

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Kombinatorische Festphasensynthese und biologische Evaluation niedermolekularer RGD-Mimetika

Christoph Gibson

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Firl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
3. apl. Prof. Dr. L. Moroder

Die Dissertation wurde am 11.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 26.06.2000 angenommen.

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Januar 1997 bis April 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Prof. Kessler danke ich für die interessante Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die Unterstützung in allen Belangen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen sowie die Schaffung eines exzellenten und produktiven Arbeitsklimas trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Gábor Sulyok, Albert Schröder, Kirstin Dechantsreiter und Dr. Roland Haubner für das gute Laborklima,
- Dr. Jörg S. Schmitt für die Einführung in das Gebiet der Azapeptide, sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen,
- Gabór Sulyok, Markus Born und Martin Kantlehner für das engagierte Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- dem Verband der Chemischen Industrie e. V. für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums,
- Markus Born, Henrik Kuhn, Christan Mang, Gabór Sulyok und Harald Schmitt für die ständige Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch,
- Dr. Elisabeth Lohof für das Korrekturlesen der Publikationen und die aktive Versorgung mit nützlichen Laborgeräten,
- Albert Schröder und Kristin Dechantsreiter sowie meinen Praktikanten Uwe Monkowius, Stephan Reiter, Markus Rojahn und Axel Zerrath für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit,

- Dr. Günter Hölzemann, Dr. Matthias Wiesner und Dr. Simon L. Goodman für das Interesse an meiner Arbeit auf dem Gebiet der RGD-Mimetika, sowie allen Mitarbeitern bei Merck KGaA, für die Durchführung der biologischen Untersuchungen,
- Diane Hahn für die Einführung in biologische Arbeitstechniken und für die einzigartige Unterstützung bei der Etablierung des *on-bead*-Rezeptortests,
- Dr. Jörg Meyer für die Untersuchung des Osteoblastenwachstums,
- Dr. Rainer Haeßner für die Hilfe bei allen NMR-, Hardware- und Softwarefragen sowie für die vielen interessanten Diskussionen,
- Niklas Heine und Dr. Frank Osterkamp für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Freundschaft,
- Jens Liermann für das Schreiben eines Computerprogrammes zur Molekülmassenberechnung der RGD-Mimetika,
- Markus Urzinger und Burghard Cordes für die reibungslose und prompte Aufnahme der ESI-Spektren,
- Maria Kranawetter für die Durchführung von HPLC-Analysen und Trennungen,
- allen anderen, namentlich nicht genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern, die dem Arbeitskreis das hervorragende Arbeitsklima verleihen.

Mein persönlicher Dank gilt Kerstin Müller für das entgegengebrachte Verständnis und ihre Bemühungen, meinen Blick auf die wichtigen Dinge des Lebens zu richten.

Inhalt

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Biologische Aspekte.....	4
2.1	Integrine und ihre natürlichen Liganden.....	5
2.2	Funktion und Gewebeverteilung der Integrine	9
2.3	Die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ bei Tumormetastasierung und Angiogenese	12
2.4	Die Rolle des $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrins bei Osteoporose, Knochenneubildung und akutem Nierenversagen	16
2.5	Synthetische $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten als Therapeutika	18
3	Grundlagen zur kombinatorischen Synthese	22
3.1	Prinzip und Historie der kombinatorischen Synthese.....	22
3.2	Aspekte und Methoden der kombinatorischen Synthese.....	24
3.2.1	Diversität.....	24
3.2.2	Methoden und Techniken	25
3.2.2.1	Das Prinzip der Festphasensynthese	25
3.2.3	Die Split-Methode nach Furka.....	26
3.2.4	Das <i>one-bead one-compound</i> -Konzept.....	28
3.2.5	Strukturbestimmung der aktiven Substanzen.....	28
3.3	Beispiele kombinatorischer Synthesen nach dem <i>one-bead</i> <i>one-compound</i> -Konzept.....	30
4	Kombinatorische Synthese von aza-RGD-Mimetika.....	35
4.1	Planung der aza-RGD-Bibliothekssynthese	35
4.1.1	Retrokombinatorische Analyse der RGD-Sequenz.....	35
4.1.2	Strukturelle und biologische Aspekte des Azabausteins B.....	37
4.1.3	Syntheseplanung zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika an der Festphase nach der Fmoc-Strategie	41
4.2	Die Synthese der Bausteine	44
4.2.1	Baustein A.....	45
4.2.2	Baustein B.....	51
4.2.3	Baustein C.....	52
4.2.4	Baustein D.....	54

4.3	Einführung des Azabausteins B.....	56
4.3.1	Route A: Festphasengestützte Azapeptidsynthese via harzgebundener aktivierter Carbaminsäuren.....	57
4.3.2	Route B: Festphasengestützte Azapeptid- bzw. Azapeptidsynthese via aktivierter Azaaminosäuren in Lösung	60
4.3.2.1	Synthese der aktivierten Azabausteine B.....	61
4.3.2.2	Optimierung des Azaglycineinbaus an der Festphase.....	63
4.3.2.3	Optimierung des Azasarcosineinbaus an der Festphase.....	66
4.3.2.4	Optimierung des Azaalanineinbaus an der Festphase.....	70
4.4	Einführung des Bausteins D	74
4.4.1	Guanylierung an der Festphase	74
4.4.2	Pyrimidylisierung an der Festphase	77
4.5	Überprüfung der Synthesesequenz zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika	82
4.5.1	Untersuchung der Kompatibilität von H-Cysa-OH mit den Azabausteinen B	83
4.5.2	Untersuchung der Kompatibilität von <i>N</i> -βPra(Bu)Mamb-NH ₂ mit den Azabausteinen B	84
4.5.3	Schwierigkeiten bei der aza-RGD-Mimetikasyntese	85
4.5.3.1	Photolyse Cysa-haltiger aza-RGD-Mimetika.....	85
4.5.3.2	Seitenkettenentschützung <i>N</i> -βPra(Bu)Mamb-haltiger aza-RGD-Mimetika...	86
4.5.4	Festphasensynthese einzelner aza-RGD-Mimetika.....	88
4.5.4.1	Synthese von azaGly-RGD-Mimetika	88
4.5.4.2	Synthese von azaSar-RGD-Mimetika.....	90
4.5.4.3	Synthese von azaAla-RGD-Mimetika	91
4.6	Synthese der aza-RGD-Bibliotheken.....	93
5	Massenspektrometrische Analyse.....	98
5.1	Peptid-Massenspektrometrie.....	98
5.2	Charakteristische Fragmentationen der aza-RGD-Mimetika	99
5.3	LC-MS- und MS ⁿ -Kontrollanalyse der Bibliotheken	104
6	Biologische Evaluation.....	108
6.1	Bindungsstudien an isolierten Integrinen	108
6.2	Etablierung eines <i>on-bead</i> -Rezeptortests	111
6.3	<i>On-bead screening</i> der aza-RGD-Mimetikabibliotheken I	116
6.4	<i>On-bead screening</i> der aza-RGD-Mimetikabibliotheken II	123

7	Aza-RGD-Mimetika in biokompatiblen Materialien	129
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	132
9	Experimente	135
9.1	Allgemeine Arbeitstechniken	135
9.2	Synthese der Bausteine	137
9.3	Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika.....	157
9.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese	158
9.3.2	Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika	163
9.3.3	Kombinatorische Synthese von aza-RGD-Mimetika nach der Split-Methode	182
9.3.4	Synthese eines aza-RGD-Mimetikums mit Acrylatanker	183
9.4	<i>On-bead sceening</i> und Analyse der aza-RGD-Bibliotheken	186
9.4.1	Zusammensetzung der <i>screening</i> -Lösungen	186
9.4.2	<i>On-bead screening</i> - und Analysemethoden	187
10	Literatur	189
11	Anhang.....	205

Abkürzungen

2-Nal	2-Naphthylalanin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Acra-OH	Acrylsäure
Äquiv.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphatdinatriumsalz
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
br.	breit
BSA	Biovine Albumin; Rinderserumalbumin
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
Col	Kollagen
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
DIPC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ep	Epiligrin
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
FABMS	<i>fast atom bombardment mass spectrometry</i>
Fb	Fibrinogen
Fbu	Fibulin
Fib	Fibrillin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Fn	Fibronectin
ges.	gesättigt
Gua	Amino(imino)methyl- (Guanyl-)
H-(2S,4S)-Azpc-OH	(2S,4S)-4-Amino-1-benzoylpyrrolidin-2-carbonsäure
H-Amob-OH	4-Amino-3-methoxybenzoesäure
H-Ani-OH	6-Aminonicotinsäure
H-Atob-OH	4-Amino-3-(trifluormethoxy)benzoesäure
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> ,-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
H- <i>cis</i> Cyh-OH	<i>cis</i> -4-Aminocyclohexancarbonsäure

H-Cmp-OH	4-Carboxymethylpiperazin
H-Cpb-OH	4-Amino-3-(4-chlorophenyl)buttersäure
H-Cpdc-OH	cis-2,5-Piperidindicarbonsäure
H-Cysa-OH	Cysteinsäure
H-Hda-H	1,6-Hexandiamin
H-Inp-OH	Isonipecotinsäure
H-Mab-OH	<i>m</i> -Aminobenzoessäure
H-Mamb-OH	<i>m</i> -(Aminomethyl)benzoessäure
H-Mape-OH	2-(<i>m</i> -Aminophenyl)essigsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMQC-COSY	<i>heteronuclear multiple quantum coherence mit COSY-Sequenz</i>
H- <i>N</i> -βPraMamb-OH	3-{[(2-Carboxyethyl)amino]methyl}benzoessäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
H-Pab-OH	<i>p</i> -Aminobenzoessäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
H-δAva-OH	5-Aminovaleriansäure
H-εAhx-OH	6-Aminohexansäure
H-γAbu-OH	4-Aminobuttersäure
iC3b	<i>inactivate complement factor 3b</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Idp	3,3-Iminodipropionsäure
In	Invasin
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
Ln	Laminin
m	Multipllett
MAdCAM	<i>mucosal adressing cell adhesion molecule</i>
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/-ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie
NBT	<i>p</i> -Nitroblautetrazoliumchlorid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Opn	Osteopontin
PEG	Polyethylenglycol
PL	Photolinker
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Polypropylen

ppm	<i>parts per million</i>
Pra	Propionsäure
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
PyBroP	Bromtripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
Pym	Pyrimidyl
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- tetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl-
Tn	Tenascin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsp	Thrombospondin
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule.</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vn	Vitronectin
vWF	von Willebrand Faktor
Z	Benzyloxycarbonyl

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, "Index Guide", 77, 210.) und den *IUPAC-IUB*-Kommissionen (IUPAC, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477; IUPAC, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919; IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1974**, 10, 3983; IUPAC-IUB (JCBN), *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37) empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

1 Einleitung und Zielsetzung

Das *travelling salesman problem* (TSP) besteht darin, daß ein Handlungsreisender eine Rundreise durch eine vorgegebene Anzahl von Städten unternehmen und dabei einen möglichst kurzen Weg zurücklegen soll. Dieses Beispiel repräsentiert eine Klasse von mathematischen Problemen, bei denen es gilt, unter Kombinationen von endlich vielen Möglichkeiten die günstigste zu finden (kombinatorische Optimierung). Die Lösung des TSP durch Enumeration, das Ausprobieren aller Möglichkeiten, würde jedoch bereits für 25 Städte die größten Supercomputer hoffnungslos überfordern. Dennoch gelang es Applegate *et al.* 1998 nachweislich die kürzeste Rundreise durch 13509 Städte der USA zu ermitteln.^[1] Der Erfolg dieser herausragenden Arbeit basiert auf geschickter Computerprogrammierung und leistungsfähigen Rechenanlagen. Entscheidend für das Gelingen war jedoch die drastische Reduktion der Anzahl der zu untersuchenden Fälle durch gründliche mathematische Analyse.

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit potentiell therapeutischem Nutzen entspricht in wesentlichen Aspekten einem kombinatorischen Optimierungsproblem. Vorausgesetzt eine bestimmte Molekülgröße soll nicht überschritten werden, gilt es auch hier, unter endlich – aber astronomisch vielen organischen Molekülen die Substanz zu finden, welche einem gegebenen pharmakologischen Anspruch am besten genügt. Aber bereits die zuverlässige Bestimmung der Wirkung *einer* Verbindung auf physiologische oder pathophysiologische Prozesse ist eine Aufgabe von enormer Komplexität. Seit etwa zwei Jahrzehnten wird mit der als rationales Wirkstoffdesign bekannten Methode versucht, die essentiellen Parameter zu erfassen, welche für die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung verantwortlich sind. In den meisten Fällen liegt dem beobachteten biologischen Effekt die spezifische Anlagerung des Wirkstoffs an ein bestimmtes Protein zu Grunde. Insbesondere bei Kenntnis der Proteinstruktur kann dann mit Hilfe geeigneter Computerprogramme abgeschätzt werden, wie stark die untersuchte Verbindung an das Protein bindet. Die so erhaltenen Ergebnisse können jedoch ausschließlich im Experiment zuverlässig validiert werden. Zudem liefert diese Verfahrensweise die besten Ergebnisse, wenn bereits ein Satz von Leitstrukturen vorliegt, deren Affinität zum Zielprotein biologisch nachgewiesen wurde.

Die biologische Evaluation blieb lange Zeit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Wirkstoffforschung. Aufgrund des rasanten Fortschritts auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Automatisierungstechnik können inzwischen jedoch Tausende von Substanzen in kurzer Zeit getestet werden. Die rasche Bereitstellung der dazu erforderlichen Zahl von verschiedenen Verbindungen war mit den klassischen Methoden der organischen Synthese kaum möglich. Ein vielversprechender Ansatz zur Überwindung dieses „Versorgungsengpasses“ ist die kombinatorische Synthese. In den letzten Jahren konnte anhand zahlreicher Beispiele demonstriert werden, daß es mit dieser Strategie in überschaubaren Zeiträumen gelingt, eine Vielzahl verschiedener Substanzen zu generieren. Da jedoch viele Synthesemethoden den Ansprüchen der kombinatorischen Synthese nicht genügen, konnte dieser Ansatz bisher nur auf eine begrenzte Anzahl von Verbindungsklassen übertragen werden. Daher ist es ein wichtiges Ziel der organischen Chemie, neue effiziente Synthesemethoden zu entwickeln, die den Anforderungen der kombinatorischen Synthese möglichst diverser Verbindungen gerecht werden.

Im Hinblick auf die nahezu unendlich große Zahl möglicher organischer Verbindungen ist die kombinatorische Synthese sowie die biologische Evaluation aller Substanzen grundsätzlich unmöglich. In Analogie zu kombinatorischen Optimierungsproblemen der Mathematik gilt es auch hier, mit chemischem Sachverstand – gegebenenfalls auch mit Methoden des rationalen Wirkstoffdesigns – die Anzahl der zu untersuchenden Substanzen auf ein bearbeitbares Maß einzugrenzen. Darüber hinaus ist es erstrebenswert, die kombinatorische Synthese und die biologische Evaluation aufeinander abzustimmen, um das Potential beider Methoden voll auszuschöpfen und somit maximale Effizienz bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe zu erzielen.

Ziel dieser Arbeit ist die kombinatorische Festphasensynthese von RGD-Mimetika zur selektiven Inhibierung des $\alpha\beta 3$ -Integrinrezeptors, der in zahlreiche pathophysiologische Prozesse involviert ist. Ausgehend von der Leitstruktur Arg-Gly-Asp (RGD) soll ein Festphasensynthesekonzept für modular aufgebaute RGD-Mimetika ausgearbeitet werden (siehe Abbildung 1.1). Um den hohen Anforderungen einer kombinatorischen Festphasensynthese gerecht zu werden, müssen die einzelnen Verknüpfungsreaktionen am festen Träger optimiert und anhand der Synthese von Einzel-

verbindungen nochmals überprüft werden. Gelänge es auf diese Weise RGD-Mimetika mit Affinität zum $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor zu finden, bestünde die Möglichkeit mit Hilfe dieser Verbindungen einen *on-bead*-Rezeptortest zu etablieren. Zudem soll eine Strategie zur Ermittlung der Struktur einer harzgebundenen Verbindung ausgearbeitet werden. Damit wären alle Voraussetzungen gegeben, um mit Hilfe dieser Vorgehensweise neue Leitstrukturen zu finden.

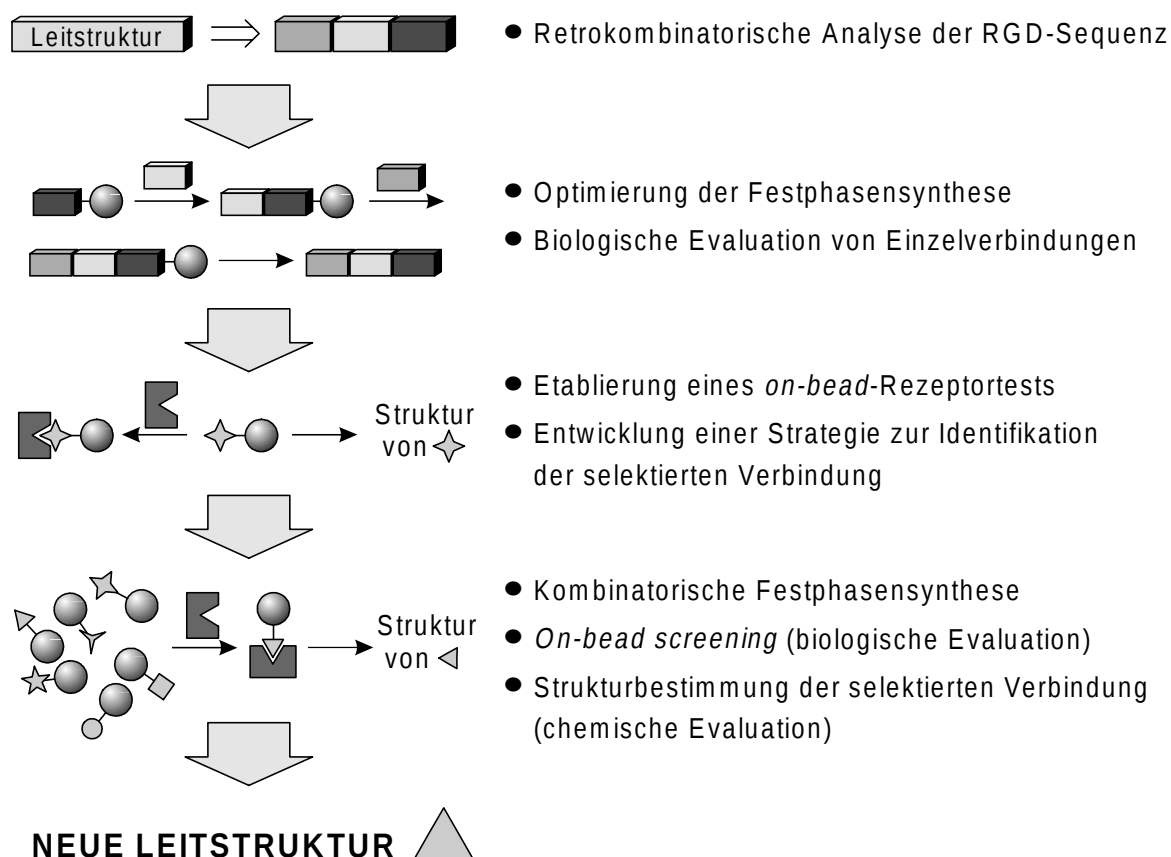


Abbildung 1.1: Geplante Vorgehensweise zur kombinatorischen Festphasensynthese von RGD-Mimetika.

Die vorliegende Arbeit soll das Spektrum der zur kombinatorischen Festphasensynthese geeigneten Reaktionen sowie die Methoden zur biologischen und chemischen Evaluation erweitern und somit einen Beitrag zur Entwicklung einsatzfähiger Medikamente mit kombinatorischen Prinzipien leisten.

2 Biologische Aspekte

In mehrzelligen Organismen spielen Zell-Zell-Kontakte sowie Kontakte zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix für die physiologische Funktion des Gewebes und seiner Entwicklung eine essentielle Rolle. So sind Embryogenese, Zelldifferenzierung, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort nur einige Beispiele, bei denen adhäsive Wechselwirkungen der Zellen von Bedeutung sind.^[2-4]

Diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Zelloberflächenproteine, den sogenannten Zelladhäsionsrezeptoren, vermittelt. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Klassen von Zelladhäsionsrezeptoren entdeckt.^[2] Die bei weitem größte und vielseitigste Rezeptorfamilie bilden die Integrine.^[5,6] Der Name Integrin wurde erstmals von Tamkun *et al.* vorgeschlagen, um darauf hinzuweisen, daß diese Zelladhäsionsmoleküle als *integrale* Membrankomplexe bei der Verbindung von extrazellulärer Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett beteiligt sind.^[7] Schon bald wurde jedoch ersichtlich, daß die Integrine nicht nur als Verankerungsproteine der Zellen dienen, sondern auch als Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen. So können Integrine Signale von der Umgebung in die Zelle übertragen und verschiedene zelluläre Verhalten wie Veränderung der Zellform, Migration oder verankerungsabhängiges Wachstum steuern. Dieser Prozeß wird auch als *outside-in signaling* bezeichnet.^[5,8] In den letzten Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, daß die adhäsiven Eigenschaften der Integrine einer zellgesteuerten Dynamik unterliegen. In einem als *inside-out signaling* bezeichneten Prozeß können Faktoren innerhalb der Zelle die Integrine von einem inerten (nicht adhäsiven) in einen aktiven (adhäsiven) Zustand umschalten.^[8] Obwohl inzwischen bei einigen Signaltransduktionskaskaden eine Integrinbeteiligung zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, bleiben viele Details der integrinvermittelten Signalübertragung ungeklärt.^[8-10]

In den folgenden Kapiteln wird auf die Struktur, die Verteilung im Gewebe sowie auf die physiologischen und pathologischen Funktionen der Integrine näher eingegangen.

2.1 Integrine und ihre natürlichen Liganden

Integrine sind nichtkovalent verknüpfte heterodimere transmembrane Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen (siehe Abbildung 2.1). Beide Untereinheiten müssen zuerst *N*-glycosyliert werden, bevor sie im endoplasmatischen Retikulum $\alpha\beta$ -Heterodimere ausbilden können.^[6] Des weiteren ist das *chaperone* BiP (GRP78) in diesen Dimerisierungsprozeß involviert.^[11] Die größere α -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind, aufgebaut. Der extrazelluläre Teil der α -Einheit ist durch drei bis vier Bereiche von ca. 12 bis 15 Aminosäuren, die divalente Kationen (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) binden, am *N*-Terminus gekennzeichnet. Sie ähnelt in ihrer Sequenz den EF-Hand-Strukturen der Kalzium-Bindungsmotive anderer Proteine wie Calmodulin.^[12] Röntgenstruktur-Untersuchungen^[13] der A Domäne der α -Untereinheit der $\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrine weisen ebenfalls auf eine Metallbindungsstelle hin, die für die Ligandbindung wichtig zu sein scheint. Dies wird durch andere Untersuchungen^[14-18] bestätigt, die zeigen, daß die Funktion der Integrine von zweiwertigen Metallionen abhängig ist und die Affinität zu ihren Liganden teilweise durch Zugabe von Mn^{2+} gesteigert werden kann. Die β -Untereinheit besteht, mit Ausnahme der $\beta 4$ -Einheit^[19] (ca. 1750 Aminosäuren), aus nicht ganz 800 Aminosäuren und enthält vier hoch konservierte cysteinreiche Domänen von je ca. 40 Aminosäuren nahe der transmembranen Region sowie einen großen *loop* am *N*-Terminus des extrazellulären Teils. Beide Einheiten besitzen eine kurze membranständige Region (20 - 30 Aminosäuren) und eine zytoplasmatische Domäne (20 - 50 Aminosäuren), die jedoch für die Heterodimerbildung nicht essentiell sind.^[11,20,21] An der Bindung extrazellulärer Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt. Die Kontaktstellen sind in Domänen nahe dem *N*-Terminus lokalisiert.^[3,5,22,23]

Der *C*-Terminus der β -Untereinheit ^[2,22] verbindet über intrazelluläre Proteine wie Talin^[24], Vinculin^[25,26] und α -Actinin^[27] den Rezeptor mit dem Aktinfilament des Zytoskeletts. Damit ermöglichen die Integrine den Zellen sowohl eine feste Bindung zur extrazellulären Matrix und anderen Zellen als auch die Informationsübertragung in das Zellinnere (Abbildung 2.1).

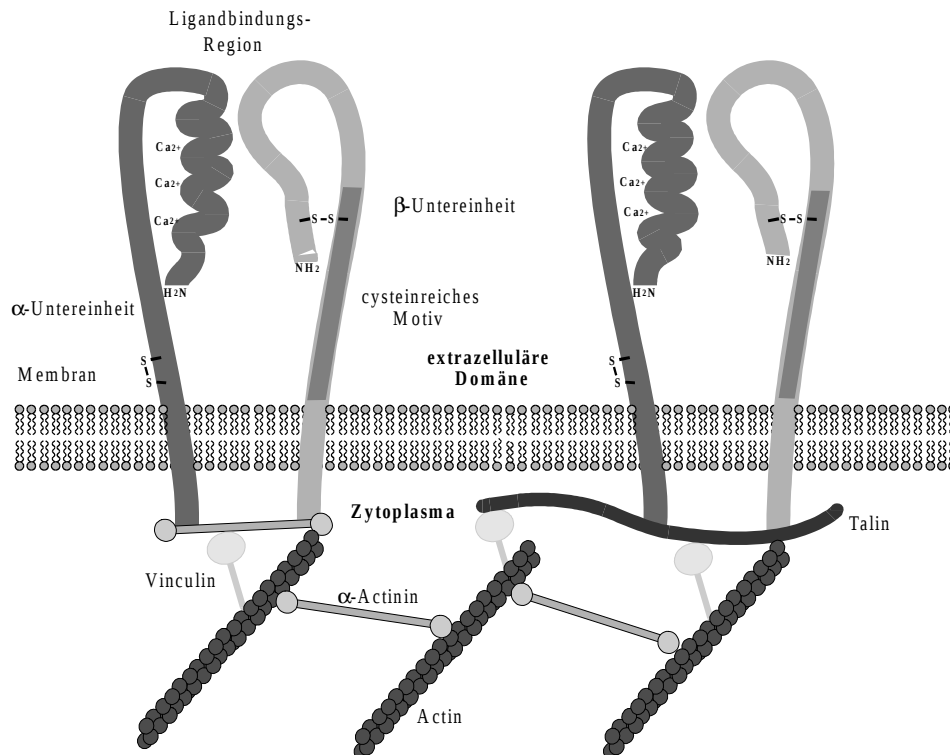


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Integrine und der Wechselwirkung mit Proteinen des Cytoskeletts. Über die intrazelluläre C-terminale Domäne binden Integrine an das Actinfilament des Cytoskeletts. Bei der Vernetzung spielen Zellproteine wie Vinculin, Talin oder α -Actinin eine Rolle.

