

**SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN *N*-ACYLIERTER AZIRIDIN-2,3-
DICARBOXYLATE ALS SELEKTIVE, PEPTIDOMIMETISCHE INHIBITOREN
VON CYSTEIN-PROTEASEN DER CATHEPSIN-L-SUBFAMILIE**

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

vorgelegt von
Diplom-Pharmazeut
Radim Vičík
aus Trnava (Tschechien)

Würzburg 2004

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg.

1. Gutachter:.....
2. Gutachter:.....
der Dissertation.

1. Prüfer:.....
2. Prüfer:.....
3. Prüfer:.....
des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister von November 1999 bis Juli 2000 am Pharmazeutischen Institut der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und von August 2000 bis Juni 2004 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Gelhaus, C.; Vicik, R.; Hilgenfeld, R.; Schmidt, C. L.; Leippe, M. and Schirmeister, T. Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate. *Biological Chemistry* **2004**, *385*, 435-438.

Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T. An improved synthesis of aziridine-2,3-dicarboxylates via azido alcohols - epimerization studies. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 3301-3312.

Abstracta:

Inhibitors of cysteine proteases containing an aziridine unit, A. Breuning, R. Vicik, T. Schirmeister, *Drugs Fut.* **2002**, *27* (Suppl. A), 444. (XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry of the EFMC European Federation of Medicinal Chemistry 2002, Barcelona).

Peptidomimetic inhibitors of cysteine proteases, R. Vicik, T. Schirmeister. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*, Suppl. 1, 102. (DPhG-Jahrestagung 2002, Berlin).

Identification of cysteine proteases of intraerythrocytic life stages of *Plasmodium falciparum* by a biotinylated small-molecule probe, T. Schirmeister, C. Gelhaus, R. Vicik, M. Leippe, *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *293*, Suppl. 38, 89. (21. Jahrestagung der Deutschen Parasitologischen Gesellschaft, 2004, Würzburg).

DANKSAGUNG

In erster Reihe möchte ich Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Möglichkeit danken, ein hochattraktives Thema in einem medizinisch-chemischen, Target-orientierten Forschungsgebiet zu bearbeiten. Ihr stetes Interesse und viele fruchtbare Diskussionen haben zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit einen großen Anteil beigetragen.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Unterstützung danken:

Dr. Christoph Gelhaus und Prof. Dr. Matthias Leippe, Institut für Zoologie, Universität Kiel, für die *In-vitro*-Testungen an *Plasmodium falciparum*,

PD Dr. John Ziebuhr, Institut für Virologie und Immunologie, Universität Würzburg, für die Überlassung der coronaviralen Protease TGEV-M^{pro} und des Substrates für die HPLC- Assays,

Prof. Dr. Philip Rosenthal, University of California, San Francisco, für die Überlassung des Falcipain-2-Plasmids und Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck, für die Expression von Falcipain-2 aus *Plasmodium falciparum*,

Prof. Dr. James McKerrow University of California, San Francisco, für die Überlassung von Rhodesain aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*,

Prof. Dr. Bernd Engels und Holger Helten, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der quantenchemischen Rechnungen,

Joseph Scheiber, Matthias Busemann und PD Dr. Knut Baumann, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Docking-Experimente,

Dr. Werner Schmitz, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Physiologie II, Universität Würzburg, für die Messungen der HR-ESI-Massenspektren,

Dr. A. Stich, Missionsärztliches Institut, Abteilung Tropenmedizin, Würzburg, für die Testungen an *Trypanosoma brucei*,

Prof. Dr. H. Moll und Prof. Dr. A. Ponte-Sucre, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an *Leishmania major*,

Dr. K. Ohlsen und Dr. W. Ziebuhr, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an *Staphylococcus sp.*,

Prof. Dr. V. Heussler, Biologisches Institut, Universität Hamburg, für die Testungen an *Trypanosoma berghei*,

Prof. Dr. G. Bringmann und Tanja Gronauer, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Messung der CD-Spektren,

Dr. M. Schlauch, Pharmazeutisches Institut, Universität Freiburg, für die chirale, analytische HPLC-Trennung der Pipecolinsäure,

C.-P. Kneis und R. Schedl, Institut für Anorganische Chemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Elementaranalysen,

Dr. M. Büchner und F. Dadrich, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Messung der EI-, CI- und FAB-Massenspektren,

Michael Kraus und Franziska Jenke, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die LC/MS-Messungen.

Frau Sandra Priller, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, danke ich für die Einweisung in die HPLC-Anlage.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Labor-Kollegen Ulrich Käßler aus Hohenlohe für die Jahre hervorragender Zusammenarbeit und für fruchtbare Diskussionen.

Meinen Kollegen Dr. Gemma Bruno, Franziska Jenke, Markus Schiller, Dr. Birgit Vedder, Björn Degel, Alexander Breuning und Michael Kraus danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	EINLEITUNG	1
1.1	VORKOMMEN VON CYSTEIN-PROTEASEN	1
1.2	STRUKTUREN DER CYSTEIN-PROTEASEN DES PAPAIN-CLANS	3
1.3	ROLLE DER HUMANEN UND PARASITÄREN CPS	6
1.4	MECHANISMUS DER KATALYSE	9
1.5	INHIBITOREN VON CYSTEIN-PROTEASEN	10
1.5.1	<i>Inhibitoren mit kleinem Ring</i>	11
1.5.1.1	Epoxysuccinyl-Peptide	11
1.5.1.2	Aziridinyl-Peptide	14
1.5.2	<i>Nichtpeptidische Inhibitoren</i>	16
2.	ZIELSETZUNG	17
3.	SYNTHESEN	19
3.1	AZIRIDIN-2,3-DICARBONSÄURE-DERIVATE	19
3.1.1	<i>Synthese der racemischen Aziridin-2,3-dicarboxylate</i>	20
3.1.2	<i>Stereoselektive Synthese der Aziridin-2,3-dicarboxylate</i>	21
3.1.2.1	Synthese der anti-Azidoalkohole	22
3.1.2.1.1	Addition an Oxiran-2,3-dicarboxylate	22
3.1.2.1.2	Addition an 1,3,2-Dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylate	26
3.1.2.1.3	Addition an 1,3,2-Dioxathiolan-2,2-dioxo-4,5-dicarboxylate	28
3.2	NICHT-PROTEINOGENE CYCLISCHE AMINOSÄUREN	30
3.2.1	<i>Synthese des (S)-Benzylaziridin-2-carboxylats</i>	30
3.2.2	<i>Synthese der (R+S)-Azetidin-2-carbonsäure</i>	31
3.2.3	<i>Synthese der N-tert-Butyloxycarbonylnipecotinsäure</i>	32
3.2.4	<i>Synthese der N-tert-Butyloxycarbonyl- und Benzyloxycarbonyl-pipecolinsäure</i>	32
3.3	ACYLIERUNG DES AZIRIDIN-STICKSTOFFS	34
3.3.1	<i>Synthese der Aziridinyl-Tripeptide über sukzessive Kupplung (SK)</i>	37
3.3.1.1	Synthese der Aziridinyl-Dipeptide	37
3.3.1.2	Synthese der Aziridinyl-Tripeptide aus Aziridinyl-Dipeptiden	41
3.3.1.3	Diastereomeren-Trennung	43
3.3.2	<i>Synthese der Aziridinyl-Tripeptide über Fragment-Kupplung (FK)</i>	45
3.3.2.1	Darstellung der Dipeptid-Fragmente BOC-Leu-/Gly-Xxx (Xxx = cyclische Aminosäure)	45
3.3.2.2	Kupplung der Aziridin-2,3-dicarboxylate mit Dipeptid-Fragmenten	48
3.4	TRIPLEPTIDE MIT FREIEN SÄURE-GRUPPEN AM AZIRIDINRING	51
3.4.1	<i>Disäuren aus Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylaten</i>	51
3.4.2	<i>Halbester aus Diethylaziridin-2,3-dicarboxylaten</i>	52

3.5	NMR-ANALYTIK.....	52
3.6	WEITERE DERIVATE DER AZIRIDIN-2,3-DICARBOXYLATE	53
3.6.1	<i>Formylierte Aziridin-Bausteine</i>	53
3.6.2	<i>Biotin-markierte Aziridin-Bausteine</i>	54
3.6.3	<i>Bis-N,N-aziridinylpiperazin</i>	55
3.6.4	<i>Synthese eines ¹³C-markierten Inhibitors</i>	56
3.7	DARSTELLUNG POTENTIELLER SUBSTRATE FÜR CORONAVIRALE CYSTEIN-PROTEASEN	58
4.	ENZYMSSAYS	61
4.1	EINFÜHRUNG.....	61
4.2	CHARAKTERISIERUNG IRREVERSIBLER HEMMUNG.....	62
4.2.1	<i>Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou</i>	63
4.2.2	<i>Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson</i>	66
4.3	CHARAKTERISIERUNG NICHT-ZEITABHÄNGIGER HEMMUNG	66
4.4	HPLC-ASSAY FÜR CORONAVIRALE PROTEASEN.....	66
4.5	DURCHFÜHRUNG DER FLUORIMETRISCHEN ENZYMASSAYS.....	67
4.5.1	<i>Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren</i>	69
4.5.2	<i>Versuche zur Hydrolysestabilität der Inhibitoren gegenüber Serin-Proteasen</i>	74
4.5.3	<i>Nachweis der Irreversibilität der Hemmung bei nicht-zeitabhängiger Hemmung</i>	75
4.5.3.1	Dialyse.....	75
4.5.3.2	Tryptischer Verdau	76
4.5.3.3	Affinitätsmarkierung des kovalent gebundenen biotinylierten Aziridin-Baustein	77
4.5.4	<i>Bestimmung der K_m-Werte</i>	78
4.6	ERGEBNISSE DER ENZYMASSAYS	79
4.7	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT	84
4.7.1	<i>Wirkung gegen Plasmodium sp.</i>	84
4.7.2	<i>Aktivität gegen Leishmania major, Trypanosoma brucei, Staphylococcus sp. und Hemmung der Biofilmbildung</i>	87
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN	90
5.1	SELEKTIVITÄT DER INHIBITOREN BZGL. DER ENZYME.....	90
5.1.1	<i>CB vs. CL-like</i>	90
5.1.2	<i>FP vs. RD; CB vs. CL; Cathepsine vs. parasitäre Proteasen</i>	92
5.2	STEREOSELEKTIVITÄT DER HEMMUNG	92
5.2.1	<i>Einfluss der Konfiguration des Aziridinrings</i>	92
5.2.2	<i>Einfluss der Konfiguration von Leucin</i>	93
5.2.3	<i>Einfluss der Konfiguration der Aminosäure Prolin</i>	94
5.2.4	<i>Einfluss der Aminosäure-Konfiguration bei den Phe-Ala-Derivaten</i>	94
5.2.5	<i>Vergleich von Enantiomeren</i>	95
5.3	EINFLUSS DER SUBSTITUENTEN AM AZIRIDINRING: ETHYLESTER, BENZYLESTER, FREIE SÄUREN	96

5.4	TRIPEPTIDE VS. DIPEPTIDE.....	96
5.5	VERGLEICH DER AMINOSÄUREN.....	97
5.5.1	<i>Vergleich der cyclischen Aminosäuren.....</i>	<i>97</i>
5.5.2	<i>Vergleich Leucin vs. Glycin.....</i>	<i>98</i>
5.6	INAKTIVIERUNGSKONSTANTE k_i	99
5.7	HEMMUNG DURCH ANDERE DERIVATE DES AZIRIDIN-2,3-DICARBOXYLATS.....	99
5.8	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
5.9	FAZIT UND AUSBLICK	100
5.10	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE - BINDUNGSMODI DER INHIBITOREN	100
5.10.1	<i>Docking-Versuche</i>	<i>101</i>
5.10.2	<i>Hypothetische Bindungsmodi verschiedener Inhibitoren an CL und CB</i>	<i>102</i>
5.10.2.1	Bindungsmodi der Inhibitoren 116C und 216C an CL.....	103
5.10.2.2	Bindungsmodus des Inhibitors 216C an CB	104
5.10.2.3	Bindungsmodi der Inhibitoren 112D, 122C, 212C, 112B und 112C an CL	104
5.10.2.4	Bindungsmodus des Inhibitors 417G an CL und CB	106
5.10.2.5	Bindungsmodus des Inhibitors 134C an CL und CB.....	106
5.10.2.6	Bindungsmodus des Inhibitors 034A an CB	107
5.10.3	<i>Diskussion</i>	<i>107</i>
5.11	EINFLUSS VON UMGEBUNG UND SUBSTITUENTEN AUF DIE REAKTIVITÄT DES AZIRIDINRINGS	110
5.11.1	<i>Quantenchemische Rechnungen</i>	<i>110</i>
5.11.2	<i>Untersuchung des Reaktionsmechanismus mittels NMR-Spektroskopie</i>	<i>115</i>
5.11.3	<i>Überlegungen zum Hemmmechanismus der N-Formyl-Derivate</i>	<i>118</i>
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	120
7.	SUMMARY.....	123
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	126
8.	ALLGEMEINE ANGABEN	126
8.1	VERWENDETE MESSGERÄTE	126
8.2	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	127
8.3	ENZYME, SUBSTRATE UND REAGENZIEN	127
8.4	ARBEITSMETHODEN	128
9.	ALLGEMEINE SYNTHETISCHE METHODEN.....	129
9.1	<i>N-ACYLIERUNG DES AZIRIDIN-STICKSTOFFS MIT SYMMETRISCHEN ANHYDRIDEN (METHODE A)</i>	<i>129</i>
9.2	<i>N-ACYLIERUNG MIT DPPA (METHODE B)</i>	<i>129</i>
9.3	<i>FRAGMENT-KUPPLUNG MIT EEDQ (METHODE C).....</i>	<i>129</i>
9.4	<i>KUPPLUNG VON AMINOSÄUREN MIT DCC+HOBT ZU DIPEPTID-FRAGMENTEN (METHODE D)</i>	<i>129</i>

9.5	KONDENSATION VON C-GESCHÜTZTEN AMINOSÄUREN MIT BOC-GLYCIN-N-CARBOXYANHYDRID (METHODE E).....	130
9.6	KONDENSATION VON AZIRIDINYL-DIPEPTIDEN MIT EINER WEITEREN AMINOSÄURE: ENTSCHÜTZEN UND KOPPLUNG MIT DPPA (METHODE F)	130
9.7	KATALYTISCHE HYDROGENOLYSE DER BENZYLESTER (METHODE G).....	130
10.	SYNTHETISIERTE VERBINDUNGEN	131
10.1	AZIRIDIN-BAUSTEINE.....	131
10.1.1	<i>Synthetisierte Ttrate</i>	<i>131</i>
10.1.2	<i>Synthetisierte Oxiran-2,3-dicarboxylate</i>	<i>132</i>
10.1.3	<i>Synthetisierte 1,3,2-Dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylate.....</i>	<i>133</i>
10.1.4	<i>Synthetisierte anti-2,3-Azidoalkohole</i>	<i>136</i>
10.1.5	<i>Synthetisierte Aziridin-2,3-dicarboxylate</i>	<i>139</i>
10.1.6	<i>Synthetisierte nicht-proteinogene Aminosäuren.....</i>	<i>142</i>
10.1.7	<i>Synthetisierte Dipeptide mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein.....</i>	<i>146</i>
10.1.8	<i>Weitere Substanzen mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein</i>	<i>154</i>
10.1.9	<i>Synthetisierte Dipeptide für Fragment-Kupplungen</i>	<i>158</i>
10.1.10	<i>Synthese des fluorimetrischen Substrates.....</i>	<i>166</i>
10.1.11	<i>Synthetisierte Tripeptide mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein.....</i>	<i>169</i>
10.1.12	<i>Tripeptide mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure.....</i>	<i>186</i>
11.	ÜBERSICHT DER SYNTHETISIERTEN UND GETESTETEN INHIBITOREN	189
12.	LITERATURVERZEICHNIS	193
13.	LEBENS LAUF, VERÖFFENTLICHUNGEN UND ERKLÄRUNG	197

ABKÜRZUNGEN

abs.: absolut

All: Allyl

AMC: 7-Amino-4-methylcumarin

AS: Aminosäure

Azet: Azetidin-2-carbonsäure

Azi: Aziridin-2,3-dicarboxylat

Azy: Aziridin-2-carboxylat

Bn: Benzyl

BOC: *tert*-Butoxycarbonyl

CB: Cathepsin B

CL: Cathepsin L

CK: Cathepsin K

CP: Cystein-Protease

DC: Dünnschichtchromatographie

DCC: Dicyclohexylcarbodiimid

DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin

DMF: *N,N*-Dimethylformamid

DMSO: Dimethylsulfoxid

DPPA: Diphenylphosphorylazid,
Phosphorsäure-diphenylesterazid

DPSI: Diphenylsulfimin Monohydrat

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EEDQ: 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-
dihydrochinolin

Et: Ethyl

Et₃N: Triethylamin

EtOAc: Ethylacetat

EtOH: Ethanol

Et₂O: Diethylether (Ether)

FP: Falcipain 2

ges.: gesättigt

HOBt: *N*-Hydroxybenzotriazol

HOSuc: *N*-Hydroxysuccinimid

Ini: Isonipecotinsäure, Piperidin-4-carbonsäure

Me: Methyl

MsCl: Methylsulfonylchlorid

NCA: *N*-Carboxyanhydrid

Nip: Nipecotinsäure, Piperidin-3-carbonsäure

Ph₃P: Triphenylphosphin

Pip: Pipecolinsäure, Piperidin-2-carbonsäure

pTSS: *p*-Toluolsulfonsäure

PE: Petrolether 40-60

RD: Rhodesain

RT: Raumtemperatur

RP: Reversed-Phase-Kieselgel

SC: Säulenchromatographie

TEA: *N,N,N*-Triethylamin

TFA: Trifluoressigsäure

THF: Tetrahydrofuran

TMS: Tetramethylsilan

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Trt: Trityl, Triphenylmethyl

UNCA: Urethan-geschützter NCA

TrtCl: Tritylchlorid, Triphenylmethylchlorid

Z: Benzyloxycarbonyl

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

Hydrolasen, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren (= Proteasen, EC 3.4), werden entsprechend der Spaltstelle in einem Substrat in Exopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Endopeptidasen (EC 3.4.21-99) unterteilt. Die meisten Proteasen sind Endopeptidasen. Die große Familie der Proteasen wird weiterhin entsprechend der Zusammensetzung des aktiven Zentrums in 5 unterschiedliche Gruppen eingeordnet: Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 3.4.22), Aspartat- (EC 3.4.23), Metallo- (EC 3.4.24) und Threonin-Proteasen (EC 3.4.25).^[1]

Cystein-Proteasen (CPs) sind weiter in 7 Superfamilien (Clans) aufgeteilt: Papain-Clan (Clan CA), Caspase-Clan (CD), Adenain-Clan (CE), Clan der Pyroglutamyl-Peptidase I (CF), Clan des hedgehog protein (CH), Sortasen C (CL) und Clan C- (C-).^[1]

Dem Papain-Clan CA gehören die meisten bisher gefundenen Cystein-Proteasen an. Papain-ähnliche (Papain-like) CPs sind weit verbreitet im ganzen Pflanzen- und Tierreich. Zahlreiche CPs findet man auch bei Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen. Früher wurde diesen Enzymen nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt, weil man annahm, dass sie nur für unspezifischen Protein-Abbau zuständig sind. Wie in den letzten 10-15 Jahre aber zunehmend klar wurde, spielen CPs eine essentielle Rolle bei verschiedenen physiologischen und auch pathologischen Prozessen. Unter diesem Gesichtspunkt sind die wichtigsten Cystein-Proteasen des Clans CA die humanen lysosomalen Cathepsine, cytoplasmatische Calpaine und verschiedene parasitäre CPs, die für die Pathogenität dieser Organismen essentielle Rollen spielen. Die Säuger-Proteasen entwickelten sich dabei durch Evolution aus den Cystein-Proteasen der Nahrungsvakuolen der Protozoen.

1.1 Vorkommen von Cystein-Proteasen

Aufgrund von Sequenz und Mechanismus der Katalyse werden Cystein-Proteasen in die schon oben erwähnten 7 Superfamilien (Clans) unterteilt, denen insgesamt 69 Subfamilien (C1-C69) angehören. Der Papain-Clan CA, gebildet unter anderen aus der Papain- C1, Calpain- C2, Streptopain- C10 und Staphopain-Subfamilie C47, umfasst die meisten aus pharmazeutisch-medizinischer Sicht interessanten Proteasen. Die Tabelle 1-1 fasst die wichtigsten Subfamilien mit charakteristischen Proteasen und ihren Eigenschaften zusammen. In Tabelle 1-2 ist das Vorkommen von Cystein-Proteasen in

verschiedenen Organismen dargelegt. Eine umfassende Informationsquelle bietet die MEROPS Datenbank <http://merops.sanger.ac.uk/>

Tabelle 1-1: Klassifizierung von Cystein-Proteasen und ihre Eigenschaften.

Clan	Sub-Familie	Prototyp-Enzym ^a	Wichtige Proteasen	Aktives Zentrum ^b	Spezifität ^c	E64 Inh. ^d
CA	C1A CL-like	Papain	Papain, Cathepsine L, S, K, P, Q, W..., Cruzipain, Falcipaine 1-3, Rhodesain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: lipophile AS (Phe, Leu)	+
	C1A CB-like	Cathepsin B	Cathepsin B		S2: Arg	+
	C1B	Bleomycin-Hydrolase	Bleomycin-Hydrolase			+
	C2	Calpain 2	Calpaine 1-15		S2: Tyr, Met, Leu, Val, Arg +Ca ²⁺ ^e	+
	C10	Streptopain	Streptopain		S2: lipophile AS	+
	C47	Staphopain A	Staphopaine A, B			+
CD	C11	Clostripain	Clostripain	HisH ⁺ , Cys ⁻	S1: Arg +Ca ²⁺ ^e	± rev.
	C14	Caspase 1 (ICE)	Caspase 1-14, ICE	HisH ⁺ , Cys ⁻	S2: Asp	-
CL	C60	Sortase	Sortase A, B	His, Cys, Arg?	LPXT G-Motiv GlyGlyGly	+
PA (C)	C3A- C3G	Picornain 3C (Chymotrypsin- like Faltung)	Poliovirus- Picornain-3C und 2A Rhinovirus- Picornain-3C und 2A HAV-Picornain- 3C	His, Cys	Gln Gly-Motiv	-
	C30	TGEV-M ^{pro}	TGEV-M ^{pro} SARS-CoV- M ^{pro}	His, Cys	LQ A-Motiv	-

^a Ein typischer Vertreter der Familie; andere Enzyme der Familie haben ähnliche Eigenschaften und Faltung. ^b Zusammensetzung, Ladung und Reihenfolge (innerhalb der Sequenz, N-Terminus→C-Terminus) des aktiven Zentrums. ^c Substratspezifität bzw. typisches Spaltungsmotiv. ^d Inhibition durch E64. ^e Ca²⁺ wird zur Aktivierung (nicht für den Katalyse-Mechanismus) benötigt. Abkürzungen: HAV Hepatitis A Virus, TGEV transmissible gastroenteritis virus, SARS-CoV severe acute respiratory syndrom coronavirus, ICE interleukin 1β converting enzyme, M^{pro} main protease, rev. reversible, Aminosäuren im 3- bzw. 1-Buchstabe-Code, || Spaltstelle im Substrat.

Tabelle 1-2: Vorkommen von Cystein-Proteasen in verschiedenen Organismen.

Subfamilie	Bakterien	Archaea	Protozoen	Pilzen	Pflanzen	Tiere	Viren
C1	+	+	+	+	+	+	+
C2	+		+	+	+	+	
C10	+						
C11	+	+	+				
C14	+		+			+	
C47	+ ^a						
C60	+						
C3							+
C30							+ ^b

^a bisher nur bei *Staphylococcus aureus*, ^b nur im Genus *Coronaviridae* bekannt.

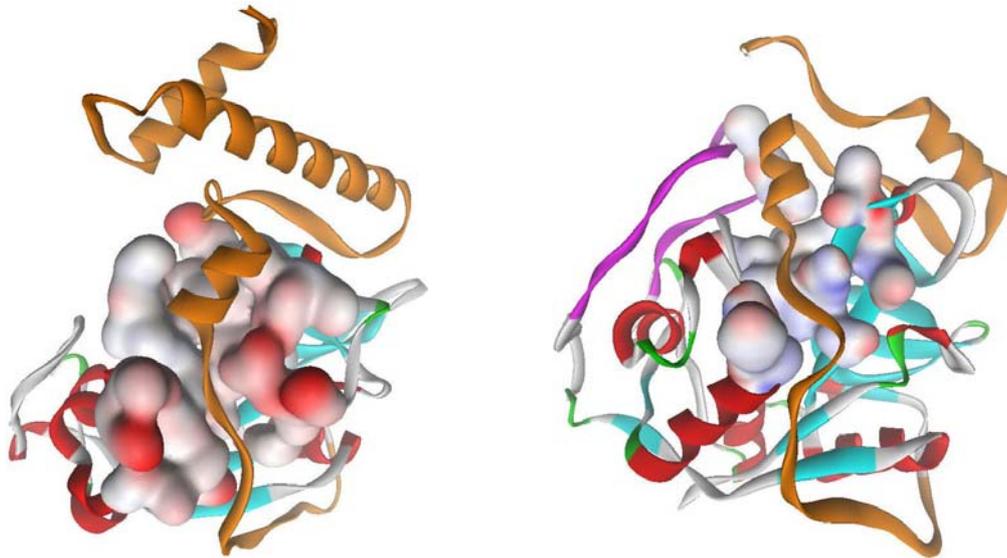
Im humanen Genom existieren Gene für 11 Papain-like CPs (Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, V, S, W, X).

Eine ständig zunehmende Anzahl von Papain-like Cystein-Proteasen wird derzeit in Parasiten identifiziert (Tabelle 1-4).

1.2 Strukturen der Cystein-Proteasen des Papain-Clans

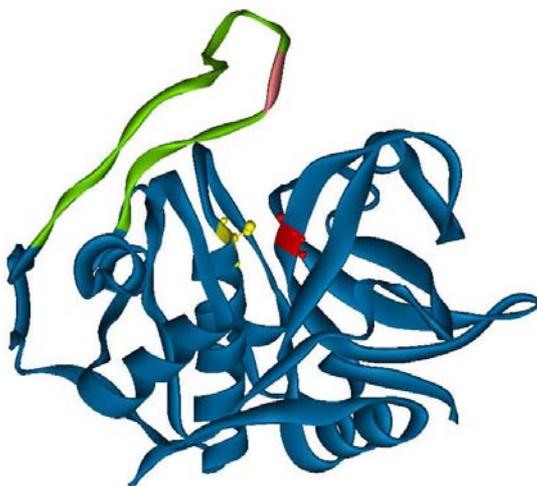
Die Cystein-Proteasen der Papain-Subfamilie werden zunächst als Präproenzyme an Ribosomen exprimiert, in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und weiter in Lysosomen prozessiert. Das Präproenzym besteht aus Signal-Peptid (10-20 AS), Prodomäne (36-315 AS) und katalytischer Domäne (220-260 AS). Das Signalpeptid ermöglicht den Transport in das ER und wird dort abgespalten. Die Prodomäne hat 3 bisher bekannte Funktionen^[2]: 1) sie dient als Gerüst für die Faltung des aktiven Zentrums,^[3,4] 2) sie sorgt für den Transport des Proenzym in das endosomale-lysosomale Kompartiment,^[5,6] und 3) sie ist ein reversibler, hochaffiner Inhibitor der eigentlichen Protease, der die vorzeitige Aktivierung der katalytischen Domäne verhindert, wobei die Prodomäne streng spezifisch die Enzyme der jeweiligen Subfamilie inhibiert.^[7-10] Das CB-Propeptid wirkt nur schwach gegen CL, das CL-Propeptid ist dagegen ein sehr aktiver Inhibitor für alle CL-like Enzyme.^[7]

Abbildung 1: Links: Procathepsin L (Prodomäne orange dargestellt); rechts: Procathepsin B (Prodomäne orange, occluding loop violett dargestellt).



Aufgrund der Sequenzen der Cathepsine und parasitären CPs werden diese Enzyme in Cathepsin-L-like, Cathepsin-B-like und Cathepsin-F-like gruppiert. Die Zusammengehörigkeit wird auch anhand eines für die jeweilige Untergruppe charakteristischen Motivs (sich wiederholende AS-Sequenz) innerhalb der Proregion bestätigt. So findet man in der Prodomäne der CL-like Gruppe das sog. ERF/WNIN-Motiv^[11]; in der CF-like Gruppe das ERFNAQ/A-Motiv.^[12,13] Für die CB-like Gruppe existiert kein charakteristisches Motiv in der Proregion.

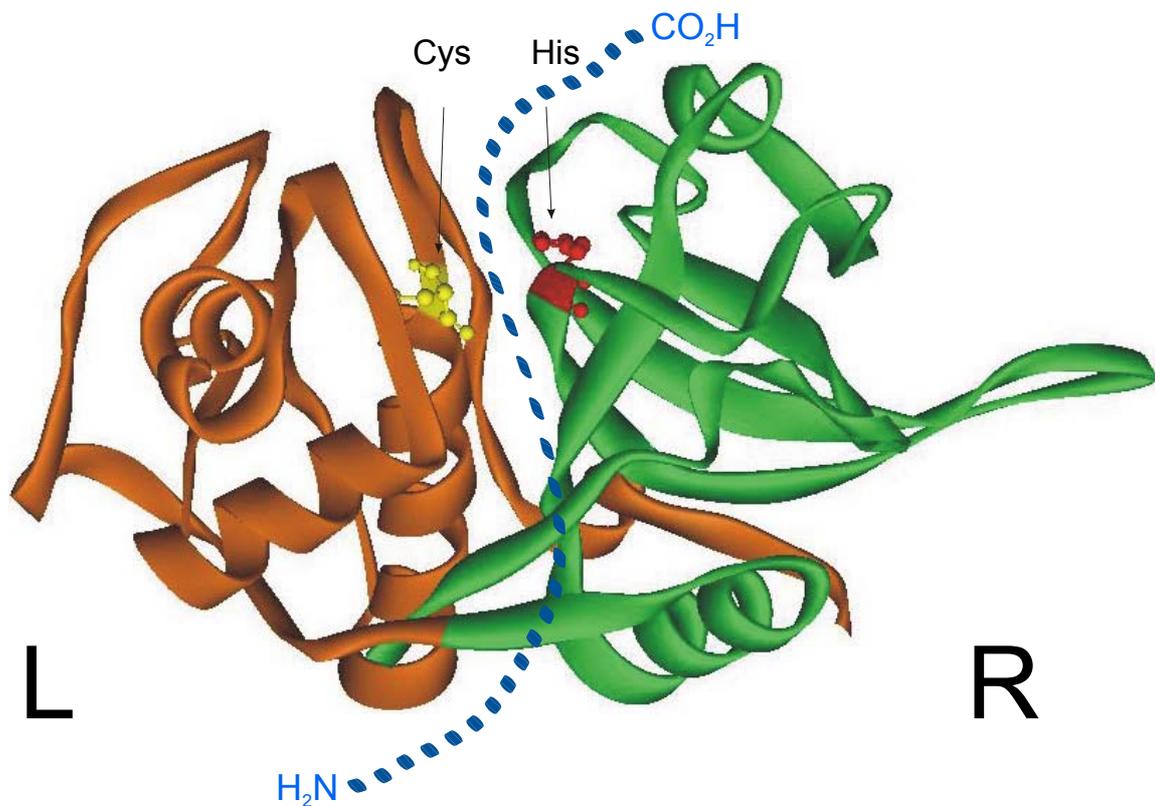
Abbildung 2: „Occluding loop“ bei Cathepsin B.



Es gibt jedoch für CB-like Proteasen einen sog. occluding loop mit zwei His-Resten (His110, His111), die für die zusätzliche Exopeptidase-Aktivität^[14] dieser Proteasen verantwortlich sind. Durch Bindung des C-terminalen Carboxylats eines Substrates wird die Abspaltung eines Dipeptides ermöglicht (Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität). Dieser occluding loop kann auch für das Design selektiver CB-Inhibitoren ausgenutzt werden.

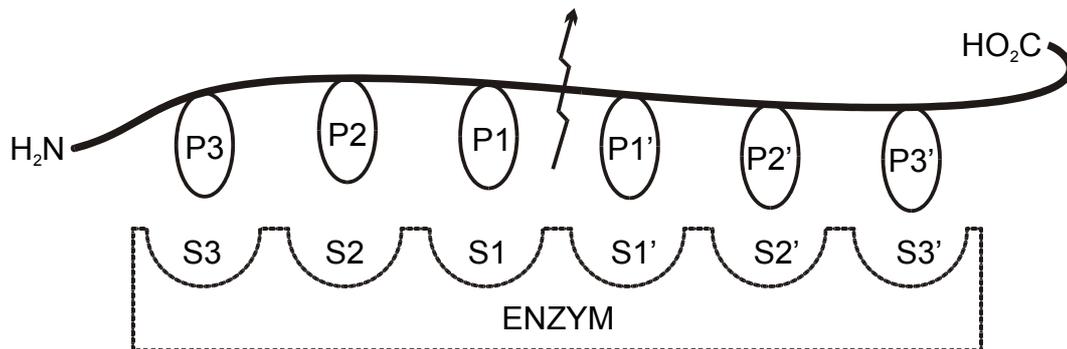
Die räumliche Struktur der Cathepsine bzw. Cathepsin-like Enzyme ist hoch konserviert. Sie bestehen aus einer L- und R- Domäne ähnlicher Größe. Der Cystein-Rest des aktiven Zentrums ist dabei innerhalb einer α -Helix der L-Domäne platziert, während der Histidin-Rest in der R-Domäne positioniert ist. Ein Substrat wird im Bindungsspalt zwischen den beiden Domänen gebunden (active site cleft).^[15]

Abbildung 3: Die L- und R-Domänen der Papain-like Cystein-Proteasen (am Beispiel von CL) Ein Substrat (blau dargestellt) wird entlang der "active site cleft" gebunden, mit dem C-Terminus nach oben.



Die Propeptidkette bindet in umgekehrter Richtung wie ein Substrat in den Bindungsspalt und verhindert so die Bindung des Substrates. Die Bindungstaschen der Enzyme, die mit einem Substrat oder Inhibitor wechselwirken, werden nach der Schechter-und-Berger-Nomenklatur^[16] (Schema 1-1) ausgehend von der Spaltstelle als S1-Sx in Richtung N-Terminus und S1'-Sx' (prime) in Richtung C-Terminus bezeichnet. Die entsprechenden Aminosäuren des Substrats bzw. Inhibitors, die in diese Taschen binden, werden mit P1-Px bzw. P1'-Px' bezeichnet.

Schema 1-1: Terminologie der Proteasen und Substrat Spezifität nach Berger und Schechter.^[16]



1.3 Rolle der humanen und parasitären CPs

Die im Hinblick auf die Entwicklung von Wirkstoffen interessantesten Cystein-Proteasen des Papain-Clans sind in der Tabelle 1-3 und der Tabelle 1-4 dargestellt. Die mit diesen Enzymen verbundenen Erkrankungen hängen praktisch immer mit erhöhten Konzentrationen an Protease zusammen, was dann zu unerwünschtem Abbau verschiedener sowohl intrazellulärer als auch extrazellulärer Proteine führt. Die Aktivität der Cathepsine ist unter anderem durch endogene Inhibitoren (Cystatine, Kininogene) und durch das pH-Optimum der Proteasen, das im relativ sauren Bereich liegt (pH 4.5-6.5), reguliert. Diese Regulation versagt bei Ungleichgewichten zwischen Cathepsinen und ihren natürlichen Inhibitoren oder bei Senkung des pH-Wertes bei entzündlichen Prozessen. Erhöhte Konzentrationen an Cystein-Proteasen werden in Zusammenhang mit der Zerstörung von Gewebe bei invasiven (Krebs) und degenerativen (rheumatoide Arthritis, Osteoporose, muskuläre Dystrophie) Erkrankungen gebracht.

Die Mechanismen, die für Überexpression und pathologische Folgen der Protease-Aktivität verantwortlich sind, sind bisher weitgehend unbekannt. So ist z. B. die Ursache der erhöhten Aktivität der Osteoklasten und damit der erhöhten Expression von CK in fortgeschrittenem Alter nach wie vor unklar.^[17]

Die humanen Cathepsine L und B kommen in beinahe jedem Gewebe des menschlichen Körpers vor, während die Cathepsine F, K, N, S, V, W Gewebe-selektiv exprimiert werden.^[17] Das pH-Optimum der meisten lysosomalen Cystein-Proteasen liegt im sauren Bereich. In neutralem bzw. schwach basischem Milieu werden sie rasch inaktiviert.^[18-20] Parasitäre Proteasen behalten dagegen ihre Aktivität auch bei neutralem oder schwach basischem pH.^[21-23] Dieses hängt mit der Aufgabe der jeweiligen Proteasen zusammen. Während die humanen Cystein-Proteasen eine gut kontrollierte

Tabelle 1-3: Physiologische und pathophysiologische Rollen ausgewählter humaner Cystein-Proteasen. ^[17,31,32]

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

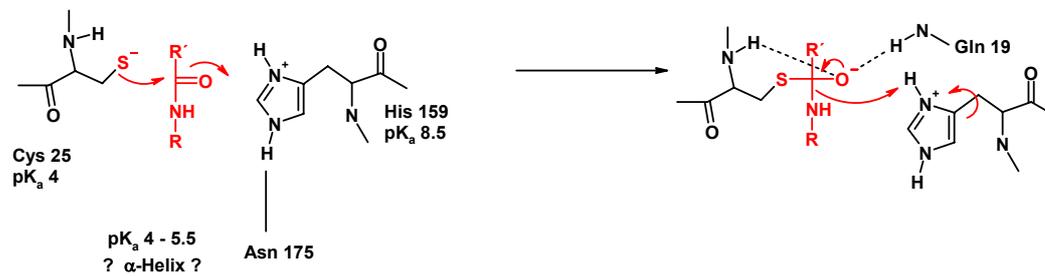
Tabelle 1-4: Parasitäre Erkrankungen und beteiligte Cystein-Proteasen. ^[17]

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

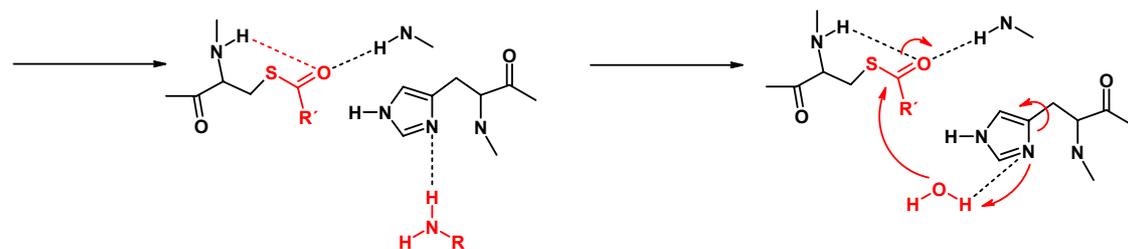
1.4 Mechanismus der Katalyse

Das katalytische Zentrum der Papain-like Cystein-Proteasen besteht aus drei Aminosäuren Cys25, His159 und Asn175 (Papain-Nummerierung), wobei der Asn-Rest nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist.^[31] Cys und His bilden ein präkatalytisches Ionen-Paar, der Asn-Rest positioniert dabei den His-Rest durch eine Wasserstoffbrücke. Der pK_a-Wert des Cystein-Thiols im aktiven Zentrum liegt etwa bei 4 ("normales"

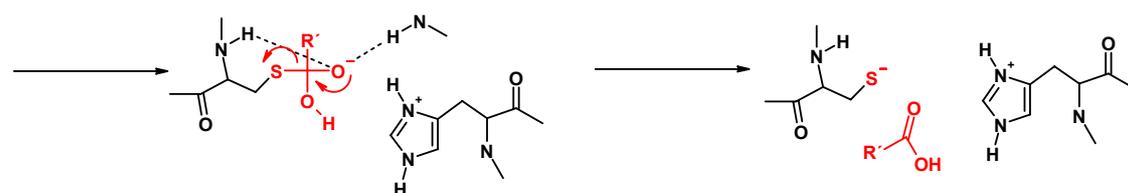
Cystein 10). Es wird vermutet, dass diese Erhöhung der Acidität einer Wechselwirkung mit der α -Helix, in der der Cystein-Rest sitzt, zu verdanken ist.



Bei der Hydrolyse einer peptidischen Bindung greift das nucleophile Thiolat des Cysteins den Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Bindung an. Es wird zunächst ein primäres tetrahedrales Intermediat gebildet, das mit Hilfe einer sog. oxyanion hole stabilisiert wird. Die oxyanion hole ist eine Tasche des Enzyms, gebildet insbesondere aus dem Seitenketten-NH des Gln¹⁹ und dem backbone-NH des Cys²⁵, die mit dem Carbonyl-Sauerstoff der zu spaltenden Peptidbindung Wasserstoff-Brücken ausbilden.



Das tetrahedrale Intermediat geht in ein acyliertes Enzym (\rightarrow kovalente Katalyse) über unter gleichzeitiger Abspaltung des C-terminalen Bruchstücks des Substrates. Als nächstes wird das acylierte Enzym durch Wasser hydrolysiert.



Dabei wird ein sekundäres tetrahedrales Intermediat gebildet, das anschließend in das regenerierte, freie Enzym und das N-terminale Bruchstück des Substrates zerfällt.

1.5 Inhibitoren von Cystein-Proteasen

Die Entwicklung von Inhibitoren der Cystein-Proteasen basiert im ersten Schritt auf einem charakteristischen Schema:

eine reaktive elektrophile Gruppe wird mit einer Peptidkette verknüpft.

Die Struktur der Peptidkette muss einer vom Enzym bevorzugten Substrat-Sequenz entsprechen, damit diese in das aktive Zentrum bindet und so die reaktive elektrophile Gruppe in die Nähe des Cystein-Restes bringen kann.

Der Cystein-Rest wird dann irreversibel alkyliert oder acyliert (Epoxysuccinyl-, Aziridinyl-, Diazomethan-, O-Acylhydroxamat-, Fluormethylketon-Petide) oder durch eine reversible, kovalente Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum blockiert (Peptidyl-Aldehyde, - α -Ketosäuren, -Nitrile).

Es wurden bisher nur wenige nicht-kovalent bindende Inhibitoren beschrieben (Peptidsulfone und Sulfonsäure-Derivate).^[33,34]

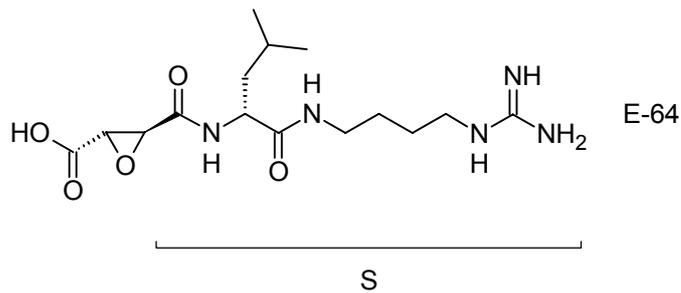
Ein Nachteil der Inhibitoren, die eine von einem Substrat abgewandelte Peptidkette haben, ist ihre Anfälligkeit für enzymatische Hydrolyse. Zur Verbesserung der Hydrolysestabilität werden Inhibitoren, die eine peptidomimetische Kette besitzen, entwickelt. Im Prinzip gibt es folgende Möglichkeiten, eine Peptidkette in ein Peptidomimetikum umzuwandeln: Abwandlungen des Peptid-Rückgrates, Modifikation der Seitenketten der Aminosäuren, Einbau unnatürlicher oder nicht-proteinogener Aminosäuren (cyclische Aminosäuren, D-Aminosäuren).

Das "Festfrieren" einer "bioaktiven" Konformation eines Inhibitors wird durch Rigidisierung der Peptidkette (Einbau von Heterocyclen, Einbau von aromatischen Ringen) erreicht. Dadurch wird die Energie, die zum Erreichen der aktiven Konformation benötigt wird, in die Synthese investiert und muss nicht mehr bei der Bindung an das Enzym aufgebracht werden. Dadurch erhöht sich in vielen Fällen die Affinität eines Inhibitors zum Enzym.

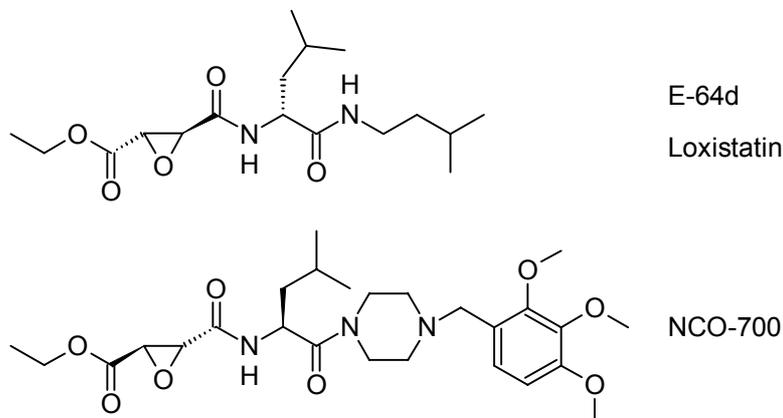
1.5.1 Inhibitoren mit kleinem Ring

1.5.1.1 Epoxysuccinyl-Peptide

Inhibitoren mit kleinem Ring^[35] als reaktive Gruppe finden sich bei den Epoxysuccinyl-Peptiden, die von dem Naturstoff E-64 (Schema 1-2), isoliert aus *Aspergillus japonicus*, abgeleitet wurden. Später wurden strukturell ähnliche Stoffe mit *trans*-(S,S)-Epoxybernsteinsäure als reaktive Gruppe in weiteren Mikroorganismen gefunden.^[36-38] Essentiell für eine Hemmung von Cystein-Proteasen ist die *trans*-Konfiguration des Epoxidrings.^[35]

Schema 1-2: Naturstoff E-64 aus *Aspergillus japonicus*.

E-64 hat eine Explosion in der Entwicklung verschiedener Cystein-Protease-Inhibitoren bewirkt. So wurde auch ein aus pharmazeutischer Sicht interessantes Derivat, E-64d (Loxistatin), entwickelt (Schema 1-3). Die geladene Seitenkette des E-64, der Agmatin-Rest, wurde durch einen Isoamyl-Rest ersetzt, und die Säure am Oxiran-Ring wurde verestert. So entstand ein zellgängiges Prodrug, das erst *in vivo* durch unspezifische Esterasen zur freien Säure (E64c) hydrolysiert wird. Dieser Wirkstoff war in Japan in Phase III der Klinischen Prüfung gegen muskuläre Dystrophie.

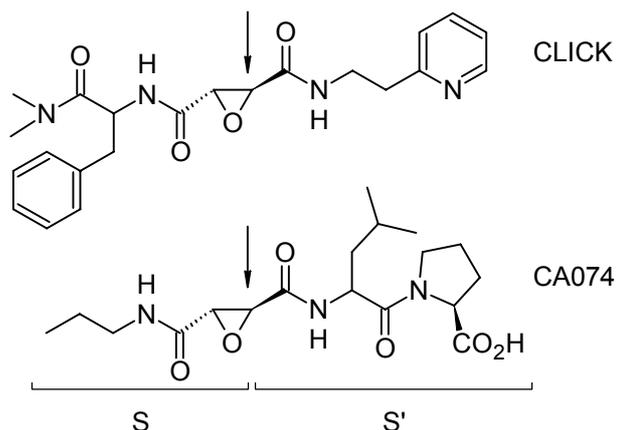
Schema 1-3: Epoxysuccinyl-Peptide in Klinischer Prüfung.

Eine weitere Verbindung, NCO-700 (Schema 1-3), die sich in Phase II der Klinischen Prüfung gegen Brust- und Prostata-Krebs befindet,^[39] wurde ursprünglich als Inhibitor für Calpain und Cathepsin B gegen cardiovaskuläre Erkrankungen entwickelt. Erst später wurde die antineoplastische Aktivität der Substanz, die nicht mit der Hemmung von Cystein-Proteasen korreliert und deren Ursache bisher nicht aufgeklärt wurde, erkannt.

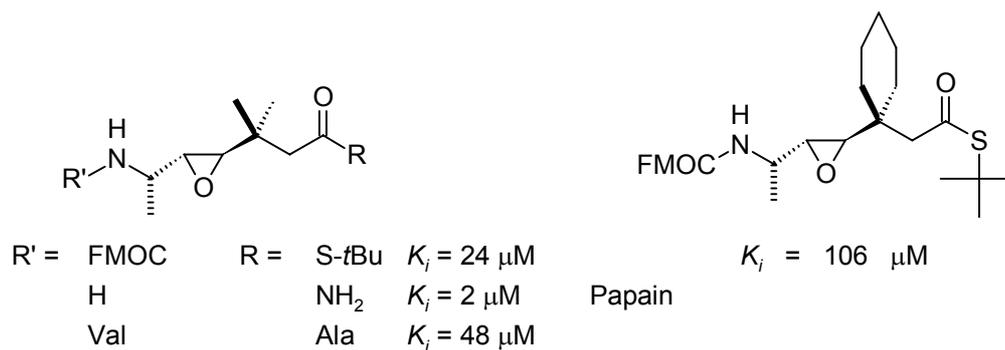
Unter den Epoxysuccinyl-Peptiden findet man auch Inhibitoren, die sowohl für CL als auch für CB selektiv sind.

Eine Serie CL-spezifischer Inhibitoren wurde von Katunuma mit Hilfe der Kristallstrukturen von Cathepsin L mit E-64 entwickelt. Diese sog. CLIK-Serie (CLIK = CL inhibitor Katunuma) besteht aus 7 Substanzen, die in der P2'-Position große lipophile Reste tragen. So können diese nicht in die durch den occluding loop abgeschirmte S2'-Tasche des CB binden. Die Hemmung ist bei Konzentrationen bis 1 μ M CL-selektiv.^[40]

Schema 1-4: Selektive CL- (CLIK) und CB- (CA074) Inhibitoren.



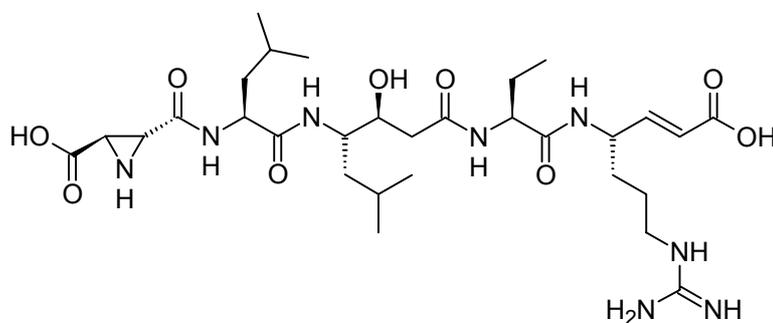
Eine Reihe von peptidomimetischen Inhibitoren mit Oxiran-Ring als Elektrophil wurde durch Kombination der Eigenschaften des E-64 und der Eigenschaften von Dipeptidyl-Fluormethylketonen entwickelt (Schema 1-5). Dabei wurde festgestellt, dass die elektronenziehenden Gruppen am Oxiran-Ring ($-\text{CO}_2\text{R}$, $-\text{CONHR}$, $-\text{COR}$) für eine irreversible Hemmung essentiell sind.^[45]

Schema 1-5: Peptidomimetische Inhibitoren mit Oxiran-Ring.

Ausgehend von E-64 wurden Inhibitoren entwickelt, die statt des Epoxids einen anderen elektrophilen Heterocyclus enthalten. Dazu gehören neben den Aziridinen auch Cyclopropenone, β -Lactone, β -Lactame und Thiirane.^[35]

1.5.1.2 Aziridinyl-Peptide

Die (S,S)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure kann als Naturstoff aus *Streptomyces* isoliert werden. Ein weiteres in der Natur vorkommendes Aziridin ist Miraziridin A (Schema 1-6), das aus dem Schwamm *Theonella mirabilis* isoliert wurde.^[46] Diese Verbindung vereint 3 verschiedene Protease-hemmende Strukturen: i) (R,R)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure, ii) Statin, (3S,4S)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure und iii) ein vinyloges Arginin.^[47] Miraziridin hemmt dadurch unspezifisch Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen.

Schema 1-6: Miraziridin A. Ein Naturstoff aus dem Schwamm *Theonella mirabilis*.

Verschiedene Peptide, die die Aziridin-2,3-dicarbonsäure als Elektrophil enthalten, wurden bereits in unserem AK synthetisiert und gegen Papain, Cathepsin L und Cathepsin B getestet (Schema 1-7, Tabelle 1-5).^[48-50] Die den wirksamsten

Epoxysuccinyl-Peptiden strukturanalogen Aziridinyl-Peptide weisen eine etwa 1000x schwächere Hemmung auf. Dies hängt mit der geringeren Reaktivität des Aziridinrings zusammen. Zwar sind die Affinitäten zu den Enzymen gleich, die Alkylierung der Proteasen verläuft jedoch ca. 1000x langsamer. Ein Vorteil der Aziridine gegenüber Epoxiden ist der Ring-Stickstoff, der acyliert oder alkyliert werden kann und so weitere Möglichkeit zur Entwicklung selektiver Inhibitoren bietet.

Schema 1-7: Aziridinyl-Peptide.

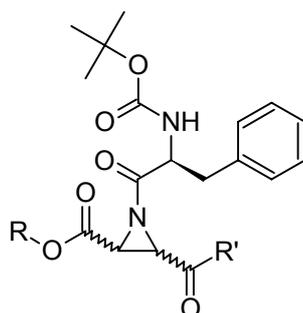


Tabelle 1-5: Hemmkonstanten und Ring-Konfiguration der Aziridinyl-Peptide.

Ringkonfiguration	R	R'	Papain k_{2nd} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	CB k_{2nd} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	CL k_{2nd} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
S,S	Et	OEt	7	2.1	1.1
S,S+R,R	H	OEt	8.4	21	3.1
S,S+R,R	H	OH	60	14	635
S,S	Et	Leu-ProOH	3	109	11
R,R	Et	Leu-ProOH	12	114	3.5

Thiiran-2-carbonsäure-Derivate, die als weitere Analoga der Epoxide ebenfalls in unserem AK synthetisiert wurden, weisen eine sehr schwache Wirkung im Vergleich zu Epoxiden und Aziridinen auf.^[35]

Als weitere reaktive Gruppen wurden Cyclopropanone als reversible Inhibitoren von Cystein-Proteasen beschrieben. β -Lactone und β -Lactame sind ebenfalls als Inhibitoren von Cystein- und Serin-Proteasen bekannt. Ein β -Lacton, das sich von Z-(S)-Serin ableitet, hemmt irreversibel die virale HAV-3C Protease.^[35]

1.5.2 Nichtpeptidische Inhibitoren

Nur wenige Inhibitoren, die nicht von peptidischen bzw. peptidomimetischen Verbindungen abstammen, wurden bisher beschrieben.^[51]

Dazu gehören 3-Chloro-4-carboxamido-6-arylpyridazine, die von Sanofi-Winthrop als irreversible Inhibitoren der ICE (Caspase-1) gefunden wurden. Für die Wirkung ist ein Halogen-substituierter Pyridazin-Ring essentiell.

Disulfiram ist bekannt als Hemmstoff der Aldehyddehydrogenase. Neuerdings wurden auch Auswirkungen auf die Apoptose von Lymphozyten festgestellt, die auf Hemmung von Caspase 1 und 3 beruhen.

Bei der Testung auf Hemmaktivität von Organotellur(IV)-Verbindungen gegen verschiedene Proteasen (Cystein-, Serin-, Metallo-, Aspartat-) wurde eine selektive Hemmung von Papain und Cathepsin B detektiert. Die Aktivität der Enzyme konnte durch Zugabe von Thiolen regeneriert werden, was auf die Bildung einer Disulfid-Brücke innerhalb der Enzyme durch oxidative Wirkung der Organotellur(IV)-Substanzen hinweist. Eine ähnliche Wirkung zeigen auch Stickstoffmonoxid-(NO)-Donoren. Neben Nitrosylierung des Thiols im aktiven Zentrum werden durch Oxidation Disulfid-Brücken gebildet, so dass der Cys-Rest des aktiven Zentrums nicht mehr für die Katalyse zur Verfügung steht. Auch hier ist die Regenerierung mit Thiolen möglich.

Substanzen mit Zimtsäureester-Baustein sowie Homophthalimide sind irreversible Hemmstoffe der HRV-3CP (human rhinovirus 3C protease).^[51]

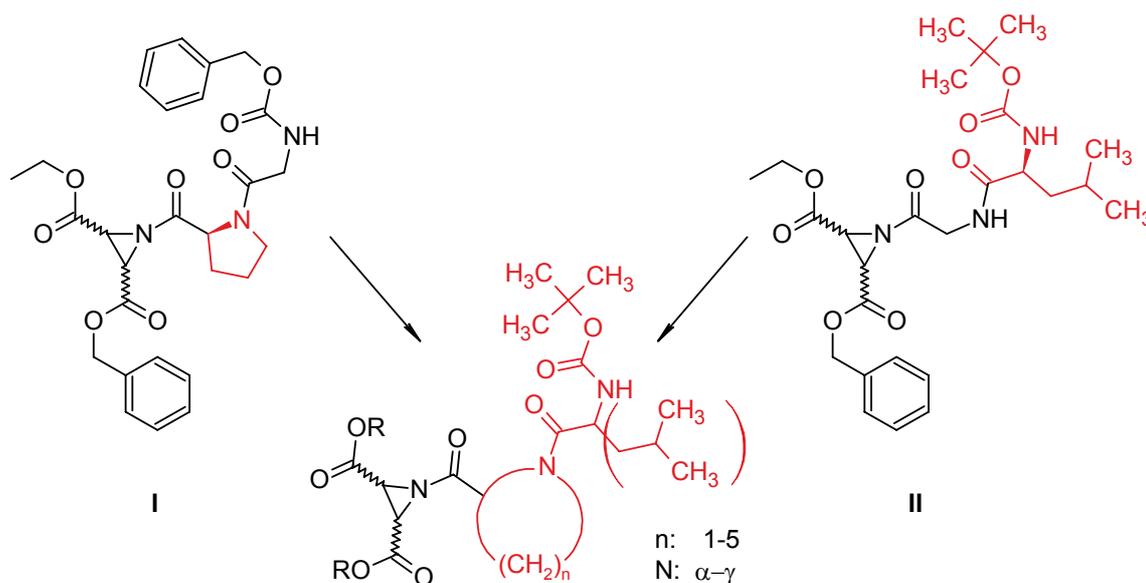
2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und die Testung einer Serie CL-selektiver Inhibitoren, die aus Aziridin-2,3-dicarboxylat als reaktive elektrophile Gruppe und einer Dipeptidkette bestehen, die unnatürliche bzw. nicht-proteinogene Aminosäuren enthalten. Aus Vorarbeiten wurden die CL-selektiven Inhibitoren I und II (siehe Schema 2-1) ausgewählt und in einer Leitstruktur vereint. Als erstes sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss die Ringgröße eines Prolin-analogen Bausteins auf die Hemmung und die Selektivität gegenüber CL hat. Weiter sollte auch der Einfluss der zweiten AS in der Peptidkette durch Austausch von Leucin gegen Glycin untersucht werden.

I Z-Gly-Pro-Azi(OBn)OEt $k_{2nd} = 10726$ (CL), 2615 (CB) $M^{-1}min^{-1}$

II Boc-Leu-Gly-Azi(OBn)OEt $k_{2nd} = 3237$ (CL), 240 (CB) $M^{-1}min^{-1}$

Schema 2-1: Entwurf der CL-selektiven Inhibitoren.



Außerdem sollte in einer BOC-Phe-Ala-Reihe der Einfluss von freien Säure-Gruppen am Aziridinring auf die Hemmung studiert werden (Schema 2-2). Aus Vorarbeiten^[49] an BOC-Phe-Azi(OR)₂ (R = Bn, Et, OH) (siehe Tabelle 1-5) war bekannt, dass schon eine Säure-Gruppe am Aziridinring die Hemmung von Cystein-Proteasen begünstigt. Dazu sollten alle 4 Diastereomere von BOC-Phe-Ala mit Dibenzyl-(S,S)-aziridin-2,3-dicarboxylat auf Hemmung vor und nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzylester untersucht werden.

I	Boc-L-Phe-L-Ala-Azi(OBn)OEt	$k_{2nd} = 281 \text{ (CL)}, 443 \text{ (CB)} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$
II	Boc-L-Phe-L-Ala-Azi(OH)OEt	$k_{2nd} = ??? \text{ (CL)}, 676 \text{ (CB)} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$
III	Boc-L-Phe-L-Ala-Azi(OH) ₂	$k_{2nd} = ??? \text{ (CL)}, ??? \text{ (CB)} \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$

Schema 2-2: Einfluss der freien Säure auf die Hemmstärke der Phe-Ala-Derivate.

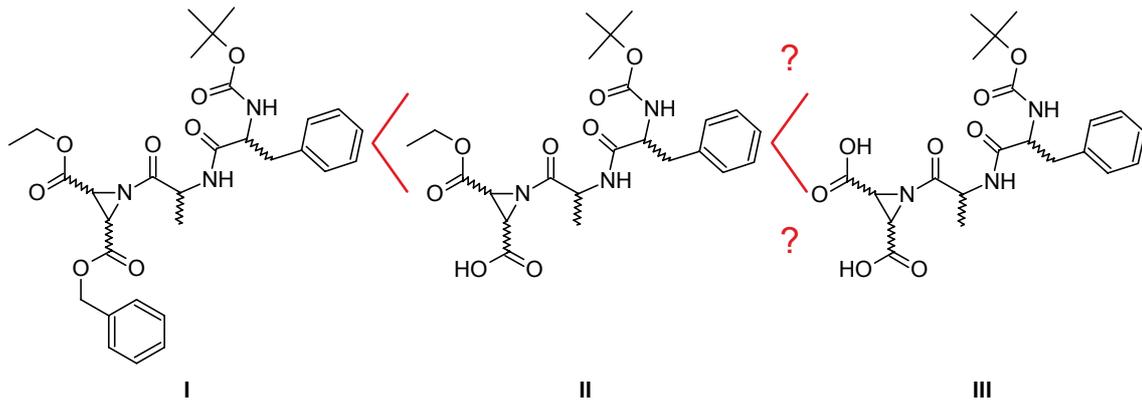
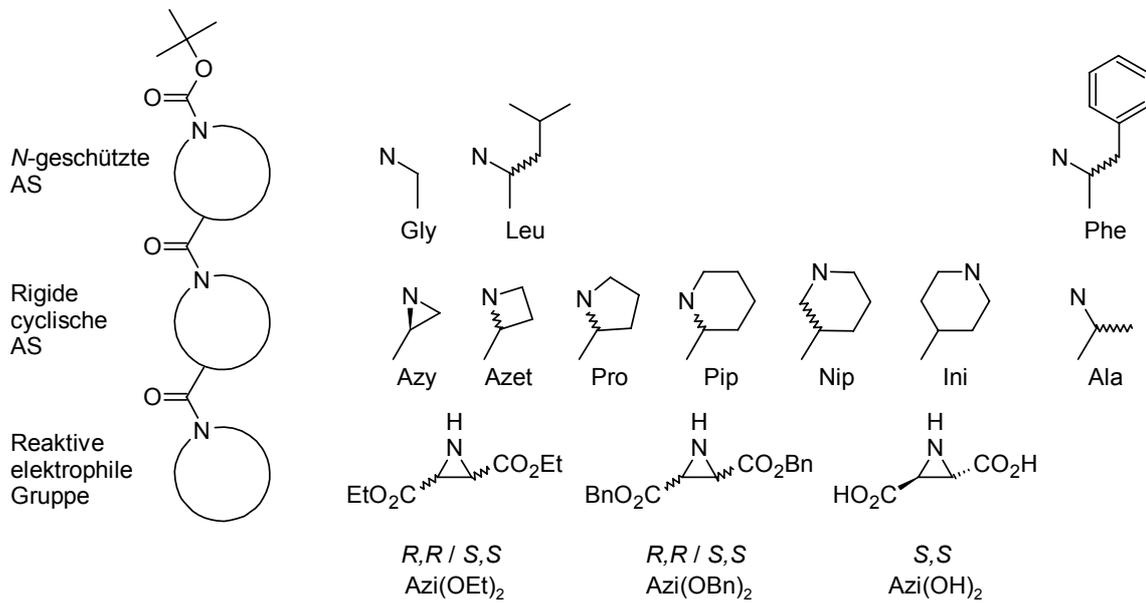


Abbildung 5: Zusammenfassendes Schema der Inhibitoren.



In den nachfolgenden Kapiteln des Allgemeinen Teils werden die Synthesen der Inhibitoren (Kapitel 3), deren Testungen an den Proteasen und Mikroorganismen (Kapitel 4) sowie die aus den Ergebnissen der Assays ableitbaren Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Kapitel 5) diskutiert.

3. Synthesen

3.1 Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivate.

Synthese der *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarbonsäureester

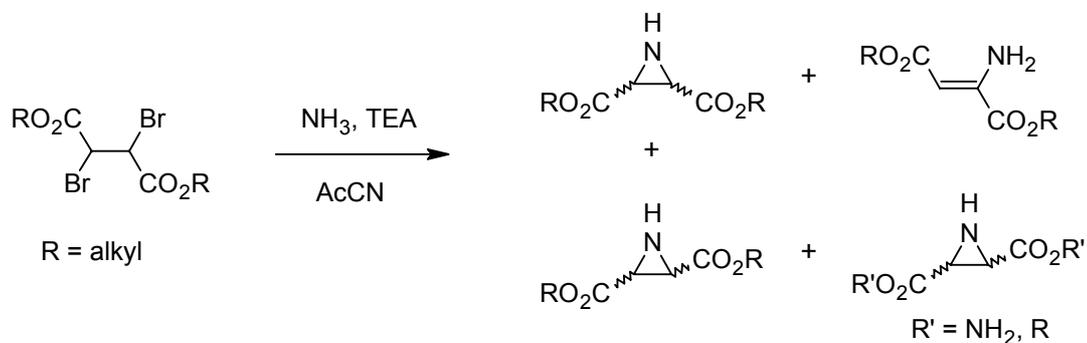
Trans-Aziridin-2,3-dicarboxylate können über vier verschiedene Verfahren synthetisiert werden.

1. Eine patentierte biosynthetische Methode nutzt in einem fermentativen Verfahren die Schimmelpilze *Streptomyces sp. 116-120 (IFO 15746)* zur Produktion von (*S,S*)-(+)-Aziridin-2,3-dicarbonsäure.^[52]
2. Cromwell-Synthese: Cyclokondensation von 2,3-Dibromsuccinaten mit Ammoniak.^[53-55]
3. Michael-Addition von Diphenylsulfimin an Fumarsäure-Derivate.^[56,57]
4. Reaktion von 3-Azido-2-hydroxysuccinaten mit Phosphanen^[58] in einer Staudinger Reaktion, gefolgt von der Cyclisierung zum Aziridinring.

Die Cromwell-Synthese und die Michael-Addition sind einfache „Eintopf-Verfahren“, die allerdings nur sehr moderate Ausbeuten und ein breites Spektrum an Nebenprodukten liefern. Außerdem sind die Ausgangsstoffe der Synthesen, die Dibromsuccinate bzw. bei den Fumaraten, der Dibenzylester, nicht kommerziell verfügbar.

Die Cromwell-Synthese liefert als Produkte ein Gemisch aus *cis*- und racemischen *trans*-konfigurierten Aziridindicarboxylaten. Die Ausbeuten dieses Verfahrens überschreiten 15% nicht, Hauptprodukt ist das entsprechende Enamin (50-60%). Ein weiterer Nachteil dieser Synthese sind die sehr langen Reaktionszeiten (bis 20 d).

Schema 3-1: Cromwell-Synthese der Aziridin-2,3-dicarboxylate.

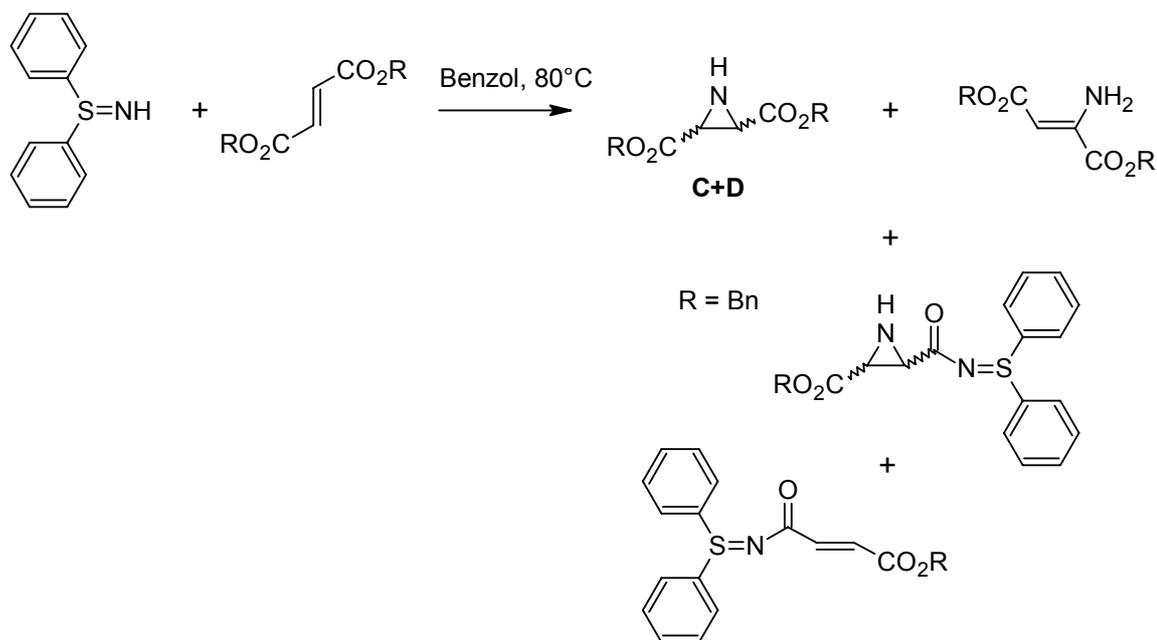


Die für die Synthese der Aziridinyl-Peptide eingesetzten Aziridin-2,3-dicarboxylate wurden nach den Verfahren 3. und 4. dargestellt.

3.1.1 Synthese der racemischen Aziridin-2,3-dicarboxylate

Die Michael-Addition von Diphenylsulfimin (DPSI) an Fumarate bietet eine Möglichkeit, die *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate schnell zu synthetisieren. Die Reaktion verläuft im ersten Abschnitt als Michael Addition. Danach folgt unter Stabilisierung des gebildeten Enols und Abspaltung von Diphenylsulfid direkt der Ringschluss zum Aziridin. Auch in diesem Verfahren entsteht das Produkt als Racemat in Ausbeuten von 25-35%. Mit 50% stellt das Enamin ebenfalls das Hauptprodukt dar, weiterhin entstehen DPSI-Addukte. Das für die Synthese des Dibenzylderivates (**C+D**) benötigte Dibenzylfumarat wurde durch Veresterung mit Benzylalkohol und DCC nach Steglich dargestellt.

Schema 3-2: Michael Addition von Diphenylsulfimin an Fumarate.



