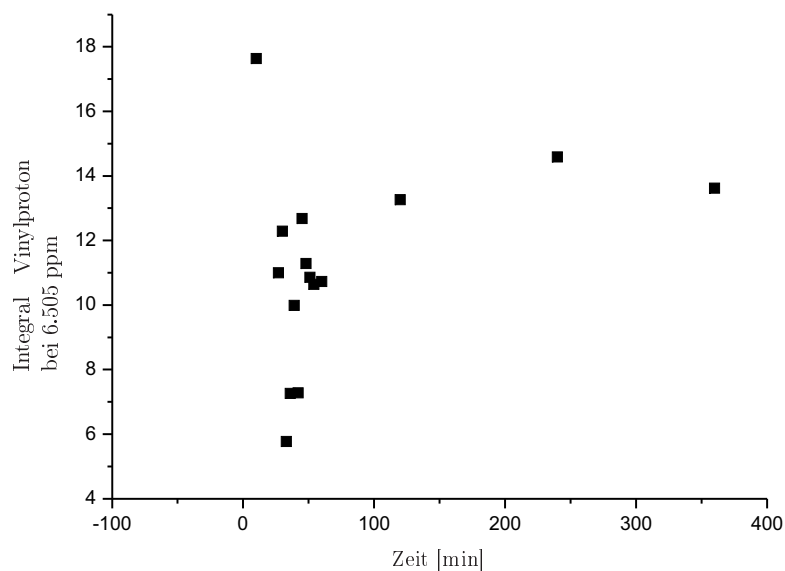
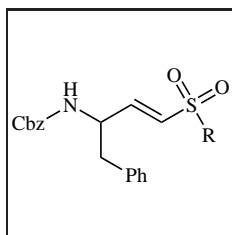


Abbildung 57: Reaktion von *p*-Methoxythiophenol mit Methylvinylsulfon 40 im Phosphatpuffer pH=7.6

ein Kurvenverlauf zu erkennen, der eindeutig einer Kinetik erster oder auch zweiter Ordnung zuzuordnen wäre. Die erfassten Daten

erscheinen ungeordnet und lassen den Schluss zu, dass es während der Messung zu störenden Nebenreaktionen kommt. Es wurde daher nach neuen Messbedingungen gesucht, die eine eindeutige kinetische Untersuchung der Reaktion ermöglichen sollten.

Messungen mit 2-Phenylethanthiol **48** in MeOD



Von *Reddick et al.* untersuchte Vinylsulfone mit R= OPh, Ph, OEt, N(Me)OBn, NHOBn, N(Me)Bn und NHBn

Eine Methode, mit der die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordner bestimmt wurden, ist 2003 von *Reddick et al.* beschrieben. [76] Sie verwendeten 2-Phenylethanthiol **48** (CAS: 4410-99-5) in deuteriertem Methanol. Als Base wurde TEA eingesetzt, die Reaktionen wurden eine Stunde lang beobachtet. Die Geschwindig-

keitskonstanten pseudo-erster Ordnung (jeweils in Klammern angegeben) wurden relativ zum langsamsten Vertreter der Vinylsulfone der links in der Abbildung dargestellten Struktur mit den Resten R= OPh (3000), Ph (120), OEt (90), N(Me)OBn (150), NHOBn (50), N(Me)Bn (3) und NHBn (1) angegeben.

Die Reaktion von 2-Phenylethanthiol mit den Vinylsulfonen **40**, **42**, **43**, **45** und **46** wurden bei denselben Bedingungen verfolgt. Die Konzentrationen von VS und Base betragen demnach

je 10 mM, während das Thiol im Überschuss (78 mM) eingesetzt wurde.

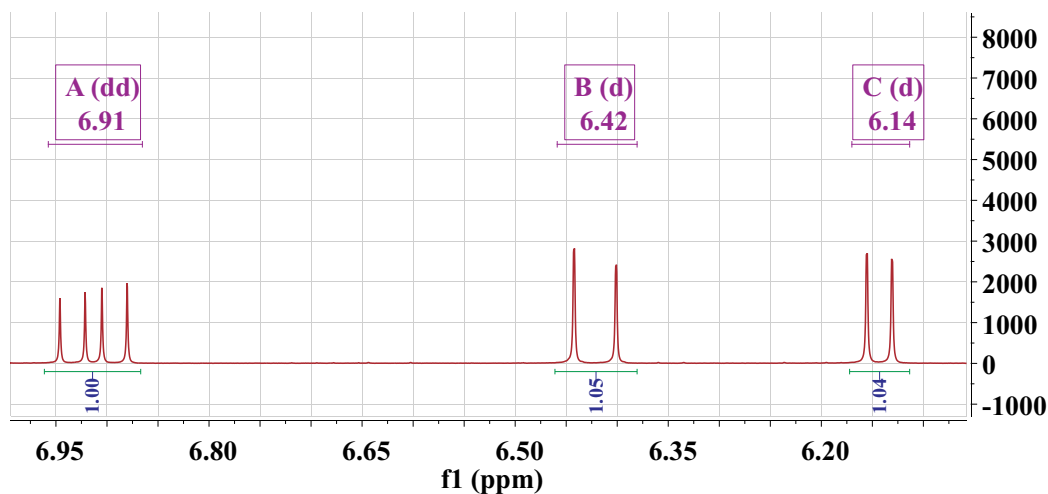


Abbildung 58: Charakteristische Vinylprotonen am Bsp. von PhVS 42

Beobachtet wurde die Abnahme der Vinylsulfone anhand ihrer signifikanten NMR-Signale. Diese waren für das jeweilige Vinylsulfon die drei Dubletts der vinyllischen Protonen bei 6 – 7 ppm (Abb. 58 am Bsp. von PhVS 42), die durch die Addition des Thiolats verschwinden. Aus den Verhältnissen der Integrale der ^1H -NMR-Signale lassen sich bei Kenntnis der Ausgangskonzentrationen die Konzentrationen der einzelnen Stoffe zu jedem Zeitpunkt bestimmen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Summe der Konzentrationen an Vinylsulfon und Addukt der Ausgangskonzentration an Vinylsulfon entspricht.

Die Ergebnisse von *Reddick et al.* konnten nur näherungsweise reproduziert werden. Nur für die Vinylsulfone MeVS 40 und

OMeVS **43** ließen sich vernünftige Kurven an die Messdaten fit-ten. Die Geschwindigkeitskonstanten ergaben sich zu

$$k_2'(\text{MeVS}) = 0.015 \pm 0.0045 \text{ s}^{-1}$$

$$k_2'(\text{OMeVS}) = 0.0073 \pm 0.0019 \text{ s}^{-1}$$

wobei letztere bereits einen großen Fehler aufweist. Das Sul-
fonamid **46** reagierte zu langsam, sodass in der angegebenen Zeit
(1 h) keine Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden konnte.
Nach 100 min war das Integral erst auf 60% abgefallen. Vollstän-
diger Umsatz wurde nach 3 d festgestellt. Im Gegensatz dazu ste-
hen OPhVS **45** und PhVS **42**, bei denen die Reaktion für die
zur Messung zur Verfügung stehende technische Ausstattung zu
schnell ablief. OPhVS **45** war bereits bis zum Zeitpunkt der ersten
Messung (120 s nach Reaktionsstart) vollständig umgesetzt. Die
Reaktion mit PhVS **42** lieferte bis zum Reaktionsende drei Mess-
punkte, die nicht zur zuverlässigen Auswertung mit der Gleichung
52 herangezogen werden können. Es lässt sich somit im Großen
und Ganzen der von *Reddick et al.* gefundene Trend bestätigen:
OPhVS > PhVS > MeVS (ohne Vgl) > OMeVS (Vgl. OEt) >
NMe₂VS (Vgl. N(Me)Bn). Da *Reddick et al.* nur relative Abhän-
gigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten angeben und nicht die
gemessenen Konstanten selbst, können die hier bestimmten Werte
für MeVS und OMeVS nicht mit diesen verglichen werden. *Red-*

dick et al. selbst werfen die Frage auf, wie die unterschiedlichen Reaktivitäten einiger *Reddick*-Sulfonamide in Bezug auf *Reddick*-PhVS zustande kommen. Welchem *Reddick*-Sulfonamid das hier vermessene **46** tatsächlich am nächsten kommt, ist nicht eindeutig. Interessant ist auch die Frage nach der Zeitskala auf der *Reddick et al.* ihre Verbindungen untersucht haben, die sie mit einer Stunde angeben. Einerseits gibt es *Reddick*-OPh, das 3000-mal schneller reagiert als das langsamste Sulfonamid, aber noch genug Datenpunkte für eine zuverlässige Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten mittels NMR liefern muss. Andererseits sollten für eine exakte Bestimmung der Reaktionskonstanten die Verbindungen innerhalb dieser Stunde annähernd vollständig reagiert haben. Dieses Verhalten konnte für NMe₂VS **46** nicht bestätigt werden. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass aufgrund des sterischen Unterschieds durch die zusätzliche Substitution der *Reddick*-Vinylsulfone sicherlich eher niedrigere Geschwindigkeitskonstanten zu erwarten sind als für die hier diskutierten Vinylsulfone, da mit der anspruchsvolleren Sterik größere Aktivierungsenergien einhergehen (s. Kapitel 4.1).

4.4.2 Messungen mittels IR

Da die Reaktionen der Vinylsulfone mit dem Thiolat von 2-Phenylethanthiol teilweise sehr schnell ablaufen, sollte eine Detektionsmethode gefunden werden, mit der die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen besser erfasst werden können. Die zeitaufgelöste Infrarot-Spektroskopie ist aufgrund mehrerer Faktoren eine gute Wahl. Wie in der NMR-Spektroskopie können den funktionellen Gruppen der Moleküle eindeutige Signale zugeordnet werden. Im Fall der Vinylsulfone sind natürlich die Banden der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung, die während der Reaktion verschwinden, von besonderer Bedeutung. An ihrer statt sollten zusätzliche Banden im Schwingungsbereich von gesättigten S-C- und C-C-Fragmenten auftreten. Die Signale können getrennt voneinander interpretiert werden, sobald die Wellenzahlen ihrer Signale ausreichend unterschiedlich sind, was bei den meisten funktionellen Gruppen gegeben ist. Somit ist die Reaktion zusätzlich an funktionellen Gruppen eindeutig zu beobachten, die nur geringe Änderungen durch die Reaktion erfahren, wie z.B. an der Verschiebung der SO₂-Schwingungsbanden der Vinylsulfone, die durch die veränderte elektronische Molekülstruktur entsteht. Ein klarer Vorteil der IR-Technik gegenüber der NMR-Methode ist die Genauigkeit der Ergebnisse, die sich aus der unterschiedli-

chen Auswertung der Spektren ergibt. Für die NMR-Messungen wird ein interner Standard benötigt, mit dessen genauer Erfassung alle Ergebnisse stehen und fallen. Zudem sind die manuelle Festlegung und Auswertung der Integrale sowie das Rauschen der Basislinie unumgängliche Fehlerquellen. Aufgrund der Fourier-Transformation ist im IR die Frequenzachse immer eindeutig gegeben und eine Kalibrierung entfällt. Bei der IR-Methode wird vor der eigentlichen Messung ein Hintergrund aufgenommen, der den Zusatz eines internen Standard ersetzt. Alle Änderung in den Banden können direkt von diesem Hintergrund subtrahiert werden, die Werte sind somit exakter als die mittels internem Standard relativ berechneten Integrale im NMR-Spektrum. Als dritter Punkt, der für die Kinetik eine entscheidende Rolle spielt, ist die Totzeit zu nennen, die bei der IR-Messmethode deutlich kleiner ist, da das Gerät nicht auf die Probe eingestellt werden muss (Vgl. Lock, Shim) und so das erste Spektrum nach wenigen Sekunden erhalten werden kann.

IR-Messungen ohne Base

Zuerst sollten die Vinylsulfone **40**, **42**, **43**, **45**, und **46** hinsichtlich ihrer Reaktivität mit dem neutralen 2-Phenylethanthiol **48** untersucht werden. Da z.B. die SARS-Protease in ihrem aktiven Zen-

trum eine Thiolfunktion aufweist, ist es interessant, ob die anvisierten Inhibitoren reaktiv genug gegenüber schwächeren Nucleophilen (Thiolen) sein würden oder ob hier eventuell eine Selektivität für starke Nucleophile (Thiolate) erreicht werden kann. Die Reaktionen wurden über einen Zeitraum von 10000 s verfolgt. Für eine gute Auflösung wurde eine VS-Konzentration von ca. 30 mM ausgewählt und die Reaktionen wurden in deuteriertem Methanol durchgeführt. Die Verwendung von deuteriertem Methanol hatte einerseits den Vorteil, dass parallel die Reaktion qualitativ mittels NMR-Spektroskopie verfolgt werden konnte, um die Bildung der richtigen Additionsprodukte zu gewährleisten. Andererseits absorbiert MeOD im Gegensatz zu MeOH in einem Bereich, der für die Reaktion wichtigen Banden nicht überlagert.

Die IR-Messungen ergaben, dass nur PhVS **42** und OPhVS **45** in dem gewählten Zeitraum mit 2-Phenylethanthiol reagieren. Die ausschließliche Bildung der beiden Reaktionsprodukte wurde mittels anschließender NMR- und LC-MS-Analysen bestätigt. Die Grafiken 59 und 60 zeigen die relevanten Ausschnitte des Differenzspektrums zum Zeitpunkt $t=10000$ s beispielhaft für die Reaktion mit PhVS **42**.

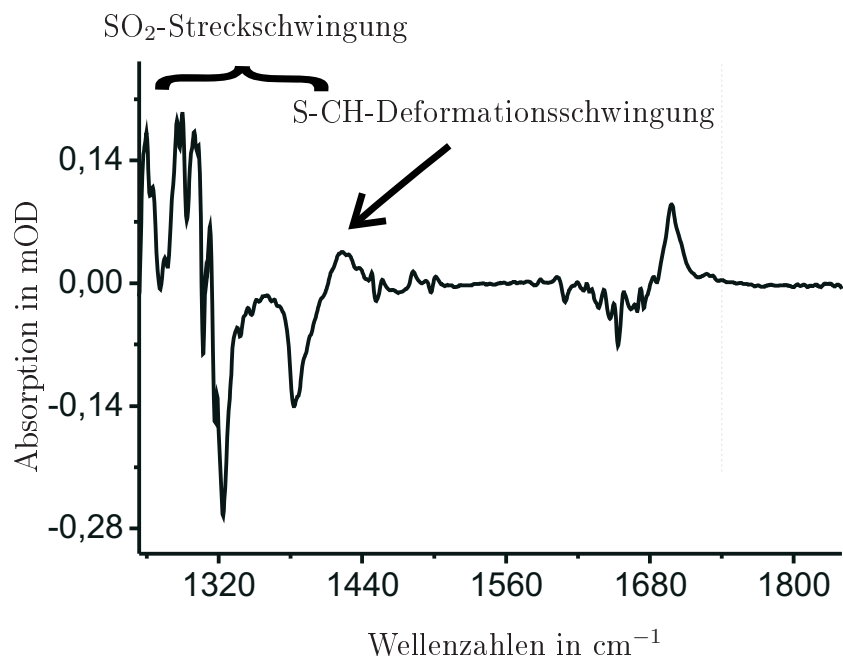


Abbildung 59: Differenzspektrum der Reaktion von PhVS 42 mit 2-Phenylethanthiol zum Zeitpunkt $t=10000$ s

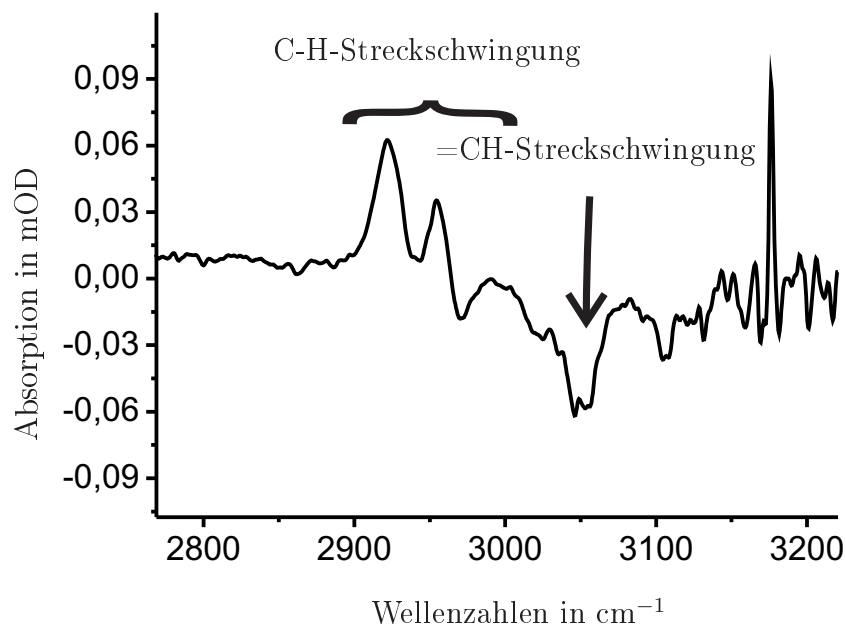


Abbildung 60: Differenzspektrum der Reaktion von PhVS 42 mit 2-Phenylethanthiol zum Zeitpunkt $t=10000$ s

Deutlich sind die signifikanten Änderungen der funktionellen Gruppen zu erkennen. Die Bande der Vinyleinheit bei 3049 cm^{-1} nimmt mit der Zeit nur ab, während die C-H-Streckschwingungen unterhalb von 3000 cm^{-1} zunehmen oder eine Verschiebung erfahren (Abb. 60). Die S-CH-Deformationsschwingung der neu gebildeten S-C-Bindung bei 1423 cm^{-1} nimmt nur zu mit der Zeit, während bei den SO_2 -Schwingungsbanden der Vinylsulfone ($1300 - 1400\text{ cm}^{-1}$) sowohl Abnahme und Zunahmen zu beobachten sind (Abb. 59). Da diese funktionelle Gruppe nicht direkt bei der Reaktion betroffen ist, verschieben sich die Banden auf Grund der veränderten elektronischen Molekülstruktur nur.

Abbildung 61 zeigt den Verlauf der genannten Banden mit der Zeit. Die schwarze (1384 cm^{-1}) und die rote Bande (3049 cm^{-1}) gehören zur SO_2 -Gruppe bzw. der Vinyleinheit. Die Banden nehmen wie erwartet während der Zeit ab. Im Gegensatz dazu gehören die pinke (2923 cm^{-1}) und die blaue (1423 cm^{-1}) Bande zum gesättigten C-C- bzw. S-C-Fragment des Produkts. Die Signale nehmen mit der Zeit zu. Die auf den ersten Blick unterschiedlich stark erscheinende Zu- oder Abnahme der Banden, lässt sich mit den unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der funktionellen Gruppen erklären. Diese lassen sich allerdings in einem Proportionalitätsfaktor berücksichtigen, sodass alle Parameter global mit

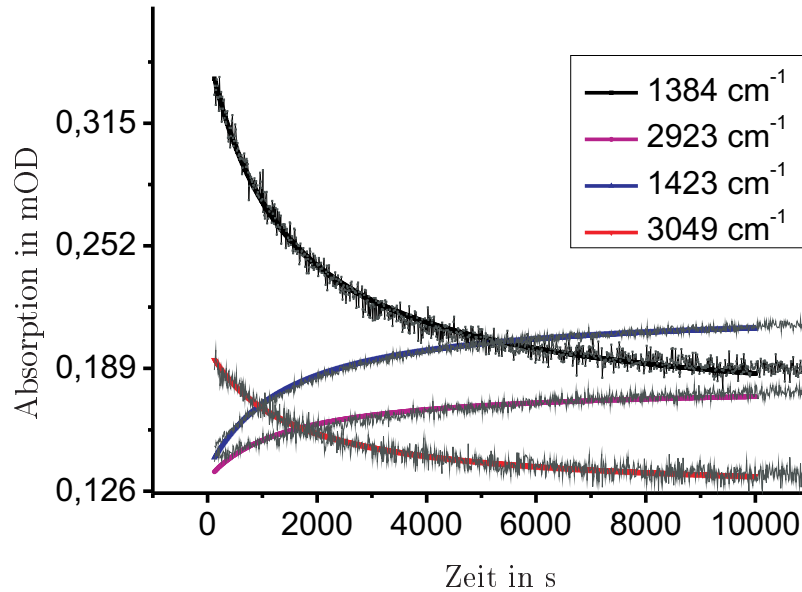


Abbildung 61: Globaler Fit der Parameter an die Daten der Reaktion von PhVS 42 mit 2-Phenylethanthiol bei verschiedenen Wellenzahlen

der nachstehenden Formel an die Messreihen gefittet werden können.

$$[A] = p \cdot \frac{1}{(k_2 \cdot t + \frac{1}{[A_0]})} - o \quad (55)$$

Dabei ist k_2 die gesuchte Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, A_0 die anfangs eingesetzte Konzentration, p der Proportionalitätsfaktor und o der offset, der die Überlagerung unterschiedlicher Schwingungen berücksichtigt, die nicht an der Reaktion beteiligt sind, und somit den konstanten Anteil der Absorption beschreibt.

Mit dieser Formel lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten für PhVS und OPhVS bestimmen:

$$k_2(\text{PhVS}) = 0.0211 \pm 0.00046 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$$

$$k_2(\text{OPhVS}) = 0.0062 \pm 0.00031 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$$

Die Reaktion von PhVS ist also etwa 3.4-Mal schneller.

Messungen mit Base

Als nächstes sollten die Reaktionen der Vinylsulfone **40**, **42**, **43**, **45**, und **46** mit dem Thiolat von 2-Phenylethanthiol untersucht werden, welches durch Zusatz von einer geeigneten Base *in situ* generiert wurde. Triethylamin besitzt im Wellenzahlenbereich von 2700 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} starke Absorptionsbanden mit Halbwertsbreiten von bis zu 100 cm^{-1} . [77] Da dieser Spektralbereich für die zu untersuchenden Reaktionen wesentlich ist, wurde TEA durch kommerziell erhältliches Natriummethylat ersetzt, welches sich allerdings ebenfalls schnell als untauglich erwies. Einen ähnlichen pK_s -Wert wie NaOMe weist NaOH auf, das zudem keine zusätzlichen Banden generiert. Alle Vinylsulfone wurde je dreimal mit einer VS-Konzentration von ca. 30 mM und 2 eq. Thiol vermessen. Die Basenkonzentration betrug 1% der VS-Konzentration, also 0.3 mM. Es konnte in allen Fällen eine Abnahme der VS-Banden beobachtet werden, allerdings in keinem Fall eine Zunah-

me der erwarteten Produktbanden. Auch die Banden des Thiols nahmen ab. Um dieses Verhalten zu deuten, wurden das Thiol und die Base in Abwesenheit der Vinylsulfone bei denselben Bedingungen untersucht. Erneut wurde die Abnahme bzw. Verschiebung der Thiolbanden beobachtet, die offenbar aus einer Reaktion mit der Base herrühren. NMR-Messungen derselben Reaktionslösung deuteten auf keine strukturelle Veränderung der Moleküle während der Nebenreaktion hin. Möglicherweise ist die beobachtete Reaktion die Deprotonierung des Thiols durch die Base, welche im NMR-Spektrum nicht unbedingt ersichtlich ist. Das IR-Experiment wurde daher über 10 h verfolgt, um zu überprüfen, ob sich in dieser Zeit ein Gleichgewicht einstellt. Dann hätte man die Base-Thiol-Mischung ausreichende Zeit vorlegen können und anschließend die Reaktion dieser Mischung mit den Vinylsulfonen untersuchen können. Da aber auch nach 10 h nur undefinierbare Bandenänderungen zu sehen waren, blieb nur die Möglichkeit offen, eine neue Methode zu entwickeln, die die Messung der Geschwindigkeitskonstanten mittels NMR ermöglichte.

4.4.3 Messungen mittels NMR — neue Verfahren

Bei der Entwicklung der neuen Messmethode sollte ebenfalls die Schwachstelle der bisherigen Messmethoden, in der die tatsächliche Konzentration des Thiolats nicht ermittelbar war, behoben werden. Da sich 2-Phenylethanhiol in MeOD bisher als NMR-spektroskopisch gut analysierbar gezeigt hat, wurde es als Nucleophil beibehalten. Der pK_s -Wert ist nicht bestimmt, lässt sich aber mit Hilfe von Ethanthiol ($pK_s= 10.5$ [78]) und Phenylmethylmercaptan ($pK_s= 9.43$ [79]) auf ungefähr 10 abschätzen. Es wurde zum einen die Reaktion des Thiols mit den Vinylsulfonen unter den bei den IR-Messungen verwendeten Bedingungen durchgeführt, um die Methoden vergleichen zu können. Zum anderen wurden die entsprechenden Reaktionen mit dem Thiolat von 2-Phenylethanthiol untersucht. Dieses wurde *in situ* durch Zusatz von einer ausreichend starken Base generiert, sodass die Deprotonierung irreversibel stattfand und die Thiolatkonzentration der ursprünglichen Thiolkonzentration entsprach. Die Konzentrationen von VS und Thiol in MeOD wurden mit 31 mM ähnlich hoch gewählt wie bei den IR-Messungen, um eine gute Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Als Standard wurde der Lösemittelrestpeak von MeOD bei 3.31 ppm verwendet, da sein Integral in der Größenordnung der restlichen Signale lag und dies eine geringe Fehlerquelle

bietet. Das Integral wurde auf 10 definiert. Die Messdauer betrug in der Regel 10000 s. Zudem wurden bei unvollständigem Umsatz bis zu diesem Zeitpunkt in den darauf folgenden Tagen Kontrollmessungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich ggf. um sehr langsame oder stark verzögerte Reaktionen handelte.

Messungen mit 2-Phenylethanthiol in deuterierten Methanol ohne Base

Zunächst wurde die Reaktion der Vinylsulfone **40**, **42**, **43**, **45** und **46** mit 2-Phenylethanthiol ohne Zusatz von Base untersucht. Nur für die Reaktion von PhVS **42** konnte ohne Basenzusatz die gewünschte Adduktbildung beobachtet werden. In den Reaktionen mit den anderen Vinylsulfonen zeigte sich kein Umsatz. Grafik 62 zeigt die Überlagerung der NMR-Spektren zu den Zeitpunkten $t=0$ s (rot) und $t=2109$ s (türkis) der Reaktion des Thiols mit PhVS **42**. Nach etwa 35 min ist das Integral der vinyllischen Protonen auf 57% abgefallen. Ebenfalls deutlich zu erkennen sind die Verschiebungen der Signale in den aromatischen (VS und Thiol) und aliphatischen (Thiol) Bereichen, die sich aus der veränderten elektronischen Umgebung nach der Addition des Thiols an die Doppelbindung ergeben.

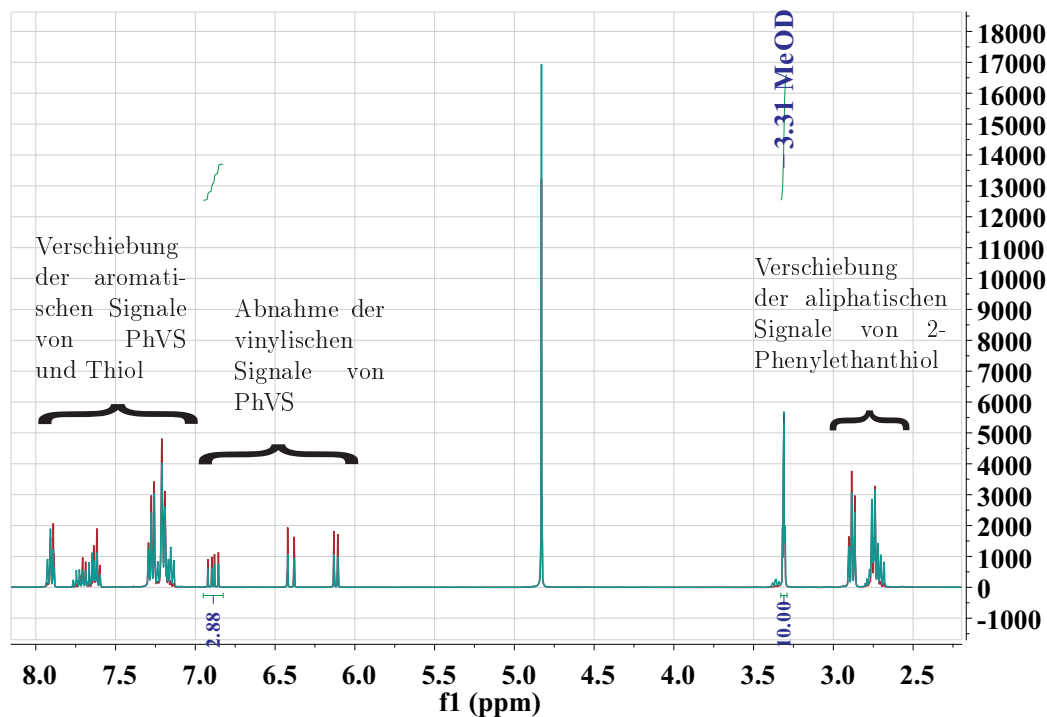


Abbildung 62: Überlagerung der Signale der Reaktion von PhVS 42 mit 2-Phenylethanthiol zu den Zeitpunkten $t=0$ s (rot) und $t=2109$ s (türkis)

Die Integrale des Vinylprotons bei 6.85 – 6.95 ppm in Abhängigkeit von der Zeit sind in schwarz in Grafik 63 aufgetragen. Mit rot ist die an die Daten gefittete Kurve dargestellt. Mit Hilfe der beschriebenen Gleichung 51 wurde die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung zu

$k_2(\text{PhVS-NMR})=0.0128 \pm 0.0015 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ bestimmt. Die unter denselben Bedingungen mittels IR erhaltene Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für PhVS betrug

$$k_2(\text{PhVS-IR})= 0.0211 \pm 0.00046 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$$

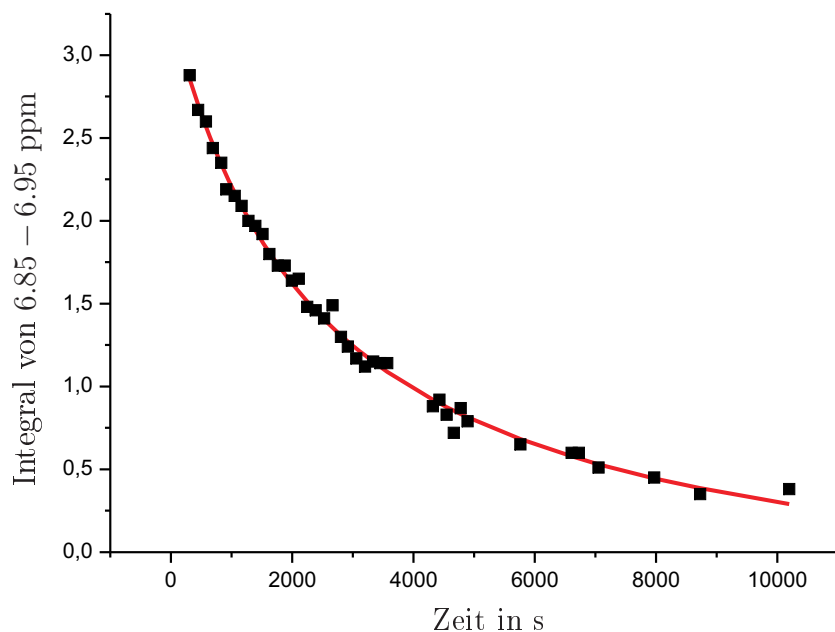


Abbildung 63: Abnahme der Integrale des Vinylprotons von PhVS 42 bei 6.85 – 6.95 ppm mit der Zeit (schwarz) und Fit an die Daten (rot) (mittels Gleichung 51)

Obwohl sich die Werte leicht unterscheiden, zeigen beide Messmethoden für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_2 eine gute Korrelation, da die Konstanten noch in derselben Größenordnung liegen. Geschwindigkeitskonstanten sind temperaturabhängig. Wählt man in der Arrhenius-Gleichung

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (56)$$

für die Reaktion mit PhVS eine Aktivierungsenergie E_a um die 12.4 kcal (Vgl. Tabelle 2, Kapitel 4.1) und nimmt an, dass der Arrhenius-Faktor in beiden Messungen identisch ist, erhält

man für die zu den gemessenen k_{IR} und k_{NMR} korrespondierenden Temperaturen T_{IR} und T_{NMR} nur eine Temperaturdifferenz von etwa 7 °C. Da in unterschiedlichen Räumen mit unterschiedlichen Messgeräten gearbeitet wurde und die tatsächliche Aktivierungsenergie nicht bekannt ist, erscheint die gefundene Abweichung der beiden Werte plausibel.