Es gibt eine große Anzahl verschiedener Integrine, die ursprünglich hinsichtlich ihrer β -Untereinheiten in drei Subfamilien unterteilt wurden. Man dachte, daß jede α -Untereinheit nur mit einer bestimmten β -Untereinheit ein Heterodimer bildet und die verschiedenen α -Untereinheiten für die Ligandspezifität verantwortlich sind. Inzwischen sind aber mindestens acht verschiedene β -Untereinheiten bekannt. Außerdem sind einige der α -Untereinheiten (vor allem α_v) mit verschiedenen β -Untereinheiten assoziiert. In Tabelle 2.1 sind die bisher bekannten Untereinheiten sowie die gefundenen Kombinationen dargestellt.^[2,5,22,28]

Tabelle 2.1: Die bekannten Kombinationen der α - und β -Untereinheiten und die jeweiligen natürlichen Liganden.^[6,29,30] Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine, bei deren Bindung an bestimmte Liganden RGD-Abhängigkeit nachgewiesen wurde.^[31]

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	Col, Ln							
$\alpha 2$	Col, Ln, Fn							
$\alpha 3$	Col, Ln5, Fn							
$\alpha 4$	Fn, In VCAM-1						MAdCAM-1 VCAM-1 Fn	
$\alpha 5$	Fn							
$\alpha 6$	Ln			Ln, Ep				
$\alpha 7$	Ln							
$\alpha 8$	Fn, Vn, Tn							
$\alpha 9$	Col, Ln, Tn							
αE							E-Cadherin	
αL		ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3						
αM		iC3b, Fb Faktor X ICAM-1 ICAM-2						
αX		iC3b, Fb						
αIIb			Fb, Fn, Vn vWF, Tsp					
αv	Vn, Fn, Opn		Vn, Ln, Fn vWF, Tsp Tn, Opn Fib, Fbu		Vn, Fn Opn, Fb vWF	Fn Fb Tn		Vn

Verwendete Abkürzungen der Integrinliganden und Gegenrezeptoren: Col = Kollagen; Ep = Epiligrin; Ln = Laminin; Isoformen von Laminin sind zusätzlich durch eine Nummer spezifiziert; Fn = Fibronectin; In = Invasin; Vn = Vitronectin; Tn = Tenascin; Opn = Osteopontin; ICAM = intercellular adhesion molecule; Isoformen von ICAM sind zusätzlich durch eine Nummer spezifiziert; iC3b = inactivate complement factor 3b; Fb = Fibrinogen; Faktor X = Blutgerinnungsfaktor X; vWF = von Willebrand Faktor; Tsp = Thrombospondin; Fib = Fibrillin; Fbu = Fibulin; MAdCAM = mucosal addressin cell adhesion molecule; VCAM = vascular cell adhesion molecule.

An den Zell-Matrix-Wechselwirkungen der Integrine sind verschiedene extrazelluläre Matrixproteine beteiligt. Die Basalmembran, die eine Grenzschrift zwischen Epithel und dem darunterliegenden Bindegewebe darstellt, besteht zu einem Teil aus derartigen Proteinen.^[32] Hier befinden sich für die Zellstruktur bestimmende Glykoproteine wie Laminin und Fibronectin sowie extrazelluläre Plasmaproteine (Fibrinogen, Thrombospondin und der von Willebrand Faktor), die eine Rolle bei der Regulation der Hämostase spielen.^[33] Vitronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein und tritt sowohl im Bindegewebe als auch im Plasma auf. Osteopontin, auch bekannt als *bone sialo protein I*, ist hauptsächlich auf der Knochenoberfläche lokalisiert und ist beim Knochenabbau durch Osteoclasten involviert.^[33] Das Adhäsionsverhalten gegenüber natürlichen Liganden variiert innerhalb der Integrinfamilie sehr stark. So erkennen einige Integrine selektiv ein oder nur wenige Proteine, während andere Integrine eine weitaus geringere Ligandenspezifität aufweisen (siehe Tabelle 2.1).

Die extrazellulären Matrixproteine besitzen verschiedene Motive, die als potentielle Zellbindungsregionen in Frage kommen.^[34] Ein Zellerkennungsmotiv, das in einem Großteil der Matrixproteine vorkommt, besteht aus der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) und wird als „universelle“ Zellerkennungssequenz bezeichnet.^[3,28,31,35,36] (siehe grau hinterlegte Felder in Tabelle 2.1). Die Ursache der teilweise, trotz der gemeinsamen Erkennungssequenz, hohen Selektivität einzelner Integrine für bestimmte Adhäsionsproteine ist immer noch ungeklärt. Unter anderem wird vermutet, daß zusätzliche Bindungsregionen oder konformelle Präferenzen der RGD-Erkennungssequenzen einen Beitrag zur Selektivität leisten.^[31]

Diese RGD-Sequenz erwies sich aber als ideale Leitstruktur für die Entwicklung niedermolekularer α Ib β 3- und α v β 3-Antagonisten. So besitzen alle dieser Antagonisten, auch als RGD-Mimetika bezeichnet, eine Carbonsäure und ein basisches Pharmakophor, resultierend aus der Carbonsäure und dem basischen Guanidin der RGD-Sequenz (siehe Kap. 2.5).

2.2 Funktion und Gewebeverteilung der Integrine

Im Folgenden werden die einzelnen Integrine zu Kollagen-, Laminin-, Fibronectin-, Fibrinogen und Zellrezeptor-bindenden Untergruppen zusammengefaßt. Des weiteren werden die Integrine mit α_v -Untereinheit gesondert betrachtet. Diese gängige Einteilung ermöglicht eine übersichtliche Beschreibung der einzelnen Integrine, da auf diese Weise Integrine mit ähnlichen Funktionen zusammengefaßt werden können. Die Einteilung der Integrine hinsichtlich ihrer natürlichen Liganden ist aber zugleich recht willkürlich, da die meisten Integrine an mehrere Liganden binden können. Zudem werden die evolutionären Zusammenhänge nach dieser Kategorisierung nicht zwingend widerspiegelt.

Kollagen-bindende Integrine: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_9\beta_1$

Die Integrine $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ wurden erstmals auf T-Zellen entdeckt und sind auch als *very late antigens* (VLA) bekannt, da sie erst nach Antigenstimulierung der T-Zellen exprimiert werden. Später wurde der Name VLA für alle β_1 -haltigen Integrine übernommen.^[37] $\alpha_2\beta_1$ ist der bedeutendste Kollagenrezeptor der Thrombozyten und ist darüber hinaus auf Fibroblasten sowie verschiedenen anderen Zelllinien und Geweben exprimiert.^[34,38] $\alpha_1\beta_1$ wird auf Zellen gefunden, die unmittelbar an die Basalmembran angrenzen, wie zum Beispiel auf den Endothelzellen der kapillaren Blutgefäße.^[39] Zudem wurde dieses Integrin auf glatten Muskelzellen,^[40] Hepatozyten^[41], Nervenzellen^[42] sowie Melanomzellen^[43] gefunden. Ähnlich ist das Integrin $\alpha_9\beta_1$ im Gewebe verteilt. So wurde es auf Zellen gefunden, die der Basalmembran des Darms, der Atemwege und der Blutgefäße benachbart sind. Darüber hinaus ist es ebenfalls auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen und Hepatozyten exprimiert.^[44]

Laminin-bindende Integrine: $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ und $\alpha_7\beta_1$

Die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ und $\alpha_7\beta_1$ vermitteln die Zelladhäsion an verschiedene Isoformen des Laminins.^[45] Sowohl $\alpha_3\beta_1$ als auch $\alpha_6\beta_1$ sind weit verbreitet und werden in fast allen Geweben exprimiert.^[6] Die Verbreitung von $\alpha_7\beta_1$ ist hingegen auf Myoblasten sowie Myotuben der Skelett- und Herzmuskeln beschränkt.^[46] Darüber hinaus wird $\alpha_7\beta_1$ auch auf einigen Melanomzelllinien

exprimiert.^[47] $\alpha 6\beta 4$ bindet ausschließlich an Laminin und wurde bisher nur auf bestimmten Epithel- und Endothelzellen, unausgereiften Thymozyten sowie perineuralen Zellen gefunden.^[48-50]

Fibronectin-bindende Integrine: $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 8\beta 1$

Die Verbreitung des $\alpha 8\beta 1$ -Integrins ist im Gewebe eines erwachsenen Menschen auf kontraktile Zellen beschränkt und kann mehrere Liganden binden.^[51] Im Gegensatz dazu ist der $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor im Gewebe weit verbreitet und bindet selektiv an Fibronectin. Aufgrund seiner Eigenschaft, Zellmigration und Zellwachstum zu beeinflussen sowie das Wachstum von Tumoren zu unterdrücken, wurde das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin in der Vergangenheit intensiv untersucht.^[52] So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß eine verstärkte Expression von $\alpha 5\beta 1$ in Tumorzellen deren Beweglichkeit und Tumorigenität herabsetzt.^[53]

Fibrinogen bindende Integrine: $\alpha \text{IIb}\beta 3$

Das $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ^[54]-Integrin, auch als GPIIb/IIIa oder Blutplättchenrezeptor bezeichnet, wird vor allem auf von Megakaryozyten abstammenden Zellen wie den Blutplättchen exprimiert. Es konnte allerdings auch auf Melanomzellen nachgewiesen werden.^[54,55] Das $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -Integrin bindet mit unterschiedlicher Stärke an eine große Zahl extrazellulärer Matrixproteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin (vgl. Tabelle 2.1). Dieser Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei der primären und sekundären Hämostase. Im Falle vaskulärer Defekte ermöglicht er die Anlagerung von Blutplättchen an kollagene Bindegewebsfasern der Wundränder. Durch die Aggregation der Blutplättchen über Fibrinogen kann es dann zum Verschluß des verletzten Gewebes kommen. Störungen der Hämostase können zu Embolien, Schlaganfall oder Herzinfarkt führen.^[56-58]

Integrine, die Zell-Zell-Wechselwirkungen vermitteln: Leukozytenintegrine (α L β 2, α M β 2, und α X β 2) sowie die Integrine α 4 β 1, α 4 β 7 und α E β 7

Alle bisher erwähnten Integrine sind für die Verankerung und Migration der Zellen in der extrazellulären Matrix verantwortlich. Darüber hinaus sind Integrine auch an Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Wie bei der Integrin-vermittelten Adhäsion an Matrixproteine, können Integrin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte zelluläre Antworten wie Veränderung der Zellform, Migration und Genaktivierung bewirken. Die β 2-Integrine, auch als *leukocyte cell adhesion molecules* (LeuCAM) bekannt, und die Integrine α 4 β 1, α 4 β 7 und α E β 7 sind alle in derartige Zell-Zell-Kontakte involviert. Sie werden hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems gefunden und spielen eine wichtige Rolle beim Entzündungs- und Immungeschehen.^[28,59]

Integrine mit α v-Untereinheit: α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 und α v β 8

Die α v-Untereinheit wird von nahezu allen Zelltypen exprimiert und kann mit fünf verschiedenen β -Untereinheiten zu den Integrinen α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 und α v β 8 dimerisieren. α v β 8 ist hauptsächlich auf neuronalem Gewebe,^[60] α v β 6 hauptsächlich auf Epithelzellen lokalisiert.^[61] Im Gegensatz dazu wird das α v β 1-Integrin^[62] von vielen Zelltypen exprimiert. Sämtliche α v-Integrine wurden zudem auf verschiedenen Tumoren gefunden.^[30]

Um der zentralen Bedeutung des α v β 3-Integrins, auch als Vitronectinrezeptor bekannt, für die vorliegende Arbeit gerecht zu werden, wird dieses zusammen mit α v β 5 etwas detaillierter beschrieben. α v β 3 und α v β 5 werden ebenfalls von einer größeren Zahl von Zelltypen exprimiert. Beide Integrine wurden auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Epithelzellen, Leukozyten und Karzinomzellen gefunden.^[30] Darüber hinaus wird α v β 3 von Osteoclasten, in geringen Mengen von Blutplättchen sowie von allen Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert.^[2,30] Im Vergleich zu anderen Integrinen erkennt α v β 3 ungewöhnlich viele Liganden, bindet aber bevorzugt an Osteopontin (siehe Tabelle 2.1). Der α v β 3-Rezeptor ist in viele Zell-Adhäsions-Phänome involviert und spielt u. a. bei der Knochenresorption,^[63,64] bei der Phagocytose von Zellen, die in die Apoptose übergehen,^[65] beim akuten Nierenversagen,^[66] bei Arthritis,^[67] Restenose^[68] und bei der Angiogenese^[69-71] eine Rolle. Darüber

hinaus ist er an verschiedenen Stellen bei Tumormetastaseprozessen beteiligt^[72]. Eine Bedeutung bei der Neovaskularisation in der Netzhaut konnte im Modell der hypoxischen Maus nachgewiesen werden.^[73]

Obwohl die $\beta 5$ -Untereinheit eine hohe Homologie zu der $\beta 3$ -Untereinheit zeigt^[74,75] und die Integrine $\alpha \nu \beta 3$ und $\alpha \nu \beta 5$ hinsichtlich ihrer Funktionen eng verwandt sind, weisen sie dennoch einige Unterschiede auf. So bindet $\alpha \nu \beta 5$ bevorzugt an Vitronectin und im Gegensatz zu $\alpha \nu \beta 3$ -abhängigen Zellen benötigen $\alpha \nu \beta 5$ -abhängige Zellen zum *spreading* und zur Migration zusätzlich eine Aktivierung durch die Proteinkinase C (PKC).^[76]

Die wichtigsten Phänomene, an denen der $\alpha \nu \beta 3$ und $\alpha \nu \beta 5$ -Rezeptor beteiligt sind, sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

2.3 Die Integrine $\alpha \nu \beta 3$ und $\alpha \nu \beta 5$ bei Tumormetastasierung und Angiogenese

Die Metastasierung von Tumoren, die als Hauptursache des tödlichen Verlaufs der meisten Krebserkrankungen zu betrachten ist, setzt ein invasives Verhalten der Zellen des Primärtumors voraus. Für das Wandern der Zellen im Organismus müssen eine Reihe von Matrixproteinbarrieren überwunden und die Anlagerung an anderes Gewebe ermöglicht werden. Daher sind bei der Tumormetastasierung sowohl proteolytische Prozesse, die vor allem das kollagene Bindegewebe betreffen, als auch eine Reihe unterschiedlicher Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt.

Diese Wechselwirkungen erlangen erst Bedeutung wenn die Tumorzelle bei der sogenannten Extravasation den Zellverband des Primärtumors verläßt und über das lymphatische System oder den Blutkreislauf in den Organismus einwandert.^[52,77-79] Aber auch beim Festsetzen im Kapillarsystem des Zielorgans sind verschiedene Adhäsionsprozesse involviert (siehe Abbildung 2.1).

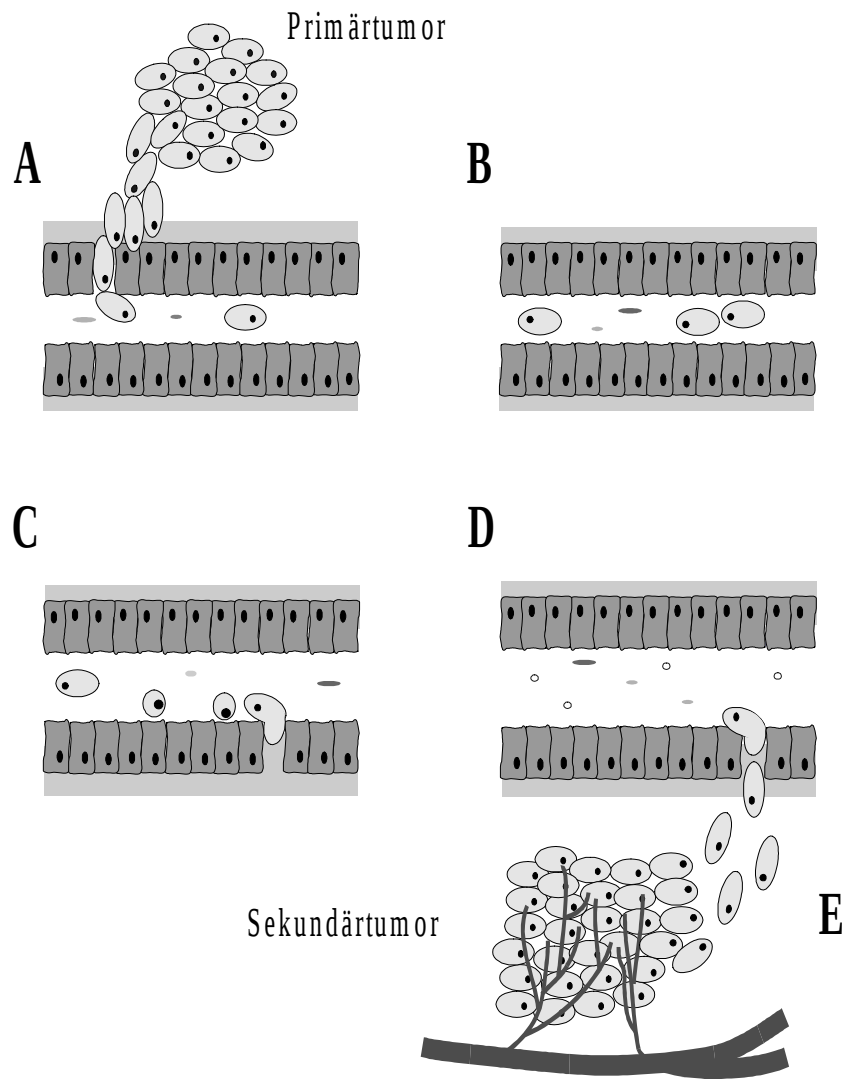


Abbildung 2.2: Phasen der Tumormetastasierung. A) Ablösen der Krebszellen vom Primärtumor und Invasion; B) Wanderung im Blut- oder Lymphsystem; C) Adhäsion im Kapillarsystem; D) Extravasation; E) Festsetzen in fremdem Gewebe und tumor-induzierte Angiogenese.

Eine große Anzahl verschiedener Studien über die Expression von Integrinen auf Tumorzellen zeigt, daß Integrine, die vor allem bei der Ausbildung fester Kontakte und der Gewebeorganisation zum Einsatz kommen, häufig in geringerem Maße exprimiert werden.^[80-84] Im Gegensatz dazu werden Integrine, die hauptsächlich an der Migration durch das Gewebe beteiligt zu sein scheinen, verstärkt gebildet. So wurde sowohl der $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor^[85-89] als auch der $\alpha v \beta 5$ -Rezeptor^[88,89] bei zahlreichen Tumorarten gefunden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Migration bestimmter Melanomzellen auf immobilisiertem Vitronectin (Haptotaxis) durch $\alpha v \beta 3$, nicht aber durch $\alpha v \beta 5$, vermittelt wird.^[90] Im Gegensatz dazu verläuft die Haptotaxis von

Proteinkinase C (PKC) aktivierten Melanomzellen hauptsächlich über einen $\alpha v \beta 5$ -abhängigen Mechanismus.^[76] Die Inhibierung dieser Integrine könnte somit die Migration der Tumorzellen einschränken und die Tumormetastasierung unterdrücken.

Die Ausbildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Organen, bei der Wundheilung und bei Entzündungen. Die Aktivierung der Endothelzellen der Blutgefäße und die Regulierung beim Aufbau neuer Kapillaren wird von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, wie z. B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor*) und Angiogenin, übernommen.^[91] Die stimulierten Endothelzellen exprimieren Proteasen, welche die Basalmembran abbauen, so daß die Endothelzellen in Richtung des Stimulus in das Stroma eindringen können.^[92] Das chemotaktische sowie das haptotaktische Verhalten wird dabei von Zell-Adhäsions-Rezeptoren kontrolliert.^[90,93] Außerdem wird diskutiert, daß das Ausbleiben von speziellen Zell-Matrix-Wechselwirkungen die an der Angiogenese beteiligten Endothelzellen veranlaßt, in die Apoptose überzugehen. Dies unterbindet die Neovaskularisation.^[94]

Krebszellen sind ebenfalls auf die Angiogenese angewiesen. Sie gewährleistet eine ausreichende Versorgung des Primärtumors mit Nährstoffen, die für sein aggressives Wachstum erforderlich ist. Außerdem werden die neu gebildeten Blutbahnen von den Krebszellen häufig verwendet, um in den Blutkreislauf zu gelangen. Ebenso wichtig ist die Ausbildung neuer Blutgefäße für die Sekundärtumore (Metastasen), denn auch sie sind ohne eine ausreichende Nährstoffversorgung nicht überlebensfähig (Abbildung 2.3).^[70,92,95]

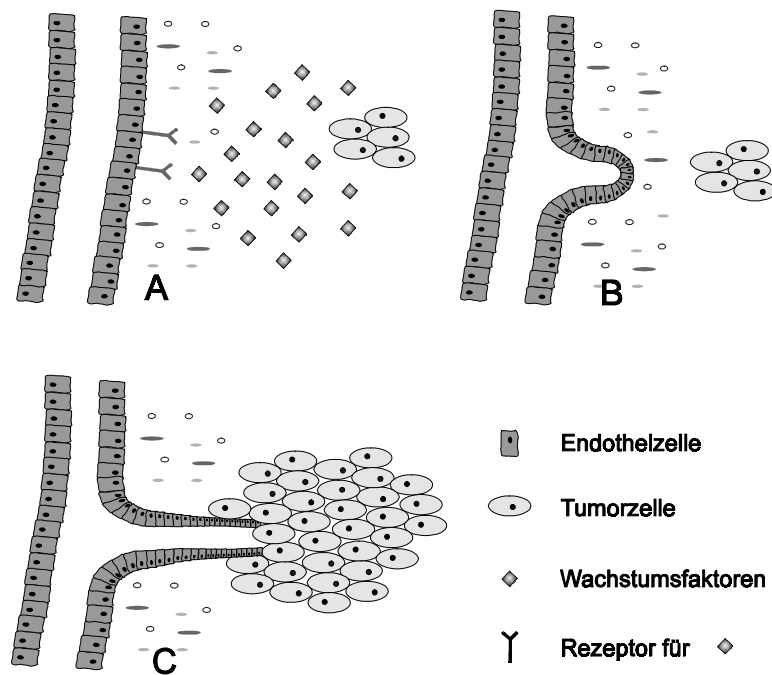


Abbildung 2.3: Tumorinduzierte Angiogenese. Die Tumorzelle stimuliert benachbarte Endothelzellen durch Freisetzen von Angiogenesefaktoren wie bFGF oder VEGF zur Proliferation (A). Proteolytische Enzyme werden freigesetzt und eine Veränderung des Rezeptorstatus der Endothelzellen hervorgerufen (verstärkte Expression der Integrine $\alpha\beta3$ oder $\alpha\beta5$). Dies ermöglicht eine zielgerichtete Invasion der extrazellulären Matrix in Richtung der Tumorzellen unter Ausbildung neuer Blutgefäße (B), welche das Gewebe mit Nährstoffen versorgen und so das Tumorstadium ermöglichen (C).

Brooks *et al.* konnten zeigen, daß der $\alpha\beta3$ -Rezeptor auf Zellen der Blutgefäße des Granulationsgewebes stark exprimiert wird, nicht aber auf Zellen der Blutgefäße des normalen Gewebes.^[93] Dies erklärt den Befund, daß spezifische $\alpha\beta3$ -Antikörper oder das von Gurrath^[96] synthetisierte Cyclopeptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* mit hoher $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Affinität die bFGF induzierte Angiogenese blockieren, aber keinen Effekt auf schon existierende Blutgefäße haben.^[94] Auch die tumorinduzierte Angiogenese kann durch die genannten Antagonisten inhibiert werden. Für diese Experimente wurde ein Melanomfragment (*human M21-L*) ausgewählt, das selbst keine $\alpha\beta3$ -Rezeptoren besitzt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Angiogenese direkt durch die Blockierung von Zellen der Blutgefäße inhibiert wird und die Tumorzellen nicht beeinflußt werden. Darüber hinaus kann der Angiogenese-prozeß jedoch über mindestens zwei unterschiedliche Wege verlaufen.^[97] So wird sowohl die bFGF- als auch die TNF- α stimulierte Angiogenese von dem $\alpha\beta3$ -Rezeptor vermittelt, während die VEGF stimulierte Angiogenese über den $\alpha\beta5$ -Rezeptor verläuft.

Diese Untersuchungen zeigen, daß sowohl der $\alpha v \beta 3$ - als auch der $\alpha v \beta 5$ -Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der durch verschiedenste Faktoren induzierten Angiogenese spielen. Obwohl neuste Untersuchungen zeigen, daß einige besonders aggressive Melanome den physiologischen Angiogenese-prozeß umgehen, indem sie „selbst“ aus Melanomzellen Blutgefäße ausbilden,^[98] bleibt die Blockierung der tumorinduzierten Angiogenese durch die Inhibierung des $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ -Rezeptors ein vielversprechendes Ziel im Kampf gegen die Metastasenbildung.

2.4 Die Rolle des $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ -Integrins bei Osteoporose, Knochenneubildung und akutem Nierenversagen

Auch im Knochenstoffwechsel spielen integrinvermittelte Zelladhäsionsvorgänge eine Rolle. So findet die Anbindung der Osteoclastenoberfläche an extrazelluläre Knochenmatrixproteine wie Osteopontin über das $\alpha v \beta 3$ -Integrin statt.^[99] Die Matrixkomponenten liegen dabei als zellgebundene oder freie Liganden des Integrinrezeptors vor.^[100] Die feste Anbindung der Osteoclasten an die Knochenmatrix und anschließende Sekretion von Säure und proteolytischen Enzymen ermöglicht diesen, Matrixproteine und mineralische Knochenbestandteile zu degradieren. Die Anbindung der Osteoclasten an die Knochenmatrix stimuliert aber wiederum die Proliferation von Osteoblasten, den Knochensubstanz-aufbauenden Zellen. Auch diese wechselwirken über das $\alpha v \beta 3$ -Integrin mit dem Knochengewebe. Dieser Prozeß wird jedoch neben dem $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor auch von anderen Integrinen vermittelt.^[101] Somit sollten $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten hauptsächlich die Adhäsion der Osteoclasten inhibieren und dadurch die Knochenresorption unterdrücken. Tatsächlich konnte in *in vitro* Versuche gezeigt werden, daß synthetische Peptide, welche die Aminosäure-Sequenz -Arg-Gly-Asp-enthalten, die Knochenresorption isolierter Osteoclasten inhibieren können.^[100,102] Auch mit dem Disintegrin Echistatin ($\beta 3$ -selektiv) konnte in ersten *in vivo* Studien an Ratten eine Knochenresorption inhibiert werden.^[103]

Ein dazu inverser Ansatz kann genutzt werden, um Knochenimplantate in natürliches Knochengewebe zu integrieren. So konnte mehrfach gezeigt werden, daß die Beschichtung verschiedener Materialien mit RGD-haltigen Peptiden die Adhäsion von Zellen an die Oberfläche vermitteln kann.^[104-109] In unserem Arbeitskreis wurde zur

Beschichtung des gängigen Implantatmaterials Polymethylmethacrylat (PMMA) ein $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ -spezifisches cyclisches Peptid mit optimiertem Spacer entwickelt.^[110,111] Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Osteoblastenkulturen, auf denen sowohl der $\alpha v \beta 3$ - als auch $\alpha v \beta 5$ -Rezeptor nachgewiesen wurden, an die mit dem cyclischen Peptid beschichteten Polymeroberflächen banden.^[110] Im Hinblick auf eine breite kommerzielle Anwendung dieser Beschichtungstechnik ist die Entwicklung von nichtpeptidischen und synthetisch leichter zugänglicheren Liganden von Interesse.