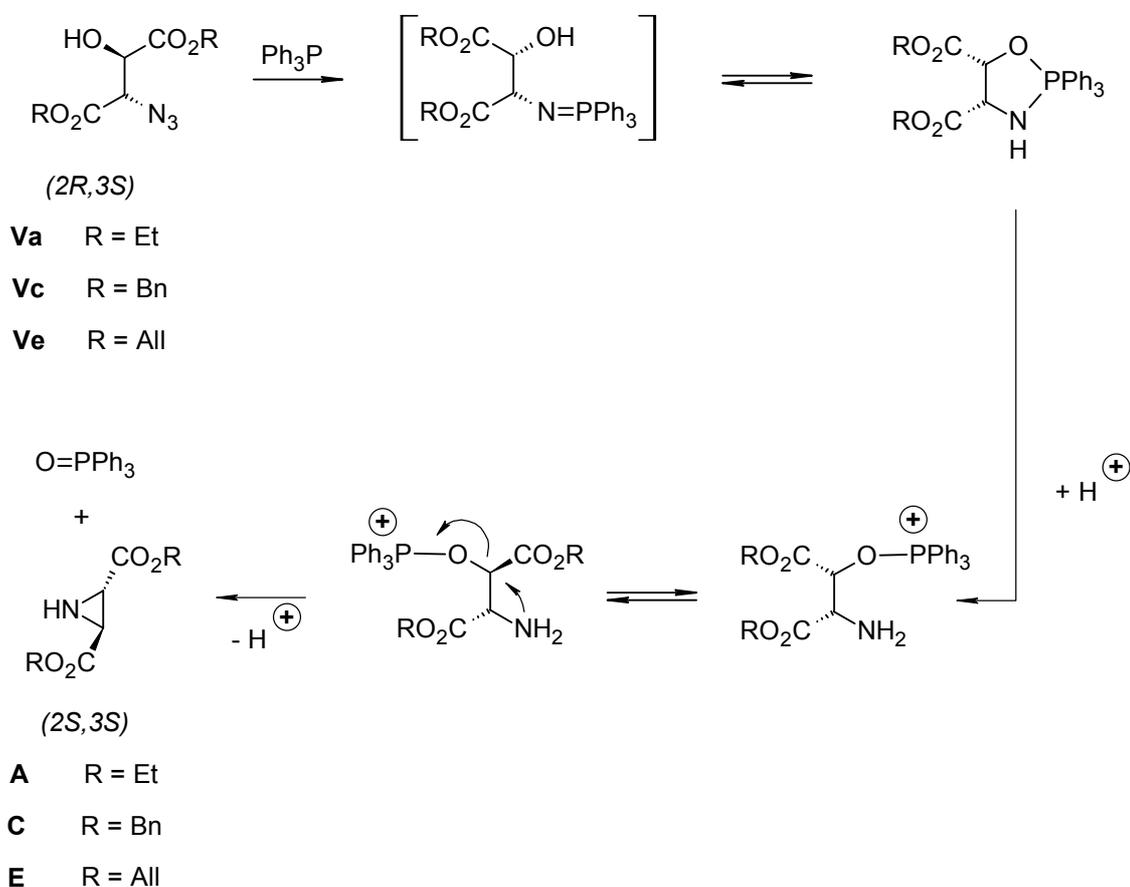
3.1.2 Stereoselektive Synthese der Aziridin-2,3-dicarboxylate

Die Staudinger-Reaktion enantiomerenreiner *anti*-Azidoalkohole mit Triphenylphosphin (PPh_3), gefolgt von der Cyclisierung zum Aziridin, führt ausschließlich zu einem *trans*-Enantiomer. So liefert die Cyclisierung von *anti*-($2R,3S$)-3-Azido-2-hydroxysuccinat das (S,S)-Aziridin-2,3-dicarboxylat, die Cyclisierung von *anti*-($2S,3R$)-3-Azido-2-hydroxysuccinat das (R,R)-Aziridin-2,3-dicarboxylat. Die *syn*-($2R,3R$ bzw. $2S,3S$)-3-Azido-2-hydroxysuccinate führen zum *cis*-konfigurierten (R,S)-Aziridin-2,3-dicarboxylat.

Die Ausbeuten variieren je nach Ester-Rest von 30% beim Dibenzyl- bis 60% beim Diethyl-Derivat.

Die Reaktion verläuft über zwei Intermediate. Als erstes entsteht ein 2-Hydroxyiminophosphoran, das in einer intramolekularen Addition der OH-Gruppe an die (P=N)-Bindung weiter zum 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidin reagiert. 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidine cyclisieren nach Lösung der P–N-Bindung unter Inversion am C-3-Atom zum Aziridinring.^[59]

Schema 3-3: Die Reaktion der *anti*-Azidoalkohole mit Triphenylphosphin.



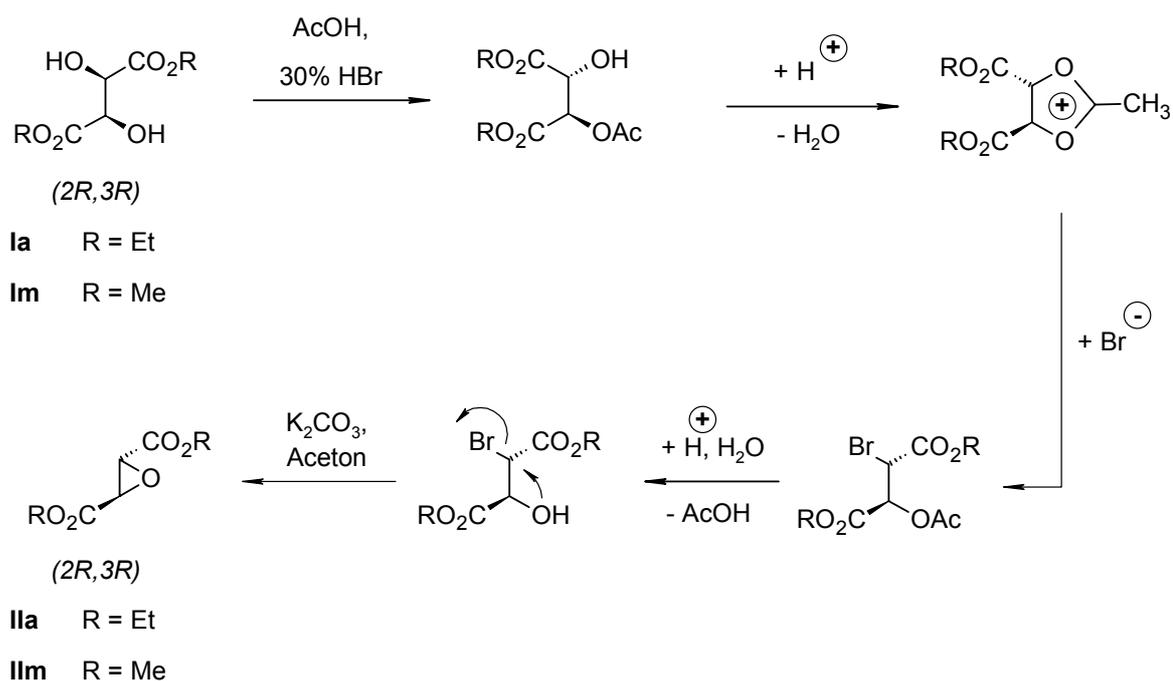
3.1.2.1 Synthese der anti-Azidoalkohole

Anti-Azidoalkohole können über drei Synthese-Wege synthetisiert werden. Alle drei Wege basieren auf Öffnung eines *trans*-konfigurierten Heterocyclen (Oxiran, cyclisches Sulfit, cyclisches Sulfat) durch nucleophilen Angriff von Azid unter S_N2 -Bedingungen.

3.1.2.1.1 Addition an Oxiran-2,3-dicarboxylate

Oxirane werden über eine mehrstufige Synthese aus L- oder D-Tartraten synthetisiert. Es wird zunächst eine Hydroxylgruppe des Tartrats in HBr/Eisessig monoacetyliert, unter sauren Bedingungen entsteht ein cyclisches 1,3-Dioxolan-2-ylum-Ion, welches mit HBr zu 2-Acetoxy-3-bromsuccinat reagiert. Dieses wird mit HBr/Eisessig zum 2-Brom-3-hydroxysuccinat hydrolysiert.^[60] Schließlich erfolgt der Ringschluss zum Oxiran unter basischen Bedingungen mit K_2CO_3 in wassrefreiem Aceton oder mit Natriummethanolat. Die Gesamtausbeute beträgt 40-60%.

Schema 3-4: Synthese der Oxiran 2,3-dicarboxylate aus Tartraten



Aufgrund der Instabilität von Benzylestern in HBr/Eisessig eignet sich diese Syntheseroute nicht zur Darstellung der Dibenzylloxiran-2,3-dicarboxylate. Es wurde daher versucht, nach Hydrolyse des (*R,R*)-Diethyloxiran-2,3-dicarboxylats den (*R,R*)-Dibenzylester durch Veresterung der Dicarbonsäure zu erhalten. Unter den vielen untersuchten Veresterungsmethoden lieferte nur eine Methode, nämlich die Umsetzung der Oxiran-2,3-dicarbonsäure mit Benzyl-O-isoharnstoff,^[61] das enantiomerenreine

(*R,R*)-Dibenzyloxiran-2,3-dicarboxylat (**IIc**) in geringen Ausbeuten (ca. 10%) (siehe Tabelle 3-1).

Schema 3-5: Versuche zu Veresterung der (*R,R*)-Oxiran-2,3-dicarbonsäure.

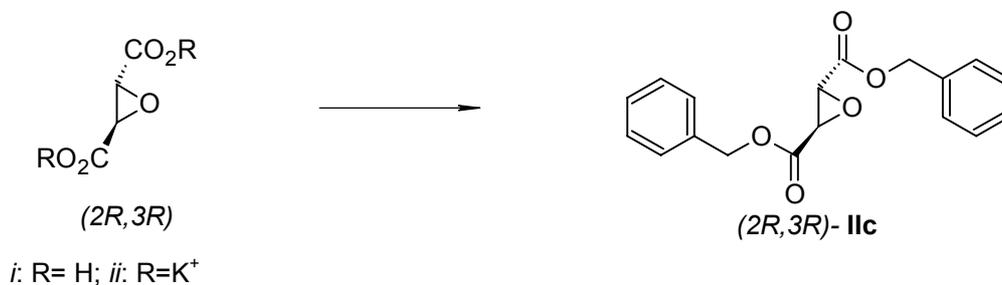
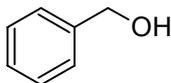
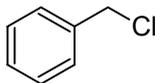
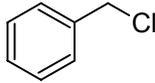
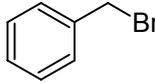
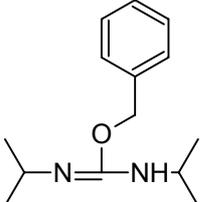


Tabelle 3-1: Versuche zur Darstellung des (*R,R*)-Dibenzyloxiran-2,3-dicarboxylats (IIc**).**

Oxiran	Reagenz	Solvens	Reaktionsbedingungen	Produkt IIc
		Toluol	<i>p</i> -TsOH, Rückfluss, 2 h	Zers.
<i>i</i>		Benzol	<i>p</i> -TsOH, Rückfluss, 2 h	Zers.
		MeCN	1. SOCl ₂ , 2. TEA	-
		-	PCl ₅	Zers.
<i>i</i>		DMF	TEA, 1 Woche RT → 50°C	-
<i>ii</i>		DMF	Lil, RT, 2 d	<2%
<i>ii</i>		DMF	18-Krone-6, 40°C, 2 d	-
		-	2 d RT → 80°C	<2%
<i>i</i>		DCM	DMAP, RT, 2 d	<2%
		Benzol	Rückfluss	10%
		THF	Rückfluss	<2%

- keine Reaktion; Zers. Zersetzung

Die Umsetzung der Epoxide mit NaN_3 und NH_4Cl als Protonendonator in DMF führt zu den *anti*-Azidoalkoholen, als Nebenprodukte entstehen die entsprechenden *syn*-Diastereomere. So liefert die Ringöffnung von (*R,R*)-Oxiran-2,3-dicarboxylat das *anti*-(*2R,3S*)-3-Azido-2-hydroxysuccinat, als Nebenprodukt entsteht *syn*-(*2R,3R*)-3-Azido-2-hydroxysuccinat. Bei Ringöffnung von (*S,S*)-Oxiran-2,3-dicarboxylat entsteht das *anti*-(*2S,3R*)-3-Azido-2-hydroxysuccinat und als Nebenprodukt *syn*-(*2S,3S*)-3-Azido-2-hydroxysuccinat.^[58] In der Literatur wurde das *syn*-konfigurierte Nebenprodukt bisher der Kontamination des Epoxids mit 2-Brom-3-hydroxysuccinat oder einer durch Azid-Austausch verursachten Epimerisierung zugeschrieben. Wie wir jedoch mit Hilfe einer NMR-Studie beweisen konnten (siehe Kapitel 3.1.2.1.2), wird die Epimerisierung zum *syn*-Azidoalkohol durch die Acidität des Protons am C-3 des Azidoalkohols verursacht.^[62] Die Epimerisierung der Azidoalkohole bei Ringöffnung der Oxirane findet unabhängig vom Lösungsmittel statt. Durch einen intra- oder intermolekularen Protonentransfer, bzw. durch Einwirkung einer Base wird an C-3 deprotoniert, es entsteht ein mesomeriestabilisiertes Carbanion. Dadurch geht die Chiralität verloren. Bei Reprotonierung entstehen die *anti*- und *syn*-Azidoalkohole (**V**) (siehe Schema 3-7). Die besten Ergebnisse bezüglich der Stereoselektivität lassen sich in wasserhaltigem Aceton (85%) oder Ethanol (80%) und bei Abwesenheit von NH_4Cl erzielen (siehe Tabelle 3-2).^[62]

Tabelle 3-2: Verhältnisse der *anti*-(2*R*,3*S*)- and *syn*-(2*R*,3*R*)-Azidoalkohole **V bei Ringöffnung von Oxiran-2,3-dicarboxylaten (IIm-Methyl und IIa-Ethyl).**

Epoxid	Solvens	Reaktionszeit ^a	anti / syn V
Protische Solventien + NH₄Cl (2–3 eq. NaN₃; 2-3 eq. NH₄Cl)			
IIm	MeOH	18 h	1 / 1 ^[58]
IIa	EtOH _{abs.}	18 h ^a	1 / 0.7
IIa	EtOH 98%	18 - 24 h ^a	1 / 0.4–1 ^d
IIa	DMSO 85%	20 h ^a	1 / 1.33
Aprotische Solventien + NH₄Cl (2 eq. NaN₃; 2 eq. NH₄Cl)			
IIa	DMF _{abs.}	20 h ^a	1 / 1.64
Protische oder wasserhaltige aprotische Solventien^c			
IIa	EtOH 80%	20 h ^a	1 / 0.26
IIa	EtOH 85%	20 h (60%) ^b	1 / 0.17
IIa	EtOH _{abs.}	20 h (10%) ^b	1 / 0.09
		0.25 h (13%) ^b	1 / 0.014
IIa	DMF 80%	1 h (43%) ^b	1 / 0.11
		24 h (100%) ^b	1 / 0.46
IIa	DMSO 80%	20 h ^a	1 / 1
IIa	DMSO 90%	17 h ^a	1 / 0.4
IIa	Aceton 85%	20 h ^a	1 / 0.2
Aprotische Solventien^c			
		0.25 h (2%) ^b	1 / 0
IIa	DMF _{abs.}	1 h (10%) ^b	1 / 0.1
		24 h (84%) ^b	1 / 1.5
IIa	DMSO _{abs.}	20 h ^a	1 / 2
IIa	Aceton _{abs.}	20 h	- / - ^e

^a Zeit für kompletten Umsatz des Epoxids; ^b % Umsatz des Epoxids zu Azidoalkohol; ^c 2 Eq. NaN₃ / wässrige Aufarbeitung; ^d 3 Reaktionen durchgeführt; ^e keine Reaktion; ^f berechnet anhand der Integration der NMR-Signale für die Azidoalkohol-Protonen 2-CH und 3-CH für *syn*- und *anti*-**V**, d bei 4.75 (*syn*-H-2), 4.64 (*anti*-H-2), 4.33 (*anti*-H-3), 4.21 (*syn*-H-3).

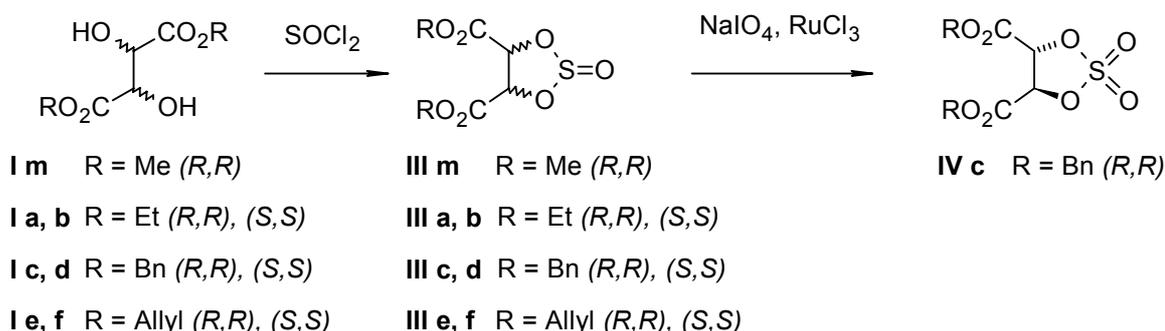
3.1.2.1.2 Addition an 1,3,2-Dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylate

Als Edukte der Azidoalkohole stellen die 2,5-Dioxathiolan-1-oxo-2,3-dicarboxylate eine Alternative zu Epoxiden dar. Die elektrophilen Eigenschaften dieser Heterocyclen entsprechen ungefähr denen von Oxiran-2,3-dicarboxylaten.^[63] Ihre Synthese verläuft in einem Schritt in quantitativen Ausbeuten ausgehend von Tartraten und beruht darauf, dass Thionylchlorid mit 1,2-Diolen cyclische Schwefligsäureester bildet. Zum Aufarbeiten dieser Reaktion genügt das Entfernen des restlichen SOCl_2 im Vakuum (siehe Schema 3-6).

Die Tartrate **Im**, **a**, **b** können käuflich erworben werden, die Tartrate **le-f** wurden über das Standard Verfahren (Veresterung unter Säure-Katalyse mit *p*TSS und Entfernen von Wasser durch azeotrope Destillation) aus Weinsäure und Allylalkohol synthetisiert.

Ic und **Id** wurden durch Veresterung der L- bzw. D-Weinsäure mit Benzylalkohol bei 200°C dargestellt und aus Diethylether/Cyclohexan umkristallisiert.^[64]

Schema 3-6: Darstellung der cyclischen Sulfite (III) bzw. Sulfate (IV) aus Tartraten (I).



Dioxathiolane reagieren mit nucleophilem NaN_3 in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion an einem Ring-Kohlenstoffatom unter Eliminierung von Schwefeldioxid zu den gewünschten *anti*-Azidoalkoholen.^[65-70]

Allerdings führen hier nur aprotische, absolute Lösungsmittel (DMF) und begrenzte Reaktionszeiten (etwa 12 Stunden, DC-Kontrolle) zu reinen *anti*-Diastereomeren (siehe Tabelle 3-3).^[62] Die Epimerisierung findet bei Einwirkung von Base durch intra- bzw. intermolekulare Deprotonierung am C-3 des Intermediats statt.^[62] Dies wurde auch durch Deuterium-Austausch des Protons am C-3 mit D_2O bzw. DCl bestätigt (siehe Tabelle 3-4 und Schema 3-7). In Abhängigkeit von Wassergehalt des Lösungsmittels und Reaktionszeiten entstehen durch Hydrolyse des cyclischen Sulfits auch wieder die entsprechenden Tartrate (siehe Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Verhältnisse der *anti*-(2*R*,3*S*)- and *syn*-(2*R*,3*R*)-Azidoalkohole (V) bei Ringöffnung von cyclischen Sulfiten (IIIa, c, f) und Sulfaten (IVc).

Cycl. Sulfit/Sulfat	Solvens	Reaktionszeit ^a	anti / syn ^g	V / I ^f
V				
Protische Solventien + NH₄Cl (2 eq. NaN₃; 2 eq. NH₄Cl)				
IIIa	DMSO 80%	18 h	1 / 0	1 / 0.6
Aprotische Solventien + NH₄Cl (2 eq. NaN₃; 2 eq. NH₄Cl)				
IIIa	DMF _{abs.}	18 h	1 / 0.43	1 / 0.16
Protische oder wasserhaltige aprotische Solventien^b				
IIIa	EtOH 80%	14 h	- / - ^c	0 / 1
IIIa	EtOH _{abs.}	14 h	1 / 0.8 ^d	1 / 0.26
IIIa	DMF 80%	14 h	1 / 0.63	1 / 0.34
IIIa	DMSO 96%	24 h	1 / 0 ^h	1 / 0.1
		48 h	1 / 0	1 / 0.1
IIIa	DMSO 80%	30 h	1 / 0	1 / 0.26
IIIa	DMSO 80%	3 h	1 / 0 ⁱ	1 / 0.29
III f	DMSO 80%	24 h	1 / 0	1 / 0.3
III c	Aceton 85%	12 h	1 / 0.4	1 / 0.4
III f	Aceton 85%	12 h	1 / 0.25 ^j	1 / 0.47
IV c	Aceton 85%	2 h	1 / 0	1 / 0
Aprotische Solventien^b				
IIIa	DMF _{abs.}	14 h	1 / 0–0.08 ^e	1 / 0–0.09 ^e
IIIa	DMSO _{abs.}	30 h	1 / 0.03	1 / 0.05
III f	DMSO _{abs.}	24 h	1 / 0.04	1 / 0.02
III c	DMF _{abs.}	12 h	1 / 0	1 / 0.09
III f	DMF _{abs.}	12 h	1 / 0.02 ^k	1 / 0 ^k
III f	Aceton _{abs.}	7 d	1 / 0.16	1 / 0

^a Zeit für kompletten Umsatz des Sulfits/ Sulfats; ^b 2 Eq. NaN₃ / wässrige Aufarbeitung; ^c 100% Tartrat (I); ^d 33% Umsatz des Sulfits IIIa; ^e 4 Reaktionen durchgeführt; ^f berechnet anhand der Integration der NMR-Signale für die Tartrat-Protonen, s bei 4.55 ppm, 2 H; ^g berechnet anhand der Integration der NMR-Signale für die Azidoalkohol-Protonen 2-CH und 3-CH für *syn*- and *anti*-6, d bei 4.75 (*syn*-H-2), 4.64 (*anti*-H-2), 4.33 (*anti*-H-3), 4.21 (*syn*-H-3); ^h 70% Umsatz des Sulfits IIIa; ⁱ 91% Umsatz des Sulfits IIIa; ^j 83% Umsatz des Sulfits III f; ^k 2 Reaktionen durchgeführt.

3.1.2.1.3 Addition an 1,3,2-Dioxathiolan-2,2-dioxo-4,5-dicarboxylate

Einen Zugang zu enantiomeren- und diastereomerenreinen *anti*-Azidoalkoholen bieten die cyclischen Schwefelsäureester (**IVc**).^[71] Diese können aus den entsprechenden 2,5-Dioxathiolan-1-oxo-2,3-dicarboxylaten durch Oxidation mit Natriumperodat und Ruthenium(III)chlorid in Acetonitril-Wasser-Gemischen dargestellt werden (siehe Schema 3-6). Der nucleophile Angriff mit Natriumazid in wässrigem Aceton führt rasch (1 Stunde) zu einem stabilen acyclischen Intermediat.^[71] Eine Epimerisierung kann hier nicht stattfinden, da das Intermediat aus der Lösung ausfällt und daher nicht mehr am C-3 deprotoniert werden kann. Nach saurer Hydrolyse mit Schwefelsäure erhält man enantiomeren- und diastereomerenreine *anti*-Azidoalkohole (siehe Schema 3-7).

Schema 3-7: Synthese der *anti*-(2*S*,3*R*)-Azidoalkohole **V, Mechanismus der Epimerisierung.**

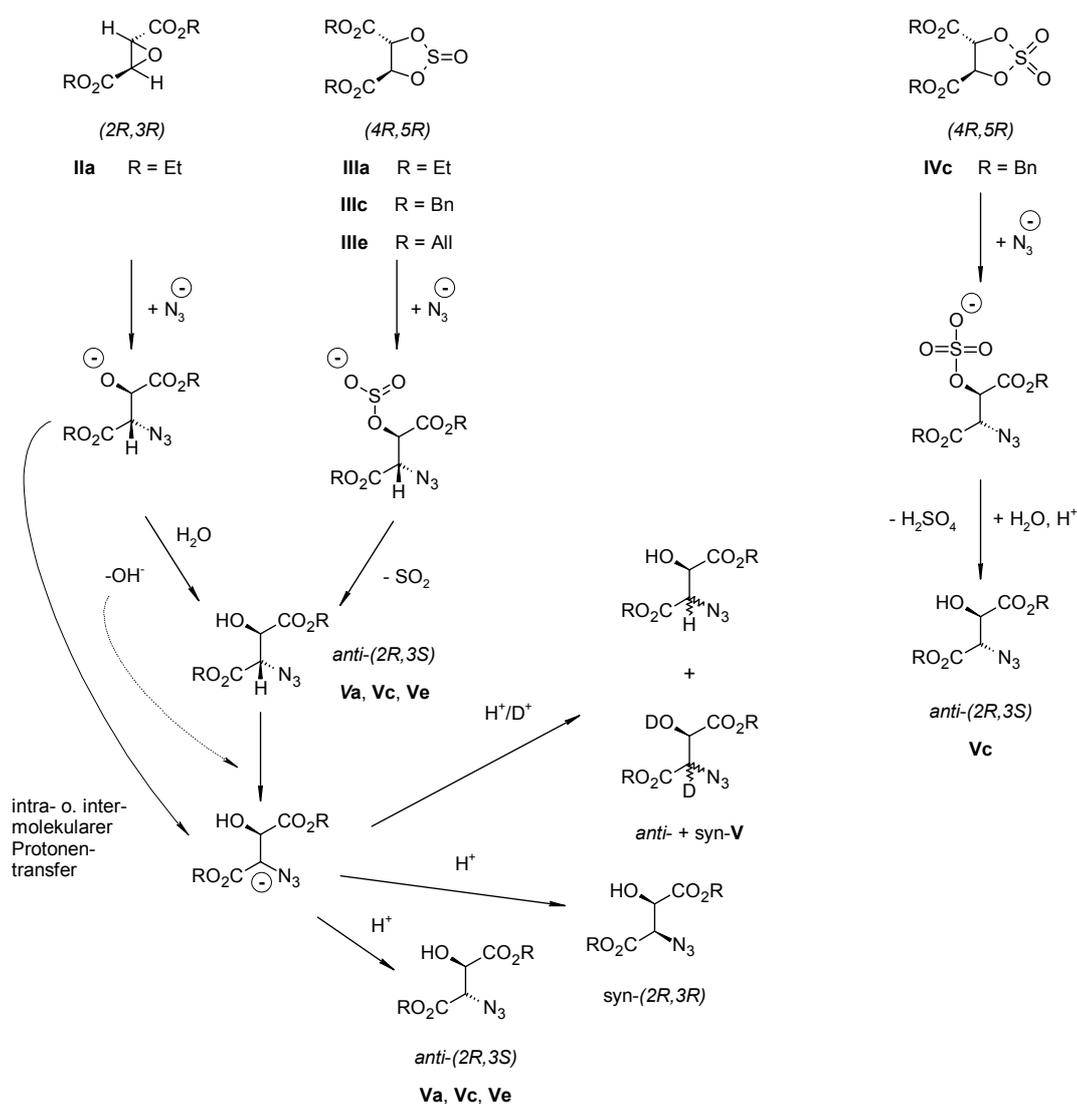


Tabelle 3-4: Verhältnisse der H-2 / H-3 Protonen des *anti*-(2*R*,3*S*)-Methyl-3-azido-2-hydroxysuccinats (Va) nach Reaktion des Epoxids (IIm) und des Sulfit (IIIm) in Solventien mit D₂O bzw. DCl.

Cycl. Sulfit	Solvens	Reaktionszeit ^c	anti / syn (V)	H-2 / H-3 ^e	(V) / (I) ^f	H → D ^g
IIIm	DMF _{abs.} /DCl ^a	19 h	1 / 0.16	1 / 0.89	1 / 0.6	11
IIIm	DMF/D ₂ O 80% ^b	19 h	1 / 0.9	1 / 0.92	1 / 0.36	8
		2 d	1 / 0.94	1 / 0.63	1 / 0.55	37
IIIm	DMSO/D ₂ O 80% ^b	19 h	1 / 0.1	1 / 0.98	1 / 0.1	2
IIIm	Aceton/D ₂ O 80% ^b	20 h	1 / 0.11	1 / 0.92	1 / 1	8
		120 h	1 / 0.28	1 / 0.8	1 / 0.8	20

Epoxi d	Solvens	Reaktionszeit ^c	anti / syn (V)	H-2 / H-3 ^e	H → D ^g
IIm	DMF _{abs.} /DCl ^a	18 h (28%) ^d	1/0.12	1/0.92	8
IIm	MeOD _{d4.} /DCl ^a	18 h (30%) ^d	1/0.12	1/0.85	15
IIm	DMF/D ₂ O 80%	19 h (100%) ^d	1/0.33	1/0.41	59
IIm	DMSO/D ₂ O 80%	19 h (90%) ^d	1/0.25	1/0.55	45
IIm	Aceton/D ₂ O 80%	19 h (88%) ^d	1/0.09	1/0.82	18

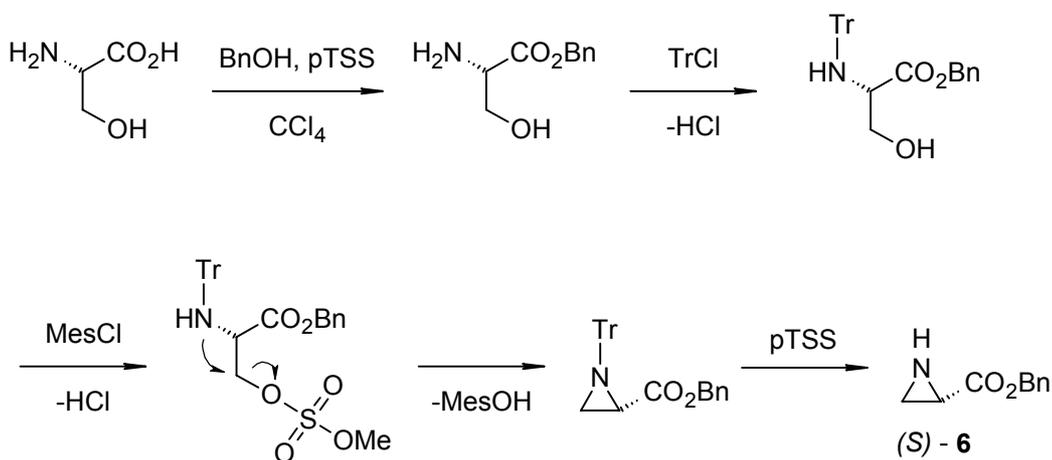
^a 2 Eq. NaN₃, 2 Eq. DCl in D₂O; ^b 2 Eq. NaN₃, wässrige Aufarbeitung, ^c Zeit für kompletten Umsatz des Epoxids; ^d % Umsatz des Epoxids zu Azidoalkohol; ^e berechnet anhand der Integration der NMR-Signale für die Azidoalkohol-Protonen 2-CH und 3-CH für *syn*- und *anti*-V, d bei 4.75 (*syn*-H-2), 4.64 (*anti*-H-2), 4.33 (*anti*-H-3), 4.21 (*syn*-H-3). ^f berechnet anhand der Integration der NMR-Signale für die Tartrat-Protonen, s bei 4.55 ppm, 2 H; ^g % Deuterium-Austausch

3.2 Nicht-proteinogene cyclische Aminosäuren

3.2.1 Synthese des (S)-Benzylaziridin-2-carboxylats

Eine stereoselektive Synthese ausgehend von einem 1,2-Aminoalkohol wurde zur Darstellung der (S)-Aziridin-2-carbonsäure angewandt. (S)-Serin wird erst in Tetrachlorkohlenstoff mit Benzylalkohol unter Katalyse mit *p*-Toluolsulfonsäure (*p*TSS) zum Benzylester umgesetzt.^[72] Der Stickstoff wird anschließend mit Tritylchlorid geschützt und die freie Hydroxyl-Gruppe des Serins mit Methansulfonsäurechlorid zum Methansulfonat derivatisiert.^[73] Durch nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares der Aminogruppe am C-1 cyclisiert das Intermediat intramolekular (unter gleichzeitiger Abspaltung des Methansulfonats) zum Aziridin. Aziridin-2-carboxylate mit freiem Stickstoff unterliegen sehr leicht saurer Hydrolyse.^[74] Aus diesem Grund erfolgt die chromatographische Isolierung des Produktes vor der Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe. Diese wird zum Schluss mit *p*TSS in Chloroform abgespalten und die Lösung anschließend mit 10%iger Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Das Benzylaziridin-2-carboxylat (**6**) wird mit Chloroform extrahiert. Die Gesamtausbeute beträgt 52%, Korn *et al.* geben 57% an.^[74] Benzylaziridin-2-carboxylat wurde anschließend zur Darstellung der Dipeptide BOC-(S)-Leu-(S)-AzyOH **116** und BOC-(*R*)-Leu-(S)-AzyOH **216** verwendet.

Schema 3-8: Synthese des (S)-Benzylaziridin-2-carboxylats.

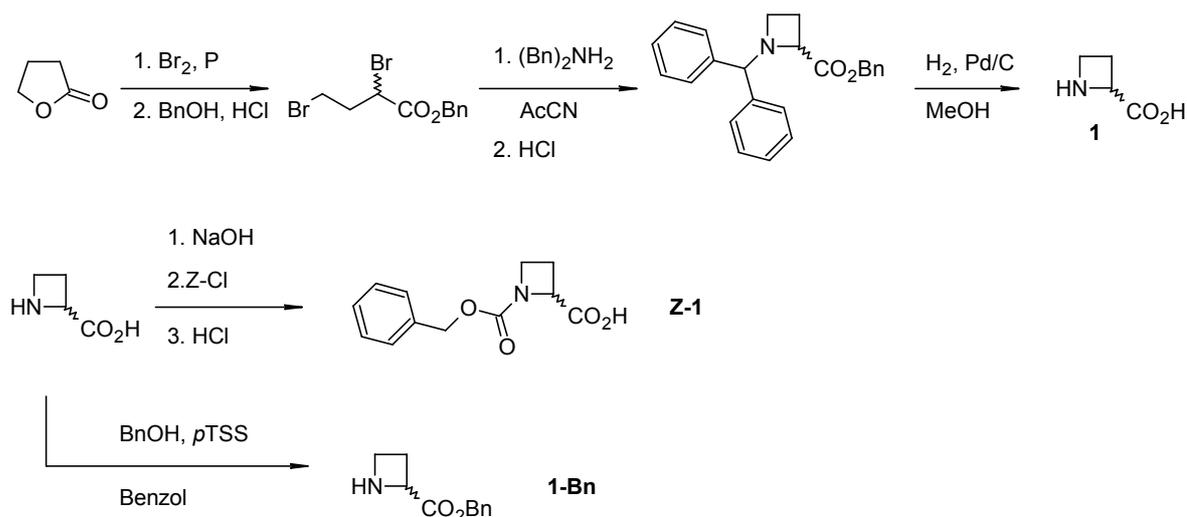


3.2.2 Synthese der (*R+S*)-Azetidin-2-carbonsäure

Für die Darstellung der Azetidin-2-carbonsäure wurde ein Syntheseweg gewählt, der zum Racemat führt.^[75] Die (*S*)-Azetidincarbonsäure ist ein Naturstoff und kann aus *Convalaria majalis* isoliert werden.^[76] Die Synthese des Racemates geht von γ -Butyrolacton aus. Dieses wird durch Bromierung mit Brom unter Katalyse von rotem Phosphor zur α,γ -Dibrombuttersäure geöffnet. Veresterung mit HCl-gesättigtem Benzylalkohol und anschließende Destillation führt zu Benzyl- α,γ -dibrombutyrat. Der Dibromester wird anschließend mit Benzhydramin in Acetonitril unter Rückfluss 12 Stunden erhitzt. Nach chromatographischer Reinigung wird das 1-Benzhydryl-2-carbobenzyloxyazetidin in Methanol mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse zur Azetidin-2-carbonsäure (**1**) hydrogenolysiert. Die Ausbeute beträgt 71%. Eine Dimerisierung zum Piperazin-Derivat, aus der Literatur für den Methylester bekannt,^[77] findet im Falle des Benzylesters auch in Lösung über einen längeren Zeitraum nicht statt.

Für die Acylierung der Aziridin-2,3-dicarboxylate wird die Azetidin-2-carbonsäure mit Benzylchloroformiat in wässrig-basischem Milieu am Stickstoff zum *Z*-(*R+S*)-Azet-OH (**Z-1**) geschützt (Ausbeute 82%). Der Benzylester, hergestellt durch Veresterung mit 1 Eq. Benzylalkohol und 1.1 Eq. *p*-Toluolsulfonsäure in Benzol (Ausbeute 88%, isoliert als *p*TSS-Salz **1-Bn**), wird hingegen zusammen mit *S*-BOC-Leucin zur Darstellung des Dipeptids **131** BOC-(*S*)-Leu-(*R+S*)-Azet-OH verwendet.

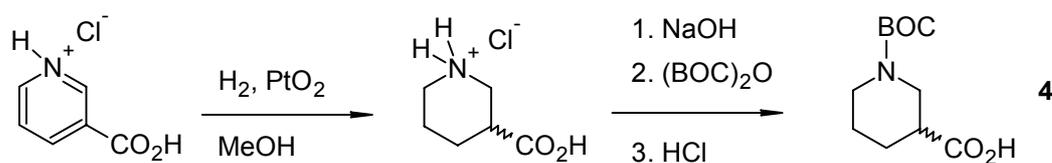
Schema 3-9: Synthese der Azetidin-2-carbonsäure (**1**) und der Derivate **Z-1**, **1-Bn**.



3.2.3 Synthese der *N*-*tert*-Butyloxycarbonylnipecotinsäure

Nicotinsäure kann in HCl-saurer Lösung mit Wasserstoff über Platinoxid als Katalysator zu Nipecotinsäure hydriert werden. Nach 48 Stunden unter 4 bar Wasserstoff werden zum Reaktionsgemisch 1.1 Eq. Natriumhydroxid zugegeben, anschließend wird nach Zugabe von Di-*tert*butyldicarbonat (1.1 Eq.) 12 Stunden bei RT gerührt. Nach Ansäuern der Lösung wird das reine Produkt mit Ethylacetat in einer Gesamtausbeute von 78% extrahiert

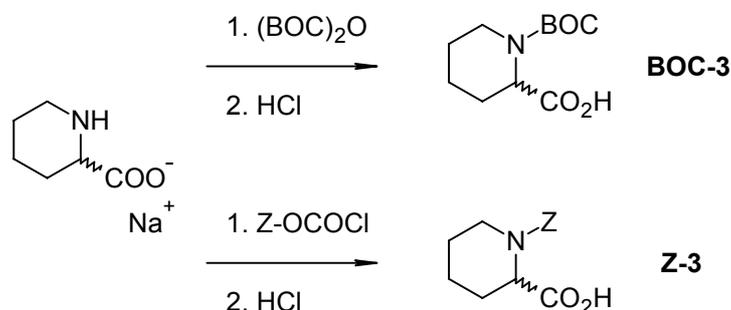
Schema 3-10: Synthese der BOC-Nipecotinsäure (4).



3.2.4 Synthese der *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- und Benzyloxycarbonyl-pipecolinsäure

Zur Darstellung der BOC-geschützten D,L-Pipecolinsäure wurde racemische Pipecolinsäure eingesetzt. Das Schützen des Stickstoffs zum BOC-Derivat **BOC-3** wurde wie bei Nipecotinsäure in wässrig-basischem Milieu mit Di-*tert*butyldicarbonat (siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Isoliert wurden insgesamt 63% BOC-D,L-Pipecolinsäure.

Schema 3-11: Synthese der BOC- und Z-Pipecolinsäure (BOC-3, Z-3).



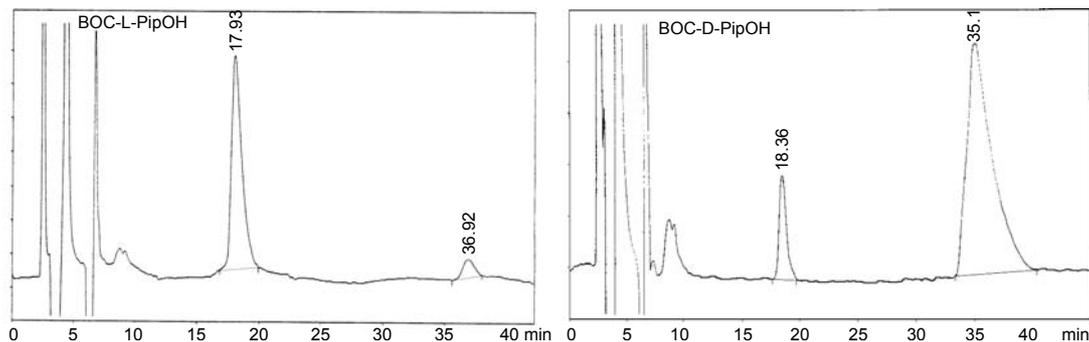
Die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde mit Benzylchloroformiat eingeführt. Zu einer wässrigen Lösung des Natriumpipecolats wurden tropfenweise 1 Eq. Benzylchloroformiat und 1 Eq. NaOH aus zwei separaten Tropftrichtern langsam bei

0°C zugetropft. Nach 1 Stunde wurde das Gemisch erst mit Diethylether extrahiert, um evtl. entstandenen Benzylalkohol zu entfernen. Nach Ansäuern wurde anschließend das reine Produkt **Z-3** in einer Ausbeute von 58% mit Ethylacetat extrahiert.

Die BOC-D,L-Pipecolinsäure stellt ein sehr rigides System dar, das schon bei Raumtemperatur Rotamere bildet. Die energetische Barriere der freien Rotation wurde anhand der NMR-Daten berechnet (siehe Kapitel 3.5).

Es wurden auch BOC-D-Pipecolinsäure und BOC-L-Pipecolinsäure als „reine“ Enantiomere käuflich erworben. Eine chromatographische Analyse (Abbildung 6) mit einer chiralen HPLC-Säule (Chirobiotic T, 250 x 4.6 mm, 5 µm; Fluss 0.5 ml, Isopropanol:Wasser 60:40) ergab jedoch, dass das L-Enantiomer mit 4% D- und das D-Enantiomer sogar mit 12% L-Isomer kontaminiert ist.

Abbildung 6: Chromatographische Analyse der „enantiomerenreinen“ BOC-L- und D-Pipecolinsäure.

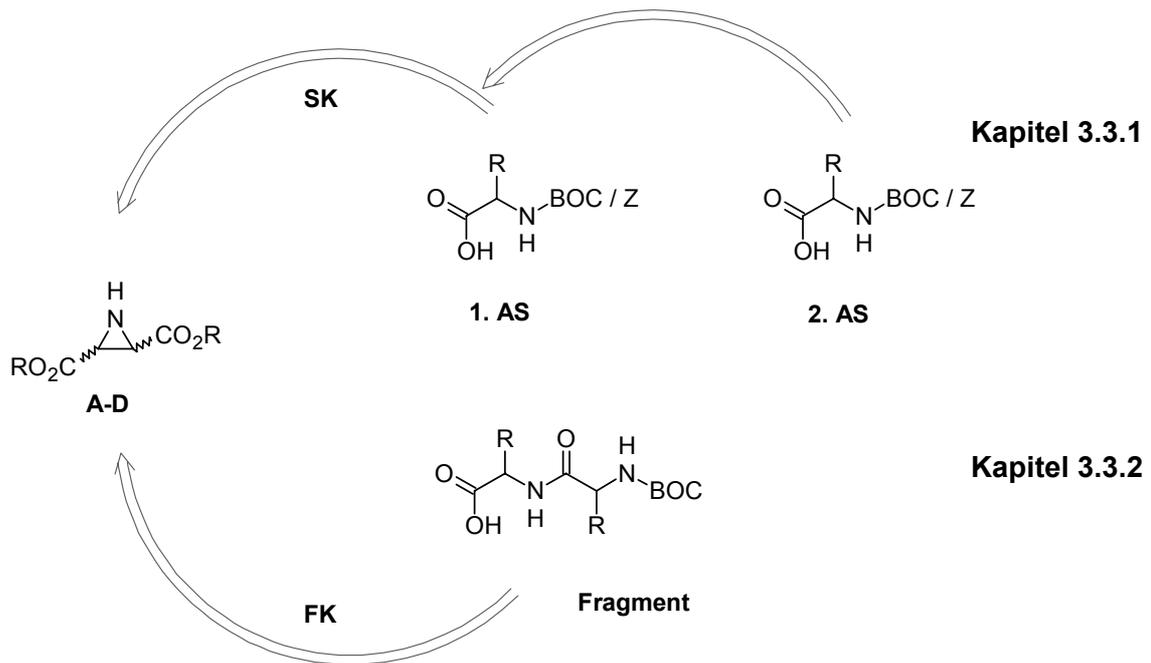


3.3 Acylierung des Aziridin-Stickstoffs

Die Aziridin-2,3-dicarboxylate sollten durch Acylierung am Aziridin-Stickstoff zu Tripeptiden umgesetzt werden. Im Vergleich zu anderen, acyclischen α -Aminosäuren besitzt der Stickstoff der Aziridin-2,3-dicarboxylate eine geringere Reaktivität. Grund für diese geringe Reaktivität und somit auch für die eingeschränkten Möglichkeiten der Derivatisierung an dieser Stelle ist die geringe Nucleophilie des Aziridin-Stickstoffs. Diese wird durch die besonderen geometrischen Eigenschaften und die damit verbundene Elektronenverteilung des Aziridinrings verursacht.^[78] Dieser Effekt wird bei Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit elektronenziehenden Carboxyl-Gruppen an C-2 und C-3 noch verstärkt. X-Ray-Daten von Aziridin-2,3-dicarboxamiden bestätigen, dass die Länge der C-C -Bindung (1.495 Å) kürzer ist, als die in entsprechenden aliphatischen C-C -Bindung (1.54 Å). Die C-N -Bindungslängen (1.46 Å) sind ungefähr vergleichbar.^[79] Die Verzerrung der Bindungswinkel im Aziridinring auf ca. 60° (gegenüber 109.5° bei sp^3 -Hybridisierung) induziert einen höheren p-Anteil in den Ringbindungen.^[78] Das freie Elektronenpaar am Stickstoff tritt mit ihnen in Wechselwirkung. Mittels Photo-Elektronen-Spektroskopie wurde die Basizität (pK-Werte 7.17-9.73) in Lösung und in der Gasphase bei Aziridin und *N*-Methylaziridin ermittelt. Im Vergleich zu größeren Aza-Heterocyclen ist diese wesentlich geringer.^[78] Dies ist ein weiterer indirekter Hinweis auf den partiellen sp^2 -Charakter des Elektronenpaars.

Prinzipiell ist die Verknüpfung des Aziridin-Bausteins mit Dipeptiden auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Zum einen können *N*-geschützte Dipeptide in einer Segmentkopplung mit dem Aziridin-Stickstoff verbunden werden (Fragmentkopplung, FK) (Kapitel 3.3.2), zum anderen können die Aminosäuren sukzessive, einzeln angeknüpft werden (sukzessive Kopplung, SK) (Kapitel 3.3.1).

Schema 3-12: Acylierung des Aziridin-Stickstoffes.



Aufgrund der geringen Reaktivität des Aziridin-Stickstoffs kommen von den verschiedenen Acylierungs- bzw. Peptidkopplungsmethoden nur einige wenige in Frage. So schlagen z.B. die direkte Kupplung mit DCC+HOBT, die Kupplung über Aktivester mit HOSuc^[48] und über unsymmetrische Anhydride mit IIDQ fehl.

Es führen nur Methoden, die hochreaktive Aminosäure- oder Peptidzwischenstufen zur Acylierung verwenden, zum Erfolg. So liefern nur die vier nachfolgend beschriebenen Methoden (siehe Schema 3-13 bis Schema 3-16) akzeptable Ausbeuten bei der Acylierung von Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit *N*-geschützten Aminosäuren oder Dipeptiden (siehe Tabelle 3-5).

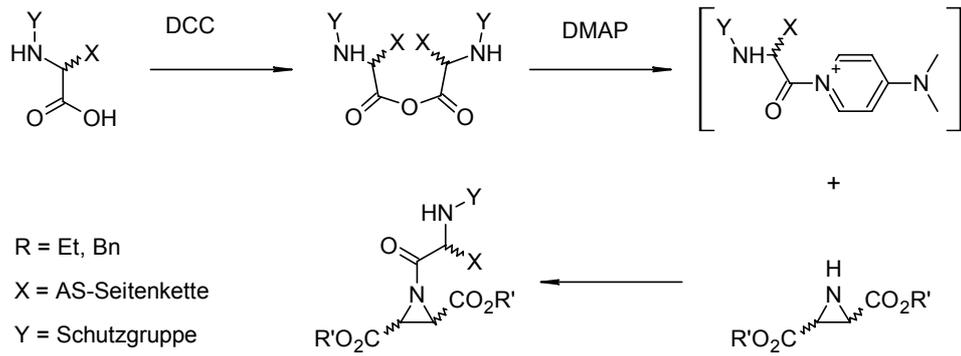
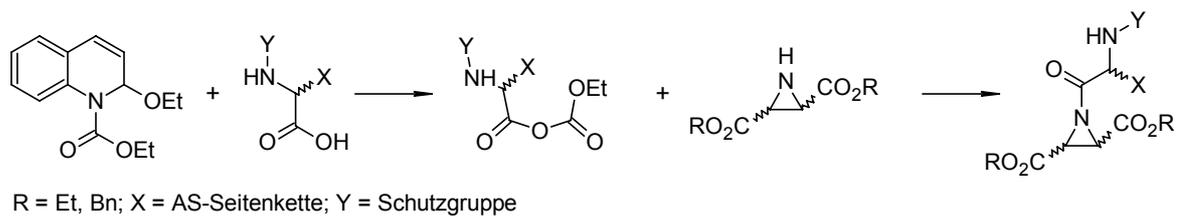
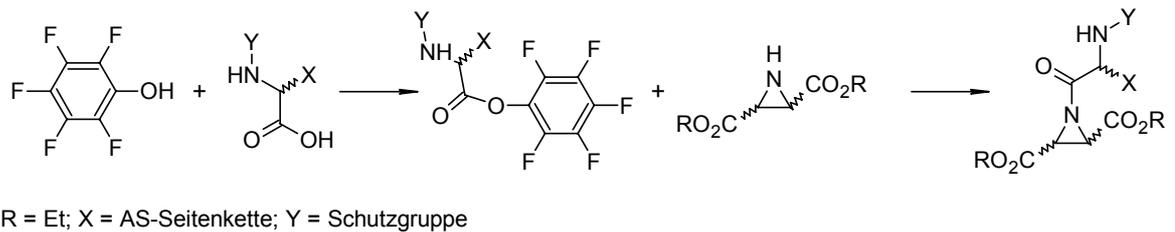
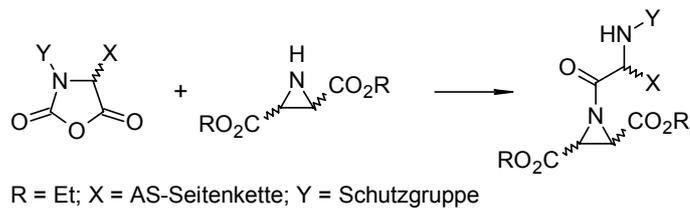
Schema 3-13: Kupplung über symmetrische Anhydride.**Schema 3-14: Kupplung über unsymmetrische Anhydride.****Schema 3-15: Kupplung mit aktiven Pentafluorophenylestern.****Schema 3-16: Kupplung mit N-geschützten N-Carboxyanhydriden (UNCAs).**

Tabelle 3-5: Übersicht der Ausbeuten für verschiedene Kupplungsmethoden.

Methode	Aktivierungsreagenz	Ausbeuten	Lit.
Symmetrische Anhydride	DCC, DIC, EDC·HCl	>90%	[49], Eigene Arbeiten
	<i>i</i> -Butylchloroformiat	70% (Epimerisierung!)	[80]
Unsymmetrische Anhydride	EEDQ	30-60%	[49], Eigene Arbeiten
	IIDQ	0% (85% <i>i</i> -Butylester des Dipeptids!)	Eigene Arbeiten
Pentafluorphenylester	DCC, PFPOH	40%	[48]
UNCAs	-	40%	[48]

3.3.1 Synthese der Aziridinyl-Tripeptide über sukzessive Kupplung (SK)

3.3.1.1 Synthese der Aziridinyl-Dipeptide

Für die Acylierung der Aziridin-2,3-dicarboxylate mit einzelnen Aminosäuren wurde das Verfahren über die symmetrischen Anhydride eingesetzt.

Die symmetrischen Anhydride werden aus zwei Äquivalenten Aminosäure und einem Äq. Carbodiimid (Dicyclohexyl- oder Diisopropyl-) dargestellt. Das entstandene Nebenprodukt, der entsprechende Harnstoff, wird abfiltriert und das Anhydrid wird sofort weiter umgesetzt.

Tabelle 3-6: Aziridinyl-Dipeptide, synthetisiert über die Methode der symmetrischen Anhydride.

Nr.	Aminosäure	Dipeptid
031B	BOC-(<i>R+S</i>)-Azet-OH	Z-(<i>R+S</i>)-Azet-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂
012A	BOC-(<i>S</i>)-Pro-OH	BOC-(<i>S</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂
012B		BOC-(<i>S</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂
013A	BOC-(<i>R+S</i>)-Pip-OH	BOC-(<i>S</i>)-Pip-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂ *
023A		BOC-(<i>R</i>)-Pip-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂ *
013B		BOC-(<i>S</i>)-Pip-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂ *
023B		BOC-(<i>R</i>)-Pip-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂ *
Z-013B	Z-(<i>R+S</i>)-Pip-OH*	Z-(<i>S</i>)-Pip-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂ *
Z-023B		Z-(<i>R</i>)-Pip-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂ *
034A	BOC-(<i>R+S</i>)-Nip-OH	BOC-(<i>R+S</i>)-Nip-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂
034B	BOC-(<i>R+S</i>)-Nip-OH	BOC-(<i>R+S</i>)-Nip-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂
005A	BOC-Ini-OH	BOC-Ini-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂
005B		BOC-Ini-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂
600B	Z-(<i>S</i>)-Leu	Z-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂

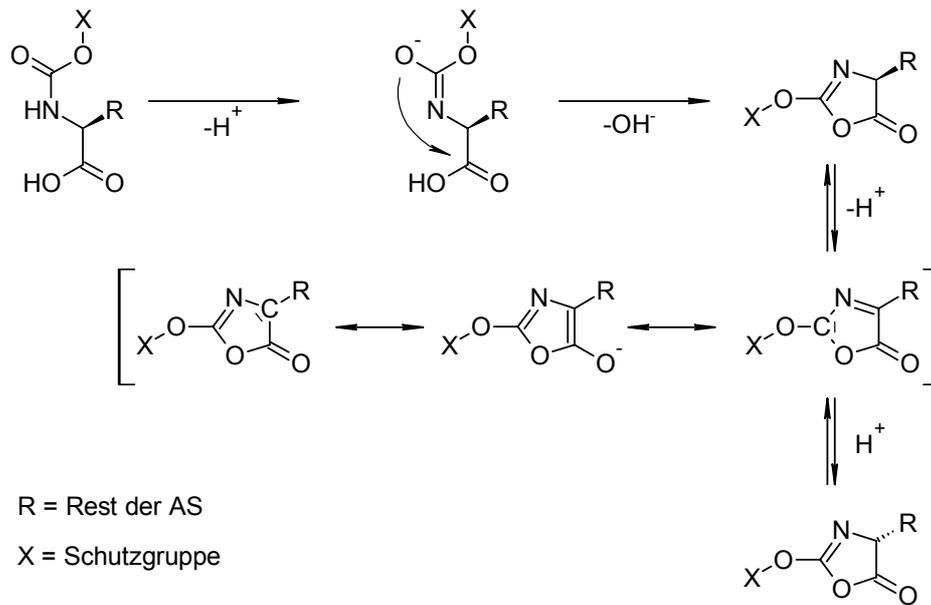
Azet = Azetidin-2-carbonsäure, Pip = Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure), Nip = Nipecotinsäure (Piperidin-3-carbonsäure), Ini = Isonipecotinsäure (Piperidin-4-carbonsäure),

* Trennung der Diastereomere durch SC, siehe Kapitel 3.3.1.3

Einziger Nachteil dieser Syntheseroute ist der Verlust von einem Equivalent der Aminosäure, da nur eine Hälfte des Anhydrids bei der Aminolyse mit dem Aziridin-Stickstoff reagieren kann. Die Acylierung verläuft unter DMAP-Katalyse (*p*-Dimethylaminopyridin) schnell (3 Stunden) und in hohen Ausbeuten (ca. 90%). DMAP erwies sich in diesem Fall als essentieller Katalysator. Wurde es jedoch equimolar eingesetzt, entsteht bei β - und γ - Aminosäure-Derivaten neben acyliertem Aziridin auch 10 % Enamin.

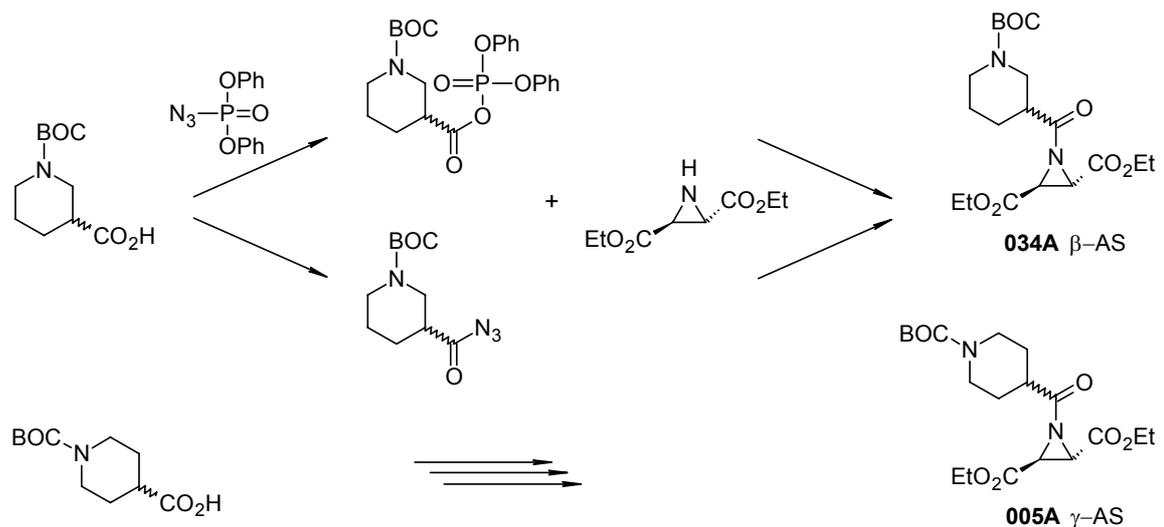
In der Literatur wird als weiterer Nachteil die große Racemisierungstendenz genannt.^[81] Dies hat sich jedoch bei den in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Dipeptiden nicht bestätigt. Die eventuell durch die Acylierung von enantiomerenreinem Aziridin

entstehenden Diastereomere müssten in den NMR-Spektren zu einem doppelten Signalsatz führen. Dies wurde jedoch bei keiner der synthetisierten Verbindungen beobachtet. Die Ursache hierfür ist höchst wahrscheinlich die kurze Reaktionszeit und auch der Mechanismus der Racemisierung. Drei verschiedene Mechanismen, verbunden mit Protonenabspaltung unter Basen-Katalyse, werden in der Literatur postuliert.^[81] Die direkte Abspaltung des α -Protons, reversible β -Eliminierung und die Bildung der Azlactone. Die Abspaltung des α -Protons kommt nur in sehr speziellen Fällen wie z.B. beim Phenylglycin vor, in denen das α -Proton durch den Phenyl-Ring acider wird. Reversible β -Eliminierung kann zur Racemisierung von Aminosäuren, die in β -Position mit einer stark elektronenziehenden Gruppe (β -Cyanoalanin) substituiert sind, führen. Häufigste und bestens studierte Ursache für Racemisierung ist die Bildung der Azlactone. Unter Baseneinwirkung wird über ein resonanzstabilisiertes Carbanion ein Proton am chiralen Kohlenstoff abstrahiert. Es wurde lange geglaubt, dass Aminosäuren mit Urethan-Schutzgruppe gegen Racemisierung stabil sind, bis ein chirales Azlacton aus BOC-Valin isoliert werden konnte. Dies deutet auf einen destabilisierenden Einfluss der Urethan-Schutzgruppe auf die Bildung des zur Racemisierung führenden Carbanions hin, wodurch die Deprotonierung verhindert wird. Die chirale Stabilität des Prolins und anderer cyclischer Aminosäuren, die sekundäre Amine darstellen, wurde bisher als Folge eines fehlenden Amid-Wasserstoffs erklärt. Es gibt jedoch die theoretische Möglichkeit, dass ein protoniertes Azlacton (Oxazolonium-Salz) gebildet werden kann, was später bei *N*-Methyl-Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. Cyclische Aminosäuren haben daher ihre Racemisierungsbeständigkeit vor allem ihrer Rigidität zu verdanken.^[81]

Schema 3-17: Racemisierung über Azlactone [5-(4H)-Oxazolone].

Als ein weiteres Verfahren zur Darstellung der Dipeptide eignet sich bedingt die DPPA-Kupplung. Der Mechanismus, wie die Aminosäuren aktiviert werden, ist nicht vollständig geklärt. Es sind zwei Wege denkbar, die auch in der Literatur beschrieben sind:^[81]

- ◆ Bildung eines Phosphorsäureanhydrids
- ◆ Bildung eines Aminosäureazids

Schema 3-18: Aktivierung und Kupplung mit DPPA.

Diese Methode führte ausschließlich bei den β - und γ -Aminosäuren Nipecotinsäure bzw. Isonipecotinsäure zu den gewünschten Produkten. Das spricht für den sterisch

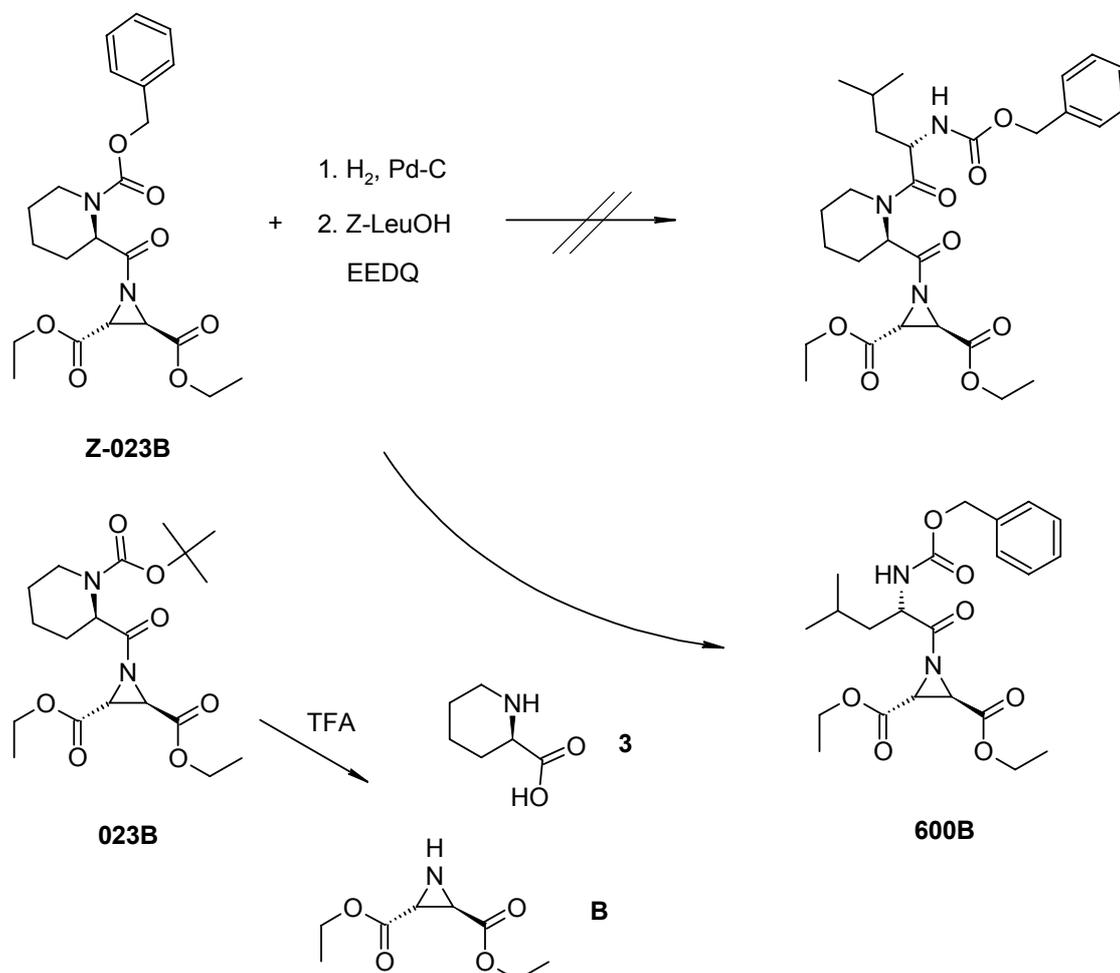
anspruchsvolleren Weg über ein Diphenylphosphorsäureanhydrid. Die Ausbeuten betragen 40-50%. Versuche mit BOC-Prolin oder BOC-Pipecolinsäure schlugen fehl. Aus diesem Grund ist höchst wahrscheinlich auch die Amidierung einer Carbonsäurefunktion des Aziridin-2,3-dicarboxylats mit α -Aminosäuren mit Hilfe der DPPA-Methode möglich, ohne dass der Stickstoff dabei geschützt werden muss. Hierzu trägt auch die höhere Nucleophilie der Aminogruppe in Aminosäuren gegenüber dem Ring-Stickstoff des Aziridins bei (siehe auch Schema 3-26).

3.3.1.2 Synthese der Aziridinyl-Tripeptide aus Aziridinyl-Dipeptiden

Nach Abspalten der *N*-Schutzgruppe von der 1. Aminosäure mit TFA bzw. Wasserstoff über Palladium/Kohle wurde anschließend mit DPPA die 2. Aminosäure BOC-LeuOH bei 0°C eingeführt. Die Ausbeuten betragen 60-70%. Die auf diesem Wege synthetisierten Aziridinyl-Tripeptide sind in Tabelle 3-9 (Kapitel 3.3.2.2) zusammengefasst.

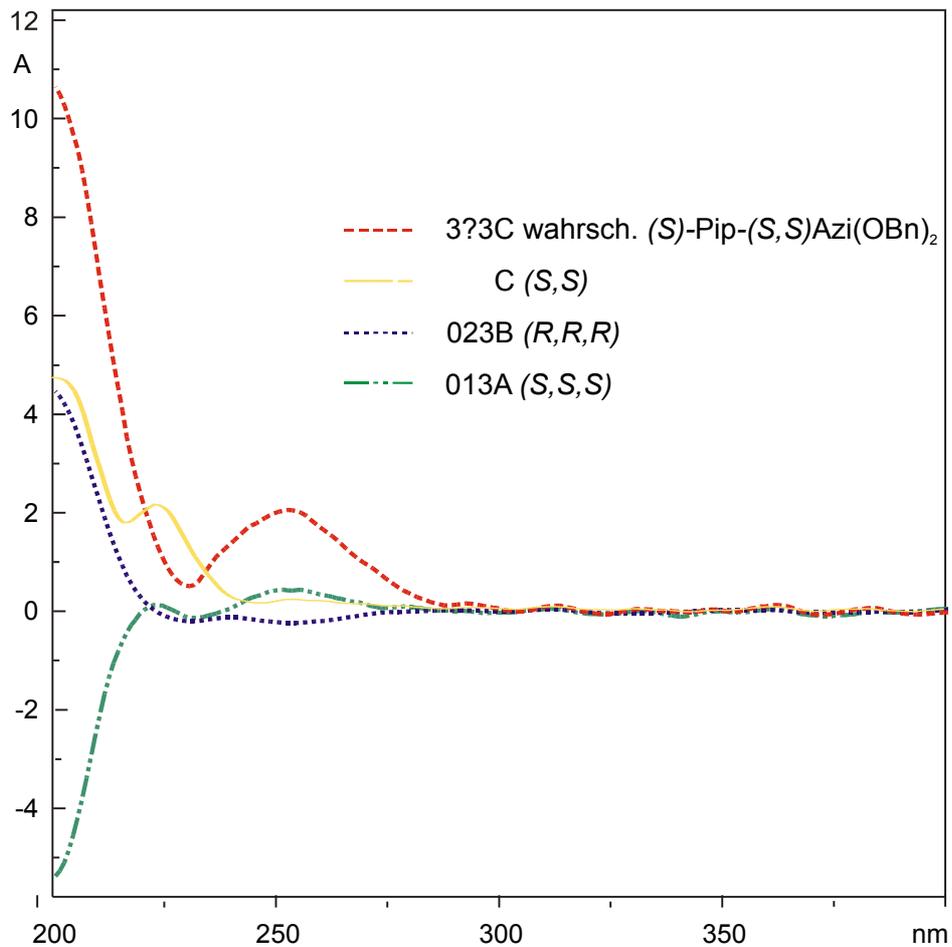
Auch die synthetisierten Pipecolinsäure-haltigen Dipeptide **013A**, **013B** und **023A**, **023B** waren ursprünglich nach Abspalten der Schutzgruppe für die weitere Umsetzung mit BOC- bzw. Z-Leucin gedacht. Dieses gelingt jedoch bei diesen Derivaten nicht. Während der BOC-Abspaltung mit TFA löste sich neben der Carbamat-Bindung der Schutzgruppe auch die Amid-Bindung am Aziridinring quantitativ. Aus diesem Grund wurde ein Z-geschütztes Dipeptid synthetisiert (**Z-023B** Z-(*R*)-Pip-(*S,S*)-Azi(OEt)₂), bei dem eine schonendere, hydrogenolytische Abspaltung der Z-Gruppe möglich ist. Doch auch hier konnten nur 60% des entschützten Dipeptids erhalten werden. Dieses wurde dann sofort weiter mit Z-Leucin und EEDQ umgesetzt. Das einzige Produkt dieses Syntheseweges, Z-(*S*)-Leu-(*R,R*)-Azi(OEt)₂ **600B** lässt vermuten, dass das ursprüngliche am Stickstoff entschützte Dipeptid instabil ist und zu freiem Aziridin-2,3-dicarboxylat zerfällt, welches dann mit dem gemischten Anhydrid des Z-Leucins reagiert (siehe Schema 3-19). Es wurde weiterhin versucht, den Aziridin-Stickstoff mit den Dipeptiden BOC-(*S*)-Leu-(*R+S*)-PipOH (**133**), BOC-(*R*)-Leu-(*R+S*)-PipOH (**233**) und BOC-Gly-(*R+S*)-PipOH (**333**) (Tabelle 3-7) direkt in einer Fragmentkupplung zu acylieren. Mit BOC-Leu-PipOH (**133**, **233**) konnte jedoch kein Aziridinyl-Tripeptid isoliert werden.

Schema 3-19: Versuche zur Darstellung von Aziridinyl-Tripeptiden mit Pipecolinsäure-Baustein.



Die Reaktion mit racemischem BOC-Gly-PipOH (**333**) lieferte dagegen diastereoselektiv nur ein Tripeptid **3?3C** (BOC-Gly-(?)-Pip-(S,S)-Azi(OBn)₂) in einer Ausbeute von 34% (Abbildung 8). Dass die Reaktion mit **133** bzw. **233** nicht abläuft, lässt sich somit durch eine sterische Barriere durch die Pipecolinsäure erklären. Das andere Diastereomer der Reaktion mit **333** konnte nicht detektiert werden (siehe Abbildung 8). Anhand der erhaltenen Ausbeuten bei den Synthesen der diastereomeren Verbindungen **013A**, **013B** und **023A**, **023B** vermuteten wir, dass es sich bei der isolierten Verbindung **3?3C** um das Diastereomer BOC-Gly-(S)-Pip-(S,S)-Azi-(OBn)₂ **313C** handelt, da die Ausbeuten an den homochiralen *S,S,S*-**013A** und *R,R,R*-**023B** Diastereomeren (59%) jeweils etwa zwei mal so hoch waren wie die der zu diesen Dipeptiden diastereomeren Verbindungen *R,S,S*-**023A** und *S,R,R*-**013B** (26%). Weitere Hinweise, dass es sich bei **3?3C** um das *S,S,S*-Diastereomer **313C** handelt, liefern CD-spektroskopische Untersuchungen (Abbildung 7).

Abbildung 7: CD-Spektren der Verbindungen 013A, 023B, 3?3C und C.