Es fällt auf, dass mittels NMR-Spektroskopie keine Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von 2-Phenylethanthiol mit OPhVS ermittelt werden konnte. Die mittels IR-Spektroskopie bestimmte Konstante liegt bei $k_2(\text{OPhVS}) = 0.0062 \pm 0.00031 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$. Vielleicht ist dies ebenfalls durch die Temperaturabhängigkeit sowie durch die geringe Größe der Geschwindigkeitskonstanten zu erklären, da der deutlich langsamere Abfall der Signale mittels NMR-Spektroskopie aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der Methode schlechter erfasst werden kann.

Messungen mit Base

Als nächstes wurden die Reaktionen der Vinylsulfone **40**, **42**, **43**, **45** und **46** mit dem Thiolat von **48** untersucht. Da das Thiolat ein viel stärkeres Nucleophil als das Thiol ist, verliefen diese Reaktionen deutlich schneller und es musste ein Weg gefunden werden, die Reaktionsgeschwindigkeit so einzustellen, dass der Konzentrationsabfall der Vinylsulfone mit den NMR-Geräteparametern gut erfasst werden konnte. Eine Möglichkeit die Reaktionsgeschwindigkeit zu kontrollieren, besteht in der Wahl der Konzentrationen der Reaktionspartner. Die Reaktionen wurden daher unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung durchgeführt. Da - bis auf im Fall von PhVS **42** - mit dem Thiol keine Reaktion zu beobachten war, konnte dieses in beliebiger Konzentration zugesetzt werden. Das eigentliche Nucleophil für die folgenden Untersuchungen, das Thiolat, wurde durch den Zusatz einer ausreichend starken Base *in situ* generiert. Als Basen wurden NaOH, KOH und KO^tBu verwendet. Die Wahl der Base beeinflusste jedoch die Reaktion wegen der annähernd gleichen pK_s-Werte der Basen und dem umgebenden Solvens MeOD nicht. Da die zugesetzte Base im Vergleich zum Solvens nur einen geringen Prozentsatz ausmacht, ist zu vermuten, dass sich ein Gleichgewicht einstellt und die hauptsächlich agierende Base in allen Fällen MeO⁻ ist. Aufgrund des deutlich unter-

schiedlichen pK_s -Werts von Base (~ 16) und Thiol (~ 10) kommt es zu einer irreversiblen Deprotonierung, und die Thiolatkonzentration kann über die Basenkonzentration gesteuert werden. Da die anionischen Sulfone nach der Addition des Thiolats einen höheren pK_s -Wert als diejenigen der eingesetzten Basen aufweisen (Vgl. $pK_s(\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_3) = 23$ [80]), wird die eingesetzte Base nur katalytisch benötigt. Die Konzentration der Base und dadurch auch die des Thiolats ist also als konstant anzusehen und somit sind die Bedingungen pseudo-erster Ordnung erfüllt. Parallele Messungen zum Reaktionsverhalten von VS und Base wurden durchgeführt, um evtl. Konzentrationsabnahmen der VS durch Reaktion mit der Base auszuschließen.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der NMR-Experimente. Alle Reaktionen wurden bis zum vollständigen Umsatz verfolgt. Die beste Basenkonzentration für die jeweils zu untersuchende Reaktion wurde experimentell ermittelt, wobei die Basenkonzentrationen von 0.8% bis 50% variiert wurden.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen und Geschwindigkeitskonstanten der Additionsreaktion vom 2-Phenylethanthiolat an Vinylsulfone mit $c(\text{VS})=31 \text{ mM}$

	Verbindung	Base mmol/	Thiol eq.	k_2' 1/s	k_2 L/(mol · s)
1	MeVS 40	1% NaOH = 0.31	2	2.27	7.58
2	PhVS 42	0.8% NaOH = 0.248	1.5	6.68×10^{-3}	26.94
3	OMeVS 43	25% KO ^t Bu = 7.75 ^a	2	9.04×10^{-4}	0.432
4	OPhVS 45	0.8% KO ^t Bu = 0.248	1.5	2.79×10^{-4}	1.126
5	NMe ₂ VS 46	20% NaOH = 8.14 ^b	2	4.032	0.05

a bei dieser Konzentration reagierte die Base in einem durchgeführten Parallelexperiment ebenfalls mit dem VS, allerdings nur sehr langsam, sodass diese Reaktion nur sehr wenig zur Signalabnahme der vinylischen Protonen beiträgt.

b die VS-Konzentration betrug 40.7 mM

Bereits am Ergebnis dieser Testmessungen für die nötige Einstellung der Basenkonzentration ließen sich große Reaktivitätsunterschiede innerhalb der Reihe der Vinylsulfone erahnen. Wird die Basenkonzentration zu niedrig gewählt, verläuft die zu beobachtende Reaktion zu langsam ab, sodass kein Fit an die Daten möglich ist und die Geschwindigkeitskonstanten nicht berechnet werden können. Wird durch eine hohe Basenkonzentration die Reakti-

on zu schnell, ist eine Datenerfassung mittels NMR-Spektroskopie nicht oder zu ungenau möglich, da dann der Großteil der Reaktion bereits vor der ersten Datenaufnahme abgelaufen ist. Mit den optimierten Basenkonzentrationen verliefen alle Reaktionen auf einer Zeitskala, die einen guten Fit an die Daten ermöglichte und somit sinnvolle Ergebnisse für die Geschwindigkeitskonstanten lieferte. Der gute Fit an die Daten, wie exemplarisch in Grafik 64 anhand der Reaktion mit MeVS **40** gezeigt, bestätigt den monoexponentiellen Verlauf der Reaktion. Dadurch sind Konkurrenzreaktionen mit der Base oder dem Thiol auszuschließen. Es ist darauf verzichtet worden, für die Geschwindigkeitskonstanten einen Fehler anzugeben, da der ermittelbare Fit-Fehler nur einen kleinen Beitrag zum Gesamtfehler liefert. Die nicht abschätzbaren Fehler, die sich durch die bereits genannten Fehlerquellen in der NMR-Methode ergeben, machen sicherlich den größeren Anteil aus.

Die k_2' -Werte (Tabelle 5) für die einzelnen Reaktionen sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da Reaktionsbedingungen nicht identisch sind. Durch Division des k_2' -Werts durch die jeweilige Basenkonzentration erhält man die miteinander vergleichbaren k_2 -Werte. Es zeigt sich, dass PhVS **42** mit Abstand am schnellsten reagierte. Es handelt sich offenbar um das reaktivste Vinylsulfon. Dies ist in Einklang mit den bereits vor-

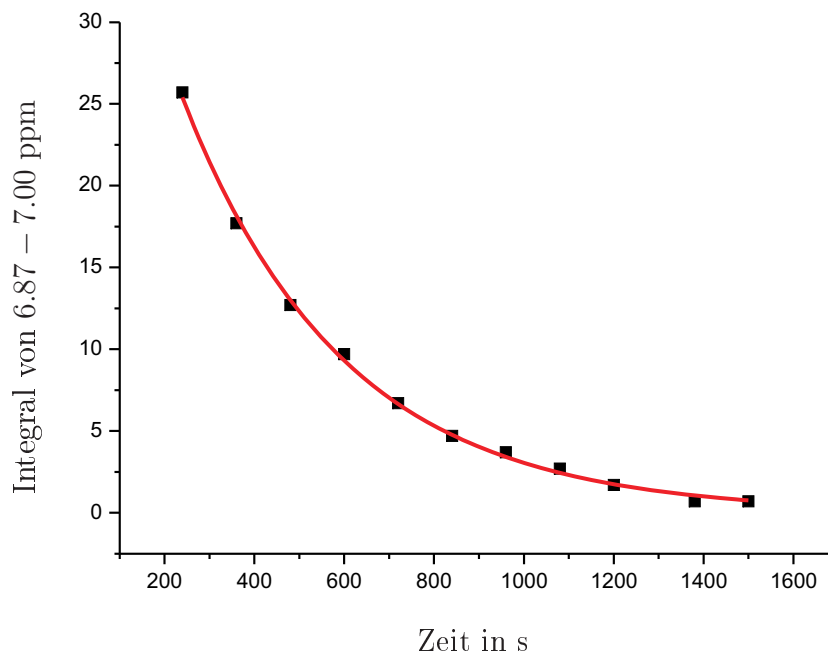


Abbildung 64: Eindeutig monoexponentielle Abnahme der Integrale des Vinylprotons von MeVS bei 6.87 – 7.00 ppm mit der Zeit (schwarz) und Fit an die Daten (rot) mittels Gleichung 52

gestellten IR- und NMR-Ergebnissen der Reaktionen ohne Basenzusatz (Kapitel 4.4.2 und 4.4.3). PhVS **42** reagiert bereits mit dem Thiol und weist in der Reaktion mit dem Thiolat die größte Geschwindigkeitskonstante auf. Eine eventuelle Konkurrenzreaktion zwischen Thiol und Thiolat ist unter diesen Gegebenheiten zu diskutieren, zumal die Konzentration des Thiolats mit 0.8% relativ niedrig gewählt werden musste, um eine gute Messbarkeit der Reaktion mit den vorhandenen Geräteparametern zu garantieren. Die Geschwindigkeitskonstante ohne Base $k_2(\text{oB}) = 0.0128 \pm 0.0015 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ist deutlich kleiner als die

der Reaktion mit Base $k_2(\text{oB}) = 26.94 \pm \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$. Die Thiolkonzentration war 1,5-fach höher im Experiment mit Base als im Versuch ohne Base. Die Konkurrenzreaktion mit dem Thiol sollte also im Experiment mit Base sogar etwas schneller ablaufen. Dennoch zeigen die experimentellen Daten einen eindeutig monoexponentiellen Verlauf, woraus sich schließen lässt, dass die Reaktion mit dem Thiol zu vernachlässigen ist.

Die k_2' -Werte für MeVS **40** und OMeVS **43** wurden bereits unter Zusatz von TEA (10 mM) bestimmt (Kapitel 4.4.1). Sie ergaben sich zu $k_2'(\text{MeVS}) = 0.015 \pm 0.0045 \text{ 1/s}$ und $k_2'(\text{OMeVS}) = 0.0073 \pm 0.0019 \text{ 1/s}$. Daraus berechnen sich nach Division durch 10 mM die k_2 -Werte zu $k_2(\text{MeVS}) = 1.5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ und $k_2(\text{OMeVS}) = 0.73 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, die trotz unterschiedlicher Messmethoden sehr gut mit den Werten aus Tabelle 5 (1.126, 0.0432) übereinstimmen. Die experimentell bestimmte Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeiten ergibt sich demnach für die untersuchten Vinylsulfone zu: Der von *Reddick et al.* beobachte-

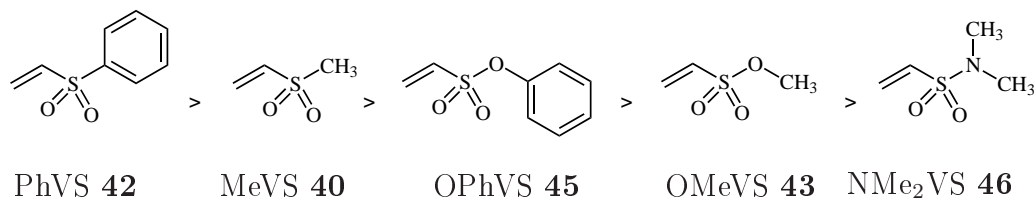


Abbildung 65: Reihenfolge der untersuchten Vinylsulfone bezüglich ihrer Reaktion mit 2-Phenylethanthiol unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung.

ten Trend

O₂PhVS > PhVS > VSOEt > VSN(Me)Bn lässt sich im Großen und Ganzen bestätigen [[76]], jedoch wird hier für die reaktiveren Vinylsulfone O₂PhVS und PhVS die umgekehrte Reihenfolge gemessen. Aufgrund der auch ohne Zusatz von Base beobachteten Reaktion von PhVS mit 2-Phenylethanthiol, erscheint es plausibel, dass PhVS das reaktivste Vinylsulfon ist.

4.5 Untersuchung der Reaktionskinetik von Aziridinen

Das hydroxymethyl-substituierte Aziridin **29** sollte in dieser Arbeit ebenfalls hinsichtlich der Reaktionskinetik mit Thiolen untersucht werden, um einen Vergleich mit dem bereits untersuchten Aziridin-2,3-dicarboxylat **23** sowie dessen stark elektrophilen Derivat **84** anzustellen (Abb. 66). [67, 68, 75] Es wurde daher auf dasselbe Verfahren zur Bestimmung der Reaktionskinetik zurückgegriffen.

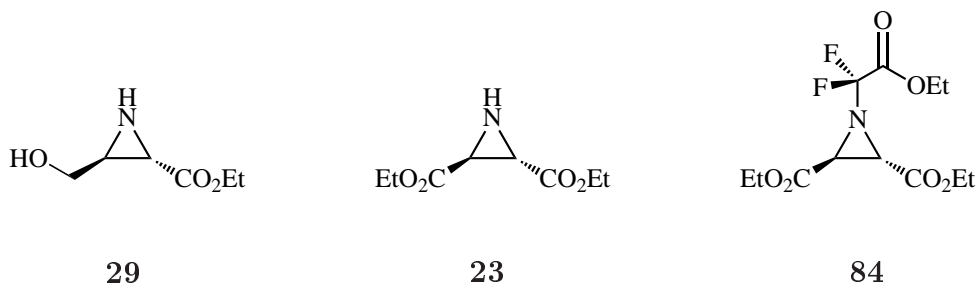
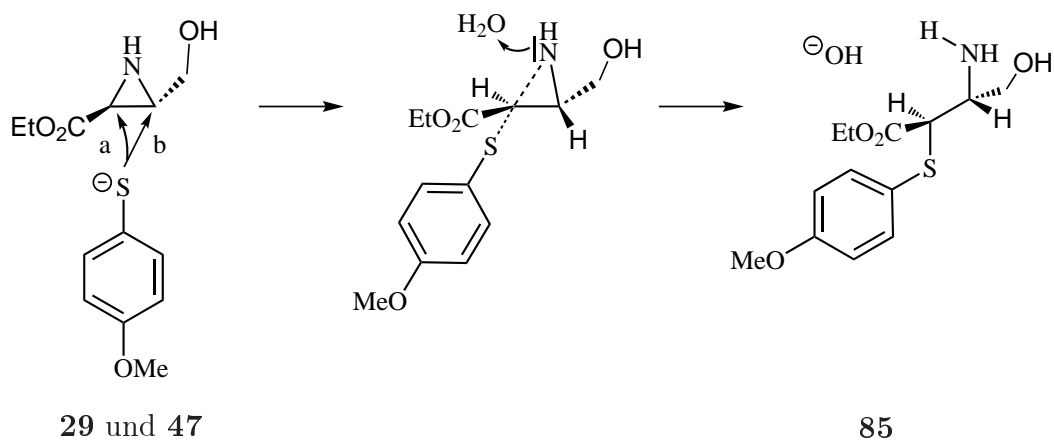


Abbildung 66: Untersuchte Aziridine

Schema 21 zeigt die zu beobachtende Reaktion zwischen Aziridin **29** und *p*-Methoxythiophenol **47**. Der Aziridin-Ring wird durch das Thiolat an einem Ringkohlenstoffatom angegriffen und dadurch irreversibel geöffnet. Im Gegensatz zu den C₂-symmetrischen Aziridinen **23** und **84** ergeben sich für das Aziridin **29** zwei Angriffsmöglichkeiten a und b (Schema 21), die zu unterschiedlichen Produkten führen würden. Aufgrund der stark elektronenziehenden Esterfunktion in Nachbarschaft zum linken Ringkohlenstoffatom ist der Angriff a elektronisch eindeutig bevorzugt und wird hier als der wahrscheinliche Angriff angenommen.



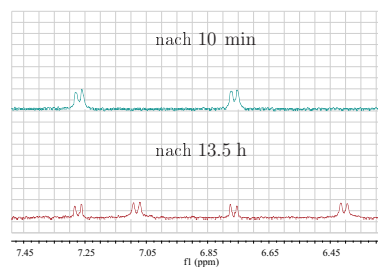
Schema 21: Ringöffnung von Aziridin **29** durch *p*-Methoxythiophenolat **47** als Modell des Enzyms

Messungen mit *p*-Methoxythiophenol **47** in Phosphatpuffer

In einem NMR-Röhrchen wurde die Reaktion von *p*-

Methoxythiophenol **47** und Hydroxymethyl-Aziridin **29** in 50 mM Phosphatpuffer in D₂O (pH=7.6) angesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde anhand der Änderung der Integrale der Protonen der Ringkohlenstoffatome von **29** bei 3.45 – 3.65 ppm sowie der aromatischen Protonen des Thiols bei 6.76 ppm (d) verfolgt. Die Konzentrationen des Aziridins und des Thiophenols betragen je 1.25 mM, das Gesamtvolumen belief sich auf 700 µL. [67] Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 66 h beobachtet, es konnten dennoch keine Veränderungen an den Signalen des Aziridins beobachtet werden. Die unter denselben Bedingungen durchgeführte Vergleichsreaktion ohne Thiol belegte ebenfalls die Stabilität des Aziridins in D₂O-Puffer.

Im Gegensatz dazu erfuhren alle Signale des Thiols bereits innerhalb der ersten Stunde eine Verschiebung. Ob diese lediglich durch die fortschreitenden Deprotonierung der Thiolfunktion entstand, ist unklar. Beide Thiolspezi-



Änderung der aromatischen Signale

es liegen nach etwa 13.5 h zu gleichen Teilen vor. Nach 66 h sind nur Signale der neuen Thiol-Spezies auszumachen. Es handelt sich bei der Beobachtung also nicht um eine Gleichgewichtseinstellung sondern um einen wohl irreversiblen Prozess unter diesen Bedin-

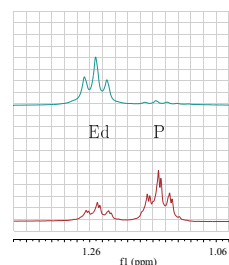
gungen.

Bei der früheren Verwendung von *p*-Methoxythiophenol **47** wurde bereits die Bildung von S-S-Bindungen beobachtet. [81] Sie hat eine Verschiebung aller Thiol-Signale im NMR-Spektrum zur Folge und könnte möglicherweise auch in diesem Fall die Reaktion sein, die beobachtet wird. Allerdings ist die Reaktion zum Disulfid als reversibler Prozess beschrieben, was den hier gemachten Beobachtungen entgegen steht.

Für den Fall, dass es sich bei der neu entstehenden funktionellen Gruppe um das Disulfid handeln, wird das Thiol als nucleophiler Reaktionspartner aus der Reaktionslösung entfernt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die offenbar ohnehin eher langsam - wenn überhaupt - ablaufende Reaktion zwischen Thiol **47** und Aziridin **29** bei längeren Reaktionszeiten dennoch nicht zu beobachten ist, da die Konzentration des nucleophilen Reaktionspartners kontinuierlich abnimmt.

Die Reaktion wurde daraufhin mit einer höheren Konzentration (31 mM) an Thiol **47** und Aziridin **29** wiederholt, um die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion durch die größere Anzahl beider Moleküle zu erhöhen. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 48 h verfolgt. Diesmal ist der Verlauf der Reaktion deutlich zu erkennen (Abb. 67).

Die Wahl der Signale, an denen der Verlauf der Reaktion quantitativ verfolgt werden sollte, fiel auf das Triplet der CH₃-Protonen der Esterereinheit, das durch die Addition des Thiols an das Aziridin eine leichte Verschiebung erfährt. Die Signale konnten mittels 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie zugeordnet werden. Alle anderen Signale des Edukts überlagern mit den später entstehenden Produktsignalen. Das Triplettsignal der Methylprotonen des Edukts lag bei 1.24 ppm, dasjenige des Produkts bei 1.14 ppm.



Signale der methylischen Protonen von **29** im Edukt und im Produkt

Grafik 67 zeigt sehr schön, dass die Reaktion zwischen Thiol **47** und Aziridin **29** nach einer Kinetik zweiter Ordnung verläuft. In dem Maße, wie das Aziridin verbraucht wird, entsteht auch das neue Produkt **85**. Die Summe beider Integrale zu einem Messzeitpunkt ist immer gleich. Aus dem ersten Messpunkt (Grafik 67) lässt sich ebenfalls erkennen, dass die Reaktion zum Zeitpunkt der ersten Messung bereits fortgeschritten war. Mithilfe von Gleichung 51 (Kapitel 4.4.1) lassen sich für die Abnahme des Aziridins sowie für die Zunahme des Produkts die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_2 berechnen.

$$k_2(\mathbf{85}\text{-Bildung}) = 0.0757 \pm 0.020 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{min})$$

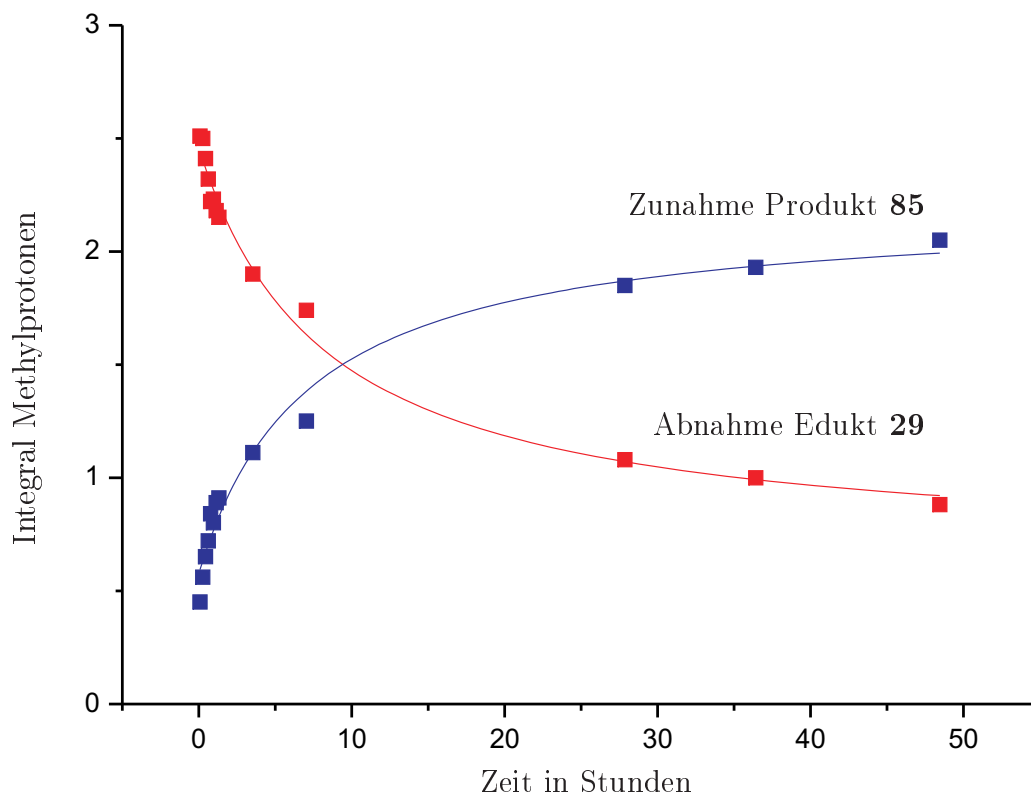


Abbildung 67: Auftragung der gemessenen Integrale gegen die Zeit für die Verbindungen **29** und **85** unter Bedingungen zweiter Ordnung

$$k_2(\mathbf{29}\text{-Abnahme}) = 0.0650 \pm 0.013 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{min})$$

Werden die jeweiligen Fehler berücksichtigt, stimmen die beiden Werte recht gut überein. Es bestätigt sich jedoch die bereits in Kapitel 4.4.2 getätigte Aussage, dass die NMR-Spektroskopie keine ideale Methode ist, um absolute quantitative Aussagen bezüglich der Kinetik einer Reaktion zu treffen. Relativ gesehen liegt Aziridin **29** bezüglich der Reaktivität mit *p*-Methoxythiophenol **47** zwischen Aziridin-2,3-dicarboxylat **23** und dessen elektrophilen Derivat **84**. [67] Für **84** wurde die Geschwindigkeitskonstante

zweiter Ordnung zu $k_2 = 1.56$ (L/(mol · min)) bestimmt. [67] Aziridin **29** ist also etwa um einen Faktor 22 langsamer.

4.6 Enzym-Assays

4.6.1 Testung von Vinylsulfonen

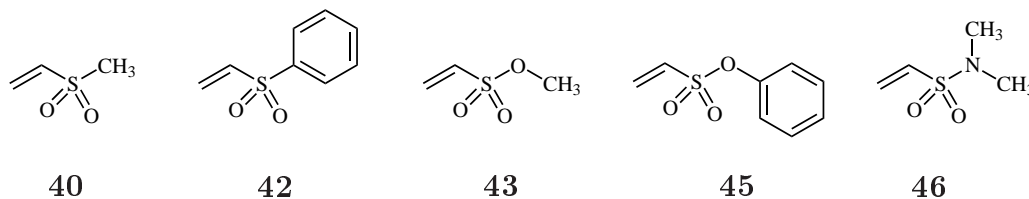


Abbildung 68: untersuchte Vinylsulfone

Die Substanzen MeVS **40**, PhVS **42**, OMeVS **43**, OPhVS **45** und NMe₂VS **46** (Abbildung 68) sollten in fluorimetrischen Assays gegen eine Reihe von Cystein-Proteasen getestet werden, um die Aktivität der potentiellen Inhibitoren zu abzuschätzen. Es wurde zunächst ein Screening bei einer Inhibitor-Konzentration von 20 μ M mit einer Messzeit von 10 min durchgeführt. Alle Werte wurden durch zweifache Messung bestimmt. Wird eine Hemmung von über 40% erzielt, werden in der Regel weitere Messungen durchgeführt, um die Zeitabhängigkeit der Hemmung zu bestimmen, die mit der Screening-Methode nicht erfasst werden kann (Vgl. Kapitel 2.3). Als Enzyme wurden Falcipain 2 (FP2), Rhodospain (Rho), die SARS-CoV-Hauptprotease M^{pro} sowie die Cathepsine B (CB) und L (CL) verwendet. Wie Tabelle 6 darstellt, zeigte keine der Verbindung eine nennenswerte Hemmung der Proteasen. Weitere Untersuchungen wurden daher nicht durchgeführt.

Tabelle 6: Mittlere prozentuale Hemmung (aus zwei Messungen) der Cystein-Proteasen FP2, Rho, M^{pro}, CB und CL nach 10 Minuten Messzeit durch **40**, **42**, **43**, **45** und **46** bei einer Inhibitor-Konzentration von 20 μM .