Beim akuten Nierenversagen, dem plötzlichen Erliegen der Ausscheidungsfunktion beider Nieren, sind eine Reihe von pathophysiologischen Prozesse und verschiedene Zelladhäsionsmoleküle involviert.^[112-114] Gemäß einer von Goligorsky *et al.* entwickelten Arbeitshypothese verlieren die Epithelzellen der Nierenkanälchen im Verlauf des akuten Nierenversagens ihre Polarität. D. h. die Integrine, die zuvor zum größten Teil an die extrazelluläre Matrix gebunden waren (polarisierter Zustand), lösen teilweise ihre Bindung und verteilen sich zufällig über die gesamte Zelloberfläche (unpolarisierter Zustand). Dieser Polarisationsverlust der Epithelzellen der Nierenkanälchen konnte durch immunhistologische Untersuchung im Tiermodell nachgewiesen werden.^[115,116] Im Zusammenhang mit dem Verlust der polarisierten Integrinverteilung werden zwei Aspekte diskutiert. Zum einen könnte der Bindungsverlust an die extrazelluläre Matrix Apoptose induzieren, zum anderen könnten Integrine, die in das Kapillarinere zeigen, andere abgelöste Zellen und Matrixfragmente binden und somit die Gefäße verengen (siehe Abbildung 2.4). Insbesondere der letztgenannte Prozeß sollte durch Applikation eines geeigneten Integrinantagonisten unterdrückt werden. Tatsächlich konnte durch direkte Gabe von peptidischen $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten wie *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* in die Nierenarterie die Regenerationsphase nach Eintreten des Nierenversagens wesentlich verkürzt werden.^[117-119]

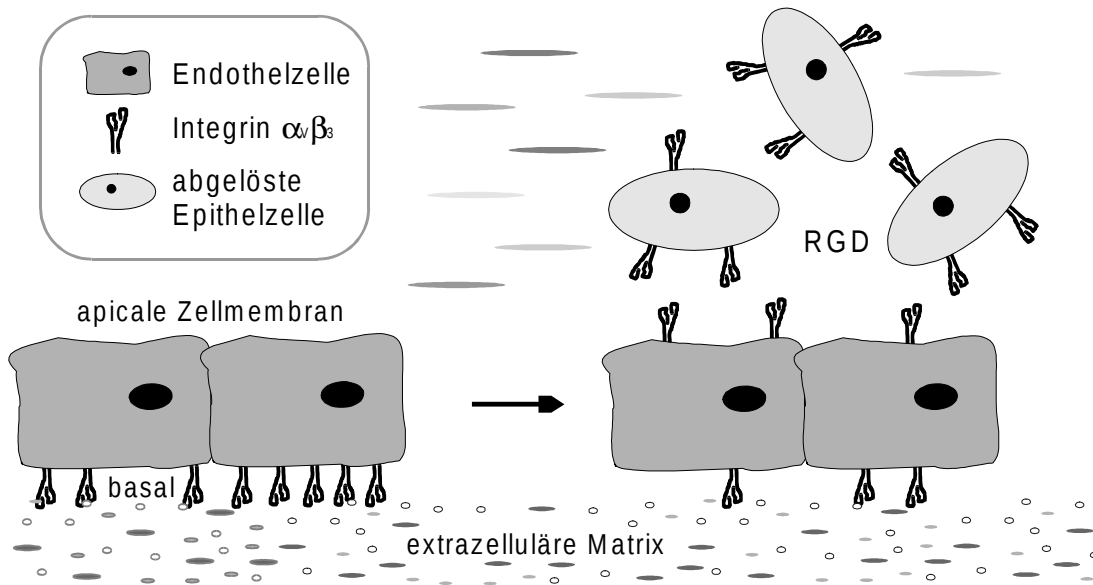


Abbildung 2.4: Die Rolle der Integrine von Epithelzellen in den Nierenkanälchen beim akuten Nierenversagen. Die Umorientierung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrine von einer zunächst basolateralen Orientierung (links) zur apicalen Membran ermöglicht eine RGD-abhängige Adhäsion von frei zirkulierenden abgelösten Zellen und Matrixfragmente (rechts). Dies trägt entscheidend zur Verengung der kapillaren Gefäße der Niere bei.

2.5 Synthetische $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten als Therapeutika

Der Blutplättchenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ erlangte als erstes Mitglied der Integrinfamilie therapeutische Bedeutung, da durch seine Inhibierung die Blutplättchenaggregation unterdrückt werden kann. Inzwischen wurden einige oral verfügbare $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten entwickelt, die derzeit verschiedene Phasen der klinischen Prüfung durchlaufen.^[29,120,121] Aufgrund der hohen pharmazeutischen Potentiale wurden in den letzten Jahren jedoch große Anstrengungen unternommen, hochaffine und gegenüber $\alpha_{IIb}\beta_3$ hochselektive Antagonisten für den $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor zu entwickeln.

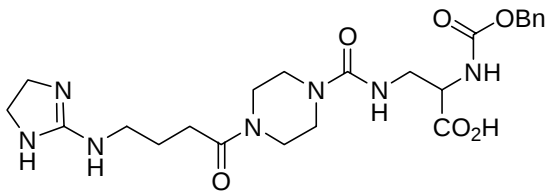
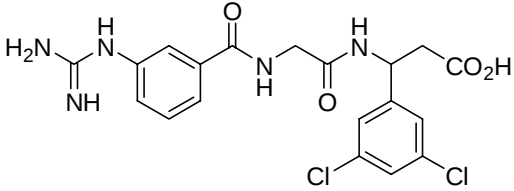
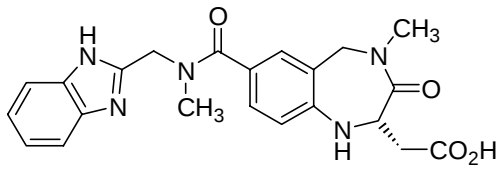
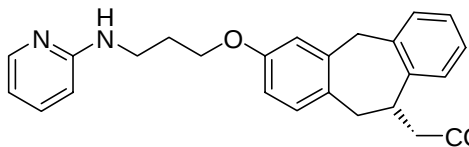
Die erste selektive Inhibierung des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors gelang mit dem monoklonalen Antikörpern LM609, der bereits in klinischen Phase-I-Studien unter dem Namen Vitaxin geprüft wurde.^[30,122,123] Kurze Zeit später wurden in unserem Arbeitskreis zahlreiche RGD-haltige $\alpha_v\beta_3$ -selektive Inhibitoren entwickelt,^[96,117,124-129] von denen das Cyclopeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (1) in zahlreichen Tiermodellen untersucht wurde (siehe Kap. 2.3). Ein *N*-Methyl-scan dieser Leitstruktur lieferte schließlich mit dem Cyclopeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-) (2) eine

Verbindung, welche die Bindung von Vitronectin an $\alpha v\beta 3$ ebenfalls mit Aktivitäten im nanomolaren Bereich inhibiert^[130] und kürzlich die klinische Phase-I-Studie erfolgreich abgeschlossen hat. Darüber hinaus wurde *in vivo* ein ausgeprägter synergistischer Effekt zwischen dem Peptid **2** und einem Fusionsprotein, bestehend aus tumorspezifischem Antikörper und Interleukin 2, nachgewiesen. So konnte an Mäusen gezeigt werden, daß die kombinierte Anwendung von Peptid **2** mit dem Fusionsprotein zu einer verstärkten Rückbildung der Tumoren führte. Dagegen führte die isolierte Applikation dieser Substanzen jeweils nur zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums.^[131] Wermuth^[132] und Schmitt^[133] konnten zudem zeigen, daß das Glycin der Cyclopeptide **1** und **2** ohne Aktivitätsverlust gegen Azaglycin ausgetauscht werden kann (siehe Verbindungen **3** und **4** in Tabelle 2.2). Dieses Ergebnis ist von zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit (siehe Kap. 4).

Inzwischen wurden in der Literatur bereits einige nichtpeptidische $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten beschrieben, die zum Teil auch in Tiermodellen auf biologische Aktivität untersucht wurden (siehe Tabelle 2.2).^[134-144] So fanden DeGrado *et al.* mit Hilfe paralleler Festphasensynthese von 24 RGD-Mimetika die hochaktive und gegenüber $\alpha IIb\beta 3$ hochselektive Verbindung **5**.^[134] Die von der Firma Searle entwickelte Verbindung **6** zeigt *in vitro* bei moderater Selektivität ebenfalls eine sehr gute Affinität zu $\alpha v\beta 3$. Zudem verhindert diese Verbindung die Proliferation von Endothelzellen in Zellkulturen und inhibiert *in vivo* sowohl die bFGF-induzierte Angiogenese als auch das Tumorwachstum bei Ratten bzw. Mäusen.^[135] Einen beachtlichen Erfolg bei der Entwicklung von nichtpeptidischen Integrinantagonisten kann die Firma SmithKline Beecham Pharmaceuticals vorweisen. 1993 berichtete eine Forschergruppe dieser Firma von der Synthese eines 3-Oxo-1,4-benzodiazepins mit hoher Affinität und Selektivität für den Blutplättchenrezeptor $\alpha IIb\beta 3$.^[145,146] Dieser $\alpha IIb\beta 3$ -Antagonist diente der selben Forschergruppe als Leitstruktur bei der Entwicklung einer Reihe von $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten, von denen das 3-Oxo-1,4-benzodiazepin **7** mit einem IC_{50} -Wert von 2.0 nM für den $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor und einer ca. 10000fachen Selektivität gegenüber dem $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin die besten Bindungseigenschaften besitzt.^[136] Kurze Zeit später gelang es, von dem 3-Oxo-1,4-benzodiazepin **7** die Verbindung **8** mit stark reduziertem Heteroatomanteil unter Erhalt der Aktivität und Selektivität abzuleiten.^[142] Diese Verbindung zeigt im Vergleich zu **7** ein deutlich verbessertes pharmakokinetisches

Profil: Die Halbwertszeit in der Ratte stieg von 9-16 min auf akzeptable 181-378 min und die orale Bioverfügbarkeit verbesserte sich von 3-7% auf etwa 100%.^[142] Darüber hinaus ergaben *in vivo*-Studien an Ratten, daß die intravenöse, aber auch die orale Applikation dieser Verbindung die Knochenresorption verhindert.^[147]

Tabelle 2.2: Auswahl von selektiven $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten

Nr.	Struktur	IC ₅₀ [nM]			Ref.
		$\alpha v\beta 3$	$\alpha v\beta 5$	$\alpha IIb\beta 3$	
1	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)	2.5	?	1700	[96]
2	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-)	5.5	?	5200	[130]
3	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-Val-)	3.5	?	5800	[132]
4	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-)	6.0	?	1600	[133]
5		1.1	420	20000	[134]
6		1.1	?	152	[135]
7		2.0	?	30000	[136]
8		4.0	1.3	9000	[142]

Obwohl also bereits eine Reihe von $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten mit zum Teil guten pharmakokinetischen Eigenschaften gefunden wurden, ist die Entwicklung von aktiven und selektiven Integrinantagonisten nicht abgeschlossen. Die meisten Integrinantagonisten wurden bisher jeweils nur auf Selektivität zwischen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$

untersucht. Viele der untersuchten Verbindungen zeigen aber, wenn überhaupt bekannt, nur geringe Aktivitätsunterschiede zwischen dem $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor (vergleiche dazu auch Tabelle 2.2). Darüber hinaus wurden bisher mindestens acht weitere RGD-abhängige Integrine gefunden (siehe Tabelle 2.1), die möglicherweise auch durch die bisher bekannten RGD-Mimetika inhibiert werden könnten. Um potentiellen Nebenwirkungen vorzubeugen, sollten diese Antagonisten jedoch möglichst spezifisch nur an einen Rezeptor binden. Vor diesem Hintergrund bleibt die Erschließung möglichst universeller Zugänge zu neuen Integrininhibitoren auch weiterhin eine wichtige Aufgabe der medizinischen Forschung.

3 Grundlagen zur kombinatorischen Synthese

Innerhalb weniger Jahre hat sich die kombinatorische Synthese von einer kaum beachteten Randerscheinung zu einem wichtigen Teilgebiet der Wirkstoffforschung entwickelt. Mit modernen molekularbiologischen Methoden ist es möglich, Proteine (*targets*) zu identifizieren und bereitzustellen, die mit bestimmten pathologischen Prozessen ursächlich in Verbindung stehen. Die daraus resultierende Möglichkeit, die Wirksamkeit einer großen Zahl von Substanzen in kurzer Zeit mit Hilfe des *high throughput screenings* bestimmen zu können, haben zu einem Paradigmenwechsel bei der Synthese von Testsubstanzen geführt. Neben der konventionellen Vorgehensweise, eine Substanz *nach* der anderen zu synthetisieren, ist das Interesse an Methoden stark gestiegen, mit denen es gelingt, viele definierte Substanzen *gleichzeitig* herzustellen. Dieser Anforderung wird die kombinatorische Synthese gerecht. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß in einer Synthesestufe nicht nur mit einem Synthesebaustein, sondern mit vielen – parallel oder in Mischung – umgesetzt wird. In jeder Stufe werden alle möglichen Kombinationen gebildet, so daß aus nur wenigen Bausteinen eine große Zahl an Produkten, eine „Verbindungsbibliothek“ entsteht. Die Aufgabe der kombinatorischen Synthese ist es, rasch eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Substanzen bereitzustellen, um in Kombination mit effizienten molekularbiologischen Testmethoden wie dem *high throughput screening* sowohl die Suche nach neuen Leitstrukturen als auch die Leitstrukturoptimierung zu beschleunigen. Der entscheidende Vorteil dieser Vorgehensweise ist ihre universelle Anwendbarkeit, da sie im Gegensatz zum rationalen Wirkstoffdesign nicht zwingend die Kenntnis der Target- oder Ligandenstruktur voraussetzt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Prinzipien der kombinatorischen Synthese niedermolekularer Verbindungen gegeben und anhand einiger Beispiele erläutert.

3.1 Prinzip und Historie der kombinatorischen Synthese

Die Anleitung zur kombinatorischen Synthese liefert die Natur. Ihr gelingt es, aus 21 natürlichen Aminosäuren eine beliebig große Zahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen aufzubauen. Schon die Kombination aller natürlicher Aminosäuren zu allen möglichen Hexapeptiden liefert die astronomisch hohe Zahl von

21^6 verschiedenen Verbindungen. Diese Verbindungen in einer akzeptablen Zeit tatsächlich zugänglich zu machen, ist Ziel der kombinatorischen Synthese.

Das zugrundeliegende Prinzip der kombinatorischen Synthese ist denkbar einfach. Statt zwei Edukte **A** und **B** zu einem Produkt **AB** zu verknüpfen, setzt man in einer kombinatorischen Synthese strukturell unterschiedliche Bausteine vom Typ **A** (**A**¹-**A**ⁿ) mit Bausteinen vom Typ **B** (**B**¹-**B**ⁿ) um, wobei jeder Baustein **A** mit jedem Baustein **B** reagiert (siehe Abbildung 3.1 a). Dies kann parallel in getrennten Gefäßen sowie simultan in einer Mischung durchgeführt werden. Setzt man auf diese Weise 10 Verbindungen vom Typ **A** mit 10 Verbindungen vom Typ **B** um, erhält man bereits 100 Produkte.

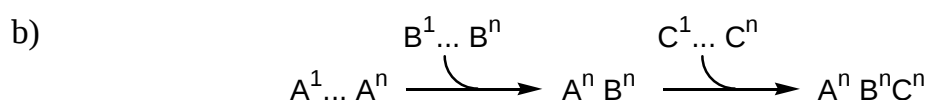
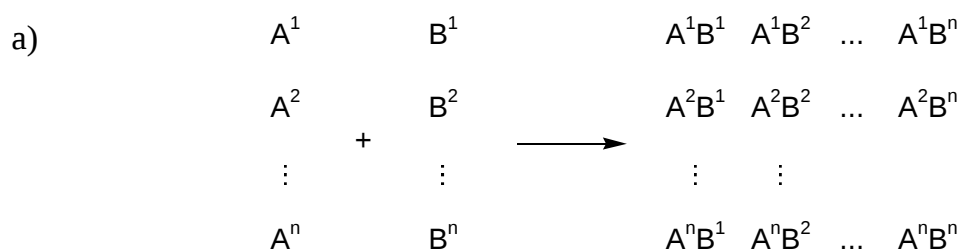


Abbildung 3.1: a) Prinzip der kombinatorischen Synthese. b) Prinzip der mehrstufigen kombinatorischen Synthese.

Dieses Prinzip kann aber auch auf mehrstufige Synthesen, wie sie in der Wirkstoffforschung die Regel sind, ausgeweitet werden und dadurch die Anzahl der erzeugten Produkte pro eingesetztem Edukt noch gesteigert werden. Bei einer zweistufigen Synthese mit jeweils 10 Bausteinen vom Typ **A**, **B** und **C** erhält man bereits $10^3 = 1000$ Produkte (siehe Abbildung 3.1 b).

Das Potential, mit Hilfe kombinatorischer Synthese Substanzbibliotheken herzustellen, wurde zuerst von Peptidchemikern erkannt. Aufbauend auf den Techniken der Festphasensynthese nach Merrifield^[148] gelten die Arbeiten von Furka in den 80er Jahren als Geburtsstunde der kombinatorischen Chemie.^[149,150] Etwa zeitgleich wurden von Geysen *et al.* die parallele Festphasensynthese von Peptiden

erarbeitet,^[151] wobei das Potential dieser Methode durch Optimierung und Miniaturisierung extrem gesteigert werden konnte.^[152,153] Peptide weisen jedoch als Wirkstoffe oft Nachteile auf, wie geringe Bioverfügbarkeit und leichter proteolytischer Abbau. Daher hat sich das Interesse der Forschung auf dem Gebiet der kombinatorischen Synthese in den letzten Jahren zunehmend auf Bibliotheken niedermolekularer organischer Verbindungen konzentriert. Ein Beleg für diesen Trend ist die im letzten Jahrzehnt stark gestiegene Zahl an erschienenen Übersichtsartikel zu dieser Thematik.^[154-172]

3.2 Aspekte und Methoden der kombinatorischen Synthese

3.2.1 Diversität

Schätzungen zufolge beträgt die Zahl der möglichen organischen Verbindungen mit einer relativen Molekülmasse <750 etwa 10^{200} .^[154] Trotz des hohen Potentials der kombinatorischen Synthese ist es daher unmöglich alle denkbaren Verbindungen, die als Wirkstoffkandidaten in Frage kämen, zu synthetisieren. So muß grundsätzlich in jeder kombinatorischen Synthese eine Auswahl an Bausteinen sowie der herzustellenden Produkte getroffen werden. Die Chance, in einer Bibliothek aktive Verbindungen zu finden, ist um so größer, je unähnlicher die Strukturen der enthaltenen Verbindungen sind. Die Testsubstanzen sollten also hinsichtlich eines bestimmten Testsystems möglichst divers sein. Diese Diversität zu bestimmen, ist eine der größten Herausforderungen auf dem Gebiet der kombinatorischen Synthese – ist aber bis heute nur ansatzweise realisierbar. Obwohl in der Vergangenheit viele Versuche unternommen wurden, geeignete Computerprogramme zur Lösung dieses Problems zu entwickeln, ist die Qualität dieser virtuellen Analysen schwer zu validieren, da sich Diversität im Experiment kaum nachweisen läßt.^[173-175] Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur qualitativen Diversitätsabschätzung eine Definition von Balkenhohl *et al.* verwendet.^[154] Danach wird ein Satz von Verbindungen als divers bezeichnet, wenn durch diese möglichst viele unterschiedliche Pharmakophormuster vertreten sind.

Eine Verbindungsbibliothek zum Auffinden einer neuen Wirkstoffleitstruktur sollte somit maximale Diversität aufweisen (*random library*). Soll jedoch, wie in der vorliegenden Arbeit, eine bereits bekannte Leitstruktur optimiert werden, oder liegen

über den biologischen Wirkort bereits Informationen vor, so werden die entsprechenden Bibliotheken von vergleichsweise niedriger Diversität sein (*focused* oder *biased library*).

3.2.2 Methoden und Techniken

Zu Beginn einer kombinatorischen Syntheseplanung muß eine grundsätzliche Entscheidung getroffen werden: Sollen die Substanzen in Lösung oder an einem polymeren Träger synthetisiert werden? Die Vorteile der kombinatorischen Synthese in Lösung scheinen auf der Hand zu liegen. Die aus der klassischen Chemie bekannten Reaktionen können ohne weitere Entwicklungsarbeit übernommen werden. Aus kombinatorischen Synthesen in Lösung resultieren jedoch zwangsläufig Gemische, deren Dekonvolution (siehe Kap. 3.2.5) unter erheblichem Zeit- und Arbeitsaufwand verläuft. Die automatisierte oder semiautomatisierte parallele Synthese von Einzelverbindungen in Lösung wird aber vermutlich in Zukunft eine interessante Technik zum Auffinden neuer Wirkstoffleitstrukturen bleiben, wird aber bei den folgenden Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt.

3.2.2.1 Das Prinzip der Festphasensynthese

Die Techniken der Festphasensynthese (siehe Abbildung 3.2) wurden Anfang der 60er Jahre ursprünglich zur Peptidsynthese entwickelt.^[148] Erst etwa zwei Dekaden später wurden die ersten organischen Festphasensynthesen beschrieben.^[176,177] Bei Festphasensynthesen sind die aufzubauenden Moleküle während der Synthese über einen Linker an einen polymeren Träger gebunden (siehe Abbildung 3.2). Die Linker sind inzwischen in einer großen Vielfalt kommerziell erhältlich, so daß die Bedingungen, unter denen die Produkte abgelöst werden, nahezu beliebig gewählt werden können.^[178]

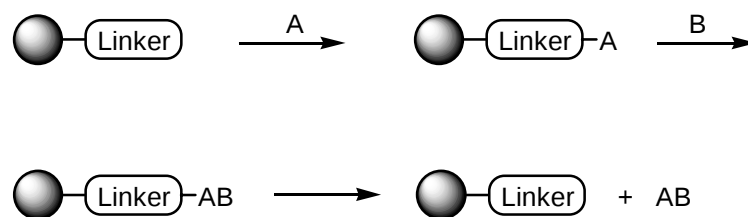


Abbildung 3.2: Prinzip der Festphasensynthese

Mit Blick auf die kombinatorische Synthese bietet die Festphasensynthese gegenüber der konventionellen Synthese in Lösung einige Vorteile. Durch die Verwendung hoher Überschüsse an gelösten Reagenzien können Reaktionen beschleunigt und vollständige Umsätze erzwungen werden. Komplexe Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte werden durch einfaches Waschen des Trägers am Ende jeder Reaktion ersetzt. So ermöglicht die Festphasensynthese die vollständige Automatisierung auch mehrstufiger Synthesen. Zwar hat die Synthese niedermolekularer organischer Verbindungen an der Festphase den hohen Entwicklungsstand der Peptid- und Nucleotidsynthese noch nicht erreicht. Durch die steigenden Forschungsanstrengungen der letzten Jahre konnte inzwischen aber bereits eine große Zahl klassischer organischer Reaktionen an der Festphase realisiert werden.^[179-181]

3.2.3 Die Split-Methode nach Furka

Zur Synthese definierter Mischungen ist es naheliegend, in jedem Reaktionsschritt Mischungen von Reaktanten einzusetzen, so daß in einem Reaktionsgefäß gleichzeitig mehrere Produkte entstehen (vgl. Abbildung 3.1 a). Die Produkte entstehen jedoch nur dann in äquimolaren Mengen, wenn alle Reaktanten annähernd die gleiche Reaktivität aufweisen. Dieser Anforderung werden jedoch die wenigsten organischen Synthesen gerecht. Dies kann dazu führen, daß bestimmte Reaktionsprodukte in sehr geringen Mengen oder überhaupt nicht gebildet werden.

Dieses Problem unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten wird durch die Split-Methode nach Furka elegant umgangen.^[149,150] Mit ihr läßt sich eine effiziente Synthese äquimolarer Substanzmischungen erreichen. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, wird der feste Träger in z. B. drei gleiche Teile aufgeteilt und jedes der drei Aliquote mit je einem Synthesebaustein des Typs **A** umgesetzt. Nach Mischen der entstandenen Produktharze und erneutem Aufteilen erhält man drei Gemische, in denen die

harzgebundenen Komponenten A^1 , A^2 und A^3 in äquimolaren Mengen vorhanden sind. Diese werden einzeln mit B^1 - B^3 umgesetzt und ergeben schon insgesamt neun definierte Produkte. Da sich zu jeder Zeit in jedem Reaktionsgefäß nur ein Reaktant in Lösung befindet, der mit einer mehr oder weniger großen Zahl verschiedener trägergebundener Reaktionspartner reagiert, können alle Reaktionen trotz eventuell unterschiedlicher Kinetiken bis zum vollständigen Umsatz geführt werden. Die Wiederholung des Cyclis bestehend aus Aufteilen, Reaktion und Vereinigen führt in kurzer Zeit zu großen Substanzbibliotheken, in denen alle Verbindungen nach Abspalten vom festen Träger in äquimolaren Mengen vorliegen. Der offensichtliche Vorteil ist, daß in neun Reaktionsschritten aus neun Synthesebausteinen 27 Produkte entstehen; bei der Synthese von Einzelsubstanzen würde man dazu 81 Reaktionsschritte benötigen.

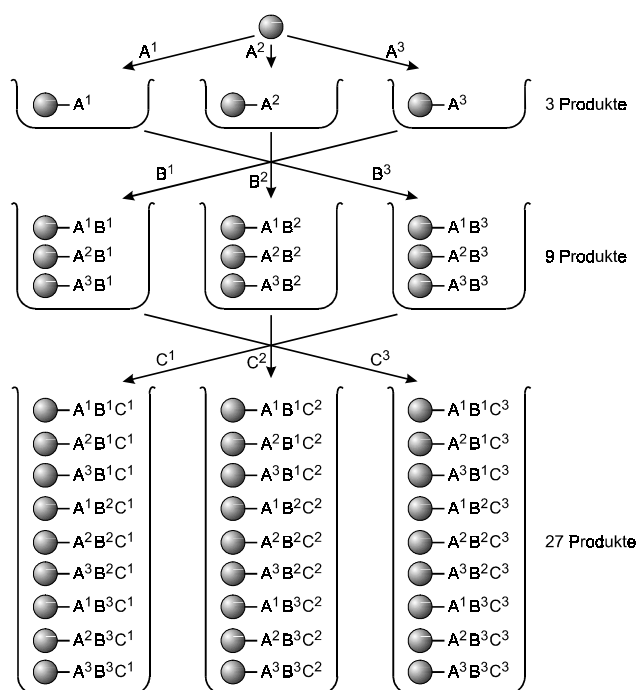


Abbildung 3.3: Die Split-Methode nach Furka. Nach jeder Synthesestufe wird der feste Träger gemischt, in gleiche Teile aufgeteilt und mit einem Synthesebaustein umgesetzt. Danach werden die Harze gemischt und erneut aufgeteilt. Im hier gezeigten Beispiel entstehen in neun Reaktionsschritten aus neun Synthesebausteinen 27 Produkte in äquimolaren Mengen.^[149,150] Auf jedem Harzkügelchen befindet sich jeweils immer nur eine Verbindung in vielfacher Kopie.^[182]

3.2.4 Das *one-bead one-compound*-Konzept

Anfang der 90er Jahre erkannten Lam *et al.*, daß das Potential der Split-Methode mit dem Erzeugen äquimolarer Substanzbibliotheken nicht vollständig ausgeschöpft ist. Sie nutzten erstmals die Besonderheit, daß sich auf jedem Partikel (*bead*) einer solchen Bibliothek genau eine Verbindung in vielfacher Kopie befindet (*one-bead one-compound*).^[182] Ihre Strategie sah vor, mit geeigneten Proteinen (z. B. mit Antikörpern) diejenigen *beads* zu detektieren, deren Substanzen spezifisch mit diesen Proteinen wechselwirken (*on-bead screening*). Anschließend sollten die positiven *beads* manuell aussortiert und die Struktur der gebundenen Verbindungen analysiert werden. Dazu inkubierten sie eine nach der Split-Methode hergestellte Pentapeptidbibliothek mit Streptavidin- bzw. einem monoklonalen Antikörper-Alkalinphosphatase-Konjugat und färbten anschließend mit Standardsubstraten an. Die intensiv gefärbten *beads* wurden aussortiert und die Struktur der aktiven Peptide per Sequenzanalyse bestimmt. Seither konnte das *one-bead one-compound*-Konzept auf zahlreiche Targets erfolgreich angewendet werden.^[170] Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Methode auf die Substanzklasse der Azapeptide auszudehnen (siehe Kap. 4).

3.2.5 Strukturbestimmung der aktiven Substanzen

Die wohl größte Herausforderung der kombinatorischen Synthese ist die Strukturbestimmung einer diskreten Verbindung aus einer Substanzbibliothek. Soll die biologische Evaluation in Lösung durchgeführt werden, müssen die Substanzbibliotheken vom festen Träger abgespalten werden. Zur Bestimmung der aktiven Verbindung der so erhaltenen Substanzmischungen in Lösung wurden verschiedene Strategien beschrieben. Eine breit anwendbare aber auch sehr zeitaufwendige und arbeitsintensive Methode ist die Dekonvolution (Enfaltung). Sie beruht auf der Eingrenzung der aktiven Verbindung durch iterative Synthese und anschließender biologischer Evaluation von Subbibliotheken einer aktiven Substanzbibliothek. Diese Methode wurde im Zusammenhang mit der Split-Methode von Furka^[149] skizziert und später mit Peptid- bzw. Oligonucleotidbibliotheken praktisch umgesetzt.^[183-185]

In der Positionsanalyse (*positional screening*) werden Subbibliotheken erzeugt, in denen jeweils ein Baustein konstant gehalten wird. Es muß also pro eingesetztem Baustein eine Subbibliothek synthetisiert werden. Der Test aller Subbibliotheken gibt im Idealfall sofort Aufschluß über die aktive Bausteinkombination.^[169,186] Liegt allerdings in einer Position keine klare Präferenz für einen bestimmten Baustein vor, müssen alle Kombinationen der bevorzugten Bausteine synthetisiert werden, um die aktivste Verbindung zu finden.