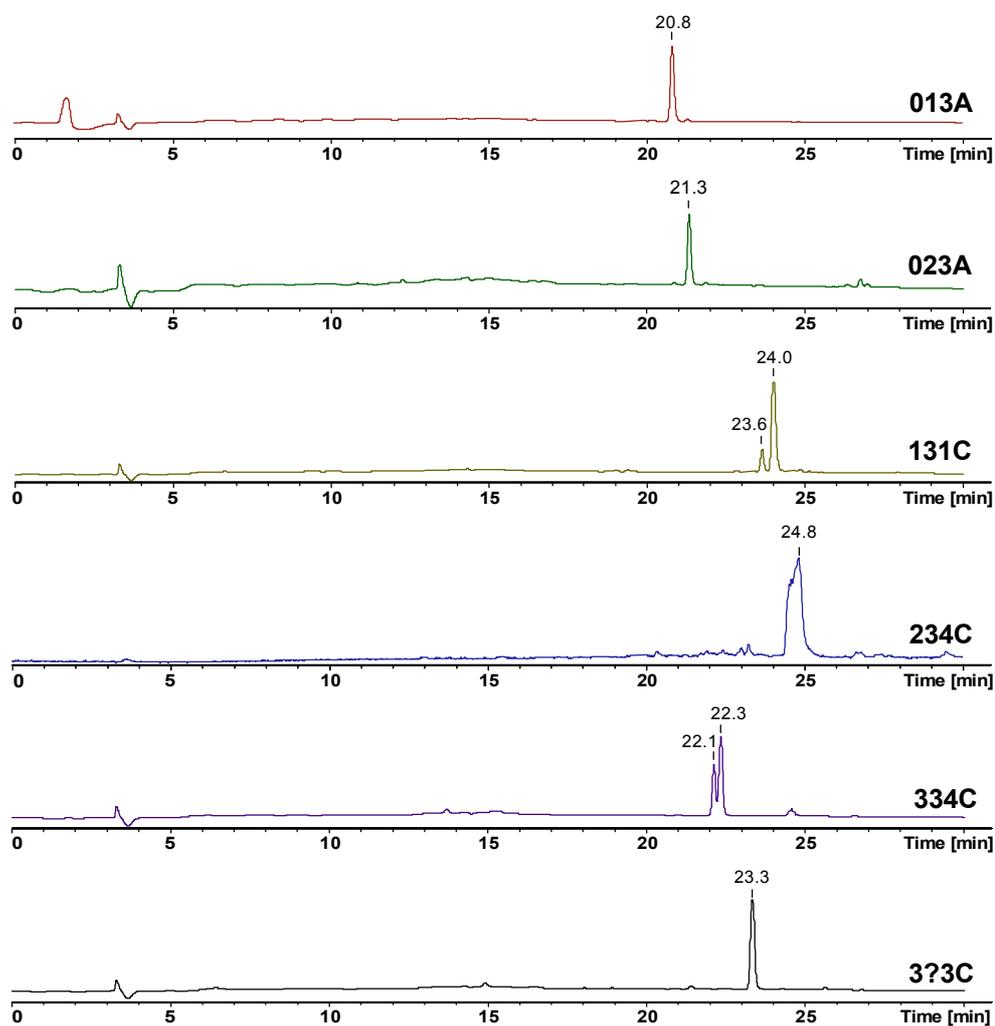


3.3.1.3 Diastereomeren-Trennung

Bei den mit BOC-Pipecolinsäure acylierten Aziridindicarboxylaten **013A**, **023A**, **013B** und **023B** gelang jeweils die präparative Trennung der zwei durch Acylierung von (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylaten mit racemischem BOC-PipOH gebildeten Diastereomeren mit Hilfe der Säulenchromatographie an Kieselgel 60, unter Elution mit einem Petrolether:Diethylether-Gemisch 3:1 (v/v). Auch die Tripeptid-Diastereomere **112C** und **112D** konnten durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 getrennt werden.

Die Trennung der Diastereomergemische **031B**, **131B**, **034A**, **034B**, **134A**, **134B**, **131C**, **134C**, **234C** und **334C** (siehe Abbildung 8) war jedoch nur im analytischen Maßstab mittels HPLC auf einer Agilent Zorbax RP C-18 Säule (4,6 x 150mm), Gradient 10% auf 100% MeCN über 30 min, UV-Detektion bei 215 nm, erfolgreich. Eine Trennung auf einer semipräparativen HPLC-Säule oder im präparativen Maßstab gelang bisher nicht.

Abbildung 8: Beispiele für HPLC-Chromatogramme von reinen Diastereomeren (013A, 023A, 3?3C) und Diastereomergemischen (131C, 234C, 334C).

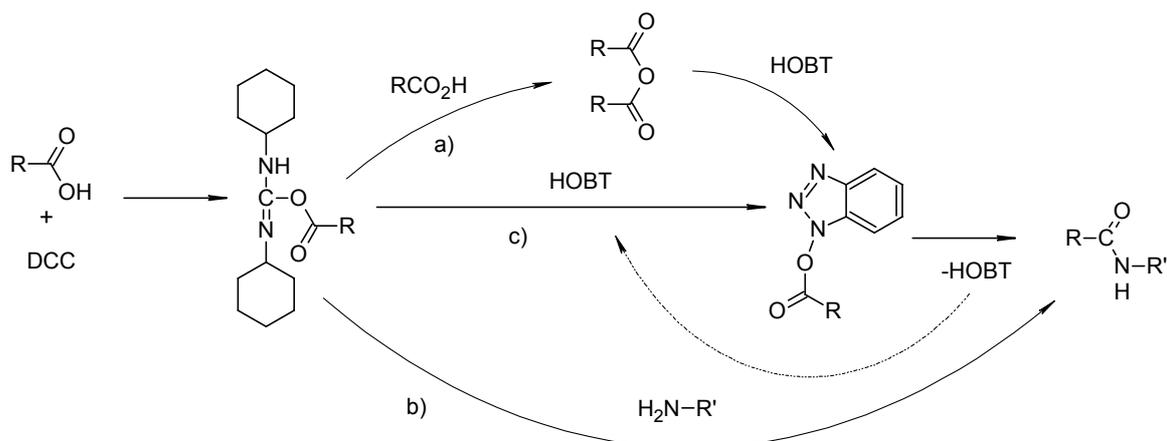


3.3.2 Synthese der Aziridinyl-Tripeptide über Fragment-Kupplung (FK)

3.3.2.1 Darstellung der Dipeptid-Fragmente BOC-Leu-/Gly-Xxx (Xxx = cyclische Aminosäure)

Die für die Fragment-Kupplung benötigten Dipeptide wurden über die DCC-HOBT Methode dargestellt. Als *N*-terminale Schutzgruppe der Aminosäuren wurde *tert*Butyloxycarbonyl (BOC) verwendet. Der C-Terminus wurde als Benzylester geschützt und nach der Kupplung zum Dipeptid hydrogenolytisch bei Atmosphärendruck mit Wasserstoff über Palladium-Kohle als Katalysator abgespalten. Die Kupplung mit DCC kann über drei verschiedene Wege laufen. Die aktivierte Aminosäure bildet zunächst *O*-Acylisoharnstoff. Dieses hochaktive Intermediat generiert a) ein symmetrisches Anhydrid, überträgt b) direkt den Acyl-Rest auf die Aminogruppe der C-geschützten Aminosäure oder bildet c) mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) *in situ* einen instabilen Aktivester.

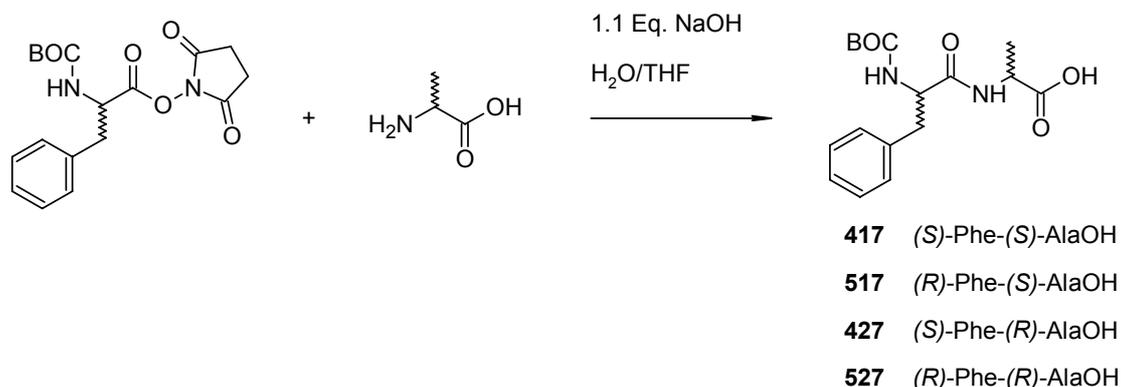
Schema 3-20: Verlauf der DCC-HOBT Kupplung.



Die hohe Reaktivität des *O*-Acylisoharnstoffs ist für auftretende Nebenreaktionen verantwortlich: die Umlagerung des *O*-Acylisoharnstoffs zum *N*-Acylharnstoff und die Racemisierung über die schon erwähnten Azlactone. Durch die Zugabe einer equimolaren Menge an HOBT wird diese Gefahr unterdrückt, weil eine weniger reaktive Spezies entsteht. Bei der Folgereaktion wird HOBT wieder regeneriert und durch den so entstehenden Überschuss verläuft die Reaktion zum größten Teil über diesen Aktivester-Weg.

Die Boc-Phe-Ala-Dipeptide wurden durch Acylierung mit dem Aktivester des Boc-Phe mit Hydroxysuccinimid in wässrigem Milieu in Ausbeuten von 60% dargestellt (Schema 3-21).

Schema 3-21: Darstellung der Boc-Phe-AlaOH Dipeptide.



Die Dipeptide mit Boc-Glycin **312**, **322**, **333** und **334** (Schema 3-22) wurden mittels *N*-geschützter Carboxyanhydride (UNCAs) dargestellt. Bei der Acylierung der als Benzylester geschützten Aminosäure entsteht als Spaltprodukt CO₂, was die Aufarbeitung und Isolierung des Produktes sehr vereinfacht. Die Reaktionszeit beträgt 15 Minuten, die Ausbeuten betragen >95%.

Schema 3-22: Darstellung der Dipeptide mit cyclischen Aminosäuren für die Fragmentkupplung.

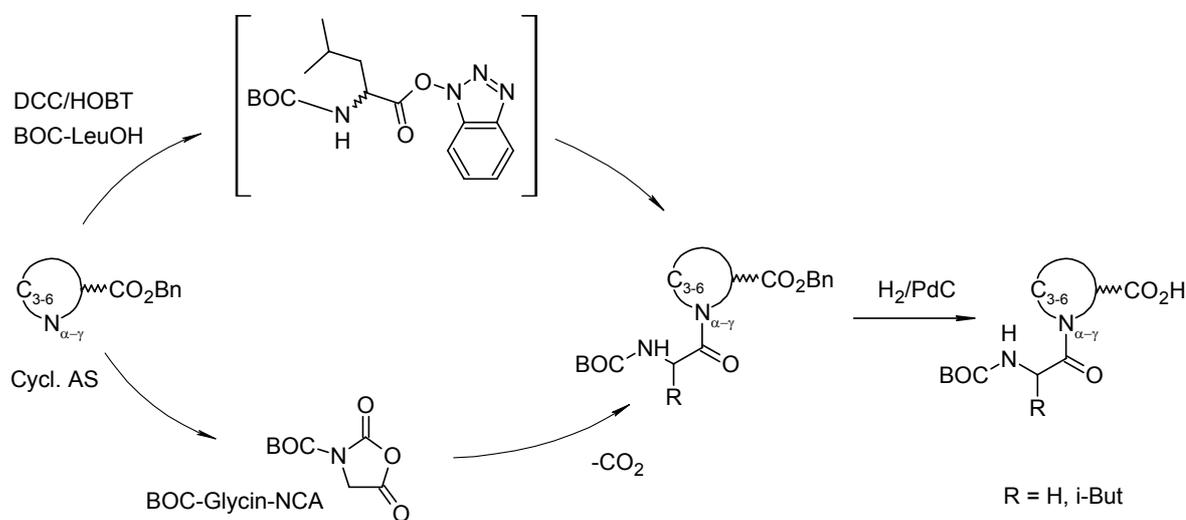


Tabelle 3-7: Dargestellte Dipeptide für die Fragment-Kupplung.

Nr.	Dipeptid
116	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-AzyOH
216	BOC-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-AzyOH
131	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-AzetOH
112	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-ProOH
122	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-ProOH
212	BOC-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-ProOH
222	BOC-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R</i>)-ProOH
312	BOC-Gly-(<i>S</i>)-ProOH
322	BOC-Gly-(<i>R</i>)-ProOH
133	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-PipOH
233	BOC-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-PipOH
333	BOC-Gly-(<i>R+S</i>)-PipOH
134	BOC-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-NipOH
234	BOC-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-NipOH
334	BOC-Gly-(<i>R+S</i>)-NipOH
417	BOC-(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-AlaOH
427	BOC-(<i>S</i>)-Phe-(<i>R</i>)-AlaOH
517	BOC-(<i>R</i>)-Phe-(<i>S</i>)-AlaOH
527	BOC-(<i>R</i>)-Phe-(<i>R</i>)-AlaOH

3.3.2.2 Kupplung der Aziridin-2,3-dicarboxylate mit Dipeptid-Fragmenten

Für die Fragment-Kupplung mit Peptiden wird häufig die Methode über unsymmetrische Anhydride benutzt. Für die Acylierung der Aziridindicarboxylate konnten bisher nur mit der EEDQ-Methode Erfolge erzielt werden, die *in situ* ein unsymmetrisches Anhydrid liefert. Alle anderen, in der Peptidsynthese etablierten Verfahren (wie z. B. unsymmetrische Anhydride mit IIDQ, DCC-HOBT, Hydroxysuccinimidylester, symmetrische Anhydride) schlugen bei der Acylierung des Aziridin-Stickstoffs fehl. Hierzu trägt entscheidend die sehr schwache Nucleophilie des Aziridins bei (siehe Kapitel 3.3). Eine Kupplung über die unsymmetrischen Anhydride mit Isobutylchloroformiat ist prinzipiell möglich. Es wurde dabei jedoch Racemisierung der 1. Aminosäure festgestellt, außerdem sind die Ausbeuten relativ gering.^[80] Die über das EEDQ-Verfahren synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 3-10 aufgelistet. Der Nummerierungsschlüssel ergibt sich aus Tabelle 3-8.

Tabelle 3-8: Nummerierungsschlüssel.



		Konfiguration		Aziridin-2,3-		
1. AS bzw. Substituent	2. AS	2. AS bzw. Substituent	3. AS	dicarboxylat		
I	II	III	IV			
0	-	0	achiral	0	-	
1	Boc-(S)-Leu	1	(S)	1	Azet	A (S,S)-Azi(OEt) ₂
2	Boc-(R)-Leu	2	(R)	2	Pro	B (R,R)-Azi(OEt) ₂
3	Boc-Gly	3	(R+S)	3	Pip	C (S,S)-Azi(OBn) ₂
4	Boc-(S)-Phe			4	Nip	D (R,R)-Azi(OBn) ₂
5	Boc-(R)-Phe			5	Ini	E (S,S)-Azi(OAll) ₂
6	Z-(S)-Leu			6	Azy	F (R,R)-Azi(OAll) ₂
7	BOC-Prz			7	Ala	G (S,S)-Azi(OH) ₂
				8	Form	
9	Biotin			9	HXA	

Azet = Azetidin-2-carbonsäure, Pip = Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure), Nip = Nipecotinsäure (Piperidin-3-carbonsäure), Ini = Isonipecotinsäure (Piperidin-4-carbonsäure), Azy = Aziridin-2-carbonsäure, Prz = Piperazin; Form = Formyl, HXA = 6-Aminohexansäure.

Beispiel:

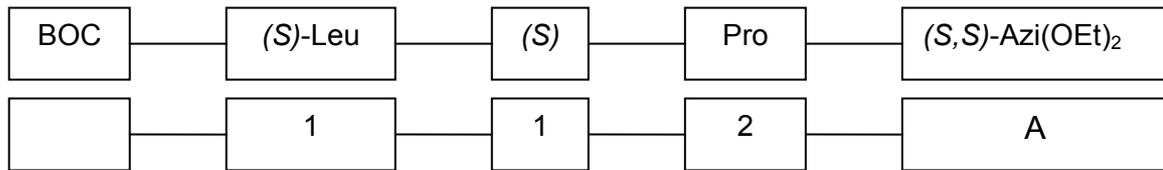


Tabelle 3-9: Tripeptide, dargestellt über sukzessive Kupplung (SK).

Nr.	Fragment	Tripeptid	Ausbeuten %
<i>(S,S)</i> -Azi(OEt) ₂ – Tripeptide			
112A	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt) ₂	57
134A	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Nip	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	48
105A	Boc-(S)-Leu-Ini	Boc-(S)-Leu-Ini-(S,S)-Azi(OEt) ₂	56
<i>(R,R)</i> -Azi(OEt) ₂ – Tripeptide			
131B	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Azet	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Azet-(R,R)-Azi(OEt) ₂	33
112B	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt) ₂	42
134B	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Nip	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	60
105B	Boc-(S)-Leu-Ini	Boc-(S)-Leu-Ini-(R,R)-Azi(OEt) ₂	65

Tabelle 3-10: Tripeptide, dargestellt über Fragment-Kupplung (FK).

Nr.	Fragment	Tripeptid	Ausbeuten %
<i>(S,S)</i> -Azi(OBn) ₂ – Tripeptide			
131C	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Azet	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Azet-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	34
112C	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	60
212C	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	23
312C	Boc-Gly-(<i>S</i>)-Pro	Boc-Gly-(<i>S</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	53
122C	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	31
222C	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	24
322C	Boc-Gly-(<i>R</i>)-Pro	Boc-Gly-(<i>R</i>)-Pro-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	36.
3?3C	Boc-Gly-(<i>R+S</i>)-Pip	Boc-Gly-(?) -Pip-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	34
134C	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Nip	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Nip-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	44
234C	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Nip	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>R+S</i>)-Nip-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	43
334C	Boc-Gly-(<i>R+S</i>)-Nip	Boc-Gly-(<i>R+S</i>)-Nip-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	62
116C	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Azy	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Azy-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	23
216C	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Azy	Boc-(<i>R</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Azy-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	59
417C	Boc-(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-Ala	Boc-(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-Ala-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	41
517C	Boc-(<i>R</i>)-Phe-(<i>S</i>)-Ala	Boc-(<i>R</i>)-Phe-(<i>S</i>)-Ala-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	16
427C	Boc-(<i>S</i>)-Phe-(<i>R</i>)-Ala	Boc-(<i>S</i>)-Phe-(<i>R</i>)-Ala-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	12
527C	Boc-(<i>R</i>)-Phe-(<i>R</i>)-Ala	Boc-(<i>R</i>)-Phe-(<i>R</i>)-Ala-(<i>S,S</i>)-Azi(OBn) ₂	29
<i>(R,R)</i> -Azi(OBn) ₂ – Tripeptide			
112D	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro	Boc-(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-Pro-(<i>R,R</i>)-Azi(OBn) ₂	49

3.4 Tripeptide mit freien Säure-Gruppen am Aziridinring

Um den Einfluss von freien Säure-Gruppen auf die inhibitorischen Eigenschaften der Tripeptide untersuchen zu können, wurde die Freisetzung der Säuren aus den Diestern in die Synthesestrategie eingeplant.

Da die saure oder alkalische Hydrolyse bevorzugt zur Hydrolyse der Azirididbindung führt,^[49] mussten schonendere Verfahren angewandt werden. Die Möglichkeit, unter sehr milden Bedingungen die Säuren selektiv und quantitativ freizusetzen, bieten nur die Hydrogenolyse der Benzylester mit Wasserstoff über Palladium-Kohle oder eventuell die Abspaltung der Allylester unter Pd⁰-Katalyse. Da die Hydrogenolyse eine sehr schnelle und bezüglich der Produktisolierung sehr saubere Methode ist, wurde diese vorzugsweise angewandt.

3.4.1 Disäuren aus Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylaten

Die Tripeptid-Dibenzylester wurden in Ethylacetat mit Wasserstoff und Palladium-Kohle unter Atmosphärendruck 30 min hydrogenolysiert. Die auf diesem Wege dargestellten Disäuren sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tabelle 3-11: Disäuren, dargestellt durch Hydrogenolyse der Dibenzylester.

112G	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂
312G	Boc-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂
322G	Boc-Gly-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂
134G	Boc-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂
234G	Boc-(R)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂
334G	Boc-Gly-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂
417G	Boc-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂
517G	Boc-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂
427G	Boc-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂
527G	Boc-(R)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂

3.4.2 Halbester aus Diethylaziridin-2,3-dicarboxylaten

Die enzymatische Hydrolyse von Ethyl- oder Methylestern stellt eine weitere schonende Methode dar, zu einer Säure-Gruppe zu gelangen. Als Enzyme werden dafür Esterasen und Proteasen eingesetzt. Bei Verwendung der Schweineleberesterase (PLE) als Katalysator wird nur ein Ester hydrolysiert, da Säuren als Substrate von der PLE nicht mehr akzeptiert werden. Daher ist dies keine Möglichkeit, beide Säuren freizusetzen. Des Weiteren kommt es auch hier u.U. zur unerwünschten Spaltung der Amid-Bindung am Aziridin-Stickstoff.^[49] In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Hydrolyse der Diester mit einer Ausnahme noch nicht untersucht.

Die Hydrolyse von **999B** mit α -Chymotrypsin bei pH 8.0 führte nach 12 Stunden laut LC-MS zu einem Gemisch aus Disäure und Halbester, das nicht weiter getrennt wurde (siehe Kapitel 4.5.2).

3.5 NMR-Analytik

Die mit Pipecolinsäure (**013A**, **023A**, **013B** und **023B**) bzw. mit Prolin (**012A**, **012B**) acylierten Aziridindicarboxylate bilden aufgrund sterischer Hinderung der freien Rotation Rotamere. *N*-acylierte Prolin- und Pipecolinsäure-Derivate bilden schon vor der Verknüpfung mit dem Aziridinring Rotamere. Die Rotamerenbildung beruht daher auf der eingeschränkten Rotation am Pro- bzw. Pip-Stickstoff und nicht auf eingeschränkter Rotation am Aziridin-Stickstoff.

Mittels NMR-Untersuchungen bei erhöhten Temperaturen konnten die Koaleszenz-Temperaturen bestimmt werden, aus denen die energetischen Barrieren der freien Rotation berechnet wurden. Verwendet wurde die Eyring-Gleichung (I) für die freie Aktivierungsenthalpie und eine Näherungsgleichung für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt (II).^[82]

$$\Delta G^\ddagger = RT_c \left(23.76 - \ln \frac{k_{\text{koal.}}}{T_c} \right) \quad \text{I}$$

$$k_{\text{koal.}} = \frac{\pi \sqrt{(v_A - v_B)^2 + 6J_{AB}^2}}{\sqrt{2}} \quad \text{II}$$

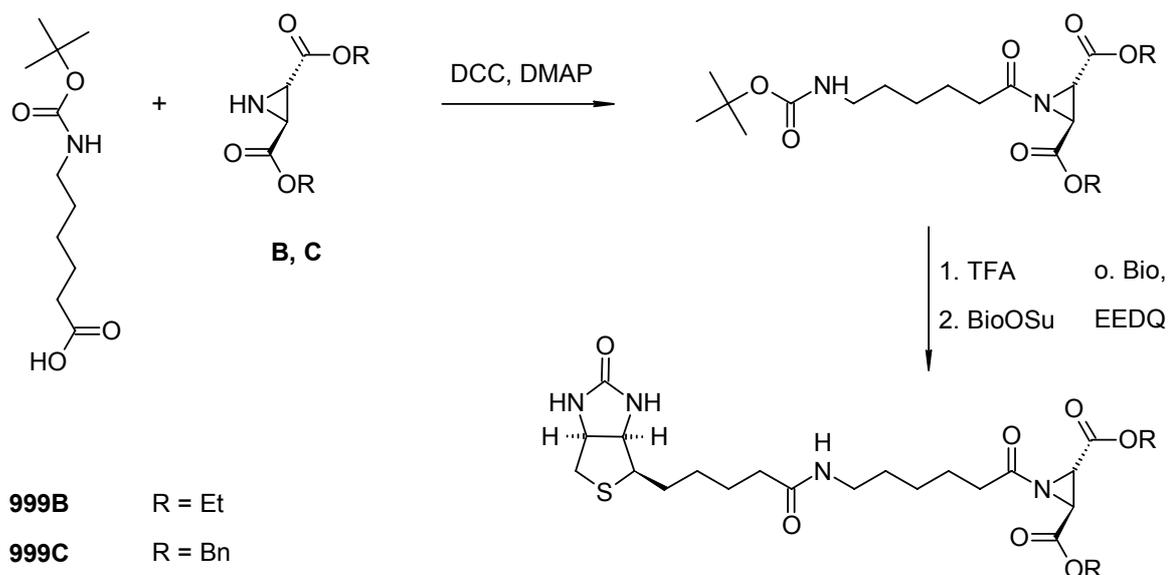
3.6.2 Biotin-markierte Aziridin-Bausteine.

Mit Biotin markierte Substanzen finden in der biologischen und biochemischen Diagnostik sehr häufig Anwendung als „affinity labels“. Dadurch, dass die Aziridin-2,3-dicarboxylate als irreversible Inhibitoren das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen alkylieren, ergibt sich damit die Möglichkeit, diese Enzyme selektiv markieren zu können.

Die Aziridine **B** und **C** wurden zuerst über die Methode der symmetrischen Anhydride mit BOC-6-Aminohexansäure (BOC-HXA) acyliert und chromatographisch gereinigt. Die Schutzgruppe wurde anschließend mit TFA abgespalten. Danach wurden mit dem Biotinhydroxysuccinimidylester, der durch Reaktion von Biotin mit HOSuc und DCC dargestellt wurde, in DMF die Derivate **999B** und **999C** synthetisiert. Das Diethyl-Derivat **999B** wurde auch noch auf einem weiteren Weg dargestellt: nach Entschützen des Zwischenproduktes wurde mit Biotin und EEDQ über das unsymmetrische Anhydrid gekuppelt. Die Verwendung eines kürzeren Spacers als HXA, β -Alanin, führte nicht zum Erfolg, beim Abspalten der BOC-Schutzgruppe verfärbte sich die Lösung auch bei 0°C immer mehr. Das NMR-Rohspektrum entsprach zwar dem entschützten Zwischenprodukt, jedoch war die Kupplung mit Biotinhydroxysuccinimidat nicht erfolgreich und das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Beide Derivate, **999B** und **999C**, wurden an *Plasmodium falciparum* für die Markierung von Cystein-Proteasen eingesetzt.^[83] Dabei wurde gefunden, dass das Diethyl-Derivat **999B** wahrscheinlich aufgrund geringerer Lipophilie nicht die Membranen der Trophozoiten passieren kann, um die gesuchten Proteine zu markieren (siehe Kapitel 4.7.1).

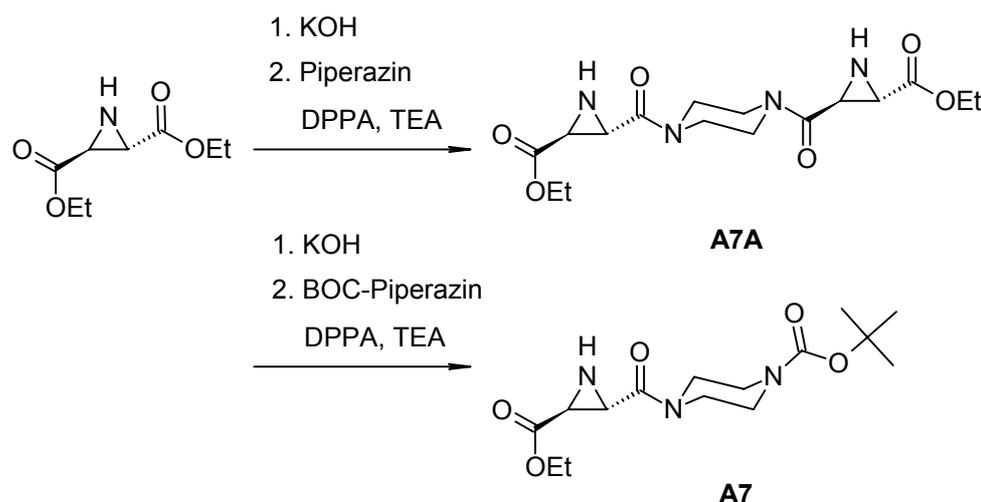
Schema 3-24: Synthese der Biotin-markierten Aziridin-Bausteine.



3.6.3 Bis-*N,N*-aziridinylpiperazin

Pharmakologische Studien an Epoxysuccinyl-Peptiden, die Piperazin in der Seitenkette enthalten, zeigten eine Wirkung gegen Brust- und Prostata-Krebs durch Induktion der Apoptose. Der Wirkungsmechanismus ist noch ungeklärt, weil die Daten nicht mit der Hemmung der beteiligten Cystein-Proteasen korrelieren.^[35,84,85] Um ein diesem Epoxysuccinyl-Peptid verwandtes Aziridin-Derivat zu erhalten, wurde ein Aziridin-Dimer, verbunden durch eine Piperazin-Brücke, synthetisiert. Dieses bietet die Möglichkeit, zwei Stellen gleichzeitig zu alkylieren. Hypothetisch könnte dieses zu einer Alkylierung des DNA-Doppelstranges führen und so die Transkription verhindern. Auch als Cystein-Protease-Inhibitor könnte dieses Derivat durch doppelte Alkylierung der Enzyme eine höhere Potenz aufweisen als monomere Aziridine.

Für die Synthese wurde die DPPA-Kupplung eingesetzt. Es wurde zunächst (*S,S*)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat partiell mit 1 Eq. Kaliumhydroxid verseift. 2 Eq. des Monoesters wurden nach Zugabe von 2 Eq. DPPA und je 1 Eq. Piperazin und TEA in DMF zu Verbindung **A7A** umgesetzt. Für die Synthese der Substanz **A7** wurden je 1 Eq. DPPA, BOC-Piperazin und TEA eingesetzt.

Schema 3-25: Synthese eines Piperazin-Derivates.**3.6.4 Synthese eines ^{13}C -markierten Inhibitors**

Für eine NMR-Studie zum Bindungsmodus der Aziridine am Papain wurde ein Aziridinyl-Tripeptid EtO-Azi-(S)-Leu-(S)-ProOBn **A+B112*** synthetisiert, in dem alle 4 C-Atome der Aziridin-2,3-dicarbonsäure mit dem Kohlenstoff-Isotop ^{13}C markiert sind. Die Synthese des Aziridins geht von voll markierter ^{13}C -Fumarsäure aus. Zunächst wurde die Fumarsäure in einem Ethanol-Benzol-Gemisch (1:1) unter H_2SO_4 -Katalyse zum Diethylfumarat umgesetzt. Die anschließende Michael-Addition von Diphenylsulfimin an Fumarat in Benzol bei 80°C ergab racemisches Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel 60 unter Elution mit Cyclohexan:Ethylacetat (3:1) wurden 27% Aziridin isoliert. Die partielle Hydrolyse des Diethylaziridin-2,3-dicarboxylates mittels Kaliumhydroxid in absolutem Ethanol führte zum *Mono*-Kalium-Salz. Kupplung mit 1.1 Eq. DPPA und 1 Eq. H_2N -(S)-Leu-(S)-ProOBn lieferte das Produkt (S,S)+(R,R)-EtO-Azi-(S)-Leu-(S)-ProOBn **A+B112***. Die beiden Diastereomeren konnten mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 unter Elution mit Diethylether:Petrolether 40-60 (2:1) getrennt werden. Insgesamt konnten dadurch ausgehend von 100 mg ^{13}C -markierter Fumarsäure 10.0 mg S,S,S,S-Diastereomer und 10.0 mg R,R,S,S-Diastereomer erhalten werden. Da nur geringe Mengen an sehr teurer ^{13}C -markierter Fumarsäure zur Verfügung standen, wurde die geschilderte Synthesesequenz mit gleicher Ansatzgröße zuerst an unmarkierter Fumarsäure durchgeführt, um die für die Synthese des markierten Aziridinyl-Peptids geeigneten Reaktionsbedingungen herauszufinden. Die Gesamtausbeute des markierten Aziridinyl-Peptids war jedoch geringer als die des unmarkierten Derivates.

Schema 3-26: Synthese des ^{13}C -markierten Inhibitors A+B112*.

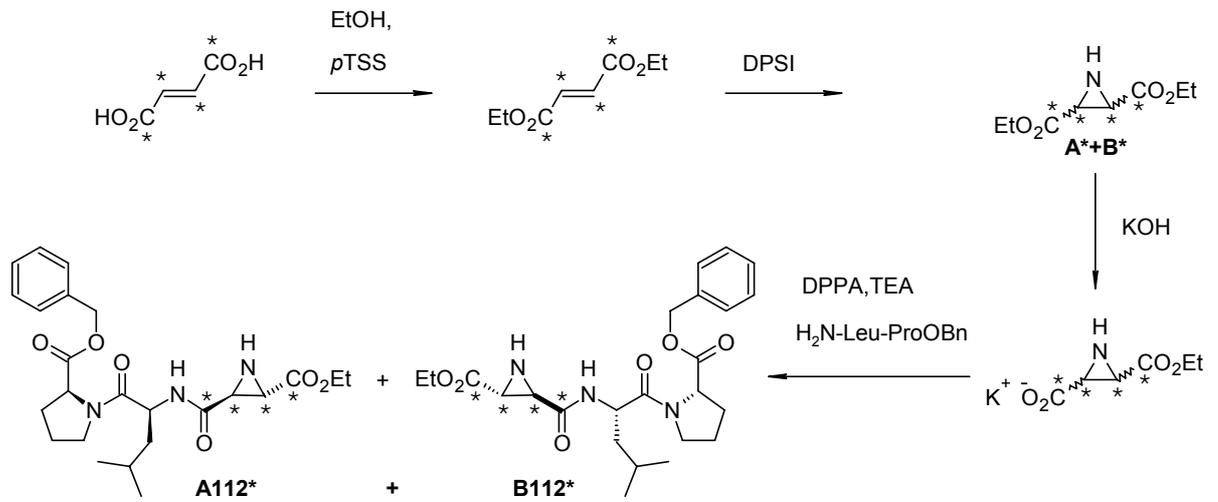
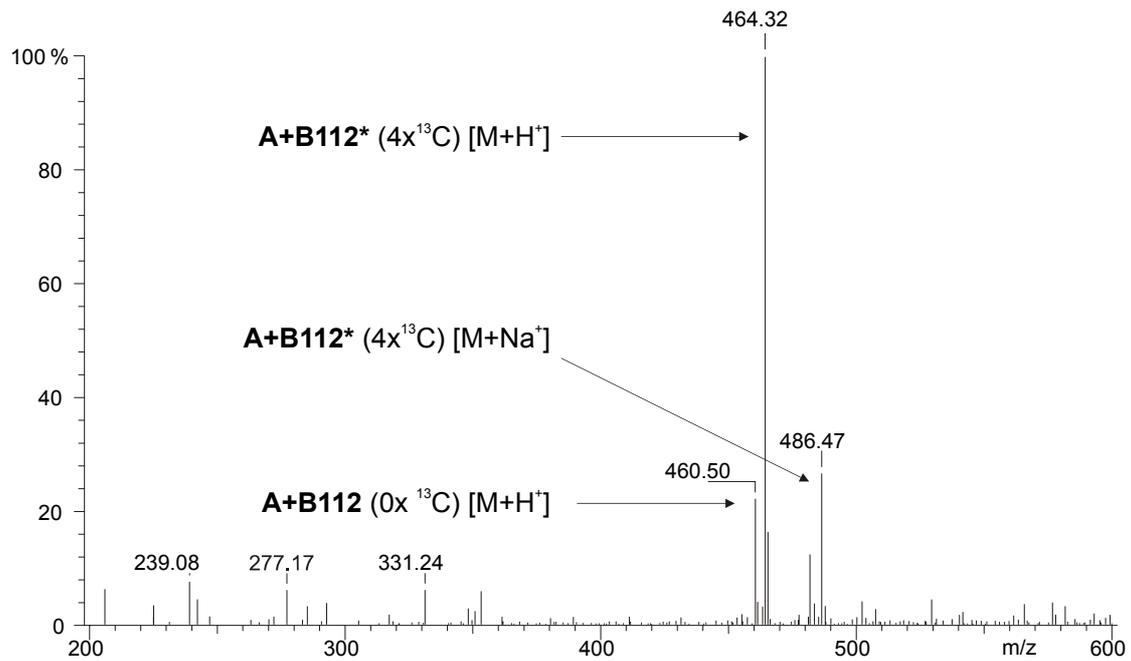


Abbildung 9: ESI-MS des ^{13}C -markierten Inhibitors A+B112*.



3.7 Darstellung potentieller Substrate für coronavirale Cystein-Proteasen

Coronaviren galten bis Anfang 2003 als relativ ungefährlich für den Menschen. Bei Tieren verursachen sie jedoch verschiedenste Erkrankungen. Beispiel für ein tierpathogenes Coronavirus ist das TGEV (transmissible gastroenteritis virus), das bei neugeborenen Schweinen zu tödlichen Durchfallerkrankungen führt. Durch eine kritische Mutation wurde ein Coronavirus jedoch auch für den Menschen zu einem gefährlichen Infektionserreger. Das SARS-Virus (Severe Acute Respiratory Syndrome) verursacht das Versagen des respiratorischen Systems. Derzeit wird fieberhaft nach einer Impfung oder einer medikamentösen Therapie gesucht. Als wichtigen Ansatzpunkt zieht man hier auch Inhibitoren der für das SARS-Virus essentiellen Hauptprotease (main protease, M^{pro}) in Betracht. Die SARS-M^{pro} ist an der Replikation der Viren beteiligt, indem sie aus dem primär exprimierten Protein alle für das Virus notwendigen Proteine ausschneidet.^[86] Die SARS-CoV-M^{pro} weist keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit den Cystein-Proteasen des Papain-Clans auf. Sie ist strukturell entfernt verwandt mit der Serin-Protease α -Chymotrypsin und den 3C-Proteasen der Rhinoviren (Picornaine).^[87] Sie besitzt im Gegensatz zu den Papain-like Cystein-Proteasen wahrscheinlich auch kein präkatalytisches Ionenpaar, sondern der Cys-Rest des aktiven Zentrums ist protoniert und damit ungeladen.^[88]

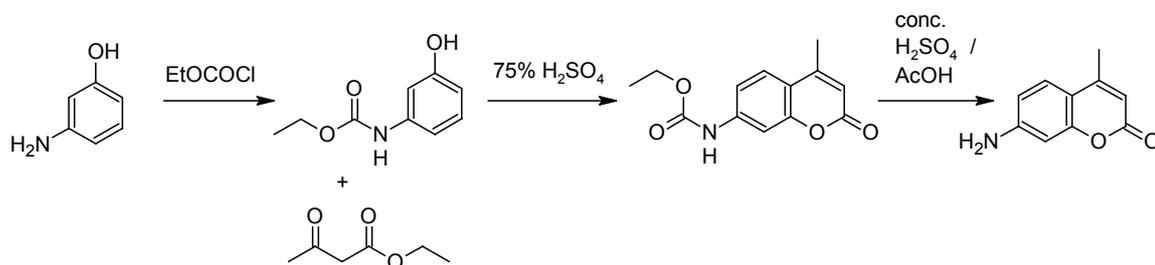
Um potentielle Inhibitoren auf Hemmung der SARS-M^{pro} und anderer coronaviraler Hauptproteasen testen zu können, wurde bisher immer ein Substrat bestehend aus 16 Aminosäuren verwendet. Die Spaltung dieses Oligopeptids durch die SARS-M^{pro} wird mittels HPLC-Analyse detektiert (siehe Kapitel 4.4).^[89] Dieses Verfahren ist mit relativ hohem Zeit- und Kosten-Aufwand verbunden und erlaubt nur eine grobe Charakterisierung von Inhibitoren. Um die Testung zu vereinfachen und genaue Hemmkonstanten bestimmen zu können, wurde nach einem geeigneten spektrophotometrisch erfassbaren Substrat gesucht. Die Sequenz, die von der SARS-Protease gespalten wird, weist einen sehr hohen Konservierungsgrad innerhalb des ganzen *Coronaviridae*-Stammes auf und ist von der Prodomäne des M^{pro}-Proenzym abgeleitet.^[89] Die P1-, P2-, und P4-Positionen gelten als essentiell für die enzymatische Hydrolyse. Aufgrund dieser Daten wurde die Sequenz Z-Gly-Val-Asn-Leu-Gln als Erkennungssequenz für das Substrat gewählt. Als spektrophotometrisch erfassbares Produkt der enzymatischen Hydrolyse sollte 7-Amino-4-methylcumarin AMC eingesetzt werden. AMC ist ein Standard-Chromophor für fluorimetrische Substrate. Die Anregung erfolgt bei 360 nm, die Emission wird bei 460 nm detektiert. Ein großer Vorteil der Fluorimetrie, im Vergleich zur Photometrie, liegt in der Empfindlichkeit für etwa 50x

kleinere minimale Konzentrationen des Fluorophors, die in Lösung noch erfasst werden können.

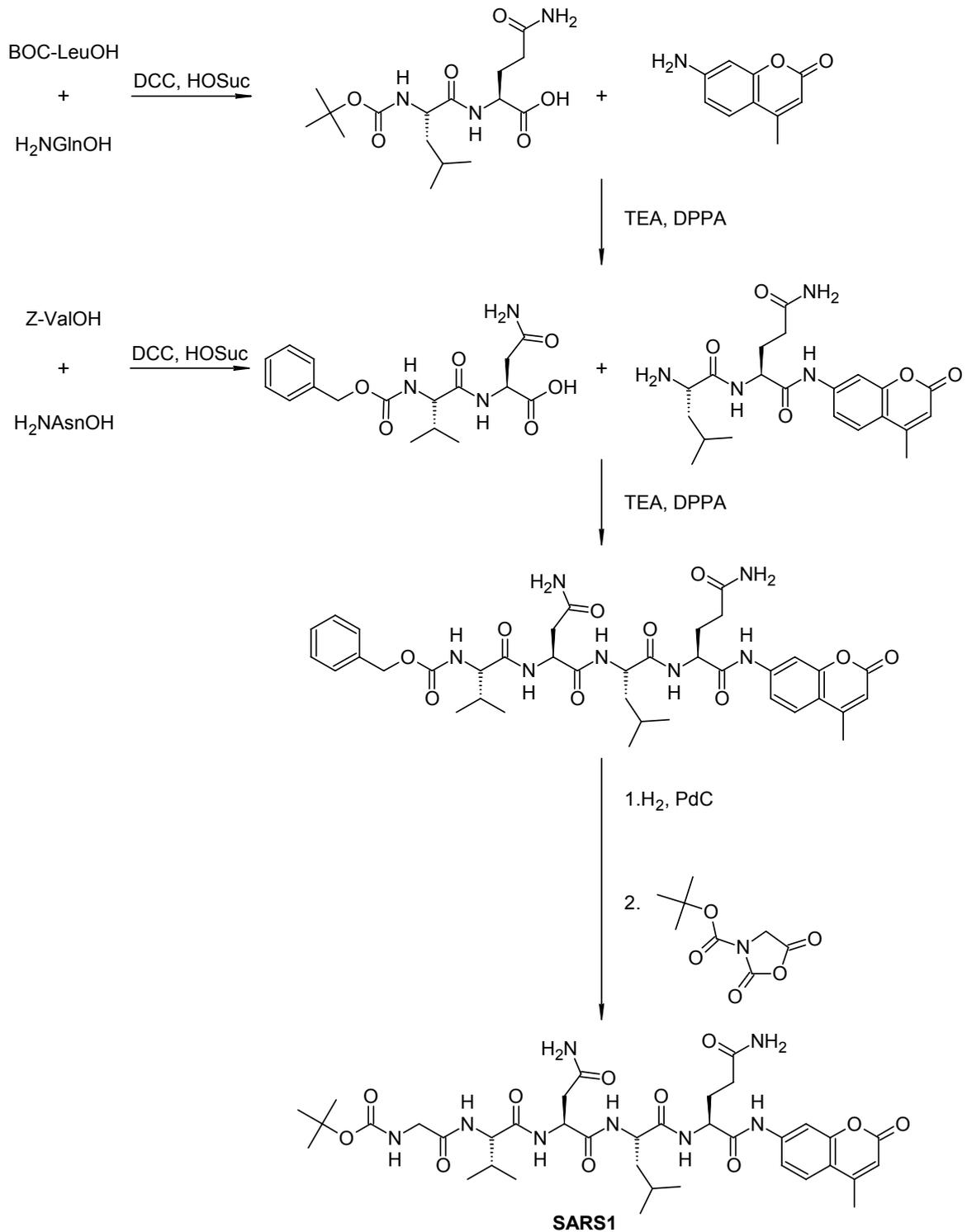
Die Synthese des ausgewählten Pentamers in Lösung stellte aufgrund der schlechten Löslichkeit der Aminosäuren Glutamin und Asparagin ein Problem dar. Aus diesem Grund wurde ein Syntheseweg gewählt, den man als "sukzessive Fragment-Kupplung" bezeichnen kann (Schema 3-28).

Zuerst wurde BOC-Leu-Gln-OH über den Aktivester des BOC-Leu mit Hydroxysuccinimid in Wasser/THF dargestellt. Nach Isolierung wurde dieses Fragment an 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) (Schema 3-27) über die DPPA-Methode gekuppelt und chromatographisch auf Kieselgel RP-C18 gereinigt. Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wurde an H₂N-Leu-Gln-AMC das zweite Fragment Z-Val-Asn-OH (dargestellt ebenso wie BOC-Leu-Gln) mit DPPA gekuppelt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Schutzgruppe wurde dann die letzte Aminosäure Boc-Gly mittels eines *N*-Carboxyanhydrids angeknüpft. Die Isolierung des Substrates erfolgte an Kieselgel RP-C18.

Schema 3-27: Synthese von 7-Amino-4-methylcumarin.



Das synthetisierte potentielle SARS- bzw. TGEV-M^{pro}-Substrat Z-Gly-Val-Asn-Leu-Gln-AMC wurde an beiden Proteasen getestet. Leider konnte keine Hydrolyse festgestellt werden. Wahrscheinlich ist der AMC-Rest zu groß, um in die relativ kleine, für die Aminosäuren Ala oder Gly optimale S1'-Tasche der Enzyme binden zu können.

Schema 3-28: Synthese eines fluorimetrischen Substrats für die SARS- und TGEV-Hauptproteasen.

4-Amino-7-methylcoumarin wurde aus m-Aminophenol und Ethylacetoacetat in einer 3-Stufen-Synthese (Schema 3-27) in einer Gesamtausbeute von 62% dargestellt.^[90]

4. Enzymassays

4.1 Einführung

Die Aziridinyl-Peptide sollten aufgrund der elektrophilen Eigenschaften des Aziridinrings einen mit den Epoxysuccinaten vergleichbaren Inaktivierungsmechanismus aufweisen. Es wird auch für die Aziridine angenommen, dass der Cystein-Rest in aktivem Zentrum des Enzyms eine kovalente Bindung mit dem Inhibitor eingeht und das Enzym dadurch irreversibel gehemmt wird. Die Versuche mit *N*-Formyl-aziridin-2,3-dicarboxylat **008B** und 4-Methoxythiophenol sowie die Versuche mit den biotinylierten Inhibitoren an Cathepsin L und an Plasmodien untermauern dies (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.7.1).

Die Irreversibilität einer Hemmung ist jedoch nicht immer mit Sicherheit vorherzusagen. Es wird aufgrund der Eigenschaften eines Inhibitors vermutet, dass eine kovalente Bindung entsteht, jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass der Inhibitor zwar in das aktive Zentrum bindet, aber die Alkylierung aufgrund einer sterisch ungünstigen räumlichen Anordnung nicht möglich ist. Nicht-kovalente oder kovalent-reversible Inhibitoren mit sehr guter Affinität können wiederum zu einer pseudo-irreversiblen Hemmung führen, die nur sehr schwer von wahrer irreversibler Hemmung zu unterscheiden ist.

Reversible und irreversible Hemmung können durch Verringerung der Inhibitor-Konzentration mittels Dialyse, Ultrafiltration oder Gelfiltration unterschieden werden. Ein reversibler Inhibitor wird in diesem Falle aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex wieder abdissoziieren und das Enzym gewinnt seine Aktivität zurück. Bei diesen Methoden muss allerdings mit gewissen Aktivitätsverlusten durch eine Instabilität des Enzyms während der Dialyse- bzw. Ultrafiltrationsprozedur gerechnet werden und immer ein Vergleich mit nicht-inaktiviertem Enzym durchgeführt werden.

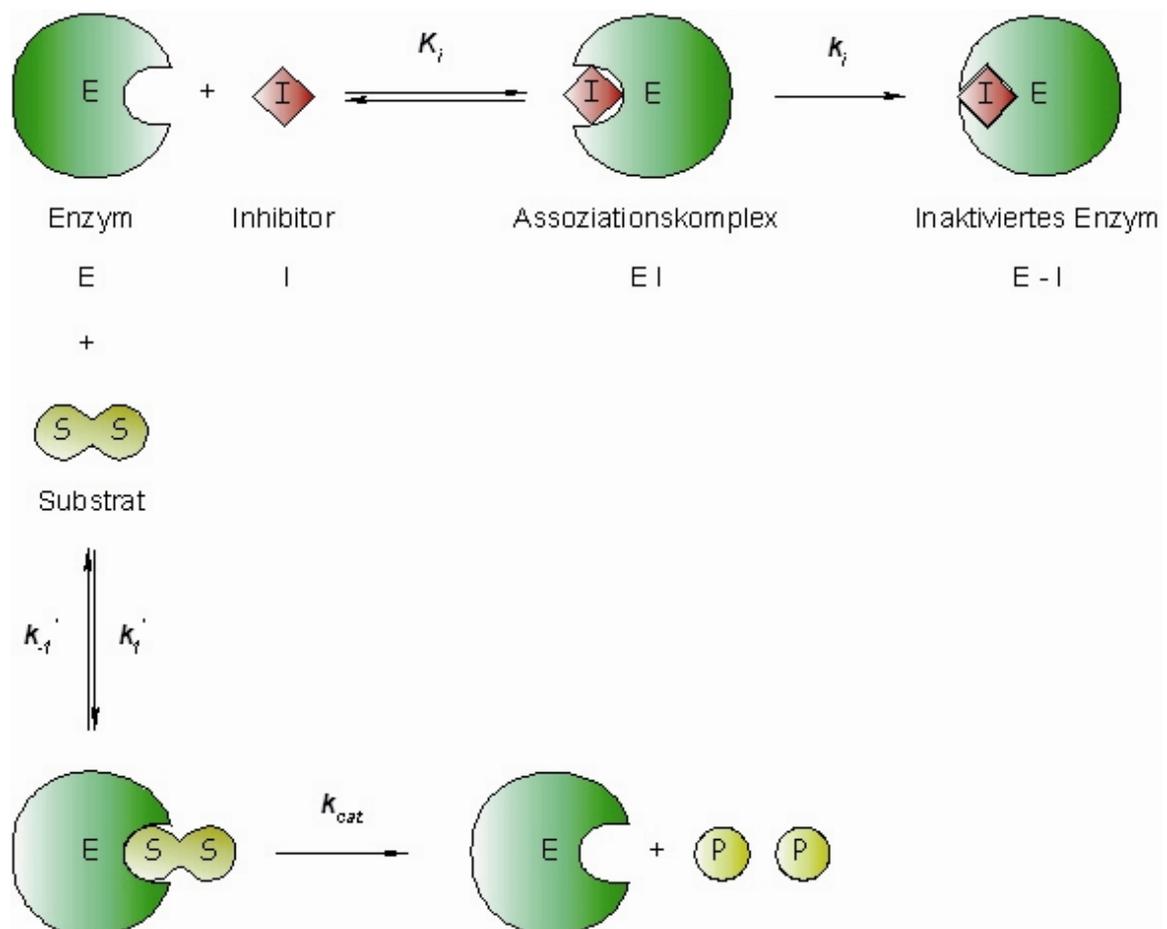
Eine viel versprechende Methode, um eine irreversible kovalente Bindung nachzuweisen, ist der tryptische Verdau eines durch einen Inhibitor inaktivierten Enzyms und die anschließende LC/MS-Analyse der durch die tryptische Spaltung entstehenden Enzymfragmente.

Eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen reversibler und irreversibler Hemmung bietet auch die Zeitabhängigkeit der Hemmung. Bei reversibler Hemmung reduziert sich die Aktivität des Enzyms nur abhängig von der Konzentration des Inhibitors und ändert sich im Laufe der Messung nicht, vorausgesetzt, dass sich ganze System unter steady-state-Bedingungen befindet (eine Sättigung des Enzym mit Substrat = stetiger definierter Überschuss des Substrates während der Messung.)

Irreversible Hemmung zeichnet sich dagegen durch einen zeitabhängigen Abfall der Enzym-Aktivität mit exponentiellem Verlauf aus, ähnlich einer Reaktion pseudo-erster Ordnung.

4.2 Charakterisierung irreversibler Hemmung

Die irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrates kann mit folgendem Reaktionsschema beschrieben werden:



Der Mechanismus kann wie folgt beschrieben werden: der Inhibitor bildet mit dem Enzym einen Assoziationskomplex, der entweder wieder dissoziieren oder weiter zu einem inaktivierten Enzym reagieren kann. Gleichzeitig konkurriert das Substrat mit dem Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms.

Zur Charakterisierung der Kinetik einer enzymatischen Reaktion dienen die Michaelis-Konstante K_m als Maß für die Affinität des Substrates zum Enzym und die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} , die etwas über die Geschwindigkeit der Substratspaltung aussagt.

Die Kinetik der Inaktivierung durch einen irreversiblen Inhibitor wird durch die Hemmkonstanten K_i , k_i , k_{2nd} beschrieben.

- K_i [M] = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die als $K_i = [E][I] / [EI]$ oder $K_i = (k_{-1} + k_i) / k_1$ definiert ist. Diese Form vereinfacht sich weiter zu $K_i = k_{-1} / k_1$ weil k_i das Gleichgewicht zwischen Enzym-Inhibitor-Komplex (E-I) auf der einen Seite und freiem Enzym (E) und Inhibitor (I) auf der anderen Seite nicht beeinflusst und nur die Geschwindigkeit der Inaktivierung bestimmt.
- k_i [min^{-1}] = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I.
- k_{2nd} [$\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, $k_{2nd} = k_i / K_i$.

Die Hemmkonstanten K_i , k_i , k_{2nd} können auf zwei verschiedene Arten, durch einen kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou^[91] oder durch einen Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson^[92] bestimmt werden. Da zur Bestimmung der Hemmkonstanten ausschließlich der kontinuierliche Assay verwendet wurde, wird an dieser Stelle auf eine ausführliche Beschreibung der kinetischen und mathematischen Grundlagen eines Verdünnungsassays verzichtet.

4.2.1 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou

Zu einer Mischung aus Inhibitor und Substrat wird Enzym zugegeben und die zeitabhängige Produktzunahme gemessen. In Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors nimmt die Zunahme des Produktes exponentiell ab und nähert sich so einer Produktkonzentration $[P_\infty]$ (Gl. I).

$$[P_t] = [P_\infty] \left(1 - e^{(-k_{obs}t)} \right) \quad |$$

Voraussetzung ist, dass der Inhibitor im Überschuss über Gesamtkonzentration an Enzym E_0 vorliegt $[I] \gg [E_0]$. Um die steady-state-Bedingungen über die ganze Zeit der Messung (bis zu 90 min) zu gewährleisten, muss auch Substrat in ausreichendem Überschuss vorliegen, damit die Abnahme der Aktivität auch tatsächlich auf die Reaktion mit dem Inhibitor zurückzuführen ist. Die Umsatz-Zeit-Kurve des Enzyms mit dem Substrat muss über die gesamte Messzeit linear verlaufen. Es wird maximal 10% Abweichung von der Linearität toleriert.

Unter steady-state-Bedingungen ($[S] \gg [E_0]$) folgt die Abnahme der Enzymaktivität E_a ($[E_a] = [E] + [EI]$) pro Zeit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung, die durch die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} charakterisiert wird: (Gl. II).

$$-k_{obs} t = \ln \left(\frac{[E_a]}{[E_0]} \right)$$

⇕

$$[E_a] = [E_0] e^{(-k_{obs} t)} \quad \text{II}$$

$$k_{obs} = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

Die Gesamtkonzentration an eingesetztem Enzym $[E_0]$ ergibt sich aus (Gl. III):

$$[E_0] = [E] + [EI] + [E-I] \quad \text{III}$$

$[E]$ → Konzentration an freiem Enzym, $[EI]$ → Konzentration an reversiblen Enzym-Inhibitor Komplex (noch potentiell aktives Enzym), $[E-I]$ → Konzentration an inaktiviertem Enzym.

Unter der Bedingung $[I] \gg [E_0]$ ist die Bildung der inaktiven Enzymform E-I der Konzentration des reversiblen Komplexes $[EI]$ proportional (Gl. IV).

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

Die Gesamtkonzentration an Enzym $[E_0]$ bleibt konstant und die Bildung des inaktiven Komplexes E-I entspricht der Abnahme an aktivem Enzym $[E_a] = [EI] + [E]$ (Gl. V).

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_i [EI] \quad \text{V}$$

Für $K_i = [E][I] / [EI]$ wird $[E_a] = [EI] K_i / [I]$ bzw. $[EI] = [E_a] / (1 + K_i / [I])$. Daraus ergibt sich für die Abnahme der Enzymaktivität die Gleichung VI:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = \frac{k_i [E_a]}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{VI}$$

Integration über die Zeit t liefert (Gl. VII):

$$\ln \left(\frac{[E_a]}{[E_0]} \right) = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{VII}$$

Unter den Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($\ln ([E_a] / [E_0]) = -k_{obs} t$) ergibt sich die hyperbolische Funktion (Gl. **VIII**).

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

⇕

VIII

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i + [I]}$$

Hemmkonstanten schlecht löslicher oder schnell reagierender Inhibitoren können nicht unter Sättigungsbedingungen $[I] \gg K_i$ sondern nur bei relativ niedrigen Inhibitorkonzentrationen unterhalb der Dissoziationskonstante $[I] \ll K_i$ bestimmt werden. Hierfür vereinfacht sich die Gleichung **VIII** zu Gleichung **IX**:

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i}$$

⇕

IX

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

Die Hemmkonstanten k_i und K_i können damit nicht mehr einzeln bestimmt werden, sondern es wird näherungsweise nur die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_{2nd} berechnet.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird jedoch nicht der wahre K_i -Wert bestimmt, sondern nur die apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} . Grund hierfür ist die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Um K_i zu berechnen muss der Wert von K_{iapp} durch den Term $(1 + [S] / K_m)$ dividiert und so um die Substrat-Konzentration $[S]$ und die Affinität des Enzyms zum Substrat korrigiert werden (Gl. **X**). Die Michaelis-Konstante K_m wird dazu in einem gesondertem Experiment bestimmt (siehe Kapitel 4.5.4).

$$K_{iapp} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$$

X

4.2.2 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson

In diesem Assay wird das Enzym mit einem 10-50fachen Überschuss an Inhibitor inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wird ein Aliquot aus der Inkubationslösung entnommen und nach Zugabe von Substrat die Rest-Aktivität des Enzyms bestimmt. Dabei wird die inkubierte Enzym-Lösung mindestens 10-fach verdünnt, um einer Hemmung durch nicht-kovalente Assoziation vorzubeugen. Der große Nachteil dieser Bestimmungsmethode liegt in dem großen Zeitaufwand, weil für jeden k_{obs} -Wert mehrere Umsatz-Zeit-Messungen mit ein und derselben Inhibitorkonzentration durchgeführt werden müssen.

4.3 Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Bei sehr langsamer Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor verläuft die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu linear, so dass es unmöglich ist, die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung zu bestimmen. In diesem Fall wird für die Auswertung der Assays die Dixon-Gleichung **XI** benutzt.

$$v_i = \frac{v_o}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{XI}$$

v_i und v_o sind die Enzymaktivitäten mit bzw. ohne Inhibitor. Da es auch hier zu einer Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat kommt, muss die ermittelte apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} durch Division durch den Term $(1 + [S] / K_m)$ korrigiert werden

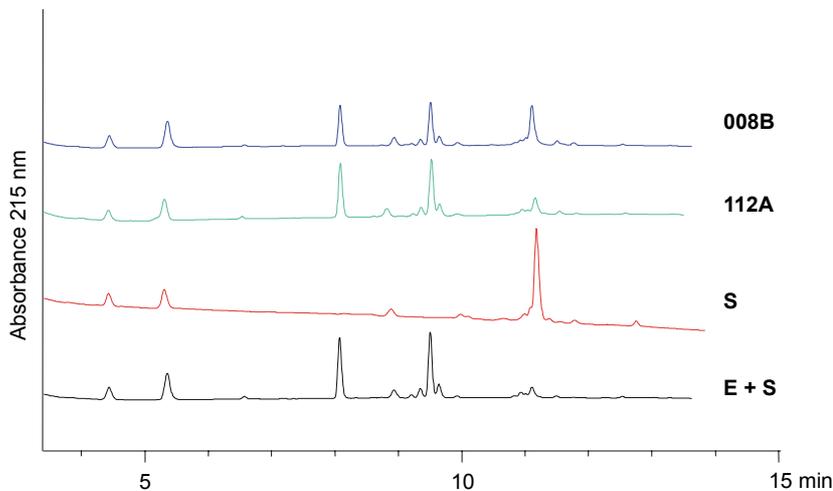
Die durchgeführten Versuche wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Enzymkinetik-Software Grafit[®] ausgewertet.

4.4 HPLC-Assay für coronavirale Proteasen

Die Hemmung der coronaviralen Haupt-Protease M^{Pro} des TGE-Virus durch Inhibitoren konnte bisher nur mittels HPLC-Detektion der Hydrolyseprodukte der Substrat-Hydrolyse grob abgeschätzt werden. Diese Verfahren ermöglicht nicht die Ermittlung der Hemmkonstanten des Inhibitors, weil die Inaktivierung des Enzyms TGEV-M^{Pro} nicht über die Produkt-Zunahme wie in einem einfachen spektrometrischen Assay verfolgt werden kann. Es ist jedoch möglich anhand der Quantifizierung des Verhältnisses zwischen restlichem Substrat und seinen Hydrolyseprodukten nach einer bestimmten Inkubationszeit eine grobe Klassifizierung von Inhibitoren vorzunehmen. Dazu wurden

Inhibitoren in DMSO ($[I] = 100 \mu\text{M}$) zusammen mit dem Enzym TGEV-M^{Pro} ($[E] = 0.3 \mu\text{M}$ in 20 mM TRIS-HCl pH 7.3, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT) inkubiert. Nach 15 min Inkubationszeit wurde das Substrat: $\text{NH}_2\text{-VSYGSTL} \parallel \parallel \text{QAGLRKMA-CO}_2\text{H}$ ($\parallel \parallel$ = Spaltstelle) in einer Konzentration von $[S] = 0.71 \text{ mM}$ zugegeben. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 20 μl . Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 25°C wurde eine HPLC-Analyse auf einer Agilent Zorbax SB-Aq RP-C18 Säule mit einem linearen Gradient von 5% auf 90% Acetonitril in Wasser mit Zusatz von 0.1 % TFA über 20 min durchgeführt.^[89]

Abbildung 10: HPLC-Chromatogramme der Assays mit TGEV M^{Pro}.



Getestet wurden die Substanzen **112A** und **008B**. Während mit **112A** keine Hemmung des Enzyms festzustellen ist, weist der *N*-formylierte Baustein **008B** eine ca. 36%ige Hemmung auf (Abbildung 10).

4.5 Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren wurden kontinuierliche Assays in weißen 96-Well-Platten (*Nunc*[®]) mit fluorimetrischer Erfassung des Spaltproduktes der enzymatischen Hydrolyse des Substrates durchgeführt. Jeder Inhibitor wurde bei 7 verschiedenen Konzentrationen (0.35–140 μM) vermessen. Als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC = *N*-Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-arginyl-7-amino-4-methylcumarin eingesetzt. Dabei wurde die zunehmende Fluoreszenz des durch die Spaltung entstehenden 7-Amino-4-methylcumarins mit Hilfe eines Fluorimeters (*Varian Cary Eclipse*) bei 460 nm detektiert (Anregung 365 nm). In der Tabelle 4-1 sind die Enzyme, ihre Konzentrationen und die verwendeten Puffer aufgelistet.

Tabelle 4-1: Enzym-Konzentrationen, Puffer und K_m -Werte.

Enzym	[E]	Puffer	K_m -Wert	Ref.
Cathepsin L <i>Paramecium tetraurelia</i>	2.4 nM	TRIS 6.0	6.5 μ M	[93]
Cathepsin B <i>human</i>	2.1 pM	TRIS 6.0	150.0 μ M	[57]
Falcpain-2 <i>Plasmodium falciparum</i>	23.3 nM	ACETAT 5.5	21.5 μ M	[94]
Rhodesain <i>Trypanosoma rhodesiense</i>	41.1 nM	ACETAT 5.5	826.5 nM	[21]

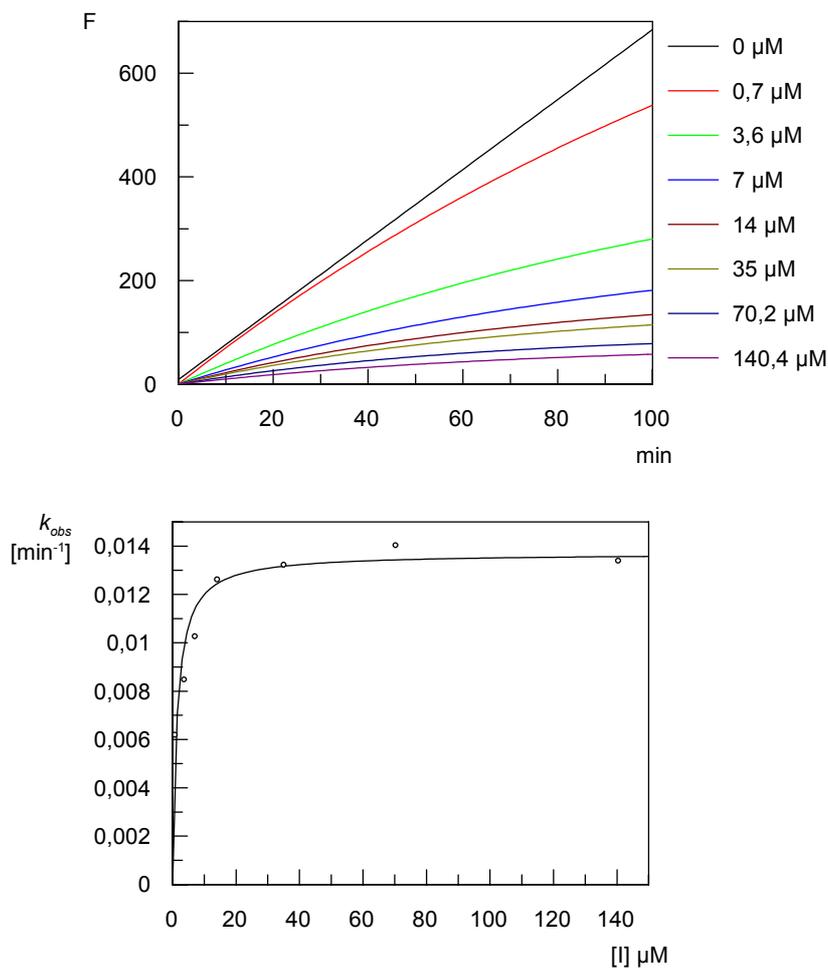
Puffer: TRIS pH 6.0, 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5mM, DTT 2.5 mM, Brij 35 0.005%; Acetat pH 5.5, 50 mM, 2.5 mM, Brij 35 0.005%.

Die Puffer enthalten EDTA, um eine Denaturierung der Enzyme durch eventuell vorhandene Schwermetalle zu verhindern. Ein niedermolekulares Thiol (DTT= Dithiotreitol) wird zugesetzt, um eine falsche Disulfid-Brücke am Cystein-Rest im aktiven Zentrum zu reduzieren und damit die Cystein-Proteasen zu aktivieren. Brij 35 ist ein nichtionisches Tensid, das zur Verbesserung der Löslichkeit von Inhibitoren und Substrat dient. Für die Enzym-Verdünnung werden jedoch Puffer ohne Brij 35 verwendet. Substrat und Inhibitoren werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 285 μ l enthält Substrat in Konzentration von 10- 80 μ M und Inhibitoren in Konzentrationen von 0.35 μ M bis 140 μ M sowie 10% DMSO. Bei dieser DMSO-Konzentration wird die Aktivität und Stabilität der Enzyme nicht beeinträchtigt. Dabei ist es wichtig, dass man beim Zusammenfügen der Komponenten zuerst Enzym mit Puffer mischt und anschließend erst Inhibitor- bzw. Substratlösung zufügt, da die sonst zu hohen DMSO-Konzentration zu Aktivitätsverlust führen.

4.5.1 Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren

Im folgenden Kapitel sind exemplarisch verschiedene Diagramme dargestellt, aus denen die Ermittlung der Hemmkonstanten hervorgeht. F auf der Y-Achse stellt die Fluoreszenz-Intensität dar, auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen.

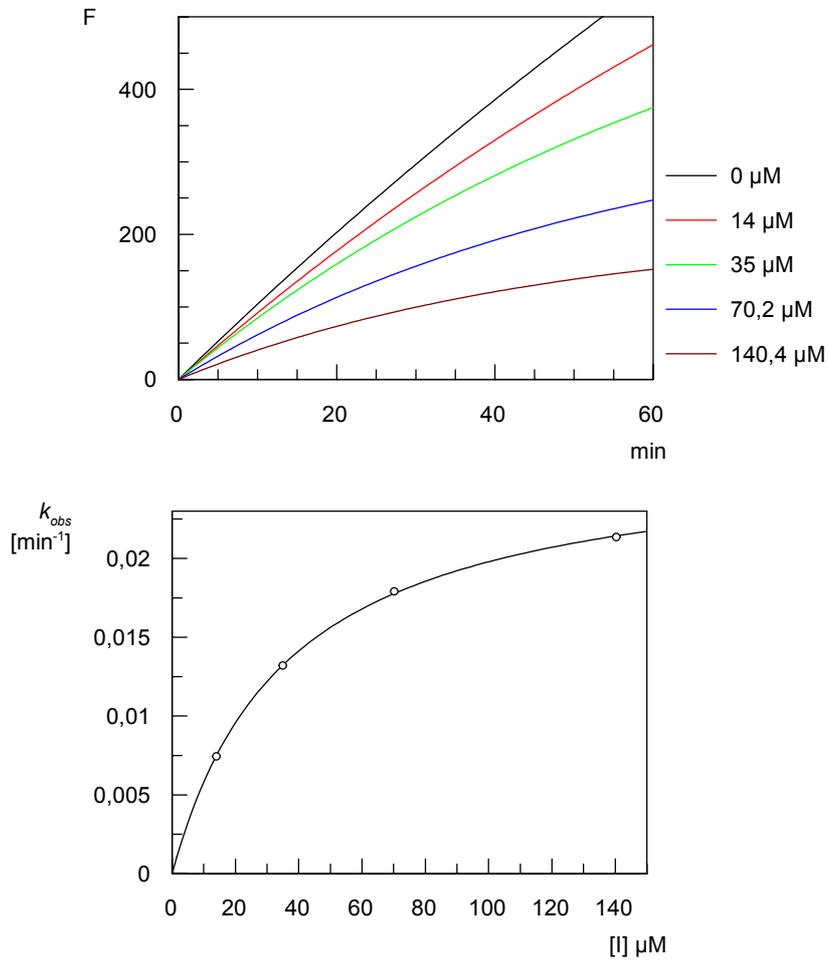
Abbildung 11: Zeitabhängige Hemmung von Cathepsin L durch das Dipeptid Z-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OEt)₂ (600B).



Ermittelte Hemmkonstanten:

- $k_i = 0.014 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$
- $K_i = 0.3 \pm 0.1 \text{ nM}$
- $k_{2nd} = 45\,750 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
- $[S] = 81.0 \text{ μM}, K_m = 6.5 \text{ μM}$

Abbildung 12: Zeitabhängige Hemmung von Cathepsin B durch das Tripeptid BOC-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂ (417G).