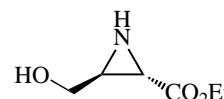
Inhibitor	FP2	Rho	M ^{pro}	CB	CL
MeVS 40	18 \pm 2	8 \pm 5	37 \pm 0	10 \pm 10	11 \pm 11
PhVS 42	20 \pm 8	11 \pm 6	15 \pm 0	1 \pm 1	0
OMeVS 43	11 \pm 4	4 \pm 4	6 \pm 3	4 \pm 4	35 \pm 7
OPhVS 45	11 \pm 0	5 \pm 5	3 \pm 3	3 \pm 3	25 \pm 5
NMe ₂ VS 46	20 \pm 2	6 \pm 1	8 \pm 6	3 \pm 3	29 \pm 0

Es fällt auf, dass die getesteten Verbindungen **40**, **42**, **43**, **45** und **46** die verwendeten Enzyme generell wenig, Rhodesain und Cathepsin B aber am wenigsten hemmen (Tabelle 6). Gegenüber der SARS-CoV-M^{pro} ist MeVS **40** die einzige Verbindung, die nennenswerte Ergebnisse liefert. Mit 37% liegt der Hemmwert deutlich über den Werten der anderen Verbindungen (3-15 %). Für Cathepsin L scheint ein Heteroatom an der Sulfongruppe (N oder O) des Inhibitors eine Steigerung der Hemmung hervorzurufen. MeVS **40** und PhVS **42** bleiben mit 0% bzw. 11% deutlich hinter den Verbindungen **43**, **45** und **46** zurück, die 35% (OPhVS), 29% (NMe₂VS) und 25% (OMeVS) Hemmung erreichen. Für die Hemmung von FP2 lässt sich keine Erklärung für die Reihenfolge der Ergebnisse finden. Diskutiert man nun die potentiellen Inhibitoren im einzelnen, lässt sich auch hier kein Trend erkennen. Keine der Substanzen beansprucht einen Platz in der Reaktivitätsreihenfol-

ge klar für sich. Die insgesamt schwächsten Hemmwerte werden von OMeVS **43** und OPhVS **45** erreicht. OMeVS **43** zeigt jedoch gegenüber CL die im Vergleich mit den anderen VS stärkste Hemmung. OPhVS **45** und NMe₂VS **46** zeigen ebenfalls Hemmung von CL. Ein allgemein positiver Einfluss des zusätzlichen Sauerstoffatoms bzw. Stickstoffatoms zwischen Sulfoneinheit und Phenylring auf die Enzymhemmung kann aber nicht beobachtet werden. Bei den übrigen Enzymen liefern die jeweiligen Vergleichsverbindungen MeVS **40** und PhVS **42** die besseren Werte. Eine Reaktivitätsreihenfolge oder ein Trend innerhalb der Serie der Vinylsulfone ist mit diesen Ergebnissen nicht aufzustellen.

4.6.2 Testung von Aziridinen

Hydroxymethyl-Aziridin **29** wird in dieser Arbeit als Baustein der peptidischen Aziridinbasierten Inhibitoren eingesetzt. Es sollte daher in enzymatischen Assays mit den potentiellen peptidischen Inhibitoren Z-Pro-Leu-Azi **67** und



Hydroxymethyl-Aziridin **29**

Boc-Leu-Pro-Azi **69** verglichen werden, bei denen das jeweilige Peptid über die freie OH-Funktion mit dem Baustein **29** verknüpft wurde. Dazu wurden die drei Verbindungen zunächst in einem Screening bei einer Inhibitor-Konzentration von 20 μ M

mit einer Messzeit von 10 min an den Enzymen FP2, Rho, SARS papain-like-Protease PL^{pro}, CB und CL getestet. Die Screening-Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Aufgrund der schwachen Hemmung wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Zeitabhängigkeit durchgeführt.

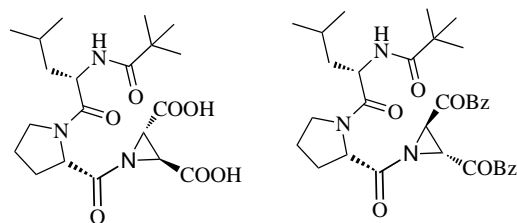
Tabelle 7: Mittlere prozentuale Hemmung (aus zwei Messungen) der Cystein-Proteasen FP2, Rho, PL^{pro}, CB und CL nach 10 Minuten Messzeit durch **29**, **67** und **69** bei einer Inhibitor-Konzentration von 20 μ M.

Inhibitor	FP2	Rho	PL ^{pro}	CB	CL
Hydroxymethyl-Aziridin 29	21 \pm 1	14 \pm 6	15 \pm 3	0	0
Z-Pro-Leu-Azi 67	15 \pm 8	0	13 \pm 5	4 \pm 4	26 \pm 5
Boc-Leu-Pro-Azi 69	13 \pm 9	0	6 \pm 5	1 \pm 1	23 \pm 4

Der kleine Baustein, Aziridin **29**, hemmt die getesteten Proteasen CB und CL gar nicht und zeigt für FP2, Rho und PL^{pro} eine Hemmung von etwa 10 - 20%. Eine Steigerung dieser Werte durch einen Peptidrest, der für eine bessere Erkennung des Inhibitors durch das Enzym sorgt, wird für **67** und **69** nicht beobachtet. Die Werte für FP2 liegen mit 15% und 13% im selben Bereich. Die unterschiedliche räumliche Struktur der peptidischen Inhibitoren **67** und **69** sollte die entsprechenden Bindetaschen des Enzyms unterschiedlich gut adressieren. Diese unterschiedlich gute Anpassung kann zu deutlich unterschiedlichen Hemmdaten führen. In diesem Fall scheint allerdings die Reihenfolge der Aminosäuren

im Peptidteil, und somit die räumliche Struktur der Inhibitoren, wenig Einfluss auf die Enzymhemmung zu haben. Bei den Testungen an Rhodocollin und CB wurde für die peptidischen Aziridine überhaupt keine Hemmung beobachtet. Für CL konnte eine Steigerung der Hemmung gegenüber Aziridin **29** beobachtet (ca. 25% gegenüber keiner Hemmung). Insgesamt weist Inhibitor Z-Pro-Leu-Azi **67** jeweils leicht höhere Hemmwerte gegenüber Boc-Leu-Pro-Azi **69** auf. Dennoch ist der Unterschied so minimal, dass daraus nicht geschlossen werden kann, dass die Aminosäure-Reihenfolge Z-Pro-Leu für die Enzymerkennung etwas günstiger ist als die umgekehrte Anordnung.

Wie der Vergleich mit älteren Daten zeigt, ist für eine gute Enzymhemmung nicht nur der Leu-Pro-Baustein entscheidend, sondern auch das Substitutionsmuster am Aziridin. Die Einführung des Peptids über den Aziridin-Stickstoff ergaben früher bereits gute Inhibitoren, die unterschiedliche Ester- bzw. Säurefunktionen an beiden Seiten des Aziridin-Dicarboxylats aufwiesen (Abb. 69). [82] Die damals synthetisierten Verbindungen lieferten ausreichend gute Screening-Ergebnisse, dass sinnvolle Verdünnungsreihen durchgeführt werden konnten und für die Verbindungen **82** und **83** k_{2nd} -Werte in $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ erhalten werden konnten (Tab. 8).

**82****83****Abbildung 69:** untersuchte Boc-Leu-Pro-Derivate**Tabelle 8:** k_{2nd} -Werte für die Inhibitoren **82** und **83** an CL, CB und FP2 [82]

Inhibitor	Enzym	k_{2nd} in $M^{-1}min^{-1}$
82	CL	26115
82	FP2	51282
83	CB	417

Sehr deutlich zeigt sich, dass eine freie Säurefunktion am Aziridin entscheidend für eine gute Hemmung ist. Ist die Carboxylgruppe verestert, wird eine schwächere Hemmung beobachtet (Tabelle 8).

In anderen früheren Arbeiten wurde bereits die Aktivität von Aziridin-2,3-dicarboxylat **23** sowie den NH-substituierten Analoga (Abbildung 70) gegenüber FP2 untersucht. Tabelle 9 zeigt die damals erhaltenen Hemmdaten.

Die aktuell untersuchten Verbindungen **29**, **67** und **69** weisen mit 21%, 15% bzw. 13% Hemmung (Tabelle 7) niedrigere Werte als die Inhibitoren **84** und **87** (58% bzw. 40%, Tabelle 9) auf.

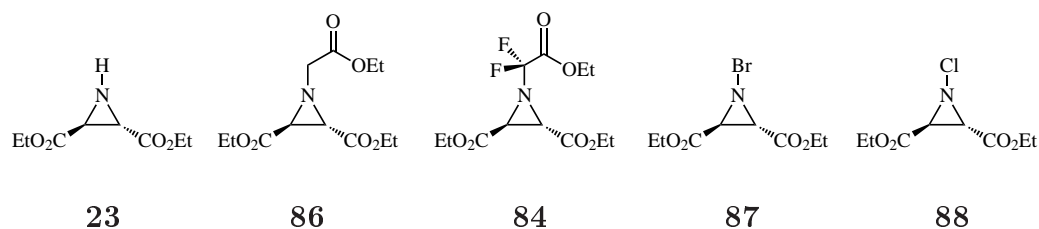


Abbildung 70: früher untersuchte Aziridin-Derivate

Tabelle 9: Prozentuale Hemmung von Falcipain 2 nach 10 Minuten Messzeit bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM und berechnete Hemmkonstanten der Inhibitoren **84**, **87** und **88** aus 2-4 unabhängigen Assays im Vergleich zu **23** und **86**.

Inhibitor	Hemmung in %	k_{2nd} in $\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$
23	-	11 ^a
86	-	8 ^a
84	58	5974
87	40	11 029
88	67	25 641

^a aus [83]

Die alten Hemmdaten wurden bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM gemessen, die neuen hingegen bei nur 20 μM . Die in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren sollten also den früheren Inhibitoren in ihrer Potenz ähneln. Für die Inhibitoren **23** und **86** fehlen adäquate Vergleichsdaten. Da sie aber geringe k_{2nd} -Werte als **84** und **87** besitzen, kann auch hier eine weniger starke Hemmung von FP2 im Vergleich zu **67** und **69** angenommen werden.

4.7 Vergleich von Theorie und Experiment

4.7.1 Reaktivität von Vinylsulfonen in Theorie und Experiment

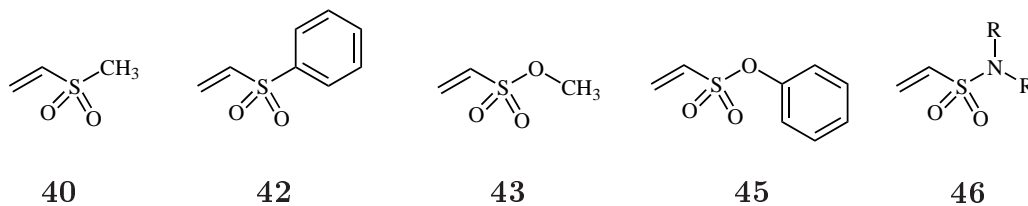


Abbildung 71: untersuchte Vinylsulfone, R= H, CH₃

Die in Abbildung 71 dargestellten Vinylsulfone wurden sowohl theoretisch als auch experimentell hinsichtlich der Kinetik ihrer Reaktion mit Thiolen und Thiolaten untersucht. Verbindung **46** trug dabei R = H in der Theorie und R = CH₃ im Experiment. Theoretische Berechnungen (Kapitel 4.1.4) hatten ergeben, dass die Sulfonester **45** und **43** am schnellsten reagieren sollten, gefolgt von Amid **46**. Daran anschließend sollte **40** etwas schneller reagieren als **42**. Dieser Trend konnte von unabhängigen Rechnungen mit einer sehr ähnlichen Theorie-Methode bestätigt werden. [84]

In Kapitel 4.6.1 wurde die in Enzym-Assays erhaltene prozentuale Hemmung diskutiert. Es ließ sich demnach keine stets gültige Reihenfolge der Reaktivität für die untersuchten Vinylsulfone aufstellen. Für das Enzym Cathepsin L ließ sich jedoch die theoretisch gefundene Tendenz, dass die Vinylsulfone, die an der Sulfoneinheit ein weiteres Heteroatom tragen (Sulfonester, Sulfonamide),

schneller als die aliphatischen/aromatischen Vinylsulfone reagieren sollen, in der prozentualen Hemmung wiederfinden. Für Cathepsin L ergab sich als Reihenfolge $\mathbf{43} = \mathbf{46} > \mathbf{45}$. $\mathbf{42}$ und $\mathbf{40}$ zeigten keine Hemmung. Für die anderen getesteten Enzyme FP2, Rho, M^{pro} und CB konnte keine Beziehung zu den theoretischen Ergebnissen festgestellt werden. Im Gegenteil, vor allem MeVS $\mathbf{40}$ lieferte deutlich bessere Hemmdaten als der Theorie nach erwartet wurden. Gegenüber M^{pro} und CB erwies sich $\mathbf{40}$ als das reaktivste Vinylsulfon.

In Modellreaktionen in deuteriertem Methanol (Kapitel 4.4.3) wurde das Enzym durch Phenylethanthiol simuliert. Ohne Basenzusatz reagierte das Thiol als Nucleophil und entsprach damit der SARS-CoV-Hauptprotease M^{pro} . Nur PhVS $\mathbf{42}$ und OPhVS $\mathbf{45}$ reagierten unter diesen Bedingungen. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung konnten mit NMR- und IR-Spektroskopie zu

$k_2(\text{PhVS } \mathbf{42} \text{ -NMR}) = 0.0128 \pm 0.0015 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ und

$k_2(\text{PhVS } \mathbf{42} \text{ -IR}) = 0.0211 \pm 0.00046 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ sowie

$k_2(\text{OPhVS } \mathbf{45} \text{ -IR}) = 0.0062 \pm 0.00031 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$

bestimmt werden. OPhVS $\mathbf{45}$ reagierte also um einen Faktor 3.4 langsamer. Laut den theoretischen Ergebnissen sollte jedoch $\mathbf{45}$ das reaktivste VS sein und einen deutlichen Unterschied in der

Reaktionskonstanten gegenüber **42** zeigen, da der Unterschied zwischen den jeweiligen Aktivierungsbarrieren mit theoretischen Methoden zu 8.6 kcal/mol berechnet wurde (Kapitel 4.1.4). Die Hemmdaten gegenüber SARS M^{pro} (Kapitel 4.6.1) ergaben MeVS **40** als klar potentesten Inhibitor der VS-Serie mit 37%. PhVS **42** und OPhVS **45** erzielten eine Hemmung von 15% bzw. 12%. Diese Ergebnisse konnten also weder mithilfe des theoretischen Ansatzes (Kapitel 4.1.4 und [84]) noch mit den durchgeführten Modellversuchen (Kapitel 4.4.2, 4.4.3) korrekt voraus gesagt werden.

In einer zweiten Modellreihe wurde Phenylethanthiol durch Zusatz von NaOH oder KO^tBu deprotoniert, sodass das Thiolat das vorrangige Nucleophil darstellte (Kapitel 4.4.3). Für diese Versuchsreihe wurden die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung bestimmt und es ergab sich die Reaktivitätsreihenfolge zu PhVS **42** > MeVS **40** > OPhVS **45** > OMeVS **43** > NMe₂VS **46**. Sie ist mit den vorhergehenden Experimenten konsistent, da hier PhVS **42**, das bereits mit dem Thiol reagierte, auch gegenüber dem Thiolat die größte Reaktivität aufweist. In enzymatischen Assays konnte diese Reihenfolge nicht bestätigt werden, da insgesamt eine geringe Enzymhemmung durch die Vinylsulfone beobachtet wurde und Unterschieden in diesem niedrigen Wertebereich

keine Bedeutung zukommt.

Eine weitere Modellreaktion und die daraus ermittelten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung sind von *Reddick et al.* veröffentlicht worden. [76] Es wurden Moleküle, die als Kopfgruppe Carbonyl-Michaelsysteme und Vinylsulfone tragen, hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Phenylethanthiol in Anwesenheit von TEA verglichen. Die von *Reddick et al.* gefundene Reihenfolge lautet: OPhVS **45** > PhVS **42** > OMeVS **43** (bzw. statt OMe ist der Rest hier OEt). MeVS **40** wurde nicht untersucht. Zusätzlich komplettierten diverse Amide die Serie von *Reddick et al.*, die je nach Substituenten am Stickstoffatom mehr oder weniger Reaktivität gegenüber dem Thiolat als die übrigen Sulfone zeigen. Untersuchungen der *Reddick*-Verbindungen mit einem ähnlichen theoretischen Modell wie dem in dieser Arbeit vorgestellten, konnten die von *Reddick* im Modell gefundene Reihenfolge nicht wiedergeben. [84] Parallel von *Reddick* durchgeführte Enzym-Assays an Cruzain lieferten keine mit dessen Modell vergleichbaren Ergebnisse. [76]

Ein Problem der Gegenüberstellung der in Theorie und Experiment erhaltenen Werte stellten die für den Vergleich herangezogene prozentuale Enzymhemmung dar. Die Hemmung eines Enzyms wird durch viele Faktoren beeinflusst. Die prozentuale Hemmung

des Enzyms kann also nicht mit der tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion zwischen Enzym und Inhibitor, bei der es zur Bildung einer kovalenten Bindung kommt, gleichgesetzt werden. Dies ist jedoch die Reaktion, die in dieser Arbeit in der Theorie (Kapitel 4.1.4) und mit diversen experimentellen Methoden (Kapitel 4.4.1-4.4.3) untersucht wurde. Für eine Diskussion, wie gut die Kinetik dieser Reaktion durch die theoretischen oder experimentellen Modelle beschrieben wird, müssten die Werte der Geschwindigkeitskonstanten k_i (Kapitel 2.3) mithilfe von Verdünnungsassays bestimmt werden. Dies wurde jedoch aufgrund der geringen beobachteten Hemmung nicht durchgeführt. Der gefundene gleiche Reaktivitäts-Trend in der Theorie und im Enzym-Assay im Fall von CL kann also zufällig sein. Ebenso muss die Abwesenheit einer Parallelität zwischen Theorie und Enzym-Assay bei den anderen getesteten Enzymen letztlich nicht bedeuten, dass das theoretische Modell falsch ist. Es liefert allerdings nur unter der Annahme sinnvolle Prognosen, dass die K_i -Werte aller untersuchter Vinylsulfone gleich sind. Ist dies nicht gegeben, kann ein QM-Modell, das die Interaktion des Inhibitors mit dem Enzym vor der Inaktivierungsreaktion nicht berücksichtigt, keine zuverlässigen Ergebnisse liefern. Hierzu wären u.a. umfassende QM/MM-Betrachtungen nötig.

Die Entscheidung, die Modellversuche mit Phenylethanthiol in deuteriertem Methanol durchzuführen, ist nach gescheiterten Modellreaktion mit p-Methoxythiophenol in D₂O getroffen worden. Dass dieses neue Modell sowohl vom Medium selbst (MeOD vs. D₂O) als auch vom pH-Wert der Reaktionsmischung den im Enzym vorliegenden Bedingungen nicht Rechnung trägt, ist ein großes Manko dieses Modells. Das ursprünglich anvisierte Modell wäre den realen Bedingungen näher gekommen. Dennoch konnten reproduzierbar die kinetischen Parameter der Reaktionen der Vinylsulfone mit dem Thiol als auch mit dem Thiolat bestimmt werden (Kapitel 4.4.1-4.4.3). Vergleichbar sind sie aus den bereits erläuterten Gründen nicht mit den in Kapitel 4.6.1 beschriebenen Hemmdaten, da auch in diesem Modell die nicht-kovalente Interaktion von Inhibitor und Enzym vernachlässigt wird, deren Beitrag in der prozentualen Hemmung mit erfasst wird.

Es bleibt der Vergleich des theoretischen Modells mit den experimentellen Modellen zu diskutieren. Beide Ansätze untersuchen nur die Kinetik der Bindungsbildung zwischen Thiol/Thiolat und Vinylsulfon. Die Ergebnisse könnten also vergleichbar sein, wenn die Unterschiede zwischen den Modellen nicht zu stark ins Gewicht fallen. In der Theorie ist das Medium Wasser in Form eines Continuum-Solvens-Modells, als Protonen-Donator steht ein

zusätzliches Molekül Ammonium zur Verfügung. Das Nucleophil ist Methylthiolat. Im Experiment ist das umgebende Solvens Methanol und das Thiol Phenylethanthiol. Durch Zusatz von festem KO^tBu wird das eigentliche Nucleophil, das Thiolat, generiert. Auf den ersten Blick konnte mit dem theoretischen Modell der experimentell gefundene Trend nicht vorhergesagt werden. Die Reihenfolge der Sulfonderivate aber, die an der Sulfongruppe ein weiteres Heteroatom tragen (Sulfonester **43** und **45**, Sulfonamid **46**) wurde richtig abgeschätzt. Der Unterschied in der Aktivierungsenergie zwischen den Sulfonestern **43** und **45** beläuft sich auf 0.7 kcal/mol. Über die Arrheniusgleichung (Kapitel 4.4.3, Gleichung 56) ergibt sich bei Annahme desselben Arrhenius-Faktors bei einer Temperatur von 25 °C, dass OPhVS **45** um einen Faktor 3 schneller als OMeVS **43** reagieren sollte. Tatsächlich wurde im Experiment (Kapitel 4.4.3) ein Faktor von 2.6 gefunden. Aufgrund der unterschiedlichen Substituenten am Stickstoffatom, ist Amid **46** nicht vollständig mit seinem H-substituierten theoretischen Pendant vergleichbar. Dass das Sulfonamid langsamer als die Sulfonester reagieren, wurde vom theoretischen Modell richtig vorhergesagt. Für Carbonylverbindungen ist die Reaktivitätsreihenfolge bekanntermaßen Aldehyd > Keton > Ester > Amid. *Heo et al.* untersuchten die Kinetik der Addition von N,

N-Dimethylaminopyridin an eine Reihe unterschiedlich substituierter Michael-Akzeptoren. [85] Dabei wies Methylvinylsulfon **40** eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung wie der untersuchte Methylester auf. Die Größenordnung der gefundenen Messwerte ist also vergleichbar mit Literaturwerten.

Die Reaktivität der Alkyl-/Arylsulfone **40** und **42** wird im theoretischen Modell unterschätzt. Im verwendeten Modell wird zunächst die Bildung eines Reaktionskomplexes beobachtet, in dem sich die Reaktanden bereits nah beieinander befinden und sich energetisch stabilisieren. Es fällt auf, dass Methylthiolat, das Nucleophil, im Fall von **40** und **42** einen größeren Abstand zu den Vinylsulfonen aufweist als in den Komplexstrukturen der Sulfonyl-ester und des Sulfonamids. Dies könnte eventuell die gefundene höhere Aktivierungsbarriere begründen, da sich das Nucleophil erst weiter annähern muss und nicht wie bei den Verbindungen **43**, **45** und **46** eine Reaktion direkter möglich ist.

5 Zusammenfassung

Derivate von Vinylsulfonen (VS), die zur Klasse der Michael-Akzeptoren gehören, haben sich in den letzten Jahren als potente irreversible Inhibitoren von Cystein-Proteasen etabliert. Eine allgemeine Struktur potentieller peptidischer Vinylsulfon-basierter Cystein-Protease-Inhibitoren ist am Beispiel von D-Ala-L-Phe-VS-Et in Abbildung 72 dargestellt.

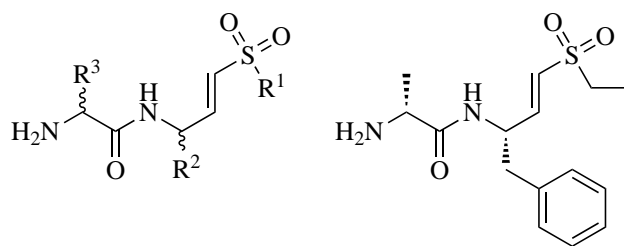


Abbildung 72: li: Allgemeine Struktur eines peptidischen Vinylsulfons, re: mit R¹ =Et, R² =Bn (→ Phe), R³ =CH₃ (→ Ala) wird diese abgekürzt mit D-Ala-L-Phe-VS-Et

Durch einen nucleophilen Angriff des Cys-Restes im aktiven Zentrum der Protease auf das β -Kohlenstoffatom der C-C-Doppelbindung wird die Protease irreversibel alkyliert. Noch nicht vollständig aufgeklärt ist der Einfluss des Substitutionsmusters am Vinylsulfon auf die Reaktionskinetik.

Ziel dieser Arbeit war es, einfache theoretische und experimentelle Methoden zu entwickeln, um erste Schlussfolgerungen hinsichtlich der Reaktivität unterschiedlicher Vinylsulfone ziehen zu können, die zur vollständigen Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung von Vinylsulfonen mit diversen Cystein-Proteasen dienen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden quantenmechanische Rechnungen an kleinen Vinylsulfon-Bausteinen angestellt, um den Einfluss unterschiedlicher Substitutionsmuster R_1 (Abb. 72) an der Sulfoneinheit auf die Reaktionskinetik von Vinylsulfonen zu untersuchen. Das Thiol im aktiven Zentrum der Cystein-Proteasen wurde dabei durch Methylthiolat imitiert, Ammoniumionen simulierten den Protonendonator Histidin. Ein bereits für Aziridine angewandtes Modell auf dieser Grundlage ließ sich nicht ohne weiteres auf die Vinylsulfone übertragen und wurde daher weiterentwickelt. Die eindimensional berechneten Reaktionspfade (Kapitel 4.1), denen die Addition des Thiolats an die C-C-Doppelbindung der Michael-Akzeptoren folgt, lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse. Daher wurde die Berechnung von Potentialflächen (PES) nötig, aus denen der tatsächliche Reaktionspfad dann ermittelt wurde (Kapitel 4.1.4). Anhand der jeweiligen Potentialfläche (Abb.

73) ließen sich auch die charakteristischen Punkte der Reaktion, wie der Reaktionskomplex, der Übergangszustand (transition state, TS) sowie das Produkt mitsamt ihren Energien und Geometrien bestimmen.

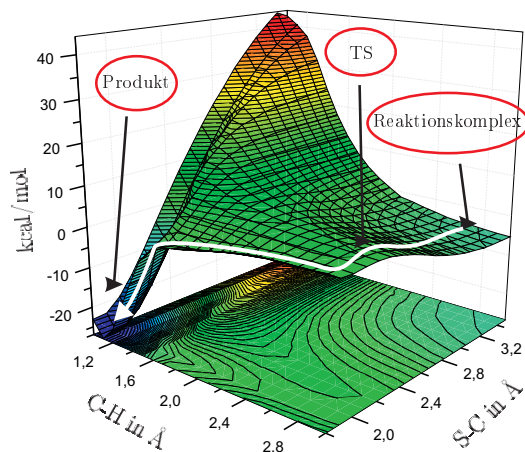


Abbildung 73: Potentialfläche am Beispiel der Additionsreaktion von Methylthiolat an Michael-Akzeptor VS-CH₃ **40**

Abbildung 73 zeigt am Beispiel der Additionsreaktion von Methylthiolat an Michael-Akzeptor VS-CH₃ **40** eine typische Potentialfläche. Deutlich zu erkennen ist der Reaktionspfad, hier dargestellt als weißer Pfeil, der vom Reaktionskomplex (ohne kovalente Bindung) über eine Energiebarriere den TS erreicht und dann barrierefrei zum Produkt verläuft. Ein klassischer Schnitt durch die Potentialfläche liefert die Reaktionskoordinate (Abb. 74).

Die Höhe der Energiebarriere, die zum Erreichen des TS überwunden werden muss, die sogenannte Aktivierungsenergie, hängt über die Arrhenius-Gleichung (56, Kapitel 4.4.3) mit den kineti-

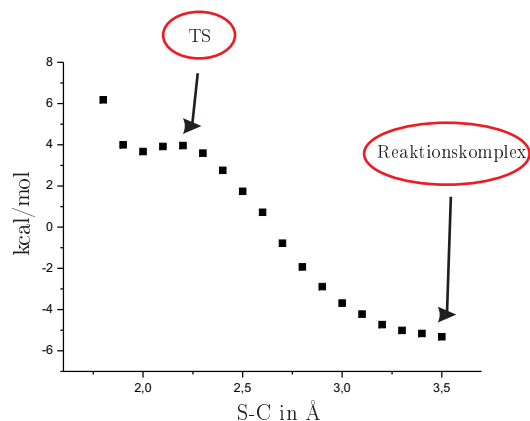


Abbildung 74: Schnitt durch die PES der Addition von Methylthiolat an VS-CH₃ 40

schen Parametern der Reaktion zusammen. Es lässt sich also durch die Kenntnis der Aktivierungsenergien die Reaktivitätsreihenfolge unterschiedlich substituierter Vinylsulfone VS vorhersagen. Die Berechnungen ergaben folgenden Trend (Kapitel 4.1.4): klassische Carbonyl-Michael-Verbindung (Vinyl-C(=O)-R₁) sollten schneller als die diskutierten Vinylsulfone reagieren. Die untersuchten Sulfonate (R₁=OMe, OPh) dürften schneller reagieren als die übrigen Sulfonderivate, wobei die Art der Alkoholkomponente keine Rolle zu spielen schien. Das untersuchte Sulfonamid (R₁=NMe₂) und die Alkyl/Aryl-substituierte Verbindungen (R₁=Me, Ph) würden deutlich langsamer reagieren, wobei der Arylrest zusätzlich zu einer leichten Verlangsamung führt. Ein zusätzlicher Substituent an der Doppelbindung (am endständigen C-Atom) dürfte den nucleophilen Angriff erheblich erschweren. Schlusslicht der Reihenfolge

bildete das Sulfoxid (Vinyl-S(=O)-Me).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Vinylsulfonbausteine synthetisiert und an separat hergestellte Peptide gekuppelt (Kapitel 4.2). Abbildung 75 zeigt die allgemeine Struktur der anvisierten peptidischen Inhibitoren.