Ein interessanter Ansatz zur biologischen Evaluation gelöster Substanzmischungen ist die Affinitätsselektion. Zuckermann *et al.* inkubierten kleine Peptidbibliotheken mit Antikörpern und konnten nach Elution die Struktur der gebundenen und somit affinen Peptide durch Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse aufklären.^[187] Die Kombination von Massenspektrometrie mit Affinitätskapillarelektrophorese erlaubt zudem die simultane Selektion und Identifikation aktiver Verbindungen in gelösten Substanzgemischen.^[188,189] Ob die Affinitätsselektion in Zukunft eine breite Anwendung auch bei größeren Bibliotheken findet, bleibt indes abzuwarten.

Wurde eine Substanzbibliothek nach der Split-Methode synthetisiert, eröffnen sich weitere Möglichkeiten sowohl zur biologischen Evaluation als auch zur anschließenden Ermittlung der aktiven Verbindung. Erlaubt der biologische Test die Evaluation trägergebundener Substanzen (*on-bead screening*), sortiert man die *beads* mit der aktiven Verbindung aus.^[182] Anschließend wird die Verbindungen vom polymeren Träger abgelöst und somit der konventionellen Analytik zugänglich gemacht (siehe Kap. 3.2.4). Hier stellt sich allerdings das Problem der geringen Substanzmengen. Während für Peptide oder Nucleotide mit den Sequenzierungsverfahren hoch empfindliche Strukturaufklärungsmethoden vorliegen, ist die direkte Strukturaufklärung mit kleinsten Mengen an niedermolekularen organischen Substanzen noch vergleichsweise wenig entwickelt. Hierzu kommen aufgrund der exzellenten Empfindlichkeit in erster Linie massenspektroskopische Methoden in Betracht. Mit einem photolabilen Linker besteht sogar die Möglichkeit unter MALDI-TOF-MS-Bedingungen die Verbindung direkt im Spektrometer vom *bead* abzuspalten.^[190,191] Die so bestimmte Molekülmasse schränkt zumindest die Struktur der aktiven Verbindung auf wenige Isomere ein. Darüber hinaus kann die Sequenz kleiner Peptide anhand des Fragmentierungsmusters zugeordnet werden.^[192,193] Die

Zuverlässigkeit der massenspektroskopischen Sequenzanalyse aktiver Peptide konnte durch Einführung der Terminierungsmethode noch gesteigert werden. Gemäß dieser Strategie wird jede Kupplungsreaktion in Anwesenheit von 5-10% eines *capping*-Reagenzes durchgeführt. Aus den im Idealfall in äquimolaren Mengen entstandenen Fehlsequenzen läßt sich im Massenspektrum unmittelbar die Sequenz des aktiven Peptids ableiten.^[194,195]

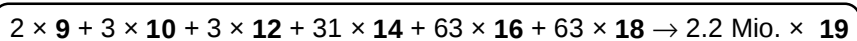
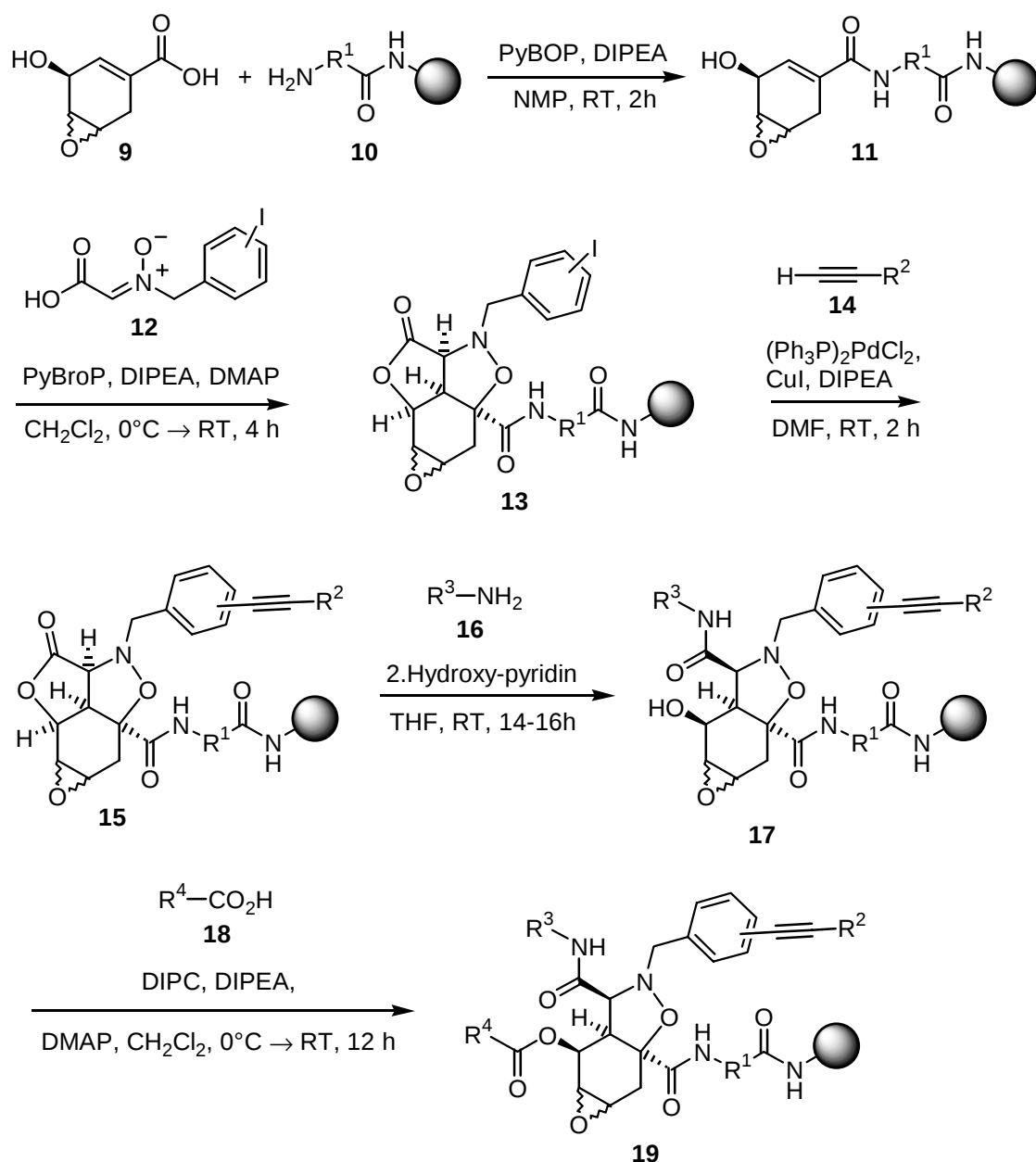
Die Codierung von Bibliotheken, welche nach der Split-Methode erzeugt wurden, bietet eine weitere interessante Alternative zur Strukturbestimmung aktiver Verbindungen. Als erste Codes wurden zunächst Peptid-^[196] bzw. Nucleotidsequenzen^[197,198] verwendet, die parallel zum Aufbau der Bibliothek am festen Träger synthetisiert wurden. Diese sequentiellen Codes können dann seriell durch Sequenzierung gelesen werden. Eine chemisch bei weitem robustere Methode stammt von Still *et al.*^[199,200] Sie verwendeten zur Erstellung eines binären, nichtsequentiellen Codes halogenierte Aromaten, die durch eine $[\text{Rh}(\text{tfa})_2]$ -katalysierte Carben-Insertion direkt mit der polymeren Matrix verknüpft werden und zur Analytik oxidativ abgespalten werden können. Durch Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektion, die gegenüber Halogenverbindungen eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist, wird auf Anwesenheit (logisch 1) oder Abwesenheit (logisch 0) der unterschiedlichen Codemoleküle geprüft. Die erhaltene Binärzahl kodiert den jeweiligen Syntheseweg. Der Hauptnachteil der chemischen Codierung besteht darin, daß zur Bibliothekssynthese nur Reaktionen angewendet werden können, die zu den chemischen Codierungsmethoden orthogonal sind.

3.3 Beispiele kombinatorischer Synthesen nach dem *one-bead one-compound*-Konzept

Obwohl in den letzten Jahren eine große Zahl organischer Reaktionen an die Festphasensynthese adaptiert werden konnte,^[179-181] wurden bisher nur wenige kombinatorische Synthesen nichtpeptidischer Verbindungen nach dem *one-bead one-compound*-Konzept beschrieben.^[170,172] Dies mag wohl damit zusammenhängen, daß jeder einzelne Reaktionsschritt einer kombinatorischen Synthesesequenz sorgfältig optimiert werden muß, um die Reinheit der Einzelverbindungen zu gewährleisten und

aus der Strukturanalyse aktiver Verbindungen zusätzliche Schwierigkeiten resultieren können.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Schreiber und Mitarbeitern demonstriert eindrucksvoll, daß auch mit Hilfe mehrstufiger Split-Synthese große naturstoffähnliche Verbindungsbibliotheken aufgebaut werden können (siehe Schema 3.1).^[201]

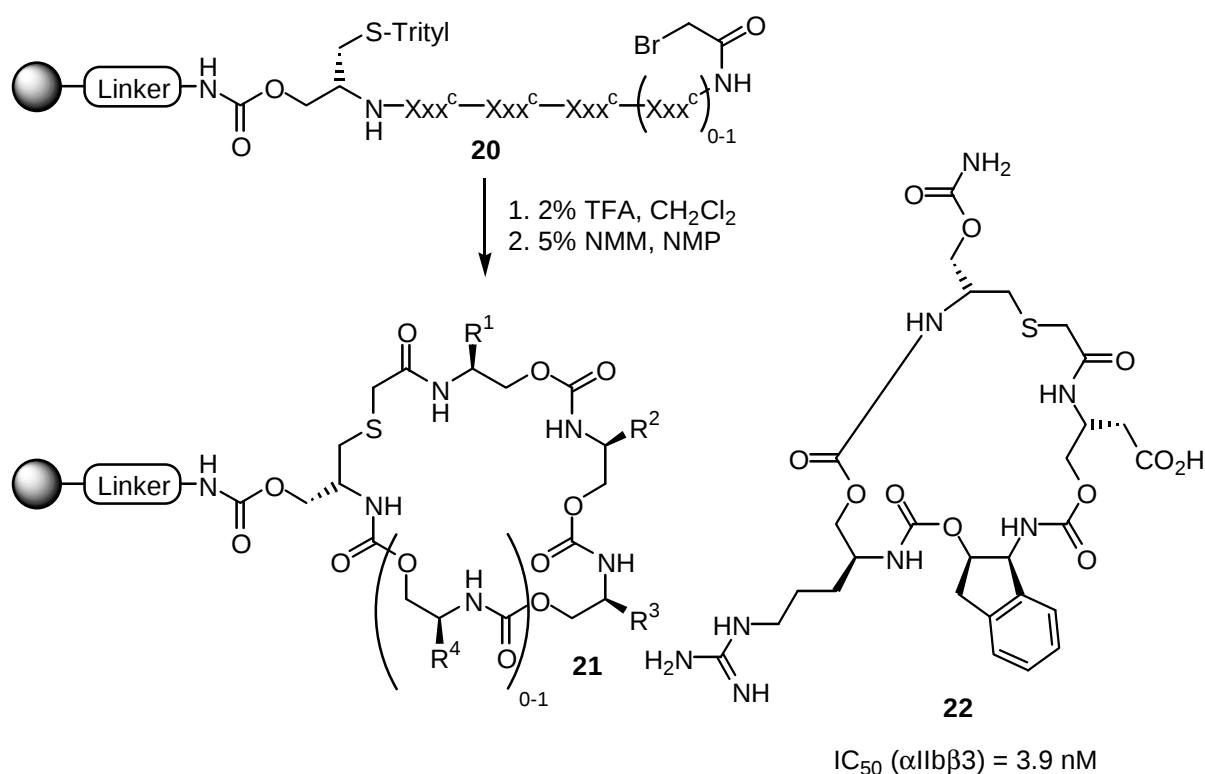


Schema 3.1: Kombinatorische Synthese von „naturstoffähnlichen“ Verbindungen^[201]

Zu Beginn der Synthese wird die Carbonsäure **9** unter Standardbedingungen an die festphasengebundene Aminosäure **10** gekuppelt. In der darauf folgenden Tandemreaktion wird der harzgebundene Allylalkohol **11** in Gegenwart der Nitrosocarbonsäure **12** via 1,3-dipolarer Cycloaddition und anschließender Veresterung zum hochfunktionalisierten Templat **13** umgesetzt. Mit einer Sonogashira/Castro-Stephens-Reaktion wird ein endständiges Alkine (**14**) eingeführt, gefolgt von einer Lactonöffnung in **15** durch das Amine **16**. Der daraus resultierende Alkohol **17** wird schließlich mit der Carbonsäure **18** zur hochsubstituierten bicyclischen Endverbindung **19** verestert.

Nachdem die einzelnen Reaktionsschritte optimiert waren, wurde die Kompatibilität der Bausteine **14**, **16** und **18** zur verwendeten Synthesestrategie überprüft. Dazu wurden 50 Alkine (**14**), 87 Amine (**16**) sowie 98 Carbonsäuren (**18**) jeweils in Einzelverbindungen eingebaut und diese mit Hilfe von LC-MS analysiert. Von den getesteten Bausteinen ergaben 23 Alkine, 54 Amine und 44 Carbonsäuren das Endprodukt **19** mit einer Reinheit >90%. Diese Bausteine wurden zusammen mit weniger optimalen Bausteinen bei der Split-Synthese einer Bibliothek verwendet, die rechnerisch etwa 2.2 Millionen Verbindungen enthielt. Da die Bibliothek nach der Methode von Still chemisch codiert wurde,^[199,200] ist sie zur biologischen Evaluation gemäß dem *one-bead one-compound*-Konzept geeignet. Dies wurde aber im beschriebenen Fall experimentell nicht realisiert. Zudem führte das Ergebnis der biologischen Evaluation einer nichtcodierten Bibliothek bestehend aus 456 Verbindungen und anschließender Dekonvolution zu einem widersprüchlichen Ergebnis. Denn nach der zweiten Iterationsstufe wurde die aktivste Verbindung in der Negativkontrolle gefunden; sie enthielt Verbindungen, die im ersten Iterationsschritt keine Aktivität aufwiesen.

Von Schulz und Mitarbeitern wurde das *one-bead one-compound*-Konzept erfolgreich auf die kombinatorische Synthese linearer sowie cyclischer Oligocarbamate zur Ermittlung hochaffiner α IIb β 3-Antagonisten angewandt.^[202] Dazu wurden an der Festphase schrittweise mit *N*-Fmoc-geschützten Amino-*p*-nitrophenylcarbonaten lineare Tri- bzw. Tetracarbamate aufgebaut. Durch *N*-terminale Einführung eines α -Bromacetats erhielt man Verbindung **20** die nach Tritylentschützung des *C*-terminalen Thiols an der Festphase unter basischen Bedingungen zum Thioether **21** cyclisiert werden konnte (siehe Schema 3.2).



Schema 3.2: Kombinatorische Festphasensynthese cyclischer Oligocarbamater^[202]

Gemäß dieses Syntheschemas wurden drei Bibliotheken synthetisiert. Um die Sequenz selektierter Verbindungen nach dem Terminierungsverfahren bestimmen zu können (siehe Kap. 3.2.5), wurden in jedem Kupplungsschritt durch Zusatz geringer Mengen eines *capping*-Reagenzes gezielt Fehlsequenzen erzeugt. Auf diese Weise wurde eine lineare und eine cyclische Tetramerbibliothek mit jeweils etwa 500 000 Verbindungen und eine cyclische Trimerbibliothek mit ca. 20 000 Verbindungen synthetisiert. Die Bibliotheken wurden zuerst mit dem biotinylierten Blutplättchenrezeptor αIIbβ3 und dann mit einem polyklonalen Biotinantikörper-Phosphatase-Konjugat inkubiert. Mit Hilfe von Standardsubstraten gelang es, *beads* mit aktiven Verbindungen spezifisch anzufärben und anschließend manuell zu selektieren. Nahezu alle Verbindungen auf den selektierten *beads* konnten massenspektrometrisch eindeutig charakterisiert werden. Ohne Ausnahme wiesen alle identifizierten Verbindungen sowohl eine Guanidin- als auch eine Carbonsäuregruppe auf – die für RGD-abhängige Rezeptoren typische Pharmakophorkombination. Die Affinität der nachsynthetisierten Verbindungen zu αIIbβ3 variierte indes überraschend stark von 3.9 nM (Verbindung 22) bis >10 000 nM. Leider wurden die Selektivitäten gegenüber anderen RGD-abhängigen Integrinen nicht bestimmt. Mit einer später erschienenen

Arbeit, in der die Selektion hochaffiner Thrombinliganden aus den selben Oligo-carbamatbibliotheken beschrieben wird, konnte die universelle Anwendbarkeit der kombinatorischen Synthese auf verschiedene *targets* demonstriert werden.^[203]

4 Kombinatorische Synthese von aza-RGD-Mimetika

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der kombinatorischen Festphasensynthese von niedermolekularen RGD-Mimetika. Die Konzeption sowie die Syntheseplanung der aza-RGD-Mimetikabibliotheken werden im folgenden Kapitel vorgestellt. Im Anschluß werden die Synthesen der dazu benötigten Bausteine beschrieben. Die Ausarbeitung und Optimierung der Schlüsselreaktionen zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika am festen Träger werden in den Abschnitten 4.3 und 4.4 detailliert besprochen. Danach wird zuerst die Festphasensynthese einzelner aza-RGD-Mimetika und abschließend die kombinatorische Festphasensynthese von aza-RGD-Mimetikabibliotheken nach der Split-Methode beschrieben.

4.1 Planung der aza-RGD-Bibliothekssynthese

4.1.1 Retrokombinatorische Analyse der RGD-Sequenz

Wie in Kapitel 2.1 bereits erwähnt, wird zur kombinatorischen Synthese neuer niedermolekularer $\alpha v \beta 3$ -Liganden von der Natur mit der RGD-Sequenz (siehe Abbildung 4.1) eine ideale Leitstruktur vorgegeben. So konnte in der Vergangenheit bereits mehrfach demonstriert werden, daß die RGD-Sequenz als Ausgangspunkt für die Entwicklung niedermolekularer und hochselektiver Integrinantagonisten geeignet ist (siehe Kapitel 2.5). Selbst beim *screening* einer randomisierten Oligocarbamatbibliothek mit dem Blutplättchenrezeptor $\alpha IIb \beta 3$ wurden immer nur Verbindungen gefunden, die das RGD-Motiv in abgewandelter Form enthielten (siehe Kapitel 3.3).^[202] Daher schien es sinnvoll, sich beim Design einer Verbindungsbibliothek mit potentiellen $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten an die RGD-Sequenz anzulehnen.

Um nach dem *one-bead one-compound*-Konzept Substanzbibliotheken zu erzeugen, müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllt werden. Zum einen müssen die Verbindungen während der Synthese mit einem festen Träger verbunden sein, zum anderen müssen sie durch Verknüpfung verschiedener Bausteine modular aufgebaut werden können. Die RGD-Sequenz muß also formal in verschiedene Bausteine sequenziert werden. Diese „retrokombinatorische Analyse“ der RGD-Sequenz wird in

Abbildung 4.1 skizziert. Demnach wird die RGD-Sequenz in ein RGD-Mimetikum transformiert, welches modular aus den vier Bausteinen A-D aufgebaut ist.

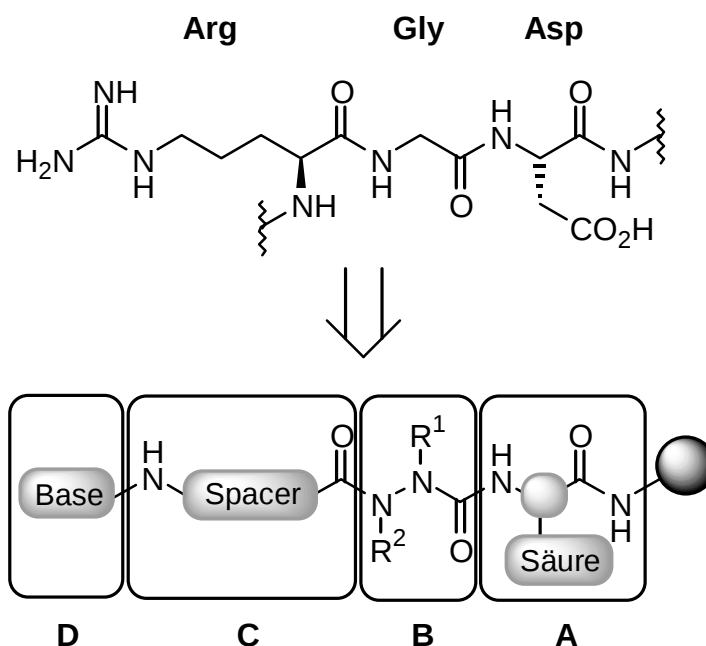


Abbildung 4.1: Retrokombinatorische Analyse der RGD-Sequenz. Die RGD-Sequenz wird in ein RGD-Mimetikum bestehend aus den Bausteine A-D transformiert. Die Carbonsäure der Asparaginsäure wird von Baustein A durch ein saures Pharmakophor, der Guanylest des Arginins von Baustein D durch ein basisches Pharmakophor präsentiert. Durch das Substitutionsmuster des Schlüsselbausteins B kann Einfluß auf die Flexibilität des RGD-Mimetikums genommen werden. Baustein C reguliert den Abstand der Pharmakophore.

Da sowohl die Carbonsäure der Asparaginsäure als auch der Guanylest des Arginins für die Bindung der RGD-Sequenz an die Integrine essentiell sind, sollten die RGD-Mimetika die gleichen Pharmakophore oder solche mit ähnlichen Eigenschaften aufweisen. Baustein A ersetzt die Asparaginsäure und trägt demzufolge ein saures Pharmakophor. Der basische Baustein D soll den Guanylest des Arginins nachahmen. Baustein C resultiert aus der Kohlenstoffkette des Arginins und reguliert im RGD-Mimetikum den Abstand zwischen dem sauren und dem basischen Pharmakophor. Durch Austausch des α -Kohlenstoffatoms im Glycin der RGD-Sequenz durch ein Stickstoffatom, wird der peptidische Charakter des RGD-Mimetikums verringert (Baustein B). Von J. Wermuth^[132] und J. S. Schmitt^[133] konnte bereits gezeigt werden, daß in $\alpha\beta 3$ -aktiven RGD-Peptiden der Austausch des Glycins durch Azaglycin unter Erhalt der biologischen Aktivität verläuft und die $\alpha\beta 3$ -Selektivität sogar noch

gesteigert werden kann. Die Substitution einer α -Aminosäure durch eine Azaaminosäure führt zu strukturellen Änderungen, die im folgenden Kapitel diskutiert werden. Alle Bausteine sollten so gewählt werden, daß der Abstand des basischen und sauren Pharmakophors etwa dem der Carbonsäure und des Guanylrestes in der RGD-Sequenz entspricht.

Um die biologische Evaluation der RGD-Mimetika an der Festphase durchführen zu können, müssen diese so mit dem festen Träger verknüpft werden, daß die daraus resultierende Verknüpfungsstelle die Rezeptor-Ligand-Erkennung nicht negativ beeinflusst. Diese „idealen“ Verknüpfungsstellen mit absoluter Sicherheit zu bestimmen, ist aber kaum möglich. Dennoch wurde mit einfachen Überlegungen versucht, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine geeignete Verknüpfungsstelle zu finden. So wurde beim Design der Verbindungsbibliothek eine Verknüpfung der RGD-Mimetika über die saure oder basische Pharmakophorgruppe ausgeschlossen, da beide für die Bindung an den Rezeptor essentiell sind. In den natürlichen Integrinliganden wird die RGD-Sequenz *N*- und *C*-terminal von unterschiedlichen Aminosäuresequenzen flankiert.^[31] An dieser Stelle scheint also eine gewisse Toleranz der Integrine vorzuliegen. Daher wurden die RGD-Mimetika, wie in der Peptidsynthese üblich, am „C-Terminus“ an die Festphase gebunden.

4.1.2 Strukturelle und biologische Aspekte des Azabausteins B

Bei der Transformation der RGD-Sequenz in ein modular aufgebautes RGD-Mimetikum, wurde das α -Kohlenstoffatom des Glycins durch ein Stickstoffatom ersetzt. Aminosäuren, deren α -Kohlenstoffatom durch ein Stickstoff ersetzt worden sind, werden als Azaaminosäuren, Peptide mit mindestens einer Azaaminosäure als Azapeptide bezeichnet.^[204] Im Rahmen dieser Arbeit werden Azapeptide, deren Azaaminosäuren die Seitenkette am β -Stickstoffatom tragen, als Azapeptoide bezeichnet (vergleiche dazu Abbildung 4.2).

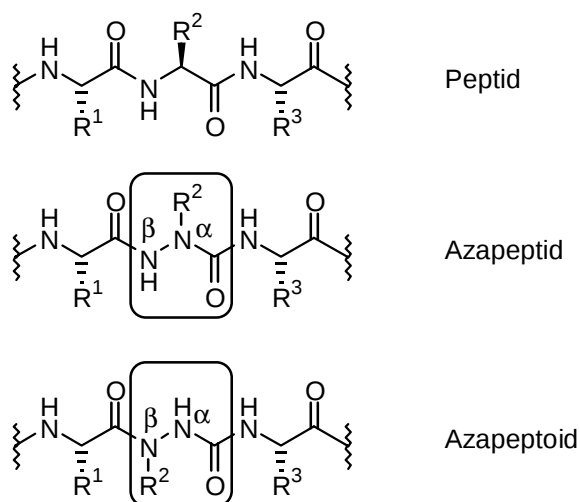


Abbildung 4.2: Vergleich zwischen Peptid, Azapeptid und Azapeptoid. Im Azapeptid ist das α -Kohlenstoffatom einer Aminosäure durch ein Stickstoffatom ersetzt, im Azapeptoid ist die Seitenkette über das β -Stickstoffatom verknüpft.

Der Austausch einer Aminosäure durch eine Azaaminosäure in Peptiden bewirkt eine Veränderung der strukturellen sowie der biologischen Eigenschaften. Dabei ist insbesondere das Potential der Azapeptide, im Vergleich zu Peptiden gegen enzymatischen Abbau resistenter zu sein, von pharmakologischem Interesse.^[205] So konnten Hess *et al.* bereits 1963 demonstrieren, daß der Austausch einer Aminosäure gegen eine Azaaminosäure im natürlichen Peptid Angiotensin II mit einer Verlängerung der Aktivitätsdauer im Tiermodell korreliert.^[206] Des weiteren wurden inzwischen einige Azapeptide zur selektiven Inhibierung von Cystein-^[207] und Serinproteasen beschrieben.^[208-211] Darüber hinaus konnte vor kurzem mit der Entwicklung hochaktiver und oral absorbierbarer Azadipeptid-Isostere zur Inhibierung der HIV-1-Protease das pharmakologische Potential der Hydrazinderivate belegt werden.^[212,213] Die Einführung einer Azaaminosäure (Baustein B) in die RGD-Mimetika könnte somit helfen, deren pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern.

Da dem Design der RGD-Mimetika eine Leitstruktur zugrunde liegt, besitzen die daraus resultierenden Bibliotheken eine vergleichsweise geringe Diversität. Im Rahmen dieser Arbeit sollten jedoch RGD-Mimetikabibliotheken synthetisiert werden, die potentielle Liganden für möglichst viele RGD-abhängige Integrine enthalten. Bei der dazu notwendigen Erhöhung der Diversität spielt die Azaaminosäure eine

herausragende Rolle, da durch Variation ihres Substitutionsmusters erheblicher Einfluß auf die Flexibilität der RGD-Mimetika ausgeübt werden kann.