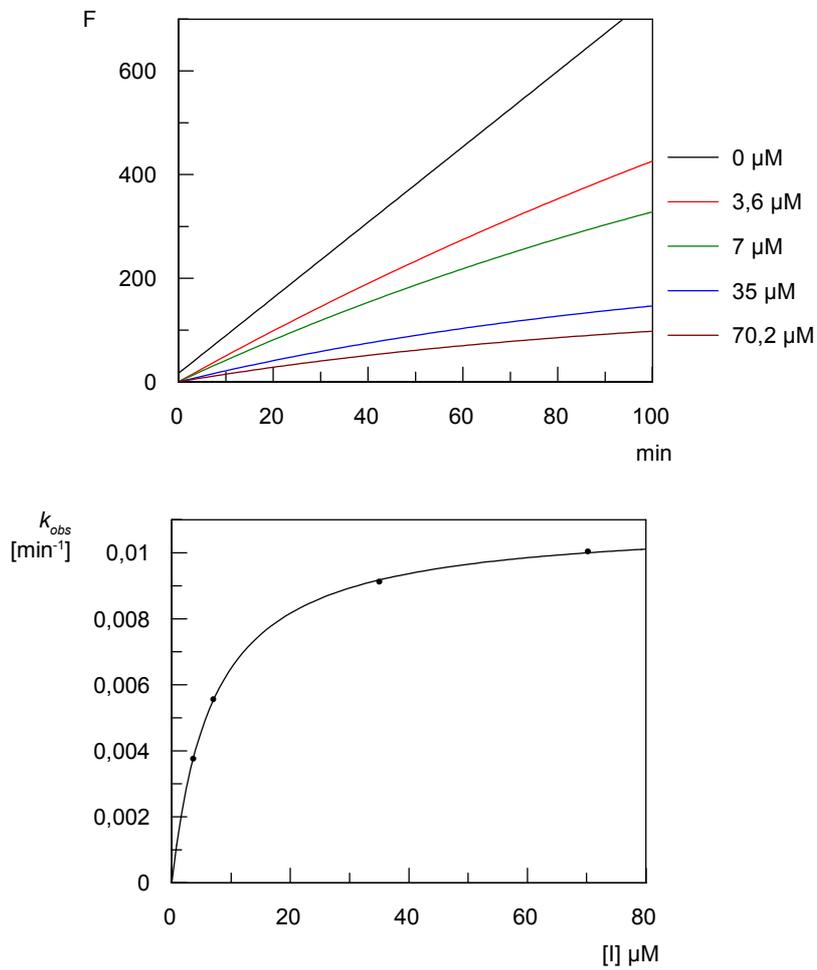
Ermittelte Hemmkonstanten: $k_i = 0.027 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$

$K_i = 18.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$

$k_{2nd} = 1\,475 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

$[S] = 52.6 \mu\text{M}, K_m = 150 \mu\text{M}$

Abbildung 13: Zeitabhängige Hemmung von Cathepsin L durch das Tripeptid BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂ (112D).



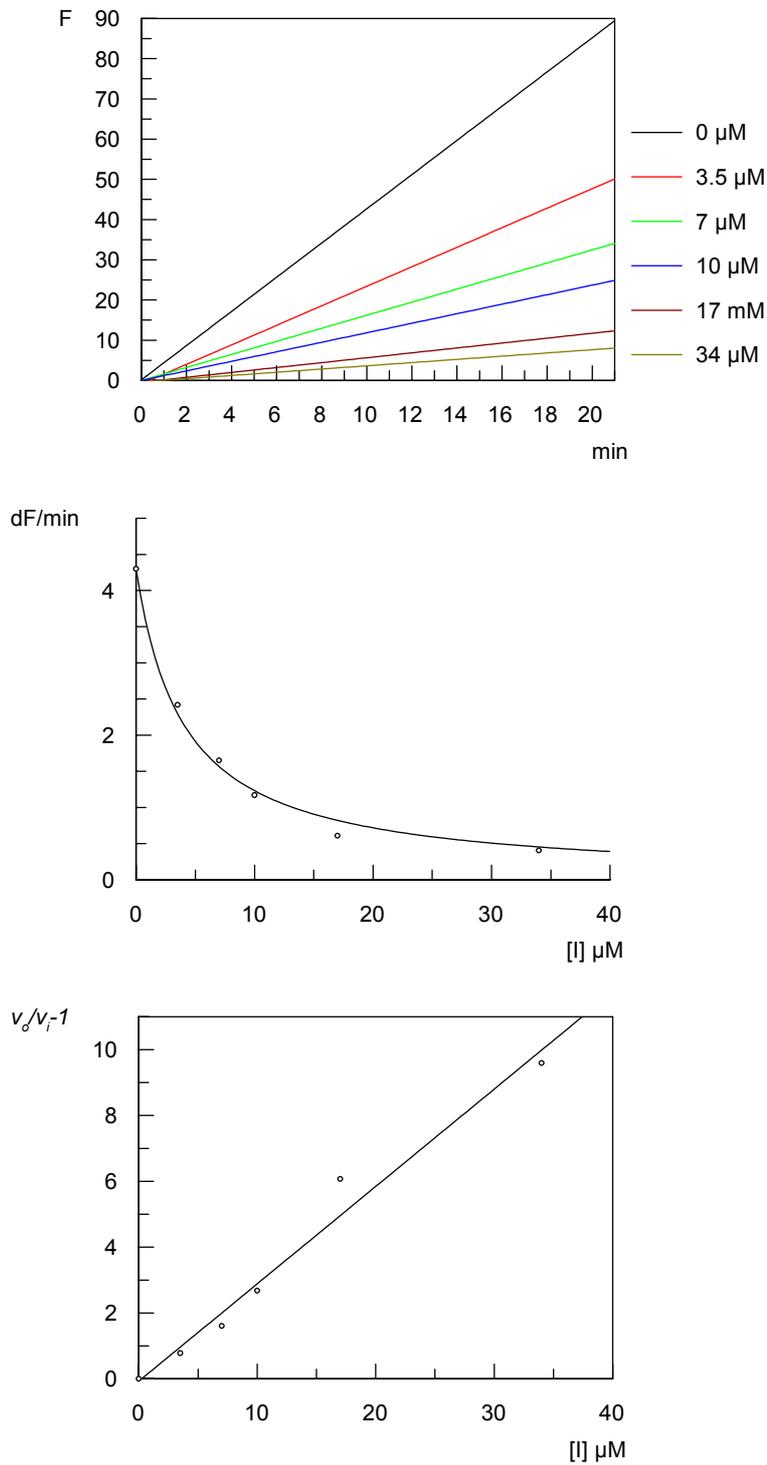
Ermittelte Hemmkonstanten: $k_i = 0.01 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$

$K_i = 0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$

$k_{2nd} = 26\,115 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

$[S] = 81.0 \mu\text{M}, K_m = 6.5 \mu\text{M}$

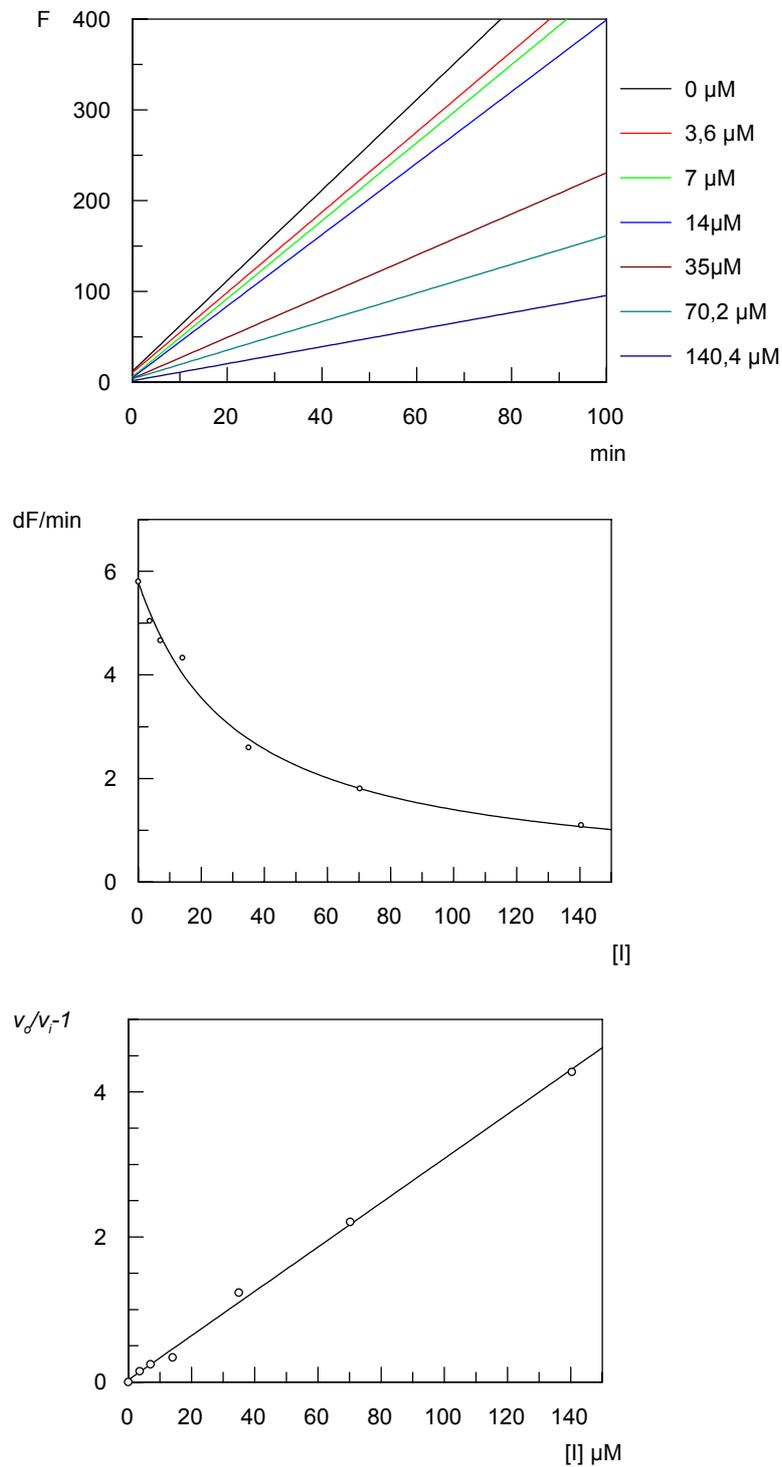
Abbildung 14: Nicht-zeitabhängige Hemmung von Cathepsin L durch den biotinylierten Inhibitor 999C.



Ermittelte Dissoziationskonstante: $K_i = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$[S] = 12.35 \mu\text{M}$, $K_m = 6.5 \mu\text{M}$

Abbildung 15: Nicht-zeitabhängige Hemmung von Rhodessain durch den Inhibitor 116C.



Ermittelte Dissoziationskonstante: $K_i = 0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$[S] = 81.0 \mu\text{M}$, $K_m = 826.5 \text{ nM}$

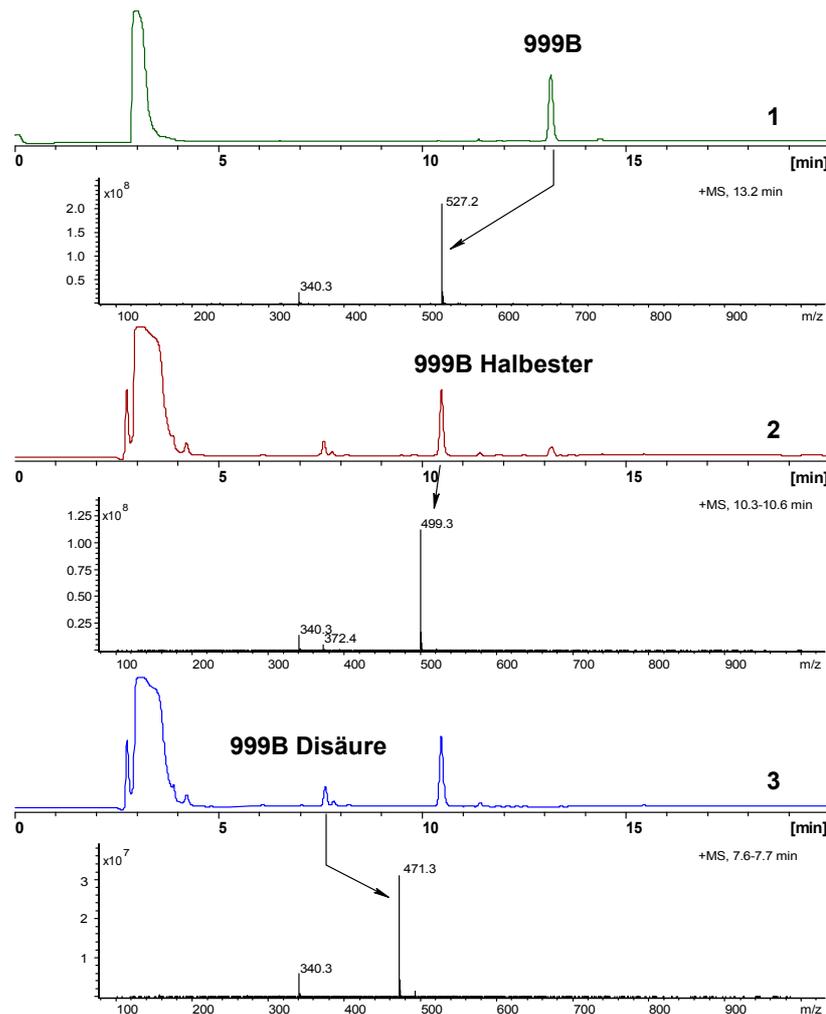
4.5.2 Versuche zur Hydrolysestabilität der Inhibitoren gegenüber Serin-Proteasen.

Um die hydrolytische Stabilität der Peptidkette der Inhibitoren unter Beweis zu stellen, wurden die Inhibitoren **134A**, **105A** und **999B** in einer Konzentration von 150 μM mit den Proteasen Trypsin bzw. Chymotrypsin 1 Stunde in 100 mM TRIS-Puffer pH 8.0 bei 35°C inkubiert und anschließend die Reaktionsansätze mit Hilfe von LC/MS untersucht. Im Reaktionsgemisch wurde in allen Fällen nach 1 Stunde die Hydrolyse der Ethylester in schwach alkalischem Milieu festgestellt, jedoch wurden keine Bruchstücke der Peptidkette gefunden. D.h. die Aziridid-Bindung wird nicht hydrolysiert. Dies steht im Gegensatz zu Versuchen mit *N*-acylierten Inhibitoren, die natürliche, proteinogene Aminosäuren enthalten. Diese werden durch α -Chymotrypsin und Trypsin auch an der Aziridid-Bindung gespalten.^[50]

Mit α -Chymotrypsin erfolgt die Esterspaltung bei **999B** schneller als bei pH 8.0 alleine, d.h. **999B** ist ein Substrat für α -Chymotrypsin.

Abbildung 16 zeigt beispielhaft die Chromatogramme und Massenspektren der Versuche mit **999B**. Zu erkennen ist, dass der Halbester das Hauptprodukt der Hydrolyse ist, neben geringen Anteilen an Disäure.

Abbildung 16: Hydrolyse der Ethylester der Verbindung 999B bei pH=8.0, 35°C.



(1) Vergleichs-Chromatogramm **999B** (bei 215 nm) am Anfang der Inkubation in TRIS-Puffer pH 8.0. (2) **999B** nach 1 Stunde in TRIS-Puffer pH 8.0. (3) **999B** nach 1 Stunde in TRIS-Puffer pH 8.0 mit Chymotrypsin.

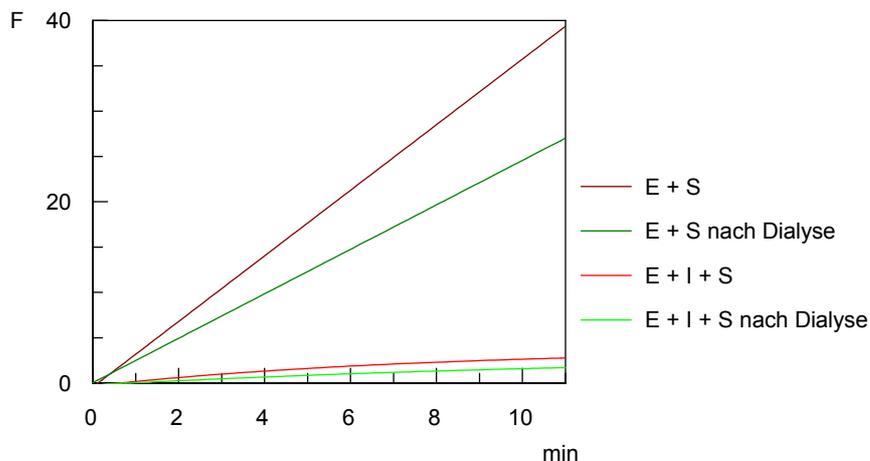
4.5.3 Nachweis der Irreversibilität der Hemmung bei nicht-zeitabhängiger Hemmung

Die Mehrheit der synthetisierten Substanzen zeigte in den Assays einen nicht-zeitabhängigen Verlauf der Umsatz-Zeit-Kurven. Dieses ist auf die sehr kleinen Inaktivierungskonstanten k_i zurückzuführen. Es wurden daher Untersuchungen durchgeführt, die eine eventuelle Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes im Falle einer reversiblen Hemmung nachweisen können.

4.5.3.1 Dialyse

In diesem Verfahren wird das Enzym mit Inhibitor 30 min inkubiert und der Dialyse mit großem Überschuss an Puffer unterzogen.

Abbildung 17: Umsatz-Zeit-Diagramme des Dialyse-Versuches von Cathepsin L mit Bio-HXA-(S,S)-Azi(OBn)₂ (999C).



Cathepsin L in Konzentration von 12.5 ng/ml wurde zusammen mit dem Inhibitor **999C** in einer Konzentration von 334 μM in 10 ml 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, pH 6.0 inkubiert. Gleichzeitig wurde auch eine Kontrolle ohne Inhibitor durchgeführt. Nach 30 min wurde die Rest-Enzymaktivität überprüft und das Reaktionsgemisch in einen Dialyse-Schlauch überführt (27/32, Serva) und gegen einen 25-fachen (250 ml) Überschuss an Puffer dialysiert. Abbildung 17 zeigt Umsatz-Zeit-Diagramme des Enzym-Inhibitor-Gemisches und der Kontrolle. Nach 1 Stunde wurde wiederum die Rest-Enzymaktivität kontrolliert. Die Aktivität des Enzyms im Kontrollversuch sinkt auf etwa 70% der ursprünglichen Aktivität. Das inhibierte Enzym gewinnt nicht wieder an Aktivität zurück, woraus man auf eine irreversible Hemmung schließen kann. Bestätigt wird die irreversible Hemmung durch die Versuche mit den Plasmodien (siehe Kapitel 4.7.1). Hier wurde der biotinylierte Inhibitor dazu verwandt, Cystein-Proteasen der Plasmodien zu "fischen". Unter anderem konnte dabei Falcipain 2 detektiert werden. Dies kann nur gelingen, wenn eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Protease ausgebildet wird.

4.5.3.2 Tryptischer Verdau

Ein elegantes Verfahren, um die kovalente Bindung eines Inhibitors nachzuweisen, stellt der Verdau des inaktivierten Enzyms mittels Trypsin und die anschließende Analyse der Hydrolysefragmente mit Hilfe von LC/MS dar. Trypsin wird für seine selektive und zuverlässige Spaltung (nach Xxx-Arg) in der Protein-Analyse sehr häufig verwendet.

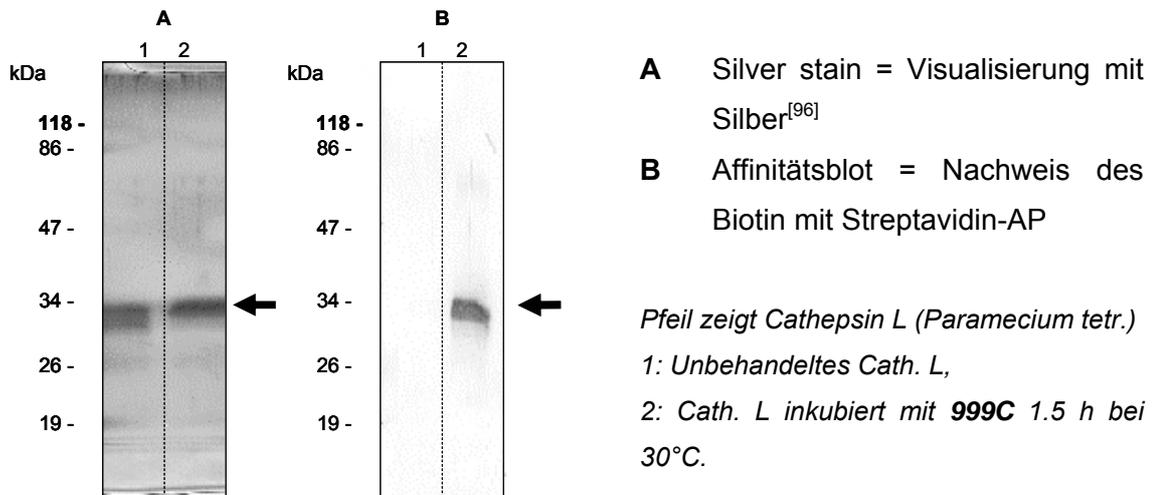
100 μl Cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*, Aktivität 500 mU/ml \approx 6.25 μg in 20 mM TRIS-Cl, pH 6.0, 0.1 mM EDTA, 2.5 DTT) wurden mit 20 μl einer 1 mM Inhibitor-Lösung

999C (166.6 μM) 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde das Enzym-Inhibitor-Gemisch mit 100 μl Reduktionspuffer (6 M Guanidin-HCl, 100 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.3) versetzt und bei 50°C 1 Stunde inkubiert. Der Reduktionspuffer wurde dann mit 10-fachem Volumen-Überschuss an TRIS-Puffer pH 8.5 (100 mM TRIS-HCl, 5 mM DTT) durch Ultrafiltration (cut-off 10 kDa) entfernt. Das Volumen wurde mit dem TRIS-Puffer pH 8.5 auf 200 μl aufgefüllt und anschließend wurde mit 10 μl Trypsin-Lsg. (*bov.* 40 U/mg, c = 1 mg/ml TRIS-Puffer) 12 Stunden bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 90 μl 1 M TFA gestoppt. Gleichzeitig wurde unter identischen Bedingungen auch Cathepsin L ohne Inhibitor eingesetzt und anschließend analysiert. Die LC/MS-Analyse erfolgte an einer Agilent 1100 LC/MSD Trap mit einer Phenomenex Jupiter Proteo Säule (90 Å 4.6 x 150 mm) und einem linearen Gradienten von 10% auf 100% MeCN / 0.1%TFA über 110 min. Das Injektionsvolumen betrug 100 μl , detektiert wurde bei 215 nm.

Die Massen der jeweiligen Fragmente, die bei dem Verdau entstehen, wurden mit der online-zugänglichen Software PeptideMass^[95] berechnet. Bei den LC/MS Analysen konnten leider weder im inaktivierten noch im aktiven Enzym die Fragmente, die jeweils den Cystein-Rest des aktiven Zentrums beinhalten, gefunden werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass dieses Fragment mit einem Molekulargewicht von fast 3 kDa zu groß für die Detektion ist.

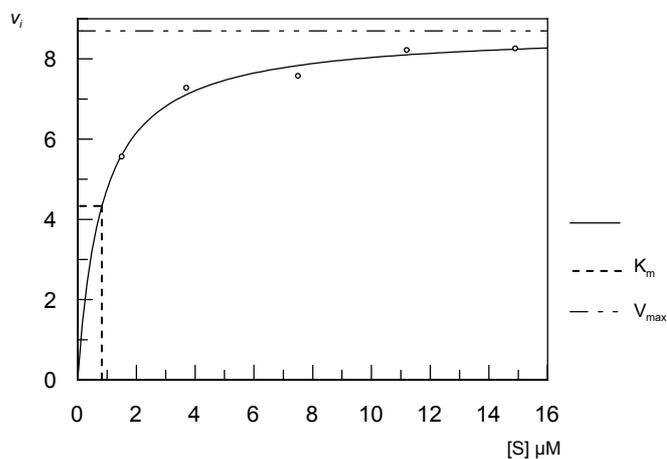
4.5.3.3 Affinitätsmarkierung des kovalent gebundenen biotinylierten Aziridin-Baustein

Die kovalente Bindung des Inhibitors **999C** an Cathepsin L wurde jedoch mittels elektrophoretischer Analyse des inkubierten Enzyms auf SDS-Gel und anschließender Detektion des Biotin-Restes mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Streptavidin-AP) nachgewiesen.

Abbildung 18: Analyse von Cathepsin L, inaktiviert durch Inhibitor 999C.

4.5.4 Bestimmung der K_m -Werte

Um die Hemmkonstanten, die eingesetzten Substrat-Konzentrationen und die Affinitäten des Substrates zu den verschiedenen Enzymen korrigieren zu können, müssen die Michaelis-Konstanten für die jeweiligen Enzyme und Substrate in die Berechnung mit einbezogen werden. K_m -Werte für die Cathepsine L und B sind aus der Literatur bekannt bzw. wurden schon früher im Arbeitskreis bestimmt. Bei Falcipain und Rhodesain mussten jedoch die K_m -Werte bestimmt werden (siehe Tabelle 4-1). Die Aktivitäten der Enzyme wurden 5-mal bei 8 verschiedenen Substrat-Konzentrationen gemessen. Mit Hilfe des Programms Grafit[®] wurden anhand der Michaelis-Menten-Gleichung die K_m - und V_{max} -Werte bestimmt. Abbildung 19 ist ein Beispiel für die K_m -Bestimmung von Rhodesain.

Abbildung 19: Ermittlung der Michaelis-Konstante K_m für Rhodesain / Z-Phe-Arg-AMC.

4.6 Ergebnisse der Enzymassays

Tabelle 4-2: Dissoziationskonstanten K_i für die Hemmung von Cathepsin L, Cathepsin B, Falcipain und Rhodesain.

		Cathepsin L K_i [μ M]	Cathepsin B K_i [μ M]	Falcipain 2 K_i [μ M]	Rhodesain K_i [μ M]
112A	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt) ₂	7.7 ± 1.3	>400	45.3 ± 6.2	3.1 ± 0.6
134A	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	2.4 ± 0.6	24.0 ± 4.1	13.1 ± 1.5	1.0 ± 0.1
105A	Boc-(S)-Leu-Ini-(S,S)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	20.1 ± 3.4	1.4 ± 0.2
131B	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Azet-(R,R)-Azi(OEt) ₂	4.8 ± 0.3	>400	38.7 ± 6.3	3.1 ± 0.2
112B	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
134B	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	5.9 ± 0.8	210.6 ± 11.6	28.9 ± 2.9	1.9 ± 0.4
105B	Boc-(S)-Leu-Ini-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	3.3 ± 0.6
131C	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Azet-(S,S)-Azi(OBn) ₂	3.8 ± 0.2	>400	34.4 ± 3.2	0.8 ± 0.2
112C	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	>400	>400	>400	2.3 ± 0.3
212C	Boc-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	4.0 ± 0.2	>400	28.3 ± 12.0	1.1 ± 0.2
312C	Boc-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	15.8 ± 1.7	43.0 ± 1.9	>400	3.1 ± 0.8
122C	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	6.0 ± 0.8	>400	43.9 ± 5.2	1.2 ± 0.2
222C	Boc-(R)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	>400	>400	>400	2.8 ± 0.3
322C	Boc-Gly-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn) ₂	7.1 ± 0.4	32.6 ± 1.4	94.9 ± 10.5	1.6 ± 0.3
3?3C	Boc-Gly-(?)-Pip-(S,S)-Azi(OBn) ₂	6.4 ± 0.6	>400	50.9 ± 4.6	0.7 ± 0.1
134C	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn) ₂	4.4 ± 0.4	>400	36.2 ± 6.9	0.6 ± 0.1
234C	Boc-(R)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn) ₂	4.2 ± 0.4	>400	48.3 ± 5.8	0.7 ± 0.1
334C	Boc-Gly-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn) ₂	5.9 ± 0.1	>400	48.0 ± 7.8	1.1 ± 0.1

		Cathepsin L <i>K_i</i> [μ M]	Cathepsin B <i>K_i</i> [μ M]	Falcipain 2 <i>K_i</i> [μ M]	Rhodesain <i>K_i</i> [μ M]
116C	Boc-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.013 ± 0.001	9.4 ± 1.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
216C	Boc-(R)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn) ₂	6.4 ± 0.4	>400	31.9 ± 3.2	1.6 ± 0.3
417C	Boc-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	16.6 ± 3.9	170.0 ± 18.8	>400	1.9 ± 0.1
517C	Boc-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	14.7 ± 1.1	>400	>400	>400
427C	Boc-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	15.2 ± 2.1	189.8 ± 12.5	6.5 ± 3.6	1.2 ± 0.3
527C	Boc-(R)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	21.6 ± 4.1	249.6 ± 12.0	45.1 ± 8.9	3.9 ± 1.6
112D	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	0.4 ± 0.2	114.6 ± 17.8	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
012A	Boc-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
012B	Boc-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
Z-013B	Z-(S)-Pip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
Z-023B	Z-(R)-Pip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	22.0 ± 1.8	>400	>400	>400
031B	Z-(R,S)-Azet-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
013A	BOC-(S)-Pip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	3.1 ± 0.5
023A	BOC-(R)-Pip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	53.0 ± 18.9	>400	>400	>400
013B	BOC-(S)-Pip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	155.6 ± 12.6	>400	>400
023B	BOC-(R)-Pip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
034A	BOC-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	>400	61.1 ± 13.0	>400	>400
034B	BOC-(R,S)-Nip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
005A	BOC-Inip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400
005B	BOC-Inip-(R,R)-Azi(OEt) ₂	>400	>400	>400	>400

		Cathepsin L <i>K_i</i> [μM]	Cathepsin B <i>K_i</i> [μM]	Falcipain 2 <i>K_i</i> [μM]	Rhodesain <i>K_i</i> [μM]
600B	Z-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.3 ± 0.1	>400	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
312G	Boc-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂	15.9 ± 1.9	88.3 ± 64.8	>400	0.9 ± 0.1
417G	Boc-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	15.3 ± 1.0	18.3 ± 0.7	8.2 ± 1.3	0.5 ± 0.1
517G	Boc-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	>400	160.1 ± 12.4	10.4 ± 0.9	0.1 ± 0.3
427G	Boc-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	17.8 ± 0.9	105.8 ± 10.0	24.2 ± 4.5	0.8 ± 0.2
527G	Boc-(R)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	26.0 ± 1.9	174.1 ± 10.3	14.4 ± 1.6	5.0 ± 0.3
234G	Boc-(R)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂	52.9 ± 4.3	133.5 ± 15.9	>400	>400
334G	Boc-Gly-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂	>400	>400	>400	>400
322G	Boc-Gly-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂	>400	>400	>400	>400
112G	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂	18.7 ± 1.2	139.4 ± 12.2	>400	>400
105G	Boc-(S)-Leu-Ini-(S,S)-Azi(OH) ₂	17.8 ± 0.8	>400	>400	>400
134G	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂	10.1 ± 0.6	127.6 ± 7.6	92.9 ± 5.1	>400
A7	EtO-(S,S)-Azi-Prz-BOC	>400	>400	>400	>400
A7A	EtO-(S,S)-Azi-Prz-(S,S)-Azi(OEt)	>400	>400	>400	>400
008B	Form-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.5 ± 0.1	>400	1.9 ± 0.6	0.4 ± 0.1
008C	Form-(S,S)-Azi(OBn) ₂	19.7 ± 4.8	>400	7.2 ± 1.3	0.5 ± 0.1
999B	Bio-HXA-(R,R)-Azi(OEt) ₂	1.3 ± 0.7	38.7 ± 10.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
999C	Bio-HXA-(S,S)-Azi(OBn) ₂	1.4 ± 0.1	50.5 ± 6.0	5.4 ± 1.3	>400

Abbildung 20: Diagramm der Affinitäten der Inhibitoren zu Cathepsin L, Cathepsin B, Falcipain und Rhodesain.

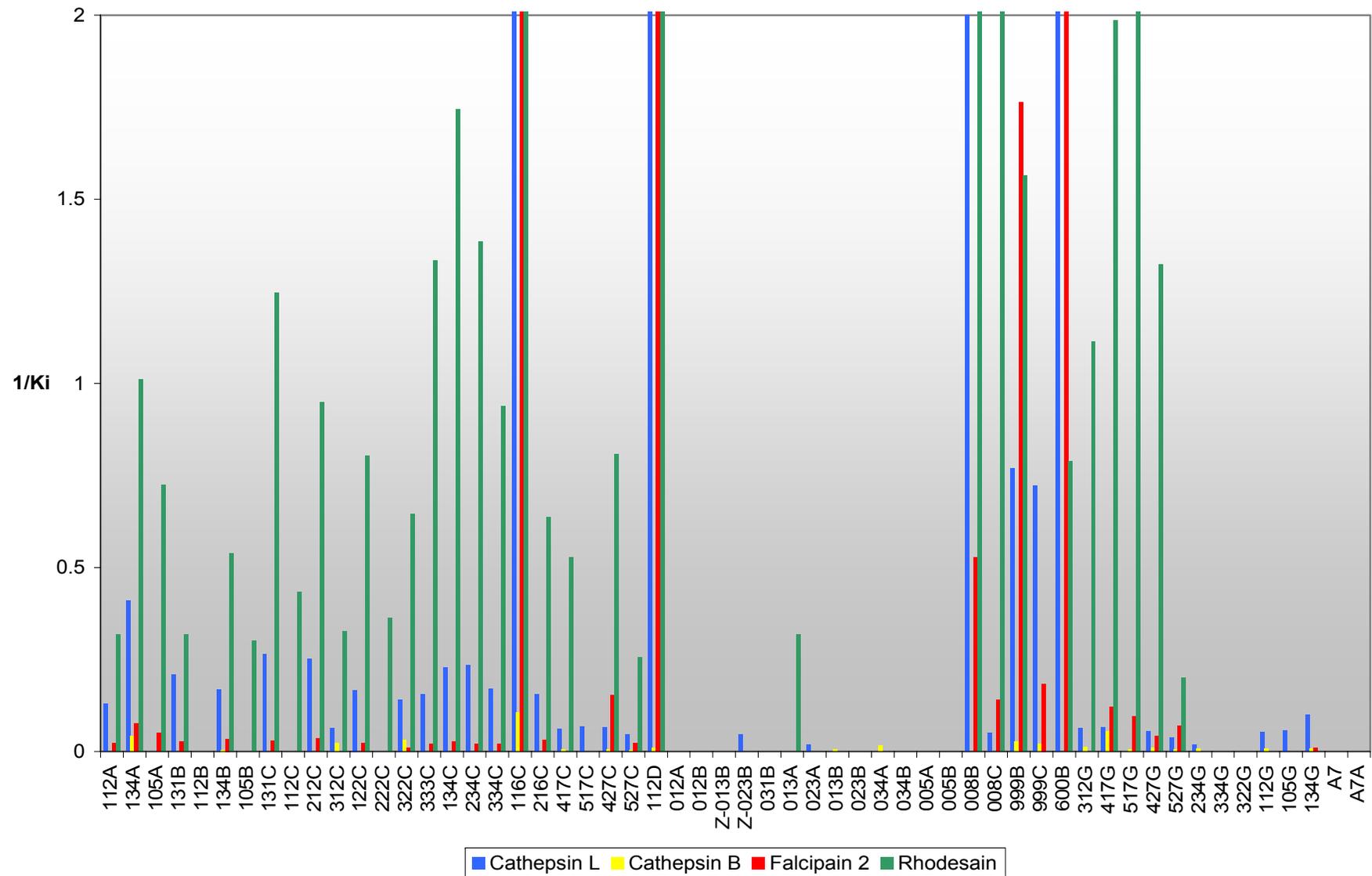


Tabelle 4-3: Hemmkonstanten für die zeit-abhängige Hemmung der Cystein-Proteasen.

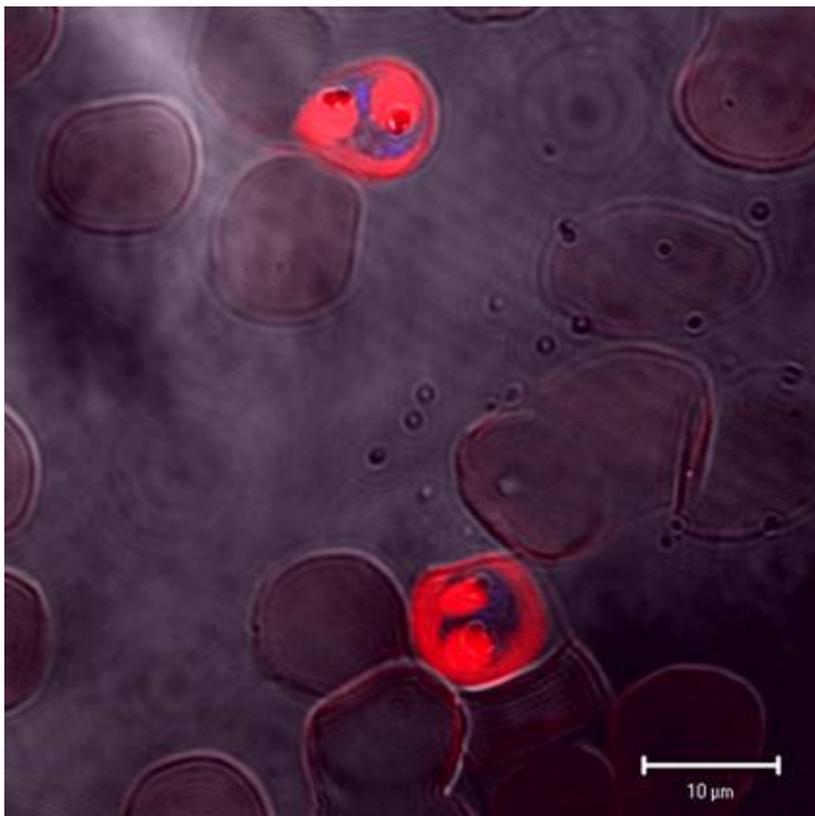
		k_i [min ⁻¹]	K_i [μmol]	k_{2nd} [M ⁻¹ •min ⁻¹]
Cathepsin L				
334C	Boc-Gly-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.007 ± 0.001	5.8 ± 0.1	1 145
112D	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	0.010 ± 0.001	0.4 ± 0.2	26 115
008B	Form-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.028 ± 0.002	0.5 ± 0.1	57 143
999B	Bio-HXA-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.004 ± 0.001	1.3 ± 0.7	3 077
600B	Z-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.014 ± 0.001	0.3 ± 0.1	45 750
Cathepsin B				
134A	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	0.02 ± 0.001	24.1 ± 4.1	833
116C	Boc-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.02 ± 0.001	9.4 ± 1.1	1 915
999B	Bio-HXA-(R,R)-Azi(OEt) ₂	0.025 ± 0.002	38.7 ± 10.2	646
999C	Bio-HXA-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.036 ± 0.002	50.5 ± 6.0	720
312G	Boc-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂	0.028 ± 0.002	88.3 ± 64.8	317
417G	Boc-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	0.027 ± 0.001	18.3 ± 0.7	1 475
234G	Boc-(R)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OH) ₂	0.054 ± 0.004	133.5 ± 15.9	408
112G	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH) ₂	0.058 ± 0.004	139.4 ± 12.2	417
Falcpain 2				
134A	Boc-(S)-Leu-(R,S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt) ₂	0.026 ± 0.006	13.1 ± 1.5	1 957
116C	Boc-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.02 ± 0.001	0.2 ± 0.1	95 238
427C	Boc-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.03 ± 0.002	6.5 ± 3.6	4 615
112D	Boc-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn) ₂	0.02 ± 0.001	0.4 ± 0.1	51 282
Rhodesain				
427C	Boc-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn) ₂	0.044 ± 0.002	1.2 ± 0.3	35 484
517G	Boc-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH) ₂	0.026 ± 0.002	0.1 ± 0.3	185 714

4.7 Biologische Aktivität

4.7.1 Wirkung gegen *Plasmodium sp.*

Die Wirkung auf verschiedene Stadien von *Plasmodium falciparum* wurde ebenfalls untersucht. Abbildung 21 zeigt junge Trophozoiten, Abbildung 22 einen reifen Schizont, jeweils nach 6 h Inkubation mit 10 μM biotinyliertem Inhibitor **999C** und anschließender Detektion mit Streptavidin-Cy3-Konjugat (Rot gefärbt). Die Zellkerne der Plasmodien sind durch den Farbstoff Hoechst 33258 blau angefärbt. Rot sichtbare Regionen auf den Abbildungen zeigen die Lokalisation des kovalent gebundenen **999C** hauptsächlich in den Nahrungsvakuolen der Parasiten aber auch im Cytosol des Erythrozyten. Es wird vermutet, dass die Cystein-Proteasen auch an dem externen Abbau von Hämoglobin beteiligt sind.

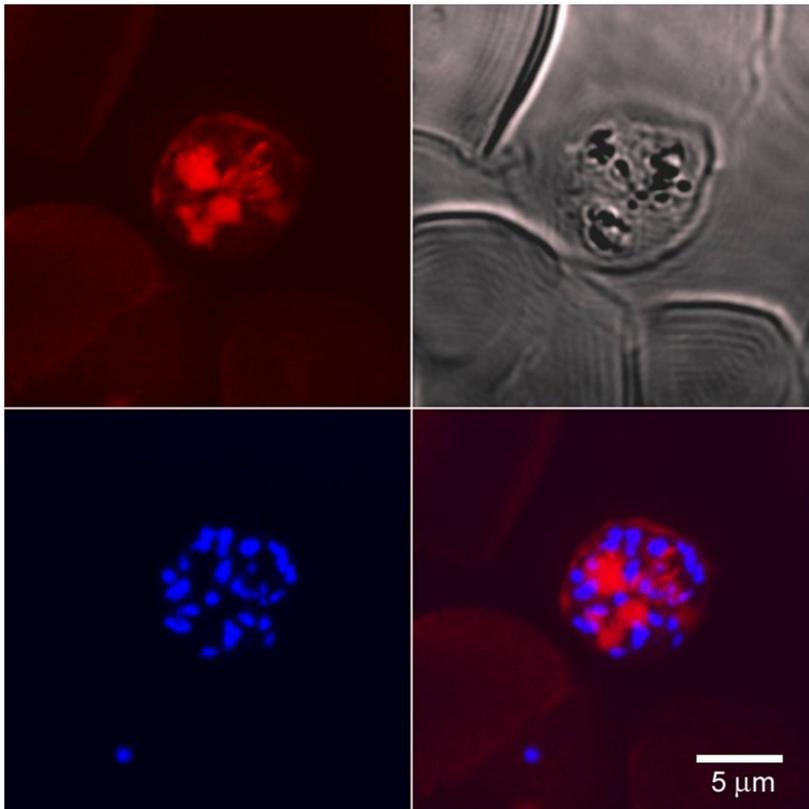
Abbildung 21: Junge Trophozoiten.



Rot: Komplex des kovalent gebundenen Biotins mit Streptavidin-Cy3-Konjugat.

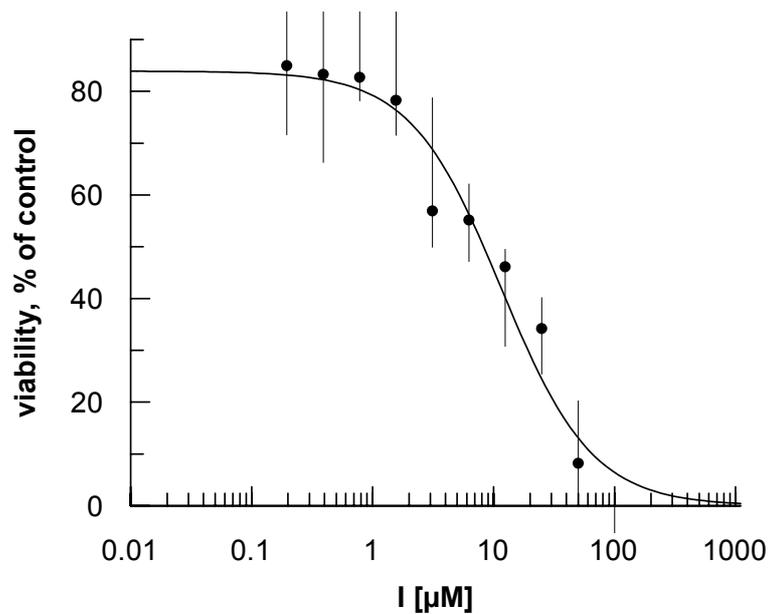
Blau: Kerne der Parasiten mit Hoechst 33258 blau angefärbt.

Abbildung 22: Reifer Schizont



Rot: Komplex des kovalent gebundenen Biotins mit Streptavidin-Cy3-Konjugat.

Blau: Kerne der Parasiten mit Hoechst 33258 blau angefärbt.

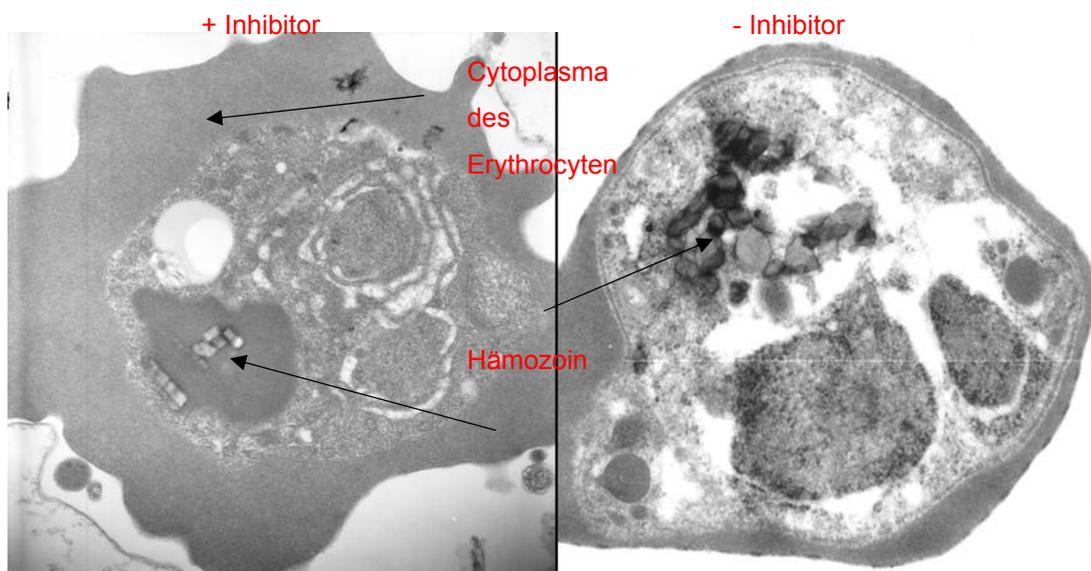
Abbildung 23: IC₅₀-Kurve der Hemmung von Plasmodien mit Inhibitor 999C.

Außerdem wurden die Inhibitoren **999C/B** auf antiplasmodiale Wirkung getestet. Während **999C** einen IC₅₀ von 11 µM für junge Trophozoiten aufweist (Abbildung 23), wurde mit **999B** keine Wirkung auf Plasmodien festgestellt. Da beide Inhibitoren im

Enzymassay an Falcipain 2 vergleichbare K_i -Werte aufweisen, liegt die fehlende antiplasmodiale Wirkung des Diethylesters möglicherweise an einer zu geringen Lipophilie und damit schlechten Membrangängigkeit.

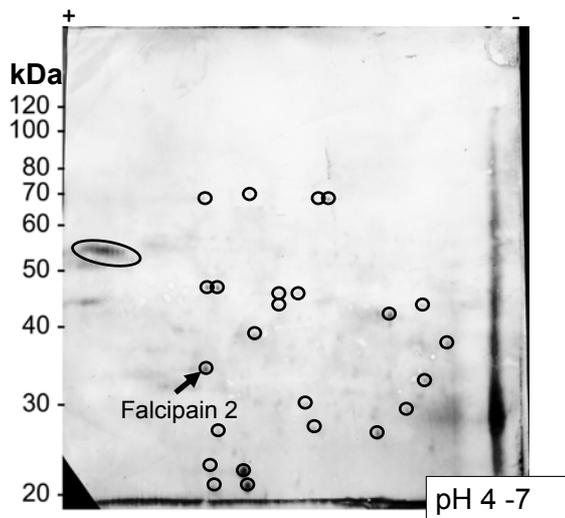
Eine Verlangsamung des Abbaus von erythrozytärem Hämoglobin, einhergehend mit einem Anschwellen der Nahrungsvakuole und einer geringeren Ablagerung von Hämozoïn in Anwesenheit von **999C** ist deutlich auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 24) zu sehen.

Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Erythrocyten.



Plasmodiale Zellen, die mit **999C** inkubiert wurden, wurden anschließend zerstört und nach Protein-Extraktion einer 2D-PAGE-Analyse (Poly-Acryl-Gel-Electrophoresis) unterzogen. Die mit biotinyliertem Inhibitor markierten Proteine, mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat sichtbar gemacht, sind in Abbildung 25 eingekreist. Bisher konnten mittels MALDI-Massenspektrometrie Falcipain-2 und Falcipain-3 identifiziert werden.

Abbildung 25: 2D-PAGE eines Homogenats aus mit Plasmodien infizierten Erythrocyten.



Die Hemmung der Merozoitenfreisetzung aus Hepatocyten durch **999C** wurde im Arbeitskreis Prof. V. Heussler, Biologisches Institut, Universität Hamburg untersucht. Hepatocyten (*HepG2*) wurden dazu mit Sporozoiten von *Plasmodium berghei* infiziert. Nach 48 Stunden wurde der Inhibitor **999C** in einer Konzentration von 40 μM zugegeben und weitere 60 Stunden inkubiert. Es konnte leider weder eine Hemmung des Wachstums noch der Freisetzung der Merozoiten festgestellt werden. Die im Vergleich mit Erythrocyten für die Metabolisierung verschiedener Xenobiotika optimale enzymatische Ausrüstung von Hepatocyten hat offensichtlich auf die Lebensdauer des Inhibitors einen fatalen Einfluss. Man kann vermuten, dass, katalysiert durch verschiedene Esterasen oder Lipasen, eine Hydrolyse der Verbindung **999C** stattfindet.

4.7.2 Aktivität gegen *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Staphylococcus sp.* und Hemmung der Biofilmbildung

Einige der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Substanzen nehmen am Screening des SFB 630 gegen verschiedene Krankheitserreger teil. **112C** zeigte von den bisher getesteten Verbindungen **112C**, **312C**, **322C**, **312G**, **322G**, **012A**, **034A**, **034B**, **112A**, **134A**, **105A**, **134B**, **105B**, **999B**, **008B**, **008C** als einzige Verbindung eine Aktivität gegen *Trypanosoma brucei* mit einer $\text{LC}_{50} = 28.57 \mu\text{M}$. Alle getesteten Substanzen weisen keine Wirkung gegen *Leishmania major*. Die Substanzen **131C**, **134C**, **234C**, **3?3C**, **334C** und **112D** zeigen eine moderate Hemmung der Biofilmbildung, dagegen aber keine Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus*, Stamm 325 wt (Abbildung 26).

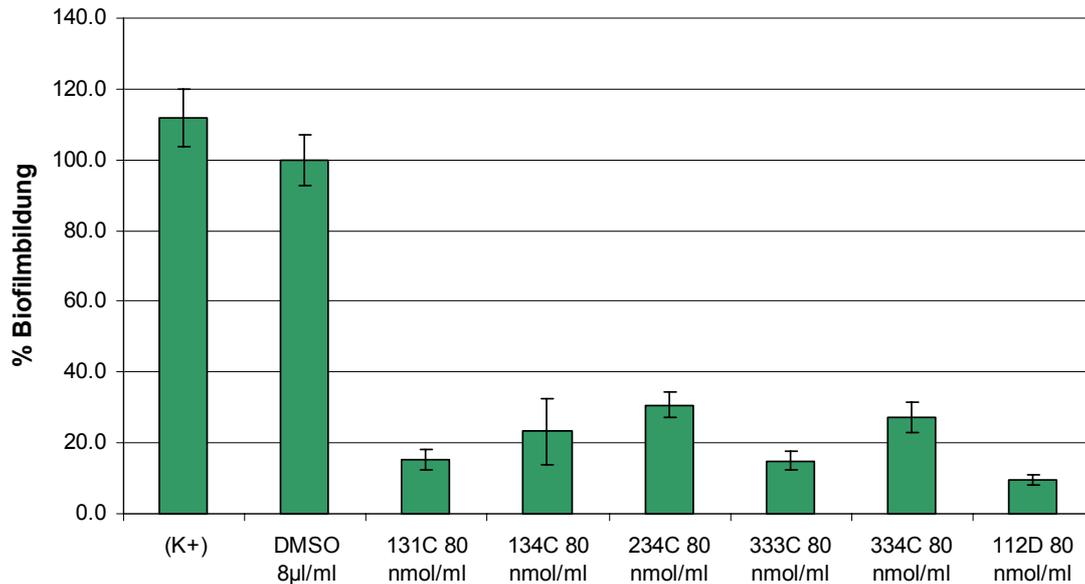
Abbildung 26: Hemmung der Biofilmbildung des *Staph. aureus* 325 wt.

Tabelle 4-4: Wachstumshemmung und Hemmung der Biofilmbildung.

Assay		WH/BFH	WH bei 160µM	
131C	MHK	<i>S.aureus</i> MA12	MIC > 160 µM	ca. 25%
		<i>S.epidermidis</i> RP62	MIC > 160 µM	ca. 50%
		<i>E.coli</i> 536	MIC > 160 µM	ca. 40%
		<i>P.aeruginosa</i> Nr.3	MIC > 160 µM	ca. 30%
	BF	<i>S.epidermidis</i> RP62	0	
		<i>S.aureus</i> 8325wt	15% BFH	
		<i>S.aureus</i> 325	85% BFH	
134C	MHK	<i>S.aureus</i> MA12	MIC > 160 µM	ca. 30%
		<i>S.epidermidis</i> RP62	MIC > 160 µM	ca. 60%
		<i>E.coli</i> 536	MIC > 160 µM	ca. 40%
		<i>P.aeruginosa</i> Nr.3	MIC > 160 µM	ca. 30%
	BF	<i>S.epidermidis</i> RP62	0	
		<i>S.aureus</i> 8325	27% BFH	
		<i>S.aureus</i> 325	77% BFH	

	Assay		WH/BFH	WH bei 160µM
234C	MHK	<i>S.aureus MA12</i>	MIC > 160 µM	ca. 25%
		<i>S.epidermidis RP62</i>	MIC > 160 µM	ca. 45%
		<i>E.coli 536</i>	MIC > 160 µM	
		<i>P.aeruginosa Nr.3</i>	MIC > 160 µM	
	BF	<i>S.epidermidis RP62</i>	0	
		<i>S.aureus 8325</i>	0	
		<i>S.aureus 325</i>	70% BFH	
333C	MHK	<i>S.aureus MA12</i>	MIC > 160 µM	
		<i>S.epidermidis RP62</i>	MIC > 160 µM	ca. 70%
		<i>E.coli 536</i>	MIC > 160 µM	ca. 40%
		<i>P.aeruginosa Nr.3</i>	MIC > 160 µM	
	BF	<i>S.epidermidis RP62</i>	0	
		<i>S.aureus 8325</i>	0	
		<i>S.aureus 325</i>	85% BFH	
334C	MHK	<i>S.aureus MA12</i>	MIC > 160 µM	
		<i>S.epidermidis RP62</i>	MIC > 160 µM	ca. 50%
		<i>E.coli 536</i>	MIC > 160 µM	ca. 30%
		<i>P.aeruginosa Nr.3</i>	MIC > 160 µM	
	BF	<i>S.epidermidis RP62</i>	0	
		<i>S.aureus 8325</i>	0	
		<i>S.aureus 325</i>	73% BFH	
112D	MHK	<i>S.aureus MA12</i>	MIC > 160 µM	
		<i>S.epidermidis RP62</i>	MIC > 160 µM	ca. 25%
		<i>E.coli 536</i>	MIC > 160 µM	
		<i>P.aeruginosa Nr.3</i>	MIC > 160 µM	
	BF	<i>S.epidermidis RP62</i>	0	
		<i>S.aureus 8325</i>	0	
		<i>S.aureus 325</i>	90% BFH	

MHK = Mikrobouillondilutionstest, BF = Biofilmtest, MIC = minimale Hemmkonzentration,
 WH = Wachstumshemmung, BFH = Hemmung der Biofilmbildung.

5. Diskussion der Ergebnisse und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

In den folgenden Kapiteln wird versucht, die vielen, auf den ersten Blick unübersichtlich wirkenden Hemmdaten, systematisch nach bestimmten Kriterien (z.B. Stereochemie, Substituent am Aziridinring, Selektivität gegenüber einzelnen Enzymen, Peptidsequenz und deren Stereochemie, etc.) zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar sehr viele Inhibitoren dargestellt und getestet, eine bzgl. aller Kriterien vollständige Reihe an Inhibitoren konnte natürlich nicht synthetisiert werden. Eine Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen kann daher nur Trends widerspiegeln.

5.1 Selektivität der Inhibitoren bzgl. der Enzyme

5.1.1 CB vs. CL-like

Alle synthetisierten Inhibitoren hemmen die Enzyme der Cathepsin-L-Subfamilie (Cathepsin L, Falcipain und Rhodesain) wesentlich besser als Cathepsin B. Erwartungsgemäß wird, mit wenigen Ausnahmen, ein relativ geringer Unterschied in der Aktivität der Inhibitoren innerhalb der Cathepsin L-Subfamilie festgestellt.

Die Verbindungen **116C** (BOC-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn)₂), **112D** (BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂), **134A** (BOC-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn)₂) und **417G** (BOC-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂) zeigen die beste unspezifische Hemmung für alle Enzyme, einschließlich Cathepsin B, wobei auch hier die Hemmung von Cathepsin B wesentlich schlechter ist.

Von allen in der vorliegenden Arbeit getesteten Enzymen wird am besten Rhodesain gehemmt, gefolgt von Cathepsin L, Falcipain 2 und schließlich Cathepsin B.



Unter den Inhibitoren finden sich auch einige, die für einzelne Enzyme selektiv sind, d.h. bei denen für die anderen Enzyme keine Hemmung bis zu einer Inhibitorkonzentration von ca. 140 µM festgestellt werden konnte. So wird Rhodesain selektiv von **105B** (BOC-(S)-Leu-Ini-(R,R)-Azi(OEt)₂), **112C** (BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂), **222C** (BOC-(R)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂) und **013A** (BOC-(S)-Pip-(S,S)-Azi(OEt)₂) gehemmt, während Cathepsin L von **Z-023B** (Z-(R)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂), **023A** (BOC-(R)-Pip-(S,S)-Azi(OEt)₂), **517C** (BOC-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OBn)₂) und **105G** (BOC-(S)-Leu-Ini-(S,S)-Azi(OH)₂) selektiv inhibiert wird. Für Cathepsin B zeigen folgende Substanzen eine zwar schwache, aber dennoch selektive Hemmwirkung: **013B** (BOC-(S)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂), **034A** (BOC-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt)₂). Für Falcipain weist

dagegen keine Substanz eine Selektivität auf. Tabelle 5-1 fasst die jeweils fünf besten Hemmstoffe für die einzelnen Enzyme zusammen, jeweils in der Reihenfolge ihrer Hemmstärken. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in der Tabelle außerdem die K_i -Werte (in μM) auch für die anderen Enzyme angegeben. Dabei wurden nur die peptidischen und peptidomimetischen Inhibitoren berücksichtigt, nicht jedoch die Biotin- und *N*-Formyl-Derivate (Kapitel 5.7).

Tabelle 5-1: Die wirksamsten Inhibitoren für die jeweiligen Enzyme, nach Hemmstärke geordnet.

	Cathepsin L (K_i)	Cathepsin B (K_i)	Falcpain 2 (K_i)	Rhodesain (K_i)
1.	116C (0.013)	116C (9.4)	116C (0.21)	517G (0.14)
2.	600B (0.3)	417G (18.3)	600B (0.42)	116C (0.32)
3.	112D (0.37)	134A (24)	112D (0.39)	112D (0.49)
4.	134A (2.4)	322C (32.6)	427C (6.5)	417G (0.5)
5.	131C (3.8)	312C (43)	417G (8.2)	134C (0.57)
	134C (4.4)	112D (115)	134A (13.1)	131C (0.8)
	322C (7.1)		131C (34.4)	134A (0.99)
	417G (15.3)		134C (36.2)	322C (1.6)
	312C (15.8)		322C (94.9)	312C (3.1)

Nachfolgende Tabelle 5-2 fasst die jeweils selektiven Inhibitoren zusammen, ebenfalls in der Reihenfolge ihrer Hemmstärke.

Tabelle 5-2: Selektive Inhibitoren, nach Hemmstärke geordnet.

	Cathepsin L (K_i)	Cathepsin B (K_i)	Rhodesain (K_i)
1.	517C (14.7)	034A (61.1)	112C (2.3)
2.	105G (17.8)	013B (156)	222C (2.8)
3.	Z-023B (22)		105B (3.3)
4.	023A (53)		013A (3.1)

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

Bei den beiden parasitären Enzymen hemmen praktisch alle Inhibitoren Rhodesain besser als Falcipain, mit einer Ausnahme, **134G**, das Falcipain bevorzugt (FP: 92.9 μM , RD: keine Hemmung).

Zwischen CB und CL lässt sich eine eindeutige Selektivität für CL feststellen. Alle Inhibitoren wirken gegen CB nur schwach oder gar nicht.

Sucht man nach Inhibitoren, die die beiden parasitären Proteasen hemmen, nicht jedoch die Cathepsine, so wird man bei zwei Inhibitoren fündig:

105A, das für FP einen K_i -Wert von 20.1 μM und für RD einen von 1.4 μM aufweist. Verbindung **517G** ist in dieser Hinsicht ähnlich selektiv: CL: keine Hemmung, CB: 160 μM , FP: 10.4 μM und RD: 0.14 μM .

Umgekehrt weisen die beiden Disäuren **234G** und **112G** eine Hemmung der Cathepsine bei gleichzeitiger Unwirksamkeit gegenüber den parasitären Proteasen auf (**234G**: 53/133.5 μM ; **112G**: 18.7/139.4 μM , CL/CB).

5.2 Stereoselektivität der Hemmung

5.2.1 Einfluss der Konfiguration des Aziridinrings

Die (S,S)-konfigurierten Diethylester weisen höhere Hemmaktivitäten auf als die entsprechenden Verbindungen mit (R,R)-konfiguriertem Aziridinring. Bei Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylaten ist die Tendenz genau umgekehrt. Hier steht allerdings nur ein Diastereomerenpaar für einen Vergleich zur Verfügung (**112D** vs. **112C**). Substanz **112D** zeigt eine gute Hemmung im Vergleich zu Verbindung **112C**, die bis auf Rhodesain keines der Enzyme hemmt.

Tabelle 5-3: Einfluss der Konfiguration und Substitution des Aziridinrings.

Cathepsin L			
	Konfig. Aziridin	Ester /Säure	K_i [μM]
112A	S,S	Et, Et	7.7
112B	R,R	Et, Et	-
112C	S,S	Bn, Bn	-
112D	R,R	Bn, Bn	0.4
112G	S,S	H, H	18.7

Der Unterschied wird besonders deutlich am Beispiel von Cathepsin L beim Vergleich der Affinitäten der Substanzen mit BOC-(S)-Leu-(S)-Pro Peptidkette, die sich nur in Konfiguration und Substitution des Aziridinrings unterscheiden (Tabelle 5-3).

5.2.2 Einfluss der Konfiguration von Leucin

Folgende diastereomere Inhibitoren unterscheiden sich jeweils nur in der Konfiguration der Aminosäure Leucin: **112C** vs. **212C**, **122C** vs. **222C**, **134C** vs. **234C**, **116C** vs. **216C** und **134G** vs. **234G**. Offensichtlich hängt die Stereoselektivität bzgl. des Leucin-Restes von der Konfiguration der cyclischen Aminosäure ab. Der Vergleich zwischen **112C** und **212C**, die jeweils einen (S)-konfigurierten Prolin-Baustein enthalten, ergibt, dass **212C** mit (R)-Leu besser wirksam ist als **112C**. Umgekehrt ist **122C** mit (R)-Pro und (S)-Leu besser wirksam als **222C** mit (R)-Pro und (R)-Leu. Bei den Estern **134C** und **234C**, sowie den Säuren **134G** und **234G** handelt es sich jeweils um Diastereomere Gemische, die die Aminosäure Nip in beiden Konfigurationen enthalten. Hier sind die Gemische ungefähr gleich wirksam. Möglich ist, dass hier die einzelnen Diastereomere in Abhängigkeit von der Konfiguration des Nip-Restes ebenfalls unterschiedliche Hemmung zeigen. Ein Vergleich der Verbindungen **116C** und **216C**, die beide die Aminosäure (S)-Azy enthalten, ergibt, dass **116C** mit (S)-konfiguriertem Leu-Rest bei allen Enzymen besser wirksam ist. Die nachfolgende Tabelle 5-4 verdeutlicht die Unterschiede in den genannten Verbindungen.

Tabelle 5-4: Einfluss der Konfiguration des Leucin-Restes auf die Selektivität.

CL / FP / RD			
	Konfig. Leu	Cycl. Aminosäure	K_i [μ M]
112C	S	(S)-Pro	- / - / 2.3
212C	R	(S)-Pro	4 / 28.3 / 1.1
122C	S	(R)-Pro	6 / 43.9 / 1.2
222C	R	(R)-Pro	- / - / 2.8
134C	S	(R+S)-Nip	4.4 / 36.2 / 0.57
234C	R	(R+S)-Nip	4.2 / 48.3 / 0.72
116C	S	(S)-Azy	0.013 / 0.21 / 0.32
216C	R	(S)-Azy	6.4 / 31.9 / 1.6
134G	S	(R+S)-Nip	10.1 / 92.9 / -
234G	R	(R+S)-Nip	53 / - / -

5.2.3 Einfluss der Konfiguration der Aminosäure Prolin

Ein Vergleich bzgl. der Konfiguration der cyclischen Aminosäure kann nur bei den Prolin- und Pipecolinsäure-Derivaten durchgeführt werden, da eine Trennung der Diastereomeren, welche die als Racemate eingesetzten Aminosäuren (*R+S*)-Nip und (*R+S*)-Azet enthalten, bisher nicht gelang. Als Inhibitoren, die die Aminosäure Pip enthalten, konnten fast ausschließlich nur Dipeptide synthetisiert werden. Diese sind bis auf wenige Ausnahmen unwirksam. Daher erübrigt sich hier ein Vergleich bzgl. der Konfiguration der Pipecolinsäure.

Tabelle 5-5: Einfluss der Konfiguration des Prolin-Rings auf die Selektivität.

CL / FP / RD			
	Konfig. Pro	N-Terminus	K_i [μ M]
112C	<i>S</i>	BOC-(<i>S</i>)-Leu	- / - / 2.3
122C	<i>R</i>	BOC-(<i>S</i>)-Leu	6 / 43.9 / 1.2
212C	<i>S</i>	BOC-(<i>R</i>)-Leu	4 / 28.3 / 1.1
222C	<i>R</i>	BOC-(<i>R</i>)-Leu	- / - / 2.8
312C	<i>S</i>	BOC-Gly	15.8 / - / 3.1
322C	<i>R</i>	BOC-Gly	7.1 / 94.9 / 1.6
312G	<i>S</i>	BOC-Gly	15.9 / - / 0.9
322G	<i>R</i>	BOC-Gly	- / - / -

Ein Vergleich der Inhibitoren mit Leu-Pro-Sequenz zeigt, wie oben schon beschrieben, dass eindeutig die heterochiralen Verbindungen die besseren Inhibitoren sind (**122C** mit (*S*)-Leu-(*R*)-Pro und **212C** mit (*R*)-Leu-(*S*)-Pro). Bei den Verbindungen mit BOC-Gly als N-Terminus unterscheiden sich die Ester von den Säuren: bei den Estern ist die Verbindung mit (*R*)-konfiguriertem Pro (**322C**) der bessere Hemmstoff, bei den Säuren umgekehrt die Verbindung **312G**, die (*S*)-Pro enthält (siehe Tabelle 5-5).

5.2.4 Einfluss der Aminosäure-Konfiguration bei den Phe-Ala-Derivaten

Bei den Phe-Ala-Derivaten wurden jeweils alle 4 diastereomeren Dibenzylester und Säuren synthetisiert. Der Aziridinring ist in allen Verbindungen (*S,S*)-konfiguriert. Bei diesen Derivaten ist es im Gegensatz zu den Leu-Pro-Derivaten nicht möglich, einen für

alle drei CL-like Proteasen gültigen Trend zu finden. Für CL gilt, dass alle Phe-Ala-Derivate, unabhängig von der Konfiguration der Aminosäuren und gleichgültig ob Ester oder Säure, mit der Ausnahme von **517G** etwa gleich gut wirksam sind.

Tabelle 5-6: Hemmungsaktivitäten der Phe-Ala Reihe.

CL / FP / RD			
	Konfig. Phe	Konfig. Ala	K_i [μ M]
417C	<i>S</i>	<i>S</i>	16.6 / - / 1.9
427C	<i>S</i>	<i>R</i>	15.2 / 6.5 / 1.24
517C	<i>R</i>	<i>S</i>	14.7 / - / -
527C	<i>R</i>	<i>R</i>	21.6 / 45.1 / 3.9
417G	<i>S</i>	<i>S</i>	15.3 / 8.2 / 0.5
427G	<i>S</i>	<i>R</i>	17.8 / 24.2 / 0.76
517G	<i>R</i>	<i>S</i>	- / 10.4 / 0.14
527G	<i>R</i>	<i>R</i>	26 / 14.4 / 5

Für FP und RD gilt, dass die beiden (*S*)-Ala-Derivate als Säuren besser sind, wohingegen bei den Estern die beiden (*R*)-Ala-Derivate eine gute Hemmung aufweisen. Die Unterschiede in den Hemmkonstanten bei den diastereomeren Disäuren sind insgesamt jedoch gering (Tabelle 5-6).

5.2.5 Vergleich von Enantiomeren

Alle bisher miteinander verglichenen Verbindungen sind Diastereomere. Die Verbindungen **222C** und **112D** sind dagegen Enantiomere (BOC-Leu-Pro-Azi(OBn)₂). Für alle Enzyme gilt hier, dass Verbindung **112D** mit der Konfiguration *S,S,R,R* besser hemmt als **222C** mit der Konfiguration *R,R,S,S*. **112D** ist von allen getesteten Leu-Pro-Derivaten das an allen Enzymen wirksamste (CL/CB/FP/RD: 0.37/115/0.39/0.49 μ M).

5.3 Einfluss der Substituenten am Aziridinring: Ethylester, Benzylester, freie Säuren

Aus der Reihe der BOC-Phe-Ala-Derivate (**417**, **517**, **427**, **527**) wirkt die Disäure **417G** am stärksten gegen alle Enzyme. Ein Vergleich in dieser Reihe zwischen Dibenzylester (**C**) und den entsprechenden Disäuren (**G**), zeigt, dass für Cathepsin L die Ester etwa gleich wirksam sind wie die Disäuren. Für alle drei anderen Enzyme gilt, dass die Disäuren (**G**) eine bessere Hemmung aufweisen als die Dibenzylester (**C**). Auffallend ist der Unterschied zwischen BOC-(*R*)-Phe-(*S*)-Ala-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (**517C**) und der entsprechenden Disäure **517G**: Der Diester hemmt ausschließlich CL, die Disäure dagegen FP und RD.