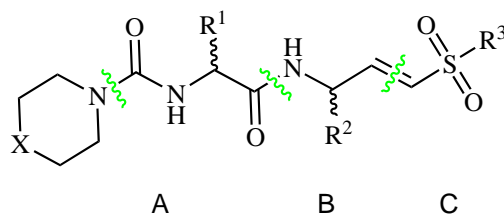


Abbildung 75: Allgemeine Struktur der anvisierten peptidischen Vinylsulfone mit $X = \text{NMe} \rightarrow \text{MP}$, $\text{O} \rightarrow \text{Mu}$; $R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow \text{D/L-Leu}$, $\text{Bn} \rightarrow \text{D/L-Phe}$; $R^2 = \text{Bn} \rightarrow \text{L-Phe}$, $\text{CH}_2\text{Bn} \rightarrow \text{D/L-HomoPhe}$; $R^3 = \text{Me}$, Ph , OMe , OPh , NMe_2

Die Bausteine A und C konnten im Allgemeinen in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die Synthese von Route B gelang in mäßiger Ausbeute. Die Kupplung von A, B und C zum potentiellen Inhibitor gelang in der Mikrowelle über eine Cross-Metathese-Reaktion, die eine sehr geringe Ausbeute lieferte. Mit dieser Technik konnten die peptidischen Inhibitoren Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **62** und MP-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **63** hergestellt werden (Kapitel 4.2).

Ein zweites Syntheseprojekt beschäftigte sich mit der Kupplung von Peptiden an neue Derivate der *trans*-Aziridin-2,3-dicarbonsäure (Kapitel 4.3). Abbildung 76 zeigt eine allgemeine

Struktur der synthetisierten Inhibitoren Z-Phe-Ala-Azi **68**, Boc-Leu-Pro-Azi **69** und Z-Pro-Leu-Azi **67**.

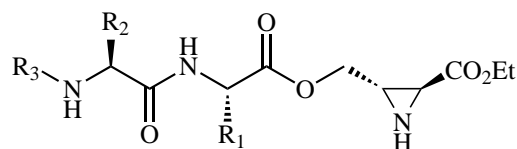


Abbildung 76: Allgemeine Struktur der synthetisierten peptidischen Aziridine, $R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow \text{L-Leu}$, $\text{CH}_3 \rightarrow \text{L-Ala}$, Pyrrolidin $\rightarrow \text{L-Pro}$; $R^2 = \text{Bn} \rightarrow \text{L-Phe}$, $\text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow \text{L-Leu}$, Pyrrolidin $\rightarrow \text{L-Pro}$; $R^3 = \text{Boc}$, Z

Hierfür wurden die Peptide des Vinylsulfonsprojekts in umgekehrter Aminosäure-Reihenfolge synthetisiert, um sie an die Aziridinbausteine kuppeln zu können.

Der dritte Teil der Doktorarbeit befasste sich mit der experimentellen Untersuchung der synthetisierten Vinylsulfonbausteine sowie den erhaltenen peptidischen VS- und Aziridin-basierten Inhibitoren. Es wurden einerseits Enzym-Assays durchgeführt (Kapitel 4.6.1), um die prozentuale Hemmung verschiedener Cystein-Proteasen durch die synthetisierten Moleküle zu messen. Keine der Verbindungen wies jedoch eine signifikante Hemmung der Proteasen Rhodesain, Falcipain 2 und Cathepsin B auf.

Andererseits wurden Modellsysteme entwickelt, um die Kinetik der Reaktionen der Vinylsulfon- und Aziridinbausteine mit einem geeigneten Thiol als Enzym-Imitat zu verfolgen. Ein ziel führendes Modell konnte mit Phenylethanthiol in deuteriertem

Methanol realisiert werden. Durch Zusatz von NaOH, KOH oder KO^tBu konnte zusätzlich die Reaktion mit dem Thiolat untersucht werden. Die Reaktionen wurden sowohl mit IR- als auch NMR-Spektroskopie verfolgt und es wurden die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung k_2 bestimmt. Die Reaktivitätsreihenfolge der untersuchten Vinylsulfone mit dem Thiolat ergab sich zu:

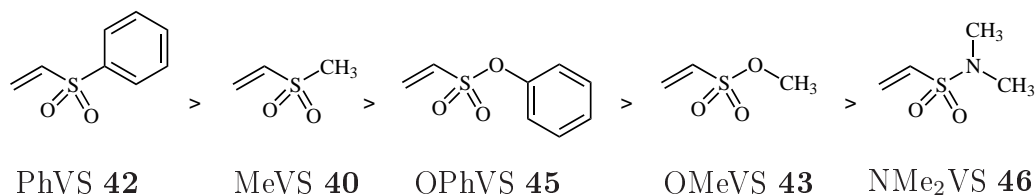


Abbildung 77: Reihenfolge der untersuchten Vinylsulfone bezüglich ihrer Reaktion mit Phenylethanthiolat

Auf den ersten Blick konnte mit dem theoretischen Modell der experimentell gefundene Trend nicht vorhergesagt werden. Die Reihenfolge der Sulfonderivate aber, die an der Sulfongruppe ein weiteres Heteroatom tragen (Sulfonester **43** und **45**, Sulfonamid **46**) wurde richtig abgeschätzt. Der Unterschied in der Aktivierungsenergie zwischen den Sulfonestern **43** und **45** beläuft sich auf 0.7 kcal/mol. Über die Arrheniusgleichung (Kapitel 4.4.3, Gleichung 56) ergibt sich bei Annahme desselben Arrhenius-Faktors bei einer Temperatur von 25 °C, dass OPhVS **45** um einen Faktor 3 schneller als OMeVS **43** reagieren sollte. Tatsächlich wurde im Experiment (Kapitel 4.4.3) ein Faktor von 2.6 gefunden. Auf-

grund der unterschiedlichen Substituenten am Stickstoffatom, ist Amid **46** nicht vollständig mit seinem H-substituierten theoretischen Pendant vergleichbar. Dass das Sulfonamid langsamer als die Sulfonester reagieren, wurde vom theoretischen Modell ebenfalls richtig vorhergesagt.

6 Summary

Derivatives of vinyl sulfones (VS), which belong to the class of Michael acceptors, have been established as potent, irreversible inhibitors of cysteine proteases during the past years. A general structure of potential peptidic vinyl sulfone-based cysteine protease inhibitors is shown with D-Ala-L-Phe-VS-Et as an example in figure 78.

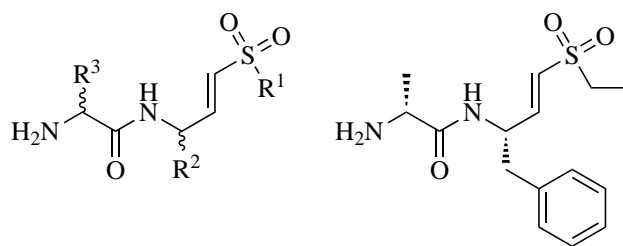


Figure 78: left: general structure of peptidic vinyl sulfones, right: with $R^1 = \text{Et}$, $R^2 = \text{Bn}$ (\rightarrow Phe), $R^3 = \text{CH}_3$ (\rightarrow Ala) the abbreviation is D-Ala-L-Phe-VS-Et

The protease is irreversibly alkylated by the nucleophilic attack of the Cys-residue of the protease's active site at the β -carbon atom of the C-C-double bond. Until now the exact nature of the reaction mechanism as well as the influence of substitution patterns at the vinyl sulfone moiety on the reaction kinetics are unclear.

The objective of this work was the development of simple, theoretical and experimental methods to draw first conclusions concerning the reactivity of diverse vinyl sulfones, which are needed for further investigations to fully understand the complex structure-activity relationship of vinyl sulfones as inhibitors of various cysteine proteases.

In the first part of this work, quantum mechanical calculations of small vinyl sulfone entities were conducted in order to investigate the impact of different substitution patterns R_1 (figure 78). Herein, the thiol of the cysteine protease's active site was imitated by methyl thiolate, whereas ammonium ions simulated the proton donor histidine.

A former model built on this basis and already used for aziridines could not easily be transferred to the reactions of vinyl sulfones and had to be developed further. The calculated one-dimensional reaction paths of the addition of the thiolate to the Michael acceptor's C-C-double bond (chapter 4.1), did not provide meaningful results. The calculation of potential energy surfaces (PES) was thus necessary, from which the actual reaction path could be deducted (chapter 4.1.4). By means of the PES (figure 79) characteristic reaction points, such as the reaction complex,

the transition state (TS) or the product, including energies and structural parameters, could be determined.

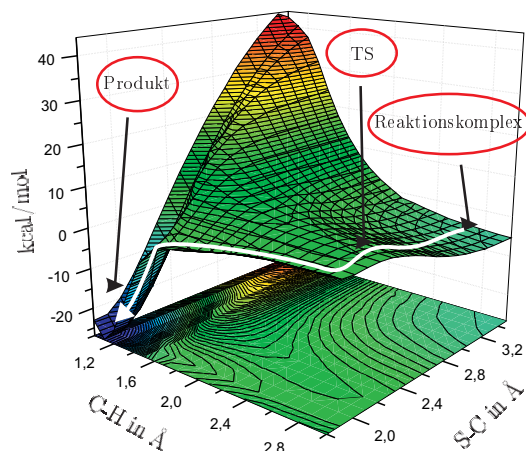


Figure 79: Potential energy surface of the addition reaction of methyl thiolate to Michael acceptor VS-CH₃ 40

A typical potential energy surface is depicted in figure 79 by taking the example of the addition reaction of methyl thiolate to Michael acceptor VS-CH₃ 40. The reaction path, illustrated by the white arrow, runs from the reaction complex to the TS by overcoming an energy barrier, followed by a barrier-free reaction to the product. A classical cut through the surface provides the reaction coordinate (figure 80).

The height of the energy barrier to pass the TS, the so-called activation energy, is related to the kinetic parameters of a reaction through the Arrhenius equation (equation 56, chapter 4.4.3). Consequently, knowledge of the activation energy permits the prediction of a reactivity order for differently substituted vinyl sulfones.

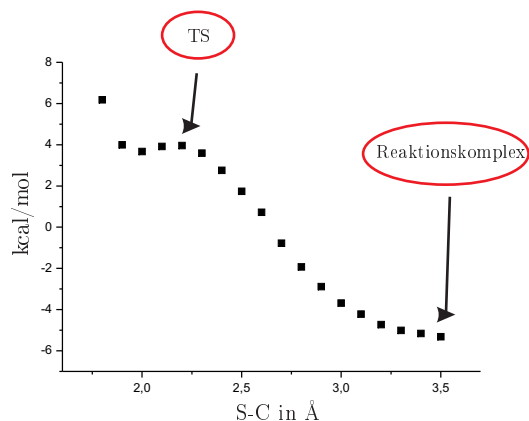


Figure 80: Cut through the PES of the addition reaction of methyl thiolate to Michael acceptor VS-CH₃ **40**

The calculations revealed the following trend (chapter 4.1.4): classical carbonyl Michael acceptors (vinyl-C(=O)-R₁) should react faster than the discussed vinyl sulfones. The examined sulfonates (R₁=OMe, OPh) should again react faster than the other sulfone derivatives, whereas the nature of the alcoholic moiety did not seem to have an influence. The analyzed sulfone amide (R₁=NMe₂) and the alkyl- /aryl-substituted compounds (R₁=Me, Ph) were expected to react significantly slower, whereas the aryl residue lead to an additional retardation. Calculations stated furthermore, that an additional substituent at the double bond would impede a nucleophilic attack tremendously. Tailight of the sequence is the sulfoxide (Vinyl-S(=O)-Me).

In the second part of this work, the discussed vinyl sulfone building blocks were synthesized and coupled to separately synthesi-

zed peptides (chapter 4.2). Figure 81 shows the general structure of the envisaged peptidic inhibitors.

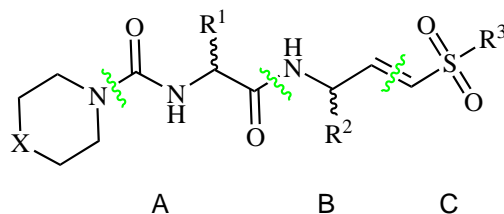


Figure 81: General structure of the envisaged peptidic vinyl sulfones with X= NMe \rightarrow MP, O \rightarrow Mu; R¹= CH₂ⁱPr \rightarrow D/L-Leu, Bn \rightarrow D/L-Phe; R²= Bn \rightarrow L-Phe, CH₂Bn \rightarrow D/L-HomoPhe; R³= Me, Ph, OMe, OPh, NMe₂

Building blocks A and C were obtained in very good yields. The synthesis of route B was achieved in moderate yields. Coupling of A, B and C to the potential inhibitor was realized in the microwave by a Cross-Metathesis reaction, providing only poor yields. Using this technique, the peptidic inhibitors Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **62** and MP-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me **63** could be obtained (chapter 4.2).

A second synthesis project dealt with the coupling of peptides to new derivatives of *trans*-aziridine-2,3-dicarboxylic acid (chapter 4.3). A general structure of the synthesized inhibitors Z-Phe-Ala-Azi **68**, Boc-Leu-Pro-Azi **69** und Z-Pro-Leu-Azi **67** is depicted in figure 82.

Additionally, the stated peptides were synthesized with reverse amino acid sequence in order to couple them to the aziridine

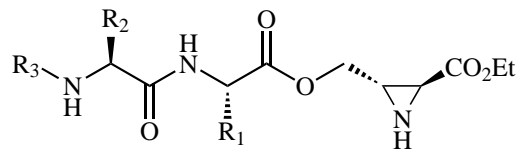


Figure 82: General structure of the synthesized peptidic aziridines, $R^1 = \text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow \text{L-Leu}$, $\text{CH}_3 \rightarrow \text{L-Ala}$, pyrrolidine $\rightarrow \text{L-Pro}$; $R^2 = \text{Bn} \rightarrow \text{L-Phe}$, $\text{CH}_2^i\text{Pr} \rightarrow \text{L-Leu}$, pyrrolidine $\rightarrow \text{L-Pro}$; $R^3 = \text{Boc}$, Z

building blocks.

The third part of this PhD thesis dealt with the experimental investigation of the synthesized vinyl sulfone building blocks as well as the obtained peptidic VS- and aziridine-based inhibitors. On the one hand, enzymatic assays were carried out (chapter 4.6.1), to measure the percentage inhibition of various cysteine proteases caused by the synthesized molecules. Unfortunately, none of the compounds showed significant inhibition of the proteases rhodesaine, falcipain 2 or cathepsine B.

On the other hand, model systems were developed to track the reaction kinetics of the addition reactions of the vinyl sulfone and aziridine building blocks with a suitable thiol as the enzyme "dummy".

A target-aimed model could be realized with phenyl ethane thiol in deuterated methanol. Moreover, by addition of NaOH, KOH or KO^tBu , the reaction with the respective thiolate could be studied. The reactions were followed by IR- and NMR-spectroscopy

and the second order rate constants k_2 were determined. The series of the investigated vinyl sulfones with respect to the reactivity towards phenyl ethane thiolate was established to

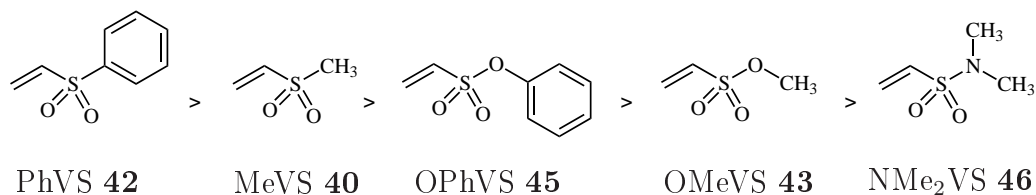


Figure 83: Series of the investigated vinyl sulfones with respect to the reactivity towards phenylethanethiolate

At first glance, the theoretical model was not able to predict the experimentally disclosed reactivity trend. Nevertheless, the order of the sulfone derivatives carrying a hetero atom at the sulfone moiety (sulfone esters **43** and **45**, sulfone amide **46**) was estimated correctly. The calculated difference in activation energy between the sulfone esters **43** and **45** is 0.7 kcal/mol. Applying the Arrhenius equation (chapter 4.4.3, equation 56) under the assumption of identical Arrhenius factors at a temperature of 25 °C, OPhVS **45** should react faster than OMeVS **43** by a factor of 3. Indeed, experiments (chapter 4.4.3) showed a factor of 2.6. Because of the different substituents at the nitrogen atom, amide **46** is not thoroughly comparable to its H-substituted theoretical pendant. The even slower reaction of the sulfone amide compared to the sulfone esters was still correctly predicted with the theoretical model.

Experimenteller Teil

1 Allgemeine Vorbemerkungen

1.1 Verwendete Geräte

Kernresonanzspektroskopie (^1H -NMR, ^{13}C -NMR): Die NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer der Firma Bruker, Typ Avance 400 aufgenommen. Die Arbeitsfrequenz betrug für ^1H -NMR-Spektren 400.13 MHz und für ^{13}C -NMR-Spektren 100.61 MHz und die Messtemperatur lag bei 300 K. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm, die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Als interner Standard dienen, wenn nicht anders angegeben, die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösemittels. Verwendete Lösemittel und deren Restprotonensignale: ^1H : δ (CDCl_3) = 7.26 ppm, δ (d_6 -DMSO) = 2.50 ppm, δ (d_4 -MeOD) = 3.31 ppm, δ (d_3 -MeCN) = 1.94 ppm, δ (D_2O) = 4.79 ppm; ^{13}C : δ (CDCl_3) = 77.16 ppm, δ (d_6 -DMSO) = 39.52 ppm, δ (d_4 -MeOD) = 49.00 ppm, δ (d_3 -MeCN) = 118.26 ppm. Für die Multiplizitäten der Signale werden die folgenden Abkürzungen verwendet: s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; dd, Dublett vom Dublett; dq, Dublett vom Quartett; m, Multiplett. Die Zuordnung

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

LC-MS-Analyse: Die LC-MS-Analysen und die ESI-Massenspektren wurden entweder an einer Agilent 1100 IonTrap aufgenommen, die mit einem HPLC-System 1100 von Agilent bestückt ist, oder an einem Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektronenspray Ionisations-Interface (ESI), ausgestattet mit einem Applied Biosystems 140 B HPLC-System mit Spark Triathlon Autosampler.

Infrarotspektroskopie (IR): Alle IR-Spektren wurden an einem Jasco FT/IR der Serie 4100 mittels ATR Einheit aufgenommen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Wellenzahlen ν in der Einheit cm^{-1} .

Spezifische Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden an einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter ermittelt (Na_D -Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$).

Schmelzpunktbestimmung (Smp): Die Schmelzpunkte wurden in einer offenen Kapillare an einem Gerät der Firma Mettler Typ

FP5 bestimmt.

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Zur Reaktionskontrolle wurden mit 0.2 mm Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien der Firma Merck verwendet (60 F₂₅₄). Zur Detektion der Substanzen wurden die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Ehrlichs Reagenz (Amine) und Ninhydrin (u.a. Aminosäuren) benutzt.

Säulenchromatographie (SC): Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (0.063 – 0.2 nm mesh) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Säulen wurden mit organischem Lösemittel gepackt. Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist jeweils in Volumenprozent angegeben.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Die Aufreinigung einiger Zielverbindungen erfolgte an einer Varian Prepstar HPLC-Anlage mit Autosampler 410 ProStar, UV-Detektor ProStar, Fraktionssammler 701 ProStar auf einer präparativen Phenomenex Hyperclone 5 μm ODS (C18, 120 \AA LC Column 250 x 21.2 mm) Säule mit Acetonitril-Wasser-Gemischen. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Gemische sind bei den Zielverbindungen angegeben. Die UV-Detektion wurde bei 215 nm oder 254 nm durchgeführt.

1.3 Enzym-Assays

Die fluorimetrischen Enzym-Assays wurden an einem Cary Eclipse Fluorimeter von Varian mit Microplate Reader durchgeführt. Die Assays wurden in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 200 μL . Die Referenzmessungen erfolgten ohne Zugabe von Inhibitor. Enzymlösungen wurden so verdünnt, dass mit 5 μL im Assay eine Steigung von 20 $\Delta F/\text{min}$ erhalten wird.

Tabelle 10: Assaybedingungen

Falcipain 2	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	175 μL P + 10 μL E + 10 μL I + 5 μL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC; [S]: 50 μM
Enzym	Falcipain 2; $[K_M]$: 21.5 μM
Puffer	ACETAT 5.5 ^a
Temperatur	25 °C
Detektion	λ : Anreg: 380 nm, Em: 460 nm

Rhodesain	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	180 μL P + 10 μL E + 5 μL I + 5 μL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC; [S]: 50 mM
Enzym	Rhodesain; $[K_M]$: 826.5 nM
Puffer	ACETAT 5.5 ^a
Temperatur	25 °C
Detektion	λ : Anreg: 380 nm, Em: 460 nm
Cathepsin B	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	180 μL P + 5 μL E + 10 μL I + 5 μL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC; [S]: 100 μM
Enzym	Cathepsin B; $[K_M]$: 150 μM
Puffer	TRIS 6.5 ^b
Temperatur	25 °C
Detektion	λ : Anreg: 380 nm, Em: 490 nm
SARS-CoV M ^{pro}	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	170 μL P + 10 μL E + 10 μL I + 10 μL S
Substrat	Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln Ser-Gly-Tyr(3'-NO ₂)- Arg(Mts)OH; [S]: 50 μM
Enzym	SARS-CoV M ^{pro} ; $[K_M]$: 190 μM
Puffer	197 TRIS 7.5 ^c
Temperatur	25 °C
Detektion	λ : Anreg: 325 nm, Em: 425 nm

SARS-CoV PL ^{pro}	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	170 μL P + 10 μL E + 10 μL I + 10 μL S
Substrat	Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly AMC [S]: 50 μM
Enzym	SARS-CoV PL ^{pro} ; $[K_M]$: 850 μM
Puffer	TRIS 7.5 ^c
Temperatur	25 $^{\circ}\text{C}$
Detektion	λ : Anreg: 360 nm, Em: 460 nm
Cathepsin L	
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay
Volumina	180 μL P + 5 μL E + 10 μL I + 5 μL S
Substrat	Cbz-Phe-Arg AMC; [S]: 6.25 μM
Enzym	Cathepsin L; $[K_M]$: 6.5 μM
Puffer	TRIS 6.5 ^b
Temperatur	25 $^{\circ}\text{C}$
Detektion	λ : Anreg: 380 nm, Em: 460 nm

P = Puffer, E = Enzym, I = Inhibitor, S = Substrat.

||markiert die Spaltstelle.

^a Puffer: ACETAT pH 5.5, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, Brij 35 0.005 %.

^b Puffer: TRIS pH 6.5, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, Brij 35 0.005 %.

198

^c Puffer: TRIS pH 7.5, 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, Brij 35 0.005 %.

1.4 Chemikalien, Reagenzien

Für die enzymatischen Assays wurde DMSO D4540 der Firma Sigma Aldrich verwendet. Die Puffer der Qualitätsstufe p.a. wurden von der Firma VWR erworben. Ehrlichs Reagenz: Sprühreagenz aus 1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 mL konz. HCl/MeOH (1:3); Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C. Wird H₂O in einer Synthese verwendet, bezieht sich diese Angabe auf deionisiertes und demineralisiertes Wasser.

Enzyme	
Falcipain 2	Prof. Dr. C. Kisker Universität Würzburg
Cathepsin L	CalBiochem
Cathepsin B	CalBiochem
SARS-CoV M^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker Universität Würzburg
SARS-CoV PL^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker Universität Würzburg
Rhodesain	Prof. Dr. C. Kisker Universität Würzburg
Substrate	
Cbz-Phe-Arg-AMC	Bachem
Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC	Bachem
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Glu-Ser-Gly-	GenScript Corporation
Tyr(3'-NO₂)-Arg (Mts)OH	New Jersey, USA)

2 Allgemeine Synthesemethoden

2.1 Isocyanatbildung

Angelehnt an [70]

1.0 eq. AS-Hydrochlorid wird in CH_2Cl_2 gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt, wobei ein feiner Argonstrom durch die Lösung geleitet wird. 4.0 eq. Pyridin werden hinzugegeben. Nach 20 min werden 1.3 eq. Phosgenlösung (20% in Toluol) innerhalb von 15 min zutropft, wobei eine Gelbfärbung zu beobachten ist. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 – 4 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Dann werden erneut 0.05 eq. Phosgenlösung hinzugegeben. Die gelbe organische Phase wird mit 0.50 M HCl versetzt und 2x mit eiskaltem H_2O gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden 1x mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wird anschließend mit MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wird das Isocyanat erhalten. Dieses wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

2.2 NCO-Kupplung

Angelehnt an [86]

1.0 eq. Isocyanat wird in trockenem THF gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Es werden 1.1 eq. 4-Methylpiperazin bzw. Morpholin zutropft. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtempera-

tur gerührt und anschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

2.3 Schutzgruppen

2.3.1 Hydrogenolyse

Angelehnt an [86, 87]

1.0 eq. Benzylester-geschützte AS wird unter Argon in MeOH in einer Hydrierbombe mit Magnetrührstab vorgelegt. 1.00 mmol pro 103 mg Substanz 10%iges Pd/C werden vorsichtig hinzugegeben und die Mischung wird bei ca. 15 bar H₂ für 2 h hydriert. Die Reaktionsmischung wird über Celite sowie über einen Büchnertrichter abfiltriert und mit MeOH nachgewaschen. Die Lösung wird mit Et₂O überschichtet und nach 2 d im Eisfach fällt das Reinprodukt in Form weißer Kristalle an.

2.3.2 Methylesterhydrolyse

Angelehnt an [87]

1.0 eq. Methylester-geschützte AS wird in MeOH gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 2.0 eq. LiOH werden hinzugegeben und es wird 2 h gerührt. Die reine Säure wird durch Extraktion mit EtOH und DCM bei pH 5-8 erhalten.

2.3.3 Tritylierung

Angelehnt an [50]

1.0 eq. Amin werden unter Argon-Atmosphäre in DCM bei 0 °C gelöst. TEA wird hinzugegeben und man lässt die Mischung auf r.t. erwärmen. 1.0 eq. Tritylchlorid wird portionsweise hinzugegeben und es wird 2 d gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung in H₂O gegossen und mit NH₄Cl- und NaCl-Lösung extrahiert.

2.3.4 Entfernung der Boc-Schutzgruppe

Angelehnt an [87]

1.0 eq. Boc-geschützte Substanz wird in DCM gelöst und mit 10.0 Volumeneq. TFA versetzt. Es wird ca. 2 h gerührt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. TFA wird als Azeotrop mit DCM über mehrfache Destillation am Rotationsverdampfer entfernt.

2.4 Reduktion mit LiAlH₄

Angelehnt an [71]

Einer Lösung aus 3.2 eq. LiAlH₄ in 20 mL THF werden über 15 min bei r.t. 1.0 eq. Trt-**53**-OMe bis Trt-**55**-OMe in 20 mL THF zugetropft. Die Reaktionsmischung wird ca. 4 h refluxiert

bis eine tiefe Rotfärbung beobachtet wird. Es wird über Nacht bei r.t. gerührt und die Mischung anschließend mit geringen Mengen H₂O, 15%iger NaOH-Lsg. und erneut H₂O gequenchet. Die gelartig ausgefallenen Aluminiumsalze werden über Celite abfiltriert und es wird mit viel DCM nachgewaschen und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt ist bereits rein genug für weitere Umsetzungen.

2.5 Oxidation nach Swern

Angelehnt an [71, 88]

Einer Lösung aus 1.5 eq. Oxalyldichlorid in 2 mL DCM werden während 10 min bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2.0 eq. DMSO in 2 mL DCM zugegeben. Nach weiteren 10 min werden 1.0 eq. Aminosäurederivat Trt-**53**-OH bis Trt-**55**-OH zugetropft und weitere 10 min gerührt. 4 eq. TEA in 2 mL DCM werden hinzugegeben und es wird bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bis die DC vollständigen Umsatz zeigt.

Die Reaktion wird bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer 20%igen KHSO₄-Lösung gequenchet und mit 10 mL Pentan verdünnt. Nach Erwärmung auf r.t. wird das Reaktionsgemisch mit ges. KHCO₃-Lsg. und NaCl-Lsg. extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wird nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer direkt umgesetzt.

2.6 Peptidkupplungen

2.6.1 Peptidkupplung in der Mikrowelle

Angelehnt an [50]

Die Mischung aus 1.0 eq. HomoPhe-Derivat **54-DB**, 1.2 eq. Aminosäurederivat, 1.2 eq. EDCI, 1.2 eq. HOBT und 2.0 eq. DIPEA in 5 mL DMF wird in der Mikrowelle 66 min auf 100 °C erhitzt. Dann werden erneut je 0.5 eq. EDCI, HOBT und DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung wird weitere 60 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt.

Die Mischung wird mit DCM extrahiert und das Rohprodukt mittels Flashsäulenchromatographie aufgereinigt.

2.6.2 Peptidkupplungen mit DCC/HOBT

Angelehnt an [87]

1.0 eq. Boc-AS werden in DMC oder THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 1.2 eq. DCC, 1.2 eq. HOBT, 1.0 eq. Amin und 2.5 eq. NMM werden hinzugegeben. Der gelartige dunkle Rückstand in der Reaktionsmischung wird nach 24 h während 2 h über einen großen Glasfildertiegel unter Druck abfiltriert und die erhaltene dunkle, klare Lösung mit Ethylacetat, H₂O, NaHCO₃-Lsg. und NaCl-Lsg. extrahiert. Das Rohprodukt wird portionsweise säulenchromatographisch aufgereinigt.