Leider wurden die strukturellen Unterschiede zwischen Azaglycin und α - bzw. β -substituiertem Azaglycin an vergleichbaren Verbindungen noch nicht untersucht. Aus einer *high-level ab initio*-Konformationsanalyse von Diformylhydrazin (**23**) und Diformylmethylhydrazin (**24**) kann aber in guter Näherung der strukturelle Einfluß der *N*-Substitution im Azabaustein B abgeschätzt werden.^[214] In Abbildung 4.3 a ist das berechnete Energieprofil für die Rotation um die *N-N*-Bindung in dem *Z,Z*-konfigurierten Diformylhydrazin (**23**) dargestellt (geschlossene Linie). Die Kurve zeigt zwei Energieminima bei einem CO-N-N-CO-Diederwinkel von 90° bzw. -90°, eine hohe Rotationsbarriere bei 0° aber eine extrem niedrige Barriere bei 180°. Das *N*-methylierte Pendant **24** weist bei 180° hingegen eine um ca. 5 kcal/mol höhere Rotationsbarriere auf (gestrichelte Linie). Das von Yoon und Mitarbeitern berechnete Energieprofil für die *N-N*-Rotation im Modellazapeptid Ac-azaAla-NHMe (**25**), bei festgehaltener gestreckter Konformation der restlichen Bindungen, gleicht dem von Verbindung **24** (siehe b in Abbildung 4.3).^[215] Auch **25** zeigt bei CO-N-N-CO-Diederwinkeln von etwa 90° bzw. -90° zwei Energieminima und bei ca. 0° sowie ca. 180° jeweils eine ausgeprägte Rotationsbarriere.

Die berechnete niedrige Energiebarriere für die Rotation um die *N-N*-Bindung bei 180° in Diformylhydrazin (**23**) steht im Einklang mit Kristallstrukturen von nichtalkylierten Diacylhydrazinen, die einen planaren CO-N-N-CO-Diederwinkel von 180° aufweisen.^[216-218] Bei substituierten Azapeptiden wurde hingegen immer ein um den Betrag von ca. 60-120° verdrehter CO-N-N-CO-Dieder gefunden.^[204,219-221] Dieser Befund untermauert die berechneten hohen Energiebarrieren der *N-N*-Bindungsrotation in den *N*-methylierten Hydraziden **24** und **25**.

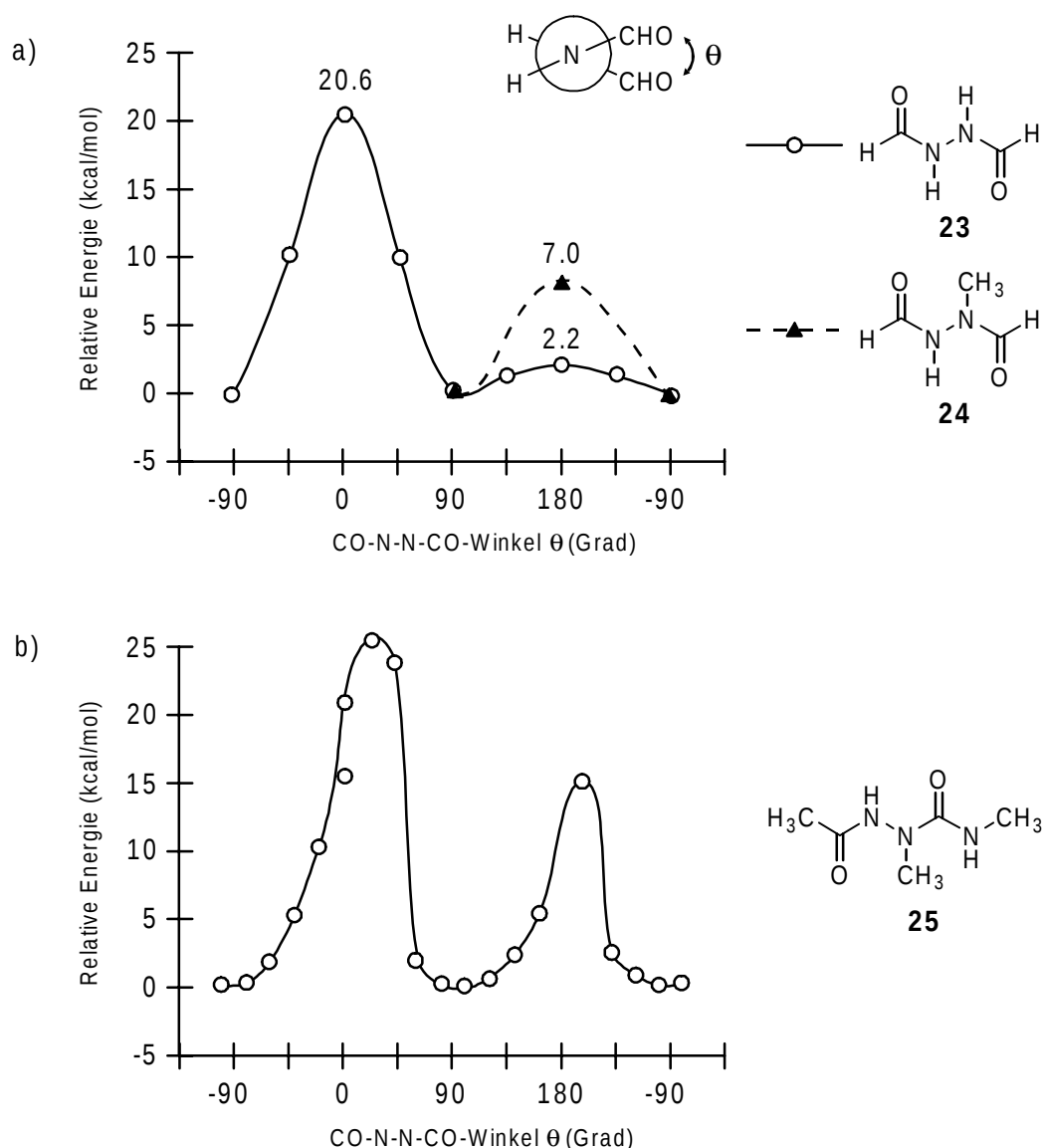


Abbildung 4.3: High-level *ab initio*-Konformationsanalyse. a) Vergleich Diformylhydrazin (**23**) vs. Diformylmethylhydrazin (**24**). Die Einführung einer Methylgruppe führt zu einer deutlichen Erhöhung der Rotationsbarriere um die N-N-Bindung^[214]. b) Das Energieprofil von Ac-azaAla-NHMe (**35**) gleicht dem von **24**.^[215]

Da der Azabaustein B die Aminosäure Glycin der RGD-Sequenz repräsentiert, würden die Integrinrezeptoren raumgreifende Substituenten an dieser Stelle vermutlich nicht tolerieren. Daher sah die Bibliotheksplanung vor, lediglich die Methylgruppe als Substituent zuzulassen. Daraus resultieren die drei Bausteine Azaglycin (azaGly), Azaalanin (azaAla) und Azasarcosin (azaSar). Aufgrund der oben durchgeführten Betrachtungen, sollte jedoch azaGly erheblich mehr Flexibilität aufweisen als azaAla oder azaSar. Mit geringfügigen Modifikationen kann demnach die Rigidität des zentralen Bausteins B und damit die räumliche Gesamtstruktur der RGD-Mimetika

stark beeinflusst werden. Die daraus resultierenden Variationen der räumlichen Anordnung bzw. der Rezeptorzugänglichkeit der Pharmakophore sollte somit die Diversität der RGD-Mimetika-Bibliothek erheblich steigern.

4.1.3 Syntheseplanung zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika an der Festphase nach der Fmoc-Strategie

Um den Anforderungen der kombinatorischen Synthese gerecht zu werden, müssen bei der Syntheseplanung der aza-RGD-Bibliothek einige Aspekte berücksichtigt werden:

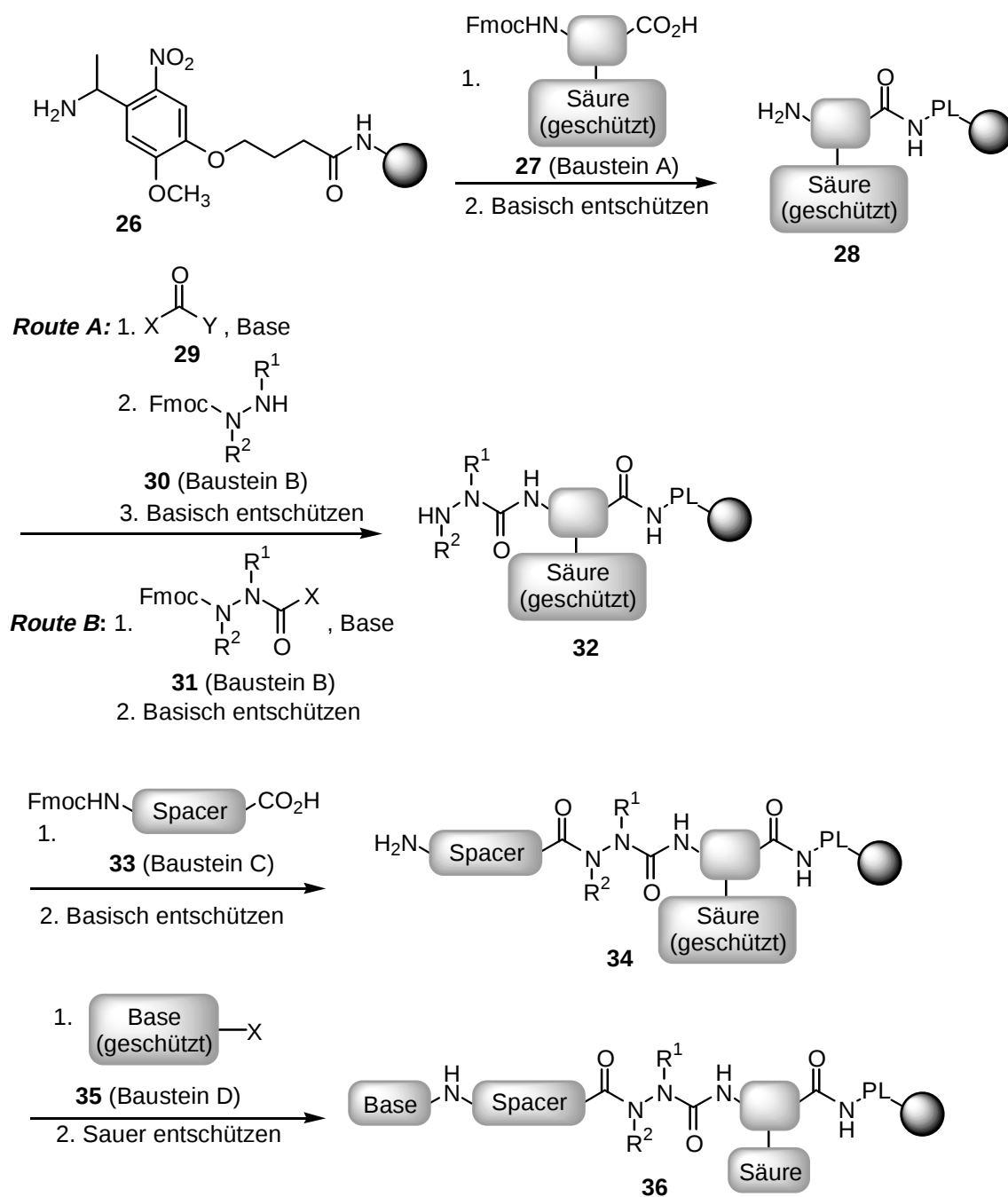
- Von den benötigten Reaktionsschritten sollten möglichst viele Schritte unter Bindungsverknüpfung erfolgen.
- Die in diesen aufbauenden Reaktionen eingesetzten Bausteine sollten mit großer Strukturvielfalt leicht zugänglich oder kommerziell erhältlich sein (siehe Kap. 4.2).
- Eine neue Verknüpfung sollte *unabhängig* von der schon aufgebauten Struktur und von dem anzuknüpfenden Synthesebaustein zuverlässig gelingen, d. h. mit hoher Ausbeute und Selektivität das gewünschte Produkt liefern.
- Um das *one-bead one-compound*-Prinzip anwenden zu können, müssen die RGD-Mimetika mit einem zu den Reaktionsbedingungen orthogonalen Linker an die Festphase geknüpft sein.

Zuerst sollte mit der Wahl des Photolinkers **26** zur Verankerung der RGD-Mimetika maximale Orthogonalität zu den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der Festphasensynthese gewährleistet werden (siehe Schema 4.1). Dieser Linker toleriert die gängigen Reaktionsbedingungen einer Festphasensynthese und ist gegenüber sauren sowie basischen Bedingungen beim Schutzgruppenabspalten weitgehend inert. Die Abspaltung der harzgebundenen Verbindungen erfolgt durch Lichteinstrahlung mit der Wellenlänge von etwa 360 nm.^[222,223] Dieser Linker ist besonders für die kombinatorische Synthese nach dem *one-bead one-compound*-Konzept geeignet. Denn die harzgebundenen Verbindungen können am festen Träger vollständig geschützt und somit dem *on-bead screening* zugänglich gemacht werden. Zudem ermöglicht dieser

Linker nach der biologischen Evaluation, die aktive Verbindung vom *bead* abzulösen und anschließend chemisch zu analysieren. Zusätzliche Vorteile bietet der Photolinker bei der Reaktionskontrolle einer Festphasensynthese, da Probeabsaltungen zur HPLC- oder LC-MS-Analyse unter milden Bedingungen zuverlässig und bequem durchgeführt werden können. Darüber hinaus kann auf diese Weise eine „Momentaufnahme“ des Reaktionsgeschehens an der Festphase erstellt werden, ohne daß dabei aufgrund drastischer Abspaltbedingungen chemische Veränderungen, wie z. B. Schutzgruppenabsaltung, auftreten.

Des weiteren sollte durch die Verwendung von TentaGel maximale Lösungsmittelkompatibilität während der Festphasensynthese sichergestellt werden. Dieses Polyethylenglycol-Polystyrol-Propfpolymer weist in fast allen gängigen organischen Lösungsmitteln, und ebenso in Wasser, gute Quelleigenschaften auf. TentaGel ist aufgrund seiner Wasserkompatibilität daher auch für das biologische *on-bead screening* im wäßrigen Milieu geeignet.

Schema 4.1 zeigt den Synthesepfad zum festphasengestützten Aufbau der aza-RGD-Mimetika **36**: Basierend auf der Fmoc-Strategie,^[224] die in der Peptidsynthese breite Anwendung findet, sollen die Bausteine A-D (**27**, **30** bzw. **31**, **33** und **35**) schrittweise miteinander verknüpft werden. Da zur Vorbereitung jeder Verknüpfungsreaktion lediglich die temporäre Fmoc-Schutzgruppe unter standardisierten basischen Bedingungen entfernt werden muß, ist die geplante Synthese zum Aufbau der RGD-Mimetika hochkonvergent.



Schema 4.1: Syntheseplanung zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika (**36**) an der Festphase nach der Fmoc-Strategie.

Die Reaktionsfolge beginnt mit der Kupplung der N-Fmoc-geschützten Aminodicarbonsäure **27**, in der die „Seitenketten“-Carbonsäure durch eine säurelabile Schutzgruppe blockiert ist. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe soll der Azabaustein B eingeführt werden. Diese Reaktion konnte bereits an der Festphase über zwei verschiedene Routen experimentell realisiert werden. In Route A wird das festphasengebundene Amin **28** in Anwesenheit einer Base zuerst mit einem zweifach

aktivierten Kohlendioxidderivat (**29**) und anschließend mit einem monogeschützten Hydrazin (**30**) umgesetzt.^[132,133,205,225] Als zweifach aktivierte Kohlendioxidderivate wurden z. B. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester, Bis(2,4-dinitrophenyl)-carbonat oder Bis(pentafluorphenyl)-carbonat verwendet. In der alternativen Route B wird das Hydrazin (**30**) in Lösung mit **29** zur aktivierten *N*-geschützten Azaamino-säure **31** umgesetzt und anschließend mit dem harzgebundenen Amin **28** zur Reaktion gebracht.^[226-228] An das entschützte Aza-peptid **32** soll dann unter Standardbedingungen der Spacerbaustein C (**33**) gekuppelt werden. Anschließend kann das Fmoc-entschützte Trimer **34** über eine nucleophile Substitutionsreaktion mit Baustein D (**35**) und anschließender Entschützung unter sauren Bedingungen in das harzgebundene aza-RGD-Mimetikum **36** überführt werden. Diese Synthesestrategie sollte komplett entschützte und festphasengebundene aza-RGD-Mimetika (**36**) liefern, die biologisch an der Festphase evaluiert werden können. Nach der Selektion eines positiven *beads*, könnte dann die Verbindung durch UV-Bestrahlung vom festen Träger abgelöst und anschließend chemisch analysiert werden.

Von den vier durchgeführten Verknüpfungsreaktionen finden zwei unter Peptidsynthesebedingungen statt. Aufgrund des hohen Entwicklungsstandes der Peptidsynthese und der inzwischen umfangreichen Palette an verfügbaren Kupplungsreagenzien, sollten diese Reaktionen mit einem hohen Maß an Zuverlässigkeit verlaufen und daher den Anforderungen der kombinatorischen Synthese genügen. Da für die Einführung der Bausteine B (**30** bzw. **31**) und D (**35**) vergleichsweise wenige Literaturpräzedenzen vorliegen, sollten diese Reaktionen im Rahmen dieser Arbeit sorgfältig auf ihre Eignung für die kombinatorische Synthese geprüft und gegebenenfalls weiterentwickelt werden.

4.2 Die Synthese der Bausteine

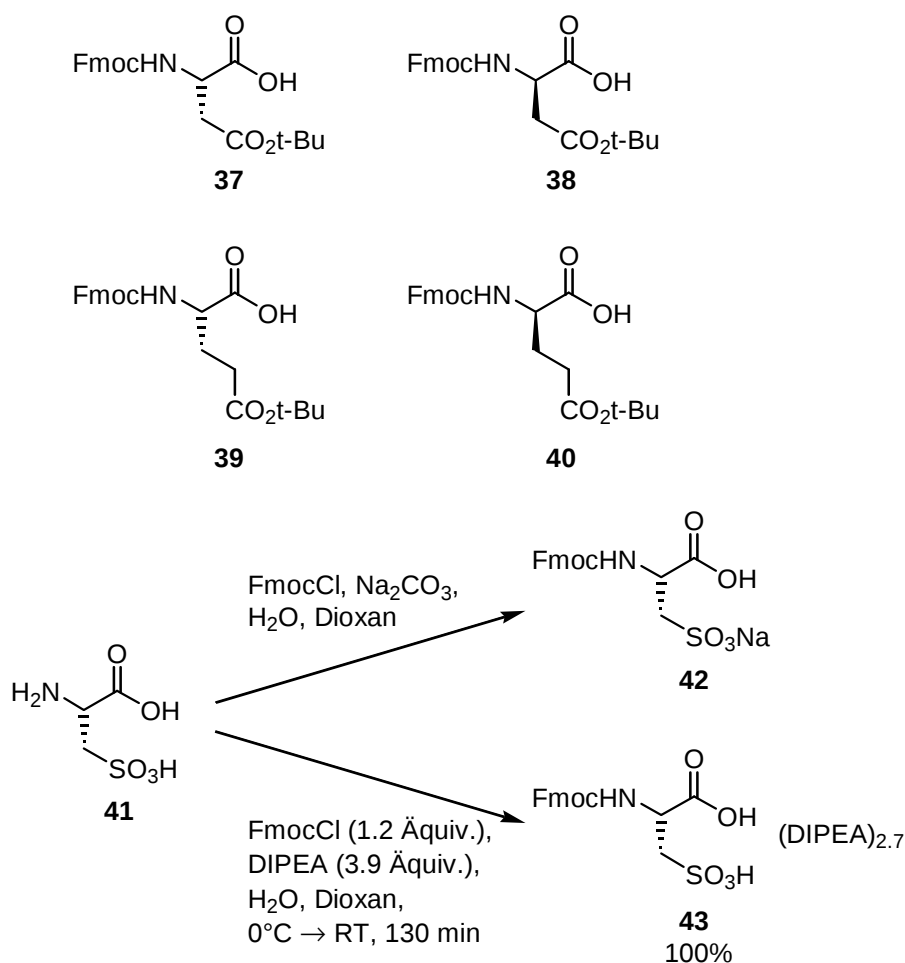
Nach gängiger Meinung sollten Bausteine für kombinatorische Synthesen im Idealfall kommerziell verfügbar sein, um den Zeitgewinn bei der Wirkstoffsuche noch zu steigern. Dies schließt die Synthese von interessanten Bausteinen jedoch nicht kategorisch aus, zumal durch die kombinatorische Synthese aus einem Baustein viele Produkte resultieren – die investierte Synthesearbeit also mehrfach ausgezahlt wird. In

der hier vorliegenden Arbeit wurden sowohl kommerziell erhältliche als auch über einen kurzen Syntheseweg zugängliche Bausteine verwendet.

4.2.1 Baustein A

Baustein A repräsentiert die Asparaginsäure der RGD-Sequenz. Um ihn gemäß der Fmoc-Strategie einbauen zu können, sollte er somit eine freie Carbonsäure, eine mit einer säurelabilen Schutzgruppe versehene Säurefunktion sowie ein Fmoc-geschütztes Amin aufweisen. Die kommerziell erhältlichen Bausteine, die diese Kriterien erfüllen, sind die Enantiomere der Asparaginsäure (**37** und **38**) sowie die Enantiomere der Glutaminsäure (**39** und **40**) (siehe Schema 4.2).

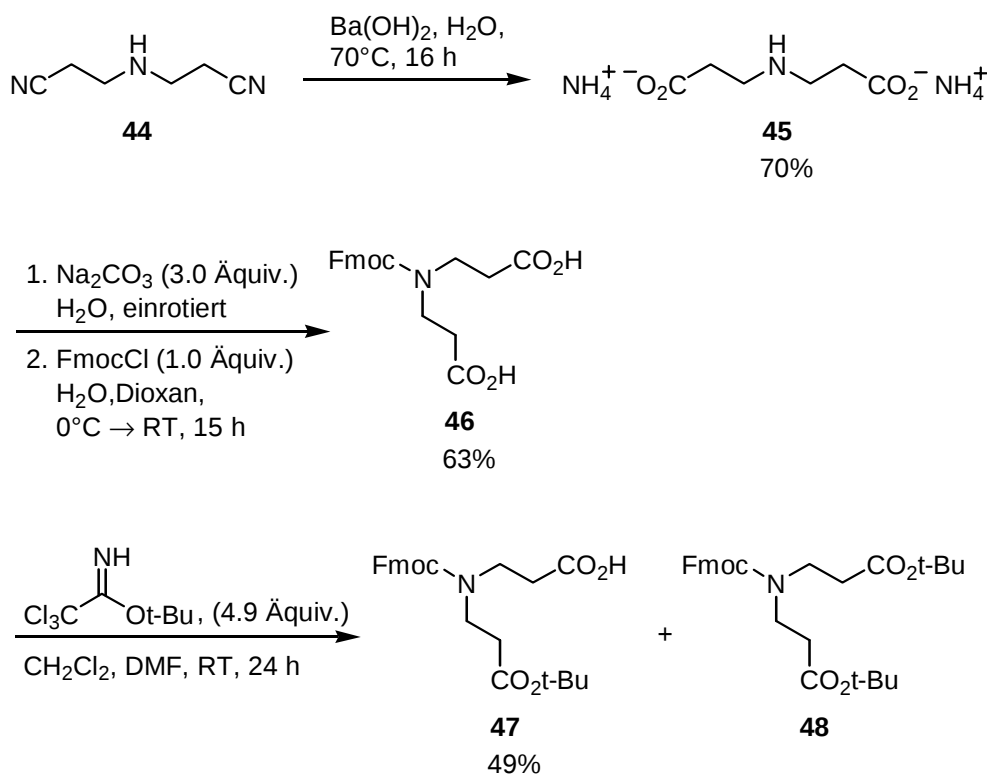
Als Asparaginsäuremimetikum schien die L-Cysteinsäure (**41**) ein interessanter Kandidat zu sein. Ihre Carbonsäure ermöglicht die Anknüpfung an die Festphase und die Sulfonsäure der Seitenkette könnte die freie Carbonsäure der Asparaginsäure nachahmen. Da die Sulfonsäuregruppe nur unter sehr drastischen Bedingungen (z. B. zum Säurechlorid)^[229,230] aktiviert werden kann, sollte sie sich gegenüber den milden Reaktionsbedingungen während der Festphasensynthese inert verhalten. Daher ist es grundsätzlich möglich, die Cysteinsäure zur RGD-Mimetika-Synthese ohne zusätzlichen Seitenkettenschutz einzusetzen. Allerdings traten bei Einführung der Fmoc-Schutzgruppe unerwartete Schwierigkeiten auf. Zwar ließ sich das Amin der Cysteinsäure (**41**) in einem Dioxan/Wasser-Gemisch in Gegenwart von Na₂CO₃ mit FmocCl acylieren, das daraus resultierende Natriumsalz der *N*-Fmoc-geschützten Cysteinsäure (**42**) erwies sich jedoch in DMF sowie NMP als unlöslich und war demzufolge nicht zur Peptidkupplung unter Standardbedingungen geeignet (siehe Schema 4.2). Dieses Problem konnte jedoch durch eine leichte Modifikation der Reaktionsbedingungen umgangen werden. Dazu wurde die Cysteinsäure (**41**) mit einem Überschuß an FmocCl in Gegenwart der Stickstoffbase DIPEA umgesetzt. Das überschüssige FmocCl sowie seine Hydrolyseprodukte konnten anschließend durch gründliche Extraktion mit Et₂O entfernt werden. Durch Entfernen des Wassers im Vakuum erhielt man ohne weiter Aufreinigung quantitativ das in DMF sehr gut lösliche *N*-Fmoc-geschützte Cysteinsäure-DIPEA-Salz (**43**).



Schema 4.2: Kommerziell verfügbare Bausteine **A** (**37-40**) und Synthese der *N*-Fmoc-geschützten löslichen Cysteinsäure **43**.

Die orthogonal geschützte Aminodicarbonsäure **47** konnte über drei Synthesestufen zugänglich gemacht werden (siehe Schema 4.3). Dazu wurde zunächst nach einer literaturbekannten Methode 3,3'-Iminodipropionitril (**44**) zum Aminodicarbonsäurediammoniumsalz **45** verseift und das Ammoniak in **45** anschließend mit wässriger Na_2CO_3 ausgetrieben.^[231] Das Natriumsalz der Aminodicarbonsäure **45** konnte dann in 63% Ausbeute in die *N*-Fmoc-geschützte Dicarbonsäure **46** umgewandelt werden. Aufgrund der symmetrischen Struktur der Dicarbonsäure **46** konnten bei der anstehenden Mono-*tert*-butylierung keine Regioisomere auftreten. Dennoch bestand die Gefahr, daß die gewünschte monogeschützte Dicarbonsäure **47** durch erneute *tert*-Butylierung zum unerwünschten Di-*tert*-butylester **48** weiterreagiert. Daher wurde die Umsetzung der Dicarbonsäure **46** mit *tert*-Butyltrichloracetimidat per DC-Kontrolle überwacht und als das optimale Verhältnis der Produkte **46**, **47** und **48** von etwa 1:2:1 detektiert wurde, abgebrochen. Obwohl diese Reaktion vermutlich mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$

katalysiert werden kann,^[232] wurde hier die unkatalysierte Variante bevorzugt, da eine längere Reaktionszeit die Kontrolle des Reaktionsverlaufs erleichterte. Das gewünschte Produkt Fmoc-Idp(Bu)-OH) **47** konnte schließlich chromatographisch in befriedigender Ausbeute von 49% isoliert werden.