Bei den Verbindungen mit der Peptidsequenz (*S*)-Leu-(*S*)-Pro-(*S,S*)-Azi (**112**) und (*S*)-Leu-(*R+S*)-Nip-(*S,S*)-Azi (**134**) können jeweils Diethylester (**A**), Dibenzylester (**C**) und Disäuren (**G**) verglichen werden. Hier wirken bei den CL-like Proteasen eindeutig die Ester besser als die Säuren. Für CL und FP sind die Diethylester hier besser als die Dibenzylester, für die Hemmung von RD besteht kaum ein Unterschied zwischen Diethyl- und Dibenzylester. Die Tendenz, dass die Ester im Vergleich zu den Säuren die besseren Inhibitoren sind, setzt sich bei folgenden Verbindungen fort, die bei gleicher Peptidsequenz und Konfiguration jeweils als Dibenzylester und Disäuren vorliegen: **322C** vs. **322G**, **234C** vs. **234G**, **334C** vs. **334G**. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die Verbindungen **312C/G** bzw. **105A/G**. Bei den BOC-Gly-(*S*)-Pro-(*S,S*)-Azi-Derivaten (**312**) sind Ester (**C**) und Säuren (**G**) etwa gleich wirksam, für BOC-(*S*)-Leu-Ini-(*S,S*)-Azi (**105**) gilt, dass der Diethylester (**A**) selektiv die parasitären Proteasen hemmt, während die Disäure (**G**) ein selektiver CL-Inhibitor ist.

Insgesamt verbessert sich durch die freien Säuren am Aziridinring die Affinität für CB.

5.4 Tripeptide vs. Dipeptide

Allgemein sind die Aziridinyl-Dipeptide unwirksam gegen die getesteten Enzyme mit der Ausnahme von Verbindung **600B** (mit Z-Leu als *N*-Terminus) die eine sehr gute Hemmung aller CL-like Proteasen aufweist. Nur Dipeptide mit Pip-Baustein weisen für einzelne Enzyme messbare Hemmkonstanten auf: **Z-023B**, **023A** für CL, **013A** für RD sowie **013B** und **034A** für CB.

5.5 Vergleich der Aminosäuren

5.5.1 Vergleich der cyclischen Aminosäuren

Bei den Derivaten, die Prolin oder eine andere cyclische Aminosäure enthalten, variiert die Ringgröße dieser cyclischen Aminosäure vom 3-Ring ((S)-Azy), über den 4-Ring ((R+S)-Azet) und 5-Ring ((R)-Pro, (S)-Pro), bis zum 6-Ring ((?)-Pip, (R+S)-Nip, Ini). Folgende Tabelle 5-7 zeigt, welche Leucin-Derivate sich jeweils nur in der cyclischen Aminosäure unterscheiden.

Tabelle 5-7: Leucin-Derivate mit unterschiedlichen cyclischen Aminosäuren.

Cycl. Aminosäure XXX	BOC-(S)- Leu-XXX- (S,S)- Azi(OBn) ₂ I	BOC-(S)- Leu-XXX- (S,S)- Azi(OEt) ₂ II	BOC-(S)- Leu-XXX- (R,R)- Azi(OEt) ₂ III	BOC-(R)- Leu-XXX- (S,S)- Azi(OBn) ₂ IV	BOC-(S)- Leu-XXX- (S,S)- Azi(OH) ₂ V	BOC-Gly- XXX-(S,S)- Azi(OBn) ₂ VI
(S)-Azy	116C	ns	ns	216C	ns	ns
(R+S)-Azet	131C	ns	131B	ns	ns	ns
(S)-Pro	112C	112A	112B	212C	112G	312C
(R)-Pro	122C	ns	ns	222C	ns	322C
(R+S)-Nip	134C	134A	134B	234C	134G	334C
Ini	ns	105A	105B	ns	105G	ns
(?)-Pip	ns	ns	ns	ns	ns	3?3C

ns = nicht synthetisiert

Bei einem Vergleich bzgl. der cyclischen Aminosäure stellt sich das Problem, dass bei den Azy-Derivaten jeweils nur Verbindungen mit (S)-konfigurierter cycl. Aminosäure, bei den Prolin-Derivaten beide Derivate einzeln, bei den Azet- und Nip-Derivaten aber nur die jeweiligen Diastereomeregemische zur Verfügung stehen. Um hier vergleichen zu können, muss man für den Vergleich mit (R+S)-Nip und (R+S)-Azet die Werte für die beiden Prolin-Derivate jeweils mitteln bzw. das (S)-Pro-Derivat mit dem (S)-Azy-Derivat vergleichen. Damit ergeben sich folgende Trends für die CL-like Enzyme:

Für BOC-(S)-Leu-XXX-(S,S)-Azi(OBn)₂ (Spalte I, Tabelle 5-7) lässt die Hemmwirkung in folgender Reihenfolge nach:



Für Verbindungen mit (S,S)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (Spalte II, Tabelle 5-7) gilt, dass die Verbindung mit Nip-Baustein jeweils am besten hemmt, gefolgt von Ini (mit Ausnahme von CL) und Pro:

Nip > Ini > Pro.

Beim (R,R)-Diethylester (Spalte III) findet sich die gleiche Reihenfolge:

Nip ≥ Azet > Ini > Pro.

Für die Verbindungen der Spalte IV, Tabelle 5-7 (BOC-(R)-Leu-XXX-(S,S)-Azi(OBn)₂) gilt in etwa:

Nip ≈ Azy > Pro

Für die Disäuren (Spalte V, Tabelle 5-7), die fast ausschließlich nur CL hemmen, gilt:

Nip > Ini > Pro.

In der Reihe der BOC-Gly-Verbindungen BOC-Gly-XXX-(S,S)-Azi(OBn)₂ (Spalte VI, Tabelle 5-7) können **312C** ((S)-Pro), **322C** ((R)-Pro), **3?3C** (wahrscheinlich (S)-Pip) und **334C** ((R+S)-Nip) verglichen werden. Hier gilt für CL und FP die Reihenfolge:

Nip > Pip > Pro,

bzw. für RD:

Pip > Pro > Nip,

d.h. Pip-Derivate hemmen besser als Pro-Derivate.

Fast man alle diese Ergebnisse zusammen, ergibt sich folgender Trend in den cyclischen Aminosäuren:

Azy ≥ Azet ≈ Nip > Ini / Pip > Pro.

5.5.2 Vergleich Leucin vs. Glycin

Für einen Vergleich von Leu und Gly lassen sich keine einheitlichen, für alle Derivate gültigen Trends feststellen. Vergleicht man bei den Estern jeweils das beste der beiden Leu-Diastereomere (**212C/122C/134C**) mit dem entsprechenden Gly-Derivat (**312C/322C/334C**), ergibt sich, dass die Gly-Derivate insgesamt geringfügig schwächer als die entsprechenden Leu-Derivate wirken. Bei den Säuren trifft dies nicht zu, hier zeigt das Gly-Derivat **334G** keinerlei Hemmung, **312G** dagegen hemmt CL und RD.

5.6 Inaktivierungskonstante k_i

Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung k_i erreicht Werte bis 0.06 min^{-1} für CB und liegt damit ca. 5x höher als bei der Hemmung der CL-like Proteasen ($k_i = 0.01\text{-}0.02 \text{ min}^{-1}$). Die Inaktivierungskonstante für Epoxide liegt bei ca. 100-1000x höheren Werten. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten und wird durch quantenmechanische Rechnungen (Kapitel 5.11) bestätigt, die ebenfalls vorhersagen, dass die nucleophile Ringöffnung von Epoxiden wesentlich schneller verläuft als die von Aziridinen.

5.7 Hemmung durch andere Derivate des Aziridin-2,3-dicarboxylats

Die *N*-Formyl-Derivate **008B** und **008C** zeigen eine sehr gute Hemmung der CL-like Enzyme.

Die biotinylierten Derivate **999B** und **999C** hemmen alle Enzyme sehr gut und sind auch im Vergleich zu anderen Inhibitoren relativ unselektiv zwischen CB und CL.

Die beiden *N*-unsubstituierten Piperazin-Derivate sind an allen Enzymen unwirksam.

5.8 Zusammenfassung

Die oben herausgearbeiteten Trends werden nachfolgend in Stichworten zusammengefasst.

- 1) CL-like >> CB
- 2) RD > CL > FP >> CB
- 3) Bester Inhibitor für alle Enzyme: **116C** (BOC-(*S*)-Leu-(*S*)-Azy-(*S,S*)-Azi(OBn)₂)
- 4) Selektive Inhibitoren einzelner Enzyme: CL: **517C**, **105G**, **Z-023B**, **023A**; CB: **034A**, **013B**; RD: **112C**, **222C**, **105B**, **013A**; FP: -
- 5) Selektive Inhibitoren parasitärer Proteasen (FP, RD): **105A**, **517G**
- 6) Stereoselektivität Aziridinring: Diethylester: *S,S* > *R,R*; Dibenzylester: *R,R* > *S,S*
- 7) Stereoselektivität bei BOC-Leu-Pro-(*S,S*)-Azi(OBn)₂-Diastereomeren: (*R*)-Leu-(*S*)-Pro / (*S*)-Leu-(*R*)-Pro > (*R*)-Leu-(*R*)-Pro / (*S*)-Leu-(*S*)-Pro
- 8) Stereoselektivität bei BOC-Leu-Pro-Azi(OBn)₂-Enantiomeren: **112D** > **222C** [*S,S,R,R* > *R,R,S,S*]; **112D** bestes Leu-Pro-Derivat bei allen Enzymen
- 9) Substituenten am Aziridinring: Phe-Ala-Derivate: CB, FP, RD: Säure > Ester; CL: Säure ≈ Ester; Leu/Gly-Derivate: CL-like: Ester > Säure
- 10) Tripeptide > Dipeptide

11) Cyclische Aminosäure: Azy \geq Azet \approx Nip $>$ Ini / Pip $>$ Pro

12) Leu \geq Gly

13) k_i -Werte: sehr niedrig, CB $>$ CL-like

14) *N*-Formyl-Derivate: sehr gute Hemmung der CL-like Proteasen; Biotin-Derivate: sehr gute Hemmung aller Enzyme; Piperazin-Derivate: keine Hemmung.

5.9 Fazit und Ausblick

Fasst man die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Punkte 3) und 8) zusammen, so bietet sich als Kombination der sehr guten Inhibitoren **116C** und **112D** die bisher noch nicht synthetisierte Verbindung BOC-(*S*)-Leu-(*S*)-Azy-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ als neue Zielstruktur an. Außerdem erscheint eine Trennung der relativ gut wirksamen Diastereomerenmische der Diester, die die Aminosäure (*R+S*)-Nip (**134C**, **234C**, **134A**, **334C**) bzw. (*R+S*)-Azet (**131C**) enthalten, sinnvoll.

5.10 Interpretation der Ergebnisse - Bindungsmodi der Inhibitoren

Betrachtet man die Ergebnisse, die mit den Estern bzw. Säuren erhalten wurden, so kann man vermuten, dass diese jeweils einen anderen Bindungsmodus aufweisen, da die allgemeinen Trends sich nicht entsprechen. Die z.T. sehr unterschiedlichen Ergebnisse der Ethyl- bzw. Benzylester könnten ebenfalls auf unterschiedlichen Bindungsmodi beruhen. Auch den Ergebnissen für die Phe-Ala-Reihe und die Leu/Gly-XXX-Reihe scheinen jeweils unterschiedliche Ursachen für gute bzw. schlechte Hemmung zu Grunde zu liegen. Eine endgültige Interpretation der Ergebnisse ist nur möglich, wenn man die Bindungsmodi der Inhibitoren an die einzelnen Enzyme kennt. Diese kann man letztendlich nur durch die Röntgenstrukturanalyse von Enzym-Inhibitor-Komplexen erhalten. Derzeit laufen in Kooperation mit dem AK Hilgenfeld (Lübeck) Versuche E-I-Komplexe verschiedener Inhibitoren mit Falcipain zu kristallisieren. Docking-Experimente können Anhaltspunkte für die Bindung der Inhibitoren an die Enzyme liefern. Sie können nicht die Ausbildung einer kovalenten Bindung berücksichtigen. Letzteres ist nur mit QM/MM-Verfahren (quantum mechanic / molecular mechanic) möglich, die sich zur Zeit noch in der Entwicklung befinden. In Kooperation mit dem AK Baumann wurden erste Docking-Versuche mit ausgewählten Inhibitoren durchgeführt. Es wurde dazu die Software FlexX[®] [97] verwendet.

5.10.1 Docking-Versuche

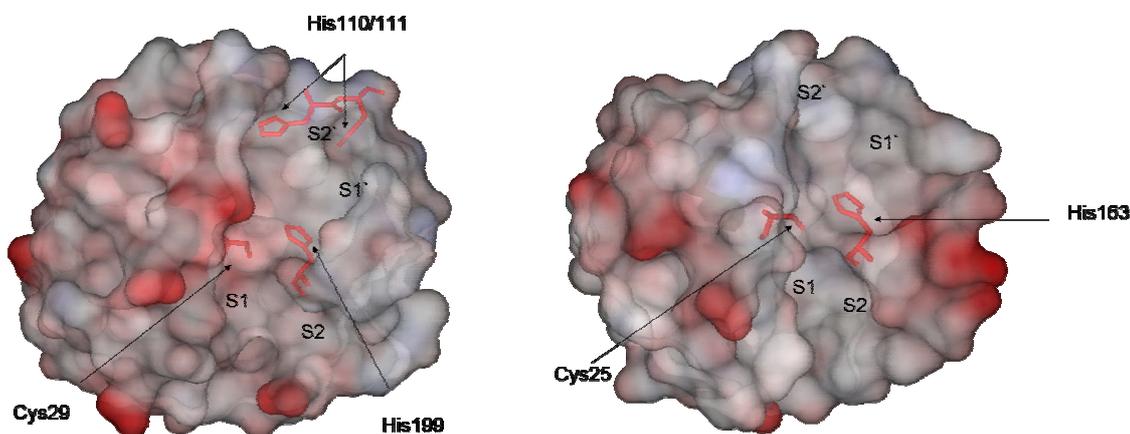
Da zur Zeit nur die 3D-Strukturen von Cathepsin B und Cathepsin L bekannt sind und für FP und RD nur Homologie-Modelle zur Verfügung stehen, wurden die Versuche an CL und CB durchgeführt. Für CB wurde die Röntgenstrukturanalyse von humanem CB zu Grunde gelegt (pdb-code: 1GMV),^[98] das auch für die Hemmtests eingesetzt wurde. Bei CL steht nur die Röntgenstruktur des humanen CL zur Verfügung (pdb-code: 1MHW).^[99] Für die Hemmtests wurde zwar CL aus *Paramecium tetraurelia* eingesetzt,^[93] die Sequenz- und Strukturhomologie mit humanem CL sowie die Ergebnisse früherer Versuche mit beiden Enzymen, die keine Unterschiede in den Hemmkonstanten zeigten,^[50] rechtfertigen jedoch die Verwendung der 3D-Struktur des humanen CL.

Die Ergebnisse der Docking-Experimente zeigen ein wichtiges Problem auf. Im Gegensatz zu *ab initio* Rechnungen kann die Konformation der Aziridid-Bindung nicht exakt beschrieben werden. Die Acyl-Gruppe am Aziridin-Stickstoff ist im Gegensatz zu "normalen" Amiden nicht planar sondern gewinkelt, die Mesomerie ist dadurch partiell aufgehoben. Dies kann von keinem Docking-Programm berücksichtigt werden. Insofern können die Ergebnisse nur als erste Anhaltspunkte betrachtet werden. Jedoch müssen die Ergebnisse mit der von den Docking-Programmen gefundenen planaren Konformation der Aziridid-Bindung nicht als grundsätzlich falsch beurteilt werden. Die entscheidende Frage ist die der Flexibilität in dieser Amid-Bindung: wenn die Energie, die zur Herstellung der Planarität aufgewendet werden muss, geringer ist als die Energie, die durch die Bindung an das Enzym gewonnen wird, dann können auch die von den Docking-Programmen gefundenen planaren Konformationen ihre Richtigkeit besitzen. Da sämtliche NMR-Spektren der *N*-acylierten Aziridine keine Hinweise auf eine eingeschränkte Inversion des Substituenten am Aziridin-N liefern (die Rotamere, die bei den Prolin- und Pipecolinsäure-Derivaten gefunden werden (siehe Kapitel 3.5), resultieren aus einer eingeschränkten Rotation um die Bindung am Prolin- bzw. Pipecolin-N), ist anzunehmen, dass die Aziridid-Bindung relativ flexibel ist. Bestätigt wird dies durch erst kürzlich durchgeführte quantenchemische Rechnungen mit *N*-acylierten Aziridinen (AK Prof. Dr. B. Engels). Die Rotationsbarrieren liegen im Bereich von nur ca. 4 kcal/mol. Diese Energie kann bei Bindung des Inhibitors an das Enzym durch Ausbildung von 2 H-Brücken aufgebracht werden. Es laufen zur Zeit Docking-Versuche, in denen die Inhibitoren in Konformationen eingesetzt werden, die zuvor durch *ab initio* Rechnungen erhalten wurden. Das Docking-Programm FlexX[®] zerschneidet einen Inhibitor in Bruchstücke und setzt diese wieder zu einem Molekül zusammen in der Konformation, in der der Energiegewinn bei der Bindung an das

Enzym (scoring function) am größten ist.^[100] Es soll daher in Zukunft versucht werden, innerhalb des Docking-Programms den Aziridinring *incl.* der Acyl-Gruppe in der möglicherweise richtigeren, gewinkelten Konformation als ein nicht weiter fragmentierbares Bruchstück zu definieren.

Als docking pocket wurde jeweils ein Bereich im Radius von 10-13 Å um den Cys-Rest des aktiven Zentrums definiert. In der nachfolgenden Abbildung 27 sind jeweils die beiden Aminosäuren des aktiven Zentrums (CB: Cys29, His199; CL: Cys25, His163), die relevanten Substratbindungstaschen S2, S1, S1' und S2' sowie bei CB zusätzlich die beiden His-Reste des occluding loop (His110, His111) hervorgehoben.

Abbildung 27: Die aktiven Zentren des CB (links) und CL (rechts) als Wasser zugängliche elektrostatische Oberfläche dargestellt.



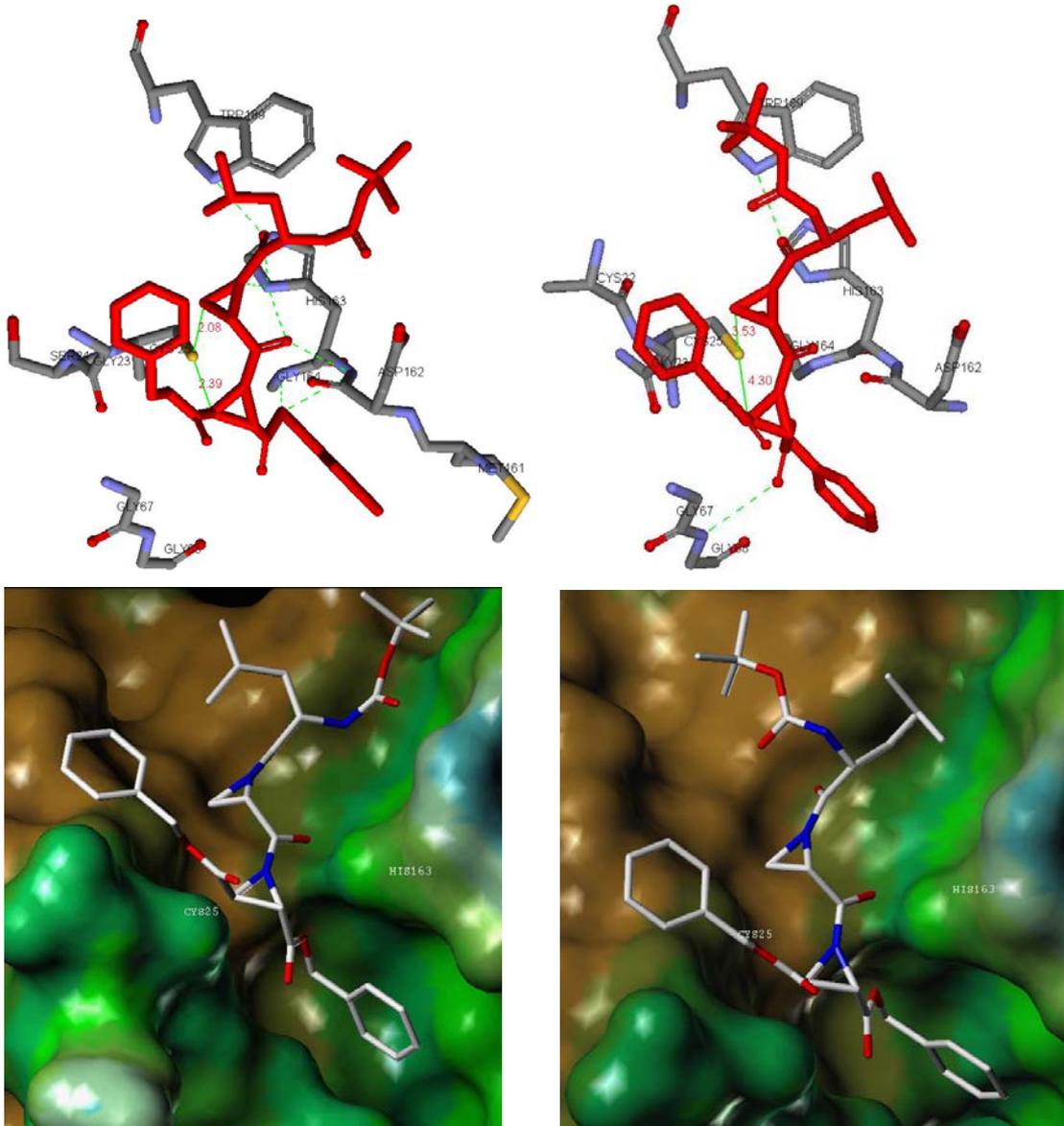
Der Hauptunterschied zwischen CL und CB ist der occluding loop. Die ganze S'-Seite von CL lässt sich am besten als flaches Becken beschreiben. Bei CB wird die S2'-Tasche durch den occluding loop begrenzt und wird dadurch wesentlich kürzer als bei CL. Insgesamt ist der gesamte Substratbindungs-Spalt des aktiven Zentrums (active site cleft) bei Cathepsin L flacher als bei CB. Die S2-Taschen beider Enzyme sind relativ tief und hydrophob, woraus sich auch die Substratspezifität für Phe und Leu in P2-Position ergibt. Die S2-Tasche von CB ist etwas breiter als die von CL.

5.10.2 Hypothetische Bindungsmodi verschiedener Inhibitoren an CL und CB

Dargestellt ist nachfolgend jeweils der Bindungsmodus, der die beste scoring function lieferte. Der Bindungsmodus wird jeweils in Stichworten beschrieben. Besonderes

Augenmerk wurde dabei vor allem auf den Abstand des elektrophilen Bausteins (Azi oder Azy) zu den Cys-Resten des aktiven Zentrums gelegt, da zwischen diesen beiden Gruppen ja die kovalente Bindung ausgebildet werden soll.

5.10.2.1 Bindungsmodi der Inhibitoren 116C und 216C an CL.



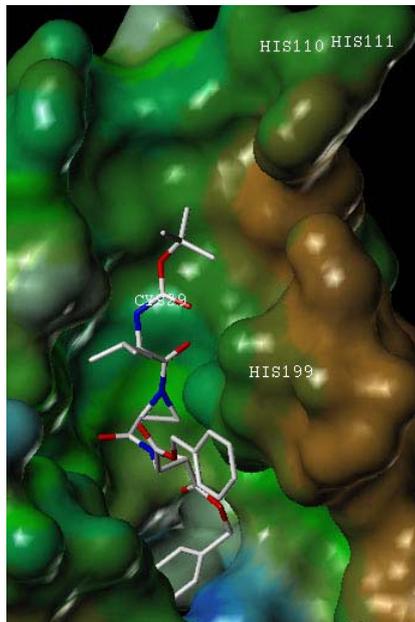
116C (links): Abstand Cys25 - Azi 1.9 Å, Cys – Azy 2.4 Å, BOC in S1', Leu in S2', Benzylester in S2

→ Bindung in prime site, Azi oder Azy als Reaktionspartner für Cys25?

216C (rechts): Abstand Cys25 - Azi 4.3 Å, Cys – Azy 3.5 Å, Leu in S1', BOC in S2', Benzylester in S2

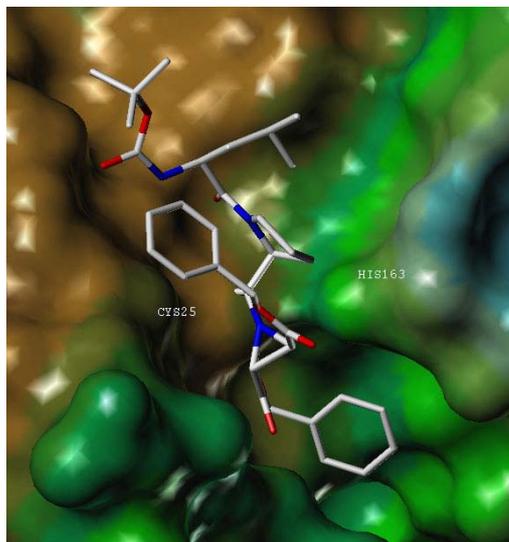
→ Bindung in prime site, Azi oder Azy als Reaktionspartner für Cys25?

5.10.2.2 Bindungsmodus des Inhibitors 216C an CB



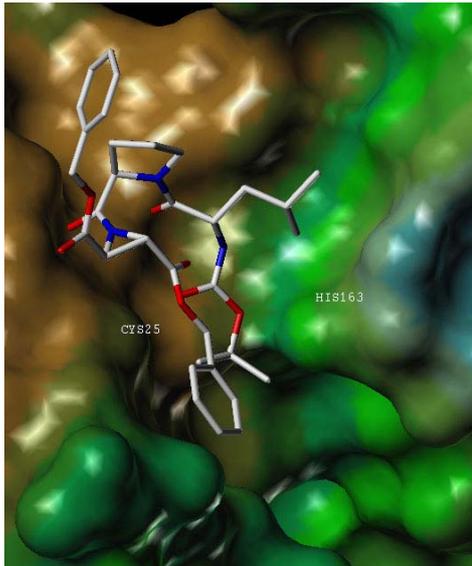
CB: Weder Azi noch Azy in der Nähe von Cys29, Azy in S1, BOC in S1`

5.10.2.3 Bindungsmodi der Inhibitoren 112D, 122C, 212C, 112B und 112C an CL



112D: Abstand Cys25 - Azi 3.2 Å, Benzylester in S2, Pro-Leu in S1`, BOC in S2`

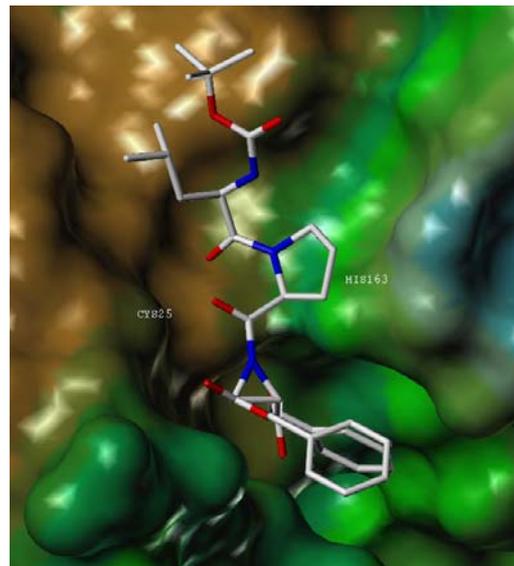
→ *Bindung in prime site*

**122C**

Abstand Cys25 - Azi 7 Å

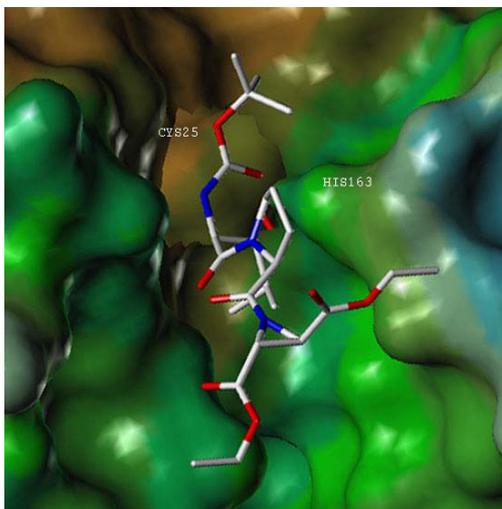
Leu in S1`

→ Bindung in prime site

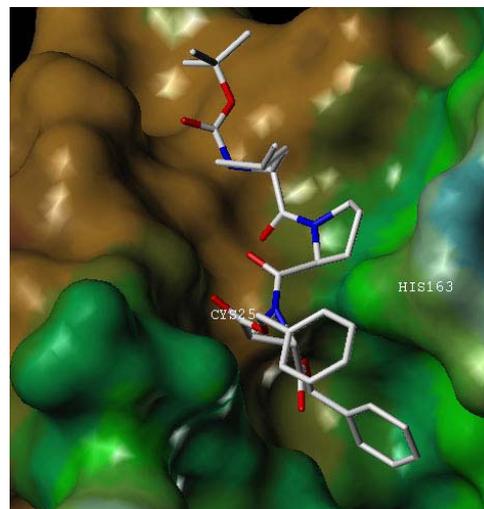
**212C**

Abstand Cys25 - Azi 5 Å

Benzylester in S2

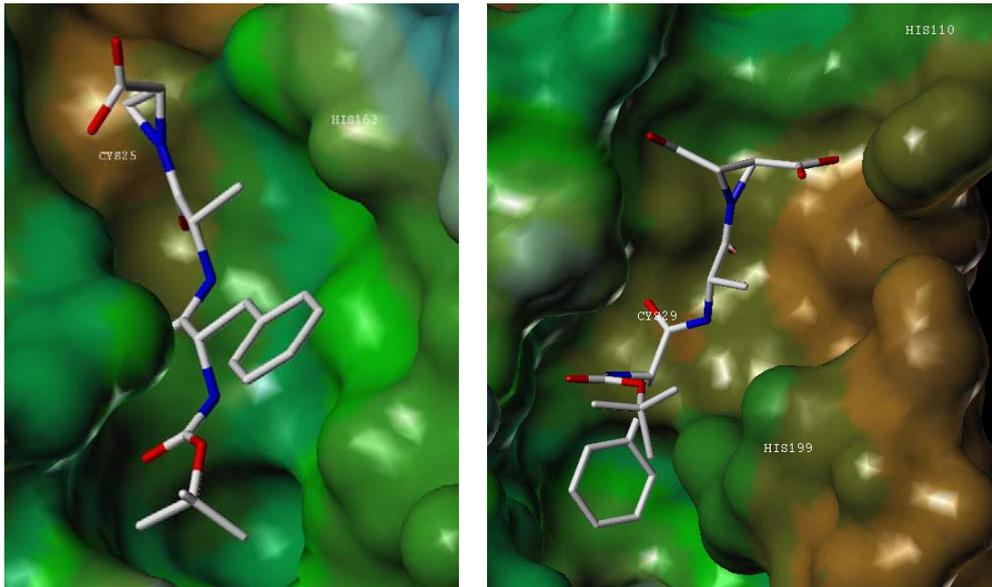
**112B**

Azi nicht in der Nähe des Cys25

**112C**

Abstand Cys25 - Azi 5 Å

5.10.2.4 Bindungsmodus des Inhibitors 417G an CL und CB

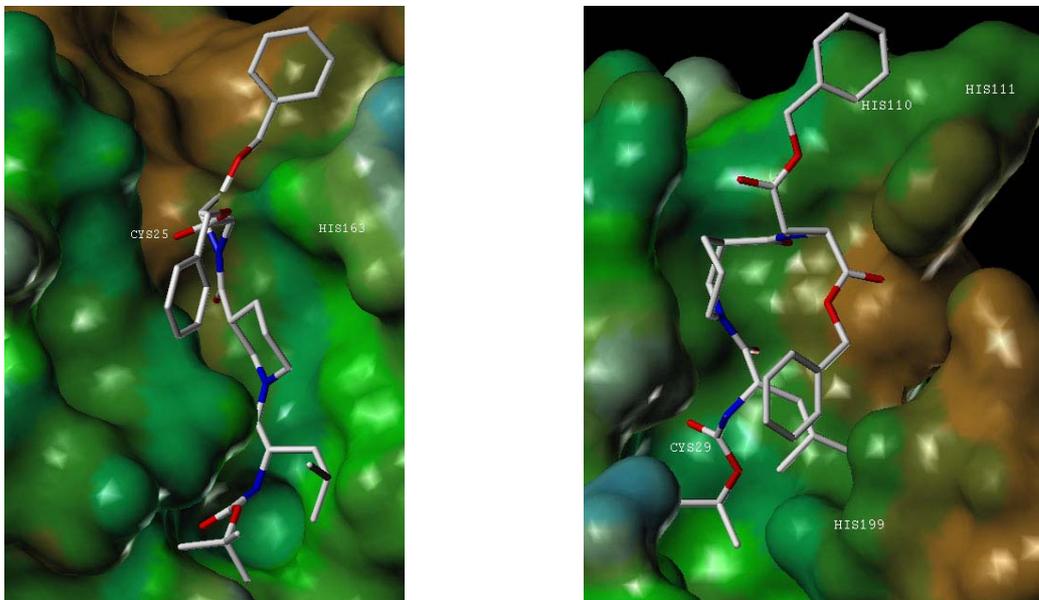


CL (links): Abstand Azi - Cys25 2 Å, Abstand CO₂H zu His163 2.9 Å, Phe in S2

→ *Bindung in non-prime site*

CB (rechts): Abstand Azi - Cys29 7.1 Å, Abstand CO₂H zu His111 3 Å, Phe in S1

5.10.2.5 Bindungsmodus des Inhibitors 134C an CL und CB

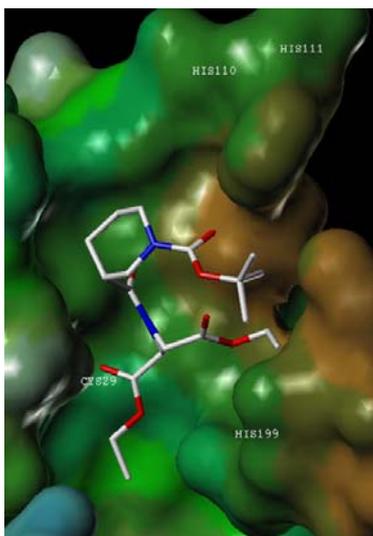


CL (links): Abstand Cys25 - Azi 2.3 Å, Nip in S1, Leu in S2, Benzylester in S1`

→ *Bindung in non-prime site*

CB (rechts): Azi nicht in der Nähe von Cys29

5.10.2.6 Bindungsmodus des Inhibitors 034A an CB



Abstand Cys29 - Azi 3.4 Å, BOC in S1'

→ *Bindung in prime site*

5.10.3 Diskussion

Für **116C** und **216C**, die beide CL sehr gut hemmen ($K_i = 13$ nM; 6.4 μ M) wird ein gemeinsamer Bindungsmodus gefunden, bei dem der Leu-Rest bzw. die BOC-Gruppe in die S'-Seite binden. Ein Benzylester bindet an die hydrophobe S2-Tasche. In beiden Fällen liegen sowohl der Azi- als auch der Azy-Baustein in räumlicher Nähe zum Cys25, so dass beide Aziridinringe als Reaktionspartner in Frage kommen. Die Bindung von **116C** wird durch 3, die von **216C** durch 2 H-Brücken stabilisiert. Die bessere Hemmung durch **116C** liegt möglicherweise daran, dass der (S)-Leu-Rest besser in die S'-Seite passt und der ganze Inhibitor tiefer in die gesamte Substratbindungsspalte binden kann.

Im Gegensatz dazu wird für **216C** an CB ($K_i > 400$ μ M) nur ein Bindungsmodus gefunden, bei dem weder der Azy- noch der Azi-Rest in der Nähe des Cys29 zu finden sind.

Von den Inhibitoren **112D**, **122C**, **212C**, **112B** und **112C**, die alle eine Leu-Pro-Sequenz besitzen, hemmt **112D** CL mit einem K_i -Wert von 0.4 μ M, **122C** und **212C** weisen K_i -Werte von 4 bis 6 μ M auf und **112B** sowie **112C** hemmen CL gar nicht. Dies spiegelt sich auch in den gefundenen Bindungsmodi wieder. Für alle Inhibitoren mit Ausnahme des Diethylesters **112B** wird eine Bindung in die S'-Seite postuliert, jedoch nur bei **112D** findet sich eine Bindung des Leu-Restes in die hydrophobe S1'-Tasche, des Benzylesters in die hydrophobe S2-Tasche und gleichzeitig ein akzeptabler Abstand

zwischen Cys25 und Aziridinring. Bei den anderen Inhibitoren fehlt mindestens eine dieser Wechselwirkungen.

Vergleicht man die Bindungsmodi der Dicarbonsäure **417G** an CB und CL, so stellt man fest, dass bei etwa gleichem K_i -Wert (27.3 vs. 15.3 μM) nur für CL ein akzeptabler Abstand des Aziridinrings zum Cys25 gefunden wird. Eine der Carbonsäuren am Ring könnte hier eine ionische Wechselwirkung mit His163 eingehen, der hydrophobe Phe-Rest könnte in die hydrophoben S2-Tasche binden. Für CB wird ein sehr großer Abstand zu Cys29 postuliert, obwohl bei diesem Inhibitor auch eine relativ hohe Alkylierungskonstante k_i gefunden wird, der Inhibitor also auch von der Kinetik her eindeutig irreversibel hemmt. Eine der beiden Säurefunktionen liegt in räumlicher Nähe zu einem His-Rest des occluding loop.

Bei **134C** korrelieren dagegen die gefundenen Bindungsmodi wieder mit den experimentell bestimmten Hemmkonstanten (CL: 4.4 μM ; CB: > 400 μM). Für CL beträgt der berechnete Abstand zu Cys25 2.3 Å, der Nip-Rest sitzt hier in der S1-, Leu in der hydrophoben S2-Tasche. Bei CB ist der Azi-Baustein weit von Cys29 entfernt lokalisiert.

Inhibitor **034A** hemmt CB mit einer Hemmkonstante von 61.1 μM . Das Docking-Programm findet einen Bindungsmodus, bei dem der Aziridinring 3.4 Å von Cys29 entfernt ist, der Nip-Rest außerhalb der Bindungstaschen steht und die BOC-Gruppe in die S1'-Tasche bindet.

Wie erwartet gibt es für die untersuchten Inhibitoren keinen gemeinsamen Bindungsmodus, sondern je nach Substituenten und Konfiguration am Aziridinring sowie Substituenten am Aziridin-Stickstoff werden völlig unterschiedliche Bindungsmodi gefunden. Für CL sind die gefundenen Bindungsmodi meistens relativ gut mit den Hemmkonstanten und den jeweiligen Eigenschaften der Substratbindungstaschen in Einklang zu bringen. Bei CB wird für **417G** ein Bindungsmodus gefunden, der nicht mit dem experimentellen Ergebnis übereinstimmt. Auch bei den Substanzen **131B**, **131C**, **013B**, mit denen ebenfalls Docking-Experimente durchgeführt wurden (Bilder nicht dargestellt), korrelieren die Ergebnisse nicht mit den Hemmkonstanten. Das Docking findet keine akzeptablen Bindungsmodi, obwohl **131B** und **131C** für CL Hemmkonstanten im micromolaren Bereich aufweisen. Für **131C** wird ein Bindungsmodus gefunden, bei dem nur die Benzylester in die Substratbindungstaschen binden, der Cys-Rest zwar in räumlicher Nähe zum Aziridinring sitzt, die Peptidkette jedoch keinerlei Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht. Bei **131B** binden weder die Ester-Reste noch die Aminosäuren an das Enzym. Für **013B**, dass CB schwach hemmt,

wird ein Bindungsmodus an die S⁻-Seite gefunden, bei dem allerdings der Aziridinring in der Nähe der His-Reste 110/111 sitzt und nicht in der Nähe von Cys29.

Abzuwarten bleibt, welche Ergebnisse die Docking-Experimente mit den bisher nicht untersuchten Inhibitoren bzw. die Experimente, die von einer anderen Konformation der Aziridid-Bindung ausgehen, liefern werden.

5.11 Einfluss von Umgebung und Substituenten auf die Reaktivität des Aziridinrings

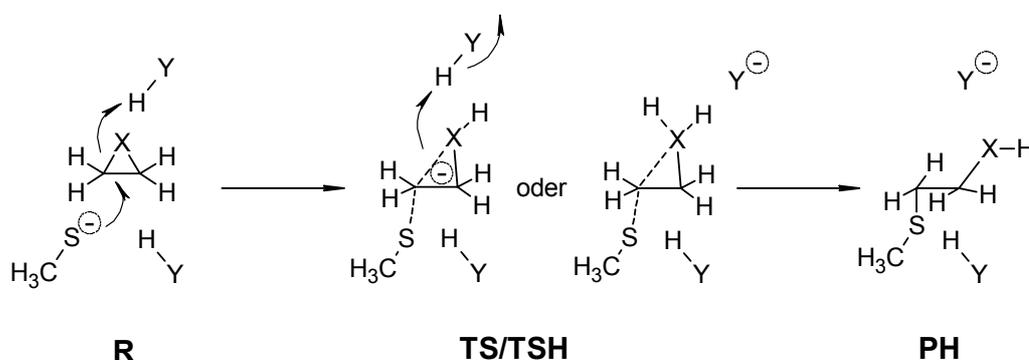
5.11.1 Quantenchemische Rechnungen

Der Einfluss von Substituenten am Aziridin-Stickstoff auf die Kinetik und Thermodynamik der nucleophilen Ringöffnungsreaktion wurde anhand einer Modellreaktion im Arbeitskreis von Prof. B. Engels mit Hilfe von quantenchemischen Rechnungen untersucht.^[101] Drei verschiedene Reaktionen wurden dabei zunächst berechnet:

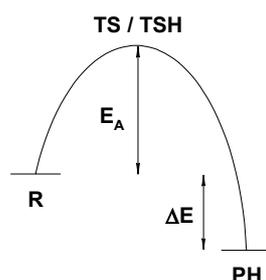
- 1) Reaktion von Methylthiolat mit Aziridin unter Einbeziehung von Wasser als Protonendonator.
- 2) Reaktion von Methylthiolat mit Aziridin unter Einbeziehung von Ammonium-Ionen als Protonendonator.
- 3) Reaktion von Methylthiolat mit *N*-Formylaziridin unter Einbeziehung von Wasser als Protonendonator.

Der Bulk-Effekt eines polaren Lösungsmittels wurde dabei ebenfalls berücksichtigt.

Schema 5-1: Nukleophiler Angriff des Thiolats am Aziridinring.



X = NH, NCHO, HY = H₂O, NH₄⁺, R = Edukt, TS = Übergangszustand, TSH = protonierter Übergangszustand, PH = Produkt



Die Energie-Profile der simulierten Reaktionen der Edukte **R** zum Produkt **PH** (Aktivierungsenergie E_A , Reaktionsenergie ΔE) lieferten Hinweise, dass eine Formylierung des Aziridin-Stickstoffs zu einer schnelleren Ringöffnungsreaktion führen sollte (Schema 5-1).

Das Energie-Profil der Reaktion verbessert sich deutlich

(geringere Aktivierungsenergie, größere Reaktionsenergie), wenn die Möglichkeit besteht, den Übergangszustand (**TS/TSH**) zu stabilisieren. Dieses ist entweder durch Protonierung des Übergangszustandes mit einem mittelstarken Protonendonator (Ammonium-Ion, niedriger pH-Wert) in der Reaktionsumgebung oder durch einen Substituenten am Aziridin-Stickstoff (Formyl-Rest) möglich, der die während der Ringöffnung entstehende negative Ladung am Stickstoff stabilisiert. Wie Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen, führt die Stabilisierung des Übergangszustandes (**TS/TSH**) jeweils zur Abnahme der Aktivierungsenergie E_A und auch zur Verbesserung der Energie-Bilanz der Reaktion.

Abbildung 28: Energie-Diagramm der Reaktion von Aziridin mit Methylthiolat und Wasser oder Ammonium als Protonendonator, Energie in kcal·mol⁻¹.

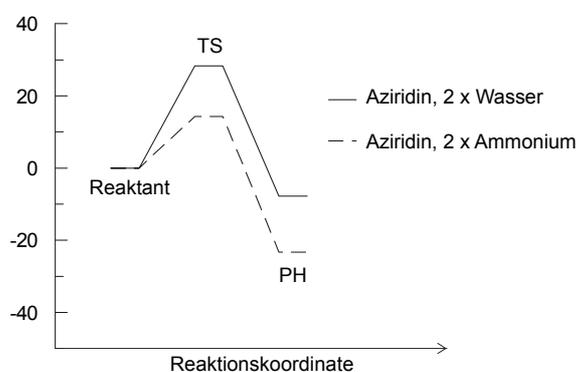
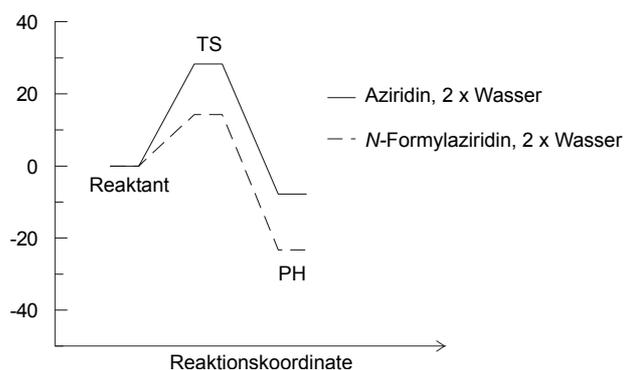


Abbildung 29: Vergleich der Energie-Bilanzen der Reaktion von Aziridin bzw. N-Formylaziridin mit Methylthiolat und Wasser als Protonendonator, Energie in kcal·mol⁻¹.



Aus Abbildung 31 und Abbildung 32, die anhand der berechneten Daten erstellt worden sind, ist zu sehen, dass die Substitution des Aziridin-Stickstoffes mit einem Formyl-Rest beim Angriff des Methylthiolates zur Stabilisierung des Übergangszustandes führt, ähnlich wie bei der Reaktion in Anwesenheit von Ammonium-Kationen als Säure.

Deutlich wird, dass in der Reaktion des Aziridins in Anwesenheit von NH_4^+ als Säure bereits der Übergangszustand durch Protonierung stabilisiert wird, während in der Reaktion des *N*-formylierten Aziridins der Formyl-Rest alleine zur Stabilisierung des Übergangszustandes entscheidend beiträgt und erst das Produkt protoniert wird. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 30 dass der Übergangszustand der Ringöffnung eines unsubstituierten Aziridins unter Einbeziehung von Wasser als schwachem Protonendonator nicht durch Protonierung stabilisiert wird, was zur Erhöhung der Aktivierungsenergie E_A und gleichzeitig zur Reduktion der Reaktionsenergie führt. Tabelle 5-8 gibt die berechneten Energien wieder.

Tabelle 5-8: Einfluss von Solvent und Substituenten am Aziridin-Stickstoff auf die Reaktionsprofile der Ringöffnung.

Substituent am Aziridin- <i>N</i>	Solvent	E_a (TS/TSH) [kcal·mol ⁻¹]	ΔE (Additions-produkt) [kcal·mol ⁻¹]	ΔE (PH) [kcal·mol ⁻¹]	Reaktions- Verlauf
1^a H	2 H ₂ O	+28.3		-6.1	exotherm
2^a H	2 NH ₄ ⁺	+14.4		-23.8	exotherm
3^a CHO	2 H ₂ O	+14.3		-23.3	exotherm
4^a CHO	2 NH ₄ ⁺	+13.1		-40.8	exotherm
5^b CHO	3 NH ₄ ⁺	+7.7	+4.9	+6.4	endotherm
6^b CHO	2 H ₂ O	--	--	+ 21.7	endotherm

^a Angriff am Ring-Kohlenstoff, ^b Angriff am H-C=O, E_a =Aktivierungsenergie, ΔE =Reaktionsenergie, TS/TSH=Übergangszustand nicht protoniert/protoniert, PH=protoniertes Produkt, -- Übergangszustand bzw. Additionsprodukt konnte nicht lokalisiert werden; alle Energiewerte sind in Bezug zu den Edukten der Reaktion angegeben.

Abbildung 30: Ringöffnung des unsubstituierten Aziridins durch Methylthiolat, Einbeziehung von Wasser als Protonendonator (Reaktion 1) (links TS, rechts PH).

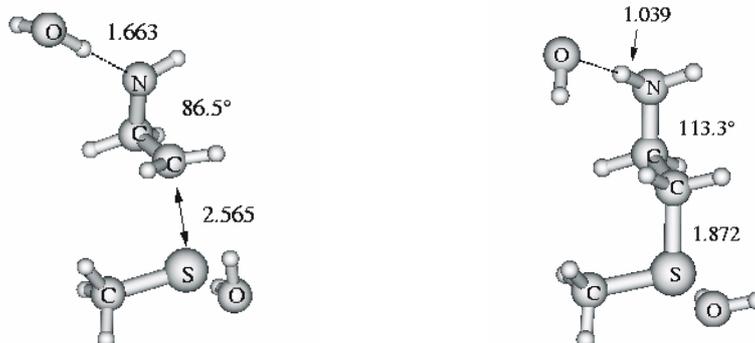


Abbildung 31: Ringöffnung des Aziridins durch Methylthiolat unter Einbeziehung von NH_4^+ als Säure (Reaktion 2) (links TSH, rechts PH).

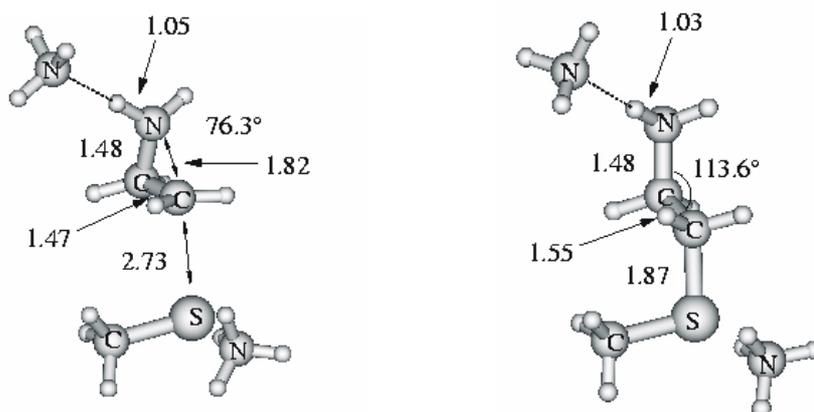
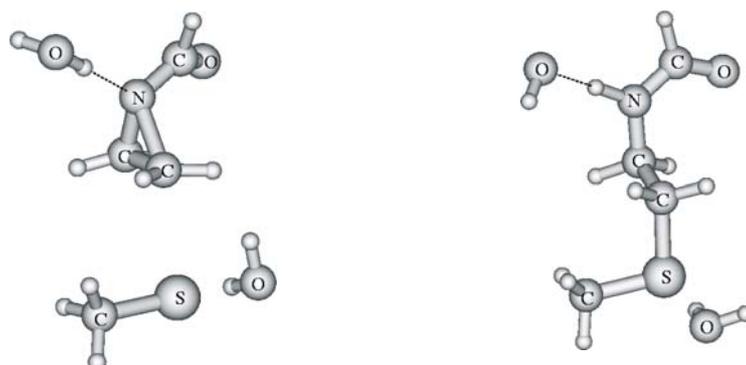


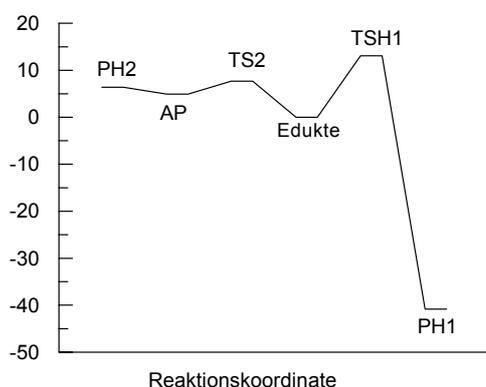
Abbildung 32: Ringöffnung des *N*-Formylaziridins durch Methylthiolat (Reaktion 3) (links TS, rechts PH).



Der nucleophile Angriff am Formyl-Kohlenstoff, der über ein Halbaminal/Hemithioacetal-Additionsprodukt zu formyliertem Thiol und freiem Aziridin verläuft, wurde ebenfalls berechnet. Die Rechnung zeigt eine Absenkung der Aktivierungsenergie E_A , die

Reaktion verläuft im Gegensatz zum Angriff am Ring-Kohlenstoff jedoch endotherm und die Produkte (PH2) liegen energetisch höher als Additionsprodukt und Edukte (Abbildung 33). Aufgrund dessen ist die Reaktion zu den Produkten S-Formylthiol und Aziridin unwahrscheinlich. Die niedrige Energiebarriere zum Additionsprodukt könnte jedoch bedeuten, dass dieser Reaktionsschritt reversibel verläuft, wie dies z.B. auch für die Reaktion von Cystein-Proteasen mit Peptidylaldehyden bekannt ist.^[102,103]

Abbildung 33: Energie-Diagramm der Reaktionen von *N*-Formylaziridin mit Methylthiolat (1: Ringöffnung, 2: Angriff am Formyl-C).



Edukte: Methylthiolat+N-Formylaziridin

TSH1: Übergangszustand der Ringöffnungsreaktion

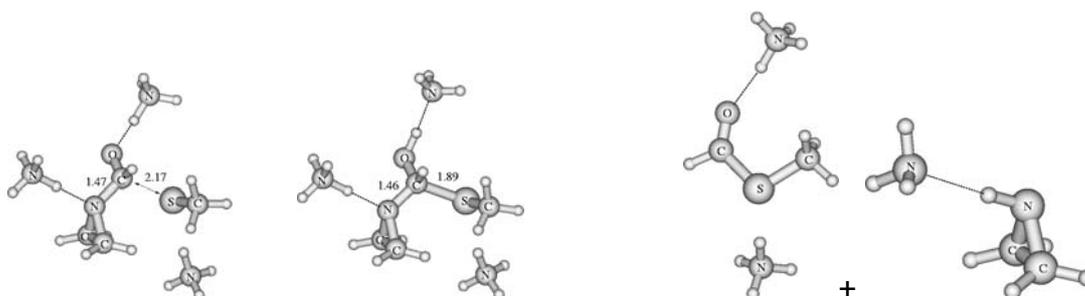
PH1: Ringöffnungsprodukt

TS2: Übergangszustand des Angriffs am Formyl-C

AP: Additionsprodukt des Angriffs am Formyl-C (Halbaminal/Hemithioacetal)

PH2: Produkte des Angriffs am Formyl-C: S-Formylthiol+Aziridin

Abbildung 34: Reaktion von *N*-Formylaziridin mit Methylthiolat - Angriff am Carbonyl-C (links TS, in der Mitte Additionsprodukt, rechts Produkte).



5.11.2 Untersuchung des Reaktionsmechanismus mittels NMR-Spektroskopie

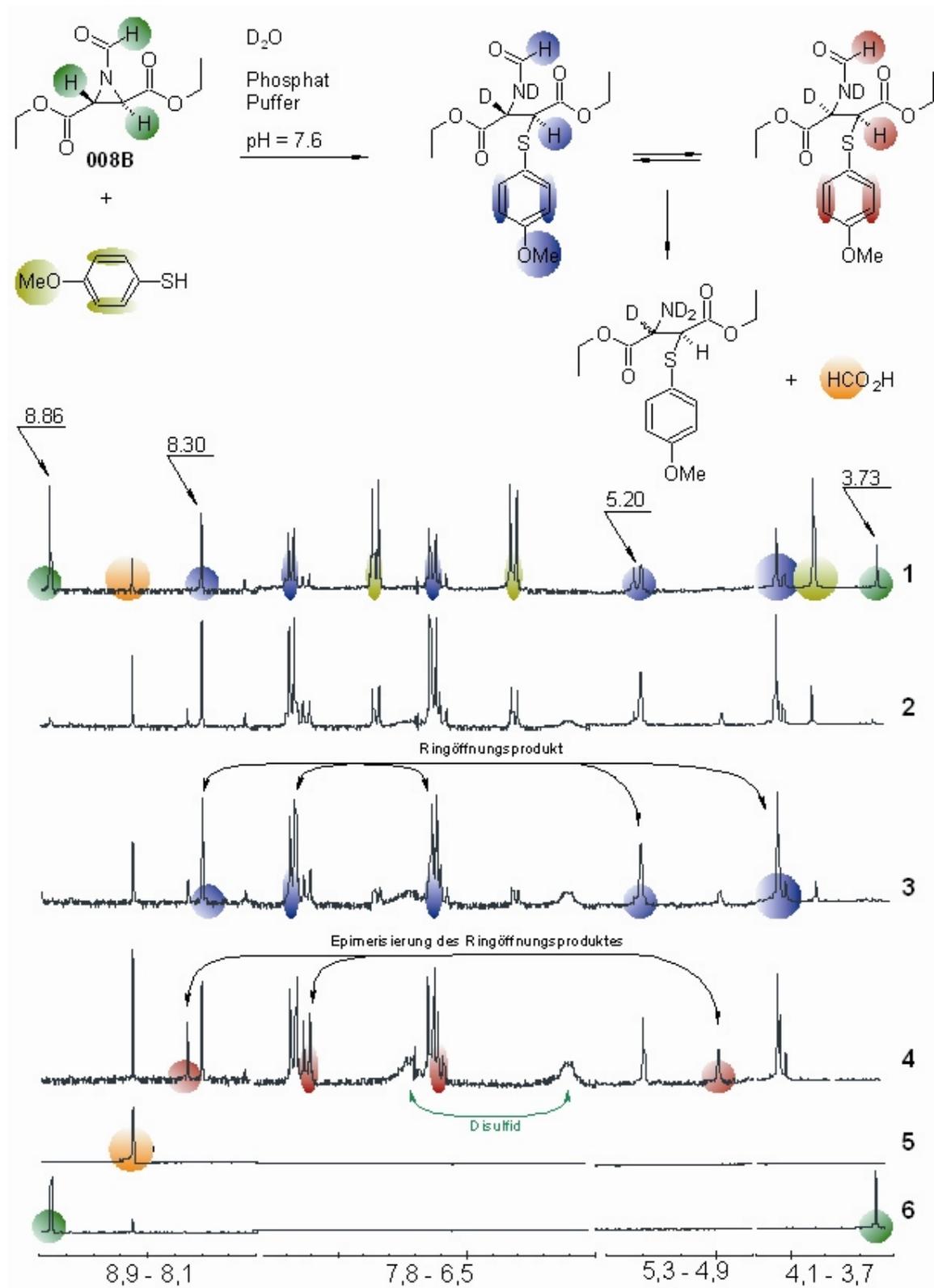
Um die vorhergesagte Beschleunigung der Ringöffnungsreaktion zu überprüfen, wurden die *N*-Formylaziridin-2,3-dicarboxylate **008B** und **008C** synthetisiert (Kapitel 3.6.1) und an verschiedenen Cystein-Proteasen getestet (Kapitel 4.6). Dabei wurde eine ca. 5000x stärkere Hemmung der Cystein-Proteasen im Vergleich zum unsubstituierten Aziridin beobachtet, was die theoretischen Untersuchungen im Prinzip bestätigt. Jedoch war unklar, ob auch tatsächlich die Hemmung durch nucleophilen Angriff am Aziridinring verursacht wird oder ob ein Formylrest auf Thiol- oder Aminogruppen übertragen wird und so das Enzym unspezifisch inaktiviert. Dieses wurde vermutet, weil nach Auflösen der Verbindung **008B** in DMSO der Formylrest nach 6 Stunden quantitativ abgespalten wird. In einem Modell-Versuch mit NMR-Detektion wurden equimolare Konzentrationen von je 100 μM 4-Methoxythiophenol und der Verbindung **008B** in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7.6 in D_2O insgesamt 4 Tage inkubiert. Jeweils nach 2, 12, 20 Stunden und 4 Tagen wurden ^1H -NMR-Spektren aufgenommen (Abbildung 35). Deutlich zu sehen ist, dass das Signal der Ring-Protonen des Formyl-Aziridins bei 3.73 ppm nach 12 Stunden nicht mehr vorhanden ist. Es entstehen keine Signale für das nicht-formylierte Aziridin. Dafür entsteht ein neues stark nach Tieffeld verschobenes Signal bei 5.20 ppm, was ein eindeutiger Hinweis auf die Ringöffnung ist. Auch das Signal für die Formylgruppe bei 8.86 ppm verschwindet zugunsten eines Peaks bei 8.30 ppm, der ebenfalls dem ringoffenen formylierten Additionsprodukt zuzuordnen ist. Bestätigt wird dieser Mechanismus des nucleophilen Angriffs auch durch massenspektrometrische Messungen. Zum einen beweisen die Massenspektren, dass das formylierte ringoffene Addukt entsteht (Massenpeak bei 358 $[\text{M} + \text{H}]^+$), zum anderen zeigt der Massenpeak bei 380 $[\text{M} + \text{Na} + 2\text{D}]^+$, dass ein zweifacher Wasserstoff-Deuterium-Austausch stattfindet. Dabei wird einerseits erwartungsgemäß das Amidproton ausgetauscht. Außerdem findet ein Austausch des Methylenprotons in Position 3 statt. Bestätigt wird dieser, auf der Acidität der Methylengruppe beruhende Austausch, auch durch die NMR-Spektren: mit zunehmender Zeit wird eine Signalsatz-Verdopplung beobachtet, was auf eine Epimerisierung in Position 3 zurückzuführen ist. Außerdem wird das Signal für das Proton in Position 2 einhergehend mit der Signalverdopplung durch Epimerisierung von einem Dublett zu einem Singulett, was die Deuterierung der 3-Position ebenfalls bestätigt. Diese Beobachtungen bestätigen auch indirekt nochmals die Versuche zur Epimerisierung der Azidoalkohole (Kapitel 3.1.2.1).

Ob bei der Reaktion des formylierten Aziridins mit 4-Methoxythiophenol auch der Formylrest auf das Thiol übertragen wird, also ein nucleophiler Angriff am Formyl-Kohlenstoff stattfindet, kann über massenspektrometrische Messungen nicht festgestellt

werden, da ein formyliertes Thiophenol in Pufferlösung wahrscheinlich nicht stabil ist und zu Ameisensäure und Thiophenol hydrolysiert. Die NMR-Signale für die Ameisensäure und für das deformylierte ringoffene Additionsprodukt, die mit Hilfe einer Vergleichsreaktion des unformylierten Derivates mit dem Thiophenol identifiziert und zugeordnet werden konnten, vergrößern sich im Laufe der Zeit. Signale für ein deformyliertes ringgeschlossenes Aziridin sind nicht zu finden. Das heißt, dass die Deformylierung wahrscheinlich nur durch Hydrolyse des ringoffenen formylierten Adduktes und nicht durch Reaktion des Thiophenols mit dem *N*-Formylaziridin verursacht wird. Zu Vergleichszwecken wurden einzeln und unter denselben Bedingungen beide Edukte (*N*-Formylaziridin **008 B** und 4-Methoxythiophenol) inkubiert. *N*-Formylaziridin hydrolysiert nach 3 Tagen aufgrund des leicht basischen Milieus vollständig zu Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat und Ameisensäure, das Thiophenol bildet durch Oxidation durch Luftsauerstoff das Disulfid. Außerdem wurde nicht-formyliertes Diethyl-(*R,R*)-aziridin-2,3-dicarboxylat mit 4-Methoxythiophenol inkubiert. Es konnte nach 3 Tagen im Vergleich zum formylierten Derivat nur eine sehr geringe Konzentration des Ringöffnungsproduktes nachgewiesen werden, was damit auch die unterschiedlichen Hemmstärken nochmals unterstreicht.

Zusammengefasst wird durch diese Versuche bestätigt, dass tatsächlich durch die *N*-Formylierung die Reaktivität des Aziridins gegenüber nucleophilem Angriff enorm erhöht wird. Der Haupt-Reaktionsmechanismus ist dabei die Ringöffnung des Aziridins und nicht die Übertragung der Formylgruppe auf das Nucleophil. Ob allerdings bei der Reaktion der *N*-formylierten Verbindungen mit den Cystein-Proteasen ev. zusätzlich zur Ringöffnung eine reversible Addition des Thiolates an den Formyl-Kohlenstoff stattfindet, kann mit diesen Modellreaktionen nicht untersucht werden. Aufgrund der erhaltenen Hemmkonstanten sollte diese zusätzliche Möglichkeit der Hemmung ebenfalls in Betracht gezogen werden (Kapitel 5.11.3). Um dies nachzuprüfen, müssen ¹³C-NMR spektroskopische Untersuchungen der Reaktion einer Protease mit einem sowohl an den Ring-Kohlenstoff-Atomen als auch am Formyl-Kohlenstoff markierten Inhibitor durchgeführt werden. Arbeiten zur Synthese eines vollständig ¹³C-markierten *N*-formylierten Derivates wurden dazu bereits begonnen.

Abbildung 35: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Reaktion von 4-Methoxythiophenol mit *N*-Formyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (**008B**).

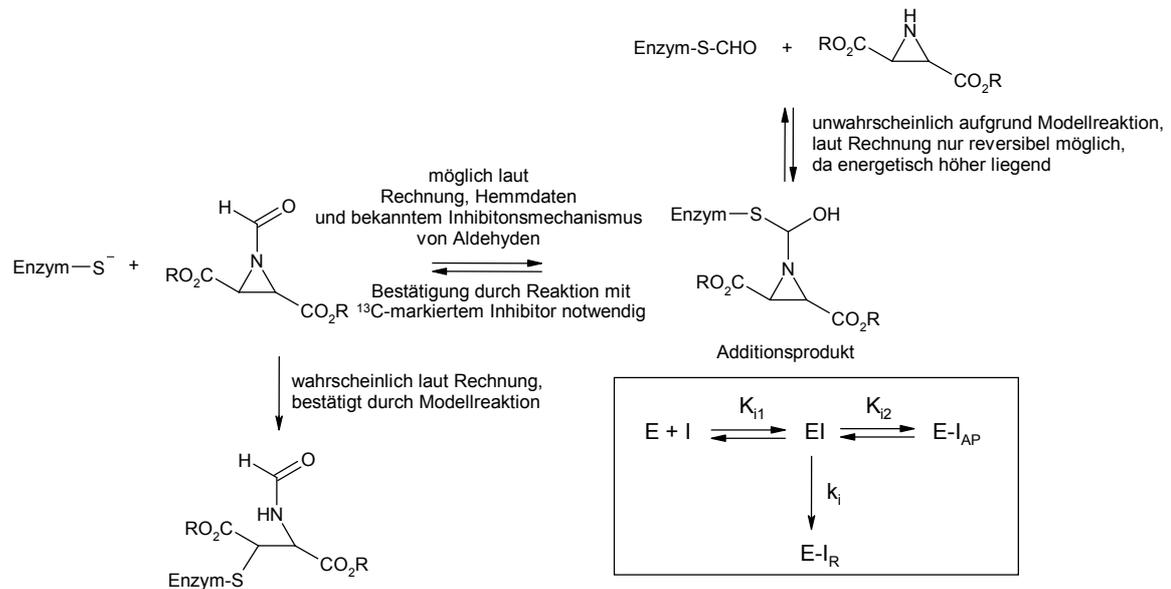


(1) 4-Methoxyphenylthiolat + **008B** in Phosphat-Puffer pH 7.6 nach 2 Stunden. (2) nach 12 Stunden. (3) nach 20 Stunden. (4) nach 4 Tagen. (5) Ameisensäure. (6) **008B** (die Signale für die Ethylester sind in den Spektren nicht dargestellt).

5.11.3 Überlegungen zum Hemmmechanismus der *N*-Formyl-Derivate

Wie bereits in den Kapiteln 5.11.1 und 5.11.2 ausgeführt, ergaben quantenchemische Berechnungen, dass auf der einen Seite eine Beschleunigung der Ringöffnungsreaktion von Aziridin mit Methylthiolat durch Formylierung des Aziridin-Stickstoffs zu erwarten ist, auf der anderen Seite ergaben die Rechnungen, dass ein Angriff am Formyl-Kohlenstoff möglicherweise reversibel verlaufen könnte. Eine Beschleunigung der Ringöffnungsreaktion durch den Thiolat-Rest einer Protease müsste sich eher in einem erhöhten k_r -Wert als in einem erniedrigten K_r -Wert ausdrücken. Bei den *N*-unsubstituierten Aziridincarbonsäuren bestätigen die in früheren Studien erhaltenen Hemmkonstanten bei niedrigen pH-Werten diesbezüglich auch die Vorhersagen der quantenchemischen Rechnungen.^[57,101] Die für die *N*-Formyl-Derivate erhaltenen Hemmkonstanten zeigen, dass zwar für Cathepsin L und Inhibitor **008B** ein etwas höherer k_r -Wert gefunden wird, insgesamt zeichnen sich die beiden *N*-Formyl-Derivate jedoch durch niedrige K_r -Werte aus. Die Modellreaktion mit dem Thiophenolat (Kapitel 5.11.2) bestätigte, dass eine Ringöffnung stattfindet, kann aber natürlich nicht ausschließen, dass ebenfalls eine reversible Addition am Formyl-Kohlenstoff stattfindet. Diese etwas widersprüchlichen Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die gute Hemmung durch die *N*-Formyl-Derivate in einem zweifachen Hemmmechanismus (Abbildung 33) begründet ist: sowohl reversible Addition an den Formyl-Kohlenstoff (zu E-I_{AP}), was die niedrigen K_r -Werte erklären könnte, als auch beschleunigte irreversible Ringöffnung durch Angriff an einem Ring-Kohlenstoff-Atom (zu E-I_R), was durch die reversible "Nebenreaktion" nicht so deutlich wie erwartet zum Tragen kommt. Die beiden Dissoziationskonstanten K_{i1} und K_{i2} sind dabei natürlich experimentell nicht zu unterscheiden, sondern es wird eine Gesamtdissoziationskonstante bestimmt. Die reversible Addition an den Aldehyd-Kohlenstoff wäre auch im Einklang mit dem bekannten reversiblen Hemmmechanismus von Peptidylaldehyden, der ebenfalls auf Bildung eines Hemithioacetals beruht. Nachfolgendes (Schema 5-2) verdeutlicht diesen möglichen zweifachen Hemmmechanismus.

Schema 5-2: Möglicher Hemmmechanismus der *N*-formylierten Aziridin-2,3-dicarboxylate.



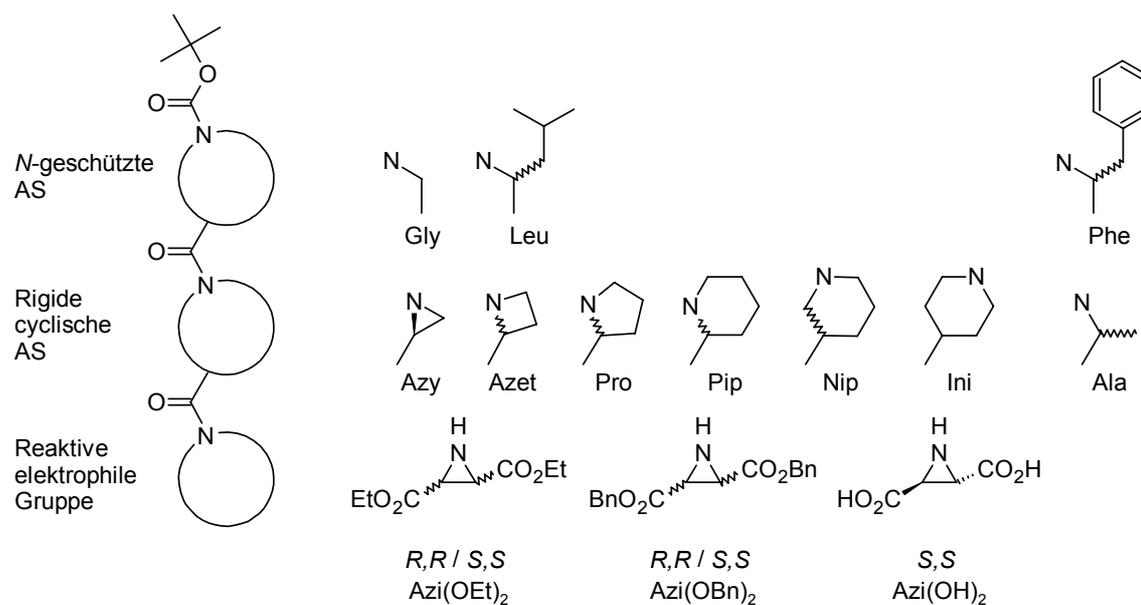
Wie in Kapitel 5.11.2 erwähnt soll diese Hypothese durch ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchungen der Reaktion einer Protease mit einem vollständig ^{13}C -markierten formylierten Inhibitor überprüft werden. Dazu wurden bereits ^{13}C -NMR-spektroskopische Voruntersuchungen mit Papain durchgeführt (Kooperation mit Dr. C. Faber, Physikalisches Institut, Würzburg). Die Synthese des ^{13}C -markierten *N*-Formyl-Derivates wurde ebenfalls bereits begonnen.