2.6.3 Peptidkupplungen mit PPA

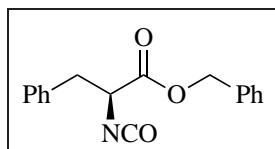
Angelehnt an [89]

1.0 eq. AS wird in EtOAc gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 3.5 eq. 50%iges PPA in DMF und 2.0 eq. 4-Methylpiperazin werden hinzugegeben. Es wird 1 h bei 0 °C und anschließend 16 h bei r.t. gerührt, wobei eine Trübung und Verfärbung nach weiß zu beobachten ist. Das Reaktionsgemisch wird mit ges. NaHCO₃-Lsg., H₂O und ges. NaCl-Lsg. extrahiert. Die organische Phase wird anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

3 Synthetisierte Verbindungen

Bausteine für Vinylsulfon-basierte Inhibitoren

(*S*)-Benzyl 2-isocyanato-3-phenylpropanoat 49-NCO



Methode 2.1

1.30 g (4.46 mmol, 1.0 eq.) L-Phenylalaninbenzylester-Hydrochlorid, 1.44 mL (17.80 mmol, 4.0 eq.) Pyridin, 3.65 mL (6.94 mmol, 1.56 eq.) Phosgenlösung (20% in Toluol), 10 mL CH₂Cl₂

Reaktionszeit: 4 h

Extraktion: 2 mL 0.50 M HCl, 4 mL eiskaltes H₂O, 4 mL CH₂Cl₂.

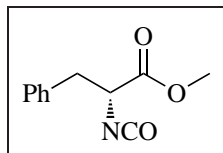
Isocyanat **49-NCO** wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 965 mg (77%)

¹H NMR (CDCl₃): 3.04 (dd, ³J = 13.8 und 4.80, PhCH₂, 1H), 3.15 (dd, ³J = 13.8 und 7.5, PhCH₂, 1H), 4.29 (dd, ³J = 7.5 und 4.8, C^{*}H, 1H), 5.14 - 5.27 (m, OCH₂, 2H), 7.09 - 7.15 (m, H_{arom}, 2H), 7.26 - 7.31 (m, H_{arom}, 3H), 7.31 - 7.42 (m, H_{arom}, 5H).

ESI (MS): ber. f. C₁₅H₁₇NO₃, 281.11; gef.: 282 (M⁺H).

Laborjournalnr: VB31

(R)-Benzyl 2-isocyanato-3-phenylpropanoat 50-NCO

Methode 2.1

1.64 g (7.62 mmol, 1.0 eq.) D-Methyl-2-amino-3-phenylpropanoat-Hydrochlorid, 90 mL CH₂Cl₂, 3.02 mL (30.48 mmol, 4.0 eq.) Pyridin, 5.20 mL (9.90 mmol, 1.3 eq.) Phosgenlösung (20% in Toluol)

Reaktionszeit: 2, 5 h

Extraktion: 2 mL 0.50 M HCl, 4 mL eiskaltes H₂O, 4 mL CH₂Cl₂

Isocyanat **50-NCO** wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 1.51 g (70%)

¹H NMR (CDCl₃): 2.91 - 2.98 (m, PhCH₂, 2H), 3.57 (s, OCH₃, 3H), 4.70 (t, ³J = 5.8, C*H, 1H), 6.98 - 7.02 (m, *m*-H_{arom}, 2H), 7.10 - 7.21 (m, *o*-/*p*-H_{arom}, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃): 38.69 (PhCH₂), 52.35 (OCH₃), 54.14 (C*H), 127.11 (*p*-CH_{arom}), 128.61 (*o*-CH_{arom}), 129.50 (*m*-CH_{arom}), 136.22 (C_q_{arom}), 156.31 (NCO), 173.24 (C=O).

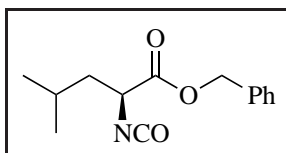
IR: 3345, 3027, 2950, 1740, 1712, 1631, 1566, 1439, 1357, 1300, 1262, 1204, 1176, 1027, 798, 750, 697.

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -62.3^\circ$ (c = 0.79, CHCl₃)

Smp.: 157.1 °C

Laborjournalnr: VB75

(S)-Benzyl 2-isocyanato-4-methylpentanoat 51-NCO



Methode 2.1

1.50 g (3.81 mmol, 1.0 eq.) (S)-Benzyl-2-amino-4-methylpentanoat-Hydrochlorid, 10 mL CH₂Cl₂, 1.51 mL (15.2 mmol, 4.0 eq.) Pyridin, 2.60 mL (4.96 mmol, 1.3 eq.) Phosgenlösung (20% in Toluol)

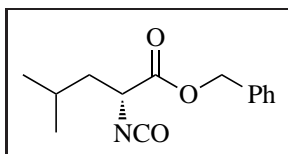
Reaktionszeit: 4 h

Extraktion: 2 mL 0.50 M HCl, 4 mL eiskaltes H₂O, 4 mL CH₂Cl₂

Isocyanat **51-NCO** wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 1.47 g (117%)

Laborjournalnr: VB66

(R)-Benzyl 2-isocyanato-4-methylpentanoat 52-NCO

Methode 2.1

3.00 g (7.60 mmol, 1.0 eq.) (*R*)-Benzyl-2-amino-4-methylpentanoat-Hydrochlorid, 20 mL CH₂Cl₂, 3.01 mL (30.4 mmol, 4.0 eq.) Pyridin, 5.20 mL (9.90 mmol, 1.3 eq.) Phosgenlösung (20% in Toluol)

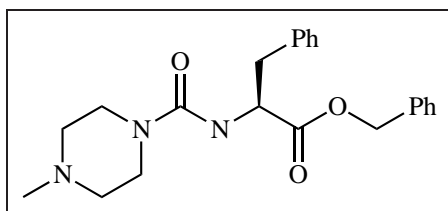
Reaktionszeit: 2.5 h

Extraktion: 2 mL 0.50 M HCl, 4 mL eiskaltes H₂O, 4 mL CH₂Cl₂

Isocyanat **52-NCO** wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 2.40 g (128%)

Laborjournalnr: VB71

(S)-Benzyl 2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-3-phenylpropanoat MP-49

Methode 2.2

598 mg (3.41 mmol, 1.0 eq.) **49-NCO**, 5 mL trockenes THF,

420 μL (3.75 mmol, 1.1 eq.) 4-Methylpiperazin

Ausbeute: 958 mg (74%)

^1H NMR (CDCl_3): 3.11 (d, $^3J = 5.2$, PhCH_2 Phe, 2H), 3.30 - 3.38 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 4H), 2.29 (s, NCH_3 , 3H), 2.33 - 2.40 (m, NCH_2 , 2H,) 4.80 - 4.89 (m, C^*H , 1H), 5.10 (d, $^2J = 12.1$, PhCH_2 Obz, 1H), 5.19 (d, $^2J = 12.1$, PhCH_2 Obz, 1H), 6.96 - 7.02 (m, H_{arom} , 2H), 7.19 - 7.23 (m, H_{arom} , 3H), 7.27 - 7.32 (m, H_{arom} , 2H), 7.33 - 7.39 (m, H_{arom} , 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 38.41 (PhCH_2 Phe), 43.74 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 46.16 (NCH_3), 54.45 (C^*H), 54.66 (NCH_2), 67.28 (PhCH_2 Obz), 135.37 (C_{qarom} Obz), 136.22 (C_{qarom} Phe), 127.10 (CH_{arom}), 128.61 (CH_{arom}), 128.70 (CH_{arom}), 128.73 (CH_{arom}), 129.52 (CH_{arom}), 156.59 (C_{q} Harnstoff), 172.61 (C_{q} Ester).

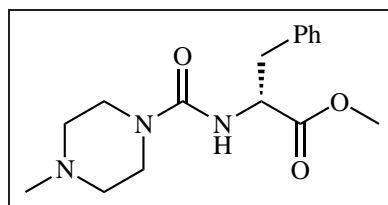
IR: 3312, 2941, 2786, 1738, 1615, 1532, 1455, 1405, 1291, 1265, 1169, 1093, 1001, 742, 697.

ESI(MS): ber. f. $\text{C}_2\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$, 381.21; gef.: 382 (99) (M^+H).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.3^\circ$ ($c = 0.83$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB32

(R)-Methyl 2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-3-phenylpropanoat MP-50



Methode 2.2

989 mg (3.50 mmol, 1.0 eq.) **50**-NCO, 5 mL trockenes THF,
428 μ L (3.85 mmol, 1.1 eq.) 4-Methylpiperazin

Ausbeute: 1.29 g (120%)

^1H NMR (CDCl_3): 2.22 (s, NCH_3 , 3H), 2.25 - 2.31 (m, 2x NCH_2 , 4H), 2.93 - 3.12 (m, PhCH_2 , 2H), 3.20 - 3.25 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 4H), 3.65 (s, OCH_3 , 3H), 4.67 - 4.75 (m, C^*H , 1H), 4.82 (d, $^3J = 7.5$, NH, 1H), 6.99 - 7.07 (m, $m\text{-H}_{\text{arom}}$, 2H), 7.13 - 7.26 (m, $o/p\text{-CH}_{\text{arom}}$, 3H).

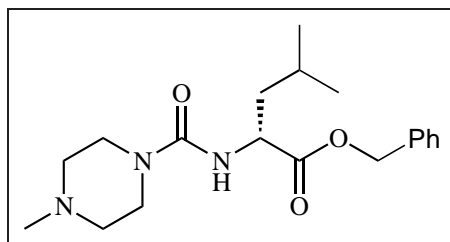
^{13}C NMR (CDCl_3): 38.44 (PhCH_2), 43.77 (2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 46.19 (NCH_3), 52.29 (OCH_3), 54.45 (C^*H), 54.68 (2x NCH_2), 127.10 ($p\text{-CH}_{\text{arom}}$), 128.59 ($o\text{-CH}_{\text{arom}}$), 129.41 ($m\text{-CH}_{\text{arom}}$), 136.36 (C_{qarom}) 156.60 (C_{q} Harnstoff), 173.22 (C_{q} Ester).

IR: 3375, 3027, 2939, 2851, 2800, 1591, 1535, 1496, 1390, 1263, 978, 699.

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -4.5^\circ$ ($c = 1.05$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB79a

**(R)-Benzyl 4-methyl-2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-
pentanoat MP-52**



Methode 2.2

1.00 g (4.04 mmol, 1.0 eq.) **52-NCO**, 5 mL trockenes THF,
494 μ L (4.45 mmol, 1.1 eq.) 4-Methylpiperazin

Das Rohprodukt wird durch mehrfache Säulenchromatographie aufgereinigt (Eluent 1. PE/EtOAc 8:1 bis 4:1, Eluent 2. EtOAc/EtOH 2:1 bis 1:2, Eluent 3. EtOAc/EtOH 4:1). Für das Produkt **MP-52** ergibt sich der $R_f = 0.23$ (EtOAc/EtOH 1:2).

Ausbeute: 298 mg (21%)

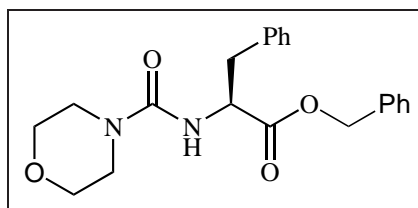
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 0.90 - 0.94 (m, 2x CH_3 Leu, 6H), 1.46 - 1.56 (m, CH_2 Leu, 1H), 1.58 - 1.70 (m, CH und CH_2 Leu, 2H), 2.30 (s, NCH_3 , 3H), 2.36 - 2.45 (m, 2x NCH_2 , 4H), 3.38 - 3.45 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 4H), 4.41 - 4.60 (m, C^*H , 1H), 4.81 (d, $^3J = 8.1$, NH, 1H), 5.07 - 5.23 (m, PhCH_2 , 2H), 7.40 - 7.28 (m, H_{arom} , 5H).
 $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 22.21 (CH_3 Leu), 22.91 (CH_3 Leu), 25.04 (CH

Leu), 42.13 (CH₂ Leu), 43.87 (2x N(C=O)CH₂), 46.21 (NCH₃), 52.41 (C*H), 54.74 (2x NCH₂), 67.07 (PhCH₂), 128.29 (CH_{arom}), 128.45 (CH_{arom}), 128.71 (CH_{arom}), 135.79 (Cq_{arom}), 157.18 (Cq Harnstoff), 174.40 (Cq Ester).

Laborjournalnr: VB74

(S)-Benzyl 2-(morpholin-4-carboxamido)-3-phenyl-propanoat

Mu-49



Methode 2.2

1.50 g (5.30 mmol, 1.0 eq.) **49**-NCO, 8 mL trockenes THF, 510 μ L (5.80 mmol, 1.1 eq.) Morpholin

Das Rohprodukt wird mit einem Gemisch aus PE/EtOAc säulenchromatographisch mit einem Gradienten von 8:1 bis 4:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 1.25 g (61%)

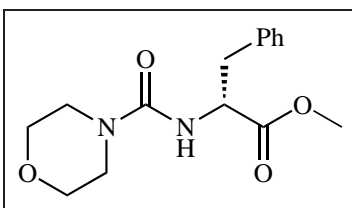
¹H NMR (CDCl₃): 3.00 - 3.17 (m, PhCH₂, 2H), 3.20 - 2.41 (m, 2x NCH₂, 4H), 3.51 - 3.77 (m, 2x OCH₂, 4H), 5.11. (d, ²J = 12.1, PhCH₂ Obz, 1H), 5.20 (d, ²J = 12.1, PhCH₂ Obz, 1H), 6.94 -

7.04 (m, H_{arom} , 2H), 7.17 - 7.25 (m, H_{arom} , 3H), 7.28 - 7.34 (m, H_{arom} , 2H), 7.34 - 7.41 (m, H_{arom} , 3H).

Laborjournalnr: VB90a

(R)-Methyl 2-(morpholin-4-carboxamido)-3-phenylpropanoat

Mu-50



Methode 2.2

565 mg (2.00 mmol, 1.0 eq.) **50-NCO**, 5 mL trockenes THF,
194 μ L (2.20 mmol, 1.1 eq.) Morpholin

Das Rohprodukt wird mit einem Gemisch aus PE/EtOAc im Verhältnis 4:1 bis EtOAc 100% säulenchromatographisch aufgereinigt. Für das Produkt **Mu-50** ergibt sich der $R_f = 0.29$ in 1:2 PE/EtOAc.

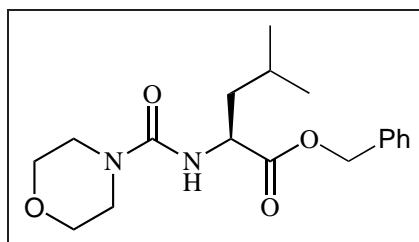
Ausbeute: 482 mg (96%)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 3.02 - 3.17 (m, PhCH_2 , 2H), 3.21 - 3.35 (m, 2x NCH_2 , 4H), 3.55 - 3.65 (m, 2x OCH_2 , 4H), 3.69 (s, OCH_3 , 3H), 4.76 (dd, $^3J = 12.9$ und 6.6 , C^*H , 1H), 5.01 (d, $^3J = 6.6$, NH, 1H), 7.06 - 7.15 (m, H_{arom} , 2H), 7.18 - 7.30 (m, H_{arom} , 3H).

Laborjournalnr: VB89a

(*S*)-Benzyl 4-methyl-2-(morpholin-4-carboxamido)-pentanoat

Mu-51



Methode 2.2

350 mg (1.42 mmol, 1.0 eq.) **51**-NCO, 3 mL trockenes THF,
137 μ L (1.56 mmol, 1.1 eq.) Morpholin

Das Rohprodukt wird mit einem Gemisch aus PE/EtOAc im
Verhältnis 8:1 bis 4:1 säulenchromatographisch aufgereinigt. Für
das Produkt **Mu-51** ergibt sich der $R_f = 0.08$ in 6:1 PE/EtOAc.

Ausbeute: 186 mg (39%)

^1H NMR (CDCl_3): 0.86 - 0.96 (m, 2x CH_3 Leu, 6H), 1.41 - 1.52
(m, CH_2 Leu, 1H), 1.57 - 1.75 (m, CH und CH_2 Leu, 2H), 2.95
- 3.02 (m, 2x NCH_2 , 4H), 3.71 - 3.76 (m, 2x OCH_2 , 4H), 4.47 -
4.59 (m, C^*H , 1H), 4.76 (bs, NH, 1H), 5.10 - 5.21 (m, PhCH_2 ,
2H), 7.33 - 7.36 (m, H_{arom} , 3H), 7.62 - 7.66 (m, H_{arom} , 2H).

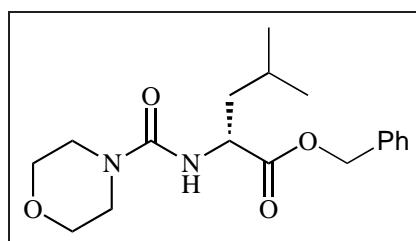
^{13}C NMR (CDCl_3): 22.04 (CH_3 Leu), 22.87 (CH_3 Leu), 24.79 (CH
Leu), 42.02 (CH_2 Leu), 46.07 (2x NCH_2), 51.79 (C^*H), 66.15 (2x

OCH₂), 66.90 (PhCH₂), 127.96 (2x CH_{arom}), 135.63 (C_{qarom}), 128.59 (CH_{arom}), 129.82 (2x CH_{arom}), 157.06 (C_q Harnstoff), 174.15 (C_q Ester).

Laborjournalnr: VB77a

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [90]

(R)-Benzyl 4-methyl-2-(morpholin-4-carboxamido)pentanoat
Mu-52



Methode 2.2

1.00 g (4.40 mmol, 1.0 eq.) **52-NCO**, 5 mL trockenes THF,
390 μ L (4.44 mmol, 1.1 eq.) Morpholin

Das Rohprodukt wird mit einem Gemisch aus PE/EtOAc säulenchromatographisch mit einem Gradient von 8:1 bis 4:1 aufgereinigt. Fraktion 3 wurde erneut mit PE/EtOAc 4:1 aufgereinigt.

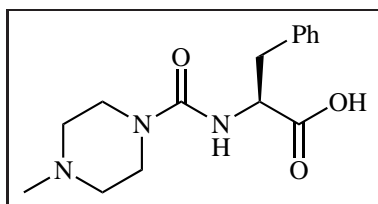
Ausbeute: 312 mg (21%)

¹H NMR (CDCl₃): 0.85 - 1.01 (m, 2x CH₃ Leu, 6H), 1.37 - 1.58 (m, CH₂ Leu, 1H), 1.58 - 1.71 (m, CH und CH₂ Leu, 2H), 3.28

- 3.45 (m, 2x NCH₂, 4H), 3.62 - 3.76 (m, 2x OCH₂, 4H), 4.51 - 4.67 (m, C*H, 1H), 4.82 (d, ³J = 8.2, NH, 1H), 5.02 - 5.29 (m, PhCH₂, 2H), 7.29 - 7.40 (m, H_{arom}, 5H).

Laborjournalnr: VB80a

**(S)-2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-3-phenylpropansäure
MP-49-COOH**



Methode 2.3.1

939 mg (2.45 mmol) Benzylester MP-49, ca. 4 mL MeOH, 247 mg 10%ige Pd/C. Nach 2 d im Eisfach fällt das Reinprodukt in Form weißer Kristalle an.

Ausbeute: 265 mg (40%)

¹H NMR (CDCl₃): 2.55 (s, NCH₃, 3H), 2.67 - 2.85 (m, 2x NCH₂ MP, 4H), 3.05 - 3.16 (m, PhCH₂, 1H) 3.19 - 3.28 (m, PhCH₂, 1H), 3.38 - 3.69 (m, 2x N(C=O)CH₂ MP, 4H), 4.47 - 4.58 (m, C*H, 1H), 7.19 - 7.24 (m, H_{arom}, 3H), 7.26 - 7.29 (m, H_{arom}, 3H).

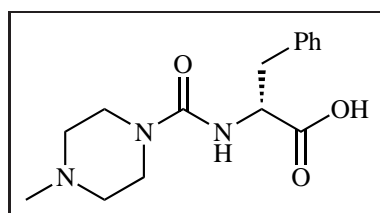
IR: 3384, 2924, 2440, 2159, 2028, 1976, 1639, 1582, 1531, 1454, 1390, 1370, 1244, 1200, 977, 884, 751, 705, 638.

ESI (MS): ber. f. $C_{15}H_{21}N_3O_3$, 291.16; gef.: 290 ($M^+ - H = COO^-$),
292 ($M^+ \cdot H$).

spez. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +1.9^\circ$ ($c = 0.0061$, $CHCl_3$)

Laborjournalnr: VB4

**(R)-2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-3-phenylpropansäure
MP-50-COOH**



Methode 2.3.2

1.29 g (4.23 mmol) Methylester MP-50, ca. 7.5 mL MeOH,
ca. 10 mL 1.0 M NaOH statt LiOH, mit ca. 5 mL 1.0 M HCl
neutralisieren, MeOH abdestillieren. Nach Überschichtung mit
4.2 mL HCl und 2 d im Eisfach fällt das Reinprodukt in Form
weißer Kristalle an.

Ausbeute: 2.59 g (72%)

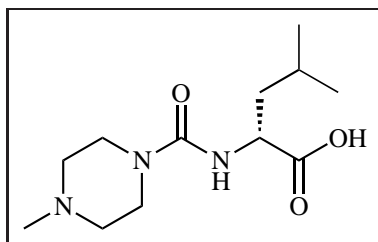
1H NMR ($CDCl_3$): 2.27 (s, NCH_3 , 3H), 2.34 - 2.50 (m, 2x NCH_2
MP, 4H), 2.91 - 3.04 (m, $PhCH_2$, 1H) 3.12 - 3.21 (m, $PhCH_2$,
1H), 3.22 - 3.43 (m, 2x $N(C=O)CH_2$ MP, 4H), 4.36 - 4.47 (m,
 C^*H , 1H), 5.72 (bs, NH, 1H), 7.11 - 7.17 (m, H_{arom} , 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 44.70 (NCH_3), 53.60 (2x NCH_2 MP), 38.31 (PhCH_2), 42.61 (2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$ MP), 56.87 (C^*H), 126.49 (CH_{arom}), 128.32 CH_{arom} , 129.65 CH_{arom} , 138.60 (C_{qarom}), 157.60 (C_{q} Harnstoff), 178.24 (C_{q} Säure).

ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$, 291.16; gef.: 292 (M^+H).

Laborjournalnr: VB79b

**(*R*)-4-Methyl-2-(4-methylpiperazin-1-carboxamido)-
pentansäure MP-52-COOH**



Methode 2.3.1

298 mg (0.85 mmol) Benzylester MP-52, ca. 4 mL MeOH,
100 mg 10%iges Pd/C, 8 bar H_2

Ausbeute (roh): 173 mg (78%)

Das Rohprodukt fällt als gelbes Öl an. Es enthält Toluol und Nebenprodukte, wie die 1D- und 2D-NMR-Spektren zeigen. Es sind nicht alle Signale zuzuordnen, dennoch kann aus der Abwesenheit der Protonen der Benzylschutzgruppe (~ 5.15 ppm) sowie der charakteristischen Säure-IR-Bande bei $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ eine

erfolgreiche Hydrogenolyse gefolgert werden.

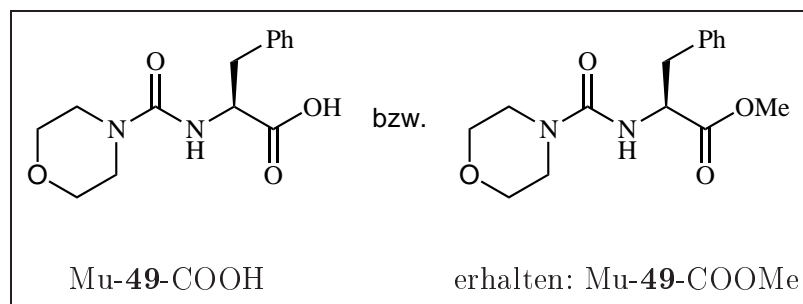
^1H NMR (CD_3OD): 0.86 - 1.02 (m, 2x CH_3 Leu, 6H), 2.31 - 2.32 (m, NCH_3 , 3H), 2.45 - 2.55 (m, 2x NCH_2 , 4H), 3.40 - 3.64 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): 22.19 (CH_3 Leu), 44.91 (2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 45.96 (NCH_3), 55.44 (2x NCH_2).

IR: 3319, 2954, 2869, 2800, 1712, 1637, 1447, 1172, 1125, 1037, 1012, 1001, 814, 686.

Laborjournalnr: VB74

**(S)-2-(Morpholin-4-carboxamido)-3-phenylpropansäure
Mu-49-COOH**



Methode 2.3.1

1.25 g (3.23 mmol) Benzylester Mu-49, ca. 8 mL MeOH, 330 mg 20%iges Pd/C, 5 bar H_2

Ausbeute: 850 mg (68%)

Das Produkt fällt als braunes Öl an. 1D- und 2D-NMR-Spektren

zeigen eine erfolgreiche Hydrogenolyse. Allerdings wird die freie Säure während der Reaktion direkt mit dem Lösemittel (MeOH) verestert. (Vgl. NMR von Enantiomer: Mu-D-Phe-OMe Mu-**50**).

^1H NMR (CD_3OD): 2.91 - 3.03 (m, PhCH_2 , 1H), 3.07 - 3.19 (m, PhCH_2 , 1H), 3.31 (bs, 2x NCH_2 , 4H), 3.57 (bs, 2x OCH_2 , 4H), 3.67 (bs, OCH_3 Ester, 3H), 4.49 (bs, C^*H , 1H), 4.84 (bs, NH, 1H), 7.12 - 7.33 (m, H_{arom} , 5H).

^{13}C NMR (CD_3OD): 38.35 (PhCH_2), 45.25 (2x NCH_2), 52.57 (OCH_3 Ester), 56.77 (C^*H), 67.46 (2x OCH_2), 127.67 (C_{arom}), 129.35 (C_{arom}), 130.14 (C_{arom}), 138.65 (C_{qarom}), 174.72 (C_{q} COOH).

IR (Ester): 3311, 2849, 1742, 1619, 1528, 1268, 1200, 1116, 995, 700.

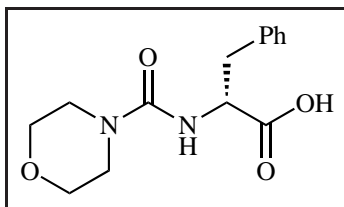
ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, 292.33; gef.: 293 (M^+H Ester).

Smp.: 79.8 °C

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +26.9^\circ$ ($c = 0.014$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB90b

(*R*)-2-(Morpholin-4-carboxamido)-3-phenylpropansäure
Mu-50-COOH



Methode 2.3.2

482 mg (1.54 mmol) Methylester Mu-50, 86.7 mg (3.62 mmol, 2.0 eq.) LiOH, 8 mL MeOH

Ausbeute: 417 mg (97%)

^1H NMR (CDCl_3): 2.99 - 3.08 (m, PhCH_2 , 1H), 3.09 - 3.28 (m, PhCH_2 , 2x NCH_2 , 5H), 3.47 - 3.60 (m, OCH_2 , 4H), 4.55 - 4.64 (m, C^*H , 1H), 4.96 (d, $^3J = 7.2$, NH, 1H), 7.07 - 7.14 (m, *o*- H_{arom} , 2H), 7.14 - 7.26 (m, *p/m*- H_{arom} , 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 37.53 (PhCH_2), 44.07 (NCH_2), 54.95 (C^*H), 66.41 (2x OCH_2), 127.26 (*p*- CH_{arom}), 128.77 (*m*- CH_{arom}), 129.44 (*o*- CH_{arom}), 136.41 (C_{qarom}), 157.70 (C_{q} Harnstoff), 174.95 (C_{q} Ester).

IR: 3354, 2922, 2853, 1721, 1624, 1524, 1454, 1397, 1260, 1196, 1112, 993, 859, 755, 700.

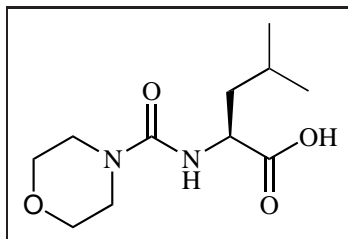
spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -17.9^\circ$ ($c = 0.75$, CHCl_3)

ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$, 278.30; gef.: 279 (M^+H).

Laborjournalnr: VB89b

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [91]

(S)-4-Methyl-2-(morpholin-4-carboxamido)-pentansäure
Mu-51-COOH



Methode 2.3.1

186 mg (0.55 mmol) Benzylester Mu-51, ca. 15 mL MeOH,
134 mg 20%iges Pd/C, 7 – 8 bar H₂

Ausbeute: 384 mg (286%) (roh)

Das Rohprodukt fällt als braunes Öl an. Es sind mittels 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie nicht alle Molekülfragmente zuzuordnen, dennoch kann aus der Abwesenheit der Protonen der Benzylschutzgruppe (~ 5.15 ppm) sowie der charakteristischen Säure-IR-Bande bei $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ eine erfolgreiche Hydrogenolyse gefolgert werden.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.75 - 0.89 (m), 1.03 (bs, 1H), 1.20 (bs, 2H), 1.40 (bs, 1H), 1.59 (bs, 1H), 2.80 (bs, 2x NCH₂, 4H), 3.38 (s), 3.58 (bs, 2x OCH₂, 4H), 4.31 (bs, C*H, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6): 14.50, 31.62, 45.31 (2x NCH $_2$), 64.75 (2x OCH $_2$), 89.01.

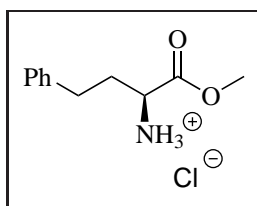
IR: 3380, 2974, 2929, 2870, 1597, 1560, 1450, 1262, 1160, 1092, 1038, 942, 876, 815, 730, 652.

ESI (MS): ber. f. C $_{11}$ H $_{20}$ N $_2$ O $_4$, 244.14; gef.: 243 (M $^{+}$ -H = COO $^{-}$).