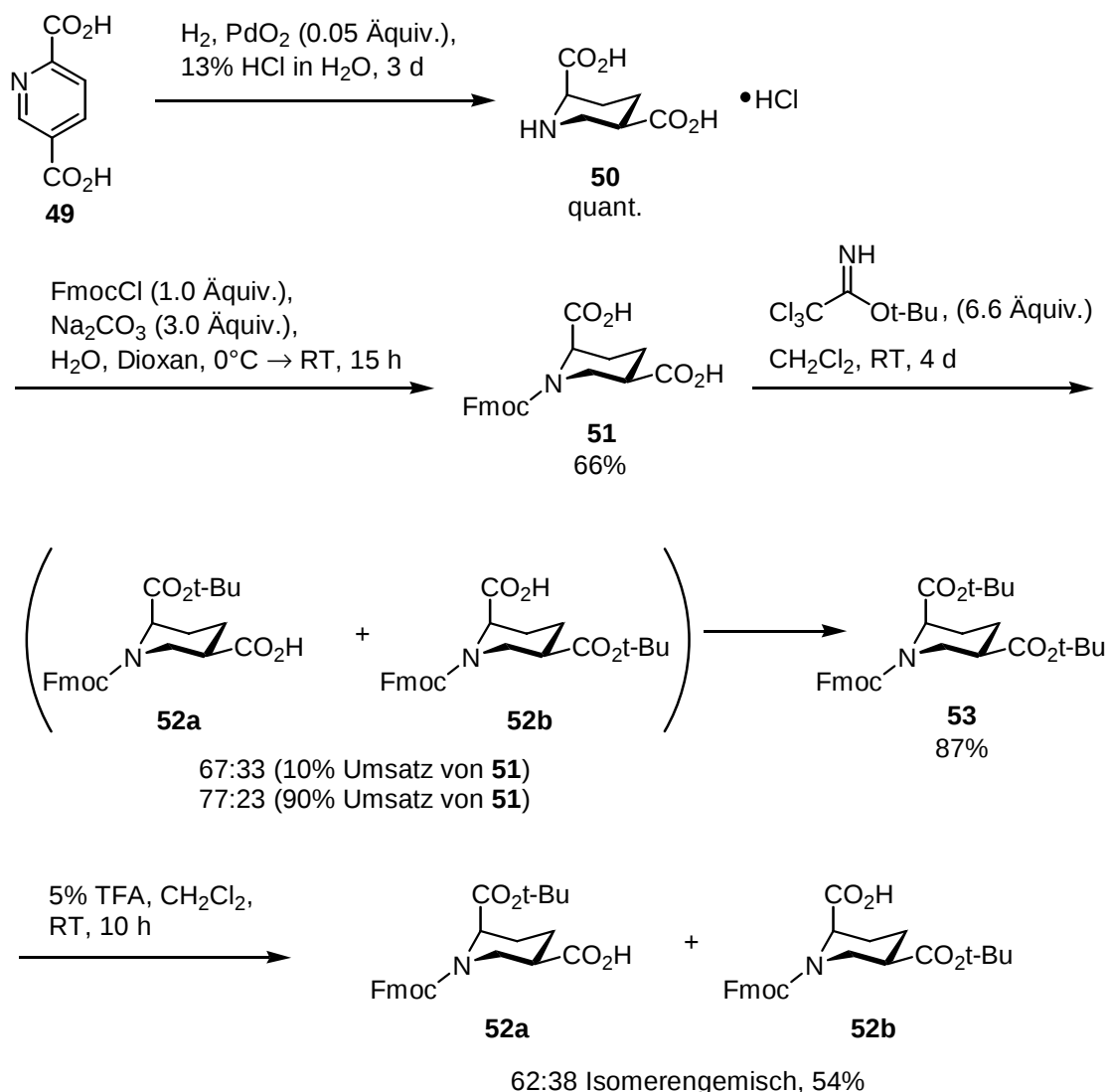


Schema 4.3: Synthese der orthogonal geschützten Aminodicarbonsäure **47**

In der *cis*-Piperidindicarbonsäure **50** sahen wir ebenfalls ein potentielles Asparaginsäuremimetikum (siehe Schema 4.4). Ausgehend von 2,5-Pyridindicarbonsäure (**49**) konnte diese in racemischer Form nach einer literaturbekannten Methode durch katalytische Hydrierung zugänglich gemacht werden.^[233] (Die *cis*-Konfiguration wurde anhand der NOESY-Spektren der Folgeprodukte **52a** und **52b** belegt, s. u.). Danach wurde die Aminodicarbonsäure **50** mit einer akzeptablen Ausbeute von 66% zur *N*-Fmoc-geschützten Dicarbonsäure **51** umgesetzt. Der Syntheseplan sah nun vor, die Carbonsäure am 5-C-Atom der Dicarbonsäure **51** regioselektiv zu verestern. Dieser Plan basierte auf der Überlegung, daß die Carbonsäure am 2-C-Atom von der unmittelbar benachbarten Fmoc-Gruppe sterisch abgeschirmt werden könnte und somit schwerer als die Carbonsäure in 5-Position zugänglich sein sollte. Die Reaktion von **51** mit *tert*-Butyltrichloracetimidat verlief jedoch enttäuschend. Es wurde nicht wie

erhofft das Regioisomer **52b**, sondern das Regioisomer **52a** bevorzugt gebildet. Zudem zeigte die Reaktionskontrolle per HPLC, daß der relative Mengenanteil der gewünschten Verbindung **52b** mit fortschreitender Reaktion immer geringer wurde. So entstanden zu Beginn der Reaktion **52a** und **52b** im Isomerenverhältnis von 67:33, nach 90%igem Umsatz der Dicarbonsäure **51** betrug das Verhältnis aber bereits 77:23. Über eine alternative Route konnten der Anteil von **52b** im Isomerengemisch leicht erhöht werden. Dazu wurde die Dicarbonsäure zuerst mit einem Überschuß an *tert*-Butyltrichloracetimidat mit einer Ausbeute von 87% in den Di-*tert*-butylester **53** umgewandelt. Dieser wurde dann unter steter HPLC-Kontrolle mit TFA entschützt. Über diesen „inversen“ Reaktionsweg entstanden die Produkte **52a** und **52b** im Isomerenverhältnis von ca. 3:2. Der relative Mengenanteil von **52b** konnte also leicht erhöht werden und blieb erfreulicherweise über die gesamte Reaktionszeit konstant. Nach 8 h TFA-Entschätzung betrug das Integralverhältnis von **51:52a:52b:53** 15:30:21:34. Danach wurde die Reaktion abgebrochen und die monogeschützten Dicarbonsäuren Fmoc-Cpdc(2-Bu)-OH (**52a**) und Fmoc-Cpdc(5-Bu)-OH (**52b**) konnten mit Hilfe chromatographischer Reinigung als 62:38-Isomerengemisch in 54% Ausbeute isoliert werden.

Alle Versuche, das Isomerengemisch aus den orthogonal geschützten Bausteinen **52a** und **52b** mit Hilfe von Flashchromatographie zu trennen oder auch nur anzureichern, schlugen fehl. Die Isomere konnten jedoch mühelos mittels präparativer HPLC jeweils in Mengen >100 mg getrennt werden. Dennoch wurden die Bausteine **52a** und **52b** als Isomerengemisch in die Bibliotheksynthese eingesetzt. Sollte ein RGD-Mimetikum eines selektierten *beads* diese Isomere enthalten, stünde genügend isomerenreines **52a** und **52b** zur Verfügung, um die RGD-Mimetika isomerenrein nachzusynthetisieren. Gemäß dieser Vorgehensweise könnte dann das biologisch aktive Isomer ermittelt werden.



Schema 4.4: Synthese der orthogonal geschützten Piperidindicarbonsäuren **52a** und **52b** im 62:38 Isomerengemisch. Die Mono-*tert*-butylierung der Dicarbonsäure **51** liefert ein ungünstigeres Produktverhältnis als die Monoentschützung des Di-*tert*-butylesters **53**.

Die oben verwendete Strukturzuordnung soll im Folgenden belegt werden. Da sowohl **52a** als auch **52b** isomerenrein zur Verfügung standen, konnten sie getrennt untersucht werden. Die Zuordnung erfolgte anhand von HMQC-COSY- sowie NOESY-Spektren. Sowohl 3-H^{ax} und 5-H^{ax} als auch 4-H^{ax} und 6-H^{ax} wiesen in den NOESY-Spektren beider Isomere NOE-Kontakte auf und müssen somit axial ausgerichtet sein (Abbildung 4.4). Zwischen 2-H^{eq} und 4-H^{ax} sowie 2-H^{eq} und 6-H^{ax} wurden jedoch keine NOE-Signale beobachtet. Darüber hinaus zeigte Verbindung **52a** einen NOE-Kontakt zwischen H-Atomen der *tert*-Butylgruppe und 6-H^{ax}. Demzufolge müssen beide Isomere *cis*-konfiguriert sein. Dies wird durch die charakteristischen

vicinalen Kopplungskonstanten, die im ^1H -NMR-Spektrum zu erkennen waren, untermauert. Das axiale 6- H^{ax} koppelte in beiden Isomeren mit dem benachbarten axialen Protonen 5- H^{ax} . Der Diederwinkel beträgt 180° , daher resultiert eine große Kopplungskonstante von $J_{5\text{H}^{\text{ax}},6\text{H}^{\text{ax}}} \approx 12.7 \text{ Hz}$. Das äquatoriale 2- H^{eq} wies im ^1H -NMR-Spektrum beider Regioisomeren hingegen mit einem breiten Dublett von $J \approx 5.2 \text{ Hz}$ keine charakteristische *trans*-Kopplung auf. Des weiteren belegte das NOE-Signal zwischen den H-Atomen der *tert*-Butylgruppe und dem 2- H^{eq} in **52a**, daß diese Verbindung die *tert*-Butylgruppe an der 2-C-Carbonsäure trägt. Demzufolge muß in **52b** die Carbonsäure am 5-C-Atom *tert*-butylgeschützt sein.

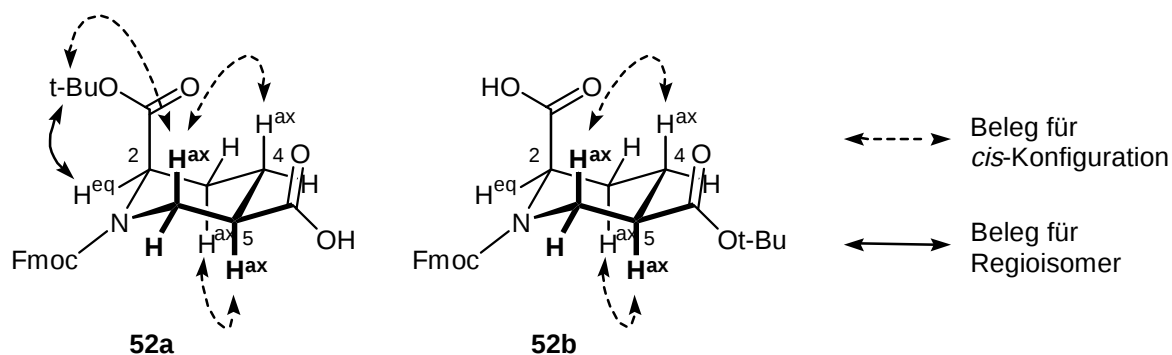
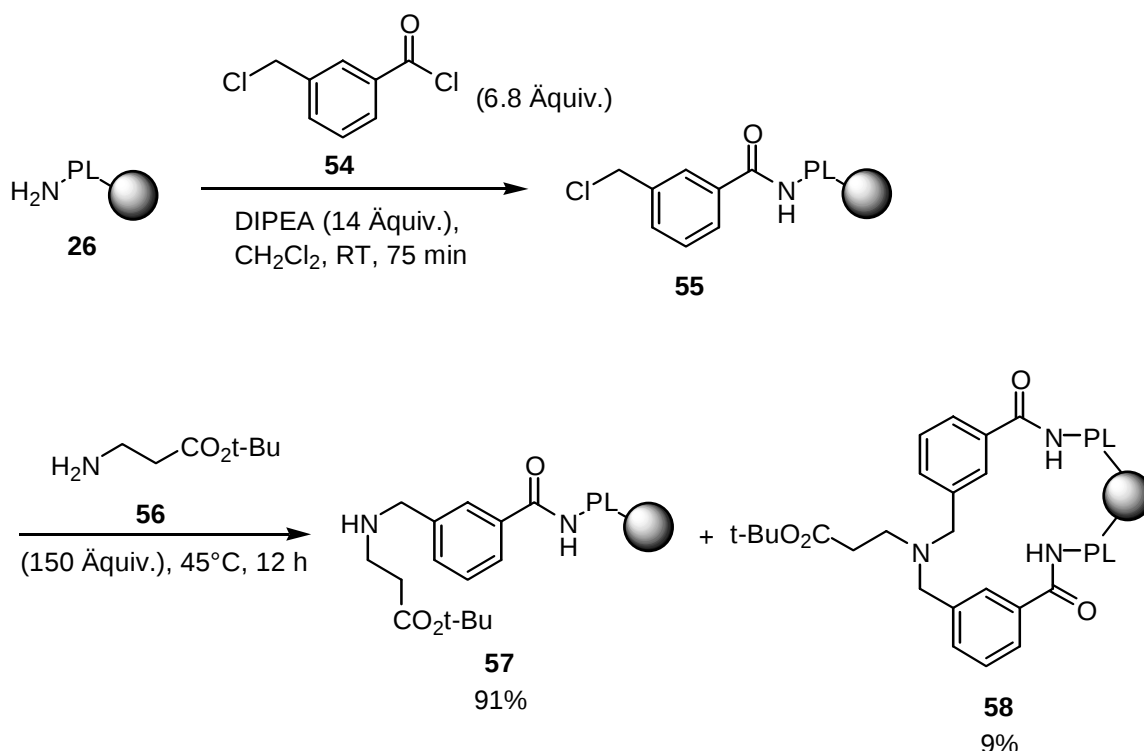


Abbildung 4.4: Signifikante NOE-Signale in **52a** und **52b**

Der dialkylierte Baustein **57** wurde submonomer an der Festphase aufgebaut (siehe Schema 4.5). Dazu wurde zuerst Photolinker-TentaGel (**26**) mit dem Säurechlorid **54** in Gegenwart der Base DIPEA acyliert. Das benzyliche Chlor im resultierenden **55** sollte dann durch das Amin der *tert*-butylgeschützten Aminosäure **56** nucleophil substituiert werden. Aus der breiten Palette von kommerziell verfügbaren Carbonsäuren mit zusätzlicher Abgangsgruppe wurde für diese Reaktionsfolge bewußt das Säurechlorid **54** ausgewählt, da es hinsichtlich potentieller Nebenreaktionen einige Vorteile bietet. So besitzt das Säurechlorid **54** in α -Stellung zur Carbonylgruppe keine Protonen und kann demzufolge durch die zur Acylierung notwendige Base nicht zum dimerisierungsgefährdeten Keten eliminiert werden.^[234] Darüber hinaus kann aufgrund der Benzylstellung des Chlors in **54** bei der nucleophilen Substitution mit dem Amin **56** keine β -Eliminierung als Nebenreaktion auftreten. Die starke Aktivierung der Carbonsäure als Säurechlorid gewährleistet zudem die Selektivität der Reaktion von **54**

mit **26** und verhindert die Substitution des benzylichen Chlors durch das harzgebundene Amin **26**.



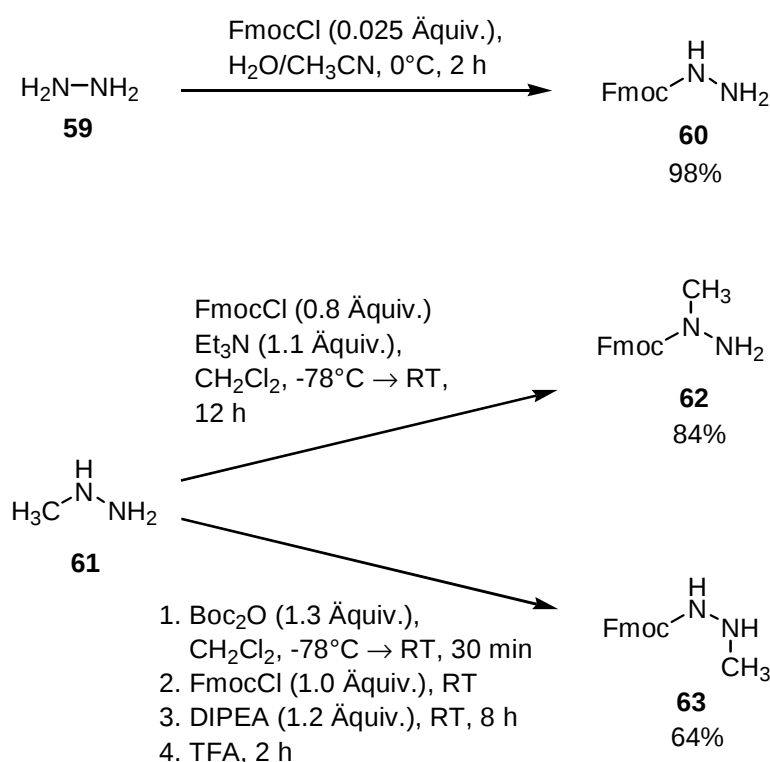
Schema 4.5: Submonomerer Aufbau des Bausteins **57** an der Festphase

Schwierigkeiten traten jedoch bei der Aminierung des Benzylchlorids **55** auf. In ersten Versuchen wurde **55** mit einer 0.2 M Lösung desamins **56** in DMF oder NMP behandelt. Das hierbei entstandene Produkt **57** war bis zu 30% mit dem tertiären Amin **58** verunreinigt, resultierend aus zweifacher Alkylierung desamins **56** mit dem Halogenid **55**. Durch drastische Konzentrationserhöhung der Reaktionslösung auf ca. 3.5 M konnte der Anteil des Trialkylamins **58** im gewünschten harzgebundenen *N*-βPra(Bu)Mamb (**57**) jedoch auf akzeptable 9% reduziert werden.

4.2.2 Baustein B

Schema 4.6 zeigt die Synthese der monogeschützten Azaaminosäurevorläufer **60**, **62** und **63**. Der Azaglycinvorläufer **60** konnte durch Umsetzung von FmocCl mit überschüssigem Hydrazin (**59**) in exzellenter Ausbeute dargestellt werden.^[235] Ausgehend von Methylhydrazin **61** konnten beide Regioisomere **62** und **63** zugänglich gemacht werden. Zur Unterscheidung der beiden Stickstoffatome in Methylhydrazin

wurde die erhöhte Nucleophilie des methylierten *N*-Atoms genutzt. So ließ sich Methylhydrazin (**61**) regioselektiv mit FmocCl und Et₃N mit einer Ausbeute von 84% in den Azasarcosinvorläufer **62** umsetzen. Um den regioisomeren Azaalaninvorläufer **63** in einer Eintopfreaktion zu erhalten, wurde Methylhydrazin (**61**) zuerst mit einem Überschuß Boc₂O versetzt. Danach wurde FmocCl sowie DIPEA zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 8 h wurde die temporär eingeführte Boc-Schutzgruppe am methylierten Stickstoffatom durch Ansäuern mit TFA entfernt und man erhielt nach chromatographischer Reinigung 1-Fmoc-2-methylhydrazin (**63**) in 64% Ausbeute.



Schema 4.6: Synthese der mono-Fmoc-geschützten Azaaminosäurenvorläufer **60**, **62** und **63**

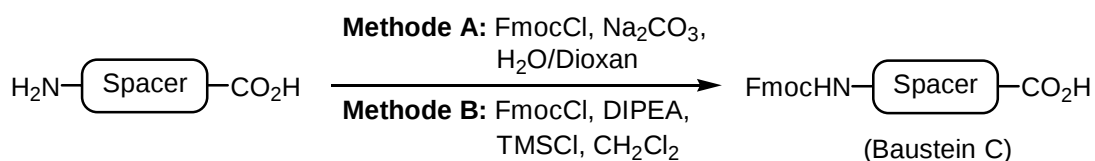
4.2.3 Baustein C

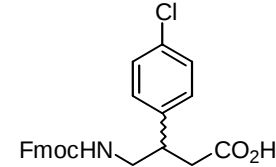
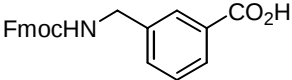
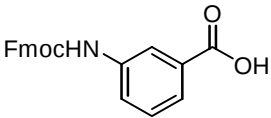
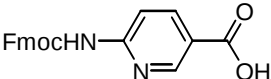
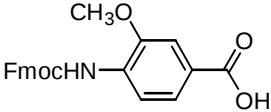
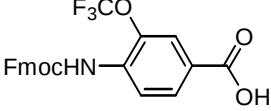
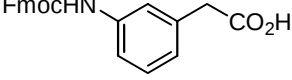
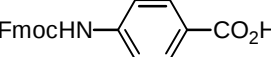
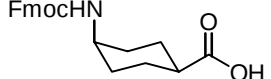
Die Syntheseplanung der RGD-Mimetika (siehe Kap. 4.1.3) sah vor, Baustein C als *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure einzuführen. Von den zahlreichen kommerziell verfügbaren *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren sind in Tabelle 4.1 die im Rahmen dieser Arbeit als Baustein C eingesetzten geschützten Aminosäuren aufgeführt.

Tabelle 4.1: Kommerziell verfügbare *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden

Nr.	Struktur	Name
73		Fmoc- γ Abu-OH
74		Fmoc- δ Ava-OH
75		Fmoc- ϵ Ahx-OH
76		Fmoc- Inp-OH
77		Fmoc-Cmp-OH
78		Fmoc-(2S,4S)-Azpc-OH

Von dem umfangreichen Angebot an kommerziell verfügbaren Aminosäuren waren jedoch nicht alle in der Fmoc-geschützten Form erhältlich. Daher mußten einige, vor allem Anilinsäuren, Fmoc-geschützt werden. Von Verbindung **65** war nur das entsprechende Cyanid erhältlich, das nach einer literaturbekannten Methode zuerst zur korrespondierenden Aminosäure hydriert werden mußte.^[236] Tabelle 4.2 zeigt das Ergebnis der Einführung der Fmoc-Schutzgruppe. Die *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren **65** und **66** wurden unter Standardbedingungen mit FmocCl in einer Na₂CO₃-Dioxan/Wasser-Lösung dargestellt (Methode A).^[237] Insbesondere bei der Synthese *N*-Fmoc-geschützter Aniline lieferte jedoch Methode B bessere Ergebnisse.^[238] Nach dieser Methode wird die Aminosäure zuerst mit einem zweifachen Überschuß an TMSCl am *N*-Atom silyliert und die Carbonsäure in den Silylester überführt. Diese temporäre Blockierung der Carbonsäure verhindert dann beim Einführen der Fmoc-Schutzgruppe Oligomerbildung. Nach dieser Methode wurden die geschützten Aminosäuren **72**, **64** und **67-71** dargestellt.

Tabelle 4.2: Synthese der *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren 64-72

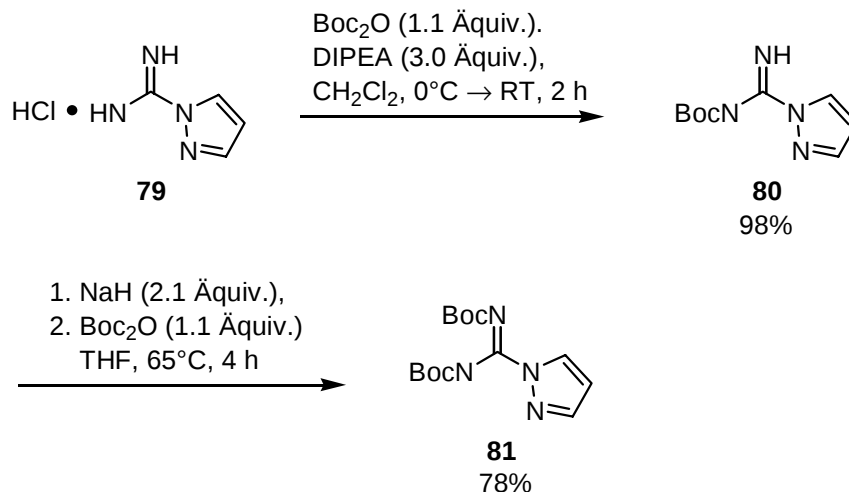
Nr.	Struktur	Name	Methode	Ausbeute
64		Fmoc-Cpb-OH	B	87%
65		Fmoc-Mamb-OH	A	16%
66		Fmoc-Mab-OH	A	87%
67		Fmoc-Ani-OH	B	63%
68		Fmoc-Amob-OH	B	45%
69		Fmoc-Atob-OH	B	46%
70		Fmoc-Mape-OH	B	88%
71		Fmoc-Pab-OH	B	79%
72		Fmoc-Cyh-OH	B	97%

4.2.4 Baustein D

Baustein D repräsentiert den Guanylstrest des Arginins der RGD-Sequenz. Daher war es naheliegend, den Aufbau der RGD-Mimetika mit der Einführung einer Guanylgruppe abzuschließen. Um wie von uns geplant, ein Amin oder Anilin in ein Guanidin zu transformieren wurden bereits verschiedene Reagenzien beschrieben.^[239-242] Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sahen wir in Bisbocguanylpiprazol **81** (siehe

Schema 4.7) aufgrund seiner hohen Reaktivität den am besten geeigneten Vertreter dieser Reagenzklasse.^[243] Dies wurde durch das Ergebnis eigener Untersuchungen (siehe Kap. 4.4.1) als auch durch das Ergebnis einer Reagenzvergleichsstudie zur Guanylierung harzgebundener Amine sowie Aniline bestätigt.^[244] Seither wurden in der Literatur mehrere Guanylierungsreagenzien beschrieben, die eine noch höhere Guanylierungseffizienz aufweisen.^[245-247] Da die Guanylierungsreaktion der RGD-Mimetika vor Erscheinen dieser Arbeiten bereits optimiert war, wurde jedoch davon abgesehen, diese Methoden in der RGD-Mimetikasyntese anzuwenden.

In Schema 4.7 ist der Zugang zu Bisbocguanylpyrazol gezeigt. Zuerst wurde Guanylpyrazol (**79**) mit Boc_2O in Gegenwart von DIPEA fast quantitativ in das monogeschützte Guanylpyrazol **80** überführt. Um **80** mit Boc_2O ein zweites Mal umzusetzen, mußte es mit NaH deprotoniert werden. Für das Gelingen dieser Reaktion war entscheidend, sie durch Zugabe von HOAc abubrechen (Zugabe von wäßriger NH_4Cl -Lösung lieferte quantitativ ein nicht charakterisiertes Nebenprodukt). Auf diese Weise konnte das Guanylierungsreagenz **81** in 81% Ausbeute erhalten werden.

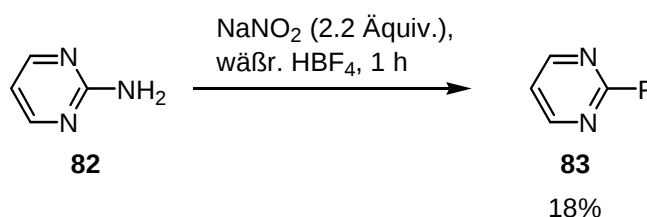


Schema 4.7: Synthese des reaktiven Guanylierungsreagngzes Bisbocguanylpyrazol **81**

Aufgrund ihrer hohen Polarität entsprechen guanylierte aza-RGD-Mimetika nicht dem Ideal eines oral verfügbaren Wirkstoffes. Daher sollte anstelle des Guanylrestes ein möglichst unpolares Guanidinmimetikum eingebaut werden. Im basischen 2-Aminopyrimidin (**82**) sahen wir einen geeigneten Vertreter dieser Pharmakophorklasse. Es weist eine deutlich geringere Polarität als die Guanidingruppe auf und wurde bereits in zahlreichen Verbindungen mit potentieller biologischer Funktion

gefunden.^[248-250] Der Austausch eines Guanidins durch ein 2-Aminopyrimidin in einem bekannten Thrombininhibitor führte zu einer signifikanten Erhöhung der Caco-2-Zellpermeabilität.^[251] Dieser Befund stützte die Hypothese, daß durch die Einführung des 2-Aminopyrimidins als Baustein D die Resorption der resultierenden aza-RGD-Mimetika verbessert werden könnte. Darüber hinaus konnten einige 2-Aminopyrimidine wie Buspirone (Tranquilizer), Piribedil (Vasodilatator) und Tandospirone (Antidepressivum, Anxiolytikum) zu marktreifen Wirkstoffen entwickelt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Amine mit 2-Fluorpyrimidin (**83**) über eine aromatische nucleophile Substitution in das korrespondierende 2-Aminopyrimidin überführt werden können.^[252,253] Dieses Reagenz wurde nach einer literaturbekannten Methode durch Diazotierung in HBF_4 aus 2-Aminopyrimidin (**82**) mit einer noch zu verbessernden Ausbeute von 18% erhalten.^[252]



Schema 4.8: Diazotierung und anschließende Fluorierung von 2-Aminopyrimidin (**82**)

Mit den beschriebenen Bausteinen A-D stand nun genügend Ausgangsmaterial für die kombinatorische Festphasensynthese der RGD-Mimetika zur Verfügung. Zuvor mußten aber die einzelnen Reaktionsschritte am festen Träger optimiert werden. Dies wird in den nun folgenden Kapiteln beschrieben.