6. Zusammenfassung

Die Cystein-Proteasen der Säuger und Parasiten wurden erst in den letzten zwei Jahrzehnten als pharmazeutisch/medizinisches Target erkannt. Die genauen Aufgaben der einzelnen Enzyme dieser sehr umfangreichen und ständig wachsenden Protease-Familie bleiben zwar teilweise noch unbekannt, es ist jedoch klar, dass ihre Aufgabe nicht nur der unspezifische Protein-Abbau ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Synthese einer Reihe peptidomimetischer Inhibitoren mit elektrophilem Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein und deren Testung an den Proteasen Cathepsin B (*human*), Cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*), Falcipain-2 (*Plasmodium falciparum*) und Rhodesain (*Trypanosoma brucei rhodesiense*).

Schema 6-1: Umfassendes Schema der synthetisierten Inhibitoren.



Die Verbindungen sind als irreversible Inhibitoren der Proteasen konzipiert. Der Aziridin-Baustein als Elektrophil wird durch den Cystein-Rest des aktiven Zentrums der Proteasen angegriffen, es erfolgt eine nucleophile Ringöffnung und damit die irreversible Alkylierung der Proteasen. Der Mechanismus der Hemmung wird dabei in einem 2-Stufen-Schema beschrieben:



K_i ist die Dissoziationskonstante des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes EI, die die Affinität eines Inhibitors zum Enzym beschreibt. k_i ist die Alkylierungskonstante der irreversiblen Reaktion zu modifiziertem Enzym E-I, die Aussagen über die Eigenschaften des elektrophilen Bausteins erlaubt. Die Alkylierungskonstante kann nur bestimmt werden, wenn ihr Wert so groß ist, dass in den Enzym-Assays eine zeitabhängige Hemmung beobachtet werden kann. Ist dies nicht der Fall müssen andere Verfahren zum Nachweis der Irreversibilität der Hemmung eingesetzt werden (Dialyse, Affinitätsmarkierung).

Die Aziridin-Bausteine wurden entweder stereoselektiv aus Tartraten oder als Racemate aus Fumaraten dargestellt. Durch NMR-spektroskopische Versuche wurde der Mechanismus der Epimerisierung der als Intermediate der stereoselektiven Synthese auftretenden Azidoalkohole aufgeklärt. Die *N*-Acylierung des Aziridin-Bausteins mit den Aminosäuren bzw. Dipeptiden erfolgte über Segmentkopplungen oder über eine schrittweise Anknüpfung der Aminosäuren. Es wurden dabei verschiedenste Methoden der Peptidchemie eingesetzt.

Die Hemmkonstanten der synthetisierten Substanzen wurden in einem kontinuierlichen fluorimetrischen Mikrotiterplatten-Assay bei Inhibitor-Konzentrationen von 0.35 - 140 μ M ermittelt. Als Substrat diente für alle Enzyme Z-Phe-Arg-AMC.

Der Nachweis der Irreversibilität der Hemmung wurde durch Dialyse-Versuche und die Affinitätsmarkierung von Cathepsin L und Falcipain 2 mit Hilfe eines Biotin-markierten Inhibitors erbracht.

Bei Inhibitoren, die eine zeitabhängige Hemmung aufweisen, wurden die Alkylierungskonstanten (k_i -Werte) ermittelt. Diese sind im Vergleich zu den Konstanten der Epoxysuccinyl-Peptide ca. 1000x kleiner, was frühere Untersuchungen bestätigt.

Aus den ermittelten Dissoziationskonstanten (K_i) ist die Selektivität für Cathepsin-L-ähnliche Proteasen eindeutig. Dabei wird die Reihenfolge RD > CL > FP >>> CB gefunden.

Der beste Inhibitor für alle Enzyme ist die Substanz **116C** (BOC-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn)₂), für die Hemmkonstanten im unteren micromolaren bzw. sogar nanomolaren Bereich gefunden werden. Unter den Substanzen finden sich auch einige, die für einzelne Enzyme selektiv sind. Für CL sind es die Verbindungen **517C**, **105G**, **Z-023B**, **023A**; für CB **034A** und **013B** und für RD **112C**, **222C**, **105B**, **013A**. Dabei gibt es zwei Inhibitoren (**105A**, **517G**), die selektiv nur die parasitären Enzyme FP und RD hemmen.

Die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergab, dass in Abhängigkeit von den Substituenten am Aziridinring (Benzylester, Ethylester, Disäure), von den Substituenten am Aziridin-Stickstoff (Phe-Ala, Leu-Xxx, Gly-Xxx, Xxx = cyclische Aminosäure) und der Stereochemie unterschiedliche Bindungsmodi vorliegen müssen. Erste Docking-Versuche, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Baumann (Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg) durchgeführt wurden, bestätigen dies. Postuliert wird für Inhibitoren, die die Sequenz Leu-Pro enthalten, eine Bindung an die S'-Seite von Cathepsin L. Dies erklärt die Selektivität dieser Inhibitoren, denn innerhalb der S'-Substratbindungstaschen finden sich die größten strukturellen Unterschiede zwischen Cathepsin B und den Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen. Im Gegensatz dazu wird für eines der Phe-Ala-Derivate eine Bindung an die S-Taschen postuliert, die zwischen den einzelnen Proteasen geringere strukturelle Unterschiede aufweisen. Dieser Inhibitor hemmt, wie fast alle Phe-Ala-Derivate, dementsprechend auch Cathepsin B besser als die Leu-Xxx-Derivate.

In Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Engels (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) wurden quantenchemische Rechnungen durchgeführt, die u.a. den Einfluss von Substituenten auf die Kinetik und Thermodynamik der nucleophilen Ringöffnung untersuchten. Vorhergesagt wurde, dass Substituenten am Aziridin-Stickstoff, die den Übergangzustand stabilisieren (*N*-Formyl), zu einer besseren Hemmung führen sollten. Das darauf hin synthetisierte *N*-Formylaziridin-2,3-dicarboxylat **008B** weist eine etwa 5000x bessere Hemmung von CL auf als das nicht-formylierte Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat. Der Mechanismus der Hemmung, die nukleophile Ringöffnung, wurde mit Hilfe einer Modellreaktion NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch prinzipiell bestätigt.

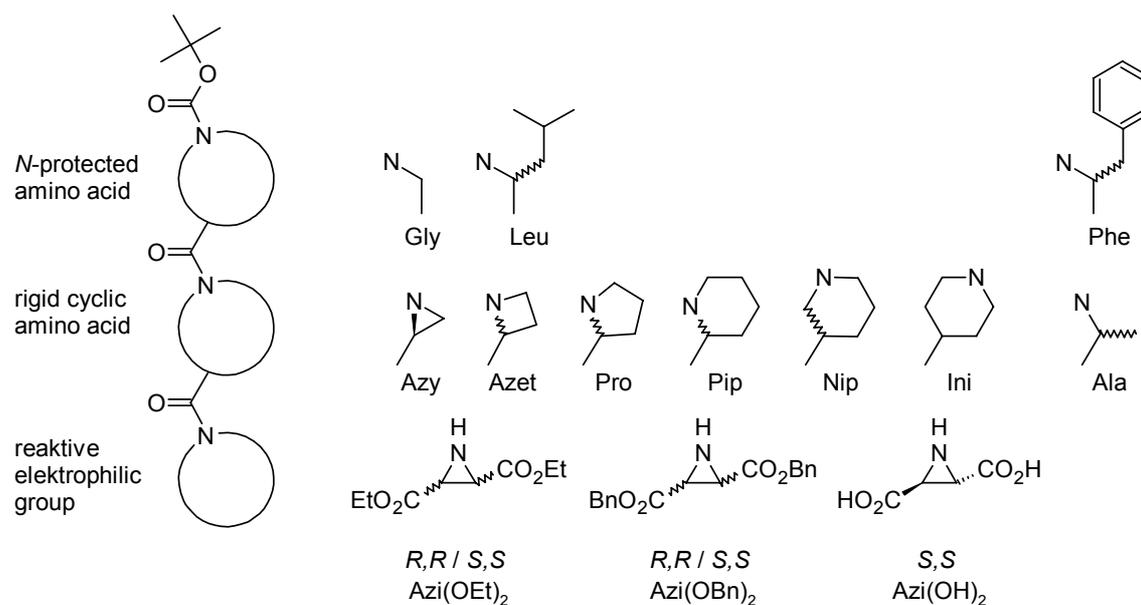
Die gezielt als "affinity label" entwickelte Biotin-markierte Verbindung **999C** wurde zur Identifizierung von Cystein-Proteasen, die von *Plasmodium falciparum* exprimiert werden, eingesetzt. Diese Verbindung hemmt nicht nur die Enzyme, sondern auch das Wachstum der Plasmodien in infizierten Erythrozyten (Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gelhaus/Leippe, Institut für Zoologie, Universität Kiel).

7. Summary

Mammalian and parasitic cysteine proteases have been discovered as potential drug targets within the last two decades. The physiological and pathophysiological functions of this huge and growing family of proteases are not yet known in detail. However, their role is no longer considered to be only unspecific protein degradation.

The goal of the present work was the syntheses of a series of peptidomimetic cysteine protease inhibitors containing aziridine-2,3-dicarboxylate as electrophilic fragment, and the testing of the synthesized compounds on the cysteine proteases cathepsin B (*human*), cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*), falcipain 2 (*Plasmodium falciparum*), and rhodesain (*Trypanosoma brucei rhodesiense*).

Scheme 1: Overview of synthesized Inhibitors.



The compounds are designed as irreversible protease inhibitors. The aziridine ring represents an electrophilic building block which is attacked by the cysteine residue of the proteases' active sites. As a consequence, the nucleophilic ring opening reaction leads to irreversible enzyme alkylation. The inhibition mechanism can be divided into two steps:



K_i represents the dissociation constant of the non-covalent enzyme inhibitor complex EI. This constant characterizes the affinity of the inhibitor for the enzyme. k_i represents the alkylation rate constant of the irreversible reaction leading to the covalently modified enzyme E-I. This constant can only be determined if its value is high enough, so that the time-dependency of the inhibition can be observed. If this is not the case alternative methods to prove the irreversibility of the inhibition have to be used (dialysis, affinity labelling).

The aziridine building blocks were synthesized stereoselectively in a chiral pool synthesis starting from tartrates, and as racemates starting from fumarates, respectively. NMR spectroscopic studies were used to clarify the mechanism of epimerization occurring during the synthesis of the azido alcohols which are intermediates of the stereoselective synthetic route. The *N*-acylation of the aziridines with amino acids or dipeptides was carried out *via* segment or subsequent peptide coupling. Various methods of peptide chemistry were used.

The inhibition constants were determined in fluorimetric microplate enzyme assays with inhibitor concentrations between 0.35-140 μ M. In all cases, the substrate Z-Phe-Arg-AMC was used.

The irreversibility of inhibition was proven by dialysis assays, and by affinity labelling of CL and falcipain using a biotinylated inhibitor.

The alkylation rate constant k_i was determined in cases where time-dependent inhibition could be observed. In comparison to epoxysuccinyl peptides the k_i -values are lower by three orders of magnitude confirming previous investigations.

The K_i values unambiguously show that the compounds exhibit a selectivity for the CL-like enzymes. The order of inhibition potency is RD > CL > FP >>> CB. The most potent inhibitor is **116C** (BOC-(*S*)-Leu-(*S*)-Azy-(*S,S*)-Azi(OBn)₂) with inhibition constants in the submicromolar and even nanomolar range. Some compounds exhibit selectivity for single enzymes: CL: **517C**, **105G**, **Z-023B**, **023A**; CB: **034A**, **013B**; RD: **112C**, **222C**, **105B**, **013A**. Compounds **105A** and **517G** selectively inhibit the parasitic proteases FP and RD.

The analysis of the structure-activity-relationship led to the assumption that different binding modes have to exist in dependence on the aziridine ring substituents (benzyl ester, ethyl ester, diacid), of the aziridine nitrogen substituents (Phe-Ala, Leu-Xxx, Gly-Xxx, Xxx = cyclic amino acid), and of the stereochemistry, respectively. First docking experiments, performed in cooperation with Dr. Baumann's group (Institute of Pharmacy and Food Chemistry, University of Wuerzburg), confirm this assumption. Inhibitors

containing a Leu-Pro sequence are predicted to bind into the S'-subsites of CL. Since the most striking structural difference between CB and CL-like proteases is found within these S'-subsites the selectivity between the enzymes may be due to binding into these subsites. In contrast, for a Phe-Ala derivative the docking postulates binding into the S-subsites which do not differ much between the enzymes. As a consequence, CB is inhibited much better by Phe-Ala-derivatives than by Leu-Xxx-derivatives.

In cooperation with Prof. Engels' group (Institute of Organic Chemistry, University of Wuerzburg) quantumchemical computations were performed analyzing the influence of substituents on the thermodynamics and kinetics of the nucleophilic ring opening. These calculations predicted that substituents stabilizing the transition state (*N*-formyl) should improve inhibition potency. In order to proof this prediction the compound **008B** (*N*-formyl aziridine-2,3-dicarboxylate) was synthesized and tested. Indeed, the compound is about 5000x more potent on CL than the non-formylated diethyl aziridine-2,3-dicarboxylate. The principal mechanism of inhibition - the nucleophilic ring opening - was proven in a model reaction by means of NMR spectroscopy and mass spectrometry.

The biotinylated compound **999C** was designed as an affinity labelling inhibitor usable to label and to identify cysteine proteases expressed by *Plasmodium falciparum*. This compound is not only a potent protease inhibitor but also displays antiplasmodial activity (cooperation with the group of Dr. Gelhaus, Prof. Leippe, Institute of Zoology, University of Kiel).

II. EXPERIMENTELLER TEIL

8. Allgemeine Angaben

8.1 Verwendete Messgeräte

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

Infrarotspektroskopie (IR): Alle IR-Spektren wurden unverdünnt (neat) an einem *Merlin-Biotech*-FTIR-Spektrometer des Typs *PharmalyzIR* aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm^{-1} .

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

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$): Die Aufnahme der NMR-Spektren wurde an einem *Bruker Avance 400* Spektrometer durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Als interner Standard diente bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren das Tetramethylsilan $\delta(\text{TMS}) = 0.0 \text{ ppm}$, bzw. die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 2.50 \text{ ppm}$, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_4\text{-MeOD}) = 4.84 \text{ ppm}$], und bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren diesen ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 39.43 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_4\text{-MeOD}) = 49.05 \text{ ppm}$]. Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, sep = Septett, m = Multiplett, und b = breit. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Massenspektrometrie (MS): Die Aufnahme der EI-, CI- und FAB-Massenspektren erfolgte an den Geräten *Varian MAT-CH 7* und *Finnigan MAT 8200* bei einer Elektronenstoßenergie von 70 eV. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensitäten der Signale in Prozent bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) an.

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

Als Standard-Fließmittel wurden Wasser/0,05% HCO₂H/Acetonitril-Gemische bei einer Flussrate von 200 µl/min verwendet. Messungen wurden standardmäßig mit einer Kapillarspannung von 2,6 kV und N₂ als Trockengas durchgeführt.

HR-ESI-MS: Messung: 0.1 bis 1.0 µM Lsg. in Methanol/Wasser/Essigsäure (49.5/49.5/1) mit Hilfe eines FT-ICR-Massenspektrometers APEX II von Bruker, ausgestattet mit einem 7 T Magneten und einer ESI-Ionenquelle von Apollo. Trockengas N₂, 15°C. Capillar Exit Spannung 80 V; 128 Scans addiert nach einer Akkumulationszeit von 0.1 sec im Hexapol mit einem Messbereich zwischen 200 und 1200 m/z. Auflösung 50000 (d.h. Basislinientrennung von 2 Peaks mit einer Masse von 50000 und 50001 Dalton).

Elementaranalysen (CHN): Die Elementaranalysen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg an den Geräten *Carlo Erba 1106* und *Leco CHNS-932* durchgeführt.

Enzymassays: a) *Fluorimetrie* - Cary Eclipse Fluorimeter von Varian mit microplate reader.

b) *HPLC* – HPLC-System Varian ProStar ausgerüstet mit Autosampler Model 410

8.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ bzw. Kieselgel RP C18 sowie Glasplatten, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel RP C18 der Firma Merck verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber *Ehrlich's Reagenz* (Amine) oder Ioddampf.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterialien wurden Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm mesh) sowie Aluminiumoxid (Alox) 90 aktiv neutral (0.063-0.2 mm mesh, Aktivitätstufe I) der Firma Merck verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen für DC und SC sind in Volumenteilen angegeben.

8.3 Enzyme, Substrate und Reagenzien

Enzyme:

Cathepsin L (*Paramecium tetraurelia*)

Calbiochem

Cathepsin B (human liver)

Calbiochem

Falcpain 2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Plasmid: Prof. Dr. P. Rosenthal Expression: Prof. Dr. R. Hilgenfeld
Rhodesain (<i>Trypanosoma rhodesiense</i>)	Prof. Dr. J. McKerrow
Trypsin (bovine pancreas)	Merck
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Merck
Aminosäuren,	Bachem, Novabiochem, Neosystem
Dipeptide	
BOC-(S)-Leu-(S)-Pro	Bachem
BOC-(S)-Phe-(S)-Ala	Bachem
Substrat Z-Phe-Arg-AMC	Bachem
EEDQ	Novabiochem
LiOH, NaN ₃ , Ph ₃ P, Et ₃ N, DCC, L- und D -Weinsäure	Fluka
DMAP, DPSI	Merck
DPPA	Aldrich
PdC 10% typ E 10 N/D	Degussa

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

8.4 Arbeitsmethoden

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

9. Allgemeine synthetische Methoden

9.1 *N*-Acylierung des Aziridin-Stickstoffs mit symmetrischen Anhydriden (Methode A)

Zu 2.2 mmol *N*-geschützter Aminosäure, gelöst in 10 ml Dichlormethan, wurden bei 0°C 290 mg (1.1 mmol) DCC zugesetzt. Nach 60 min wurde der entstandene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, 1 mmol Aziridin-2,3-dicarboxylat und eine katalytische Menge (0.1 Eq.) DMAP zugegeben. Die Reaktion wurde langsam auf RT gebracht und mittels DC-Analyse verfolgt. Nach 3-12 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rest in 50 ml Ethylacetat mit 5 Tropfen Wasser aufgenommen und 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde der präzipitierte Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, die Lösung mit 1x 20 ml 2% Na₂CO₃, 2x 20 ml Wasser und 1x10 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mittels hydrostatischer Säulenchromatographie gereinigt.

9.2 *N*-Acylierung mit DPPA (Methode B)

Eine Lösung von 1 mmol Carbonsäure (oder deren Salz) und 1 mmol C-geschützter Aminosäure (oder Dipeptid) in 5ml DMF wurde bei 0°C mit 303 mg (1.1 mmol) DPPA versetzt. Tropfenweise wurden 2 Eq. (bei Carbonsäure-Salz 1 Eq. Et₃N) Et₃N in 3 ml DMF über 30 min zugegeben. Nach 12 Stunden Rühren bei 0°C wurden 50 ml Ethylacetat zugegeben und 3x mit je 25 ml Wasser, 2x mit NaHCO₃ und 1x mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

9.3 Fragment-Kupplung mit EEDQ (Methode C)

248 mg (1 mmol) EEDQ wurden zu einer Lösung aus 0.5 mmol Aziridin-2,3-dicarboxylat und 1 mmol *N*-geschützten Peptids in 2 ml DMF oder Dichlormethan zugegeben. Nach 5 Tagen bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit wurde das Reaktionsgemisch mit 50 ml Ethylacetat verdünnt und 2x mit je 25 ml 2% Na₂CO₃, 2x mit Wasser und 1x mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde dann mit Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

9.4 Kupplung von Aminosäuren mit DCC+HOBT zu Dipeptid-Fragmenten (Methode D)

Ein equimolares Gemisch aus Aminosäure-Benzylester, BOC-geschützter Aminosäure und HOBT wurde in THF bei 0°C mit 1 Eq. DCC versetzt. Nach 30 min bei 0°C wurde

das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 5 Stunden gerührt. Nach Abdestillieren des THF wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit 5 Tropfen Wasser 30 min gerührt und anschließend der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die organische Phase wurde dann 2x mit 2% Na₂CO₃, 2x mit ges. NaHCO₃, 2x mit Wasser und 1x mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Der nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde ohne weitere Reinigung mit 20 mg Pd-C in Ethylacetat 30 min mit H₂ hydrogenolysiert (zur Aufarbeitung siehe Methode G, Kapitel 9.7). Die Dipeptide wurden aus Ethylacetat/Petrolether 40-60 umkristallisiert.

9.5 Kondensation von C-geschützten Aminosäuren mit BOC-Glycin-N-carboxyanhydrid (Methode E)

1 Eq. BOC-Gly-NCA wurde in einer Portion zu einer Lösung von 1 Eq. Aminosäure-Benzylester in Dichlormethan bei 0°C gegeben und kräftig gerührt. Nach Abklingen der CO₂-Entwicklung wurde das Gemisch weitere 30 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1x mit 2% Na₂CO₃, 1 x mit 5% Citronensäure, 2x mit Wasser und 1x mit ges. NaCl gewaschen. Nach Abziehen des Lösemittels wurde nach Methode G der Benzylester hydrogenolytisch abgespalten und das Produkt aus Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert.

9.6 Kondensation von Aziridinyldipeptiden mit einer weiteren Aminosäure: Entschützen und Kopplung mit DPPA (Methode F)

1 mmol BOC-N-geschützten Dipeptids wurde in einem Dichlormethan/TFA-Gemisch 5/1 bei 0°C unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde 3x erneut in Dichlormethan gelöst und das Lösungsmittel wurde abgezogen, um die restliche TFA zu entfernen. Der Rückstand wurde ohne Reinigung unter strengstem Ausschluss von Luftfeuchtigkeit nach Methode B (Kapitel 9.2) mit DPPA umgesetzt.

9.7 Katalytische Hydrogenolyse der Benzylester (Methode G)

Die Lösung des Benzylesters in Ethylacetat oder MeOH wurde mit 20 mg Pd-C versetzt. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült, evakuiert und mit H₂ bei Raumdruck begast. Das Gemisch wurde kräftig gerührt und der Fortschritt der Hydrogenolyse dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. 30 min wurde das Pd-C durch Filtration über Celite[®] entfernt. Nach Abziehen des Lösemittels wurde das Produkt umkristallisiert.

10. Synthetisierte Verbindungen

10.1 Aziridin-Bausteine

10.1.1 Synthetisierte Ttrate

Zu einer Suspension aus 15 g (100 mmol) L-Weinsäure in 100 ml Toluol wurden 27 g (250 mmol) Benzylalkohol und 1.8 g (10% Eq.) *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann ca. 10 Stunden am Wasserabscheider unter Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss erhitzt bis kein Wasser mehr entstand (ca. 10 Stunden). Das Toluol wurde abdestilliert, der Rückstand in 150 ml Diethylether gelöst, mit 3 x 100 ml ges. NaHCO₃, 2 x 100 ml Wasser gewaschen, getrocknet und in 500 ml Cyclohexan eingegossen. Das Präzipitat wurde dann erneut noch zweimal in Diethylether aufgelöst und in Cyclohexan ausgefällt.

(3*R*,3*R*)-Dibenzyltartrat (Ic)

Weißer Feststoff, 30.7 g (93 mmol), Ausb. 93%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.14.

Smp.: 53-54°C (Lit.^[64] 49-50°; 62-64; 67-69°C).

$[\alpha]_D^{20} = +14.3$ (c = 1.15 in MeOH)

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3458$ (m, br.), 1744 (s, C=O), 1450 (m), 1405 (m), 1253 (m), 1188 (m), 1125 (s), 1088 (s, br.), 972 (m), 735 (m), 695 (s, br.) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 3.13$ (s br., 2 H, 2 OH), 4.53 (s, 2 H, 2 CH), 5.19 (t, 4 H, CH₂), 7.25-7.32 (m, 10H, 2 C₆H₅) ppm.

(2*S*,3*S*)-Dibenzyltartrat (Id)

$[\alpha]_D^{20} = -14.3$ (c = 1.03 in MeOH)

Spektroskopische Daten identisch mit (*R,R*)-Dibenzyltartrat.

(2*R*,3*R*)-Diallyltartrat (Ie)

Aus Allylalkohol und Weinsäure, Durchführung wie für Dibenzyltartrat.

Farbloses Öl, 20.7 g (90 mmol), Ausb. 90%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.26.

$[\alpha]_D^{20} = +18.4$ (c = 1.01 in MeOH)

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3449$ (m, br), 3088 (s), 2947 (m), 1738 (s, C=O), 16541 (s), 1368 (m), 1278 (m), 1189 (m), 1128 (s), 1082 (s), 986 (m), 926 (m), 820 (m), 711 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 3.04$ (br s, 2 H, 2 OH), 4.62 (s, 2 H, 2 CH), 4.75 (dd, 4 H, -CH₂-CH=, J = 4.55 Hz, J = 1.27 Hz), 5.30 (dd, 2 H, CH₂=CH-, J = 1.01 Hz, J_{cis} = 10.61 Hz), 5.38 (dd, 2 H, CH₂=CH-, J = 1.27 Hz, J_{trans} = 17.18 Hz), 5.89 – 6.01 (m, 2 H, 2 CH₂=CH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 67.21$ (2 -CH-CH₂-), 72.49 (2 CH), 119.68 (2 CH₂=CH-), 131.52 (2 CH₂=CH-), 171.60 (2 C=O) ppm.

C₁₀H₁₄O₆ (230.21), ber.: % C 52.17, H 6.13; gef.: % C 52.25, H 6.07.

(2S,3S)-Diallyltartrat (If)

Spektroskopische Daten identisch mit (*R,R*)-Diallyltartrat.

$[\alpha]_D^{20} = -18.9$ (c = 1,03 MeOH).

C₁₀H₁₄O₆ (230.21), ber.: % C 52.17; H 6.13; gef.: % C 51.99, H 6.18.

10.1.2 Synthetisierte Oxiran-2,3-dicarboxylate

- ◆ 32 g (155 mmol) Diethyltartrat wurden mit 154 ml HBr/Eisessig versetzt und bei RT 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf ca. 500 g Eis gegossen und 3x mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann mit je 2x 100 ml Wasser und anschließend mit 2x 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt.
- ◆ Der verbleibende Rückstand wurde in 150 ml abs. Ethanol gelöst, es wurden 16.0 ml HBr/Eisessig hinzugefügt und 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde im Vakuum abdestilliert.
- ◆ Der Rückstand wurde in 400 ml Aceton gelöst und nach Zugabe von 124 g K₂CO₃ unter gelegentlichem Schütteln 12 Stunden stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde über einer Celite[®]-Schicht abfiltriert und nach Entfernung

des Lösungsmittels wurde der Rückstand über eine 15 cm Vigreux-Kollone destilliert.

(2*R*,3*R*)-Diethyloxiran-2,3-dicarboxylat (IIa)

Aus 32 g (155 mmol) (*R,R*)-Diethyltartrat

Farblose viskose Flüssigkeit, 11.6 g (62 mmol), Ausb.: 39 %.

Sdp.: 77-79°C/2.0·10⁻² mbar (Lit.^[48] 80°C/0.1 mm Hg).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -107.1$ (c = 1.05 Diethylether) (Lit. -108.9, c=1.068, Diethylether).^[48]

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1,27 (t, 6 H, 2 x CH₃), 3.65 (s, 2H, 2x CH), 4.25 (q, 4H, 2 x CH₂), 5.19 (t, 4 H, OCH₂) ppm.

(2*S*,3*S*)-Diethyloxiran-2,3-dicarboxylat (IIb)

Aus 32 g (155 mmol) (*S,S*)-Diethyltartrat

Farblose viskose Flüssigkeit, 11.9 g (63 mmol), Ausb.: 41 %.

Sdp.: 80°C/1,9·10⁻² mbar, (Lit.^[48] 80°C/0.1 mm Hg).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +99.3$ (c = 1.113 Diethylether) (Lit. +96.5, c=1.057, Diethylether).^[48]

Spektroskopische Daten identisch mit (*R,R*)-Diethyloxiran-2,3-dicarboxylat.

(2*R*,3*R*)-Dimethyloxiran-2,3-dicarboxylat (IIIm)^[104]

Aus 28 g (155 mmol) (*S,S*)-Dimethyltartrat

Farblose, nadelförmige Kristalle, 11.2 g, Ausb.: 45%

Spektroskopische und analytische Daten entsprechen den Literaturangaben.^[104]

10.1.3 Synthetisierte 1,3,2-Dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylate

45 mmol Tartrat wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und bei 0°C unter Stickstoff tropfenweise mit 3.7 ml (50 mmol) SOCl₂ versetzt. Die Reaktion wurde mit 10 Tropfen DMF gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf 50°C erhitzt und das dabei entstehende HCl mit einem schwachen Stickstoffstrom aus dem Reaktionskolben

kontinuierlich entfernt. Nach 30 min wurde das restliche SOCl_2 und das Lösemittel im Vakuum bei 50°C entfernt. Das Produkt wurde im Falle des Dibenzylesters ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

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

Farblose Flüssigkeit, 10.7 g, (43 mmol) 95%.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +186.5 \text{ (c = 2.28 MeOH).}^{[62]}$$

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3520$ (m, br), 3000 (s), 2960 (s), 1745 (s, br, C=O), 1685 (m), 1645 (m), 1475 (m), 1450 (m), 1375 (s), 1220 (s, br), 1060 (s, S=O), 1020 (s), 940 (m), 855 (m), 825 (m), 730 (s, br) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 1.35$ (t, 6 H, 2 CH_3 $J=7.0\text{Hz}$), 4.30 (q, 4 H, 2 CH_2 , $J=7.0$ Hz), 5.22 (d, 1 H, CH $J=4.3$ Hz), 5.69 (d, 1 H, CH, $J=4.3$ Hz) ppm.

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_7\text{S}$ (252.24), ber.: % C 38.09, H 4.80; gef.: % C 38.17, H 4.93.

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

Gelbliches Öl, 16.2 g (43 mmol), Ausb.: 95%

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -72.3 \text{ (c = 1.16 MeOH).}$$

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3495$ (m, br), 3034 (s), 2959 (s, C-H), 1742 (s, br, C=O), 1661 (m), 1496 (m), 1454 (m), 1382 (m), 1261 (s), 1209 (s, br), 1058 (s, S=O), 1003 (s), 960 (m), 792 (m), 735 (m), 695 (s, br) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 5.17$ (d, 4 H, 2 CH_2), 5.18 (d, 1 H, $J = 4,3$ Hz, 2 CH_2), 5.68 (d, 1 H, $J = 4.3$ Hz, CH), 7.25-7.32 (m, 10H, 2 C_6H_5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 68.98$, 69.05 (CH_2), 79.65, 80.17 (CH), 129.10 (C_6H_5), 134.60, 134.73 (q. C), 166.62, 166.74 (C=O) ppm.

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

15 g (40 mmol) Dioxathiolan, gelöst in MeCN / Wasser-Gemisch 1/1 wurden mit 9.6 g (45 mmol) NaIO_4 und mit einer katalytischen Menge (5 mg) $\text{RuCl}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ versetzt und 1 Stunde bei RT gerührt. Das Acetonitril wurde im Vakuum bei 40°C abdestilliert und der Rückstand mit 3x 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden

dann mit 1x 50 ml NaHCO₃, 1x 20% Na₂S₂O₃, 1x 100 ml Wasser und zum Schluss mit 1x 100 ml ges. NaCl Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum auf ca. 50 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde über eine ca. 10 cm dicke Kieselgel-Schicht gepresst, das Kieselgel mit weiteren 150 ml Diethylether gewaschen und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.45.

Farbloses Öl, 10.8 g (27 mmol), 69 %.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.31-7.39 (m, 10H, arom. CH); 5.45 (d, J=4.3 Hz, 1H, CH); 5.29 (s, 4 H, 2 CH₂) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 164.11 (C=O), 133.71 (q. C), 128.90 (arom. CH), 76.94 (2x CH), 69.20 (2x CH₂) ppm.

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

Gelbliches Öl, Ausb.: 16 g (42 mmol), 93%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.41.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +71.8$ (c = 1.16 MeOH).

C₁₈H₁₆O₇S (376.38), ber.: % C 57.44; H 4.28; gef.: % C 57.56, H 4.35.

Spektroskopische Daten siehe (*R,R*)-Dibenzylidioxathiolan (III c).

(4R,5R)-Diallyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (III e)

Farbloses bis leicht gelbliches Öl, 12.0 g (43.5 mmol), Ausb.: 96%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.42.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -173.5$ (c = 1.07 MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3501$ (m, br), 3090 (s), 2958 (s), 1742 (s, br, C=O), 1647 (m), 1450 (m), 1369 (m), 1275 (m), 1203 (m), 1056 (s, S=O), 990 (m), 937 (m), 804 (m), 733 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 4.75 (dt, 2H, J=6.1 Hz, -CH₂-CH=), 4.76 (dt, 2H, J=6.1 Hz, -CH₂-CH=), 5.30 (d, 1H, J=4.3 Hz, CH), 5.31 (dd, 1H, J=1.3 Hz, J_{cis}=10.4 Hz, CH₂=CH-), 5.33 (dd, 1H, J=1.0 Hz, J_{cis}= 10.4 Hz, CH₂=CH-), 5.38 (dd, 1H, J=1.3 Hz, J_{trans}= 17.2 Hz, CH₂=CH-), 5.40 (dd, 1H, J=1.3 Hz, J_{trans}=17.2 Hz, CH₂=CH-), 5.75 (d, 1H, J=4.3 Hz, CH), 5.88–5.99 (m, 2H, -CH=CH₂) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 67.78 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 67.82 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 79.59 (CH), 80.15 (CH), 120.21 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 120.54 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 130.85 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 130.98 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 166.47 (C=O), 166.57 (C=O) ppm.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{S}$ (276.26), ber.: % C 43.48, H 4.38; gef.: % C 43.59, H 4.42.

(4S,5S)-Diallyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (III f)

Spektroskopische Daten identisch mit (*R,R*)-Diallyldioxathiolan (**III e**).

Farbloses bis leicht gelbliches Öl, 11.8 g (42.5 mmol), Ausb.: 94%.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +166.97$ (c = 1.12 in MeOH).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{S}$ (276.26), ber.: % C 43.48; H 4.38; gef.: % C 43.51, H 4.35.

10.1.4 Synthetisierte anti-2,3-Azidoalkohole

Methode 1:

5.0 g Epoxid (26.6 mmol) wurden in 80 ml Ethanol abs. gelöst, 5,3 g (80 mmol) NaN_3 und 4.3 g (80 mmol) NH_4Cl hinzugefügt und nach 12 Stunden Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch über Celite[®] abfiltriert und im Vakuum konzentriert. Dem Rückstand wurden 50 ml Wasser zugefügt und es wurde mit 3 x 50 ml Diethylether extrahiert. Die Etherphase wurde getrocknet und nach Abziehen des Lösungsmittels säulenchromatographisch gereinigt.

Methode 2: ^[62]

10.0 g (26.5 mmol) cyclisches Sulfit wurden in 20 ml DMF abs. mit 5.2 g (80 mmol) NaN_3 versetzt und 24 Stunden bei RT gerührt. Das orange gefärbte Reaktionsgemisch wurde nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) mit 50 ml Diethylether verdünnt, mit 50 ml Wasser versetzt und mit 3 x 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden dann mit 100 ml Wasser und 100 ml ges. NaCl Lösung gewaschen und anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

Methode 3: ^[62]

Zu 10 g (26.5 mmol) Dibenzyl-dioxodioxathiolan in einem Aceton-Wasser-Gemisch (4/1) wurden 3.2 g (50.0 mmol) NaN_3 zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei RT gerührt. Das dabei entstehende weiße Präzipitat wurde auf einer Sinterglasfilternutsche gesammelt und gründlich mit Diethylether gewaschen. 10 g

(25.0 mmol) (*R,R*)-Dioxodioxathiolan wurden in einem Aceton-Wasser-Gemisch (4:1) gelöst, danach wurden 3.2 g (2 Eq.; 50.0 mmol) NaN_3 zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1 Stunde bei RT gerührt. Das weiße kristalline Präzipitat wurde abfiltriert und mit 100 ml Diethylether gewaschen. 8.8 g, 20.25 mmol, 81 %

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 400.13 MHz): $\delta = 7.26\text{-}7.38$ (m, 10H, arom. CH) , 5.10 (d, $J=4.0$ Hz, 1 H, CH), 4.99-5.09 (m, 4 H, 2 CH_2), 4.97 (d, $J=4.0$ Hz, 1 H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 100.62 MHz): $\delta = 167.64$ (C=O) , 167.11 (C=O) , 135.67 (q.C) , 135.44 (q. C), 128.09 (arom. CH), 74.10 (CH), 66.98 (CH_2), 66.40 (CH_2), 63.06 (CH) ppm.

Dieser Feststoff wurde dann 4 Stunden in 200 ml eines Gemisches aus 20% H_2SO_4 und Diethylether (1/1) hydrolysiert. Die organische Phase wurde anschließend abgetrennt, mit 50 ml ges. NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und mit 2 x 50 ml Wasser gewaschen. Nach Abtrennen und Trocknen der organischen Phase wurden 5.9 g (16.6 mmol, 82%) Dibenzyl-(*2R,3S*)-3-azido-2-hydroxybutan-1,4-dicarboxylat (**Vc**) isoliert. (Restliche Daten siehe weiter unten).

(2R,3S)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (Va)

Hergestellt nach Methode 1 und 2.

Farbloses Öl, 4.3 g (18.8 mmol), Ausb.: 71%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): 1.30 (t, $J= 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 (t, $J= 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 4.26-4.32 (m, 4 H, 2 CH_2), 4.33 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), O-CH, 4.64 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, N-CH) ppm.

Die übrigen analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben. ^[67]

(2S,3R)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (Vb)

Hergestellt nach Methode 1.

Farbloses Öl, 4.1 g (18.2 mmol), Ausb.: 71%.

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

Hergestellt nach Methode 2 und 3.

Farblose nadelförmige Kristalle, 6.5 g (18.3 mmol), Ausb.: 69%.

Smp.: 33-34°C.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.45.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39.9^{\circ}$ (c = 1,15 in MeOH). (Lit.^[71] +17.0°C=2.5, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3412$ (m, br), 3062 (s), 3034 (s), 2105 (s), 1747 (s, br, C=O), 1713 (s), 1498 (m), 1456 (m), 1384 (m), 1294 (m), 1268 (m), 1099 (s), 1019 (m), 969 (m), 870 (m), 743 (m), 694 (s, br) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 3.30$ (s, 1 H, OH), 4.26 (d, 1 H, J=2.8 Hz, CH), 4.57 (d, 1 H, J=2.8 Hz, CH), 4.93-4.98 (m, 4H, 2x CH₂), 7.25-7.32 (m, 10 H, 2x C₆H₅) ppm.

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

Hergestellt nach Methode 2 und 3.

Farblose nadelförmige Kristalle, 6.2 g (17.4 mmol), Ausb.: 66%.

Smp.: 33-34°C.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.45

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37.1$ (c = 1.02 MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3412$ (m, br), 3062 (s), 3034 (s), 2105 (s, -N₃), 1747 (s, br, C=O), 1713 (s), 1498 (m), 1456 (m), 1384 (m), 1294 (m), 1268 (m), 1099 (s), 1019 (m), 969 (m), 870 (m), 743 (m), 694 (s, br) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 3.30$ (s, 1 H, OH), 4.26 (d, 1 H, J=2.8 Hz, CH), 4.57 (d, 1 H, J=2.8 Hz, CH), 4.93-4.98 (m, 4H, 2x CH₂), 7.25-7.32 (m, 10 H, 2x C₆H₅) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 64.84$ (CH), 68.52, 68.79 (CH₂), 72.58 (CH), 129.06 (C₆H₅), 134.82, 134.98 (q. C), 167.30, 171.03 (C=O) ppm.

C₁₈H₁₇ N₃O₅ (355.34), ber.: % C 60.84, H 4.82; N 11.83; gef.: % C 60.96, H 4.78, N 11.80.

(2R,3S)-Diallyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (Ve)

Hergestellt nach Methode 2.

Farblose Flüssigkeit, 4.1 g (15.9 mmol) Ausb.: 61%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.38.

$[\alpha]_D^{20} = +30.4$ (c = 2.005 MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3412$ (m, br), 3062 (s), 3034 (s), 2105 (s, -N₃), 1747 (s, br, C=O), 1713 (s), 1498 (m), 1456 (m), 1384 (m), 1294 (m), 1268 (m), 1099 (s), 1019 (m), 969 (m), 870 (m), 743 (m), 694 (s, br) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 3.33$ (s, 1 H, OH), 4.39 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, CH), 4.71 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, CH), 5.32 (dd, 2H, *J*=0.8 Hz, *J*_{cis}= 10.6 Hz, -CH=CH₂), 5.38 (dd, 2H, *J*=1.3 Hz, *J*_{trans}= 17.12 Hz, -CH=CH₂), 5.86-5.99 (m, 2H, 2x CH=CH₂) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 64.87$ (CH), 67.27 (CH₂), 67.61 (CH₂), 72.49 (CH), 120.05 (-CH=CH₂), 120.15 (-CH=CH₂), 131.23 (-CH=CH₂), 131.34 (-CH=CH₂), 167.08 (C=O), 170.83 (C=O) ppm.

C₁₀H₁₃O₅N₃ (255.23), ber.: % C 47.06, H 5.13, N 16.46; gef.: % C 46.91, H 5.25, N 16.58.

(2S,3R)-Diallyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (Vf)

Hergestellt nach Methode 2.

Farblose Flüssigkeit, 4.0 g (15.8 mmol) Ausb.: 60%.

$[\alpha]_D^{20} = -30.7$ (c = 1.06 MeOH).

C₁₀H₁₃O₅N₃ (255.23), ber.: % C 47.06, H 5.13, N 16.46; gef.: % C 47.22, H 5.01, N 16.35.

10.1.5 Synthetisierte Aziridin-2,3-dicarboxylate

◆ Synthese der Enantiomere

Zu 3.5 g (10 mmol) Azidoalkohol in absolutem DMF wurden bei 0°C Portionsweise über 30 min 3.2 g (12 mmol) Triphenylphosphin zugesetzt. Nach Abklingen der Stickstoffentwicklung wurde das Gemisch 30 min. bei RT und dann weitere 4 Stunden bei 85°C gerührt. Das DMF wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit Petrolether 40-60/Diethylether 3/1 gereinigt.

◆ Synthese des Racemates

7.4 g (25 mmol) Dibenzylfumarat wurden zusammen mit 5.2 g (26 mmol) Diphenylsulfimin in Benzol unter Rückfluss erhitzt. Nach 12 Stunden wurde das Benzol abgezogen und der Rückstand auf Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt.

(S,S)+(R,R)-Dibenzylaziridine-2,3-dicarboxylat (C+D)

Farblose Kristalle, 1.6 g, (5.2 mmol), Ausb.: 21 %. Smp.: 59-60°C.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.34.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3159 (m, br), 2946 (s), 2889 (s), 1728 (s, br, C=O), 1496 (s), 1455 (m), 1383 (m), 1340 (m), 1271 (m), 1168 (m), 1004 (s), 958 (m), 910 (m), 865 (m), 831 (m), 744 (s), 698 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1.84 (s, 1 H, NH), 2.94 (s, 2 H, CH), 5.20 (m, 4 H, 2 CH₂), 7.36 (m, 10H, 2 C₆H₅) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 35.47 (CH), 68.02 (CH₂), 128.65 (C₆H₅), 134.85 (2 C), 168.43 (C=O) ppm.

C₁₈H₁₇O₄N (311.33), ber.: % C 69.44, H 5.50, N 4.5; gef.: % C 69.51, H 5.49, N 4.39.

(2S,3S)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (A)

Leicht gelbes Öl, 1.03 g (5.5 mmol), Ausb.: 55%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan : Ethylacetat 2:1 :R_f = 0.35.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +131.1 (c = 1.1, CHCl₃). (Ref.^[48] +128.0, c=1, CHCl₃; Ref.^[58] +133.3, c=1, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 1.28 (t, 6H, 2 x CH₃), 1.89 (s br., 1 H, NH), 2.84 (s, 2 H; 2 x CH), 4.22 (q, 4 H, 2 CH₂) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 13.64 (2x CH₃), 35.73 (2x CH), 61.78 (2x CH₂), 168.38 (2 C=O) ppm.

(2R,3R)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (B)

Leicht gelbes Öl, 1.07 g (5.7 mmol), 57%.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -113.1 (c = 1.05, CHCl₃). Ref.^[48] -89.0, c = 0.98, CHCl₃).

Die übrigen spektroskopischen Daten entsprechen dem (S,S)-Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (**A**).

(S,S)-Dibenzylaziridine-2,3-dicarboxylat (C)

Farblose Kristalle, 1.18 g, (3.8 mmol), Ausb.: 38 %. Smp.: 59-60°C.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.34.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +79.3$ (c = 1.02 in MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3159$ (m, br), 2946 (s), 2889 (s), 1728 (s, br, C=O), 1496 (s), 1455 (m), 1383 (m), 1340 (m), 1271 (m), 1168 (m), 1004 (s), 958 (m), 910 (m), 865 (m), 831 (m), 744 (s), 698 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): $\delta = 1.84$ (s, 1H, NH), 2.94 (s, 2H, CH), 5.20 (m, 4H, 2 CH₂), 7.36 (m, 10H, 2 C₆H₅) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 35.47$ (CH), 67.46 (CH₂), 68.02 (CH₂), 128.65 (C₆H₅), 134.85 (2 C), 168.43 (C=O) ppm.

C₁₈H₁₇O₄N (311.33), ber.: % C 69.44, H 5.50, N 4.5; gef.: % C 69.51, H 5.49, N 4.39.

(R,R)-Dibenzylaziridine-2,3-dicarboxylat (D)

Farblose Kristalle, 1.09 g (3.5 mmol), Ausb.: 35 %.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -79.8$ (c = 1.04 MeOH).

C₁₈H₁₇O₄N (311.33), ber.: % C 69.44, H 5.50, N 4.50; gef.: % C 69.41, H 5.56, N 4.41.

Die übrigen spektroskopische Daten entsprechen dem (S,S)-Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat (**C**).

(S,S)-Diallylaziridin-2,3-dicarboxylat (E)

Gelbliches Öl, 0.88 g (4.2 mmol), Ausb.: 42 %.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:Ethylacetat 3:1, R_f = 0.32.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +131.5$ (c = 1.16 MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3159 (m, br), 2946 (s), 2889 (s), 1728 (s, br, C=O), 1496 (s), 1455 (m), 1383 (m), 1340 (m), 1271 (m), 1168 (m), 1004 (s), 958 (m), 910 (m), 865 (m), 831 (m), 744 (s), 698 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 1.85 (s, 1H, NH), 2.92 (s, 2H, CH), 4.63-4.69 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-CH=}$), 5.28 (dd, 2H, $J=1.0$ Hz, $J_{\text{cis}}=10.6$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.34 (dd, 2H, $J=1.3$ Hz, $J_{\text{trans}}=17.2$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.87-5.99 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH-}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 36.16 (CH), 66.90 ($\text{CH}_2\text{-CH=}$), 119.73 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.60 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 169.62 (C=O) ppm.

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ (211.21), ber.: % C 56.86, H 6.20, N 6.6; gef.: % C 56.97, H 6.12, N 6.61.

(R,R)-Diallylaziridin-2,3-dicarboxylat (F)

Leicht gelbes Öl 0.91 g (4.3 mmol), Ausb.: 43 %.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -130,8$ ($c = 1.02$ in MeOH).

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ (211.21), ber.: % C 56.86, H 6.20, N 6.63; gef.: % C 56.98, H 6.15, N 6.57.

Die übrigen spektroskopische Daten entsprechen dem (S,S)-Diallylaziridin-2,3-dicarboxylat (E).

10.1.6 Synthetisierte nicht-proteinogene Aminosäuren

N-Tritylbenzylaziridin-2-carboxylat (Trt-Azy-OBn)

10.6 g (0.1 mol) (S)-Serin wurden in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff suspendiert und 20 ml (0.2 mol) Benzylalkohol wurden zusammen mit 21 g (0.11 mol) pTSS zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde am Wasserabscheider 12 Stunden refluxiert. Nach Abziehen des CCl_4 im Vakuum wurde der Rest mit 100 ml Diethylether versetzt und nach 2 Tagen im Kühlschrank wurden weitere 200 ml kalter Ether zugegeben. Die entstandene Suspension wurde abfiltriert und mit Ether gewaschen. SerOBn•pTSS wurde als weißes kristallines Pulver isoliert, 35.2 g, 92%. Smp. 84-85°C. (Lit.: 80°C).^[72]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 8.11-8.02 (bs, 2H, $\text{NH}+\text{COOH}$); 7.68 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, arom. CH Tos); 7.29-7.12 (m, 5H, arom. CH) 7.01 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, arom. CH Tos); 5.11-4.96 (m, 2H, CH_2OPh); 4.16-4.04 (m, 1H, α -Ser CH); 4.04-3.95 (m, 1H, β -Ser CH_2); 3.93-3.83 (m, 1H, β -Ser CH_2); 2.26 (s, 3H, CH_3 Tos) ppm.

20 g (52 mmol) (S)-Ser-OBn•pTSS wurde in 50 ml CH₃Cl gelöst und bei 0°C wurden 15.3 g (55 mmol) Tritylchlorid zugegeben. Unter kräftigem Rühren wurden tropfenweise 15 ml (2 Eq.) Et₃N über 15 min zugegeben. Nach weiteren 12 Stunden Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch erneut auf 0°C gekühlt und 7.1 g MsCl zugegeben, gefolgt von tropfenweise Zugabe von 10 ml Et₃N. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1 Stunde bei RT gerührt und für weitere 5 Stunden (DC Kontrolle) unter Reflux erhitzt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rest in 100 ml EtOAc aufgenommen und je 2x mit 50 ml 5% KHSO₄ und ges. NaHCO₃ extrahiert. Die organische Phase wurde 2x mit 20 ml Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum konzentriert. Die Säulenchromatographie (SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 8:1) ergab 11.3 g, 52%. Smp.: 114-115°C.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.51-7.12 (m, arom. CH, 20H); 5.12-4.98 (m, 2H, OCH₂Ph); 2.22 (dd, 1H, J=1.8 Hz, 2.6 Hz, 3-Azy CH₂); 1.87 (dd, 1H, J=2.6 Hz, 6.2 Hz, 2-Azy CH); 1.35 (dd, 1H, J=1.5 Hz, 6.1 Hz, 3-Azy CH₂) ppm.

Für die Umsetzung zu den Peptiden **116** und **216** wurde unmittelbar vor dem Gebrauch die Tritylschutzgruppe zu **6** abgespalten. Hierzu wurden zu einer Lösung von Trt-Azy-OBn in Chloroform 10 Eq. pTSS in MeOH zugegeben und 2 Stunden gerührt (DC Kontrolle). Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rest in EtOAc gelöst und mit ges. NaHCO₃ extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, konzentriert und anschließend weiter nach Methode D zu **116** bzw. **216** umgesetzt.

Azetidin-2-carbonsäure

27.5 g (320 mmol) α-Butyrolacton und 0.2 g roter Phosphor wurden auf dem Ölbad auf 115°C erhitzt. 51.1 g Brom wurden tropfenweise so zugegeben, dass die Reaktionstemperatur zwischen 115-120°C blieb. Nach Zugabe des Broms wurde 1 Stunde bei 115°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf 0°C gekühlt, 38 ml kalten Benzylalkohols zugegeben und mit trockenem HCl-Gas gesättigt (15 min). Der Kolben wurde dicht verschlossen und 3 Tage bei RT gerührt. Die Mischung wurde dann mit 300 ml Diethylether verdünnt, 3x mit 100 ml 5% Na₂CO₃ und 2x mit 50 ml Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das leicht orange gefärbte Öl wurde im Vakuum über eine 10 cm Vigreux-Kolonne destilliert und ergab 73.1 g Benzyl-α,γ-dibromobutyrat als farbloses Öl, Sp.: 105-108°C (0,05 mbar).

50.4 g (150 mmol) Benzyl- α,γ -dibromobutyrat wurden zusammen mit 83 g (450 mmol) Benzhydrlamin in 400 ml abs. Acetonitril 20 Stunden refluxiert. Nach Entfernen des Acetonitrils im Vakuum wurde der Rest mit 200 ml Ether gemischt und das ausgefallene Benzhydrlaminhydrobromid wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert und säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Cyclohexan:EtOAc 6:1). Es verblieben 40.7 g Benzyl-1-benzhydrlazetid-2-carboxylat als farbloses Öl, das zunächst farblose Kristalle bildete (Smp.: 60-62°C).

25.0 g (70 mmol) Benzyl-1-benzhydrlazetid-2-carboxylat in 100 ml MeOH wurden mit 1 g Pd-C versetzt und mit H_2 bei 3 bar 10 Stunden hydriert. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite[®] filtriert, mit Wasser gut nachgewaschen und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rest wurde auf 100 ml mit Wasser verdünnt und 3x mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum auf ca 20 ml wieder konzentriert und die Azetidin-2-carbonsäure mittels Isopropylalkohol als weißes Pulver gefällt. Smp.: >200, Zersetz., Ausbeute: 5 g, 71%.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400.13 MHz): δ = 4.65 (ddd, 1H, $J=0.4$ Hz, 8.0 Hz, 9.9 Hz, 2-Azet CH); 3.94 (ddd, 1H, $J=8.3$ Hz, 9.4 Hz, 10.6 Hz, 4-Azet CH_2); 3.77 (ddt, 1H, $J=0.8$ Hz, 6.0 Hz, 10.6 Hz, 4-Azet CH_2); 2.74-2.52 (m, 1H, 3-Azet CH_2); 2.39 (td, 1H, $J=8.1$ Hz, 9.8 Hz, 12.2 Hz, 3-Azet CH_2) ppm.

1 g wurde durch das Standardverfahren mit Z-Cl zu **Z-1** umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 10.96-10.21 (bs, 1H, COOH); 7.46-7.16 (m, 5H, arom. CH); 5.31-4.91 (m, 2H, OCH_2Ph); 4.84-4.69 (bm, 1H, 2-Azet CH); 4.08-3.92 (bm, 2H, 4-Azet CH); 2.64-2.21 (bm, 2H, 3-Azet CH) ppm.

4 g (40 mmol) Azetidin-2-carbonsäure wurden in 75 ml Benzol suspendiert. Es wurden 5 ml Benzylalkohol und 8.5 g (45 mmol) pTSS zugegeben und am Wasserabscheider unter Stickstoff 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der pastenförmige Rückstand 3x mit 50 ml Cyclohexan extrahiert, um restlichen Benzylalkohol zu entfernen. Umkristallisation des Rückstandes aus Diethylether bei 0°C ergab 13.3 g, (88%) Benzylazetid-2-carboxylat-tosylat **1-Bn** als gelblichen Feststoff, Smp.: 55-57°C. **1-Bn** wurde nach Methode D weiter zum Dipeptid **131** umgesetzt.

Piperidin-3-carbonsäure 34 (Nipecotinsäure), BOC-34

50 g (0.40 mol) Nicotinsäure wurden in 203 ml (1Eq.) 2M HCl gelöst, mit 300 mg PtO₂ versetzt und mit H₂ unter 5 bar 3 Tage hydriert und anschließend über Celite[®] filtriert. Ausbeute 85%, 15% Verunreinigung mit Nicotinsäure.

¹H-NMR (D₂O, 400.13 MHz): δ = 3.48 (dd, 1H, *J*=3.8 Hz, 12.9 Hz, 2-Nip CH₂); 3.35-3.27 (m, 1H, 6-NipCH₂); 3.27 (dd, 1H, *J*=8.9 Hz, 2.8 Hz, 2-Nip CH₂); 3.06-2.98 (m, 1H, 6-Nip CH₂); 2.93 (sep, *J*=4.4 Hz, 3-Nip CH); 2.17-2.07 (4-Nip CH₂); 1.99-1.89 (5-Nip CH₂); 1.86-1.75 (4-Nip+5-Nip CH₂) ppm.

Das Reaktionsgemisch wurde mit NaOH alkalisch gestellt, 50 ml Dioxan und 79 g (0.36 mol) (BOC)₂O wurden zugegeben. Nach 6 Stunden Rühren wurde das Dioxan im Vakuum entfernt, das Gemisch mit 100 ml Diethylether extrahiert, die wässrige Lösung mit 150 ml EtOAc überschichtet und unter Rühren mit 2M HCl sauer gestellt. Die organische Phase wurde anschließend im Vakuum aufkonzentriert und die BOC-Nipecotinsäure **BOC-34** mit Petrolether 40-60 gefällt und abfiltriert. Weißes Pulver, 60.8 g, 78%. Smp.: 155-157°C.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 11.41-10.66 (bs, 1H, COOH); 4.25-3.97 (bs, 1H, 2-Nip CH₂); 3.87 (td, *J*=3.9 Hz, 13.3Hz, 1H, 6-Nip CH₂); 3.03 (bs, 1H, 2-Nip CH₂); 2.84 (tt, *J*=4.0 Hz, 10.1 Hz, 1H, 6-Nip CH₂); 2.47 (bt, *J*=4.0Hz, 1H, 3-Nip CH); 2.13-1.97 (m, 1H, 4-Nip CH₂); 1.79-1.55 (m, 2H, 4'-Nip+5-Nip CH₂); 1.52-1.37 (m, 11H, BOC+5'-Nip) ppm.

Benzylpiperidin-3-carboxylat, Benzylnipecotat (34-Bn)

11.5 g (50 mmol) BOC-Nipecotinsäure wurde im 50 ml Dichlormethan gelöst, 5.5 ml Benzylalkohol, gefolgt von 10.5 g (51 mmol) DCC wurden bei 0°C zugegeben. Nach 2 Stunden bei RT wurde der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 4:1) gereinigt. 14.7 g, 92% BOC-Nip-OBn wurden anschließend in 50 ml Dichlormethan /TFA-Gemisch 5/1 bei 0°C gelöst und nach 30 min (DC-Kontrolle) mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und mit 5% Na₂CO₃ extrahiert. Farbloses Öl (9.4 g, 93%)

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.34-7.15 (m, 5H, arom. CH); 5.22-5.11 (m, 2H, OCH₂Ph); 3.16 (dd, *J*=3.8, 12.4 Hz, 1H, 2-CH₂); 2.90 (dt, *J*=4.1, 12.4 Hz, 1H, 6-CH₂); 2.82 (dd, *J*=9.3, 12.4 Hz, 1H, 2-CH₂); 2.67-2.56 (1H, 6-CH₂); 2.51-2.47 (m, 1H, 3-CH); 2.17-2.05 (bs, 1H NH); 2.05-1.94 (m, 1H, 4-CH₂); 1.76-1.59 (m, 2H, 4-CH₂+5-CH₂); 1.51-1.36 (m, 1H, 5-CH₂) ppm.

NipOBn **34-Bn** wurde weiter nach Methode D zu **134** und **234**, nach Methode E zu **334** umgesetzt.

10.1.7 Synthetisierte Dipeptide mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(benzyloxycarbonyl)-(R+S)-azetid-2-yl]aziridin-2,3-dicarboxylat, Z-(R+S)-Azet-(R,R)-Azi(OEt)₂ (031B)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 230 mg, 57%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.21.

$[\alpha]_D^{25} = -10.7$ (c 1.36, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} =$: 2982, 1739, 170.4, 1446, 1402, 1328, 1300, 1194, 1126, 1030, 1002, 737, 699 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta =$ 7.44-7.28 (m., 8.6H, arom. CH); 5.21-5.03 (m, 3.4H, CH₂Ph); 4.87 (dd, *J*=5.9 Hz, 10.0 Hz, 1H, Azet- α CH); *4.78 (dd, *J*=6.0 Hz, 9.5 Hz, 0.7H, Azet- α CH); *4.23 (q, *J*=7.1 Hz, 2.8H, OCH₂CH₃); 4.22 (q, *J*=7.1 Hz, 4H, OCH₂CH₃); *4.08-4.01 (m, 0.7H, Azet- γ CH₂); *4.00-3.89 (m, 0.7H, Azet- γ' CH₂); 4.00-3.89 (m, 1H, Azet- γ CH₂); 3.84-3.75 (m, 1H, Azet- γ' CH₂); *3.52 (s, Azi-Ring CH, 1.4H); 3.42 (br. s, Azi-Ring CH, 2H); 2.66-2.52 (m, Azet- β CH₂, 1.7H); 2.52-2.39 (m, Azet- β' CH₂, 1.7H); 1.28 (t, *J*=7.1 Hz, OCH₂CH₃, 6H); *1.28 (t, *J*=7.1 Hz, OCH₂CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta =$ 178.05 (N-C=O); 166.15 (EtO-C=O); 156.64 (Z-O-C=O); 136.086 (q. arom. C); 128.362, 128.026, 127.855 (arom. CH); 67.05 (OCH₂Ph); 62.90 (Azet- α CH); 62.29 (OCH₂CH₃); 47.62 (Azet- γ CH₂); 39.78, 39.22 (Azi-ring CH); 21.09 (Azet- β CH₂); 13.94 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₄N₂O₇, [M+H⁺]: 405.1662; gef.: 405.1656.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt)₂ (012A)

Methode A; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 880 mg, 46%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.29.

$[\alpha]_D^{25} = -50.0$ (c 1.24, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = : 3464, 2979, 1740, 1696, 1391, 1368, 1325, 1258, 1192, 1163, 1124, 1090, 1030, 919, 856, 773, 732 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz), 2 Rotamere 1:1: δ = 4.52-4.38 (br. m, α -Pro CH, 0.5H); 4.38-4.29 (br. m, α -Pro CH, 0.5H); 4.29-4.02 (br. m, OCH_2CH_3 , 4H); 3.53-3.28 (br. m, δ -Pro CH_2 +CH Azi, 4H); 2.27-1.72 (br. m, β + γ Pro CH_2 , 4H); 1.43-1.32 (br. d, BOC, 9H); 1.29-1.15 (br. m, OCH_2CH_3 , 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 180.04, 179.09 (N-C=O Pro); 166.05, 165.63 (EtO-C=O); 154.51, 153.81 (C=O BOC); 80.35, 79.65 (BOC q. C); 62.24, 61.96 (OCH_2CH_3); 61.08, 60.87 (α -Pro CH); 46.55, 46.45 (δ -Pro CH_2); 39.80, 39.05 (2x Azi CH); 30.48, 29.57 (β -Pro CH_2); 28.20, 28.02 (BOC); 24.08, 23.47 (Pro- γ CH_2); 13.85 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 385.1975, gef.: 385.1969.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt)₂ (012B)

Methode A; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 325 mg, 17 %.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.33.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +37.9 (c 1.18, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = : 2980, 1740, 1695, 1449, 1391, 1368, 1325, 1260, 1192, 1164, 1118, 1088, 1032, 918, 856, 773, 732 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz), 2 Rotamere 1:1: δ = 4.55-4.46 (br. m, α -Pro CH, 0.5H); 4.44-4.37 (br. m, α -Pro CH, 0.5H); 4.33-4.18 (br. m, OCH_2CH_3 , 4H); 3.62-3.34 (br. m, δ -Pro+CH Azi, 4H); 2.33-1.82 (br. m, β + γ Pro CH_2 , 4H); 1.50-1.38 (br. d, BOC, 9H); 1.37-1.24 (br. m, OCH_2CH_3 , 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 180.12, 179.14 (N-C=O Pro); 166.10, 165.68 (EtO-C=O); 154.51, 153.78 (C=O BOC); 80.28, 79.62 (BOC q. C); 62.26, 61.97 (OCH_2CH_3); 61.11, 60.92 (α -Pro CH); 46.57, 46.47 (δ -Pro CH_2); 39.84, 39.07 (2x Azi CH); 30.51, 29.60 (β -Pro CH_2); 28.23, 28.05 (BOC); 24.11, 23.51 (Pro- γ CH_2); 13.88 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 385.1975; gef.: 385.1975.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(benzyloxycarbonyl)-(S)-pipecolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, Z-(S)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (Z-013B)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 101 mg, 23%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.44.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -47.9$ (c1.23, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} =$: 2940, 1738, 1696, 1422, 1366, 1325, 1256, 1194, 1169, 1123, 1073, 1030, 736, 698 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), 2 Rotamere 7:3: $\delta =$ 7.43-7.27 (m, 5H, arom. CH); 5.27-5.03 (m, 2H, OCH₂Ph); 4.91 (bs, 0.7H, α Pip CH); 4.85 (bs, 0.3H, α Pip CH); 4.22 (q, $J=7.0$ Hz, 4H, OCH₂CH₃); 4.13 (bd, $J=11.4$ Hz, 1H, ϵ -Pip CH₂); 3.38 (bs, 0.6H, Azi CH); 3.31 (bs, 1.4H, Azi CH); 3.1 (dt, $J=2.0$ Hz, 13.3 Hz, 1H, ϵ' -Pip CH₂); 2.33 (bd, $J=10.9$ Hz, 1H, β -Pip CH₂); 1.81-1.37 (m, 5H, $\beta'+\gamma+\delta$ -Pip CH₂); 1.29 (t, 1H, $J=7.2$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta =$ 179.05, 178.26 (N-C=O); 166.27, 166.02 (O-C=O); 155.74 (C=O Z); 136.60, 136.32 (q. arom. C); 128.43, 127.94, 127.66, (arom. CH); 67.33 (OCH₂Ph); 62.22 (OCH₂CH₃); 56.30, 56.51 (α -Pip CH); 42.32, 42.10 (ϵ -Pip CH₂); 39.92, 39.77 (CH Azi); 26.02, 26.69 (β -Pip CH₂); 24.88, 24.65 (δ -Pip CH₂); 20.43, 20.30 (γ -Pip CH₂); 13.90 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₈N₂O₇, [M+Na⁺]: 455.1794; gef.: 455.1789.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(benzyloxycarbonyl)-(R)-pipecolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, Z-(R)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (Z-023B)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 121 mg, 28%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.40.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +42.1$ (c 1.07, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} =$: 2942, 1740, 1699, 1424, 1368, 1325, 1256, 1195, 1158, 1125, 1073, 1030, 732, 698 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), 2 Rotamere 5:3: $\delta =$ 7.40-7.27 (m, 5H, arom. CH); 5.26-5.05 (m, 2H, OCH₂Ph); 4.99 (bs, 0.6H, α Pip CH); 4.86 (bs, 0.4H, α Pip CH); 4.19 (q, $J=7.0$ Hz, 4H, OCH₂CH₃); 4.07 (bdd, $J=1.2$ Hz, 13.4 Hz, 1H, ϵ -Pip CH₂); 3.47 (bs, 1.3H, Azi CH); 3.39 (bs, 0.7H, Azi CH); 3.06 (dt, $J=2.3$ Hz, 13.6 Hz, 0.6H, ϵ' -Pip CH₂); 2.93 (dt,

$J=2.3$ Hz, 13.6 Hz, 0.4H, ϵ' -Pip CH_2); 2.34 (bt, $J=10.3$ Hz, 1H, β -Pip CH_2); 1.77-1.33 (m, 5H, $\beta'+\gamma+\delta$ -Pip CH_2); 1.25 (t, $J=7.0$ Hz, 6H, OCH_2CH_3) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): δ = 178.05, 177.47 (N-C=O); 165.70 (O-C=O); 155.56, 154.53 (C=O BOC); 136.32, 136.22 (q. arom. C); 128.43, 127.97, 128.38, 127.87, 128.33, 127.83, (arom. CH); 67.56, 67.25 (OCH_2Ph); 62.37, 62.21 (OCH_2CH_3); 57.08, 56.37 (α -Pip CH); 42.14, 41.83 (ϵ -Pip CH_2); 39.57 (CH Azi); 26.59, 26.14 (β -Pip CH_2); 24.57, 24.93 (δ -Pip CH_2); 20.55-20.38 (γ -Pip CH_2); 20.23, 13.94 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{22}H_{28}N_2O_7$, $[M+Na^+]$: 455.1794; gef.: 455.1787.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-pipercolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Pip-(S,S)-Azi(OEt)₂ (013A)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 891 mg; 56%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.44.

$[\alpha]_D^{25}$ = -39.0 (c 1.38, $CHCl_3$).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 2976, 1742, 1697, 1659, 1452, 1408, 1366, 1325, 1263, 1193, 1157, 1076, 1032, 869, 736 cm^{-1} .

1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz), 2 Rotamere 1:1: δ = 4.95 (bs, 0.5H, α Pip CH); 4.78 (bs, 0.5H, α Pip CH); 4.24 (q, $J=7.1$ Hz, 4H, OCH_2CH_3); 4.07 (bd, $J=12.6$ Hz, 0.5H, ϵ -Pip CH_2); 3.97 (bd, $J=12.6$ Hz, 0.5H, ϵ -Pip CH_2); 3.42 (bs, 2H, Azi CH); 3.00 (bt, $J=12.9$ Hz, 0.5H, ϵ' -Pip CH_2); 2.84 (bt, $J=12.9$ Hz, 0.5H, ϵ' -Pip CH_2); 2.37-2.26 (m, 1H, β -Pip CH_2); 1.76-1.37 (m, 14H, BOC+ $\beta'+\gamma+\delta$ -Pip CH_2); 1.36-1.22 (m, 6H, OCH_2CH_3) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): δ = 179.42, 178.66 (N-C=O); 165.8, 165.68 (O-C=O); 155.12, 154.72 (C=O BOC); 80.54, 80.14 (q. C BOC); 62.38, 62.23 (OCH_2CH_3); 57.71, 55.85 (α -Pip CH); 42.51, 41.11 (ϵ -Pip CH_2); 39.61 (CH Azi); 28.37 (BOC); 26.82, 26.29 (β -Pip CH_2); 25.07, 24.64 (δ -Pip CH_2); 20.82 (γ -Pip CH_2); 14.02 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{19}H_{30}N_2O_7$, $[M+Na^+]$: 421.1951; gef.: 421.1939.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-pipercolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Pip-(S,S)-Azi(OEt)₂ (023A)

Methode A; Ansatz: 4 mmol; Ausbeute: 120 mg, 8%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.52.

$[\alpha]_D^{25} = +66.5$ (c 1.15, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2940, 1740, 1686, 1412, 1367, 1323, 1268, 1193, 1154, 1126, 1074, 1032, 866, 735 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), 2 Rotamere 5:1: $\delta = 4.85$ (bs, 0.84H, α Pip CH); 4.75 (bs, 0.16H, α Pip CH); 4.32-4.14 (m, 4H, OCH₂CH₃); 3.99 (bd, 1H, $J=13.5$ Hz, 1H, ϵ -Pip CH₂); 3.40 (bs, 0.3H, Azi CH); 3.34 (bs, 1.7H, Azi CH); 2.97 (bdt, $J=2.3$ Hz, 13.3 Hz, 1H, ϵ' -Pip CH₂); 2.32 (bd, $J=8.0$ Hz, 1H, β -Pip CH₂); 1.72-1.34 (m, 14H, BOC+ β' + γ + δ -Pip CH₂); 1.29 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, OCH₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.11$ (N-C=O); 166.52 (O-C=O); 155.11 (C=O BOC); 79.93 (q. C BOC); 62.22 (OCH₂CH₃); 55.68, 56.49 (α -Pip CH); 42.60 (ϵ -Pip CH₂); 40.02, 39.86 (CH Azi); 28.29 (BOC); 25.87 (β -Pip CH₂); 25.01 (δ -Pip CH₂); 20.66 (γ -Pip CH₂); 13.94 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₃₀N₂O₇, [M+Na⁺]: 421.1951; gef.: 421.1947.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-pipercolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (013B)

Methode A; Ansatz: 4 mmol; Ausbeute: 218 mg; 14%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.51.