Laborjournalnr: VB77b

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [90]

L-HomoPhe-methylester-hydrochlorid 54-OMe



Angelehnt an [87]

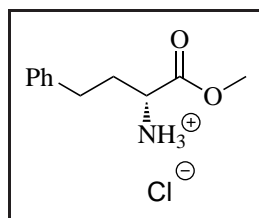
2.50 g (8.95 mmol) Boc-L-HomoPhe werden in 120 mL 2,2-Dimethoxypropan gelöst und mit ca. 9 mL konz. HCl versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei r.t. gerührt. 2,2-Dimethoxypropan wird am Rotationsverdampfer entfernt und der feste braune Rückstand wird in wenig MeOH aufgenommen und mit Et $_2$ O überschichtet. Das Produkt 54-OMe fällt als HCl-Salz in hellen Nadeln aus und wird nach Filtration erhalten.

Ausbeute: 1.88 g (92%)

^1H NMR (CDCl_3): 2.38 - 2.44 (m, PhCH_2 , 2H), 2.83 - 2.99 (m, C^*HCH_2 , 2H), 3.70 (s, OCH_3 , 3H), 4.11 (bs, C^*H , 1H), 7.16 - 7.28 (m, H_{arom} , 5H).

Laborjournalnr: VB43

D-HomoPhe-methylester-hydrochlorid 55-OMe



Angelehnt an [87]

2.35 g (8.41 mmol) Boc-D-HomoPhe werden in 120 mL 2,2-Dimethoxypropan gelöst und mit ca. 9 mL konz. HCl versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei r.t. gerührt. 2,2-Dimethoxypropan wird am Rotationsverdampfer entfernt und der feste braune Rückstand wird in wenig MeOH aufgenommen und mit Et_2O überschichtet. Das Produkt **55-OMe** fällt als HCl-Salz in hellen Nadeln aus und wird nach Filtration rein erhalten.

Ausbeute: 1.74 g (98%)

^1H NMR (CDCl_3): 2.32 - 2.48 (m, C^*HCH_2 , 2H), 2.78 - 3.00 (m, PhCH_2 , 2H), 3.66 (s, OCH_3 , 3H), 4.08 - 4.26 (m, C^*H , 1H), 7.11 - 7.17 (m, $p\text{-H}_{\text{arom}}$, 1H), 7.18 - 7.23 (m, $m\text{-H}_{\text{arom}}$, 2H), 7.23 - 7.28

(m, *o*-H_{arom}, 2H), 9.01 (s, NH₃, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃): 31.26 (PhCH₂), 32.13 (C*HCH₂), 53.06 (C*H), 53.24 (OCH₃), 126.42 (*p*-CH_{arom}), 128.59 (*m*-CH_{arom}), 128.80 (*o*-CH_{arom}), 139.88 (C_q_{arom}), 169.76 (C_q Ester).

IR: 2841, 1734, 1578, 1508, 1451, 1432, 1241, 1198, 1062, 758, 739, 697.

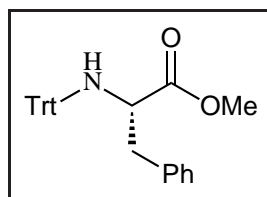
ESI(MS): ber. f. C₁₁H₁₅NO₂, 193.11; gef.: 194 (M⁺H) (76).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -26.3^\circ$ (c = 0.91, CHCl₃)

Smp.: > 300 °C

Laborjournalnr: VB103

(S)-Methyl-3-phenyl-2-(tritylamino)propanoat Trt-53-OMe



Methode 2.3.3

3.12 g (14.5 mmol) Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid, 60 mL DCM, ca. 7 mL TEA, 4.86 g (55.7 mmol, 1.0 eq.) Tritylchlorid, 10 mL H₂O

Ausbeute: 4.32 g (70%)

¹H NMR (CDCl₃): 1.62 (d, ³J = 10.9, NH, 1H), 2.86 - 3.00 (m,

PhCH₂, 2H), 3.03 (s, OCH₃, 3H), 3.48 - 3.61 (m, C^{*}H, 1H), 7.11 - 7.44 (m, H_{arom}, 20H).

¹³C NMR (CDCl₃): 42.50 (PhCH₂), 51.38 (OCH₃), 58.50 (C^{*}H), 71.13 (C_q Trt), 126.44 (CH_{arom}), 126.80 (CH_{arom}), 127.37 (CH_{arom}), 127.88 (CH_{arom}), 128.04 (CH_{arom}), 128.06 (CH_{arom}), 128.35 (CH_{arom}), 128.94 (CH_{arom}), 129.94 (CH_{arom}), 137.65 (C_{qarom}), 145.99 (C_{qarom}), 147.01 (C_{qarom}), 175.04 (C_q Ester).

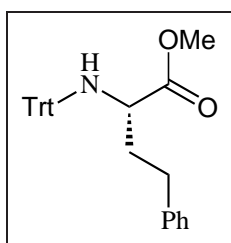
ESI(MS): ber. f. C₂₉H₂₇NO₂, 421.20; gef.: 421 (M⁺), 444 (M⁺)Na.

Smp.: 214.5 °C

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +54.0^\circ$ (c = 0.018, CHCl₃)

Laborjournalnr: VB56/85

(S)-Methyl-4-phenyl-2-(tritylamino)butanoanoat Trt-54-OMe



Methode 2.3.3

4.85 g (9.42 mmol) **54-OMe**, 8 mL DCM, ca. 2.5 mL TEA, 1.35 g (4.85 mmol, 1.0 eq.) Tritylchlorid, 8 mL H₂O

Ausbeute: 1.93 g (91%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.98 - 2.16 (m, C^*HCH_2 , 2H), 2.55 - 2.80 (m, PhCH_2 , 2H), 3.19 (s, OCH_3 , 3H), 3.40 - 3.51 (m, C^*H , 1H), 7.14 - 7.35 (m, H_{arom} , 15H), 7.48 - 7.54 (m, H_{arom} , 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 31.72 (PhCH_2), 37.51 (C^*HCH_2), 51.48 (OCH_3), 56.09 (C^*H), 71.21 (C_q Trt), 125.96 ($p\text{-C}_{\text{arom}}$ Ph), 126.42 ($p\text{-C}_{\text{arom}}$ Trt), 127.83 ($o\text{-C}_{\text{arom}}$ Ph), 127.96 ($o\text{-C}_{\text{arom}}$ Trt), 127.98 ($o\text{-C}_{\text{arom}}$ Trt), 128.38 ($m\text{-C}_{\text{arom}}$ Trt), 128.45 ($m\text{-C}_{\text{arom}}$ Trt), 128.86 ($m\text{-C}_{\text{arom}}$ Ph), 141.71 ($\text{C}_{q\text{arom}}$ Ph), 146.03 ($\text{C}_{q\text{arom}}$ Trt), 171.35 (C_q Ester).

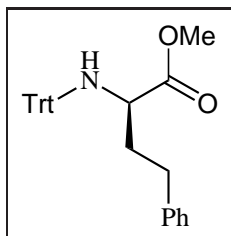
IR: 3404, 2920, 2868, 1448, 1376, 1349, 1105, 1065, 934, 886, 763, 702.

ESI(MS): ber. f. $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{NO}_2$, 435.22; gef.: 435 (M^+), 458 (M^+Na).

Smp.: 100.1 °C

Laborjournalnr: 102b/52/47

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [50]

(R)-Methyl-4-phenyl-2-(tritylamino)butanoat**Trt-55-OMe**

Methode 2.3.3

1.59 g (8.22 mmol) **55-OMe**, 12 mL DCM, ca. 3.5 mL TEA,

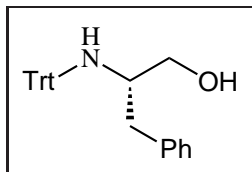
2.29 g (8.22 mmol, 1.0 eq.) Tritylchlorid, 8 mL H₂O

Ausbeute: 3.19 g (89%)

¹H NMR (CDCl₃): 1.97 - 2.14 (m, C*HCH₂, 2H), 2.55 - 2.71 (m, PhCH₂, 2H), 3.20 (s, OCH₃, 3H), 3.39 - 3.50 (m, C*H, 1H), 7.14 - 7.36 (m, H_{arom}, 15H), 7.48 - 7.53 (m, H_{arom}, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃): 31.80 (PhCH₂), 37.59 (C*HCH₂), 51.56 (OCH₃), 56.18 (C*H), 71.29 (C_q Trt), 126.04 (*p*-CH_{arom} Ph), 126.50 (*p*-CH_{arom} Trt), 128.05 (*o*-CH_{arom} Ph), 128.46 (*o*-CH_{arom} Trt), 128.53 (*o*-CH_{arom} Trt), 128.95 (*m*-CH_{arom} Trt), 141.79 (C_q_{arom} Ph), 146.11 (C_q_{arom} Trt), 147.02 (C_q_{arom} Trt), 175.43 (C_q Ester).

Laborjournalnr: VB104

(S)-3-Phenyl-2-(tritylamino)proanol Trt-53-OH

Methode 2.4

2.89 g (77.0 mmol, 3.2 eq.) LiAlH_4 in 20 mL THF, 12.61 g (24.0 mmol, 1.0 eq.) Trt-**53**-OMe in 20 mL THF

Quenchen mit 1.3 mL H_2O , 1.3 mL 15%iger NaOH-Lsg., 4.0 mL H_2O

Die säulenchromatographische Aufreinigung einer kleinen Menge des Rohprodukts mit einem 12:1 Gemisch aus Pentan/Ethylacetat führte zur überwiegenden Zersetzung des Produkts, daher wurde das Rohprodukt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 1.32 g (139%)

^1H NMR (CDCl_3): 2.44 - 2.55 (m, PhCH_2 , 1H), 2.61 - 2.71 (m, PhCH_2 , 1H), 2.91 - 3.01 (m, HOCH_2 , 1H), 3.01 - 3.08 (m, HOCH_2 , 1H), 3.19 - 3.29 (m, C^*H , 1H), 7.10 (d, $^3J = 7.2$, H_{arom} Trt, 2H), 7.17 - 7.48 (m, H_{arom} Trt und Phe, 13H), 7.73 (d, $^3J = 7.7$, H_{arom} Trt, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 39.07 (PhCH_2), 55.36 (C^*H), 62.31 (CH_2OH), 71.25 (Cq Trt), 125.99 (CH_{arom}), 126.42 (CH_{arom}), 127.05 (CH_{arom}), 127.78 (CH_{arom}), 127.86 (CH_{arom}), 127.96 (CH_{arom}),

128.20 (CH_{arom} Trt), 129.43 (CH_{arom} Trt), 139.09 (C_{qarom} Phe),
146.66 (C_{qarom} Trt), 147.06 (C_{qarom} Trt).

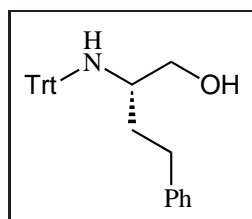
IR: 3056, 3024, 2932, 2877, 1595, 1490, 1446, 1207, 1154, 1029,
900, 743, 696.

ESI(MS): ber. f. $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}$, 393.21; gef.: 394 (M^+H) (100).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -131.8^\circ$ ($c = 0.13$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB106

(S)-4-Phenyl-2-(tritylamino)butanol Trt-54-OH



Methode 2.4

531 mg (14.14 mmol, 3.2 eq.) LiAlH_4 in 8 mL THF, 1.93 g
(4.42 mmol, 1.0 eq.) in 8 mL THF

Quenchen mit 0.3 mL H_2O , 0.3 mL 15%iger NaOH-Lsg., 0.9 mL
 H_2O

Das Rohprodukt ist bereits rein genug für weitere Umsetzun-
gen. Die säulenchromatographische Aufreinigung in einem 12:1
Gemisch aus Pentan/Ethylacetat führt zur überwiegenden Zer-
setzung des Produkts.

Ausbeute: 1.156 g (64%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.36 - 1.52 (m, C^*HCH_2 , 1H), 1.70 - 1.88 (m, C^*HCH_2 , 1H), 2.41 - 2.54 (m, PhCH_2 , 1H), 2.59 - 2.72 (m, PhCH_2 , 1H), 2.83 - 2.94 (m, C^*H , 1H) 3.52 (dd, $^2J=10.8$, $^3J=3.2$, CH_2OH , 1H), 3.33 (dd, $^2J=10.8$, $^3J=4.4$, CH_2OH , 1H), 7.15 - 7.22 (m, H_{arom} Trt, 2H), 7.27 - 7.60 (m, H_{arom} Trt und HomoPhe, 13H), 7.69 - 7.84 (m, H_{arom} Trt, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 32.39 (PhCH_2), 34.62 (C^*HCH_2), 55.31 (C^*H), 63.09 (CH_2OH), 71.19 (Cq Trt), 125.59 (H_{arom}), 126.37 (H_{arom}), 127.02 (H_{arom}), 127.75 (H_{arom}), 127.81 (H_{arom}), 127.96 (H_{arom}), 128.16 (H_{arom}), 128.19 (H_{arom}), 128.65 (H_{arom}), 141.91 (Cq_{arom} HomoPhe), 146.66 (Cq_{arom} Trt), 147.06 (Cq_{arom} Trt).

IR: 3058, 3025, 2927, 2527, 2159, 2031, 1976, 1595, 1490, 1446, 1031, 967, 898, 745, 696.

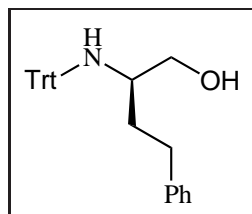
ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}$, 407.22; gef.: 243 (Trt), 408 (M^+H), 167 ($\text{M}^+\text{H}_3 - \text{Trt}$).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +305.7^\circ$ ($c = 0.11$, CHCl_3)

Smp.: 80.3 °C

Laborjournalnr: VB112

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [50]

(R)-4-Phenyl-2-(tritylamino)butanol Trt-55-OH

Methode 2.4

880 mg (23.40 mmol, 3.2 eq.) LiAlH_4 in 10 mL THF, 1.93 g (4.42 mmol, 1.0 eq.) Trt-55-OMe in 10 mL THF

Quenchen mit 0.4 mL H_2O , 0.4 mL 15%iger NaOH-Lsg., 1.2 mL H_2O

Das Rohprodukt (3.19 g, 108%) wird mit einem 12:1 Gemisch aus Pentan/Ethylacetat sowie mit Pentan 100% säulenchromatographisch aufgetrennt, das Produkt kann jedoch nicht rein isoliert werden.

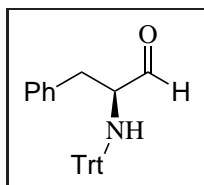
^1H NMR (CDCl_3): 1.42 - 1.55 (m, C^*HCH_2 , 1H), 1.66 - 1.82 (m, C^*HCH_2 , 1H), 2.43 - 2.53 (m, PhCH_2 , 1H), 2.54 - 2.71 (m, PhCH_2 , 1H), 2.82 - 2.96 (m, C^*H , 1H), 3.36 (dd, $^2J = 10.8$, $^3J = 4.5$, CH_2OH , 1H), 3.53 (dd, $^2J = 10.9$, $^3J = 3.1$, CH_2OH , 1H), 7.12 - 7.18 (m, H_{arom} Trt, 2H), 7.25 - 7.62 (m, H_{arom} Trt und HomoPhe, 13H), 7.69 - 7.75 (m, H_{arom} Trt, 5H).

IR: 3465, 3060, 3026, 2928, 2503, 1490, 1444, 1329, 1156, 1010, 756, 695, 637.

ESI (MS): ber. f. $C_{29}H_{29}NO$, 407.22; gef.: 167 (100) (M^+H_3-Trt), 408 (M^+H), 243 (Trt).

Laborjournalnr: VB105

(S)-3-Phenyl-2-(tritylamino)propanal Trt-53-CHO

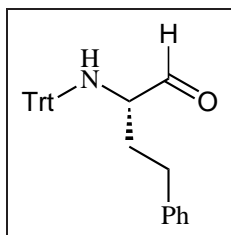


Methode 2.5

74 μ L (0.88 mmol, 1.5 eq.) Oxalyldichlorid in 2 mL DCM, 48 μ L (1.16 mmol, 2.0 eq.) DMSO in 2 mL DCM, 230 mg (0.58 mmol, 1.0 eq.) Trt-53-OH, 322 μ L (2.32 mmol, 4.0 eq.) TEA in 1 mL DCM

1H NMR ($CDCl_3$): 2.61 - 2.85 (m, $PhCH_2$, 2H), 3.51 - 3.60 (m, C^*H , 1H), 7.12 - 7.24 (m, H_{arom} , 11H), 7.27 - 7.40 (m, H_{arom} , 9H), 8.86 (d, $^3J = 2.2$, CHO, 1H).

Laborjournalnr: VB83a

(S)-4-Phenyl-2-(tritylamino)butanal Trt-54-CHO

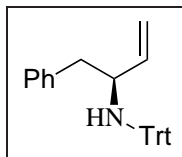
Methode 2.5

6.04 mL (12.09 mmol, 1.7 eq.) Oxalyldichlorid in 10 mL DCM, 2.02 μ L (24.44 mmol, 4.0 eq.) DMSO in 10 mL DCM, 2.90 g (7.11 mmol, 1.0 eq.) Trt-54-OH, 6.40 mL (46.22 mmol, 6.5 eq.) TEA in 10 mL DCM

Die Charakterisierung konnte nur mittels DC erfolgen, da das NMR-Gerät unserer Kooperationspartner an der Universität von Messina, bei denen die Substanz während eines Forschungsaufenthaltes synthetisiert wurde, defekt war und keine weiteren Möglichkeiten der Analytik zur Verfügung standen. $R_f(\text{R-OH}) = 0.53$, $R_f(\text{R-CHO}) = 0.66$ (13:1 PE/EtOAc). Nach vollständiger Reaktion wurde das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt. Die Rohausbeute wurde nicht bestimmt.

Laborjournalnr: VB93a

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [50]

(S)-1-Phenyl-N-tritylbut-3-en-2-amin Trt-53-DB

Angelehnt an [71]

1.03 g (2.54 mmol, 2.0 eq.) Wittig-Reagenz Triphenylmethylphosphin-Iodid werden unter Argonatmosphäre bei 0 °C in 20 mL trockenem THF vorgelegt. MeLi wird so lange hinzugegeben, bis die weiße Suspension zu einer orangefarbenen, klaren Lösung wird. Nach 10 min werden 500 mg (1.27 mmol) Trt-**53**-CHO in 5 mL trockenem THF gegeben. Nach 5 min wird das Eisbad entfernt und man ließ die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 3 h wird die Reaktionsmischung mit Pentan verdünnt und mit H₂O gequenchet. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung wird mit H₂O extrahiert und über MgSO₄ getrocknet, dann wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

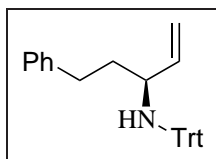
Das Rohprodukt (599 mg, 117%, $R_f = 0.91$ (13:1 PE/EtOAc)) wird mit Pentan säulenchromatigraphisch aufgetrennt, das Produkt kann jedoch nicht rein isoliert werden. Das NMR-Spektrum von Fraktion 1 deutet jedoch klar auf eine C-C-Doppelbindung hin.

Ausbeute: 59 mg (11%)

^1H NMR (CDCl_3): 5.64 (dd, $^3J_{trans} = 14.2$, $^2J = 2.0$, vinyl- CH_2 cis-H, 1H), 5.98 (dd, $^3J_{cis} = 11.7$, $^2J = 2.0$, vinyl- CH_2 trans-H, 1H), 6.60 - 6.75 (m, vinyl-CH, 1H).

Laborjournalnr: VB114b

(S)-5-phenyl-N-tritylpent-1-en-3-amin Trt-54-DB



Angelehnt an [71]

5.75 g (14.23 mmol, 2.0 eq.) Wittig-Reagenz Triphenylmethylphosphin-Iodid werden unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C in 30 mL trockenem THF vorgelegt. 5.6 mL (14.0 mmol, 2.0 eq.) BuLi (2.5 M in Hexan) werden langsam hinzugegeben. Nach 10 min werden 2.87 g (7.11 mmol) Trt-54-CHO in 5 mL trockenem THF gegeben. Nach 5 min wird das Eisbad entfernt und man lässt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 3 h wird die Reaktionsmischung mit Pentan verdünnt und mit H_2O gequenchet. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung wird mit H_2O extrahiert und über MgSO_4 getrocknet, dann wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Rohprodukt (3.50 g) wird säulenchromatigraphisch mit ei-

nem Gradienten von PE/EtOAc 4:1 bis EtOAc 100% aufgetrennt.

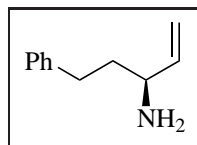
Ausbeute: 1.40 g (48%)

Die Charakterisierung konnte nur mittels DC erfolgen, da das NMR-Gerät unserer Kooperationspartner an der Universität von Messina, bei denen die Substanz während eines Forschungsaufenthaltes synthetisiert wurde, defekt war und keine weitere Möglichkeiten der Analytik zur Verfügung standen.

Laborjournalnr: VB93b

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [50]

(S)-5-Phenyl-pent-1-en-3-amin NH₂-54-DB



Angelehnt an [50]

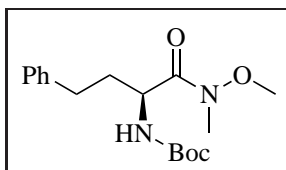
1.40 g (3.46 mmol, 1.0 eq.) Trt-**54-DB** wird in 20 mL Aceton und 2 eq. 6 N HCl 15 h zum Sieden erhitzt. Das freie Amin NH₂-**54-DB** (1.51 g) wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

Die Charakterisierung konnte nur mittels DC erfolgen (Ehrlichs-Reagenz), da das NMR-Gerät unserer Kooperationspartner an der Universität von Messina, bei denen die Substanz während eines Forschungsaufenthaltes synthetisiert wurde, defekt war und

keine weitere Möglichkeiten der Analytik zur Verfügung standen.

Laborjournalnr: VB61c

Boc-L-HomoPhe-*N,N*-methoxy-methylamid 56



Angelehnt an [22, 87]

Zu der Reaktionsmischung aus 333 mg (1.11 mmol) Boc-L-HomoPhe-OH und 120 mg (1.23 mmol, 1.10 eq.) *N,O*-Dimethylhydroxylamin in 8 mL DMF werden bei 0 °C 442 μ L (2.80 mmol, 2.5 eq.) NMM und 1.46 mL (2.80 mmol, 2.5 eq.) 50%iges PPA in DMF gegeben. Nach einer Stunde lässt man die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt über Nacht. Die Reaktionsmischung wird mit 3x 5 mL H₂O extrahiert. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Reinprodukt nach Säulenchromatografie mit Eluent Cy/EtOAc 1:1 erhalten.

Ausbeute: 301 mg (92%)

¹H NMR (CDCl₃): 1.50 (s, Boc, 9H), 1.82 - 1.95 (m, PhCH₂CH₂, 2H), 2.65 - 2.85 (m, PhCH₂, 2H), 3.20 (s, NCH₃, 3H), 3.66 (s, OCH₃, 3H), 4.72 (bs, C^{*}H, 1H), 5.29 (bs, NH, 1H), 7.15 - 7.35

(m, H_{arom} , 5H).

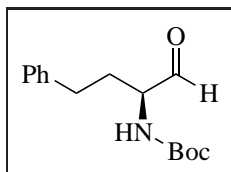
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 31.60 ($PhCH_2$), 28.27 (3x CH_3 Boc), 32.01 (NCH_3), 34.49 ($PhCH_2CH_2$), 50.01 (C^*H), 61.38 (OCH_3), 79.46 (Cq Boc), 125.87 (CH_{arom}), 128.25 (CH_{arom}) 125.44 (CH_{arom}), 141.08 (Cq_{arom}), 155.53 (Cq Boc), 172.98 (Cq Amid).

IR: 3292, 2922, 2852, 1702, 1656, 1537, 1457, 1362, 1291, 1253, 1175, 1119, 1065, 1013, 980.

Smp.: 147.5 °C

Laborjournalnr: VB12

***Tert*-Butyl (1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)carbammat 57**



Angelehnt an [22]

301 mg (0.93 mmol) **56** werden in 8 mL trockenem THF unter Argon vorgelegt und vorsichtig portionsweise mit 213 mg (5.60 mmol, 6.9 eq.) $LiAlH_4$ versetzt. Nach 4.75 h wird die Reaktion beendet, indem die Reaktionsmischung auf mit 1.0 M HCl versetztes EtOH gegossen wird. Die Mischung wird mit ges. NaCl-Lösung und einem 1:1 Gemisch aus Et_2O und DCM extrahiert. Ein weißer Feststoff wird abfiltriert. Das Rohprodukt, das sich im

Filtrat befindet, wird säulenchromatographisch mit einem 2:1 Gemisch aus Cy/EtOAc aufgereinigt.

Ausbeute: 94 mg (38%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.50 (s, Boc, 9H), 1.85 - 2.00 (m, C^*HCH_2 , 1H), 2.20 - 2.35 (m, C^*HCH_2 , 1H), 2.70 - 2.80 (m, PhCH_2 , 2H), 4.20 - 4.35 (bs, C^*H , 1H), 5.15 - 5.30 (bs, NH, 1H), 7.15 - 7.40 (m, H_{arom} , 5H), 9.58 (s, CHO, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 28.34 (3x CH_3 Boc), 28.34 (PhCH_2), 31.53 (C^*HCH_2), 45.36 (Cq Boc), 80.26 (Cq Boc), 126.34 (CH_{arom}), 128.42 (CH_{arom}), 128.60 (CH_{arom}), 140,71 (Cq Ph), 155.66 (Cq), 199.68 (CHO).

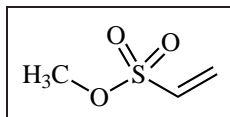
ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3$, 263.15; gef.: 163 ($\text{M}^+\text{-H-Boc}$), 262 ($\text{M}^+\text{-H}$).

Smp.: 144.3 °C

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +0.1^\circ$ (c = 0.012, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB16

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [92]

Methoxyvinylsulfon 43

Angelehnt an [93]

Zu 2.00 g (12.27 mmol, 1.0 eq.) Chlorethylsulfonylchlorid gelöst in 8 mL DCM werden 498 μ L (12.27 mmol, 1.0 eq.) Methanol gegeben und auf 0 °C abgekühlt. Während einer Stunde werden 3.41 mL (24.54 mmol, 2.0 eq.) Triethylamin zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 1x mit 0.01 M HCl und 2x mit H₂O gewaschen. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Vinylsulfon **43** wird rein erhalten.

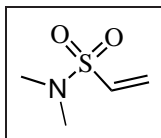
Ausbeute: 724 mg (48%)

¹H NMR (CDCl₃): 3.83 (s, OCH₃, 3H), 6.17 (d, ³J = 9.4, *cis*-H CH₂, 1H), 6.37 - 6.59 (m, CH und *trans*-H CH₂, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): 131.44 (CH₂), 131.03 (CH), 56.44 (OCH₃).

Laborjournalnr: VB62/91

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [93]

Dimethylaminovinylsulfon 46

Angelehnt an [94]

Zu 1.56 mL (3.07 mmol, 1.0 eq.) Dimethylamin (2.00 M Lösung in THF) in 2 mL CH₂Cl₂ werden 0.86 mL (6.14 mmol, 2.0 eq.) Triethylamin gegeben und auf 0 °C abgekühlt. Während einer halben Stunde werden 0.50 g (3.07 mmol, 1.0 eq.) Chlorethylsulfonylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Verdünnung mit DCM wird 2x mit wässr. NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 314 mg (76%)

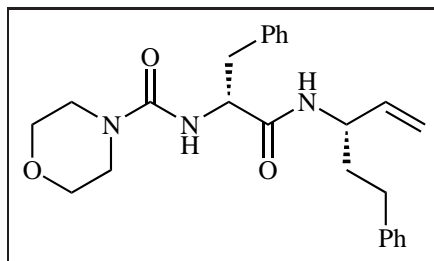
¹H NMR (CDCl₃): 2.78 (s, 2x NCH₃, 6H), 6.04 (d, ³J = 9.8, *trans*-H CH₂, 1H), 6.23 (d, ³J = 16.6, *cis*-H CH₂, 1H), 6.23 (dd, ³J = 16.6 und 9.8, CH, 1).

IR: 2947, 1638, 1460, 1332, 1144, 957, 761.

ESI (MS): ber. f. C₄H₉NO₂S, 135.04; gef.: 136 (M⁺H).

Laborjournalnr: VB64/92b

Mu-D-Phe-L-HomoPhe-DB 59



Methode 2.6.1

50 mg (0.19 mmol, 1.0 eq.) **54-DB**, 62 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) Mu-**50-COOH**, 42.18 + 30.77 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) ED-Cl, 29.8 + 21.0 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) HOBT, 130 + 27 μ L (0.61 mmol, 3.2 eq.) DIPEA, 5 mL DMF

Das Reaktionsgemisch wird mit H₂O, NaCl-Lösung und NaHCO₃-Lösung extrahiert. Das Rohprodukt wird nicht rein isoliert. Es wird aufgrund der geringen Ausbeute dennoch direkt umgesetzt, da charakteristische Signale im NMR-Spektrum verzeichnet werden.

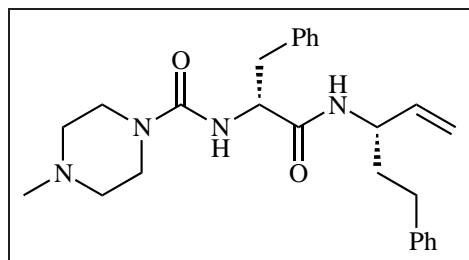
Ausbeute: 30 mg (36%)

¹H NMR (CDCl₃): 1.34 (d, ³J = 6.6, 3H), 1.49 - 1.57 (m, 5H), 3.31 - 3.36 (m, 2x NCH₂, 2H), 3.62 - 3.68 (m, 2x OCH₂, 6H), 4.74 - 4.80 (m, C*H, 1H), 4.97 - 5.07 (m, CH_{vinyl}, 2H), 5.35 - 5.42 (m, CH_{vinyl}, 1H), 7.27 - 7.29 (m, H_{arom}, 13H).