4.3 Einführung des Azabausteins B

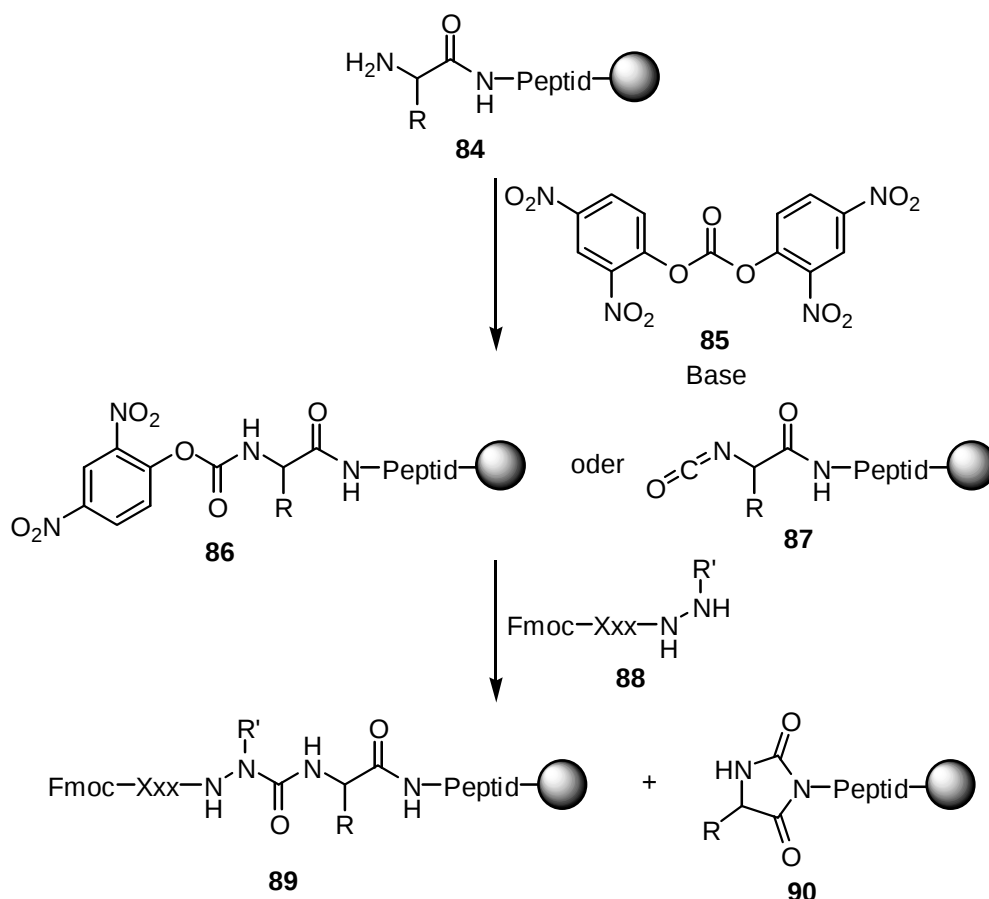
Mit Hilfe des *one-bead one-compound*-Konzepts können in kurzer Zeit große Substanzbibliotheken erzeugt werden. Da eine Reaktionskontrolle während der geplanten kombinatorischen Synthese jedoch nicht möglich war und Bausteine mit unterschiedlicher Reaktivität eingesetzt werden sollten, mußte jede Reaktion sorgfältig untersucht und gegebenenfalls optimiert werden. Darüber hinaus war stets darauf zu achten, daß die Reaktionen am festen Träger mit minimaler Nebenproduktbildung

verliefen und die chemischen Transformationen kompatibel zu den bereits aufgebauten Verbindungen waren. Nur so konnte erreicht werden, daß die geplante aza-RGD-Mimetikabibliothek möglichst viele der vorausgesagten Produkte enthielt.

Unter den geplanten Reaktionen an der Festphase nahm die Einführung des Azabausteins B eine herausragende Rolle ein. Diese Reaktion konnte bereits am festen Träger experimentell realisiert werden, wurde jedoch nie zur kombinatorischen Festphasensynthese verwendet.^[132,133,225-228] Daher mußte die Einführung der Azabausteine besonders intensiv untersucht werden – und wie sich zeigte, neue Methoden entwickelt werden, die den Anforderungen der kombinatorischen Synthese gerecht wurden.

4.3.1 Route A: Festphasengestützte Azapeptidsynthese via harzgebundener aktivierter Carbaminsäuren

Zuerst wurde eine von Quibell *et al.* beschriebene Route zur Azapeptidsynthese verfolgt.^[225] Sie setzten das *N*-terminale freie Amin eines harzgebundenen Peptids (**84**) mit Bis(2,4-dinitrophenyl)-carbonat (**85**) zur aktivierten Carbaminsäure **86** oder zum Isocyanat **87** um (siehe Schema 4.9). Anschließend wurde nach der sogenannten Dipeptid-Route ein *N*-terminal geschütztes Aminosäurehydrazid (**88**) zugegeben und man erhielt das *N*-Fmoc-geschützte Azapeptid **89**. Bei dieser Reaktion entstand jedoch in erheblicher Menge das Hydantoin **90**. (In einer später erschienen Publikation wurde diese Nebenreaktion zur selektiven Hydantoinsynthese an der Festphase benutzt.)^[254] Wurde diese Reaktion ohne Basenzusatz durchgeführt, konnte die Hydantoinbildung zwar unterdrückt werden, dies hatte aber eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit zur Folge. Dennoch konnte diese Strategie in unserem Arbeitskreis erfolgreich mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester auf die Synthese cyclischer Azapeptide angewandt werden.^[132]

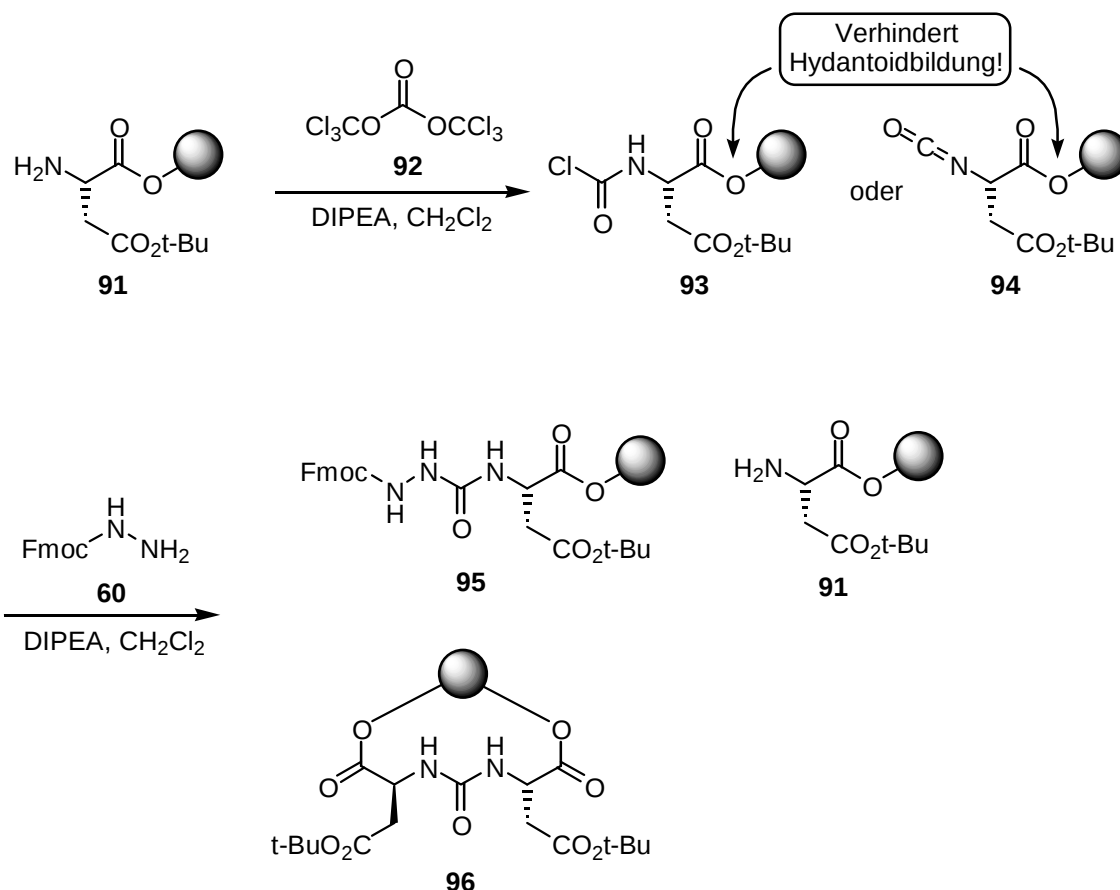


Schema 4.9: Azapeptidsynthese an der Festphase nach Quibell et al.^[225]

Diese Strategie wurde von J. S. Schmitt im Rahmen seiner Dissertationsarbeit weiterentwickelt.^[133] Er konnte zeigen, daß zur Erzeugung aktivierter Carbaminsäuren am festen Träger Chlorameisensäure-4-nitrophenylester (**86**) durch das reaktivere Triphosgen^[255] (**92**) ersetzt werden kann. Mit dieser Methode konnte die Reaktionszeit der Azapeptidbildung erheblich verkürzt werden.

Vor dem Hintergrund dieser positiven Erfahrungen war es daher naheliegend diese Strategie auf die kombinatorische Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika anzuwenden. Anhand der Synthese des harzgebundenen Fmoc-azaGly-Asp(Bu)-OH (**95**) sollte ausgelotet werden, in welchem Umfang diese Methode dazu geeignet ist (siehe Schema 4.10). Ausgehend von TCP-Polystyrol-Harz-gebundener Asparaginsäure (**91**) wurde mit einer Lösung von Triphosgen (**92**) und DIPEA in CH₂Cl₂ das Carbaminsäurechlorid **93** oder das Isocyanat **94** generiert. Welche der beiden denkbaren Zwischenstufen tatsächlich vorlag, wurde nicht aufgeklärt, war jedoch für den weiteren Reaktionsverlauf nicht entscheidend. Um das gewünschte Azapeptid **95** zu erhalten wurde das Harz gewaschen und danach mit Fmoc-Hydrazin (**60**) in

Gegenwart von überschüssigem DIPEA versetzt. Da die Asparaginsäure als Tritylester an die Festphase gebunden war, konnten die resultierenden aktivierten Carbaminsäuren **93** und **94** keine Hydantoinbildung eingehen.



Schema 4.10: Darstellung von harzgebundenem Fmoc-azaGly-Asp(Bu)-OH (**95**) nach Route A. Resultierend aus der Quervernetzungsreaktion von **93** oder **94** mit **91** entsteht das Nebenprodukt **96**. Zudem wurde Edukt **91** im Produktgemisch nachgewiesen.

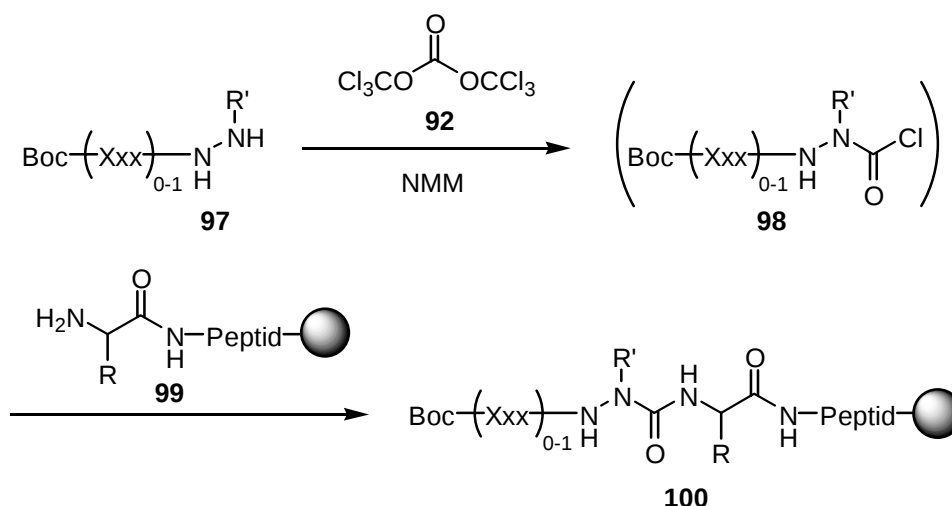
Die LC-MS-Analyse der vom Harz abgespaltenen Produkte ergab, daß unter diesen Reaktionsbedingungen überwiegend das gewünschte Azapeptid **95** entstanden war. Leider war es mit dem Harnstoff **96**, resultierend aus der Quervernetzungsreaktion von **91** mit **93** oder **94**, und einigen nicht identifizierten Nebenprodukten verunreinigt. Des weiteren wurden in den Produktgemischen unterschiedlicher Ansätze teilweise erhebliche Mengen der nicht umgesetzten Asparaginsäure (**91**) nachgewiesen, obwohl die Reaktionsparameter nicht verändert wurden.

Aufgrund ihrer mangelhaften Reproduzierbarkeit und Neigung zur Nebenproduktbildung schien diese Strategie also den hohen Ansprüchen einer kombinatorischen

Synthese nicht zu genügen. Darüber hinaus sah unsere Syntheseplanung vor (siehe Kap. 4.1.3), Baustein A amidisch über einen Photolinker an die Festphase zu binden. Dies hätte die beschriebene Route noch stärker limitiert, da vermutlich ihre Anwendung auf die Bausteine Asparaginsäure sowie Glutaminsäure zur unerwünschten Hydantoinbildung geführt hätte. Daher mußte eine andere Strategie zur Einführung der Azabausteine gefunden werden.

4.3.2 Route B: Festphasengestützte Azapeptid- bzw. Azapeptidsynthese via aktivierter Azaaminosäuren in Lösung

Die Alternative zur oben beschriebenen Route A war, die Fmoc-geschützten Hydrazine in Lösung in aktivierte Carbazinsäuren zu überführen und diese mit harzgebundenen Aminosäuren bzw. Peptiden zu den entsprechenden Azapeptiden umzusetzen. Die in Route A aufgetretene Hydantoinbildung sowie die Quervernetzungsreaktion zum Harnstoff könnte dann nicht stattfinden. Darüber hinaus könnte mit einem beliebig hohen Überschuß an aktivierter Azaaminosäure vollständiger Umsatz erzwungen werden. Diese Route wurde für die Azapeptidsynthese nach der Boc-Strategie mit Triphosgen als Carbonylierungsreagenz bereits realisiert.^[226,227] Dazu wurde das Boc-geschützte Hydrazin **97** mit Triphosgen (**92**) in Gegenwart der Base *N*-Methylmorpholin (NMM) in die entsprechende aktivierte Azaaminosäure **98** überführt (siehe Schema 4.11). Anschließend wurde das harzgebundene Peptid **99** mit dem *in situ* generierten Carbazinsäurechlorid **98** behandelt und man erhielt das harzgebundene Azapeptid **100**.



Schema 4.11: Azapeptidsynthese an der Festphase nach André *et al.* und Frochot *et al.* [226,227]

Diese Methode scheint für die festphasengestützte Azapeptidsynthese sehr gut geeignet zu sein. Die aktivierte Azaaminosäure wird gemäß dieser Methode jedoch *in situ* generiert. Daher besteht immer das Risiko, daß überschüssiges Triphosgen mit dem freien *N*-Terminus des harzgebundenen Peptids reagiert. Darüber hinaus erwies sich diese Methode zur Darstellung aktivierter Azapeptide als nicht geeignet (siehe folgendes Kapitel).

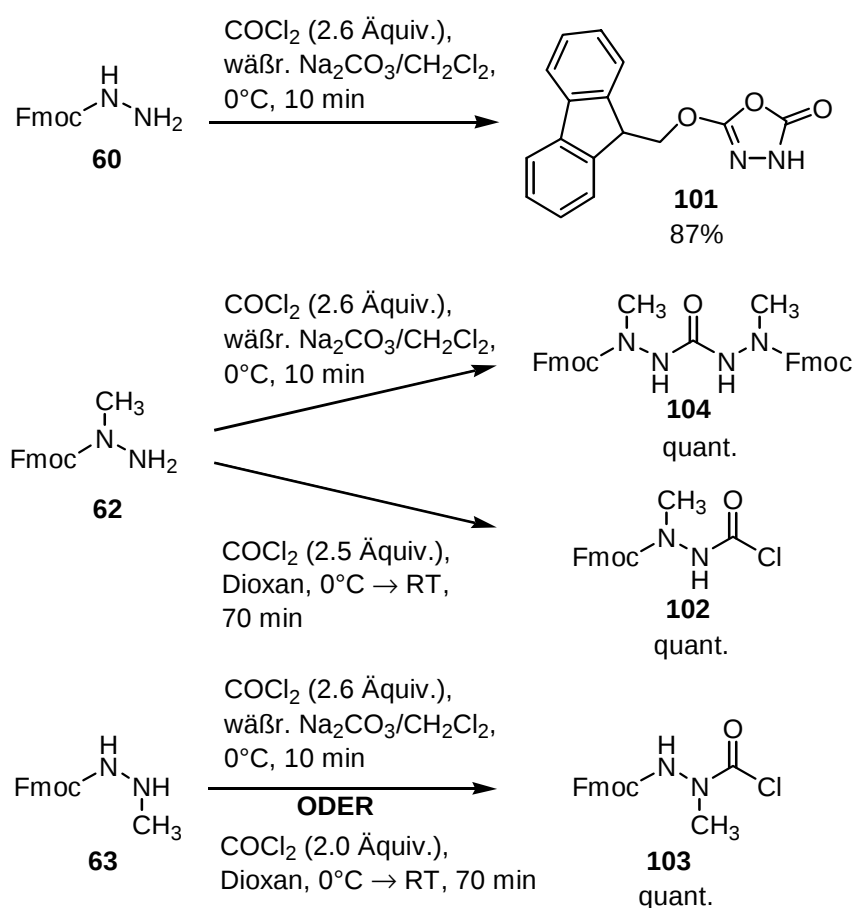
4.3.2.1 Synthese der aktivierten Azabausteine B

In Schema 4.12 ist der Zugang zu den aktivierten Azabausteinen **101-103** dargestellt. Zur Transformation der monogeschützten Hydrazine **60-63** in die korrespondierenden aktivierten Spezies mußten sie mit einer zweifach aktivierten Carbonsäure umgesetzt werden. Für die Realisierung dieser Reaktion erwies sich eine kommerziell erhältliche Lösung von Phosgen in Toluol als Reagenz der Wahl. Phosgen besitzt eine außerordentlich hohe Reaktivität und ein Überschuß kann im Gegensatz zum gleichreaktiven aber kristallinen Triphosgen bequem und vollständig im Vakuum entfernt werden.

Nach einer von Nowick *et al.* zur Darstellung von Isocyanaten beschriebenen Methode konnte Fmoc-Hydrazin (**60**) in guter Ausbeute in das hoch reaktive 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-on **101** überführt werden.^[256] Dazu wurde das Fmoc-Hydrazin (**60**) in einer 1:1-Mischung aus CH_2Cl_2 und wäßriger NaHCO_3 -Lösung suspendiert und

anschließend mit einem ca. zweifachen Überschuß an Phosgen versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min mußte zur Aufarbeitung lediglich die organische Phase vom Lösungsmittel befreit werden und man erhielt das analysenreine 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-on **101**.

Die Anwendung dieser Methode auf die Fmoc-Methylhydrazine **62** und **63** führte jedoch in beiden Fällen nicht zu den entsprechenden 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-onen. Anstatt der erwarteten Heterocyclenbildung wurde auf diese Weise der Azasarcosin-vorläufer **62** quantitativ in das Carbondihydrazid **104** umgewandelt, während aus dem Azaalaninvorläufer **63** das verunreinigte Carbazinsäurechlorid **103** resultierte.



Schema 4.12: Synthese der aktivierte Azabausteine **101**, **102** und **103**

Leider konnte die von Maurad und Mitarbeitern beschriebene Aktivierung von Boc-geschützten Hydrazinen mit Triphosgen und NMM nicht auf den Azapeptoidvorläufer **62** übertragen werden.^[226,227] Alle Versuche **62** mit Phosgen in Gegenwart einer tertiären Stickstoffbase wie Et₃N, DIPEA, Pyridin, Collidin oder NMM zu aktivieren, führten zu nicht identifizierten Produktgemischen. Im Gegensatz zu den säurelabilen

Boc-geschützten Hydrazinen bestand jedoch bei der Umsetzung der Fmoc-geschützten Hydrazine **62** und **63** keine Notwendigkeit, das während der Reaktion entstandene HCl zu neutralisieren.

Bereits 1964 gelang es J. Gante, das säurestabile Z-Hydrazin mit Phosgen in die entsprechende Carbazinsäure zu transformieren.^[257] Dazu wurde Phosgen in eine Lösung von Z-Hydrazin in Et₂O eingeleitet. Da etwa die Hälfte des Z-hydrazins während der Reaktion als Hydrochloridsalz ausfiel und sich somit der weiteren Umsetzung mit Phosgen entzog, war die Ausbeute jedoch auf ca. 50% limitiert. Zudem verlief die Umsetzung des Z-geschützten Carbazinsäurechlorids mit verschiedenen Aminen mit unbefriedigenden Ausbeuten. Daher galten Carbazinsäuren zur Azapeptidsynthese als wenig geeignet.

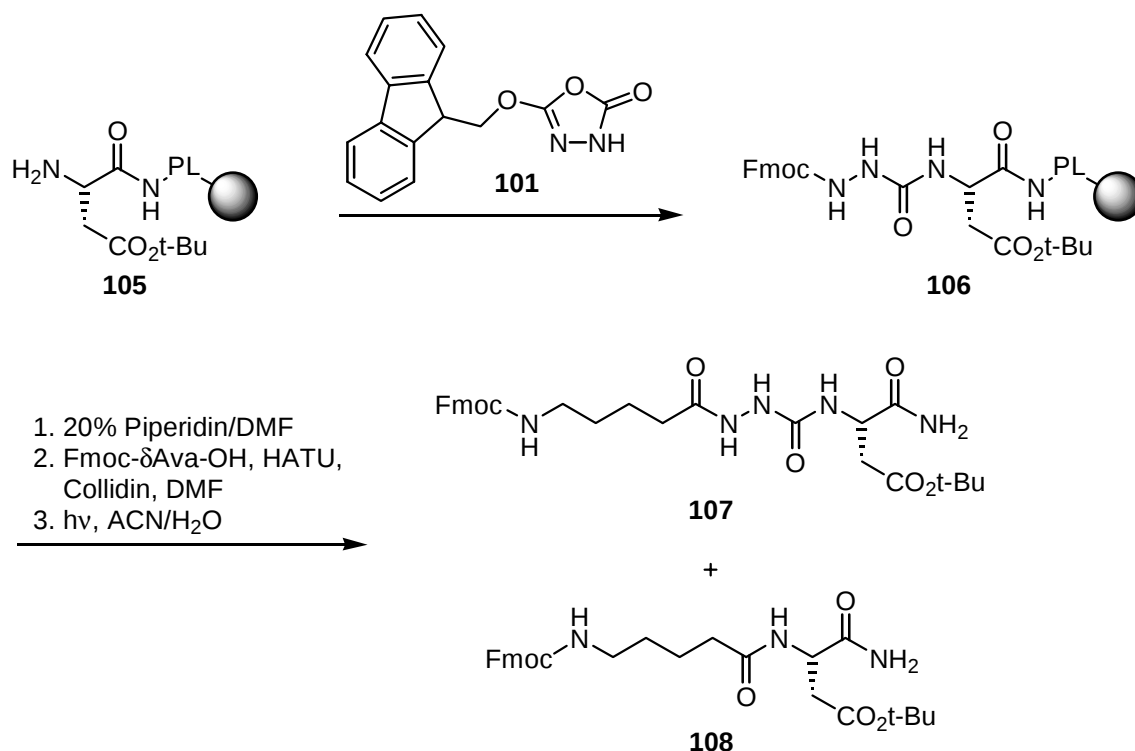
Dennoch versuchten wir die Fmoc-Hydrazine ohne Basenzusatz mit einer Phosgenlösung in Toluol in die korrespondierenden Carbazinsäurechloride zu überführen. Wie erwartet fielen die Fmoc-Hydrazine **62** und **63** in CH₂Cl₂ nach Zugabe von Phosgen als Hydrochloridsalz aus. Erfreulicherweise konnte die Entstehung des Niederschlags durch Verwendung von wasserfreiem Dioxan als Lösungsmittel vermieden werden. Auf diese Weise gelang es mit einem Überschuß an Phosgenlösung sowohl **62** als auch **63** quantitativ in die korrespondierenden Carbazinsäurechloride **102** und **103** zu transformieren.

Alle aktivierten Azabausteine konnten als Feststoffe isoliert werden. Sie erwiesen sich als äußerst stabil und konnten bei 4 °C über mehrere Monate gelagert werden, ohne dabei an Reaktivität zu verlieren.

4.3.2.2 Optimierung des Azaglycineinbaus an der Festphase

Schema 4.13 zeigt die Vorgehensweise zur Untersuchung der Kupplungsreaktion des als Oxadiazolon aktivierten Azaglycins **101** mit festphasengebundenen Aminen. Als Modellbaustein A wurde die Photolinker-TentaGel-gebundene Asparaginsäure (**105**) gewählt. Um den Umsatz der harzgebundenen H-Asp(Bu)-NH₂ (**105**) mit dem Oxadiazolon **101** zuverlässig kontrollieren zu können, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Reaktion durch Waschen des Harzes mit CH₂Cl₂ oder DMF abgebrochen. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Hilfe des Kupplungs-

reagenzes HATU in Gegenwart der Base Collidin die Fmoc-geschützte δ -Aminovaleriansäure (Fmoc- δ Ava-OH) an das entschützte Azapeptid **106** gekuppelt. Zur Abspaltung der harzgebundenen Reaktionsprodukte wurde das Harz in CH₃CN/Wasser suspendiert und mit UV-Licht bestrahlt. Nach dieser Vorgehensweise erhielt man das gewünschte Produkt **107** zusammen mit Dipeptid **108**, das aus unumgesetzter Asparaginsäure (**105**) resultierte. Beide Produkte enthielten Fmoc- δ Ava-OH, welches ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum in der Nähe von 220 nm aufweist. Daher konnte aus dem HPLC-Chromatogramm bei 220 nm zuverlässig das relative Mengenverhältnis von Azapeptid **107** zu Dipeptid **108** bestimmt werden und somit auf den Reaktionsumsatz der harzgebundenen Asparaginsäure **105** mit dem Oxadiazolon **101** geschossen werden.



Schema 4.13: Festphasensynthese von Azapeptid **106**. Nach Fmoc-Entschützung, Kupplung mit Fmoc- δ Ava-OH und Photolyse des Harzes erhält man das Azapeptid **107** neben dem Dipeptid **108**, resultierend aus unumgesetztem **105**. Beide Produkte tragen das dominante UV-Chromophor Fmoc und können daher mittels HPLC zuverlässig quantifiziert werden.

Abbildung 4.5 veranschaulicht die Umsetzung des Asp(Bu)-amid-Harzes (**105**) mit einem zweifachen bzw. dreifachen Überschuß an Oxadiazolon **101** in CH₂Cl₂ bei

Raumtemperatur. Es ist zu erkennen, daß das Oxadiazolon **101** bemerkenswert rasch mit der harzgebundenen Asparaginsäure (**105**) reagierte. Dennoch war ein dreifacher Überschuß des aktivierten Azaglycins **101** notwendig, um die Kupplung nach spätestens 50 min zu vervollständigen.