$[\alpha]_D^{25} = -68.6$ (c 1.25, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2940, 1740, 1687, 1412, 1367, 1323, 1269, 1194, 1157, 1126, 1088, 1032, 866, 736 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), 2 Rotamere 5:1: $\delta = 4.85$ (bs, 0.84H, α Pip CH); 4.75 (bs, 0.16H, α Pip CH); 4.32-4.14 (m, 4H, OCH₂CH₃); 3.99 (bd, $J=13.5$ Hz, 1H, ϵ -Pip CH₂); 3.40 (bs, 0.3H, Azi CH); 3.34 (bs, 1.7H, Azi CH); 2.97 (dt, $J=2.3$ Hz, 13.3 Hz, 1H, ϵ' -Pip CH₂); 2.32 (bd, $J=8.0$ Hz, 1H, β -Pip CH₂); 1.72-1.34 (m, 14H, BOC+ β' + γ + δ -Pip CH₂); 1.29 (t, $J=7.1$ Hz, 1H, OCH₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.11$ (N-C=O); 166.52 (O-C=O); 155.11 (C=O BOC); 79.93 (q. C BOC); 62.22 (OCH₂CH₃); 55.68, 56.49 (α -Pip CH); 42.60 (ϵ -Pip CH₂); 40.02, 39.86 (CH Azi); 28.29 (BOC); 25.87 (β -Pip CH₂); 25.01 (δ -Pip CH₂); 20.66 (γ -Pip CH₂); 13.94 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₃₀N₂O₇, [M+Na⁺]: 421.1951; gef.: 421.1939.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-pipecolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Pip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (023B)

Methode A; Ansatz: 4 mmol; Ausbeute: 798 mg, 50%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.45.

$[\alpha]_D^{25} = +37.7$ (c 1.54, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2974, 1743, 1697, 1659, 1519, 1452, 1406, 1366, 1325, 1261, 1188, 1158, 1077, 1032, 869, 736 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), 2 Rotamere 1:1: $\delta = 4.95$ (bs, 0.5H, α Pip CH); 4.78 (bs, 0.5H, α Pip CH); 4.24 (q, $J=7.1$ Hz, 4H, OCH₂CH₃); 4.07 (bd, $J=12.6$ Hz, 0.5H, ϵ -Pip CH₂); 3.97 (bd, $J=12.6$ Hz, 0.5H, ϵ -Pip CH₂); 3.42 (bs, 2H, Azi CH); 3.00 (bt, $J=12.9$ Hz, 0.5H, ϵ' -Pip CH₂); 2.84 (bt, $J=12.9$ Hz, 0.5H, ϵ' -Pip CH₂); 2.37-2.26 (m, 1H, β -Pip CH₂); 1.76-1.37 (m, 14H, BOC+ β' + γ + δ -Pip CH₂); 1.36-1.22 (m, 6H, OCH₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.41, 178.65$ (N-C=O); 165.79, 165.67 (O-C=O); 155.11, 154.71 (C=O BOC); 80.53, 80.13 (q. C BOC); 62.37, 62.22 (OCH₂CH₃); 57.7, 55.84 (α -Pip CH); 42.50, 41.1 (ϵ -Pip CH₂); 39.6 (CH Azi); 28.36 (BOC); 26.81, 26.28 (β -Pip CH₂); 25.06, 24.63 (δ -Pip CH₂); 20.81 (γ -Pip CH₂); 14.01 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₃₀N₂O₇, [M+Na⁺]: 421.1951; gef.: 421.1944.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt)₂ (034A)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 147mg, 37%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.33.

$[\alpha]_D^{25} = 22.1$ (c 1.08, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2978, 1737, 1691, 1424, 1367, 1327, 1265, 1192, 1147, 1031, 1000, 8557, 768 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 4.37-4.14$ (m, OCH₂CH₃+2-Nip CH₂, 5 H); 4.10-3.92 (br. m, 6-Nip CH₂, 1H); 3.51-3.41 (m, 2xCH Azi, 2H); 3.04-2.81 (br.m, 2'-Nip CH₂, 1H); 2.80-2.64 (br. m, 6'-Nip CH₂, 1H); 2.46-2.26 (br. m, 3-Nip CH, 1H); 2.22-1.96 (br. m, 4-Nip CH₂, 1H); 1.79-1.57 (br. m, 5+4'-Nip CH₂, 2H); 1.52-1.38 (br. m, BOC+5'-Nip CH₂, 10H); 1.37-1.22 (m, OCH₂CH₃, 6H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 181.06, 180.22 (N-C=O); 166.37, 166.31 (EtO-C=O); 154.82, 154.61 (C=O BOC); 79.86, 79.65 (q. C BOC); 62.51, 62.43 (OCH_2CH_3); 45.68, 45.25 (2- CH_2 Nip); 44.15, 44.06 (3-CH Nip); 42.90, 42.77 (6- CH_2 Nip); 39.91, 39.88 (2xCH Azi); 28.65, 28.37 (3x CH_3 BOC); 26.62, 26.15 (4- CH_2 Nip); 24.46, 24.20 (5- CH_2 Nip); 13.99 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 399.2131; gef.: 399.2125.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R+S)-Nip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (034B)

Methode A; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1036 mg; 52%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.34.

$[\alpha]_D^{25}$ = -22.9 (c 1.29, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 2978, 1737, 1690, 1422, 1367, 1325, 1256, 1193, 1146, 1030, 1001, 857, 768 cm^{-1} .

^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 4.37-4.13 (m, 5 H, OCH_2CH_3 +2-Nip CH_2); 4.09-3.93 (br. m, 1H, 6-Nip CH_2); 3.52-3.40 (m, 2xCH Azi, 2H); 3.03-2.83 (br. m, 1H, 2'-Nip CH_2); 2.81-2.64 (br. m, 1H, 6-Nip CH_2); 2.43-2.28 (br. m, 1H, 3-Nip CH); 2.23-1.96 (br. m, 1H, 4-Nip CH_2); 1.78-1.56 (br. m, 2H, 5+4'-Nip CH_2); 1.53-1.38 (br. m, 10H, BOC+5'-Nip); 1.36-1.26 (m, OCH_2CH_3 , 6H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 181.0 (N-C=O); 166.4 (EtO-C=O); 154.6 (C=O BOC); 79.7 (q. C BOC); 62.5 (OCH_2CH_3); 45.1 (2-Nip CH_2); 44.7 (6-Nip CH_2); 44.2 (3-Nip CH); 39.9 (2xCH Azi); 28.4 (BOC); 26.6 (4-Nip CH_2); 24.5 (5-Nip CH_2); 14.0 (OCH_2CH_3) ppm.

181.04, 180.22 (N-C=O); 166.36, 166.30 (EtO-C=O); 154.81, 154.60 (C=O BOC); 79.86, 79.65 (q. C BOC); 62.50, 62.43 (OCH_2CH_3); 45.67, 45.21 (2- CH_2 Nip); 44.15, 44.06 (3-CH Nip); 42.90, 42.77 (6- CH_2 Nip); 39.91, 39.88 (2x CH Azi); 28.64, 28.36 (3x CH_3 BOC); 26.62, 26.14 (4- CH_2 Nip); 24.46, 24.19 (5- CH_2 Nip); 13.99 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 399.2131; gef.: 399.2127.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-isonipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Ini-(S,S)-Azi(OEt)₂ (005A)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 155 mg, 39%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.27.

$[\alpha]_D^{25} = +19.6$ (c 1.15, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2979, 1737, 1692, 1641, 1422, 1367, 1325, 1273, 1236, 1192, 1139, 1073, 1021, 938, 860, 768 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 4.49\text{-}4.32$ (br. m, 2-Ini CH₂, 1H); 4.31-4.17 (m, OCH₂CH₃, 4H); 4.06-3.81 (br. m, 6-Ini CH₂, 1H); 3.47 (s, 2xCH Azi, 2H); 3.37-3.05 (br. m, 6'-Ini CH₂, 1H); 2.95-2.71 (br. m, 2'-Ini CH₂, 1H); 2.56-2.42 (br. m, 4-Ini CH, 1H); 2.08-1.98 (br. m, 3-Ini CH₂, 1H); 1.98-1.86 (br. m, 5-Ini CH₂, 1H); 1.83-1.70 (m, 3'-Ini+5'-Ini CH₂, 2H); 1.82-1.37 (m, 3xCH₃ BOC, 9H); 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, OCH₂CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 181.50$ (N-C=O Ini); 166.43 (2xEtO-C=O); 155.69 (C=O BOC); 79.67 (q. C BOC); 62.63 (OCH₂CH₃); 44.35 (2-Ini CH₂); 43.84 (4-Ini CH); 41.28 (6-Ini CH₂); 39.99 (2xCH Azi); 28.76 (3-Ini CH₂); 28.40 (CH₃ BOC); 27.65 (5-Ini CH₂); 14.09 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₃₀N₂O₇, [M+H⁺]: 399.2131; gef.: 399.2127.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-isonipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Ini-(R,R)-Azi(OEt)₂ (005B)

Methode A; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 574mg; 29%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.28.

$[\alpha]_D^{25} = -19.3$ (c 1.20, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2979, 1737, 1690, 1423, 1367, 1325, 1274, 1234, 1192, 1167, 1137, 1073, 1021, 942, 862, 768 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 4.48\text{-}4.31$ (br. m, 2-Ini CH₂, 1H); 4.30-4.16 (m, OCH₂CH₃, 4H); 4.05-3.83 (br. m, 6-Ini CH₂, 1H); 3.46 (s, 2xCH Azi, 2H); 3.27-3.07 (br. m, 6'-Ini CH₂, 1H); 2.95-2.71 (br. m, 2'-Ini CH₂, 1H); 2.55-2.41 (br. m, 4-Ini CH, 1H); 2.07-1.97 (br. m, 3-Ini CH₂, 1H); 1.97-1.83 (br. m, 5-Ini CH₂, 1H); 1.82-1.69 (m, 3'-Ini+5'-Ini CH₂, 2H); 1.48-1.37 (m, CH₃ BOC, 9H); 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, OCH₂CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 181.60$ (N-C=O Ini); 166.47 (2xEtO-C=O); 155.68 (C=O BOC); 79.65 (q. C BOC); 62.61 (OCH₂CH₃); 44.32 (2-Ini CH₂); 43.81 (4-Ini CH); 41.26 (6-Ini CH₂); 39.97 (2xCH Azi); 28.73 (3-Ini CH₂); 28.37 (CH₃ BOC); 27.61 (5-Ini CH₂); 14.06 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{19}H_{30}N_2O_7$, $[M+H^+]$: 399.2131; gef.: 399.2125.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(benzyloxycarbonyl)-(S)-leucyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, Z-(S)-Leu-(R,R)-Azi(OEt)₂ (600B)

Methode A; Ansatz: 1 mmol; Ausbeute: 206 mg, 47%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.37.

$[\alpha]_D^{25} = -26.5$ (c 1.35, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3354, 2959, 1710; 1735, 1711, 1524, 1451, 1371, 1325, 1256, 1197, 1117, 1029, 736, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.37\text{-}7.25$ (m, arom. CH, 5H); 5.44 (d, $J=9.6$ Hz, NH, 1H); 5.13-5.04 (m, CH₂Ph, 2H); 4.45 (dd, $J=4.4$ Hz, 9.6 Hz, α -Leu CH, 1H); 4.2 (q, $J=7.1$ Hz, OCH₂CH₃, 4H); 3.51 (s, 2xAzi CH, 2H); 1.85-1.64 (m, β -Leu CH₂+ γ -Leu CH, 2H); 1.57 (dd, $J=4.1$ Hz, 10.0 Hz, β -Leu CH₂, 1H); 1.57 (ddd, $J=4.1$ Hz, 10.0 Hz, 13.0 Hz, β' -Leu CH₂, 1H); 1.26 (t, $J=7.2$ Hz, OCH₂CH₃, 6H); 0.93 (d, $J=5.6$ Hz, δ -Leu CH₃, 3H); 0.92 (d, $J=5.8$ Hz, δ' -Leu CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.9$ (N-C=O); 165.7 (EtO-C=O); 155.6 (BnO-C=O); 136.1 (q. arom. C); 128.2, 127.9, 127.7 (arom. CH); 66.7 (CH₂Ph); 62.2 OCH₂CH₃; 54.1 (α -Leu CH); 41.8 (β -Leu CH₂); 39.9 (2xAzi CH); 24.3 (γ -CH Leu); 22.8 (δ -Leu CH₃); 21.4 (δ' -Leu CH₃); 13.7 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{22}H_{30}N_2O_7$, $[M+Na^+]$: 457.1951; gef.: 457.195.

10.1.8 Weitere Substanzen mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein

(2R,3R)-Diethyl-1-formylaziridin-2,3-dicarboxylat, Frm-(R,R)-Azi(OEt)₂ (008B)

94 mg (0.5 mmol) Diethyl-(R,R)-aziridin-2,3-dicarboxylat (**B**) in 10 ml Dichlormethan wurden mit 72 mg (0.55 mmol) Formylpivaloylanhydrid versetzt und 12 Stunden unter Stickstoff bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit 40 ml Dichlormethan verdünnt und 2x mit ges. NaHCO₃ Lsg. und 1x mit 25 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung mit Na₂SO₄ wurde das Lösemittel abgezogen und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.28).

Farblose Kristalle, hygroskopisch, Smp. 28-29°C. Ausbeute: 78 mg; 72%.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -79.1$ (c 1.56, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 2986, 1732, 1706, 1447, 1371, 1327, 1294, 1193, 1092, 1028, 842 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 8.653$ (s, HC=O, 1H); 4.25 (m, 2xOCH₂CH₃, 4H); 3.45 (s, 2xCH, 2H); 1.33 (t, $J=7.15 \text{ Hz}$, 2xOCH₂CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 168.5$ (HC=O); 166.1 (C=O); 62.7 (2xOCH₂); 39.0 (2xCH); 14.0 (2xOCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₉H₁₃NO₅, [M+Na⁺]: 238.0691; gef.: 238.0695.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-formylaziridin-2,3-dicarboxylat, Frm-(S,S)-Azi(OBn)₂ (008C)

Zur Synthese siehe **008B**. Ansatz: 0.25 mmol; Ausbeute 48 mg; 57%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.31.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +42.9$ (c 1.1, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3275, 2957, 1727, 1498, 1452, 1383, 1337, 1257, 1174, 1082, 1001, 866, 743, 696 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 8.65$ (s, HC=O, 1H); 7.46-7.30 (m, arom. CH, 10H); 5.22 (s, 2x OCH₂-Ph, 4H); 3.52 (s, 2x CH, 2H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 168.3$ (HC=O); 165.9 (C=O); 134.3 (q. arom. C); 128.9, 128.7, 128.6 (arom. CH); 68.3 (2x OCH₂-Ph); 39.0 (2x CH) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₇NO₅, [M+Na⁺]: 362.1004; gef.: 362.1009.

3-Ethylloxycarbonyl-2-[(N-tert-butoxycarbonyl)piperazin-N-carbonyl]aziridin, EtO-(S,S)-Azi-Prz-BOC (A7)

468 mg (2.5 mmol) Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (**A**) wurden mit 70 mg (0.5 Eq.) KOH in Ethanol partiell verseift. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und mit 466 mg (2.5 mmol) BOC-Piperazin weiter nach Methode B umgesetzt.

Gelbliche Kristalle, Smp. 38-39°C, Ausbeute: 537 mg; 66%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.07).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +61.1$ (c 1.44, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3459, 1733, 1671, 1639, 1590, 1484, 1187, 1137, 924, 725, 689 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 4.29-4.09 (m, OCH_2 , 2H); 3.70-3.34 (br. m, $4\times\text{CH}_2$, 8H); 2.99 (br. s, 3-*CH* Azi, 1H); 2.70 (br. s, 2-*CH* Azi, 1H); 2.16 (br. s, *NH*); 1.44 (s, BOC, 9H); 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 169.3 (N-C=O); 166.9 (C=O(OEt)); 154.3 (C=O BOC); 80.4 (q. C); 61.7 (OCH_2CH_3); 44.8 (CH_2); 43.5 (CH_2); 43.2 (CH_2); 42.5 (CH_2); 35.6 (2-*CH* Azi); 33.7 (3-*CH* Azi); 28.3 (CH_3 BOC); 14.0 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 328.1872; gef.: 328.1866.

**Bis-*N,N*-(3-ethoxycarbonylaziridin-2-carbonyl)piperazin,
EtO-(*S,S*)-Azi-Prz-(*S,S*)-AziOEt (A7A)**

94 mg (0.5 mmol) Diethylaziridin-2,3-dicarboxylat (**A**) wurden mit 14 mg (0.5 Eq.) KOH in Ethanol partiell verseift. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und weiter mit 21 mg (0.5 Eq.) Piperazin nach Methode B umgesetzt.

Gelbliches Öl; Ausbeute: 36 mg, 39%.

DC: SiO_2 60, EtOAc, R_f = 0.43.

$[\alpha]_D^{25}$ = -38.6 (c 1.05, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3461, 1734, 1640, 1591, 1485, 1446, 1256, 1188, 1138, 1022, 976, 925, 774, 726, 690 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 4.29-4.16 (m, OCH_2CH_3 , 4H); 3.61-3.22 (br. m, Prz CH_2 , 8H); 2.97 (dd, $J=2.0$ Hz, 8.3 Hz, Azi *CH*, 1H); 2.69 (dd, $J=2.0$ Hz, 9.2 Hz, Azi *CH*, 1H); 2.17 (t, $J=8.6$ Hz, Azi *NH*, 1H); 1.3 (t, $J=7.2$ Hz, OCH_2CH_3 , 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 169.24, 166.91 (N-C=O); 61.69 (C=O(OEt)); 45.25 (OCH_2CH_3); 44.8, 44.3, 42.8 (CH_2 Prz); 35.8, 33.7 (Azi *CH*); 14.1 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 369.1774; gef.: 369.1767.

**(2*S*,3*S*)-Dibenzyl-1-[(*R*)-biotin-6-aminohexanoyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat,
Bio-HXA-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (999C)**

508 mg (2.2 mmol) BOC-6-Aminohexansäure wurden mit 227 mg (1.1 mmol) DCC in 15 ml Dichlormethan bei 0°C 30 min gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde mit 311 mg (1 mmol) (*S,S*)-Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat (**C**) in 1ml DCM bei RT

versetzt, gefolgt von der Zugabe von 60 mg (0.5 mmol) DMAP. Nach 12 Stunden Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rest in 100 ml Diethylether gelöst, 2x mit 2% Na₂CO₃ und 1x mit 10% Citronensäure gewaschen und anschließend, nach Trocknung mit Na₂SO₄, über eine 3 cm dicke Kieselgelschicht gepresst. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Zwischenprodukt BOC-HXA-(S,S)-Azi-(OBn)₂ in 5ml Trifluoressigsäure/DCM (1/3) bei 0°C gelöst und 30 min gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel-TFA-Gemisches im Vakuum wurde der Rest in 5 ml DMF gelöst, anschließend wurden 266 µl (2 mmol) Et₃N und 375 mg (1.1 mmol) Biotinhydroxysuccinimidylester bei RT zugegeben und 5 Tage gerührt.

Das Produkt Bio-HXA-(S,S)-Azi-(OBn)₂ **999C** wurde durch Flash-Chromatographie (SiO₂ 60, Chloroform→Methanol Gradient) gereinigt und als gelblicher amorpher Feststoff isoliert. Ausbeute: 253 mg, 39%.

DC (SiO₂ 60, Chloroform:Methanol 10:1, R_f = 0.45

$[\alpha]_D^{20} = -30.4$ (c 1.01, MeOH)

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3250$ (m, br.), 2930 (m), 2862 (m), 2360 (s), 1735 (s), 1697 (s, C=O), 1637 (s), 1379 (s), 1324 (s), 1182 (s), 1074 (s), 954 (m), 730 (s), 649 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): Aziridin: $\delta = 3.49$ (s, 2 H, 2 x CH ring), 5.19 (s, 4 H, 2 x CH₂), 7.30-7.37 (m, 10H, 2 C₆H₅); Aminohexansäure: $\delta = 1.15$ -1.30 (m, 2H; 4-CH₂), 1.33-1.48 (m, 2H; 5-CH₂), 1.58-1.75 (m, 2H; 3-CH₂), 2.10-2.25 (m, 1H; 2-CH₂a), 2.28-2.40 (m, 1H; 2-CH₂b), 3.07-3.15 (m, 2H; 6-CH₂), 6.76 (bt, 1H; NH); Biotin: 1.33-1.48 (m, 2H; 4-CH₂), 1.48-1.75 (m, 4H; 3'+5'-CH₂), 2.20-2.25 (m, 2H; 2'-CH₂), 2.73 (d, 1H, J = 12.1 Hz; cis 12'-CH₂), 2.87 (dd, 1H, J = 12.1 Hz und J = 5.0 Hz; trans 12'-CH₂), 4.30-4.35 (m, 1H; 7'-CH), 4.50-4.55 (m, 1H; 11'-CH), 5.7 (bs, 1H; 10'-NH), 6.32 (bs, 1H; 8'-NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta =$ Aziridin: $\delta = 40.0$ (2 x CH ring), 68.2 (2 x CH₂), 128.7 (2 x C₆H₅), 168.4 (2 x C=O); Aminohexansäure: $\delta = 23.8$ (3-CH₂), 25.6 (4-CH₂), 28.9 (5-CH₂), 36.5 (2-CH₂), 39.4 (6-CH₂), 173.2 (1-C=O); Biotin: 26.2 (3'-CH₂), 27.8 (5'-CH₂), 27.9 (4'-CH₂), 35.7 (2'-CH₂), 40.5 (12'-CH₂), 55.4 (6'-CH), 60.5 (11'-CH), 62.2 (7'-CH), 169.4 (1'-C=O), 180.5 (9'-C=O) ppm.

ESI MS m/z: 651.3 [M+H⁺] (100%), 673.3 [M+Na⁺] (25%).

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₂N₄O₇S, [M+H⁺]: 651.2852; gef.: 651.2855.

**(2R,3R)-Diethyl-1-[(R)-biotin-6-aminohexanoyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat,
Bio-HXA-(S,S)-Azi(OEt)₂ (999B)**

Ansatz: 1 mmol Aziridin-2,3-dicarboxylat, siehe **999C**.

Säulenchromatographie (SiO₂ 60, Chloroform→Methanol Gradient). Isoliert als gelblicher amorpher Feststoff. Ausbeute: 242 mg, 46%.

DC (SiO₂ 60, Chloroform:Methanol 10:1, R_f = 0.42.

$[\alpha]_D^{20} = +33.1^\circ$ (c 1.06, MeOH).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3231$ (m, br.), 2930 (m), 2858 (m), 2360 (s), 1736 (s), 1697 (s, C=O), 1640 (s), 1154 (s), 1459 (m), 1369 (s), 1325 (s), 1265 (m), 1195 (s), 1071 (s), 1030 (s), 858 (s), 649 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): Aziridin: $\delta = 1.3$ (t, 6 H, 2 x CH₃), 3.41 (s, 2 H, 2 x CH ring), 4.22 (q, 4 H, 2 x CH₂); Aminohexansäure: $\delta = 1.35$ -1.40 (m, 2H; 4-CH₂), 1.48-1.56 (m, 2H; 5-CH₂), 1.58-1.76 (m, 2H, 3-CH₂), 2.28-2.35 (m, 1H; 2-CH₂a), 2.39-2.48 (m, 1H; 2-CH₂b), 3.19-3.27 (m, 2H; 6-CH₂), 6.15 (bt, 1H; NH); Biotin: 1.40-1.50 (m, 2H; 4'-CH₂), 1.58-1.76 (m, 2H; 3'+5'-CH₂), 2.20-2.25 (m, 2H; 2'-CH₂), 2.73 (d, 1H, J =12.1 Hz; cis 12'-CH₂), 2.87 (dd, 1H, J =12.1 Hz und J =5.0 Hz; trans 12'-CH₂), 4.30-4.35 (m, 1H; 7'-CH), 4.50-4.55 (m, 1H; 11'-CH), 5.7 (bs, 1H; 10'-NH), 6.32 (bs, 1H; 8'-NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): Aziridin: $\delta = 14.1$ (2 x CH₃), 40.0 (2 x CH ring), 62.5 (2 x CH₂), 166.5 (2 x C=O); Aminohexansäure: $\delta = 24.0$ (3-CH₂), 25.6 (4-CH₂), 29.2 (5-CH₂), 36.5 (2-CH₂), 39.2 (6-CH₂), 173.2 (1-C=O); Biotin: 26.3 (3'-CH₂), 28.1 (5'-CH₂), 28.2 (4'-CH₂), 36.1 (2'-CH₂), 40.6 (12'-CH₂), 55.6 (6'-CH), 60.2 (11'-CH), 61.8 (7'-CH), 169.8 (1'-C=O), 180.3 (9'-C=O) ppm.

ESI MS m/z: 527.3 M+H⁺ (100%) 549.4 M+Na⁺ (20%).

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₄H₃₈N₄O₇S, [M+H⁺]: 527.2539; gef.: 527.2537.

10.1.9 Synthetisierte Dipeptide für Fragment-Kupplungen**Benzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl]-(S)-aziridin-2-carboxylat,
BOC-(S)-Leu-(S)-AzyOBn (116)**

Methode D, Ansatz: 5 mmol, Ausbeute: farbloses Öl, 1.31 g, 66%.

$[\alpha]_D^{20} = -31.8$ (c 1.15, CHCl₃)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.42-7.27 (m, 5H, arom. CH); 5.26-5.13 (m, 2H, OCH_2Ph); 4.96 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, Leu NH); 4.25 (dt, $J=4.7$ Hz, 8.6 Hz, 1H, Leu- α CH); 3.41 (dd, $J=2.9$, 5.5 Hz, Azy- α CH, 1H); 2.60 (d, $J=5.8$ Hz, 1H, 3- CH_2 Azy); 2.55 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, 3'- CH_2 Azy); 1.81-1.64 (m, 2H, β - CH_2 Leu+ γ -Leu CH); 1.54-1.41 (m, 1H, β' - CH_2 Leu); 1.41 (bs, BOC, 9H); 0.90 (d, $J=4.2$ Hz, 3H, Leu- δ CH_3); 0.89 (d, $J=4.1$ Hz, 3H, Leu- δ' CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 184.14 (N-C=O Leu); 167.82 (BnO-C=O); 155.43 (C=O(BOC)); 134.96 (q. arom. C); 128.49, 128.41, 128.36 (arom. CH); 79.74 (BOC q. C); 67.30 (OCH_2Ph); 53.83 (Leu- α CH); 41.76 (Leu- β CH_2); 34.23 (Azy- α CH); 30.33 (Azy- β CH_2); 28.16 (BOC CH_3); 24.62 (Leu- γ CH); 22.70 (Leu- δ CH_3); 21.71 (Leu- δ' CH_3) ppm.

**Benzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*R*)-leucyl]-(*S*)-aziridin-2-carboxylat,
BOC-(*R*)-Leu-(*S*)-AzyOBn (216)**

Methode D, Ansatz: 5 mmol, Ausbeute: farbloses Öl, 1.23 g, 63%.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.2$, (c 1.26, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.42-7.27 (m, arom. CH, 5H); 5.25-5.12 (m, OCH_2Ph , 2H); 4.96 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, Leu NH); 4.25 (dt, $J=4.7$ Hz, 8.6 Hz, 1H, α -Leu CH, 1H); 3.40 (dd, $J=2.9$ Hz, 5.5 Hz, 1H, 2-CH Azy); 2.59 (dd, $J=5.8$ Hz, 1.5 Hz, 1H, 3- CH_2 Azy); 2.55 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, 3'- CH_2 Azy); 1.78-1.64 (m, 2H, β -Leu CH_2 + γ -Leu CH); 1.58-1.46 (m, 1H, β' -Leu CH_2); 1.40 (bs, 9H BOC); 0.89 (d, $J=4.2$ Hz, 3H, δ -Leu CH_3); 0.88 (d, $J=4.1$ Hz, 3H, δ' -Leu CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 183.82 (BnO-C=O); 167.51 (N-C=O Leu); 155.11 (q. arom. C); 134.64, 128.18, 128.10, 128.05 (arom. CH); 79.42 (q. C BOC); 66.99 (OCH_2Ph); 53.51 (α -CH Leu); 41.44 (β - CH_2 Leu); 33.92 (2-CH Azy); 30.01 (3- CH_2 Azy); 27.85 (BOC); 24.30 (γ Leu); 22.38 (δ - CH_3 Leu); 21.39 (δ' - CH_3 Leu) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R+S*)-azetidin-2-carbonsäure,
BOC-(*S*)-Leu-(*R+S*)-AzetOH (131)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol, Ausbeute: 852 mg, 54%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 48-49°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.2$ (c 0.99, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 6.8 (bs, 2H, $\text{COOH}+\text{NH}$ Leu); 4.82 (dd, $J=5.3$ Hz, 9.5 Hz, 1H, α -Azet CH); 4.34 (dd, $J=8.4$ Hz, 14.2 Hz, 1H, γ -Azet CH_2); 4.27-4.17 (m, 2H, γ -Azet $\text{CH}_2+\alpha$ -Leu CH); 2.68-2.57 (m, 1H, β -Azet CH_2); 2.24 (ddd, $J=5.7$ Hz, 11.2 Hz, 14.5 Hz, 1H, β' -Azet CH_2); 1.70 (sep, 1H, $J=6.7$ Hz, γ -Leu CH); 1.49-1.38 (m, 11H, BOC+ β -Leu CH_2); 0.92 (d, $J=5.3$ Hz, 3H, δ -Leu CH_3); 0.90 (d, $J=5.3$ Hz, 3H, δ' -Leu CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 174.14 (COOH Azet); 172.32 (N-C=O Leu); 155.38 (C=O BOC); 79.43 (BOC q. C); 58.78 (α -Azet CH); 48.61 (γ -Azet CH_2); 47.67 (α -Leu CH); 42.62 (β -Leu CH_2); 28.18 (BOC); 24.31 (γ -Leu CH); 22.93 (δ -Leu CH_3); 21.88 (δ' -Leu CH_3); 20.12 (Azet- β CH_2) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolin, BOC-(*S*)-Leu-(*R*)-ProOH (122)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.26 g, 68%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 52-53°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +89.3$ (c 0.98, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.65; 6.85 (bs, 2H $\text{COOH}+\text{NH}$); 4.63-4.39 (m, Pro- α +Leu- α CH, 2H); 4.00-3.75 (m, Pro- δ CH_2 , 1H); 3.78-3.45 (m, Pro- δ' CH_2 , 1H); 2.34-1.84 (m, Pro- β +Pro- γ CH_2 +Leu- γ C, 4H); 1.79-1.65 (m, Pro- γ' CH_2 , 1H); 1.51-1.26 (m, BOC+Leu- β CH_2 , 11H); 0.96 (d, $J=6.2$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.94 (d, $J=6.3$ Hz, Leu- δ' CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 173.79 (COOH Pro); 172.82 (N-C=O Leu); 155.51 (C=O BOC); 79.56 (BOC q. C); 59.36 (Pro- α CH); 50.33 (Leu- α CH); 47.00 (Pro- δ CH_2); 41.82 (Leu- β CH_2); 28.45 (Pro- β CH_2); 28.13 (BOC); 24.43 (Pro- γ CH_2); 24.43 (Leu- γ CH); 23.17 (Leu- δ CH_3); 21.75 (Leu- δ' CH_3) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-leucyl-(*S*)-prolin, BOC-(*R*)-Leu-(*S*)-ProOH (212)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.12 g, 60%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 55-57°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -80.2$ (c 1.49, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 8.55-7.86 (bs, $\text{COOH}+\text{NH}$, 2H); 4.61-4.40 (m, Pro- α +Leu- α CH, 2H); 3.98-3.73 (m, Pro- δ CH_2 , 1H); 3.68-3.42 (m, Pro- δ' CH_2 , 1H); 2.34-1.84 (m, Pro- β +Pro- γ CH_2 +Leu- γ CH, 4H); 1.78-1.63 (m, Pro- γ' CH_2 , 1H); 1.61-1.26 (m,

BOC+Leu- β CH_2 , 11H); 0.98 (d, $J=6.3$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.94 (d, $J=6.5$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): δ = 173.88 (COOH Pro); 172.91 (N-C=O Leu); 155.59 (C=O BOC); 79.64 (BOC q. C); 59.45 (Pro- α CH); 50.40 (Leu- α CH); 47.07 (Pro- δ CH_2); 41.89 (Leu- β CH_2); 28.52 (Pro- β CH_2); 28.20 (BOC); 24.50 (Pro- γ CH_2); 24.49 (Leu- γ CH); 23.23 (Leu- δ CH_3), 21.81 (Leu- δ' CH_3) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-leucyl-(*R*)-prolin, BOC-(*R*)-Leu-(*R*)-ProOH (222)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.41 g, 76%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 98-100°C.

$[\alpha]_D^{20} = +104.3$ (c 0.88, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): δ = 8.55-7.86 (bs, 2H, COOH+NH); 4.61-4.40 (m, 2H, Pro- α +Leu- α CH); 4.09-3.38 (m, 2H, Pro- δ CH_2); 2.33-1.84 (m, 4H, Pro- β +Pro- γ CH_2 +Leu- γ CH); 1.78-1.63 (m, 1H, Pro- γ' CH_2); 1.47-1.37 (m, 11H, BOC+Leu- β CH_2); 0.96 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, Leu- δ CH_3); 0.91 (d, $J=6.7$ Hz, 3H, Leu- δ CH_3) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): δ = 172.015 (COOH Pro); 171.80 (N-C=O Leu); 155.69 (C=O BOC); 79.51 (BOC q. C); 58.84 (Pro- α CH); 50.27 (Leu- α CH); 46.71 (Pro- δ CH_2); 41.99 (Leu- β CH_2); 28.96 (Pro- β CH_2); 28.34 (BOC); 24.88 (Pro- γ CH_2); 24.53 (Leu- γ CH); 23.37 (Leu- δ CH_3); 21.73 (Leu- δ' CH_3) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-glycyl-(*S*)-prolin, BOC-Gly-(*S*)-ProOH (312)**

Methode E; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.52 g, 97%.

Weiser kristalliner Feststoff, Smp.: 136-137°C.

$[\alpha]_D^{20} = -96.1$ (c 1.10; $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400.13 MHz): δ = 6.45 (bs, 2H, COOH+NH); 4.56 (dd, 1H, $J=3.5$ Hz, 5.8 Hz, Pro- α CH); 4.06-3.81 (m, 2H, Gly CH_2); 3.67-3.52 (m, 1H, δ -Pro CH_2); 3.51-3.38 (m, 1H, δ -Pro CH_2); 2.33-2.11 (m, 1H, β -Pro CH_2); 2.09-1.93 (m, 3H, β' -Pro+ γ -Pro CH_2); 1.45 (bs, 9H, BOC) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100.62 MHz): δ = 172.95 (COOH Pro); 171.47 (N-C=O Gly); 155.60 (C=O BOC); 79.35 (BOC q. C); 58.80 (Pro- α CH); 45.66 (Pro- δ CH_2); 42.83 (Gly CH_2); 28.76 (Pro- β CH_2); 28.16 (BOC) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-glycyl-(*R*)-prolin, BOC-Gly-(*R*)-ProOH (322)**

Methode E; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.55 g, 98%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 134-136°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +98.0$ (c 1.21, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 6.92$ (bs, 2H, COOH+NH); 4.58 (dd, 1H, $J=3.5$ Hz, 5.8 Hz, Pro- α CH); 4.09-3.80 (m, 2H, Gly CH₂); 3.71-3.51 (m, 1H, δ -Pro CH₂); 3.50-3.34 (m, 1H, δ -Pro CH₂); 2.38-2.12 (m, 1H, β -Pro CH₂); 2.10-1.91 (m, 3H, β' -Pro+ γ -Pro CH₂); 1.44 (bs, 9H, BOC) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 172.91$ (COOH Pro); 171.44 (N-C=O Gly); 155.55 (C=O BOC); 79.31 (BOC q. C); 58.75 (Pro- α CH); 45.61 (Pro- δ CH₂); 42.79 (Gly CH₂); 28.72 (Pro- β CH₂); 28.13 (BOC) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R+S*)-pipecolinsäure, BOC-(*S*)-Leu-(*R+S*)-PipOH (133)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 912 mg, 53%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 57-58°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.4$ (c 1.18, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 6.40$ (bs, COOH+Leu-NH, 2H); 5.33 (d, $J=5.6$ Hz, Pip- α , 1H); 4.83-4.63 (m, Leu- α CH, 1H); 3.86 (t, $J=13.5$ Hz, Pip- ϵ CH₂, 1H); 3.28 (dtd, $J=2.3$ Hz, 13.1 Hz, 12.8 Hz, 15.2 Hz, Pip- ϵ' CH₂, 1H); 2.32 (d, $J=8.9$ Hz, Pip- β CH₂, 1H); 1.85-1.61 (br. m, Pip- δ +Pip- β' CH₂+Leu- γ CH, 3H); 1.51-1.35 (m, Pip- δ' +Pip- γ CH₂, BOC, Leu- β CH₂, 14H); 0.94 (d, $J=5.3$ Hz, Leu - δ CH₃, 3H); 0.92 (d, $J=5.3$ Hz, Leu - δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 172.81$ (N-C=O Leu); 169.06 (COOH); 155.64 (C=O(BOC)); 79.89 (BOC q. C); 52.41, 52.05 (Pip- α CH); 48.79, 48.23 (Leu- α CH); 43.47, 43.21 (Pip- ϵ CH₂); 41.79 (Leu- β CH₂); 30.95 (Leu- δ , δ' 2xCH₃); 28.36 (BOC); 26.49 (Pip- β CH₂); 25.14 (Pip- δ CH₂); 23.39 (Leu- γ CH); 20.82 (Pip- γ CH₂) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-leucyl-(*R+S*)-pipecolinsäure, BOC-(*R*)-Leu-(*R+S*)-PipOH (233)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 896 mg, 52%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 58-59°C.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.3 \text{ (c 1.20, CHCl}_3\text{)}.$$

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 6.83 (bs, COOH+Leu-NH, 1H); 5.35 (d, $J=5.6$ Hz, Pip- α , 1H); 4.84-4.62 (m, Leu- α CH, 1H); 3.88 (t, $J=13.5$ Hz, Pip- ϵ CH₂, 1H); 3.29 (dtd, $J=2.3, 13.1, 12.7, 15.1$ Hz, Pip- ϵ' CH₂, 1H); 2.33 (d, $J=8.9$ Hz, Pip- β CH₂, 1H); 1.86-1.62 (br. m, Pip- δ +Pip- β' CH₂+Leu- γ CH, 3H); 1.52-1.36 (m, Pip- δ' +Pip- γ CH₂, BOC, Leu- β CH₂, 14H); 0.95 (d, $J=5.2$ Hz, Leu - δ CH₃, 3H); 0.93 (d, $J=5.2$ Hz, Leu - δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 172.79 (N-C=O Leu); 169.01 (COOH); 155.63 (C=O(BOC)); 79.86 (BOC q. C); 52.40, 52.03 (Pip- α CH); 48.78, 48.23 (Leu- α CH); 43.45, 43.21 (Pip- ϵ CH₂); 41.78 (Leu- β CH₂); 30.94 (Leu- δ, δ' 2xCH₃); 28.35 (BOC); 26.48 (Pip- β CH₂); 25.12 (Pip- δ CH₂); 23.39 (Leu- γ CH); 20.80 (Pip- γ CH₂) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-glycyl-(*R+S*)-pipecolinsäure, BOC-Gly-(*R+S*)-PipOH (333)**

Methode E; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.24 g, 87%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 105-107°C.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0.0 \text{ (c 1.43, CHCl}_3\text{)}.$$

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz), Rotamere 2/1: δ = 6.88 (COOH+NH, 2H); 5.12 (bd, $J=24.6$ Hz, 1H, Pip- α CH, 1H); 4.23-3.79 (bm, Gly-CH₂, 2H); 3.62 (bd, $J=12.8$ Hz, Pip- ϵ CH₂, 1H); 3.25 (bt, $J=11.6$ Hz, Pip- ϵ' CH₂, 1H); 2.31 (d, $J=13.3$ Hz, Pip- β CH₂, 1H); 1.84-1.58 (bm, Pip- δ +Pip- β' CH₂, 2H); 1.56-1.32 (br. m, Pip- δ' +Pip- γ CH₂, BOC, 12H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 174.68 (N-C=O Gly); 169.15 (COOH); 156.08 (C=O(BOC)); 79.89 (BOC q. C); 52.34 (Pip- α CH); 42.47 (Pip- ϵ CH₂); 42.41 (Gly-CH₂); 28.36 (BOC); 26.38 (Pip- β CH₂); 24.91 (Pip- δ CH₂); 20.78 (Pip- γ CH₂) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(*R+S*)-nipecotinsäure, BOC-(S)-Leu-(*R+S*)-NipOH (134)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.18 g, 69%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 55-56°C.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.0 \text{ (c 1.07, CHCl}_3\text{)}.$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 6.27-5.46 (bs, 2H, $\text{NH}+\text{COOH}$); 4.76-4.50 (m, 1.5H, $\alpha\text{-Leu CH}+2\text{-Nip CH}_2$); 4.48-4.18 (m, 0.5H, 2-Nip CH_2); 4.10-3.74 (m, 1H, 6-Nip CH_2); 3.36-2.78 (m, 2H, 2'+6'-Nip CH_2); 2.69-2.40 (m, 1H, 3-Nip CH); 2.24-2.04 (m, 1H, 4-Nip CH_2); 1.93-1.30 (m, 15H, BOC+4'-Nip+5-Nip+Leu- β CH_2 +Leu- γ CH); 1.04-0.83 (m, 6H, Leu- δ CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 178.61 (COOH); 171.19 (N-C=O Leu); 155.07 (C=O BOC); 79.97 (q. C BOC); 50.21 (Leu- α CH); 47.71, 46.43 (2- CH_2 Nip); 45.45, 44.26 (6- CH_2 Nip); 42.26 (Leu- β CH_2); 41.33 (3- CH Nip); 27.98, 27.72 (BOC); 26.01, 25.25 (4- CH_2 Nip); 24.47 (Leu- γ CH); 24.33 (5- CH_2 Nip); 21.19 (Leu- δ CH_3); 21.00 (Leu- δ' CH_3) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-leucyl-(*R*+*S*)-nipecotinsäure,
BOC-(*R*)-Leu-(*R*+*S*)-NipOH (234)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.23 g, 72%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 54-55°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.2$ (c 1.34, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 5.96 (bs, 2H, $\text{NH}+\text{COOH}$); 4.76-4.50 (m, 1.5H, $\alpha\text{-Leu CH}+2\text{-Nip CH}_2$); 4.48-4.18 (m, 0.5H, 2-Nip CH_2); 4.10-3.74 (m, 1H, 6-Nip CH_2); 3.36-2.78 (m, 2H, 2'+6'-Nip CH_2); 2.69-2.40 (m, 1H, 3-Nip CH); 2.24-2.04 (m, 1H, 4-Nip CH_2); 1.93-1.30 (m, 15H, BOC+4'-Nip+5-Nip+Leu- β CH_2 +Leu- γ CH); 1.04-0.83 (m, 6H, Leu- δ CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 178.61 (COOH); 171.21 (N-C=O Leu); 155.07 (C=O BOC); 79.99 (q. C BOC); 50.24 (Leu- α CH); 47.71, 46.43 (2- CH_2 Nip); 45.44, 44.26 (6- CH_2 Nip); 42.26 (Leu- β CH_2); 41.36 (3- CH Nip); 27.98, 27.71 (BOC); 26.01, 25.24 (4- CH_2 Nip); 24.47 (Leu- γ CH); 24.32 (5- CH_2 Nip); 21.19, 21.02 (Leu- δ' CH_3) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-glycyl-(*R*+*S*)-nipecotinsäure, BOC-Gly-(*R*+*S*)-NipOH (334)**

Methode E; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.37 g, 96%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 102-105°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0.0$ (c 1.43, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz) Rotamere 1/1: δ = 7.06-6.72 (bs, 2H, $\text{NH}+\text{COOH}$); 4.57-4.46 und 3.10-2.97 (m, a2-Nip CH_2 , 0.5H) und (m, a2'-Nip CH_2 , 0.5H); 4.04-3.85 und 3.23-3.10 (m, a6-Nip $\text{CH}_2+\text{Gly CH}_2$, 2.5H) und (m, a6'-Nip, 0.5H); 3.71-3.61 und 3.46-3.34 (m, b2-Nip CH_2 , 0.5H) und (m, b2'-Nip H, 0.5H); 3.61-3.51 und 3.10- 2.97 (m, b6-Nip H, 0.5H) und (m, b6'-Nip H, 0.5H); 2.65-2.45 (m, 3-Nip H, 1H); 2.18-2.05 (m, 4-Nip CH_2 , 1H); 1.91-1.61 (m, 4'-Nip+5-Nip CH_2 , 2 H); 1.57-1.38 (m, BOC+5'-Nip CH_2 , 10H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 174.69 (COOH Nip); 171.40 (N-C=O Gly); 155.48 (C=O BOC); 79.33 (q. C BOC); 45.95 (2- CH_2 Nip); 45.26 (6- CH_2 Nip); 43.36 (3-CH Nip); 42.03 (Gly- CH_2); 28.30 (BOC); 26.43 (4- CH_2 Nip); 24.62 (5- CH_2 Nip) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-phenylalanyl-(*R*)-alanin, BOC-(*S*)-Phe-(*R*)-AlaOH (427)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.04 g, 62%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 180-182°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.7$ (c 1.12, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400.13 MHz): δ = 12.61 (bs, Ala-COOH); 8.14 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, NH-Ala); 7.43-7.11 (m, 5H, arom. H Phe); 6.82 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, NH-Phe); 4.36-4.01 (m, 2H, $\alpha\text{-Phe}+\alpha\text{-Ala CH}$); 3.03-2.62 (m, 2H, $\beta\text{-Phe CH}_2$); 1.44-1.08 (m, 12H, BOC+ $\beta\text{-Ala CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100.62 MHz): δ = 173.79 (N-C=O Phe); 171.05 (COOH Ala); 154.96 (O-C=O BOC); 137.91 (q. arom C, Phe); 129.14, 127.84, 126.03 (arom. CH Phe); 77.89 (q. C BOC); 55.29 ($\alpha\text{-CH Ala}$); 47.33 ($\alpha\text{-CH Phe}$); 37.75 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe); 28.03 (CH_3 BOC); 17.38 ($\beta\text{-CH}_3$ Ala) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-phenylalanyl-(*S*)-alanin, BOC-(*R*)-Phe-(*S*)-AlaOH (517)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 995 mg, 59%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 193-194°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.9$ (c 1.05, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400.13 MHz): δ = 12.57 (bs, Ala-COOH); 8.15 (d, 1H, $J=7.3\text{Hz}$, NH-Ala); 7.35-7.14 (m, 5H, arom. H Phe); 6.82 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, NH-Phe); 4.36-4.00 (m, 2H,

α -Phe+ α -Ala CH); 3.00-2.64 (m, 2H, β -Phe CH₂); 1.36-1.17 (m, 12H, BOC+ β -Ala CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO, 100.62 MHz): δ = 173.79 (N-C=O Phe); 171.06 (COOH Ala); 154.96 (O-C=O BOC); 137.90 (q. arom C, Phe); 129.14, 127.84, 126.03 (arom. CH Phe); 77.89 (q. C BOC); 55.30 (α -CH Ala); 47.34 (α -CH Phe); 37.75 (β -CH₂ Phe); 28.03 (CH₃ BOC); 17.39 (β -CH₃ Ala) ppm.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*R*)-phenylalanyl-(*R*)-alanin, BOC-(*R*)-Phe-(*R*)-AlaOH (527)**

Methode D; Ansatz: 5 mmol; Ausbeute: 1.02 mg, 61%.

Weißer kristalliner Feststoff, Smp.: 153-154°C.

$[\alpha]_D^{20} = +7.2$ (c 1.06, CHCl₃).

¹H-NMR (DMSO, 400.13 MHz): δ = 12.56 (bs, Ala-COOH); 8.18 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, *NH*-Ala); 7.35-7.11 (m, 5H, arom. H Phe); 6.85 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, *NH*-Phe); 4.30-4.13 (m, 2H, α -Phe+ α -Ala CH); 3.06-2.63 (m, 2H, β -Phe CH₂); 1.35-1.24 (m, 12H, BOC+ β -Ala CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO, 100.62 MHz): δ = 174.03 (N-C=O Phe); 171.49 (COOH Ala); 155.19 (O-C=O BOC); 138.21 (q. arom C); 129.19, 127.94, 126.10 (arom. CH); 77.94 (q. C BOC); 55.45 (α -CH Ala); 47.51 (α -CH Phe); 37.37 (β -CH₂ Phe); 28.11 (CH₃ BOC); 17.28 (β -CH₃ Ala) ppm.

10.1.10 Synthese des fluorimetrischen Substrates

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*S*)-glutamin, BOC-(*S*)-Leu-(*S*)-GlnOH**

10.5 g (51 mmol) DCC wurden zu einer Lösung aus 11.6 g (50 mmol) BOC-LeuOH und 5.9 g (51 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 50 ml THF bei 0°C zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren bei RT wurden 11.0 g (75 mmol) H₂NGlnOH in 25 ml Wasser zugetropft und 12 Stunden gerührt. Das THF wurde abgezogen und 100 ml EtOAc zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit 2M HCl auf pH=4 angesäuert und nach 10 min Rühren wurde die organische Phase abgetrennt, filtriert und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösemittels wurde der Rückstand 3x aus EtOAc umkristallisiert.

Ausbeute: 11.8 g, 66%.

Weißes kristallines Pulver, Smp.: 63-65°C.

$[\alpha]_D^{20} = -19.9$ (c 0.96, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 400.13 MHz): $\delta = 4.40$ (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 9.2 Hz, α -Gln CH); 4.07 (dd, 1H, $J=5.4$ Hz, 9.5 Hz, α -Leu CH); 2.39-2.09 (m, 2H, γ -Gln CH_2); 2.02-1.87 (m, 1H, β -Gln CH_2); 1.79-1.63 (m, 1H, β -Gln CH_2); 1.79-1.63 (m, 1H, γ -Leu CH); 1.58-1.46 (m, 1H, β -Leu CH_2); 1.42 (s, 9H, BOC); 0.94 (d, 3H, $J=6.7$ Hz, δ -Leu CH_3); 0.92 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, δ -Leu CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, 100.62 MHz): $\delta = 177.81$ ($\text{H}_2\text{N-C=O}$ Gln); 175.88 (HN-C=O Leu); 174.58 (C=O Gln); 157.94 (C=O BOC); 80.62 (q. C BOC); 54.59 (α -Leu CH); 52.98 (α -Gln CH); 42.10 (β -Leu CH_2); 32.68 (γ -Gln CH_2); 28.83 (β -Gln CH_2); 28.78 (BOC); 26.09 (γ -Leu CH); 23.48 (δ -Leu CH_3); 22.04 (δ -Leu CH_3) ppm.

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-(S)-valyl-(S)-asparagin, Z-(S)-Val-(S)-AsnOH**

Synthetisiert und isoliert wie für BOC-LQOH beschrieben. 12.6 g (50 mmol) Z-ValOH, 9.9 g (75 mmol) H_2NAsnOH .

Ausbeute: 11.8 g, 66%.

Weißes kristallines Pulver, Smp.: 169-172°C.

$[\alpha]_D^{20} = -3.5$ (c 0.37, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400.13 MHz): $\delta = 13.65$ -11.61 (bs, 1H, COOH); 8.10 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, NH Asn); 7.43-7.29 (m, 5H, arom. CH); 7.26 (d, 1H, $J=9.1$ Hz, NH Val); 6.97-6.81 (bs, 2H, NH_2 Asn); 5.12-4.96 (m, 2H, OCH_2Ph); 4.51 (dd, 1H, $J=6.4$ Hz, 13.3 Hz, α -Asn CH); 3.91 (dd, 1H, $J=6.8$ Hz, 8.6 Hz, α -Val CH); 2.63-2.37 (m, 2H, β -Asn CH_2); 2.06-1.88 (m, 1H, β -Val CH); 0.88 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, γ -Val CH_3); 0.83 (d, 1H, $J=6.7$ Hz, γ -Val CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100.62 MHz): $\delta = 172.58$ ($\text{H}_2\text{N-C=O}$ Asn); 171.07 (HN-C=O Asn); 170.74 (C=O Val); 156.00 (C=O Z); 136.98 (q. arom. C); 128.24, 127.64, 127.52 (arom. CH); 65.31 (OCH_2Ph); 59.79 (α -Val CH); 48.63 (α -Asn CH); 36.60 (β -Asn CH_2); 30.43 (β -Val CH); 19.05 (γ -Val CH_3); 17.81 (γ -Val CH_3) ppm.

7-[(*N*-Benzyloxycarbonyl)-(*S*)-valyl-(*S*)-asparaginy-(*S*)-leucyl-(*S*)-glutaminyl]-amido-4-methylcumarin

8 g (50 mmol) 3-Ethoxycarbonylaminophenol wurden in 40 ml 75% H₂SO₄ suspendiert und nach Zugabe von 7.8 g (60 mmol) Ethylacetoacetat 4 Stunden bei RT gerührt. Der Ansatz wurde anschließend auf 300 g Eis gegossen, das Präzipitat abfiltriert, mit kaltem Wasser nachgewaschen und schließlich aus EtOH umkristalisiert. 9.6 g (78%) 7-(*N*-Ethoxycarbonyl)amido-4-methylcumarin wurden als weiße bis leicht gelbliche Nadeln isoliert. Smp.: 185-186°C (Lit.: 185-187^[105], 186-188°C^[90])

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.68 (d, 1H, *J*=8.7 Hz, 6-CH AMC); 7.54 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, 8-CH AMC); 7.40 (dd, 1H, *J*=2.0 Hz, 8.7 Hz, 5-CH AMC); 6.22 (s, 1H, 3-CH AMC); 4.17 (q, 2H, *J*=7.1 Hz, OCH₂); 2.38 (s, 3H, AMC CH₃); 1.26 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH₃) ppm.

9.6 g (39 mmol) 7-(*N*-Ethoxycarbonyl)amido-4-methylcumarin wurde mit 20 ml konz. H₂SO₄ und 40 ml Eisessig gemischt und 4 Stunden im Ölbad unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das gelbe Reaktionsgemisch auf 200 g Eis gegossen und unter zusätzlicher Kühlung mit NaOH basisch gestellt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wurde mit Wasser gewaschen. 7-Amino-4-methylcumarin wurde dann nach Umkristallisieren aus EtOH als farblose Plättchen isoliert. Ausbeute 5 g, 74%.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.36 (d, 1H, *J*=9.0 Hz, 5-CH AMC); 6.60-6.56 (m, 1H, 6-CH + 8-CH AMC); 6.02 (s, 1H, 3-CH AMC); 4.15 (bs, 2H, NH₂); 2.35 (s, 1H, AMC CH₃) ppm.

1.1 mmol BOC-Leu-GlnOH wurden zusammen mit 1 mmol AMC nach Methode B zu BOC-Leu-Gln-AMC umgesetzt, das anschließend nach Reinigung über RP-C18-Kieselgel (Gradient 10% auf 100% MeOH) als weißes Pulver isoliert wurde. Ausbeute: 180 mg, 35%.

¹H-NMR (MeOD, 400.13 MHz): δ = 7.86 (s, 1H, 8-CH AMC); 7.72 (dd, 1H, *J*=1.7 Hz, 8.7 Hz, 5-CH AMC); 7.60 (dd, 1H, *J*=8.7 Hz, 38.7 Hz, 6-CH AMC); 6.25 (s, 1H, 3-CH AMC); 4.60-4.47 (m, 1H, α-Gln CH); 4.15-4.02 (m, 1H, α-Leu CH); 2.47 (s, 3H, AMC CH₃); 2.43-2.15 (m, 3H, β-Gln+γ-Gln CH₂); 2.12-1.95 (m, 1H, β-Gln CH₂); 1.81-1.66 (γ-Leu CH); 1.61-1.39 (s, 11H, BOC+β-Leu CH₂); 1.04-0.89 (m, 6H, δ-Leu CH₃) ppm.

¹³C-NMR (MeOD, 100.62 MHz): δ = 177.61 (H₂N-C=O); 176.40 (N-C=O Leu); 172.26 (N-C=O Gln); 163.23 (C=O AMC); 160.36 (arom. q. C); 158.29 (arom. q. C); 155.41

(C=O BOC); 155.28 (arom. q. C); 143.35 (arom. q. C); 126.65 (5-CH AMC); 117.28 (6-CH AMC); 113.70 (3-CH AMC); 108.17 (8-CH AMC); 80.90 (BOC q. C); 57.52 (α -Gln CH); 55.00 (α -Leu CH); 41.88 (β -Leu CH₂); 32.45 (γ -Gln CH₂); 28.78 (BOC-CH₃); 28.66 (β -Gln CH₂); 23.49 (γ -Leu CH); 22.18 (δ -Leu CH₃); 21.96 (δ -Leu CH₃); 18.56 (CH₃ AMC) ppm.

155 mg (300 μ mol) BOC-Leu-Gln-AMC wurden in 5 ml Dichlormethan/TFA 5/1 entschützt und anschließend mit 113 mg (310 μ mol) Z-Val-AsnOH nach Methode F weiter umgesetzt. Das Produkt wurde auf RP-C18-Kieselgel gereinigt (Gradient 10% auf 100% MeOH).

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₈H₄₉N₇O₁₀, [M+H⁺]: 764.3619; gef.: 764.3628.

10.1.11 Synthetisierte Tripeptide mit Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat. BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OEt)₂ (112A)

Methode F; Ansatz: 1 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 286 mg, 57%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.16.

$[\alpha]_D^{20} = -45.9$ (c 1.01, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3325, 1735, 1704, 1645, 1441, 1368, 1253, 1192, 1165, 1125, 1026, 735$ cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 5.13$ (bd, $J=9.1$ Hz, NH Leu, 1H); 4.68 (dd, $J=4.5$ Hz, 7.5 Hz, Pro- α CH, 1H); 4.48 (dt, $J=4.5, 7.5$ Hz, Leu- α CH, 1H); 4.11-3.99 (m, 2xOCH₂, 4H); 3.61-3.50 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.44-3.33 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 3.24 (s, 2xAzi CH, 2H); 2.07-1.73 (m, Pro- $\beta+\beta'+\text{Pro-}\gamma+\gamma'$ CH₂, 4H); 1.55 (sep., $J=6.7$ Hz, Leu- γ CH, 1H); 1.32-1.14 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 1.09 (t, $J=7.2$ Hz, 2xCH₃, 6H); 0.77 (d, $J=6.5$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.72 (d, $J=6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 177.70$ (N-C=O Pro); 171.83 (N-C=O Leu); 165.78 (C=OEt); 155.63 (C=O BOC); 79.40 (BOC q. C); 62.44 (OCH₂-CH₃); 60.17 (Pro- α CH); 50.23 (Leu- α CH); 46.70 (Pro- δ CH₂); 42.11 (Leu- β CH₂); 39.60 (Azi CH); 28.55 (Pro- β CH₂); 28.32 (BOC); 24.85 (Pro- γ CH₂); 24.52 (Leu- γ CH); 23.37 (Leu- δ CH₃); 21.71 (Leu- δ' CH₃); 13.99 (OCH₂-CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{24}H_{39}N_3O_8$, $[M+H^+]$: 498.2815; gef.: 498.2813

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OEt)₂ (134A)

Methode F; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 61 mg, 48%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.21.

$[\alpha]_D^{20} = +10.4$ (c 0.68, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3385, 1731, 1698, 1661, 1518, 1441, 1367, 1327, 1219, 1192, 1167, 1024, 856 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 5.39\text{-}5.11$ (m, NH Leu, 1H); 4.69-4.50 (m, α -Leu CH, 1H); 4.34-4.11 (m, OCH₂CH₃+2-Nip CH₂, 5H); 4.10-3.79 (m, 6-Nip CH₂, 1H); 3.51-3.35 (m, CH Azi, 2H); 3.34-2.75 (m, 2'-Nip+6'-Nip CH₂, 2H); 2.71-2.25 (m, 3-Nip CH, 1H); 2.21-2.00 (m, 4-Nip CH₂, 1H); 1.86-1.58 (m, 4'-Nip+5-Nip CH₂+ γ -Leu CH, 3H); 1.49-1.17 (m, BOC+5'-Nip+ β -Leu CH₂+OCH₂CH₃, 18H); 1.05-0.78 (m, δ -Leu CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.78, 179.52$ (N-C=O Nip); 171.64, 171.39 (N-C=O Leu); 166.78, 166.56 (EtO-C=O); 155.65, 155.57 (C=O BOC); 79.57, 79.51 (q. C BOC); 63.15, 62.88 (OCH₂CH₃); 49.10, 49.00 (α -Leu CH); 47.29, 46.41 (2-CH₂ Nip); 44.35, 44.17 (3-CH Nip); 43.68, 43.33 (6-CH₂ Nip); 42.86, 42.61 (Leu- β CH₂); 40.44, 40.39 (CH Azi); 28.73, 28.69 (BOC); 26.94, 26.56 (4- CH₂ Nip); 25.06, 25.00 (5- CH₂ Nip); 24.88 (Leu- γ CH); 23.82, 21.87 (Leu- δ CH₃); 14.40, 14.34 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $C_{25}H_{41}N_3O_8$, $[M+H^+]$: 512.2972; gef.: 512.2976.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-isonipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Ini-(S,S)-Azi(OEt)₂ (105A)

Methode F, Ansatz: 0.25 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute 72 mg, 56%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.15.

$[\alpha]_D^{20} = +17.7$, (c 1.02, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 1737, 1700, 1640, 1447, 1369, 1327, 1269, 1194, 1167, 1140, 1024, 857 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 5.21 (s, *NH*-Leu, 1H); 4.64 (t, $J=7.2$ Hz, α -Leu *CH*, 1H); 4.44-4.35 (bd, $J=13.5$ Hz, 2-*Ini* CH_2 , 1H); 4.29-4.16 (m, OCH_2CH_3 , 4H); 3.91-3.88 (bd, $J=13.6$ Hz, 6-*Ini* CH_2 , 1H); 3.49 (s, 2x*CH* Azi, 2H); 3.13 (bdt, $J=10.9$ Hz, 2.2 Hz, 6'-*Ini* CH_2 , 1H); 2.89-2.76 (bdt, $J=11.1$ Hz, 2.8 Hz, 2'-*Ini* CH_2 , H); 2.53-2.39 (bm, 4-*Ini* CH_2 , 1H); 2.01 (bd, $J=13.3$ Hz, 3-*Ini* CH_2 , 1H); 1.89 (bt, $J=13.6$ Hz, 5-*Ini* CH_2 , 1H); 1.85-1.59 (m, 3'-*Ini*+ 5'-*Ini* CH_2 + γ -Leu *CH*, 3H); 1.53-1.35 (m, 3x CH_3 BOC+ β -Leu CH_2 , 11H); 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, OCH_2CH_3 , 6H); 1.07-0.86 (m, 2x CH_3 δ -Leu, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 181.50 (N-C=O *Ini*); 171.33 (N-C=O Leu); 166.47 (2xEtO-C=O); 155.68 (C=O BOC); 79.44 (q. C BOC); 62.61 (OCH_2CH_3); 48.63 (α -*CH* Leu); 44.32 (2- CH_2 *Ini*); 43.31 (4-*CH* *Ini*); 42.90 (β - CH_2 Leu); 41.36 (6- CH_2 *Ini*); 39.97 (2x*CH* Azi); 28.73 (3- CH_2 *Ini*); 28.37 (3x CH_3 BOC); 27.61 (5- CH_2 *Ini*); 24.70 (γ -*CH* Leu); 23.49 (Leu- δ CH_3); 21.87 (Leu- δ' CH_3); 14.06 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 512.2972; gef.: 512.2969.

(2*R*,3*R*)-Diethyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*+*S*)-azetidin-2-carbonyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(*S*)-Leu-(*R*+*S*)-Azet-(*R,R*)-Azi(OEt)₂ (131B)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 40 mg; 33%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.27.

$[\alpha]_D^{20}$ = -22.3 (c 1.35, CHCl_3)

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 1738, 1706, 156, 1497, 1449, 1324, 1250, 1170, 1021, 736 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 4.98 (bd, $J=8.7$ Hz, Leu-*NH*, 1H); 4.78 (dd, $J=6.1$, 8.7 Hz, Azet- α *CH*, 1H); 4.22 (q, $J=7.1$ Hz, OCH_2CH_3 , 4H); 4.30-4.15 (m, Leu- α *CH*, Azet- γ CH_2 , 3H); 3.52 (s, 2xAzi *CH*, 2H); 2.68-2.52 (m, Azet- β CH_2 , 2H); 1.74-1.64 (m, Leu- γ *CH*, 1H); 1.49-1.39 (m, BOC+Leu- β CH_2 , 11H); 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, OCH_2CH_3 , 6H); 0.92 (d, $J=6.3$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.91 (d, $J=6.4$ Hz, Leu- δ' CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 178.92, 178.77 (N-C=O Azet); 173.65, 173.44 (N-C=O Leu); 165.91, 165.78 (EtO-C=O); 155.53, 155.45 (C=O BOC); 79.63, 79.56 (BOC q. C); 62.26, 62.03 (OCH_2CH_3); 61.76, 61.65 (Azet- α *CH*); 49.11, 48.93 (Aze- γ CH_2); 48.07, 47.96 (Leu- α *CH*); 42.36, 42.10 (Leu- β CH_2); 40.23, 40.17 (Azi *CH*); 28.29,

28.25 (BOC); 24.52 (Leu- γ CH); 23.12, 21.09 (Leu- δ CH₃); 21.18, 21.06 (Azet- β CH₂); 14.19, 14.06 (OCH₂-CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₃H₃₇N₃O₈, [M+H⁺]: 484.2659; gef.: 484.2653.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(R,R)-Azi(OEt)₂ (112B)

Methode F; Ansatz: 1 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 207 mg, 42%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.23.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39.8$ (c 1.52, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 1740, 1709, 1646, 1503, 1429, 1368, 1252, 1166, 1028, 915, 644$ cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 5.15$ (bd, $J=9.0$ Hz, NH Leu, 1H); 4.67 (dd, $J=2.6$ Hz, 7.4 Hz, Pro- α CH, 1H); 4.49-4.38 (m, Leu- α CH, 1H); 4.18 (q, 4H, $J=7.2$ Hz, 2xOCH₂); 3.77-3.65 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.59-3.51 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 3.50 (s, 2xAzi CH, 2H); 2.30-1.84 (m, Pro- $\beta+\beta'+\text{Pro-}\gamma+\gamma'$ CH₂, 4H); 1.7 (sep., $J=6.8$ Hz, Leu- γ CH, 1H); 1.45-1.27 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 2xCH₃, 6H); 0.93 (d, $J=6.4$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.88 (d, $J=6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.12$ (N-C=O Pro); 171.93 (N-C=O Leu); 165.92 (EtO-C=O); 155.47 (C=O BOC); 79.28 (BOC q. C); 62.02 (OCH₂-CH₃); 60.00 (Pro- α CH); 50.04 (Leu- α CH); 46.57 (Pro- δ CH₂); 42.10 (Leu- β CH₂); 40.19 (Azi CH); 28.58 (Pro- β CH₂); 28.19 (BOC); 24.73 (Pro- γ CH₂); 24.52 (Leu- γ CH); 23.22 (Leu- δ CH₃); 21.62 (Leu- δ' CH₃); 13.88 (OCH₂-CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₄H₃₉N₃O₈, [M+H⁺]: 498.2815; gef.: 498.2808.

(2R,3R)-Diethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(R,R)-Azi(OEt)₂ (134B)

Methode F; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 76 mg, 60%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.22.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.3$ (c 1.17, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 1737, 1707, 1640, 1504, 1445, 1368, 1327, 1270, 1195, 1166, 1129, 1026, 857 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 5.35-5.13 (m, *NH* Leu, 1H); 4.72-4.42 (m, α -*CH* Leu, 1H); 4.33-4.02 (m, OCH_2CH_3 +2-*Nip* *CH*, 5H); 3.90-3.76 (m, 6-*Nip* CH_2 , 1H); 3.47-3.38 (m, *CH* Azi, 2H); 3.29-2.70 (m, 2'-*Nip*+6'-*Nip* CH_2 , 2H); 2.65-2.30 (m, 3-*Nip* *CH*, 1H); 2.31-1.95 (m, 4-*Nip* CH_2 , 1H); 1.87-1.57 (m, 4'-*Nip*+5-*Nip* CH_2 + γ -Leu *CH*, 3H); 1.52-1.19 (m, BOC+5'-*Nip*+ β -Leu CH_2 + OCH_2CH_3 , 18H); 0.99-0.78 (m, δ -Leu CH_3 , 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 179.80, 179.62 (N-C=O *Nip*); 171.44, 171.29 (N-C=O Leu); 166.66, 166.57 (EtO-C=O); 155.63, 155.55 (C=O BOC); 79.57, 79.51 (q. C BOC); 62.59, 62.43 (OCH_2CH_3); 48.85, 48.53 (α -Leu *CH*); 46.49, 45.87 (2- CH_2 *Nip*); 43.90, 43.64 (3-*CH* *Nip*); 43.59, 43.20 (6- CH_2 *Nip*); 42.85, 42.67 (Leu- β CH_2); 39.98, 39.88 (*CH* Azi); 28.29 (BOC); 26.76, 26.56 (4- CH_2 *Nip*); 25.26 (5- CH_2 *Nip*); 24.53 (Leu- γ *CH*); 23.28, 21.80 (Leu- δ' CH_3); 13.93 (OCH_2CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 512.2972; gef.: 512.2970.

(2*R*,3*R*)-Diethyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-isonipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(*S*)-Leu-(*R*+*S*)-Ini-(*R*,*R*)-Azi(OEt)₂ (105B)

Methode F, Ansatz: 0.5 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 167 mg, 65%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.15.

$[\alpha]_D^{20}$ = -14.6, (c 1.32, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3300, 1737, 1706, 1638, 1504, 1448, 1368, 1327, 1269, 1194, 1165, 1126, 1014 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 5.25 (s, *NH*-Leu, 1H); 4.64 (t, $J=7.2$ Hz, α -Leu *CH*, 1H); 4.46-4.36 (bd, $J=13.5$ Hz, 2-*Ini* CH_2 , 1H); 4.31-4.17 (m, OCH_2CH_3 , 4H); 3.96-3.89 (bd, $J=13.6$ Hz, 6-*Ini* CH_2 , 1H); 3.49 (s, 2x*CH* Azi, 2H); 3.14 (bdt, $J=10.9$ Hz, 2.2 Hz, 6'-*Ini* CH_2 , 1H); 2.90-2.78 (bdt, $J=11.1$ Hz, 2.8 Hz, 2'-*Ini* CH_2 , 1H); 2.54-2.40 (bm, 4-*Ini* *CH*, 1H); 2.02 (bd, $J=13.3$ Hz, 3-*Ini* CH_2 , 1H); 1.90 (bt, $J=13.6$ Hz, 5-*Ini*, 1H); 1.84-1.60 (m, 3'-*Ini*+ 5'-*Ini* CH_2 + γ -Leu *CH*, 3H); 1.53-1.35 (m, 3x CH_3 BOC+ β -Leu CH_2 , 11H); 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, OCH_2CH_3 , 6H); 1.01-0.86 (m, 2x CH_3 δ -Leu, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 181.60 (N-C=O *Ini*); 171.43 (N-C=O Leu); 166.47 (2xEtO-C=O); 155.68 (C=O BOC); 79.44 (q. C BOC); 62.61 (OCH_2CH_3); 48.53 (α -*CH*

Leu); 44.32 (2-CH₂ Ini); 43.31 (4-CH Ini); 42.90 (β-CH₂ Leu); 41.26 (6-CH₂ Ini); 39.97 (2xCH Azi); 28.73 (3-CH₂ Ini); 28.37 (3xCH₃ BOC); 27.61 (5-CH₂ Ini); 24.69 (γ-CH Leu); 23.39, 21.84 (Leu-δ CH₃); 14.06 (OCH₂CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₅H₄₁N₃O₈, [M+H⁺]: 512.2972; gef.: 512.2970.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R+S)-azetid-2-carbonyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Azet-(S,S)-Azi(OBn)₂ (131C)

Methode C, Ansatz: 0.25 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 52 mg, 34%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.26.