ESI (MS): ber. f. C₂₅H₃₁N₃O₃, 421.24; gef.: 423 (M⁺H₂), 445 (M⁺HNa).

Laborjournalnr: VB97

MP-D-Phe-L-HomoPhe-DB 60



Methode 2.6.1

50 mg (0.19 mmol, 1.0 eq.) **54-DB**, 64 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) MP-**50-COOH**, 42.18 + 30.77 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) ED-Cl, 29.8 + 21.0 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) HOBt, 130 + 27 μ L (0.61 mmol, 3.2 eq.) DIPEA, 5 mL DMF, Extraktion mit DCM
Das Rohprodukt wird mit einem PE/EtOAc-Gemisch 7:3 mittels zweifacher Flashsäulenchromatographie aufgetrennt. Das Rohprodukt wird nicht rein isoliert. Es wird aufgrund der geringen Ausbeute dennoch direkt umgesetzt, da ähnliche Signale wie bei **59** im NMR-Spektrum verzeichnet werden.

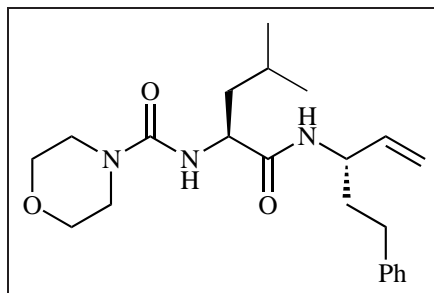
Ausbeute: 20 mg (24%)

^1H NMR (CDCl_3): 4.73 - 4.83 (m, C^*H , 1H), 4.96 - 5.10 (m, CH_{vinyl} , 2H), 5.18 - 5.38 (m, CH_{vinyl} , 1H).

ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{36}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$, 434.27; gef.: 434 (M^+), 456 ($\text{M}^+\cdot\text{Na}$), 473 ($\text{M}^+\cdot\text{K}$).

Laborjournalnr: VB96

Mu-L-Leu-L-HomoPhe-DB 61



Methode 2.6.1

50 mg (0.19 mmol, 1.0 eq.) **54-DB**, 54 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.)

Mu-**51**-COOH, 42.18 + 30.77 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) ED-

Cl, 29.8 + 21.0 mg (0.22 mmol, 1.1 eq.) HOBt, 130 + 27 μ L

(0.61 mmol, 3.2 eq.) DIPEA, 5 mL DMF, Extraktion mit DCM

Das Rohprodukt wird mit einem PE/EtOAc-Gemisch 7:3 mittels
Flashsäulenchromatographie aufgetrennt. Die Charakterisierung

kann nur mittels DC erfolgen, da das NMR-Gerät unserer Ko-
operationspartner an der Universität von Messina, bei denen

die Substanz während eines Forschungsaufenthaltes synthetisiert
wurde, defekt war und keine weitere Möglichkeiten der Analytik

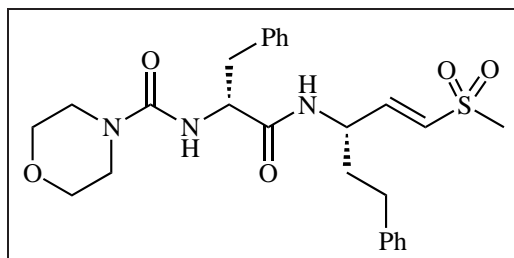
zur Verfügung standen. Die Edukte besitzen einen

$R_f = 0$, das Produkt besitzt einen $R_f = 0.19$ (7:3 PE/EtOAc).

Ausbeute: 20 mg (27%)

Laborjournalnr: VB95

Mu-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me 62



Angelehnt an [50]

30 mg (0.07 mmol, 1.0 eq.) **59** und 61 μL (0.7 mmol, 10.0 eq.) MeVS **40** werden in 5 mL DCM *gradient grade* vorgelegt und mit der Hälfte von 8.76 mg (0.014 mmol, 20 mol%) Hoveyda-Grubbs-2nd Katalysator versetzt. Die Mischung wird während 66 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe der restlichen Katalysatormenge wird eine weitere Stunde auf 100 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird 15 h bei r.t. gerührt, dann erneut für eine Stunde auf 100 °C erhitzt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels HPLC, das Produkt kann dennoch nicht rein isoliert werden.

HPLC: präparativ, Acetonitril-Wasser-Gradient [0 – 10 min: 20%, 10 – 20 min: 20 - 70%, 20 – 25 min: 70 - 95%, 25 – 55 min: 95%]

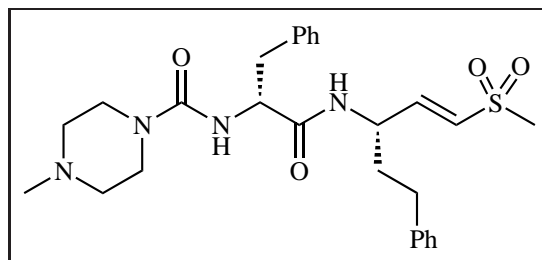
¹H NMR (CDCl₃): 2.95 (s, VS-CH₃, 3H), 3.33 - 3.39 (m, 2x NCH₂,

4H), 3.62 - 3.70 (2x OCH₂, 4H), 5.30 (bs, C*H, 1H), 5.38 - 5.48 (m, NH, 1-2H), 6.14 (d, ³J = 9.8, trans-H_{vinyl} CH₂, 1H), 6.47 (d, ³J = 16.6, cis-H_{vinyl} CH₂, 1H), 6.72 (dd, ³J = 16.6 und 9.8, H_{vinyl} CH, 1H), 7.06 - 7.13 (m, H_{arom}, 5H), 7.42 - 7.57 (m, H_{arom}, 5H).

ESI (MS): ber. f. C₂₆H₃₃N₃O₅S, 499.21; gef.: 499 (M⁺), 523 (M⁺Na), 537 (M⁺K).

Laborjournalnr: VB110

MP-D-Phe-L-HomoPhe-VS-Me 63



Angelehnt an [50]

20 mg (46 μmol, 1.0 eq.) **60** und 40 μL (0.70 mmol, 10.0 eq.) MeVS **40** werden in 8 mL DCM *gradient grade* vorgelegt und mit der Hälfte von 5.76 mg (9.20 μmol, 20 mol%) Hoveyda-Grubbs-2nd Katalysator versetzt. Die Mischung wird während 66 min auf 100 °C in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe der restlichen Katalysatormenge wird eine weitere Stunde auf 100 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird 15 h bei r.t. gerührt, dann erneut

für eine Stunde auf 100 °C erhitzt.

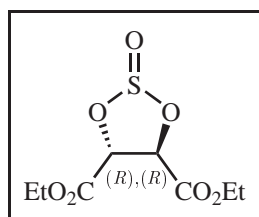
Die Aufreinigung erfolgt mittels HPLC, das Produkt kann dennoch nicht rein isoliert werden. Im NMR-Spektrum überwiegen die Signale des Edukts MeVS **40**.

HPLC: präparativ, Acetonitril-Wasser-Gradient [0 – 10 min: 20%, 10 – 20 min: 20 - 70%, 20 – 25 min: 70 - 95%, 25 – 55 min: 95%]

ESI (MS): ber. f. $C_{27}H_{36}N_4O_4S$, 512.25; gef.: 513 (M^+H), 535 (M^+Na), 551 (M^+K).

Laborjournalnr: VB115

Bausteine für Aziridin-basierte Inhibitoren

Cyclisches Sulfit **28**

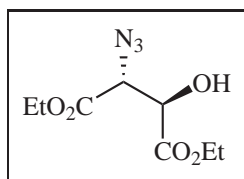
Angelehnt an [58]

8.87 g (43.00 mmol) (2*R*, 3*R*)-Diethyltartrat werden in 20 mL CH₂Cl₂ gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Der farblosen, viskosen Lösung werden 3.90 mL (53.00 mmol, 1.2 eq.) Thionylchlorid unter Rühren innerhalb von 5 min zugetropft. DMF wird katalytisch hinzu gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei r.t. und dann 1.5 h bei 50 °C gerührt, wobei ein feiner Argonstrom durch die Mischung geleitet wird. Das überschüssige SOCl₂ wird im Vakuum (50 °C, 8 mbar) entfernt. Das farblose, flüssige Produkt **28** wird ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 10.29 g (95%)

Laborjournalnr: VB111

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [58]

Azidoalkohol 22

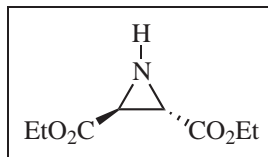
Angelehnt an [58]

Das cyclische Sulfit **28** wird in 20 mL DMF gelöst. Nach portionsweiser Zugabe von 6.50 g (100.00 mmol, 2.3 eq.) Natriumazid unter Kühlen wird das Reaktionsgemisch 30 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine Verfärbung nach rot-orange zu beobachten ist. Der Mischung werden 50 mL CH₂Cl₂ sowie 30 mL H₂O beigefügt und es wird weitere 2 h gerührt. Die tiefrote, wässrige Phase wird 3x mit 20 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten CH₂Cl₂-Phasen werden 8x mit 40 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird anschließend mit MgSO₄ getrocknet und gefiltert. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wird der Azidoalkohol **22** erhalten. Dieser wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 9.35 g (99%)

Laborjournalnr: VB111

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [58]

Aziridin-2,3-dicarboxylat 23

Angelehnt an [58]

Das als orange-gelbes Öl anfallende **22** wird in 120 mL DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb 1 h werden 22.50 g (81.0 mmol, 2.0 eq.) Triphenylphosphin portionsweise zugegeben, wobei ein Farbumschlag nach tief gelb zu beobachten ist. Die Lösung wird erst 1.5 h bei r.t., dann 4.5 h bei 80 °C gerührt. Es tritt eine Verfärbung nach rot-braun auf. DMF wird im Vakuum entfernt (80 °C, 0 mbar) und das Rohprodukt (6.30 g, 78%) wird durch zweifache Säulenchromatographie gereinigt.

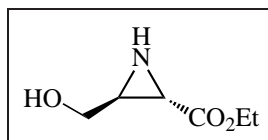
SC: Als mobile Phase wird ein Cyclohexan/Ethylacetat-Gemisch mit einem Gradienten von 5:1 bis 2:1 benutzt. Für das Produkt **23** ergibt sich der $R_f = 0.35$ in einem 2:1-Gemisch von Cyclohexan/Ethylacetat.

Ausbeute: 4.43 g (55%), viskose, hellgelbe Flüssigkeit

^1H NMR (CDCl_3): 1.31 (t, 2x CH_3 , 6H, $^3J = 7.1$), 1.79 (s, NH, 1H), 2.86 (s, CH, 2H), 4.24 (q, OCH_2 , 4H, $^3J = 7.1$).

Die übrigen analytischen Daten entsprechen der Literatur. [58]

Laborjournalnr: VB111

(S,S)-Ethyl-3-hydroxymethyl-aziridin-2-carboxylat 29

Angelehnt an [59]

2.10 g (11.2 mmol) Aziridin-2,3-dicarboxylat **23** werden in 25 mL EtOH gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 381 mg (10.08 mmol, 0.90 eq.) NaBH₄ werden portionsweise hinzu gegeben und es wird weitere 2 h bei 0 °C und dann 24 h bei r.t. gerührt. Der pH-Wert der orangefarbenen Suspension wird mit ca. 150 mL ges. NH₄Cl-Lsg. auf pH 8 eingestellt und die Lösung nimmt eine hellgelbe Farbe an. In Anwesenheit eines Phosphatpuffers (pH 7.5, bestehend aus K₂HPO₄ und KH₂PO₄) wird zügig mit DCM extrahiert. DCM wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

SC: Als mobile Phase wird ein Ethylacetat/Pentan-Gemisch mit einem Gradienten von 1:1 bis 10:1 benutzt. Für das Produkt **29** ergibt sich der R_f = 0.18 in einem 1:1-Gemisch von Ethylacetat/Pentan.

Ausbeute: 1.13 g (69%), viskose, hellgelbe Flüssigkeit

¹H NMR (CDCl₃): 1.30 (t, ³J = 7.1, CH₃, 3H), 2.48 - 2.56 (m, 2x

Azi-CH, 2H), 3.53 (dd, $^2J = 12.0$, $^3J = 4.5$, HOCH₂CH₃, 1H), 3.80 (dd, $^2J = 12.0$, $^3J = 3.2$, HOCH₂CH₃, 1H), 4.13 - 4.29 (m, OCH₂, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.29 (CH₃), 32.62 (CHCH₂), 39.42 (CHC=O), 61.49 (HOCH₂), 61.91 (CH₃CH₂), 172.24 (C=O).

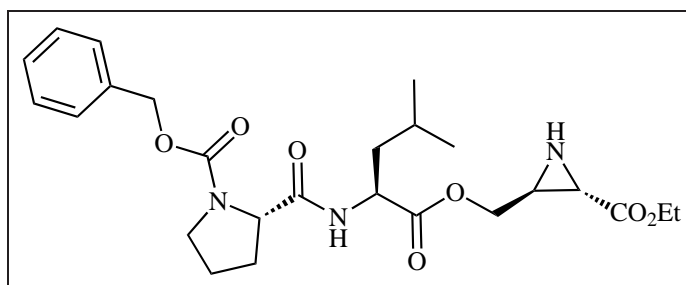
IR: 3279, 2925, 1783, 1723, 1656, 1373, 1207, 1093, 1022, 858, 707, 609.

ESI (MS): ber. f. C₆H₁₁NO₃, 145.07; gef.: 146 (M⁺H).

Laborjournalnr: VB124, VB125

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [59]

Ethyl 3-(Cbz-(S)-prolyl-(S)-leucyl-hydroxymethyl)-aziridin-2-carboxylat 67



255 mg (1.74 mmol) Ethyl-3-hydroxymethyl-aziridin-2-carboxylat **29** werden in 25 mL DCM *peptide grade* gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es werden 630 mg (1.71 mmol, 1.0 eq.) Z-Pro-Leu-Dipeptid, 378 mg (1.83 mmol, 1.05 eq.) DCC und

katalytische Mengen DMAP hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C und 4 d bei r.t. gerührt. Nach Ende der Reaktion wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 25 mL EtOAc und 5 Tropfen H₂O aufgenommen und eine weitere Stunde bei r.t. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Nach Extraktion mit 2%iger NaHCO₃-Lsg., H₂O und ges. NaCl-Lsg. wird die organische Phase über NaSO₄ getrocknet. EtOAc wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt (809 mg, 94%) wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

SC: Als mobile Phase wird ein Pentan/Ethylacetat-Gemisch mit einem Gradienten von 2:1 bis 0:1 benutzt. Für das Produkt **67** ergibt sich der $R_f = 0.12$ in einem 1:1-Gemisch von Pentan/Ethylacetat.

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels HPLC, das Produkt wurde zu 93% rein erhalten.

HPLC: präparativ, Acetonitril-Wasser-Gradient [0 – 10 min: 30 - 70%, 10 – 30 min: 70 - 95%, 30 – 55 min: 95%, % ACN]

Ausbeute: 271 mg (32%), viskose, hellgelbe Flüssigkeit

¹H NMR (CDCl₃): 0.80 - 0.92 (m, 2x CH₃ Leu, 6H), 1.26 (t, ³J = 7.1, Ethyl-CH₃, 3H), 1.44 - 1.68 (m, CH₂ und CH Leu, 3H), 1.81 - 1.95 (m, β-CH₂ Pro und γ-CH₂ Pro, 2H), 2.11 (bs, γ-CH₂

Pro, 1H) 2.21 - 2.32 (β -CH₂ Pro, 1H), 2.35 - 2.58 (m, 2x CH Azi, 2H), 3.35 - 3.60 (m, δ -CH₂ Pro, 2H), 3.85 - 4.05 (m, OCH₂ Azi, 1H), 4.13 - 4.22 (m, Et-CH₂ und OCH₂ Azi, 3H), 4.29 (bs, C*H Pro, 1H), 4.43 - 4.61 (m, C*H Leu, 1H), 5.01 - 5.18 (m, CH₂ Obz, 2H), 7.18 - 7.39 (m, CH_{arom}, 5H).

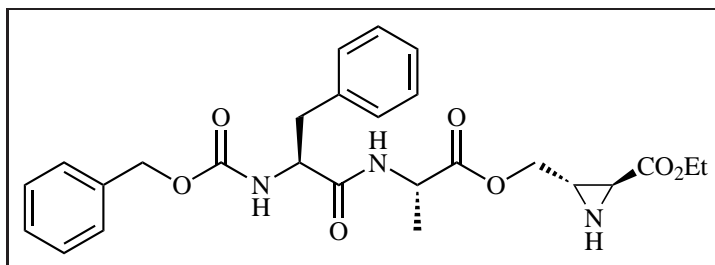
¹³C NMR (CDCl₃): 14.11 (Ethyl-CH₃), 21.88 (CH₃ Leu), 22.70 (CH₃ Leu), 24.80 (CH Leu), 28.09 (β -CH₂ Pro), 30.99 (γ -CH₂ Pro), 33.38 (CH Azi), 36.18 (CH Azi), 41.12 (CH₂ Leu), 46.95 (δ -CH₂ Pro), 50.61 (C*H Leu), 60.56 (C*H Pro), 61.85 (Et-CH₂), 65.77 (OCH₂ Azi), 67.27 (CH₂ Obz), 127.78 (CH_{arom}), 128.03 (CH_{arom}), 128.47 (CH_{arom}), 136.44 (Cq_{arom}), 156.09 (Cq Carba-
mat), 171.50 (Cq Ethylester), 172.43 (Cq Leu).

IR: 3290, 2956, 1686, 1535, 1414, 1353, 1150, 1117, 985, 696.

ESI (MS): ber. f. C₂₅H₃₅N₃O₇, 489.25; gef.: 490 (M⁺H).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -0.003^\circ$ (c = 0.006, CHCl₃)

Laborjournalnr: VB127

Ethyl 3-(Cbz-(S)-phenylalanyl-(S)-alanyl-hydroxymethyl)-aziridin-2-carboxylat 68

245 mg (1.68 mmol) Ethyl-3-hydroxymethyl-aziridin-2-carboxylat **29** werden in 12 mL DCM *peptide grade* gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es werden 622 mg (1.68 mmol, 1.0 eq.) Z-Phe-Ala-Dipeptid, 364 mg (1.76 mmol, 1.05 eq.) DCC und katalytische Mengen DMAP hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C und 4 d bei r.t. gerührt. Nach Ende der Reaktion wird das LM am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 25 mL EtOAc und 5 Tropfen H₂O aufgenommen und eine weitere Stunde bei r.t. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Nach Extraktion mit 2%iger NaHCO₃-Lsg., H₂O und ges. NaCl-Lsg. wird die organische Phase über NaSO₄ getrocknet. EtOAc wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt (697 mg, 83%) wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

SC: Als mobile Phase wird ein Pentan/Ethylacetat-Gemisch mit einem Gradienten von 2:1 bis 0:1 benutzt. Für das Produkt **68**

ergibt sich der $R_f = 0.63$ in Ethylacetat.

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels HPLC, das Produkt wurde zu 97% rein erhalten.

HPLC: präparativ, Acetonitril-Wasser-Gradient [0 – 10 min: 30 - 70%, 10 – 30 min: 70 - 95%, 30 – 55 min: 95%, % ACN]

Ausbeute: 206 mg (25%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.19 - 1.31 (m, Ethyl- CH_3 , CH_3 Ala, 6H), 2.33 - 2.41 (m, CH Azi, 1H), 2.42 - 2.52 (m, CH Azi, 1H), 2.93 - 3.07 (m, PhCH_2 , 2H), 3.84 - 3.97 (m, OCH_2 Azi, 1H) 4.04 - 4.23 (m, Ethyl- CH_2 und OCH_2 Azi, 3H), 4.28 - 4.41 (m, C^*H , 1H), 4.41 - 4.50 (m, C^*H , 1H), 5.00 (s, OCH_2 Obz, 2H), 7.07 - 7.31 (m, PhCH , 10H).

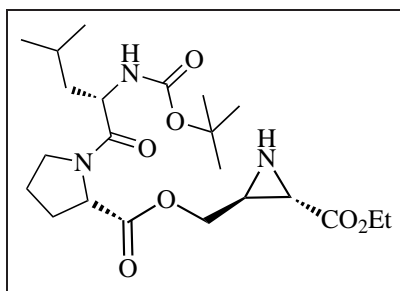
IR: 3292, 2931, 2848, 2114, 1646, 1533, 1452, 1209, 1043, 746, 696.

ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$, 497.22; gef.: 498 (97) (M^+H).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +121.1^\circ$ ($c = 0.006$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB123

Ethyl 3-(Boc-(*S*)-leucyl-(*S*)-prolyl-hydroxymethyl)-aziridin-2-carboxylat **69**



164 mg (1.12 mmol) Ethyl-3-hydroxymethyl-aziridin-2-carboxylat **29** werden in 12 mL DCM peptide grade gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es werden 366 mg (1.12 mmol, 1.0 eq.) Boc-Leu-Pro-Dipeptid, 242 mg (1.12 mmol, 1.05 eq.) DCC und katalytische Mengen DMAP hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C und 4 d bei r.t. gerührt. Nach Ende der Reaktion wird das LM am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 25 mL EtOAc und 5 Tropfen H₂O aufgenommen und eine weitere Stunde bei r.t. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Nach Extraktion mit 2%iger NaHCO₃-Lsg., H₂O und ges. NaCl-Lsg. wird die organische Phase über NaSO₄ getrocknet. EtOAc wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt (628 mg, 123%) wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

SC: Als mobile Phase wird ein Pentan/Ethylacetat-Gemisch mit

einem Gradienten von 2:1 bis 0:1 benutzt. Für das Produkt **69** ergibt sich der

$R_f = 0.67$ in Ethylacetat.

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels HPLC, das Produkt wurde zu 63% rein erhalten.

HPLC: präparativ, Acetonitril-Wasser-Gradient [0 – 10 min: 30 - 70%, 10 – 30 min: 70 - 95%, 30 – 55 min: 95%, % ACN]

Ausbeute: 252 mg (49%)

^1H NMR (CDCl_3): 0.86 - 0.99 (m, 2x CH_3 Leu, 6H), 1.28 (t, $^3J = 7.1$, Ethyl- CH_3 , 3H), 1.40 (s, Boc, 9H), 1.43 - 1.52 (m, CH_2 Leu, 2H), 1.69 - 1.80 (m, CH Leu, 1H), 1.90 - 2.12 (m, β - CH_2 Pro, 1H), 2.16 - 2.29 (m, β - CH_2 Pro, 1H), 2.36 - 2.44 (m, CH-Azi, 1H), 2.52 - 2.62 (m, (C=O)-CH-Azi, 1H), 3.54 - 3.64 (m, δ - CH_2 Pro, 1H), 3.70 - 3.81 (m, δ - CH_2 Pro, 1H), 3.88 - 3.98 (m, OCH_2 -Azi, 1H), 4.12 - 4.27 (m, Ethyl- CH_2 , OCH_2 -Azi, 3H), 4.41 - 4.51 (m, C^*H Leu, 1H), 4.51 - 4.57 (m, C^*H Pro, 1H), 5.05 - 5.13 (m, NH, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 14.28 (Ethyl- CH_3), 21.92 (CH_3 Leu), 23.53 (CH_3 Leu), 24.71 (CH Leu), 25.07 (γ - CH_2 Pro), 28.49 (CH_3 Boc), 29.17 (β - CH_2 Pro), 33.53 (CH-Azi), 36.41 ((C=O)-CH-Azi), 42.09 (CH_2 Leu), 46.87 (δ - CH_2 Pro), 50.43 (C^*H Leu), 58.85 (C^*H Pro), 62.02 (Ethyl- CH_2), 66.06 (OCH_2 -Azi), 79.67 (Cq)

Boc), 155.85 (Cq Carbamat), 172.02 (Cq Ethylester).

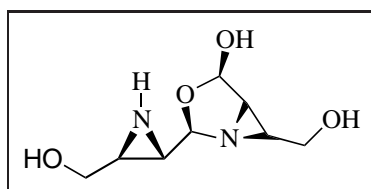
IR: 2958, 2871, 1707, 1646, 1430, 1366, 1164, 1021, 868, 729.

ESI (MS): ber. f. $C_{22}H_{37}N_3O_7$, 455.26; gef.: 456 (M^+H).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -17.2^\circ$ ($c = 0.013$, $CHCl_3$)

Laborjournalnr: VB126

**6-(Hydroxymethyl)-2-(3-(hydroxymethyl)aziridin-2-yl)-
3-oxa-1-azabicyclo[3.1.0]hexan-4-ol 31**



Angelehnt an [59]

1 g (6.85 mmol) (*S,S*)-Ethyl-3-hydroxymethyl-aziridin-2-carboxylat **29** werden in 25 mL trockenem Toluol gelöst und auf -78°C abgekühlt. 913 μL (11.84 mmol, 1.8 eq.) DIBAL werden über 3 h vorsichtig an der Glaswand entlang zugetropft und es werden weitere 2 h bei -78°C gerührt.

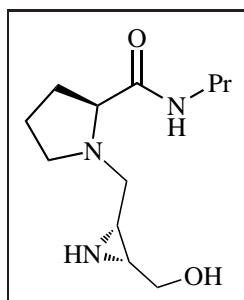
Die Reaktionsmischung wird mit ca. 10 mL MeOH bei -78°C gequench und weitere 30 min gerührt. Während weiterer 30 min lässt man das Reaktionsgemisch erwärmen auf r.t. Mit 0.1 – 1 mL ges. NaSO_4 -Lsg. werden die Aluminiumsalze ausgefällt und nach weiteren 30 min abfiltriert und mit MeOH nachgewaschen.

ESI (MS): ber. f. $C_8H_{14}N_2O_4$, 202.10; gef.: 135 (84)
(Hemiacetal⁺H), 203 (Dimer⁺H).

Laborjournalnr: VB55

Die Verbindung ist in der Literatur bekannt. [59]

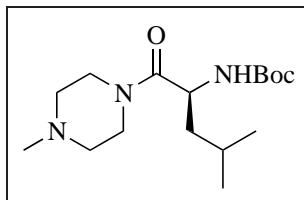
**(*S*)-1-(((2*R*,3*R*)-3-(Hydroxymethyl)aziridin-2-yl)methyl)-
N-propylpyrrolidin-2-carboxamid**



50 mg (0.26 mmol, 1.0 eq.) (*S*)-*N*-propylpyrrolidin-2-carboxamid **70** und 53.56 mg (0.26 mmol, 1.0 eq.) **31** werden in einem Gemisch aus 2.5 mL trockenem MeOH, 2.5 mL trockenem THF und 1 mL trockenem DCM unter N_2 -Atmosphäre gelöst. Dann werden zunächst 18.17 mg (0.29 mmol, 1.0 eq.) $NaCNBH_3$ und dann 76.6 mg (0.58 mmol, 2.2 eq.) $ZnCl_2$ hinzugegeben und es wird 5 h bei r.t. gerührt. Die erfolgreiche Testreaktion wird durch das massenspektroskopische Signal des Produkts belegt.

ESI (MS): m/z (%): 276 ($M^{+}K$).

Laborjournalnr: VBCanada16

***N*-Boc-(4-methylpiperazin)-L-leucinamid 72**

Methode 2.6.3

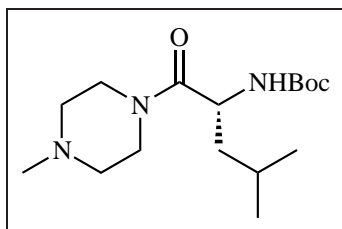
5.33 g (23.03 mmol) Boc-L-Leu, 7 mL EtOAc, 25.0 mL (57.59 mmol, 3.5 eq.) 50%iges PPA, 5.12 mL (46.07 mmol, 2.0 eq.) 4-Methylpiperazin. Es wird 1 h bei 0 °C und anschließend 5 d bei r.t. gerührt. Dennoch zeigt die DC, dass der Umsatz nicht vollständig ist. Es wird mit der Zeit eine Verfärbung der klaren Lösung nach braun beobachtet. Das Reaktionsgemisch wird zusätzlich mit EtOAc extrahiert.

Das Produkt wird ohne Aufreinigung umgesetzt.

Ausbeute: 6.70 g (93%)

^1H NMR (CDCl_3): 0.92 (d, $^3J = 6.7$, CH_3 Leu, 3H), 0.98 (d, $^3J = 6.5$, CH_3 Leu, 3H), 1.43 (s, Boc, 9H), 1.64 - 1.77 (m, CH_2 Leu, 2H), 2.18 - 2.59 (m, (2x NCH_2 MP, NCH_3 MP), 7H), 3.39 - 3.81 (m, (2x NCH_2 MP), 4H), 4.64 (bs, C^*H , 1H), 5.25 (bs, NH, 1H).

Laborjournalnr: VB33

N-Boc-(4-methylpiperazin)-D-leucinamid 73

Methode 2.6.3

5.00 g (20.04 mmol) D-Leu-Boc-Hydrochlorid, 5 mL EtOAc, 30.0 mL (70.1 mmol, 3.5 eq.) 50%iges PPA, 4.45 mL (40.09 mmol, 2.0 eq.) 4-Methylpiperazin.

SC: Als mobile Phase wird ein 6:1 Pentan/Ethylacetat-Gemisch benutzt. Für das Produkt **73** ergibt sich der $R_f = 0.34$.

Ausbeute: 965 mg (57%)

^1H NMR (CDCl_3): 0.87 (d, $^3J = 6.8$, CH_3 Leu, 3H), 0.96 (d, $^3J = 6.5$, CH_3 Leu, 3H), 1.19 - 1.28 (m, CH_2 Leu, 2H), 1.41 (s, Boc, 9H), 1.60 - 1.76 (m, CH Leu, 1H), 2.28 (s, NCH_3 , 4H), 2.31 - 2.47 (m, 2x NCH_2 , 4H), 7H), 3.43 - 3.71 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 4H), 4.67 - 4.58 (m, C^*H , 1H), 5.29 (d, $^3J = 8.9$, NH, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 22.07 (CH_3 Leu), 23.48 (CH_3 Leu), 24.73 (CH Leu), 29.79 (CH_2 Leu), 42.03 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 43.12 (Cq Boc), 45.41 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 46.04 (NCH_3), 48.48 (C^*H), 54.70 (NCH_2), 55.14 (NCH_2), 79.57 (Cq Boc), 155.68 (Cq Amid), 171.47 (Cq Carbamat).

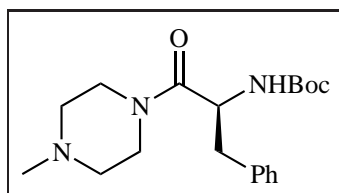
ESI (MS): ber. f. C₁₆H₃₁N₃O₃, 313.24; gef.: 314 (M⁺H).

IR: 3296, 2954, 2932, 2869, 2793, 1703, 1640, 1445, 1365, 1291, 1248, 1167, 1000, 778.

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +20.1^\circ$ (c = 1.79, CHCl₃)

Laborjournalnr: VB34

N-Boc-(4-methylpiperazin)-L-phenylalaninamid **74**



Methode 2.6.2

5.11 g (19.28 mmol) Boc-L-Phe, 40 mL DMC, 4.77 g (23.14 mmol, 1.2 eq.) DCC, 3.13 g (23.14 mmol, 1.2 eq.) HOBT, 2.14 mL (19.28 mmol, 1.0 eq.) 4-Methylpiperazin, 7.60 mL (48.20 mmol, 2.5 eq.) NMM

Das Rohprodukt (6.557 g, 98%) wird portionsweise säulenchromatographisch mit einem Gradient von Cy/EtOAc (2:1) bis EtOAc 100% aufgereinigt. Für das Produkt **74** ergibt sich der $R_f = 0.52$ in 1:2 Cy/EtOAc.

Ausbeute: 3.10 g (46%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.42 (s, Boc, 9H), 2.29 (s, NCH_3 , 3H), 2.83 - 3.00 (m, PhCH_2 , 2H), 4.74 - 4.85 (m, C^*H , 1H), 5.32 - 5.47 (m, NH, 1H), 7.12 - 7.34 (m, H_{arom} , 5H).

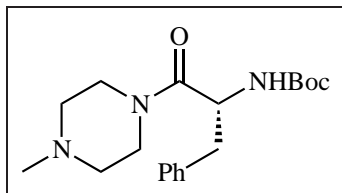
IR: 3323, 2925, 2848, 1709, 1623, 1570, 1535, 1436, 1362, 1242, 1222, 1169, 1087, 640.

ESI(MS): ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$, 347.22; gef.: 348 (57) (M^+H).

Laborjournalnr: VB37

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [95]

(*N*)-Boc-(4-methylpiperazin)-D-phenylalaninamid **75**



Methode 2.6.2

4.97 g (18.75 mmol) Boc-D-Phe, 40 mL DCM, 4.64 g (22.50 mmol, 1.2 eq.) DCC, 3.94 g (22.50 mmol, 1.2 eq.) HOBT, 2.08 mL (18.75 mmol, 1.0 eq.) 4-Methylpiperazin, 7.60 mL (48.20 mmol, 2.5 eq.) NMM

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit einem Gradienten von Cy/EtOAc (2:1) bis EtOAc 100% aufgereinigt. Für das Produkt **75** ergibt sich der $R_f = 0.52$ in 1:2 Cy/EtOAc.

Ausbeute: 555 mg (8%)

^1H NMR (CDCl_3): 1.42 (s, 3x CH_3 Boc), 2.87 - 3.07 (m, PhCH_2 , 2H), 4.79 (bs, C^*H , 1H), 5.37 (d, $^3J = 8.1$, NH, 1H), 7.16 - 7.35 (m, H_{arom} , 5H).

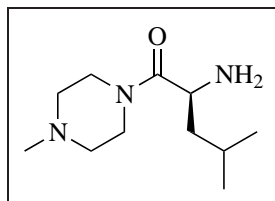
^{13}C NMR (CDCl_3): 28.47 (3x CH_3 Boc), 40.33 (PhCH_2), 43.66 (2x NCH_2), 50.90 (C^*H), 53.55 (2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$), 80.26 (C_q Boc), 127.34 (CH_{arom}), 128.92 (CH_{arom}), 129.83 (CH_{arom}), 136.59 ($\text{C}_{q\text{arom}}$), 170.52 (C_q Carbamat).

IR: 3321, 2958, 2930, 2871, 1697, 1643, 1451, 1365, 1244, 1163, 1019, 975, 745, 700.

ESI(MS): ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$, 347.22; gef.: 348 (76) (M^+H).

Laborjournalnr: VB38

(4-Methylpiperazin)-L-leucinamid 76



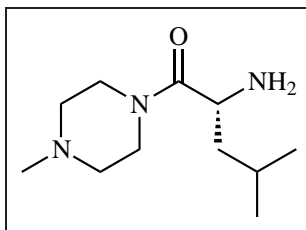
Methode 2.3.4

500 mg (1.60 mmol) *N*-Boc-(4-methylpiperazin)-L-leucinamid **72**, 10 mL DCM, 1.20 mL (16.00 mmol, 10.0 eq.) TFA. Das Rohprodukt (1.02 g, 193%) wird direkt an L-Homophenylalanin gekuppelt.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 0.87 (d, $^3J = 6.3$, CH_3 Leu, 3H), 0.94 (d, $^3J = 6.4$, CH_3 Leu, 3H), 1.39 - 1.48 (m, CH_2 Leu, 1H), 1.53 - 1.64 (m, CH und CH_2 Leu, 2H), 2.26 (s, NCH_3 , 3H), 2.31 - 2.44 (m, 2x NCH_2 , 4H), 3.36 - 3.58 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 3H), 1.63 - 1.74 (m, 2x $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$, 1H), 4.93 (dt, $^3J = 9.0$, $^3J = 3.9$, C^*H , 1H).

Laborjournalnr: VB42

4-Methylpiperazin-D-leucinamid 73



Methode 2.3.4

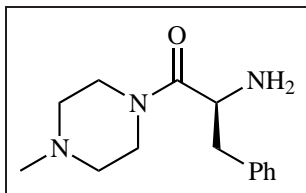
3.56 g (11.35 mmol) *N*-Boc-(4-methylpiperazin)-D-leucinamid **73**, 85 mL DCM, 8.43 mL (113.50 mmol, 10.0 eq.) TFA.

IR: 2967, 2877, 2728, 1774, 1661, 1470, 1130, 975, 837, 797, 721, 703.

ESI (MS): ber. f. $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$, 213.18; gef.: 214 (88) (M^+H).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$ ($c = 0.82$, CHCl_3)

Laborjournalnr: VB118

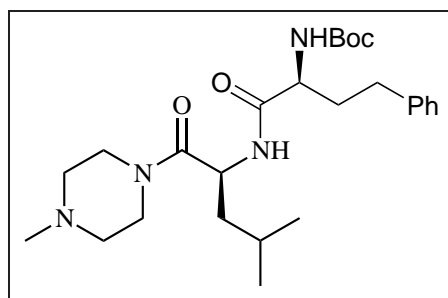
4-Methylpiperazin-L-phenylalaninamid **78**

Methode 2.3.4

700 mg (2.01 mmol) *N*-Boc-(4-methylpiperazin)-L-phenylalaninamid **74**, 15 mL DCM, 1,5 mL (20.10 mmol, 10.0 eq.) TFA. Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Laborjournalnr: VB59a

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [96]

MP-L-Leu-L-HomoPhe-Boc **79**

50 mg (0.23 mmol) **76**, 65 mg (0.23 mmol, 1.0 eq.) L-HomoPhe-Boc und 80 μ g (0.47 mmol, 2.0 eq.) DIPEA werden in 10 mL DMC gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 122 mg (0.23 mmol, 1.0 eq.) Pybob werden hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 d

bei r.t. gerührt und mit NH_4Cl -Lsg, H_2O , und NaCl -Lsg. extrahiert.

Die DC der Rohausbeute (176 mg, 158%) zeigte mind. 9 Spots, NMR-Spektrum und LC-MS-Spektrum des Rohprodukts deuteten auf das Vorhandensein des Zielprodukts hin. Nicht alle Signale sind eindeutig zuzuordnen.

^1H NMR (CDCl_3): 0.92 - 0.95 (m, CH_3 Leu, 3H), 1.01 (d, $^3J = 6.4$, CH_3 Leu, 3H), 1.45 (s, Boc, 9H), 1.48 - 1.51 (m, CH, 1H), 1.56 - 1.67 (m, CH_2 , 2H), 1.90 - 2.02 (m, 1H), 2.08 - 2.25 (m, 1H), 2.53 (s, NCH_3 , 3H), 2.60 - 2.77 (m, PhCH_2 und CH_2 , 4H), 2.78 - 2.90 (m, CH_2 , 2H), 3.57 - 3.79 (m, $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$ MP, 4H), 3.93 - 4.02 (m, 1H), 4.24 - 4.35 (m, CH oder C^*H , 1H), 4.93 (dt, $^3J = 8.9$, $^3J = 4.1$, C^*H , 1H), 7.13 - 7.34 (m, H_{arom} , 2H), 7.23 - 7.29 (m, H_{arom} , 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 21.92 (CH_3 Leu), 23.34 (CH_3 Leu), 24.82 (CH Leu), 28.49 (3x CH_3 Boc), 31.73 (PhCH_2), 42.10 (CH_2 Leu), 44.24 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$ MP), 44.90 (NCH_3), 48.08 (C^*H), 51.10 (Cq Boc), 53.71 (CH oder C^*H), 53.90 (NCH_2 MP), 54.03 (PhCH_2 Phe), 126.03 (CH_{arom}), 128.50 (CH_{arom}), 128.54 (CH_{arom}), 165.63 (Cq), 169.51 (Cq), 174.63 (Cq).

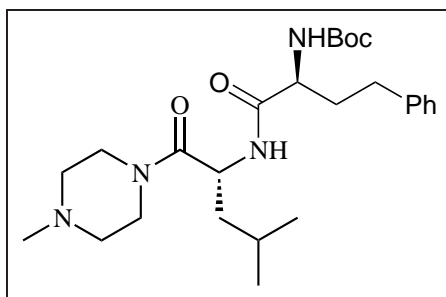
IR: 2348, 2932, 2865, 1707, 1647, 1453, 1365, 1244, 1154, 1085, 1013, 840, 747, 700.

ESI (MS): ber. f. $C_{26}H_{42}N_4O_4$, 474.32; gef.: 475 ($M^+ \cdot H$) (1), 515 ($M^+ \cdot Ca$) (31).

spez.Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +5.1^\circ$ ($c = 0.67$, $CHCl_3$)

Laborjournalnr: VB49

MP-D-Leu-L-HomoPhe-Boc 80



Methode 2.6.2

447 mg (1.60 mmol) L-HomoPhe-Boc, 341 mg (1.60 mmol, 1.0 eq.) **77**, 216 mg (1.60 mmol, 1.0 eq.) HOBt, 346 mg (1.68 mmol, 1.05 eq.) DCC, 10 mL THF.

SC: Als mobile Phase wird ein Cyclohexan/Ethylacetat-Gemisch mit einem Gradient von 1:0 bis 1:5 benutzt. Für das Produkt **80** ergibt sich der $R_f = 0.22$ in 2:1 Cy/EtOAc.

Das Produkt (1.98 g, 250%) enthält viele Verunreinigungen aus dem Cyclohexan. Während eines zweiten Aufreinigungsschritt zersetzt sich das Produkt.

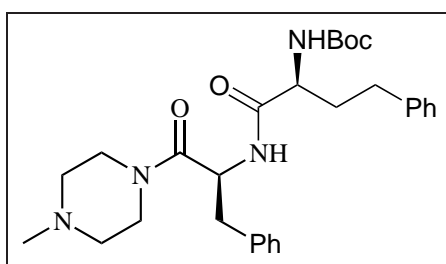
1H NMR ($CDCl_3$): 0.92 (d, $^3J = 6.5$, CH_3 Leu, 3H), 1.00 (d, $^3J =$

6.5, CH₃ Leu, 3H), 1.40 (bs, Boc, 9H), 4.17 (bs, C*H, 1H), 4.89 (bs, C*H, 1H), 6.99 - 7.23 (m, H_{arom}, 5H).

ESI (MS): ber. f. C₂₆H₄₂N₄O₄, 474.32; gef.: 476 (M⁺H), 514 (M⁺K).

Laborjournalnr: VB45

MP-L-Phe-L-HomoPhe-Boc 81



Methode 2.6.2

561 mg (2.01 mmol) L-HomoPhe-Boc, 497 mg (2.01 mmol, 1.00 eq.) **78**, 271 mg (2.01 mmol, 1.0 eq.) HOBt, 435 mg (2.11 mmol, 1.05 eq.) DCC, 880 μ L (7.04 mmol, 3.5 eq.) NMM, 15 mL THF. Das Rohprodukt (1.09 g, 106%) wird mit einem PE/EtOAc-Gemisch säulenchromatographisch mit einem Gradienten von PE 100% bis EtOAc 100% aufgetrennt, das Produkt kann jedoch nur in Spuren isoliert werden, da es sich während der SC zersetzt.

Ausbeute: 34.5 mg (3.4%)

¹H NMR (CDCl₃): 1.46 (s, Boc, 9H), 1.71 - 2.00 (m, PhCH₂ und

PhCH₂CH₂ HomoPhe, 4H), 2.02 - 2.16 (m, PhCH₂ Phe, 2H), 2.22 (s, NCH₃, 3H), 2.55 - 2.74 (m, NCH₂, 4H), 2.88 - 3.11 (m, N(C=O)CH₂, 4H), 3.74 - 3.84 (m, C*H, 1H), 4.12 (bs, C*H, 1H), 4.96 (bs, NH, 1H), 5.09 (bs, NH, 1H), 7.12 - 7.21 (m, H_{arom}, 10H).
ESI (MS): ber. f. C₂₉H₄₀N₄O₄, 508.30; gef.: 508 (M⁺).

Laborjournalnr: VB59

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur. [96]

Literatur

- [1] N. Rawlings, A. Barrett, *Meth. Enzymol.* **1994**, *244*, 461-486.
- [2] F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.
- [3] N. D. Rawlings, D. P. Tolle, A. J. Barrett, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D160-D164.
- [4] Merops - The Peptidase Database, *Release 7.90*;
<http://merops.sanger.ac.uk/> 2007.
- [5] R. Vicik, M. Busemann, C. Gelhaus, N. Stiefl, J. Scheiber, W. Schmitz, F. Schulz, M. Mladenovic, B. Engels, M. Leippe, K. Baumann, T. Schirmeister, *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1126-1141.
- [6] P. Scaddan, M. Dufresne, *Invasion Metastasis* **1993**, *13*, 301-313.
- [7] H. H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.
- [8] R. Leung-Toung, W. R. Li, T. F. Tam, K. Karimian, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 979-1002.
- [9] D. Bromme, J. Kaleta, *J. Curr. Pharm. Design.* **2002**, *8*, 1639-1658.

- [10] B. Turk, D. Turk, V. Turk, *Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, 1477, 98-111.
- [11] S. Pinitglang, A. B. Watts, M. Patel, J. D. Reid, M. A. Noble, S. Gul, A. Bokth, A. Naeem, H. Patel, E. W. Thomas, *Biochemistry* **1997**, 36, 9968-9982.
- [12] H. Yang, M. Yang, Y. Ding, Y. Liu, Z. Lou, Z. Zhou, L. Sun, L. Mo, S. Ye, H. Pang, G. F. Gao, K. Anand, M. Bartlam, R. Hilgenfeld, Z. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 13190-13195.
- [13] C. Huang, P. Wei, K. Fan, Y. Liu, L. Lai, *Biochemistry* **2004**, 43, 4568-4574.
- [14] F. Hof, A. Schütz, C. Fah, S. Meyer, D. Bur, J. Liu, D. E. Goldberg, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2138-2141.
- [15] C. Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, M. Rao, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 38, 89-119.
- [16] D. C. Chatfield, A. Augstein, C. D'Cunha, E. Lewandowska, S. F. Wnuk, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 313-322.
- [17] C. P. Govardhan, R. H. Abeles, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 330, 110-114.

- [18] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523-528.
- [19] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.
- [20] R. P. Hanzlik, S. A. Thompson, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 711-712.
- [21] S. A. Thompson, P. R. Andrews, R. P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104-111.
- [22] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Broemme, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193-3196.
- [23] M. J. Duffy, *The Role of Proteolytic Enzymes in Cancer Invasion and Metastasis* **1992**, *10*, 145-155.
- [24] F. Ashall, H. Angliker, E. Shaw, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *170*, 923-929.
- [25] N. S. Simpkins, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6951-6984.
- [26] P. L. Fuchs, T. F. Braish, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 903-918.
- [27] P. S. Dragovich, *et al. J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2806-2818.

- [28] J. R. Somoza, H. Zhan, K. K. Bowman, L. Yu, K. D. Mortara, J. T. Palmer, J. M. Clack, M. E. McGratz, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12543-12551.
- [29] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.
- [30] T. Schirmeister, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329*, 239-244.
- [31] T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560-572.
- [32] S. Tsubotani, M. Takizawa, M. Shirasaki, J. Mizoguchi, Y. Shimizu, *Takeda Chem. Ind. Ltd. Osaka, Japan* **1995**, WO 95/28416.
- [33] S. Tsuboya, M. Takizawa, M. Hattori, M. Shirasaki, *Takeda Chem. Ind. Ltd. Osaka, Japan* **1996**, JP 96/221470.
- [34] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
- [35] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-A1138.
- [36] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- [37] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
- [38] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

- [39] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5651.
- [40] A. A. Rashin, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1725-1733.
- [41] A. Klamt, G. J. Schürmann, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1993**, *2*, 799.
- [42] A. Schäfer, A. Klamt, D. Sattel, J. C. W. Lohrenz, F. Eckert, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2187-2193.
- [43] M. Mladenovic, **2007**, Diss. 'Theoretical Investigations into the Inhibition of Cysteine Proteases', Universität Würzburg.
- [44] TURBOMOLE, *Version 5.6* R. Ahlrichs, M. Bär, H.-P. Baron, R. Bauernschmitt, S. Böckner, M. Ehring, K. Eichkorn, S. Elliott, F. Furch, F. Haase, M. Häser, H. Horn, C. Huber, U. Huniar, M. Kattaneck, C. Kölmel, M. Kollwitz, K. May, C. Ochsenfeld, H. Öhm, A. Schäfer, U. Schneider, O. Treutler, M. v. Arnim, F. Weigend, P. Weis, H. Weiss, Universität Karlsruhe, **1988**.
- [45] K. Eichkorn, O. Treutler, H. Öhm, M. Häser, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Letters* **1995**, *242*, 652-660.
- [46] K. Eichkorn, F. Weigend, R. Ahlrichs, *Theor. Chem. Acc.* **1997**, *97*, 119-124.

- [47] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829-5839.
- [48] J. W. Lee, D. Y. Oh, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 2209-2212.
- [49] J. W. Lee, D. Y. Oh, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1989**, *10*, 392.
- [50] 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.
- [51] J. Legters, B. Thijs, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5287-5294.
- [52] K. Mori, H. Iwasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 87-90.
- [53] N. Furukawa, *Synthesis* **1976**, 30-31.
- [54] J. Backes in Houben-Weyl, *Methoden der Organischen Chemie*; Thieme Verlag, Stuttgart, Bd. E 16c, S. 440 ff.
- [55] K. Berlin, L. Williams, O. Dermer, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 873-876.
- [56] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 3041-3045.
- [57] V. Markov, A. Prosyaniuk, S. Bondarenko, I. Mishchenko, S. Loban, V. Zdenko, *Zh. Org. Khim.* **1981**, *17*, 1180-1183.

- [58] A. Breuning, R. Vicik, T. Schirmeister, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3301-3312.
- [59] R. Hili, A. K. Yudin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14772-14773.
- [60] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*; VCH, Weinheim, 2. Aufl., S. 125-129, 1994.
- [61] R. Kitz, I. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- [62] C. G. Knight, *Proteinase Inhibitors*; Elsevier, Amsterdam, Chapter 2, S. 42-44, 1986.
- [63] W.-X. Tian, C.-L. Tsou, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [64] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [65] D. W. Marquart, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431-441.
- [66] D. Marquart, *SIAM J. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431-441.
- [67] V. Schulz, **2007**, Diplomarbeit 'Hochelektrophile Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivate als Bausteine für neue Inhibitoren von Cystein-Proteasen', Universität Würzburg.
- [68] V. Buback, M. Mladenovic, B. Engels, T. Schirmeister, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5282-5289.

- [69] H. Helten, T. Schirmeister, B. Engels, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7691-7701.
- [70] J. Nowick, N. A. Powell, T. Nguyen, G. Noronha, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7366-7370.
- [71] J. F. Dellaria Jr., R. G. Maki, H. H. Stein, J. Cohen, D. Whittorn, K. Marsh, D. J. Hoffman, J. J. Plattner, T. J. Perun, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 534-542.
- [72] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*; VCH, Weinheim, 3. korr. Auflage, 2001.
- [73] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*; Oxford University Press, 2004.
- [74] K. Levenberg, *Quart. Appl. Math.* **2** **1944**, 164-168.
- [75] R. Vicik, H. Helten, T. Schirmeister, B. Engels, *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1021-1028.
- [76] J. J. Reddick, J. Cheng, W. R. Roush, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1967-1970.
- [77] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/>, 17.10.2010.

- [78] J. P. Danehy, C. J. Noel, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2511-2515.
- [79] M. M. Kreevoy, E. T. Harper, R. E. Duvall, H. S. Wilgus, L. T. Ditsch, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4899-4029.
- [80] R. G. Pearson, R. L. Dillon, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2439-2443.
- [81] H. F. Gilbert, *Meth. Enzymol.* **1985**, *251*, 8-28.
- [82] R. Vicik, *Dissertation: Synthese und Eigenschaften N-acylierter Aziridin-2,3- Dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren von Cystein-Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie* Würzburg, 2004.
- [83] T. Schirmeister, M. Peric, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1281-1291.
- [84] K. Ansorg, **2009**, Diplomarbeit 'Mode of action of vinyl-sulfone based protease inhibitors', Universität Würzburg.
- [85] C. K. M. Heo, J. W. Bunting, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3570-3578.
- [86] B. Cathers, C. Barrett, J. T. Palmer, R. M. Rydzewski, *Bioorg. Chem.* **2002**, *30*, 264-275.

- [87] M. Bodansky, A. Bodansky, *The practice of peptide synthesis*, 2nd ed.; Springer-Verlag, Berlin 1994.
- [88] A. Albeck, R. Persky, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 653-657.
- [89] C. Buechold, **2010**, Diss. 'Synthese und Testung cis-konfigurierter Aziridine als pseudo-irreversible Inhibitoren der sekretorischen Aspartatproteasen von *Candida Albicans*', Universität Würzburg.
- [90] T. Shinozuka, K. Shimada, S. Matsui, T. Yamane, M. Ama, T. Fukuda, M. Taki, Y. Takeda, E. Otsuka, S. Yamamoto, M. Naito, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6807-6819.
- [91]
- [92] K. Steert, M. Berg, J. C. Mottram, G. D. Westrop, G. H. Coombs, P. Cos, L. Maes, J. Joossens, P. van der Veken, A. Haemers, K. Augustyns, *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1734-1748.
- [93] G. Colombano, C. Travelli, U. Galli, A. Caldarelli, M. G. Chini, P. G. Canonico, G. Sorba, G. Bufulco, G. C. Tron, A. A. Genazzani, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 617-623.
- [94] A. Zhou, D. Rayabarapu, P. R. Hanson, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 531-534.

[95] T. Nagamine, K. Inomata, Y. Endo, *Heterocycles* **2008**, *76*, 1191-1204.

[96] P. Meier, S. Mueller, *Synthesis* **2007**, *14*, 2203-2207.

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
Abst.	Abstand
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
Bn	Benzyl
cat.	katalytisch
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
COSY	correlated spectroscopy, eine 2D-NMR-Technik
Cy	Cyclohexan
Cys	Cystein
d	Dublett
D ₂ O	deuteriertes Wasser
DABCYL	4-((4-(Dimethylamino)phenyl)-azo)-benzoesäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DIPEA	Di-isopropyl-ethyl-amin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPSI	Diphenylsulfimin
EA	Ethylacetat
EDANS	(5-(2-Aminoethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Et	Ethyl, C ₂ H ₄ -
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eq.	Equivalent
ESI	electron spray ionisation, Elektrospray-Ionisation
EWG	electron withdrawing group, elektronenziehende Gruppe
FP	Falcipain
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
ges.	gesättigt
Glu	Glutaminsäure
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat

His	Histidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HOAc	Essigsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HomoPhe	Aminosäure Homophenylalanin
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HR-ESI-MS	high resolution electron spray ionisation mass spectrometry, hoch auflösende Elektrospray- Ionisation mit Massenspektrometrie
konz.	konzentriert
LC-MS	liquid chromatography - mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
Leu	Leucin
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
LM	Lösemittel
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
m	Multipllett

Me	Methyl, CH ₃ -
MeCN	Acetonitril
MeOD	deuteriertes Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
M ^{pro}	main protease
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaOEt	Natriumethanolat
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	nuclear magnetic resonance, magnetische Kernspinresonanz
Obz	Benzyl
PE	Pentan
PES	potential energy surface, Potentialfläche
Ph	Phenyl, C ₆ H ₅ -
Phe	Phenylalanin
PL ^{pro}	papain like protease
PPA	Propanphosphonsäure-Anhydrid
ppm	parts per million
Py	Pyridin
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat

q	Quartett
quint	Quintett
R	Substituent R
<i>rac</i>	in racemischem Verhältnis
r. t.	Raumtemperatur
Rx.	Reaktion
s	Singulett
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrom, schweres akutes Atemwegssyndrom
SC	Säulenchromatographie
Ser	Serin
sext	Sextett
t	Triplett
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
TMSN ₃	Trimethylsilylazid
Tol	Toluol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trometamol

Trt	Tryl- (Triphenylmethyl-)
Tyr	Tyrosin
V	vinyl
Verb.	Verbindung/en
VS	Vinylsulfon-
wfr.	wasserfrei
Z=Cbz	Benzyloxycarbonyl

Danksagung

Viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Tanja Schirmeister** und Herrn **Prof. Dr. Bernd Engels** für die Möglichkeit ein so interessantes und abwechslungsreiches Themengebiet zu bearbeiten. Vielen herzlichen Dank ebenfalls für die zahlreichen Gelegenheiten, meine Arbeit auf Fachtagungen im In- und Ausland zu präsentieren und bei mehreren Kooperationspartnern im Ausland neue Techniken zu erlernen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Silvana Grasso (Università degli Studi di Messina, Italien) und Herrn Prof. Dr. Andrei Yudin (University of Toronto, Kanada) für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen und den bereichernden Austausch von Erfahrungen im Bereich der Peptidsynthese.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei **Dr. Curd Schollmayer** und **Dr. Eberhard Heller** für die Möglichkeiten der Messung besonderer NMR-Experimente sowie Tipps und Tricks für die Mikrowellensyntheseexperimente.

Vielen Dank an **Cornelia Heindl** für die Unterstützung bei den Enzym-Assays.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Kollegen im AK Schirmeister, im AK Engels sowie den Assisten des 3. Semesters für das angenehme Arbeitsklima, die heitere Stimmung im Arbeitskreis sowie bei der Studentenbetreuung und die vielen sehr schönen gemeinsamen (Abend-)Stunden: Philipp Fey, Conny Heindl, Thomas Pfeuffer, Matthias Rappold, Caroline Schad, Roswitha Scheblein, Thomas Schneider, Swarna Oli, Monika Herb, Martin Stempka, Paula Tabares,

Thilo Waag, Constanze Waltenberger, Armin Welker, Hongmei Wu, Markus Zettner, Jessica Klöckner, Christian Markl, Christian Büchold, Daniel Cappel, Amelie Gutmann, Alexander Paasche, Steven Holloway, Reinhold Fink, Christoph Grebner, Uschi Rüppel, Johannes Pfister, Ferdinand Matz, Christoph Menrath, Simon Vogel, Thomas Schmidt, Wook Lee, Volker Settels, Kay Ansorg, Johannes Becker, Christoph Walter, Daniel Weber, Anastasia Weickert, Dr. Wenlan Liu, Dr. Svetlana Stepanenko.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Mannschaft der Instituts-Werkstatt und die Damen im Sekretariat für die umgehende und umfassende Hilfe bei Problemen aller Art.

DFG, SFB630 und DAAD sei für die gewährte finanzielle Unterstützung im Rahmen meiner Promotionszeit gedankt.

Unendlich dankbar bin ich **meinem Mann**; für deine Liebe, dein Verständnis und deine geduldige Unterstützung in stressigen Zeiten, für deine Lösungsvorschläge und die anregenden chemischen Diskussionen und natürlich für deine technische Expertise, die mir so manche Arbeit erleichtert hat.

Mein herzlichster Dank gilt **meinen Eltern**; für eure fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meines Studiums, der Promotionszeit und bei der Anfertigung dieser Arbeit. Vielen Dank dafür, dass ihr euch immer für mein Projekt interessiert habt und euch mit mir über Fortschritte gefreut habt. Wenn es mal nicht so gut lief, habt ihr mit mir gelitten und gleichzeitig versucht, mich wieder aufzubauen! Vielen herzlichen Dank euch beiden!

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

DARMSTADT 29. JULI 2012