$[\alpha]_D^{20} = +36.5$, (c 1.06, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 1740, 1708, 1657, 1499, 1451, 1427, 1367, 1326, 1249, 1171, 1120, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.44-7.30 (m, arom., 10H); 5.26-5.14 (m, 2xOCH₂Ph, 4H); 4.98 (d, J=8.7 Hz, Leu-NH, 1H); 4.78 (dd, J=6.2, 8.8 Hz, Azet-α CH, 1H); 4.34-4.13 (m, Leu-α CH, Azet-γ CH₂, 3H); 3.56 (s, 2xAzi CH, 2H); 2.59-2.50 (m, Azet-β CH₂, 2H); 1.74-1.64 (m, Leu-γ CH, 1H); 1.49-1.39 (m, BOC+Leu-β CH₂, 11H); 0.92 (d, J=6.2 Hz, Leu-δ CH₃, 3H); 0.91 (d, J=6.4 Hz, Leu-δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): δ = 178.66 (N-C=O Azet); 173.75 (N-C=O Leu); 166.18 (BnO-C=O); 155.49 (C=O BOC); 134.69 (q. arom. C); 128.56, 128.50 (arom. CH); 79.63 (BOC q. C); 67.97 (OCH₂Ph); 61.73 (Azet-α CH); 49.02 (Aze-γ CH₂); 47.92 (Leu-α CH); 42.12 (Leu-β CH₂); 40.63 (Azi CH); 28.35 (BOC); 24.52 (Leu-γ CH); 23.08, 21.99 (Leu-δ CH₃); 21.03 (Azet-β CH₂) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₃H₄₁N₃O₈, [M+H⁺]: 608.2972; gef.: 608.2957.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (112C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 188 mg, 60%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.34.

$[\alpha]_D^{20} = -37.8$ (c 1.22, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3403, 2959, 1742, 1708, 1647, 1500, 1428, 1367, 1327, 1249, 1169, 1122, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.45\text{-}7.27$ (m, arom. CH, 10H); 5.25-5.15 (m, 2xOCH₂Ph, 4H); 5.13 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, Leu NH, 1H); 4.71 (dd, 1H, $J = 3.3$ Hz, 8.3 Hz, Pro- α CH, 1H); 4.54-4.43 (m, Leu- α CH, 1H); 3.81-3.69 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.63 (s, 2xAzi CH, 2H); 3.62-3.55 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 2.31-2.18 (m, Pro- β CH₂, 1H); 2.17-2.07 (m, Pro- γ CH₂, 1H); 2.06-1.91 (m, Pro- β' , Pro- γ' CH₂, 2H); 1.83-1.65 (m, Leu- γ CH, 1H); 1.52-1.36 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 0.97 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.91 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.19$ (N-C=O Pro); 172.08 (N-C=O Leu); 165.87 (BnO-C=O); 155.60 (C=O BOC); 134.80 (q. arom. C); 128.59, 128.49 (arom. CH); 79.42 (BOC q. C); 67.81 (OCH₂Ph); 60.23 (Pro- α CH); 50.18 (Leu- α CH); 46.67 (Pro- δ CH₂); 42.19 (Leu- β CH₂); 40.39 (2x Azi CH); 28.64 (Pro- β CH₂); 28.34 (BOC); 24.68 (Pro- γ CH₂); 24.51 (Leu- γ CH); 23.35, 21.73 (Leu- δ CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, [M+H⁺]; 622.3128; gef.: 622.3113.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-leucyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (212C)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 36 mg, 23%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.23.

$[\alpha]_D^{20} = -19.5$ (c 1.05, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3300, 2959, 1739, 1708, 1647, 1497, 1427, 1367, 1245, 1165, 1121, 1026 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.28\text{-}7.14$ (m, arom. CH, 10H); 5.12 (d, $J = 9.0$ Hz, Leu NH, 1H); 5.09-5.02 (m, 2xOCH₂Ph, 4H); 4.44 (dd, $J = 2.9, 7.7$ Hz, Pro- α CH, 1H); 4.35 (dt, $J = 4.0, 9.3$ Hz, Leu- α CH, 1H); 3.56-3.47 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.37 (s, 2xAzi CH, 2H); 3.34-3.24 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 2.08-1.97 (m, Pro- β CH₂, 1H); 1.96-1.86 (m, Pro- β' , Pro- γ CH₂, 2H); 1.80-1.70 (m, Pro- γ' CH₂, 1H); 1.61-1.48 (m, Leu- γ CH, 1H); 1.35-1.21 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 0.84 (d, $J = 6.5$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.77 (d, $J = 6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 177.53 (N-C=O Pro); 171.56 (N-C=O Leu); 165.59 (BnO-C=O); 155.40 (C=O BOC); 134.66 (q. arom. C); 128.78, 128.75, 128.63 (arom. CH); 79.36 (BOC q. C); 68.02 (OCH_2Ph); 60.62 (Pro- α CH); 50.35 (Leu- α CH); 46.61 (Pro- δ CH_2); 42.89 (Leu- β CH_2); 39.60 (Azi CH); 28.80 (Pro- β CH_2); 28.31 (BOC); 24.60 (Pro- γ CH_2); 24.52 (Leu- γ CH); 23.43 (Leu- δ CH_3); 21.96 (Leu- δ' CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 622.3128; gef.: 622.3141.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (312C)

Methode C; Ansatz: 1 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 301 mg, 53%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.10.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -18.3 (c 1.05, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3401, 2978, 1739, 1713, 1649, 1451, 1368, 1281, 1248, 1164, 699 cm^{-1} .

^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.42-7.27 (m, arom. CH, 10H); 5.30-5.25 (bs, Gly NH, 1H); 5.21-5.17 (m, 2x OCH_2Ph , 4H); 4.49 (dd, $J=3.3, 8.5$ Hz, Pro- α CH, 1H); 4.04-3.85 (m, Gly CH_2 , 2H); 3.57-3.54 (m, Pro- δ CH_2 , 1H); 3.53 (s, 2x CH Azi, 2H); 3.47-3.44 (m, Pro- δ' CH_2 , 1H); 2.22-2.17 (m, Pro- β CH_2 , 1H); 2.06-1.97 (m, Pro- β' +Pro- γ CH_2 , 3H); 1.48-1.37 (s, BOC, 9H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 177.79 (N-C=O Pro); 167.48 (N-C=O Gly); 165.54 (BnO-C=O); 155.93 (C=O BOC); 134.57 (q. arom. C); 128.69 128.64, (arom. CH); 79.64 (BOC q. C); 68.06 (OCH_2Ph); 59.00 (Pro- α CH); 45.87 (Pro- δ CH_2); 42.94 (CH_2 Gly); 39.51 (Azi CH); 28.96 (Pro- β CH_2); 28.28 (BOC); 24.56 (Pro- γ CH_2) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 566.2502; gef.: 566.2491.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (122C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 95 mg, 31%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.29.

$[\alpha]_D^{20} = +7.3$ (c 1.13, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3396, 2959, 1742, 1707, 1646, 1500, 1429, 1367, 1326, 1249, 1167, 1126, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.39\text{-}7.31$ (m, arom. CH, 10H); 5.24-5.13 (m, 2xOCH₂Ph+Leu NH, 5H); 4.62 (dd, $J=2.5, 8.0$ Hz, Pro- α CH, 1H); 4.57-4.45 (m, Leu- α CH, 1H); 3.90-3.76 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.64 (s, 2xAzi CH, 2H); 3.61-3.55 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 2.30-2.20 (m, Pro- β CH₂, 1H); 2.19-2.05 (m, Pro- γ CH₂, 1H); 2.04-1.92 (m, Pro- β' , Pro- γ' CH₂, 2H); 1.77-1.66 (m, Leu- γ CH, 1H); 1.52-1.35 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 0.99 (d, $J=6.3$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.93 (d, $J=6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 178.53$ (N-C=O Pro); 171.66 (N-C=O Leu); 165.69 (BnO-C=O); 155.50 (C=O BOC); 134.66 (q, arom. C); 128.63, 128.63 (arom. CH); 79.36 (BOC q. C); 67.89 (OCH₂Ph); 60.70 (Pro- α CH); 50.37 (Leu- α CH); 46.62 (Pro- δ CH₂); 42.56 (Leu- β CH₂); 40.15 (Azi CH); 29.43 (Pro- β CH₂); 28.35 (BOC); 24.75 (Pro- γ CH₂); 24.49 (Leu- γ CH); 23.49, 22.06 (Leu- δ CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₈, [M+H⁺]: 622.3128; gef.: 622.3138.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-leucyl-(R)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Leu-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (222C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 73 mg, 24%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.21.

$[\alpha]_D^{20} = +40.0$ (c 1.15, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3385, 2958, 1743, 1708, 1645, 1500, 1428, 1367, 1333, 1269, 1250, 1166, 1122, 1024, 699 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.40\text{-}7.33$ (m, arom. CH, 10H); 5.25-5.16 (m, 2xOCH₂Ph, 4H); 5.13 (d, $J=9.2$ Hz, Leu NH, 1H); 4.71 (dd, $J=2.8, 7.7$ Hz, Pro- α CH, 1H); 4.47 (dt, $J=6.0, 8.8$ Hz, Leu- α CH, 1H); 3.77-3.70 (m, Pro- δ CH₂, 1H); 3.63 (s, 2xAzi CH, 2H); 3.61-3.55 (m, Pro- δ' CH₂, 1H); 2.31-2.21 (m, Pro- β CH₂, 1H); 2.18-2.07 (m, Pro- γ CH₂, 1H); 2.06-1.93 (m, Pro- β' , Pro- γ' CH₂, 2H); 1.73 (h, $J=6.7$ Hz, Leu- γ CH, 1H); 1.50-1.37 (m, BOC+Leu- β CH₂, 11H); 0.97 (d, $J=6.5$ Hz, Leu- δ CH₃, 3H); 0.92 (d, $J=6.7$ Hz, Leu- δ' CH₃, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 179.21 (N-C=O Pro); 172.14 (N-C=O Leu); 165.90 (BnO-C=O); 155.63 (C=O BOC); 134.81 (q. arom. C); 128.62, 128.52 (arom. CH); 79.47 (BOC q. C); 67.85 (OCH_2Ph); 60.26 (Pro- α CH); 50.21 (Leu- α CH); 46.69 (Pro- δ CH_2); 42.19 (Leu- β CH_2); 40.41 (Azi CH); 28.67 (Pro- β CH_2); 28.36 (BOC); 24.71 (Pro- γ CH_2); 24.54 (Leu- γ CH); 23.37, 21.74 (Leu- δ CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 622.3128; gef.: 622.3133.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(R)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Gly-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OBn)₂ (322C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 102 mg, 36%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.14.

$[\alpha]_D^{20} = +29.6$ (c 1.13, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3418, 2977, 1739, 1708, 1654, 1499, 1432, 1326, 1271, 1248, 1167, 1024, 698 cm^{-1} .

^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.43-7.28 (m, arom. CH, 10H); 5.49; 5.32 (bs, Gly NH, 1H); 5.25-5.12 (m, 2x OCH_2Ph , 4H); 4.59 (dd, $J=3.2, 8.6$ Hz, Pro- α CH, 1H); 4.06-3.74 (m, Gly CH_2 , 2H); 3.64 (s, 2x CH Azi, 2H); 3.59-3.50 (m, Pro- δ CH_2 , 1H); 3.47-3.35 (m, Pro- δ' CH_2 , 1H); 2.31-2.17 (m, Pro- β CH_2 , 1H); 2.19-2.05 (m, Pro- γ CH_2 , 1H); 2.09-1.91 (m, Pro- β' +Pro- γ' CH_2 , 3H); 1.50-1.34 (s, BOC, 9H) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 178.66 (N-C=O Pro); 167.46 (N-C=O Gly); 165.80 (BnO-C=O); 155.66 (C=O BOC); 134.66 (q. arom. C); 128.77, 128.61 (arom. CH); 79.56 (BOC q. C); 67.95 (OCH_2Ph); 60.57 (Pro- α CH); 45.89 (Pro- δ CH_2); 42.9 (CH_2 Gly); 40.09 (Azi CH); 29.07 (Pro- β CH_2); 28.30 (BOC); 24.49 (Pro- γ CH_2) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 566.2502; gef.: 566.2510.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(?)-pipercolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Gly-(?)-Pip-(S,S)-Azi(OBn)₂ (3?3C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 100 mg, 34%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.28.

$[\alpha]_D^{20} = +31.1$ (c 1.31, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3422, 2941, 1735, 1710, 1651, 1497, 1451, 1436, 1367, 1325, 1244, 1166, 1014, 738, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.38\text{-}7.27$ (m, arom. CH, 10H); 5.44 (bd, Gly-NH, 1H); 5.28 (bs, 2xCH₂OBn, 4H); 5.27 (bd, $J=5.1$ Hz, Pip- α CH, 1H); 3.61 (bd, $J=12.8$ Hz, Pip- ϵ CH₂, 1H); 3.42 (s, 2x Azi-CH, 2H); 3.27 (bdt, $J=2.5, 13.5, 13.6$ Hz, Pip- ϵ' CH₂, 1H); 2.32 (bd, $J=13.3$ Hz, Pip- β CH₂, 1H); 4.13-3.88 (m, Gly CH₂, 2H); 1.76-1.66 (m, Pip- δ +Pip- β' CH₂, 2H); 1.50-1.40 (br. m, Pip- δ' +Pip- γ CH₂ + BOC, 12H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz), Rotamere 2/1: $\delta = 178.23$ (N-C=O Pip); 167.75 (N-C=O Gly); 166.06 (BnO-C=O); 134.63 (C=O BOC); 128.69, 128.65, 128.71 (arom. CH); 79.67 (BOC q. C); 68.14 (2xCH₂OBn); 54.33, 52.43 (Pip- α CH); 42.99 (Gly-CH₂); 42.33, 42.25 (Pip- ϵ CH₂); 40.03 (Azi-2xCH); 28.40, 27.79 (BOC); 26.55, 25.85 (Pip- β CH₂); 25.25, 24.99 (Pip- δ CH₂); 20.81, 20.62 (Pip- γ CH₂) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₇N₃O₈, [M+H⁺]: 580.2659; gef.: 580.2670.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn)₂ (134C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 140 mg, 44%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.28.

$[\alpha]_D^{20} = +21.6$ (c 1.16, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3398, 2955, 1737, 1705, 1640, 1499, 1446, 1367, 1325, 1265, 1246, 1173, 1126, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.49\text{-}7.29$ (m, arom. CH, 10H); 5.37-5.08 (m, OCH₂Ph+NH Leu, 5H); 4.76-4.50 (m, α -Leu CH, 1H); 4.23-4.04 (m, 2-Nip CH₂, 1H); 3.94-3.74 (m, 6-Nip CH₂, 1H); 3.65-3.43 (m, CH Azi, 2H); 3.34-3.08 (m, 2'-Nip CH₂, 1H); 3.07-2.92 (m, 6'-Nip CH₂, 1H); 2.66-2.45 (m, 3-Nip CH, 1H); 2.41-2.04 (m, 4-Nip CH₂, 1H); 1.82-1.52 (m, 4'-Nip+5-Nip CH₂+ γ -Leu CH, 3H); 1.51-1.19 (m, BOC+5'-Nip CH₂+ β -Leu CH₂, 12H); 1.08-0.83 (m, 2x δ -Leu CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.78, 179.60$ (N-C=O Nip); 171.42, 171.27 (N-C=O Leu); 166.15, 166.10 (BnO-C=O); 155.61, 155.53 (C=O BOC); 134.51 (q. arom.

C); 128.78, 128.69, 128.58 (arom. CH); 79.44, 79.39 (q. C BOC); 68.31, 68.14 (OCH₂Ph); 48.74, 48.58 (α -Leu CH); 46.79, 45.91 (2- CH₂ Nip); 45.54, 45.22 (6- CH₂ Nip); 43.67, 43.33 (3-CH Nip); 42.82, 42.45 (Leu- β CH₂); 40.05, 39.97 (Azi CH); 28.33, 28.28 (BOC); 26.67, 26.43 (4- CH₂ Nip); 24.69, 24.62 (5- CH₂ Nip); 23.44, 23.34 (Leu- δ CH₃); 21.89, 21.69 (Leu- δ' CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₅H₄₅N₃O₈, [M+H⁺]: 636.3285; gef.: 636.3296.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OBn)₂ (234C)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 136 mg, 43%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.28.

$[\alpha]_D^{20} = -1.8$ (c 1.08, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3409, 2955, 1738, 1705, 1640, 1499, 1446, 1367, 1325, 1246, 1173, 1126, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.50\text{-}7.30$ (m, arom. CH, 10H); 5.39-5.09 (m, OCH₂Ph+NH Leu, 5H); 4.78-4.51 (m, α -CH Leu, 1H); 4.24-4.05 (m, 2-Nip CH₂, 1H); 3.96-3.75 (m, 6-Nip CH₂, 1H); 3.67-3.45 (m, CH Azi, 2H); 3.35-3.10 (m, 2'-Nip CH₂, 1H); 3.08-2.94 (m, 6'-Nip CH₂, 1H); 2.68; 2.46 (m, 3-Nip CH, 1H); 2.43-2.06 (m, 4-Nip CH₂, 1H); 1.84-1.54 (m, 4'-Nip+5-Nip CH₂+ γ -Leu CH, 3H); 1.53-1.21 (m, BOC+5'-Nip+ β -Leu CH₂, 12H); 1.10-0.84 (m, δ -Leu CH₃, 6H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.80, 179.62$ (N-C=O Nip); 171.44, 171.29 (N-C=O Leu); 166.17, 166.12 (BnO-C=O); 155.63, 155.55 (C=O BOC); 134.53 (q. arom. C); 128.80, 128.71, 128.60 (arom. CH); 79.45, 79.40 (q. C BOC); 68.32, 68.15 (OCH₂Ph); 48.74, 48.58 (α -Leu CH); 46.80, 45.93 (2-CH₂ Nip); 45.56, 45.24 (6-CH₂ Nip); 43.69, 43.35 (3-CH Nip); 42.83, 42.47 (Leu- β CH₂); 40.06, 39.99 (Azi CH); 28.34, 28.29 (BOC); 26.69, 26.44 (4-CH₂ Nip); 24.70, 24.63 (5-CH₂ Nip); 24.51 (Leu- γ CH); 23.45, 23.35 (Leu- δ CH₃); 21.91, 21.70 (Leu- δ' CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₅H₄₅N₃O₈, [M+H⁺]: 636.3285; gef.: 636.3295.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-glycyl-(*R*+*S*)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-Gly-(*R*+*S*)-Nip-(*S,S*)-Azi(OBn)₂ (334C)

Methode C; Ansatz: 1 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 361 mg, 62%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.15.

$[\alpha]_D^{20} = +12.5$ (c 1.19, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3417, 2975, 1710, 1650, 1497, 1459, 1442, 1366, 1250, 1166, 1049, 1028, 699 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.44\text{-}7.26$ (m, arom. CH, 10H); 5.24-5.15 (m, 2xOCH₂Ph, 4H); 5.12 (bd, *J*=6.1 Hz, 1H, NH Gly); 4.56-4.46 (m, a2-Nip CH₂, 0.5H) and 3.09-2.97 (m, a2'-Nip CH₂, 0.5H); 4.04-3.85 (m, a6-Nip CH₂+Gly CH₂, 2.5H) and 3.23-3.10 (m, a6'-Nip CH₂, 0.5H); 3.71-3.61 (m, b2-Nip CH₂, 0.5H) and 3.45-3.33 (m, b2'-Nip CH₂, 0.5H); 3.60 (s, 2xAzi CH, 2H); 3.58-3.51 (m, b6-Nip CH₂, 0.5H) and 3.09-2.97 (m, b6'-Nip CH₂, 0.5H); 2.61-2.44 (m, 3-Nip CH, 1H); 2.14-2.04 (m, 4-Nip CH₂, 1H); 1.88-1.61 (m, 4'-Nip+5-Nip CH₂, 2 H); 1.54-1.38 (m, BOC+5'-Nip CH₂, 10H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 179.80, 179.64$ (N-C=O Nip); 171.40, 171.33 (N-C=O Gly); 165.87, 165.81 (BnO-C=O); 155.48, 155.42 (C=O BOC); 134.79 (q. arom. C); 128.59, 128.49, 128.47 (arom. CH); 79.33, 79.29 (q. C BOC); 67.81, 67.70 (OCH₂Ph); 46.75, 45.95 (2-CH₂ Nip); 45.43, 45.26 (6-CH₂ Nip); 43.65, 43.35 (3-CH Nip); 42.27, 42.02 (Gly- CH₂); 40.71, 40.39 (2x Azi CH); 28.35, 28.30 (BOC); 26.61, 26.42 (4-CH₂ Nip); 24.66, 24.61 (5-CH₂ Nip) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₁H₃₇N₃O₈, [M+H⁺]: 580.2659; gef.: 580.2669.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-{1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl]-(S)-aziridin-2-carbonyl}aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn)₂ (116C)

Methode C; Ansatz: 1 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 123 mg, 23%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.50.

$[\alpha]_D^{20} = +31.1$ (c 1.06, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3352, 2959, 1742, 1695, 1500, 1454, 1367, 1250, 1167, 1105, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.44-7.25 (m, arom. CH, 10H); 5.24-5.14 (m, $2\times\text{OCH}_2\text{Ph}$, 4H); 4.96 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, Leu NH); 4.25 (dt, $J=4.6, 8.7$ Hz, Leu- α CH, 1H); 3.61 (s, $2\times\text{Azi}$ CH, 2H); 3.40 (dd, $J=2.9, 5.4$ Hz, 2-CH Azy, 1H); 2.58 (d, $J=5.7$ Hz, 3- CH_2 Azy, 1H); 2.55 (d, $J=1.5$ Hz, 3'- CH_2 Azy, 1H); 1.82-1.62 (m, β - CH_2 Leu+ γ -Leu CH, 2H); 1.58-1.45 (m, β' - CH_2 Leu, 1H); 1.40 (bs, BOC, 9H); 0.89 (d, $J=4.3$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.87 (d, $J=4.2$ Hz, Leu- δ' CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 184.26 (N-C=O Leu); 181.31 (N-C=O Azy); 165.86 (BnO-C=O); 155.55 (C=O BOC); 134.78 (q. arom. C); 128.62, 128.54, 128.49 (arom. CH); 79.87 (BOC q.C); 67.80 (OCH_2Ph); 53.96 (Leu- α CH); 41.88 (Leu- β CH_2); 41.38 ($2\times$ Azi CH); 34.36 (2-CH Azy); 30.46 (3- CH_2 Azy); 28.29 (BOC); 24.75 (Leu- γ CH); 22.83, 21.84 (Leu- δ CH_3) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 593.2737; gef.: 593.2734.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-{1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-leucyl]-(S)-aziridin-2-carbonyl}aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Leu-(S)-Azy-(S,S)-Azi(OBn) $_2$ (216C)

Methode C; Ansatz: 1 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 318 mg, 59%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.48.

$[\alpha]_D^{20}$ = +64.4 (c 1.26, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3350, 2959, 1742, 1699, 1500, 1454, 1367, 1250, 1166, 1020, 698 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.45-7.27 (m, arom. CH, 10H); 5.25-5.12 (m, OCH_2Ph , 4H); 4.96 (d, $J=8.2$ Hz, Leu NH, 1H); 4.25 (dt, $J=4.7, 8.6$ Hz, Leu- α CH, 1H); 3.63 (s, $2\times\text{Azi}$ CH, 2H); 3.40 (dd, $J=2.9, 5.5$ Hz, 2-CH Azy, 1H); 2.59 (dd, $J=5.8, 1.5$ Hz, 3- CH_2 Azy, 1H); 2.55 (d, $J=1.5$ Hz, 3'- CH_2 Azy, 1H); 1.78-1.64 (m, β -Leu CH_2 + γ -Leu CH, 2H); 1.58-1.46 (m, β' -Leu, 1H); 1.40 (bs, BOC, 9H); 0.89 (d, $J=4.2$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.88 (d, $J=4.1$ Hz, Leu- δ' CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 183.81 (N-C=O Leu); 180.22 (N-C=O Azy); 165.86 (BnO-C=O); 155.10 (C=O BOC); 134.78 (q. arom. C); 128.16, 128.08, 128.03 (arom. CH); 79.41 (q. C BOC); 67.80 (OCH_2Ph); 53.50 (α -CH Leu); 41.43 (β - CH_2 Leu); 40.38 ($2\times$ Azi CH); 33.90 (2-CH Azy); 30.00 (3- CH_2 Azy); 27.83 (BOC); 24.29 (γ Leu CH); 22.37, 21.38 (δ - CH_3 Leu) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 593.2737; gef.: 593.2731.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(S)-alanyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OBn)₂ (417C)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 65 mg, 41%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.22.

$[\alpha]_D^{20} = +27.4$ (c 1.96, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3485, 2924, 1741, 1656, 1593, 1499, 1450, 1426, 1366, 1325, 1248, 1170, 1119, 1021, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.45\text{-}7.15$ (m, 15H, arom. CH); 6.63 (bs, 1H, NH-Ala); 5.25-5.15 (m, 2x OCH₂Ph, 4H); 5.11-5.05 (bs, 1H, NH-Phe); 4.43 (p, *J*=7.0 Hz, 1H, α -Phe CH); 4.40-4.31 (bs, 1H, α -Ala CH); 3.69 (s, 2H, 2x Azi CH); 3.09-2.98 (m, 2H, β -Phe CH₂); 1.40 (bs, 9H, BOC); 1.37 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, β -Ala CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.62 MHz): $\delta = 180.15$ (N-C=O Ala); 171.11 (N-C=O Phe); 165.92 (BnO-C=O); 155.46 (O-C=O BOC); 136.66 (q. arom C, Phe); 134.85 (q. arom. C); 129.43, 128.69, 128.65, 128.44, 126.89 (arom. CH); 80.15 (q. C BOC); 67.85 (OCH₂Ph); 55.60 (α -CH Ala); 48.21 (α -CH Phe); 40.07 (2x Azi CH); 38.43 (β -CH₂ Phe); 28.26 (CH₃ BOC); 18.26 (β -CH₃ Ala) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₃₅H₃₉N₃O₈, [M+H⁺]: 630.2815; gef.: 630.2809.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-phenylalanyl-(S)-alanyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OBn)₂ (517C)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 25 mg, 16%.

DC: SiO₂ 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.35.

$[\alpha]_D^{20} = -52.1$ (c 1.91, CHCl₃).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3486, 2934, 1739, 1659, 1594, 1451, 1426, 1368, 1322, 1248, 1169, 1120, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): $\delta = 7.46\text{-}7.16$ (m, 15H, arom. CH); 6.41 (bd, *J*=7.4 Hz, 1H, NH-Ala); 5.26-5.16 (m, 2x OCH₂Ph, 4H); 5.11 (bs, 1H, NH-Phe); 4.63-4.50 (m, 1H, α -Phe CH); 4.47-4.35 (bs, 1H, α -Ala CH); 3.64 (s, 2H, 2x Azi CH); 3.05 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, β -Phe CH₂); 1.40 (bs, 9H, BOC); 1.26 (d, 1H, *J*=6.9 Hz, β -Ala) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 180.02 (N-C=O Phe); 172.33 (N-C=O Phe); 165.88 (BnO-C=O); 155.31 (C=O BOC); 136.63 (q. arom C, Phe); 134.82 (q. arom. C); 129.27, 128.57, 128.37, 128.04, 126.86 (arom. CH); 80.11 (q. C BOC); 67.80 (OCH_2Ph); 55.65 (α -CH Ala); 47.95 (α -CH Phe); 40.41 (2x Azi CH); 38.71 (β - CH_2 Phe); 28.20 (BOC); 18.02 (β - CH_3 Ala) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 630.2815; gef.: 630.2822.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(R)-alanyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn)₂ (427C)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 19 mg, 12%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.24.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +31.5 (c 2.54, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3496, 2928, 1740, 1658, 1596, 1498, 1451, 1426, 1367, 1326, 1248, 1170, 1120, 1021, 699 cm^{-1} .

^1H -NMR (CDCl_3 , 400.13 MHz): δ = 7.53-7.22 (m, 15H, arom. CH); 6.46 (bd, $J=7.3$ Hz, 1H, NH-Ala); 5.33-5.21 (m, 2x OCH_2Ph , 4H); 5.17 (bs, 1H, NH-Phe); 4.70-4.55 (m, 1H, α -CH Phe); 4.40 (bs, 1H, α -CH Ala); 3.69 (s, 2x Azi CH, 2H); 3.10 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, β - CH_2 Phe); 1.45 (bs, 9H, BOC); 1.31 (d, 1H, $J=6.9$ Hz, β - CH_3 Ala) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 180.18 (N-C=O Phe); 172.49 (N-C=O Phe); 166.05 (BnO-C=O); 155.47 (C=O BOC); 136.79 (q. arom C, Phe); 134.98 (q. arom. C); 129.43, 128.73, 128.53, 128.20, 127.02 (arom. CH); 80.27 (q. C BOC); 67.98 (OCH_2Ph); 55.83 (α -CH Ala); 48.13 (α -CH Phe); 40.59 (2x Azi CH); 38.89 (β - CH_2 Phe); 28.38 (BOC); 18.20 (β - CH_3 Ala) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 630.2815; gef.: 630.2813.

(2S,3S)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-phenylalanyl-(R)-alanyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(R)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OBn)₂ (527C)

Methode C; Ansatz: 0.25 mmol; gelbliche viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 46 mg, 29%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, R_f = 0.27.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.3$ (c 2.03, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3495, 2918, 1739, 1651, 1596, 1499, 1449, 1425, 1365, 1324, 1246, 1168, 1119, 1022, 699 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 7.42\text{-}7.12$ (m, 15H, arom. H); 6.62 (bs, 1H, *NH*-Ala); 5.22-5.13 (m, 4H, 2x OCH_2Ph); 5.08-5.03 (bs, 1H, *NH*-Phe); 4.41 (p, $J=7.0$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Phe); 4.37-4.29 (bs, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Ala); 3.67 (s, 2H, 2x Azi *CH*); 3.06-2.96 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Phe); 1.37 (bs, 9H, BOC); 1.35 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, $\beta\text{-CH}_2$ Ala) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 180.10$ (N-C=O Ala); 171.05 (N-C=O Phe); 165.87 (BnO-C=O); 155.40 (C=O BOC); 136.61 (q. arom. C, Phe); 134.79 (q. arom. C); 129.37, 128.63, 128.59, 128.39, 126.83 (arom. CH); 80.10 (q. C BOC); 67.80 (OCH_2Ph); 55.18 ($\alpha\text{-CH}$ Ala); 47.79 ($\alpha\text{-CH}$ Phe); 39.65 (2x Azi *CH*); 38.01 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe); 27.84 (CH_3 BOC); 17.84 ($\beta\text{-CH}_3$ Ala) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, $[\text{M}+\text{H}^+]$: 630.2815; gef.: 630.2807.

(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*S*)-prolyl]aziridin-2,3-dicarboxylat, BOC-(*S*)-Leu-(*S*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂ (112D)

Methode C; Ansatz: 0.5 mmol; farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 152 mg, 49%.

DC: SiO_2 60, Cyclohexan:EtOAc 2:1, $R_f = 0.32$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26.0$ (c 1.19, CHCl_3).

IR (neat): $\tilde{\nu} = 3355, 2959, 1746, 1699, 1500, 1456, 1367, 1250, 1167, 1104, 1022, 698 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400.13 MHz): $\delta = 7.42\text{-}7.34$ (m, arom. *CH*, 10H); 5.27-5.17 (m, 2x OCH_2Ph , 4H); 5.14 (d, $J=9.3$ Hz, Leu *NH*, 1H); 4.72 (dd, $J=2.9, 7.7$ Hz, Pro- α *CH*, 1H); 4.48 (dt, $J=5.9, 8.8$ Hz, Leu- α *CH*, 1H); 3.78-3.71 (m, Pro- δ CH_2 , 1H); 3.64 (s, 2x Azi *CH*, 2H); 3.62-3.56 (m, Pro- δ' CH_2 , 1H); 2.33-2.22 (m, Pro- β CH_2 , 1H); 2.20-2.08 (m, Pro- γ CH_2 , 1H); 2.08-1.94 (m, Pro- β' , Pro- γ' CH_2 , 2H); 1.74 (sep, $J=6.7$ Hz, Leu- γ *CH*, 1H); 1.52-1.38 (m, BOC+Leu- β CH_2 , 11H); 0.98 (d, $J=6.6$ Hz, Leu- δ CH_3 , 3H); 0.93 (d, $J=6.8$ Hz, Leu- δ' CH_3 , 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 179.22$ (N-C=O Pro); 172.15 (N-C=O Leu); 165.91 (BnO-C=O); 155.64 (C=O BOC); 134.82 (q. arom. C); 128.63, 128.53 (arom. CH); 79.48

(BOC q. C); 67.86 (OCH₂Ph); 60.27 (Pro- α CH); 50.22 (Leu- α CH); 46.70 (Pro- δ CH₂); 42.20 (Leu- β CH₂); 40.42 (Azi CH); 28.68 (Pro- β CH₂); 28.37 (CH₃ BOC); 24.72 (Pro- γ CH₂); 24.55 (Leu- γ CH); 23.38 (Leu- δ CH₃); 21.75 (Leu- δ' CH₃) ppm.

HR-ESI-MS: ber. f. C₂₄H₃₉N₃O₈, [M+H⁺]: 622.3128; gef.: 622.3209.

(2R,3R+2S,3S)-N-{[3-Ethoxycarbonylaziridin-2-yl]carbonyl}-(S)-leucyl-(S)-prolinbenzylester, (S,S+R,R)-EtO-Azi-(S)-Leu-(S)-ProOBn (A112*)

130.6 mg, (741.2 μ M) Diethylfumarat (4x ¹³C) und 168,9 mg (770 μ M) DPSI wurden in 10 ml Benzol 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch auf SiO₂ unter Elution mit Cyclohexan:Ethylacetat-Gemisch 2:1 gereinigt. Ausbeute: 38.3 mg (200.3 μ M) (*R,R+S,S*)-Diethylaziridindicarboxylat. Nach partieller Hydrolyse mit (0.98 Eq.) 11.4 mg KOH in 10 ml EtOH bei 0°C (5 Stunden) und entfernen des Lösemittels im Vakuum, wurde das Kalium-Salz des Halbesters nach Methode B weiter umgesetzt. Nach Säulenchromatographie auf SiO₂ mit Diethylether:Petrolether 40-60 (2:1) wurden 10.0 mg, 10% von *R,R,S,S*-Diastereomer und 10.0 mg, 10% von *S,S,S,S*-Diastereomer isoliert.

¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ = 7.39-7.29 (m, 5H, arom. CH); 6.95-6.86 (bs, NH-Leu); 5.23-5.05 (m, 2H, OCH₂Ph); 4.81-4.71 (m, 1H, α -Leu CH); 4.63-4.52 (m, 1H, α -Pro CH); 4.31-4.18 (m, 2H, OCH₂CH₃); 3.84-3.71 (m, 1H, δ -Pro CH₂); 3.67-3.53 (m, 1H, δ -Pro CH₂); 2.85-2.77 (bd, *J*=11.7 Hz, 1H, Azi CH); 2.64-2.53 (bd, *J*=11.7 Hz, 1H, Azi CH); 2.28-2.14 (m, 1H, β -Pro CH₂); 2.03-1.91 (m, 2H, β -Pro+ γ -Pro CH₂); 1.81-1.45 (m, 5H, NH Azi+ γ -Leu CH+ β -Leu+ γ -Pro CH₂); 1.37-1.19 (m, 3H, OCH₂CH₃); 1.02-0.84 (m, 6H, δ -Leu CH₃) ppm.

Die übrigen Daten entsprechen der Literatur.^[50]

10.1.12 Tripeptide mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure

Allgemeine Methode

10 μ mol des entsprechenden Dibenzylesters wurden in 15 ml Ethylacetat gelöst und mit 20 mg Pd-C versetzt. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült, evakuiert und mit H₂ bei Raumdruck begast. Das Gemisch wurde kräftig gerührt und der Fortschritt der Hydrogenolyse dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. 30 min wurde das Pd-

C durch Filtration über Celite[®] entfernt. Nach Abziehen des Lösemittels wurden die Disäuren für die Testung in DMSO aufgenommen.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(S)-Leu-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH)₂ (112G)

Weißes Pulver, 4.3 mg, 97%.

ESI-MS: C₂₀H₃₁N₃O₈ [M+OH⁻]: 458.1.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH)₂ (134G)

Weißes Pulver, 4.4 mg, 98%.

ESI-MS: C₂₁H₃₃N₃O₈ [M-H⁺]: 454.1.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(R)-leucyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(R)-Leu-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH)₂ (234G)

Weißes Pulver, 4.2 mg, 93%.

ESI-MS: C₂₁H₃₃N₃O₈ [M-H⁺]: 454.4.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-isonipecotyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(S)-Leu-(R+S)-Ini-(S,S)-Azi(OH)₂ (105G)

Weißes Pulver, 4,1 mg, 90%.

ESI-MS: C₂₁H₃₃N₃O₈ [M-H⁺]: 454.3.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(S)-prolyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-Gly-(S)-Pro-(S,S)-Azi(OH)₂ (312G)

Weißes Pulver, 3.6 mg, 94%.

ESI-MS: C₁₆H₂₃N₃O₈ [M-H⁺]: 384.1.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(R)-prolyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-Gly-(R)-Pro-(S,S)-Azi(OH)₂ (322G)

Weißes Pulver, 3.5 mg, 92%.

ESI-MS: C₁₆H₂₃N₃O₈ [M-H⁺]: 384.3.

(2S,3S)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-glycyl-(R+S)-nipecotyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-Gly-(R+S)-Nip-(S,S)-Azi(OH)₂ (334G)

Weißes Pulver, 3.6 mg, 90%.

ESI-MS: C₁₇H₂₅N₃O₈ [M-H⁺]: 398.1.

(2S,3S)-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(S)-alanyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(S)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂ (417G)

Weißes Pulver, 4.3 mg, 96%.

ESI-MS: C₂₁H₂₇N₃O₈ [M-H⁺]: 448.1.

(2S,3S)-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(R)-phenylalanyl-(S)-alanyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(R)-Phe-(S)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂ (517G)

Weißes Pulver, 4.4 mg, 98%.

ESI-MS: C₂₁H₂₇N₃O₈ [M-H⁺]: 448.2.

(2S,3S)-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(S)-phenylalanyl-(R)-alanyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(S)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂ (427G)

Weißes Pulver, 4.2 mg, 94%.

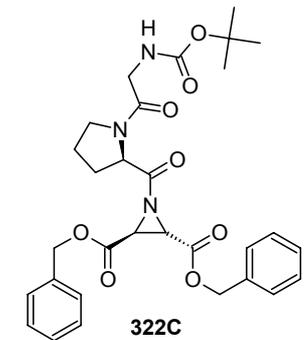
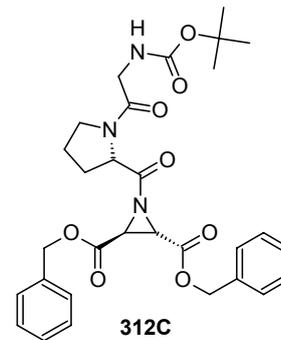
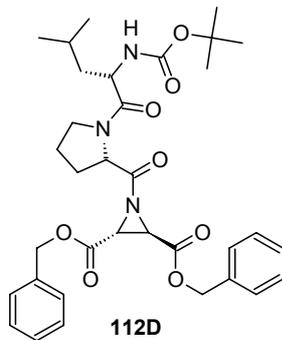
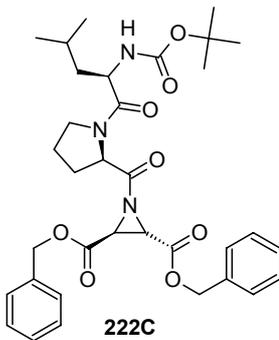
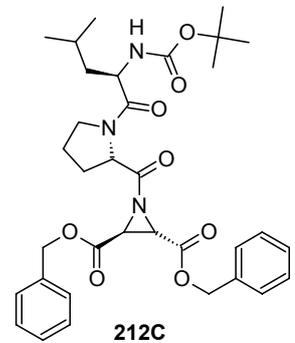
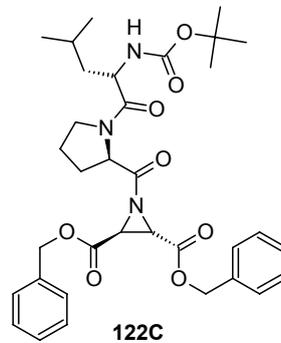
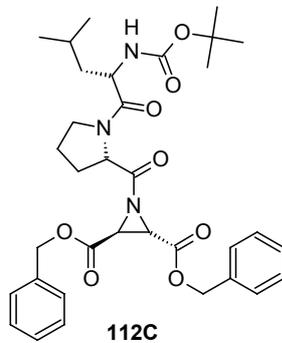
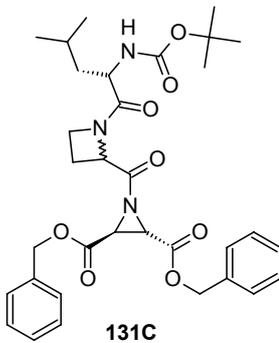
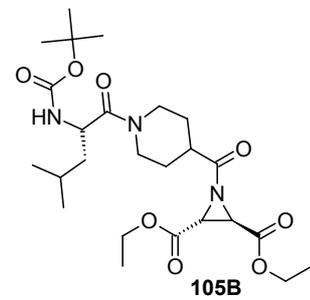
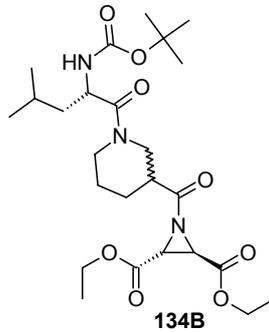
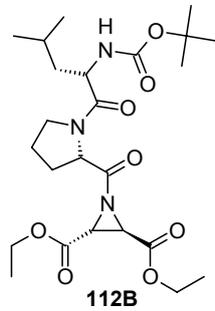
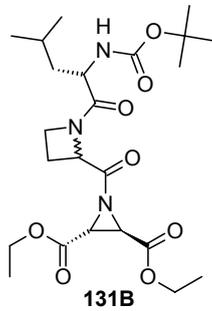
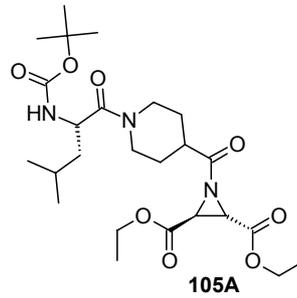
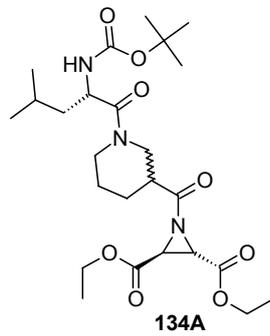
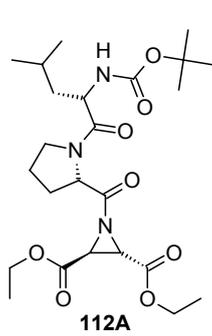
ESI-MS: C₂₁H₂₇N₃O₈ [M-H⁺]: 448.2.

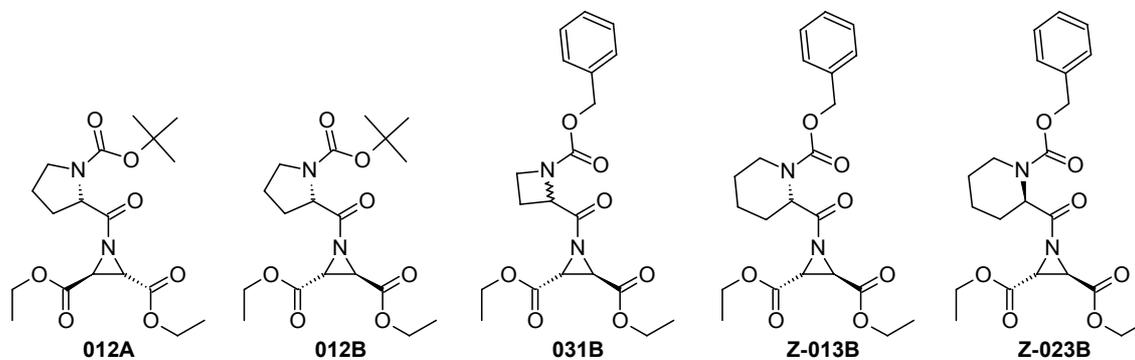
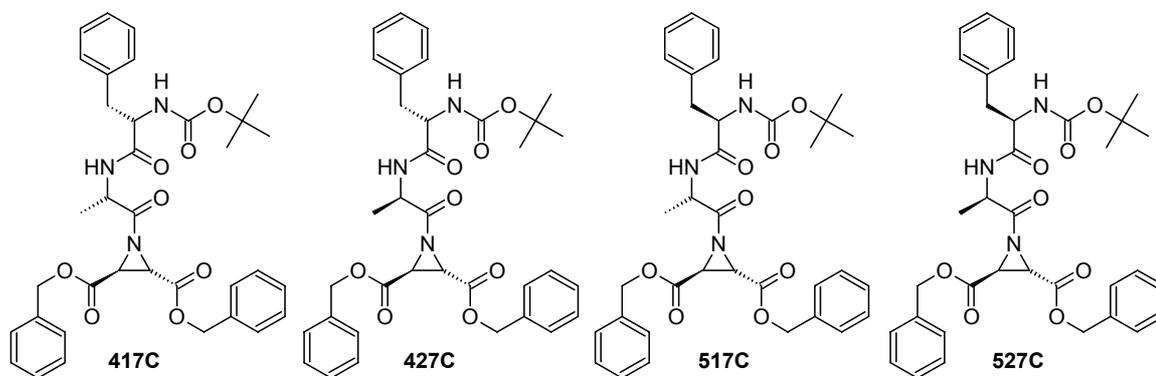
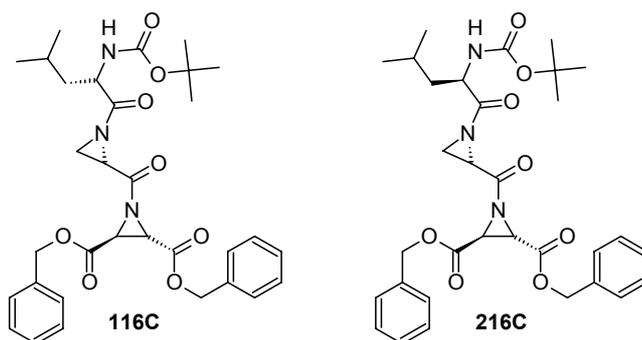
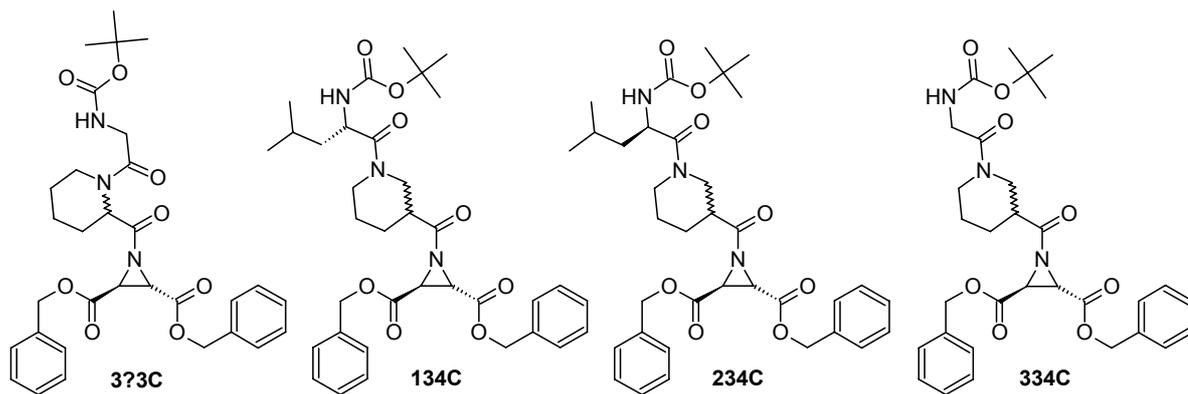
(2S,3S)-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(R)-phenylalanyl-(R)-alanyl]aziridin-2,3-dicarbonsäure, BOC-(R)-Phe-(R)-Ala-(S,S)-Azi(OH)₂ (527G)

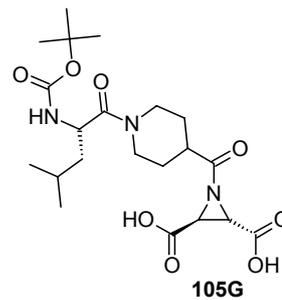
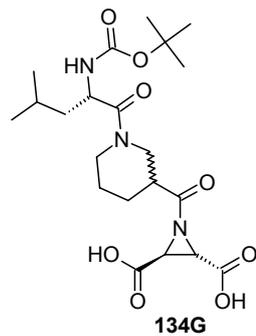
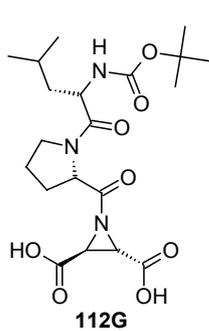
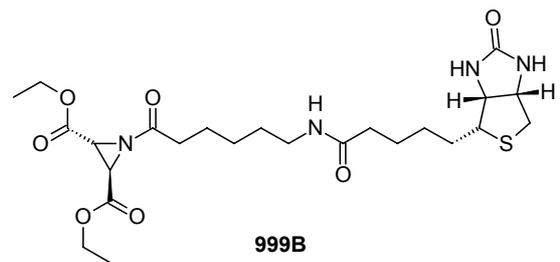
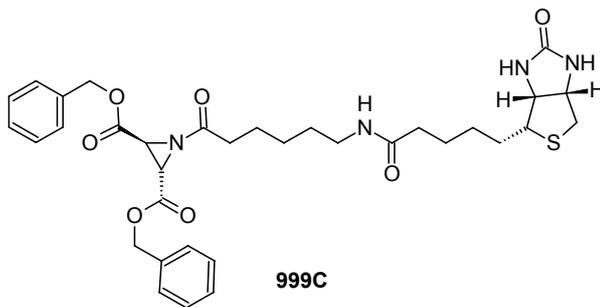
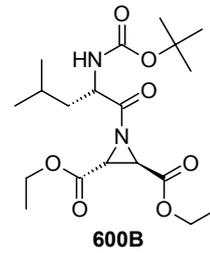
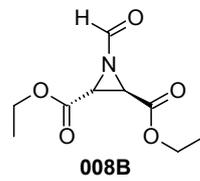
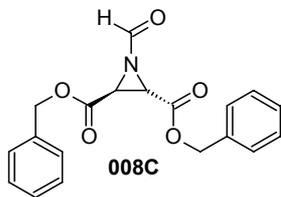
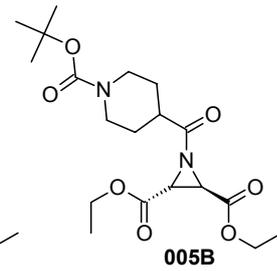
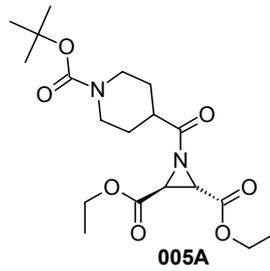
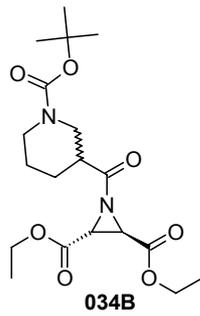
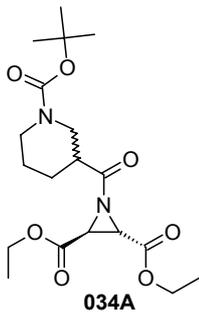
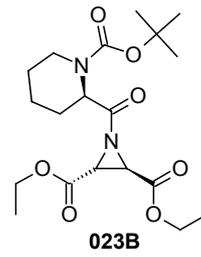
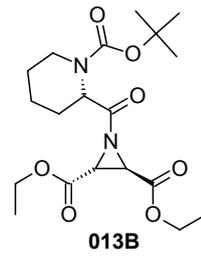
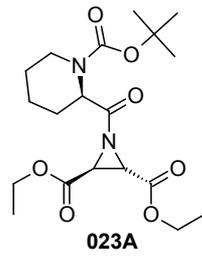
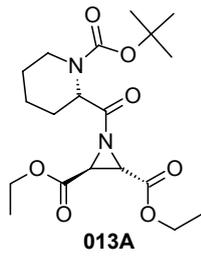
Weißes Pulver, 4.3 mg, 96%.

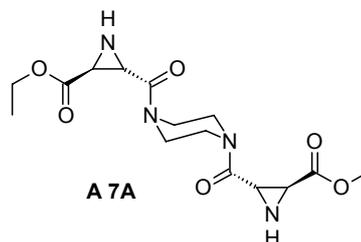
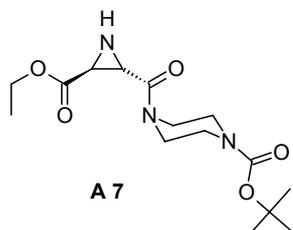
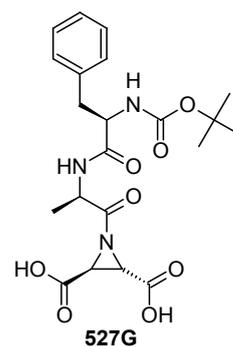
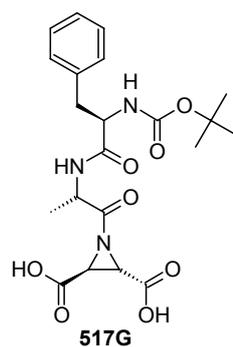
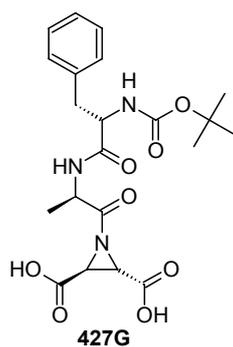
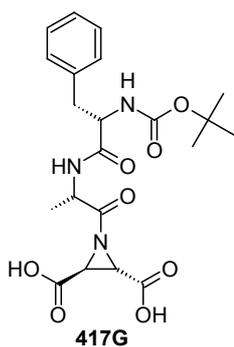
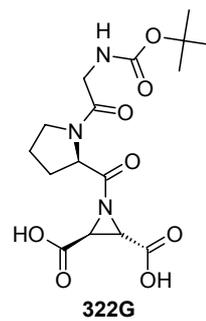
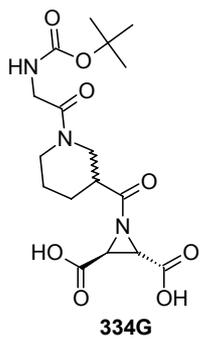
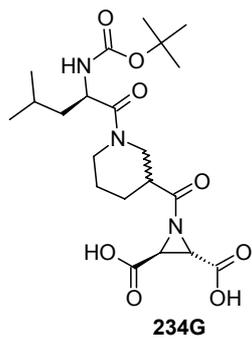
ESI-MS: C₂₁H₂₇N₃O₈ [M-H⁺]: 448.3.

11. Übersicht der synthetisierten und getesteten Inhibitoren









12. Literaturverzeichnis

- [1] MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).
- [2] Wiederanders, B. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 477, 261-270.
- [3] Schilling, K.; Pietschmann, S.; Fehn, M.; Wenz, I.; Wiederanders, B. *Biol. Chem.* **2001**, 382, 859-865.
- [4] Yamamoto, Y.; Watabe, S.; Kageyama, T.; Takahashi, S. Y. *Arch. Insect.* **1999**, 42, 167-178.
- [5] Chapman, R. L.; Kane, S. E.; Erickson, A. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 8808-8816.
- [6] Nissler, K.; Kreuzsch, S.; Rommerskirch, W.; Strubel, W.; Weber, E.; Wiederanders, B. *Biol. Chem.* **1998**, 379, 219-224.
- [7] Fox, T.; Demiguel, E.; Mort, J. S.; Storer, A. C. *Biochemistry* **1992**, 31, 12571-12576.
- [8] Carmona, E.; Dufour, E.; Plouffe, C.; Takebe, S.; Mason, P.; Mort, J. S.; Menard, R. *Biochemistry* **1996**, 35, 8149-8157.
- [9] Guo, Y. L.; Kurz, U.; Schultz, J. E.; Lim, C. C.; Wiederanders, B.; Schilling, K. *FEBS Lett.* **2000**, 469, 203-207.
- [10] Billington, C. J.; Mason, P.; Magny, M. C.; Mort, J. S. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2000**, 276, 924-929.
- [11] Karrer, K. M.; Peiffer, S. L.; Ditomas, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3063-3067.
- [12] Wex, T.; Levy, B.; Wex, H.; Bromme, D. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1999**, 259, 401-407.
- [13] Wex, T.; Levy, B.; Wex, H.; Bromme, D. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 477, 271-280.
- [14] Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R. A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N.; Bode, W. *EMBO J.* **1991**, 10, 2321-2330.
- [15] McGrath, M. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 181-204.
- [16] Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1967**, 27, 157-&.
- [17] Lecaille, F.; Kaleta, J.; Bromme, D. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4459-88.
- [18] Kirschke, H.; Schmidt, I.; Wiederanders, B. *Biochem. J.* **1986**, 240, 455-459.
- [19] Kirschke, H.; Wiederanders, B.; Bromme, D.; Rinne, A. *Biochem. J.* **1989**, 264, 467-473.
- [20] Turk, B.; Dolenc, I.; Turk, V.; Bieth, J. G. *Biochemistry* **1993**, 32, 375-380.
- [21] Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Lucas, K. D.; Brinen, L. S.; Alvarez Hernandez, A.; Cheng, J.; Gwaltney, S. L., 2nd; Roush, W. R.; Stierhof, Y. D.; Bogyo, M.; Steverding, D.; McKerrow, J. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, 118, 61-73.
- [22] Eakin, A. E.; Mills, A. A.; Harth, G.; Mckerrow, J. H.; Craik, C. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 7411-7420.
- [23] Sajid, M.; McKerrow, J. H. *Mol. Biochem. Parasit.* **2002**, 120, 1-21.
- [24] Rosenthal, P. J. *Adv. Parasitol.* **1999**, 43, 105-59.
- [25] Tort, J.; Brindley, P. J.; Knox, D.; Wolfe, K. H.; Dalton, J. P. *Adv. Parasitol.* **1999**, 43, 161-266.

- [26] Mottram, J. C.; Frame, M. J.; Brooks, D. R.; Tetley, L.; Hutchison, J. E.; Souza, A. E.; Coombs, G. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14285-93.
- [27] Souza, A. E.; Waugh, S.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C. *FEBS Lett.* **1992**, *311*, 124-7.
- [28] North, M. J.; Cotter, D. A.; Franek, K. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *60*, 153-7.
- [29] McKerrow, J. H. *Exp. Parasitol.* **1989**, *68*, 111-5.
- [30] Rosenthal, P. J.; Sijwali, P. S.; Singh, A.; Shenai, B. R. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 1659-72.
- [31] Otto, H. H.; Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-172.
- [32] Turk, B.; Turk, D.; Turk, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 98-111.
- [33] Klaus, J.; Rasnick, D.; Palmer, J.; Kuo, E. In *WO 96/40737*; Arris Pharm. Corp. San Francisco: USA, 1996.
- [34] Palmer, J.; Rasnick, D.; Klaus, J. In *WO 96/30353*; Arris Pharm. Corp. San Francisco: USA, 1996.
- [35] Schirmeister, T.; Klockow, A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585-96.
- [36] Otsuka, T.; Muramatsu, Y.; Higaki, T.; Nakanishi, T.; Takase, S.; Hatanaka, H.; Okamoto, M.; Hino, M.; Hashimoto, S. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1999**, *52*, 536-41.
- [37] Otsuka, T.; Muramatsu, Y.; Nakanishi, T.; Hatanaka, H.; Okamoto, M.; Hino, M.; Hashimoto, S. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2000**, *53*, 449-58.
- [38] Otsuka, T.; Muramatsu, Y.; Niikura, K.; Okamoto, M.; Hino, M.; Hashimoto, S. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1999**, *52*, 542-7.
- [39] *Drugs of the Future* **2000**, *25*, 1215.
- [40] Katunuma, N.; Murata, E.; Kakegawa, H.; Matsui, A.; Tsuzuki, H.; Tsuge, H.; Turk, D.; Turk, V.; Fukushima, M.; Tada, Y.; Asao, T. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 6-10.
- [41] Yamamoto, A.; Hara, T.; Tomoo, K.; Ishida, T.; Fujii, T.; Hata, Y.; Murata, M.; Kitamura, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **1997**, *121*, 974-7.
- [42] Yamamoto, A.; Kaji, T.; Tomoo, K.; Ishida, T.; Inoue, M.; Murata, M.; Kitamura, K. *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 942-4.
- [43] Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Hara, T.; Murata, M.; Kitamura, K.; Ishida, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **2000**, *127*, 635-43.
- [44] Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Miyagawa, H.; Takaoka, Y.; Sumiya, S.; Kitamura, K.; Ishida, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2000**, *48*, 480-5.
- [45] Demarcus, M.; Ganadu, M. L.; Mura, G. M.; Porcheddu, A.; Quaranta, L.; Reginato, G.; Taddei, M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 697-706.
- [46] Nakao, Y.; Fujita, M.; Warabi, K.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462-10463.
- [47] Schaschke, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 855-857.
- [48] Schirmeister, T. *Arch. Pharm.* **1996**, *329*, 239-244.
- [49] Schirmeister, T. *Biopolymers* **1999**, *51*, 87-97.
- [50] Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560-72.
- [51] Schirmeister, T.; Kaeppler, U. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 361-73.
- [52] Tsubotani, S.; Takizawa, M.; Shirasaki, M.; Mizoguchi, J.; Schimizu, Y. *WO 95/28416*, **1995**.
- [53] Berlin, K. D.; Williams, L. G.; Dermer, O. C. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 873-&.

- [54] Markov, V. I.; Prosyaniuk, A. V.; Bondarenko, S. V.; Mishchenko, A. I.; Loban, S. V.; Zdesenko, V. A. *Zh. Org. Khim.* **1981**, *17*, 1180-1183.
- [55] Bucciarelli, M.; Forni, A.; Moretti, I.; Prati, F.; Torre, G. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1993**, 3041-3045.
- [56] Furukawa, N.; Oae, S.; Yoshimura, T. *Synthesis-Stuttgart* **1976**, 30-32.
- [57] Schirmeister, T.; Peric, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1281-91.
- [58] Legters, J.; Thijs, L.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5287-5294.
- [59] Pochlauer, P.; Muller, E. P.; Peringer, P. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1238-1247.
- [60] Mori, K.; Iwasawa, H. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 87-90.
- [61] Vowinkel, E. *Chem. Ber.-Recl.* **1966**, *99*, 1479-&.
- [62] Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2003**, *14*, 3301-3312.
- [63] Lohray, B. B.; Bhushan, V. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1997**, *68*, 89-180.
- [64] Hu, Y. F.; Yamada, K. A.; Chalmers, D. K.; Annavajjula, D. P.; Covey, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4550-4559.
- [65] Gao, Y.; Zepp, C. M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3155-3158.
- [66] He, L. L.; Byun, H. S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2071-2074.
- [67] Metz, K.; Honda, M.; Komori, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 55-60.
- [68] Shustov, G. V.; Kachanov, A. V.; Korneev, V. A.; Kostyanovsky, R. G.; Rauk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10267-10274.
- [69] Kang, S. K.; Park, D. C.; Rho, H. S.; Yoon, S. H.; Shin, J. S. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1994**, 3513-3514.
- [70] Lohray, B. B.; Ahuja, J. R. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1991**, 95-97.
- [71] Barrett, A. G. M.; Sakadarat, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5110-5117.
- [72] Holden, K. G.; Mattson, M. N.; Cha, K. H.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5913-5918.
- [73] Nakajima, K.; Takai, F.; Tanaka, T.; Okawa, K. *B. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1577-1578.
- [74] Korn, A.; Rudolphbohner, S.; Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1717-1730.
- [75] Rodebaug, R. M.; Cromwell, N. H. *J. Heterocyc. Chem.* **1969**, *6*, 435-&.
- [76] Fowden, L. *Biochem. J.* **1956**, *64*, 323-32.
- [77] Phillips, B. A.; Cromwell, N. H. *J. Heterocyc. Chem.* **1973**, *10*, 795-799.
- [78] Backes, J. i. H.-W. In *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie*; Thieme; Vol. Bd. E16c.
- [79] Kostyanovsky, R. G.; Krutius, O. N.; Stankevich, A. A.; Lyssenko, K. A. *Mendeleev Commun.* **2003**, 223-226.
- [80] Schirmeister, T. *Pep. Sci. - Present and Future* **1998**, 654-656.
- [81] Bodanzsky, M. *Principles of Peptide Synthesis, 2. Edition*; Springer-Verlag: Berlin, 1993.
- [82] Günther, H. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry*; John Wiley & Sons Ltd, 1994.
- [83] Gelhaus, C.; Vicik, R.; Hilgenfeld, R.; Schmidt, C. L.; Leippe, M.; Schirmeister, T. *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 435-438.
- [84] Eilon, G. F.; Gu, J.; Slater, L. M.; Hara, K.; Jacobs, J. W. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, *45*, 183-91.
- [85] Haga, N.; Ishibashi, T.; Hara, A.; Abiko, Y. *Pharmacology* **1985**, *31*, 208-17.

- [86] Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhvani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. *Science* **2003**, *300*, 1763-7.
- [87] Yang, H.; Yang, M.; Ding, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mo, L.; Ye, S.; Pang, H.; Gao, G. F.; Anand, K.; Bartlam, M.; Hilgenfeld, R.; Rao, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13190-5.
- [88] Huang, C.; Wei, P.; Fan, K.; Liu, Y.; Lai, L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4568-74.
- [89] Hegyi, A.; Ziebuhr, J. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 595-9.
- [90] Atkins, R. L.; Bliss, D. E. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1975-1980.
- [91] Tian, W. X.; Tsou, C. L. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [92] Kitz, R.; Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-&.
- [93] Volkel, H.; Kurz, U.; Linder, J.; Klumpp, S.; Gnau, V.; Jung, G.; Schultz, J. E. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 198-206.
- [94] Shenai, B. R.; Sijwali, P. S.; Singh, A.; Rosenthal, P. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29000-10.
- [95] Peptide-Mass, <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>.
- [96] Heukeshoven, J.; Dernick, R. *Electrophoresis* **1985**, *6*, 103-112.
- [97] FlexX 1.12, BioSolveIT **2003**, An der Ziegelei 75, 53757 St. Augustin, Germany.
- [98] 1GMY: *pdb-Databank*,
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=268281096404686&page=0&pdblid=1GMY>.
- [99] 1MHW: *pdb-Databank*,
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=264111096404577&page=0&pdblid=1MHW>.
- [100] Wolf, K.; Dormeyer, M. *Parasitol. Res.* **2003**, *90 Suppl 2*, 91-6.
- [101] Helten, H.; Schirmeister, T.; Engels, B. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7691-7701.
- [102] Dufour, E.; Storer, A. C.; Menard, R. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9136-43.
- [103] Hanzlik, R. P.; Jacober, S. P.; Zygmunt, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 33-42.
- [104] Miller, M. W. *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 233-&.
- [105] Sekine, T.; Itakura, H.; Namihisa, T.; Takahashi, T.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 3286-3289.

13. Lebenslauf, Veröffentlichungen und Erklärung

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Radim Vičík
Familienstatus: ledig
Nationalität: tschechisch
Geburtsdatum: 16.12.1974
Geburtsort: Zlín (1948-1989 Gottwaldov), Tschechische Republik

SCHULAUSSBILDUNG:

9/1981 - 6/1989 Grundschule in Trnava
9/1989 - 6/1993 Gymnasium in Zlín
5/1993 Abitur

HOCHSCHULAUSSBILDUNG:

10/1993 – 6/1998 Pharmaziestudium an der Karls-Universität Prag in Hradec Kralové (Königsgratz).

Staatsexamen:

2/1996 Pharmakognosie
6/1996 Pharmazeutische Chemie
2/1997 Pharmakologie
3/1997 Kontrolle chemischer Arzneistoffe
4/1998 Sozialpharmazie
9/1997 - 6/1998 Diplomarbeit unter Anleitung von PD Dr. M. Dolezal
Titel: Substituierte Anilide der Pyrazincarbonsäure als potentielle Arzneimittel I.
10/1998 – 6/1999 Praktikum im Rahmen des Erasmus-Sokrates-Austauschprogramms am Pharmazeutischen Institut, Universität Heidelberg im AK Prof Dr. R. Neidlein unter Anleitung von PD Dr. P. Deigner.
11/1999 – 6/2004 Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Tanja Schirmeister in Freiburg (11/1999 – 7/2000) und Würzburg (8/2000-6/2004)

VERÖFFENTLICHUNGEN:

Posterpräsentationen:

Irreversible peptidomimetic inhibitors of cysteine proteases. R. Vicik, T. Schirmeister, Jahrestagung der GDCh, **2001**, Würzburg.

Inhibitors of cysteine proteases containing an aziridine unit, T. Schirmeister, A. Breuning, R. Vicik, XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry of the EFMC European Federation of Medicinal Chemistry, **2002**, Barcelona.

Peptidomimetic inhibitors of cysteine proteases, R. Vicik, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2002**, Berlin.

Irreversible peptidomimetische Cystein-Protease-Inhibitoren mit Aziridin-Baustein. R. Vicik, C. Gelhaus, M. Leippe, T. Schirmeister, DPhG-Jahrestagung, **2003**, Würzburg.

Irreversible peptidomimetic inhibitors of cysteine proteases containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid as electrophilic building block. R. Vicik, J. Ziebuhr, T. Schirmeister, 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society) associated with the ICPI (International Conference on Protease Inhibitors), **2003**, Nagoya, Japan.

Identification of cysteine proteases of intraerythrocytic life stages of *Plasmodium falciparum* by a biotinylated small-molecule probe. T. Schirmeister, C. Gelhaus, R. Vicik, M. Leippe, 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society) associated with the ICPI (International Conference on Protease Inhibitors), **2003**, Nagoya, Japan.

Identification of cysteine proteases of intraerythrocytic life stages of *Plasmodium falciparum* by a biotinylated small-molecule probe, T. Schirmeister, C. Gelhaus, R. Vicik, M. Leippe, 21. Jahrestagung der Deutschen Parasitologischen Gesellschaft, **2004**, Würzburg.

Screening of electrophilic compounds as potential irreversible M^{pro} Inhibitors. A. Breuning, R. Vicik, C. Schmuck, J. Ziebuhr, T. Schirmeister, SARS-Kongress, **2004**, Lübeck.

Proline containing inhibitors of cathepsins and cathepsin-like parasitic proteases. R. Vicik, N. Stiefl, K. Baumann, T. Schirmeister, DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg.

Theoretical Studies about cysteine protease inhibitors - How valid are predictions? T. Schirmeister, R. Vicik, H. Helten, B. Engels, DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg.

Screening of electrophilic compounds as potential irreversible Inhibitors of coronaviral M^{pro}s. A. Breuning, M. Schiller, U. Kaepler, F. Jenke, B. Degel, R. Vicik, N. Stiefl, K. Baumann, C. Schmuck, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg.

Publikationen:

Gelhaus, C.; Vicik, R.; Hilgenfeld, R.; Schmidt, C. L.; Leippe, M. and Schirmeister, T. Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate. *Biological Chemistry* **2004**, *385*, 435-438.

Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T. An improved synthesis of aziridine-2,3-dicarboxylates via azido alcohols - epimerization studies. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 3301-3312.

Inhibitors of cysteine proteases containing an aziridine unit, A. Breuning, R. Vicik, T. Schirmeister, *Drugs Fut.* **2002**, *27* (Suppl. A), 444. (XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry of the EFMC European Federation of Medicinal Chemistry 2002, Barcelona).

Peptidomimetic inhibitors of cysteine proteases, R. Vicik, T. Schirmeister. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*, Suppl. 1, 102. (DPhG-Jahrestagung 2002, Berlin).

Identification of cysteine proteases of intraerythrocytic life stages of *Plasmodium falciparum* by a biotinylated small-molecule probe, T. Schirmeister, C. Gelhaus, R. Vicik, M. Leippe, *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *293*, Suppl. 38, 89 (21. Jahrestagung der Deutschen Parasitologischen Gesellschaft, 2004, Würzburg).

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN *N*-ACYLIERTER AZIRIDIN-2,3-DICARBOXYLATE ALS
SELEKTIVE, PEPTIDOMIMETISCHE INHIBITOREN VON CYSTEIN-PROTEASEN DER CATHEPSIN-
L-SUBFAMILIE**

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Radim Vičík