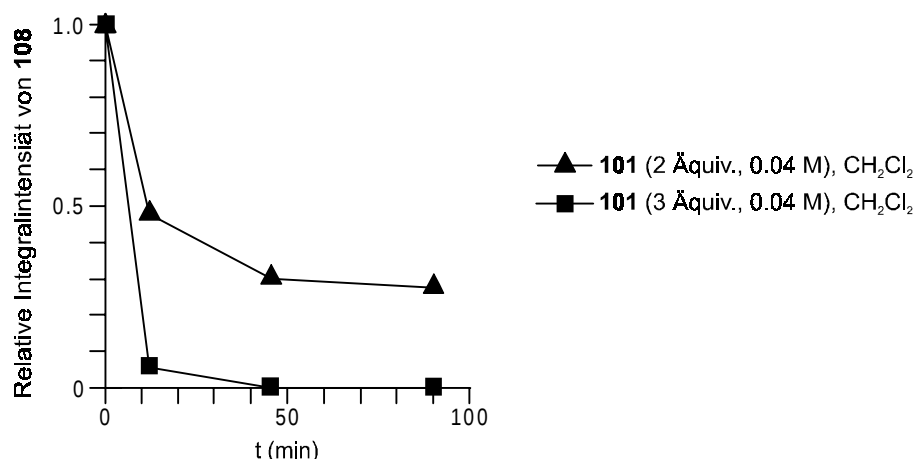


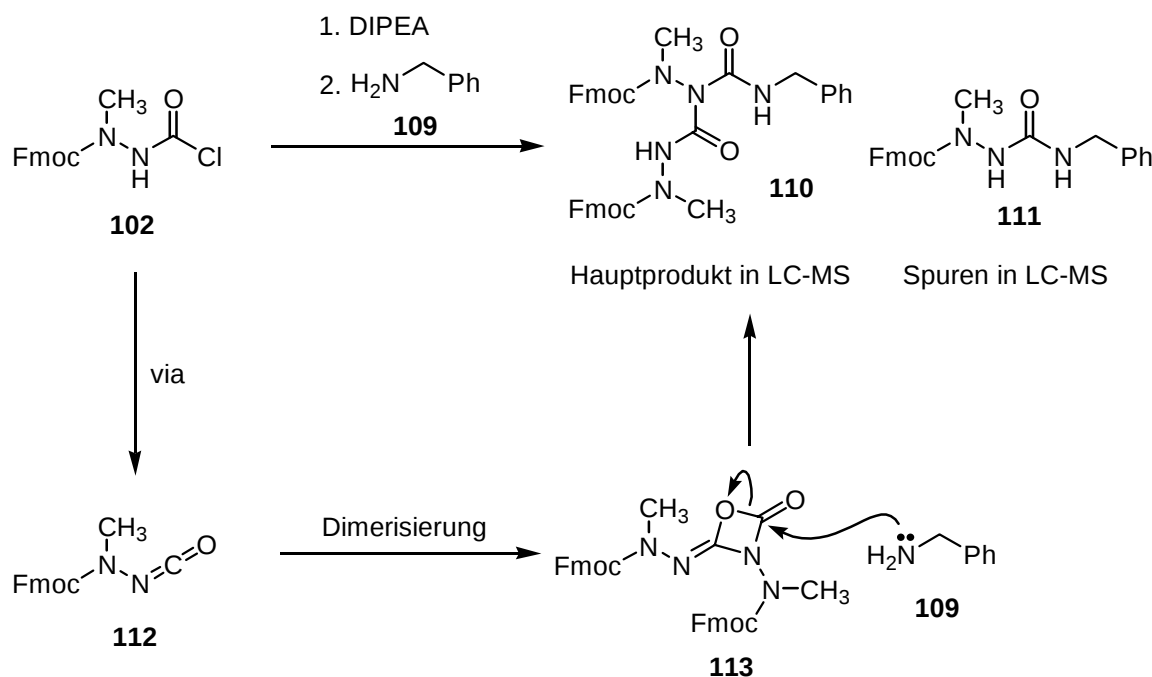
Abbildung 4.5: Reaktion des Oxadiazolons **101** mit H-Asp(Bu)-amid-Harz **105**. Relativer Mengenanteil an Edukt **105** (quantifiziert durch relative Integralintensität der Fehlsequenz **108** im HPLC-Chromatogramm) in Abhängigkeit der Reaktionszeit *t*.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Durchführung dieser Reaktion nicht auf das Lösungsmittel CH₂Cl₂ beschränkt ist, sondern auch in DMF, CH₃CN oder THF durchgeführt werden kann. Bei wiederholt durchgeführten Kupplungen von Oxadiazol **101** an die harzgebundene Asparaginsäure (**105**) betrug die HPLC-ermittelte Reinheit des resultierenden Azapeptids **106** stets etwa 90%. Aufgrund seiner Effizienz und Zuverlässigkeit ist das Oxadiazolon **101** demnach ein ideales Reagenz zur kombinatorischen Festphasensynthese Azaglycin-haltiger Verbindungen.

In der Literatur wurden bereits verschiedene 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-one als vergleichsweise stabile Heterocyclen beschrieben. Um sie dennoch mit Semicarbaziden oder Aminen – in schlechten Ausbeuten – zu öffnen, waren Temperaturen von >100°C notwendig.^[258,259] Im Gegensatz zu diesen 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-onen ist Verbindung **101** am 5-C-Atom nicht mit einem Alkylrest, sondern mit einem O-Atom substituiert. Dies scheint der Grund für die ungewöhnlich hohe Reaktivität des Oxadiazolons **101** zu sein.

4.3.2.3 Optimierung des Azasarcosineinbaus an der Festphase

Um die Eignung des Carbazinsäurechlorids **102** zur kombinatorischen Festphasensynthese der RGD-Mimetika zu überprüfen, wurde es in ersten Orientierungsexperimenten in Lösung mit Benzylamin (**109**) umgesetzt (siehe Schema 4.14). Grundsätzlich sollten kombinatorische Festphasensynthesen mit möglichst unkomplizierten Reaktionsführungen gelingen. Dies verbessert die Reproduzierbarkeit der einzelnen Reaktionsschritte und erleichtert die Automatisierung der Festphasensynthese. Im Idealfall genügt zur Durchführung einer Reaktion die *einmalige* Zugabe einer Reaktionslösung zum festen Träger. Um diesen Anforderungen zu genügen, wurde zuerst eine „gebrauchsfertige“ Lösung hergestellt, indem das aktivierte Azasarcosin **102** zusammen mit DIPEA in CH_2Cl_2 gelöst wurde. Danach wurde die so erhaltene Reaktionslösung mit einem Äquivalent Benzylamin (**109**) versetzt. Die LC-MS-Analyse des Produktgemisches zeigte jedoch nur Spuren des gewünschten Produkts **111** neben zahlreichen zum Teil nicht identifizierten Nebenprodukten.



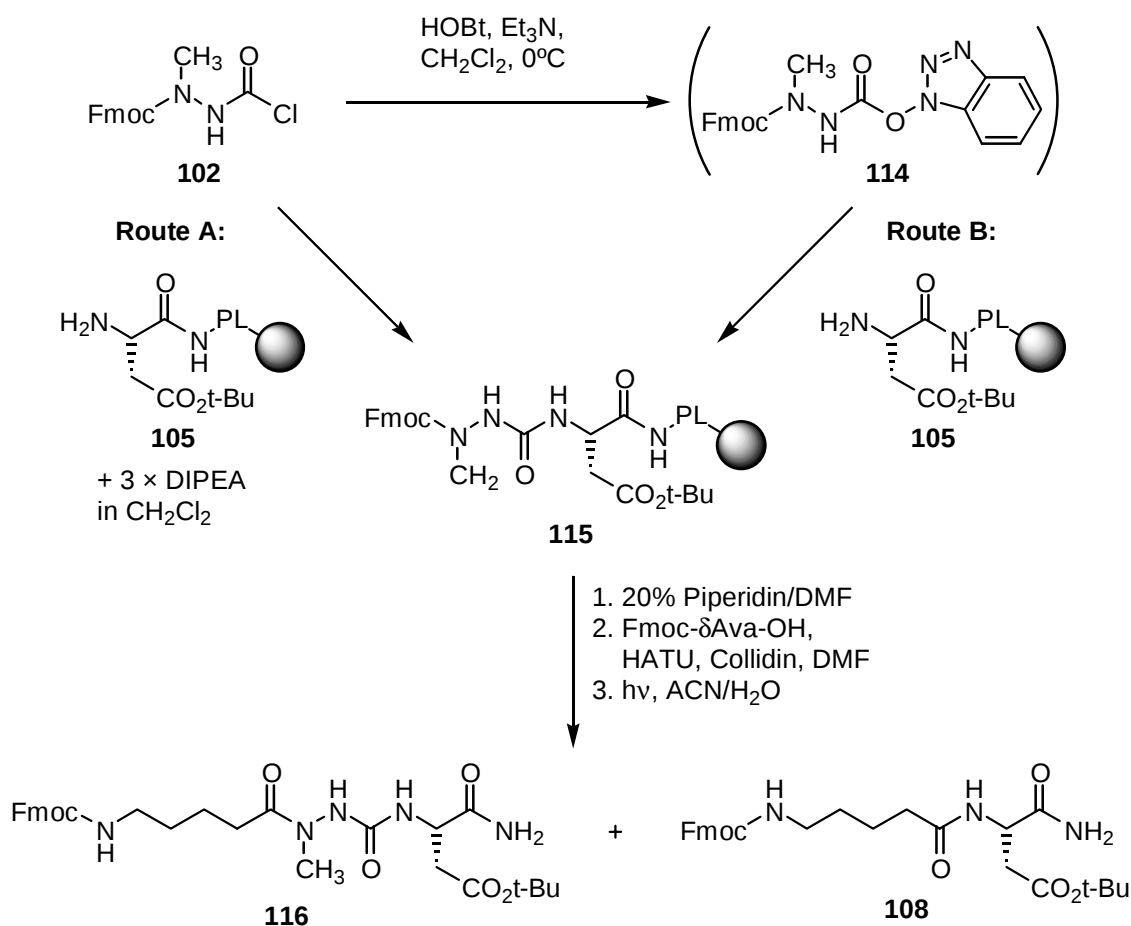
Schema 4.14: Umsetzung des Carbazinsäurechlorids **102** mit Benzylamin (**109**) in Gegenwart von DIPEA. Das gewünschte Produkt **111** entsteht nur zu einem geringen Anteil. Die detektierte Masse von m/z 695 (**110**) könnte aus der Dimerisierung des Isocyanats **112** zu **113** und anschließender Aminolyse mit Benzylamin (**109**) resultieren.

Eines der Hauptprodukte wies die Molekülmasse m/z 695 auf. Schema 4.14 zeigt die wahrscheinliche Struktur der entstandenen Verbindung **110** sowie einen plausibeln Reaktionsweg, der das Auftreten dieser Verbindung erklärt. Danach eliminiert das Carbazinsäurechlorid **102** nach Zugabe der Base zum Isocyanat **112**. Dieses dimerisiert analog zu einem Keten zum 1,3-Oxazetidin-2,4-dion **113**, das durch Aminolyse mit Benzylamin **109** unter Ringöffnung zu Verbindung **110** führt. Es sind auch andere Strukturen der selben Molekülmasse sowie alternative Reaktionswege denkbar. Entscheidend für die beobachtete Nebenproduktbildung schien aber das hochreaktive Eliminierungsprodukt **112** zu sein, da **102** ohne Basenzusatz in Lösung stabil ist. Sein Auftreten könnte aber verhindert werden, wenn es gelänge, die Reaktion unter neutralen Bedingungen durchzuführen.

Dies konnte durch Umstellung des Reaktionsprotokolls experimentell realisiert werden. Dazu wurde zuerst eine äquimolare Menge Benzylamin **109** zu einer Lösung des Carbazinsäurechlorids **102** in CH_2Cl_2 gegeben und danach sukzessiv mit DIPEA versetzt, um das während der Reaktion entstandene HCl zu neutralisieren. Tatsächlich konnte gemäß dieser Reaktionsführung das Entstehen der Nebenprodukte vollkommen unterdrückt und vollständiger Umsatz erzielt werden. Der Versuch, die HCl-Eliminierung durch den Einsatz der abgeschirmten Stickstoffbase 2,6-Di(*tert*-butyl)pyridin (Protonenfalle) zu verhindern, schlug fehl. Die typischen aus der HCl-Eliminierung entstandenen Nebenprodukte wurden nicht beobachtet. Dennoch konnte die Umsetzung des Benzylamins nicht komplettiert werden, da es auch mit einem großen Überschuß an schwach basischer Protonenfalle nicht gelang, das HCl zu neutralisieren.

Nach diesen Voruntersuchungen sollte die Aminolyse des aktivierten Azasarcosins **102** auf die Festphasensynthese übertragen werden. Als Modellbaustein A wurde erneut die Photolinker-TentaGel-gebundene Asparaginsäure (**105**) gewählt (siehe Schema 4.15). Um den Umsatz der harzgebundenen H-Asp(Bu)-NH₂ (**105**) mit dem Carbazinsäurechlorid **102** zuverlässig quantifizieren zu können wurde die in Kap. 4.3.2.2 beschriebene Strategie verwendet. Wie erwartet, führte aufgrund der HCl-Bildung die Behandlung der harzgebundenen Asparaginsäure (**105**) mit einem Überschuß an Carbazinsäurechlorid **102** ohne Basenzusatz unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel immer zu einem etwa 50%igen Umsatz. Dies ergab die

HPLC-Quantifizierung der Kupplungsprodukte **116** und **108**. Um die Reaktion zu vervollständigen mußte also das während der Reaktion entstandene HCl neutralisiert werden. Dazu wurde die in Lösung ausgearbeitete Reaktionsführung angewandt und dadurch die oben beschriebene Nebenproduktbildung vermieden. So wurde das H-Asp(Bu)-Amidharz (**105**) zuerst mit einem fünffachen Überschuß einer Lösung von Carbazinsäurechlorid **102** in CH_2Cl_2 versetzt. Dann wurde dreimal im Zeitintervall von etwa 30 min jeweils ein zweifacher Überschuß einer DIPEA-Lösung zugegeben. Auf diese Weise konnte vollständiger Umsatz erzielt werden. Die HPLC-ermittelte Reinheit des photolytisch vom Harz abgelösten Azaeptids **115** betrug >95%.



Schema 4.15: Festphasensynthese von Azaeptid **115**. Route A: Das Carbazinsäurechlorid **102** wird direkt mit der harzgebundenen Asparaginsäure (**105**) umgesetzt. Route B: **102** wird zuerst in den analogen HOBt-Akivester **114** überführt. Das HOBt/ Et_3N -Gemisch puffert die Lösung und ermöglicht eine Reaktionsführung ohne nachträgliche Titration - Die nachfolgende Peptidkupplung dient der HPLC-Quantifizierung (siehe Kap. 4.3.2.2).

Obwohl dieses Reaktionsprotokoll nicht optimal zur Automatisierung geeignet ist, konnte durch wiederholte Durchführung dieser Reaktion ihre Reproduzierbarkeit belegt werden. Bei Anwendung des ausgearbeiteten Reaktionsprotokolls ist das aktivierte Azasarcosin **102** zur manuellen kombinatorischen Festphasensynthese daher bestens geeignet.

Manche hochautomatisierte Techniken der parallelen Synthese wie z. B. die SPOT-Synthese auf Zellulose^[152] oder die *light-directed synthesis on chips*^[153] benötigen jedoch „gebrauchsfertige“ Reaktionslösungen. D. h. eine nachträgliche pH-Justierung ist mit den genannten Methoden nicht durchführbar.

Um auch diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde die in Schema 4.15 gezeigte alternative Route B entwickelt. Gemäß dieser Methode wird das Carbazinsäurechlorid **102** *in situ* durch Zugabe einer Lösung von saurem HOBt und basischem Et₃N in CH₂Cl₂ in den korrespondierenden HOBt-Aktivester **114** umgewandelt. Die in Abbildung 4.6 veranschaulichte Reaktion einer 0.1 M Lösung des HOBt-Aktivesters mit H-Asp(Bu)-amid-Harz (**105**) in CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur, zeigte eine akzeptable Reaktionsgeschwindigkeit. Nach einer Reaktionszeit von 4 h, war die harzgebundene Asparaginsäure (**105**) bereits zu 93% umgesetzt. Darüber hinaus wurde keine signifikante Nebenproduktbildung beobachtet. Offensichtlich konnte also mit der Et₃N/HOBt-Lösung das Reaktionsmedium gepuffert werden. Dadurch wurde die unter basischen Bedingungen auftretende Eliminierung verhindert. Zugleich konnte der Et₃N/HOBt-Puffer der inhibierenden pH-Senkung während der Reaktion entgegenwirken. Mit der Et₃N/HOBt-gepufferten Lösung des HOBt-Aktivesters **114** wurde somit auch zur Azasarcosin-Kupplung eine „gebrauchsfertige“ Reaktionslösung entwickelt, die allen Anforderungen einer automatisierten Festphasensynthese genügt.

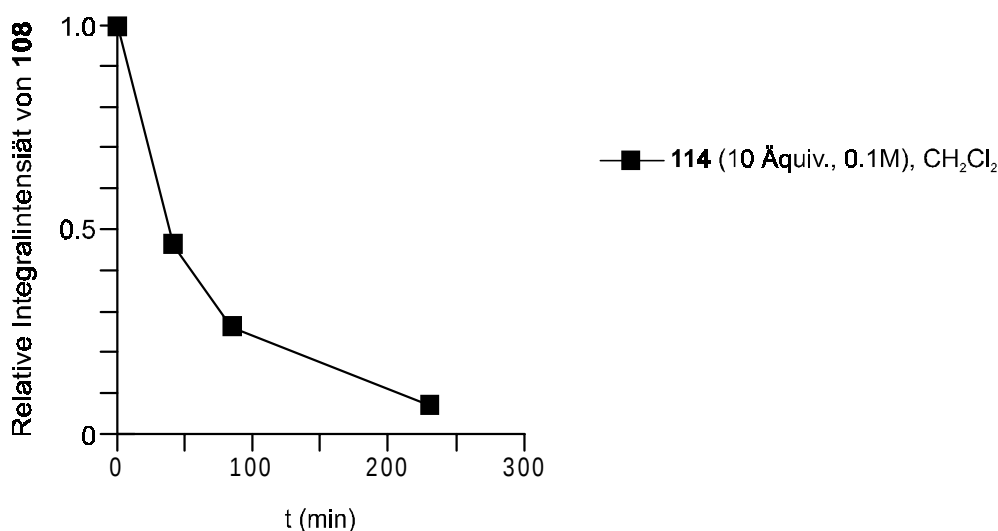


Abbildung 4.6: Reaktion des HOBt-Aktivesters **114** mit H-Asp(Bu)-amid-Harz **105**. Relativer Mengenanteil an Edukt **105** (quantifiziert durch relative Integralintensität der Fehlsequenz **108** im HPLC-Chromatogramm) in Abhängigkeit der Reaktionszeit t .

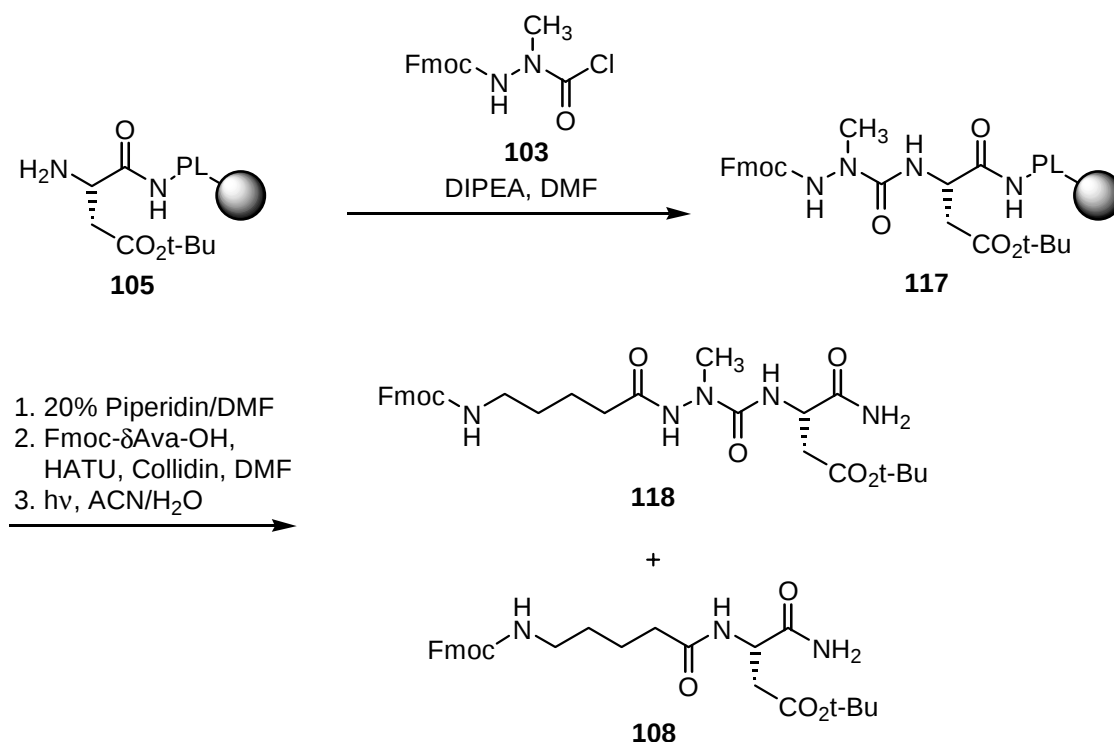
Dennoch wurde davon abgesehen, die Route über den Aktivester **114** weiter zu optimieren, da die Carbazinsäure-Route reproduzierbar sehr gute Ergebnisse lieferte und mit einer erheblich höheren Reaktionsgeschwindigkeit verlief.

4.3.2.4 Optimierung des Azaalanineinbaus an der Festphase

Das als Carbazinsäurechlorid aktivierte Azaalanin **103** ist am N -Atom in α -Stellung zum Säurechlorid mit einer Methylgruppe substituiert. Daher konnte in dieser Verbindung keine basenvermittelte HCl- β -Eliminierung auftreten. Die Behandlung von harzgebundener Asparaginsäure **105** mit einer Lösung von Carbazinsäurechlorid **103** und DIPEA in CH₂Cl₂ ergab das Fmoc-geschützte Azapeptid **117** ohne signifikante Nebenproduktbildung (Schema 4.16).

Im Vergleich zu den oben beschriebenen aktivierten Azabausteinen, erwies sich das Carbazinsäurechlorid **103** jedoch als überraschend unreaktiv. Die Bestimmung des Reaktionsumsatzes erfolgte analog zur in Kap. 4.3.2.2 beschriebenen Methode. Das HPLC-ermittelte Verhältnis der Folgeprodukte **117** und **108** zeigte, daß die Reaktion einer 0.05 M Lösung von **103** und DIPEA in CH₂Cl₂ mit der harzgebundenen Asparaginsäure (**105**) nach einer Reaktionszeit von 5 h nur zu etwa 50% abgeschlossen war (siehe Abbildung 4.7). Diese vergleichsweise niedrige Reaktionsgeschwindigkeit steht im Einklang mit einer Beobachtung von Janda und Mitarbeitern. Die von ihnen

untersuchten Boc-geschützten und als Pentafluorphenylester „aktivierten“ Pendants zu **103** erwiesen sich gegenüber Hydrazinen als inert.^[228]



Schema 4.16: Festphasensynthese von Azapeptid **118**. Es genügt die einmalige Zugabe einer Carbazinsäurechlorid **103**/DIPEA-Lösung. Die nachfolgende Peptidkupplung dient der HPLC-Quantifizierung (siehe Kap. 4.3.2.2).

Danach wurde versucht, die Reaktion des Carbazinsäurechlorids **103** zu katalysieren. Der Zusatz des gängigen Acylierungskatalysators DMAP unterdrückte jedoch die Bildung des gewünschten Produkts Fmoc-azaAla-Asp(Bu)-NH₂ (**117**) vollständig. Zum gleichen Ergebnis führte die Durchführung der Reaktion in einem 1:1-Lösungsmittelgemisch aus Pyridin und CH₂Cl₂. (Vermutlich zersetzte sich das Carbazinsäurechlorid in Gegenwart von DMAP oder Pyridin). Mit dem alternativen Acylierungskatalysator Bu₃P^[260] konnte die Reaktion hingegen überhaupt nicht beeinflusst werden.

Im Gegensatz zur literaturbekannten *in situ*-Generierung von Carbazinsäurechloriden mit Triphosgen,^[220,226,227] lieferte unsere Strategie die Carbazinsäurechloride als Reinverbindungen und ermöglichten daher die freie Wahl des Lösungsmittels bei deren Umsetzung. Ein Lösungsmittelscreening ergab, daß die Verwendung von CH₃CN und THF anstelle von CH₂Cl₂ zu einer leichten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit

führte. Das beste Ergebnis zeigte jedoch DMF. Wurde die Reaktion in diesem Lösungsmittel durchgeführt, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit etwa verdoppelt werden. Durch zusätzliche Konzentrationserhöhung der Reaktionslösung, wurde schließlich eine befriedigende Reaktionsgeschwindigkeit erzielt. Wie in Abbildung 4.7 verdeutlicht, genügte eine Reaktionszeit von 5 h, um die harzgebundene Asparaginsäure **105** mit einer 0.1 M Lösung von aktiviertem Azaalanin **103** und DIPEA in DMF zu etwa 97% umzusetzen. Um für die endgültigen Synthesen der azaAla-haltigen RGD-Mimetika vollständigen Umsatz zu gewährleisten, wurde ein fünffacher Überschuß an **103** eingesetzt und die Reaktionszeit auf 12 h verlängert.

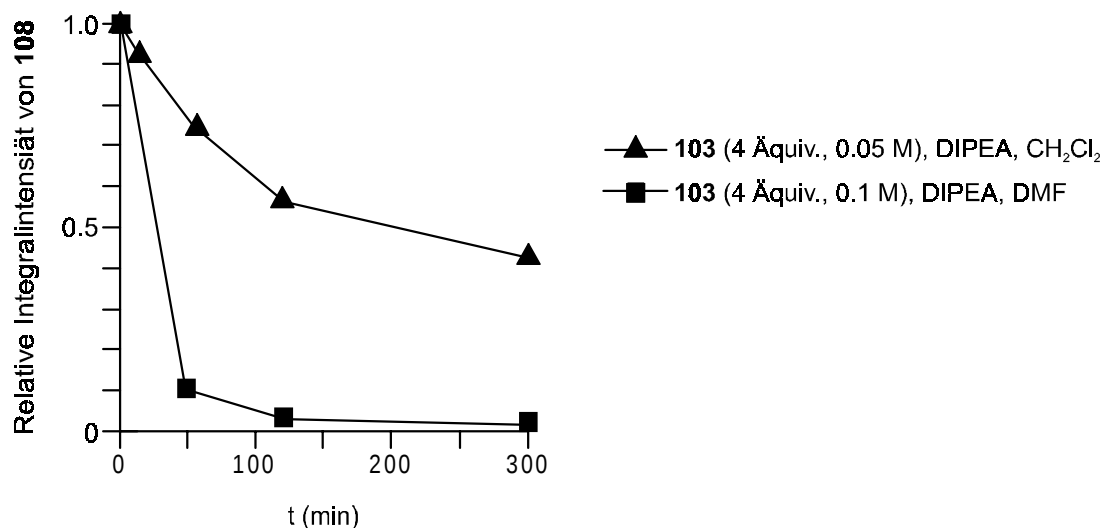


Abbildung 4.7: Reaktion der Carbazinsäure **103** mit H-Asp(Bu)-amid-Harz **105**. Relativer Mengenanteil an Edukt **105** (quantifiziert durch relative Integralintensität der Fehlsequenz **108** im HPLC-Chromatogramm) in Abhängigkeit der Reaktionszeit *t*.

Das Carbazinsäurechlorid des Fmoc-geschützten Azaalanins **103** erwies sich unter HPLC-Bedingungen als stabil. Dies eröffnete in diesem Fall die Möglichkeit, das Reaktionsgeschehen auch auf Seiten der Reaktionslösung zu verfolgen. Dazu wurde aus einer 0.1 M Lösung von **103** und DIPEA in DMF in bestimmten Zeitintervallen jeweils eine Probe entnommen und mit Hilfe von HPLC untersucht. In Abbildung 4.8 sind fünf HPLC-Diagramme über einen Reaktionszeitraum von 18 h gezeigt. Es ist zu erkennen, daß sich das Carbazinsäurechlorid **103** langsam zu mehreren Produkten zersetzt. Nach 18 h ist noch etwa 30% des unzersetzten aktivierten Azaalanins **103** vorhanden. Dies rechtfertigt die vergleichsweise lange Reaktionszeit von 12 h bei der

Acylierung der harzgebundenen Asparaginsäure **105** mit dem Carbazinsäurechlorid **103**.

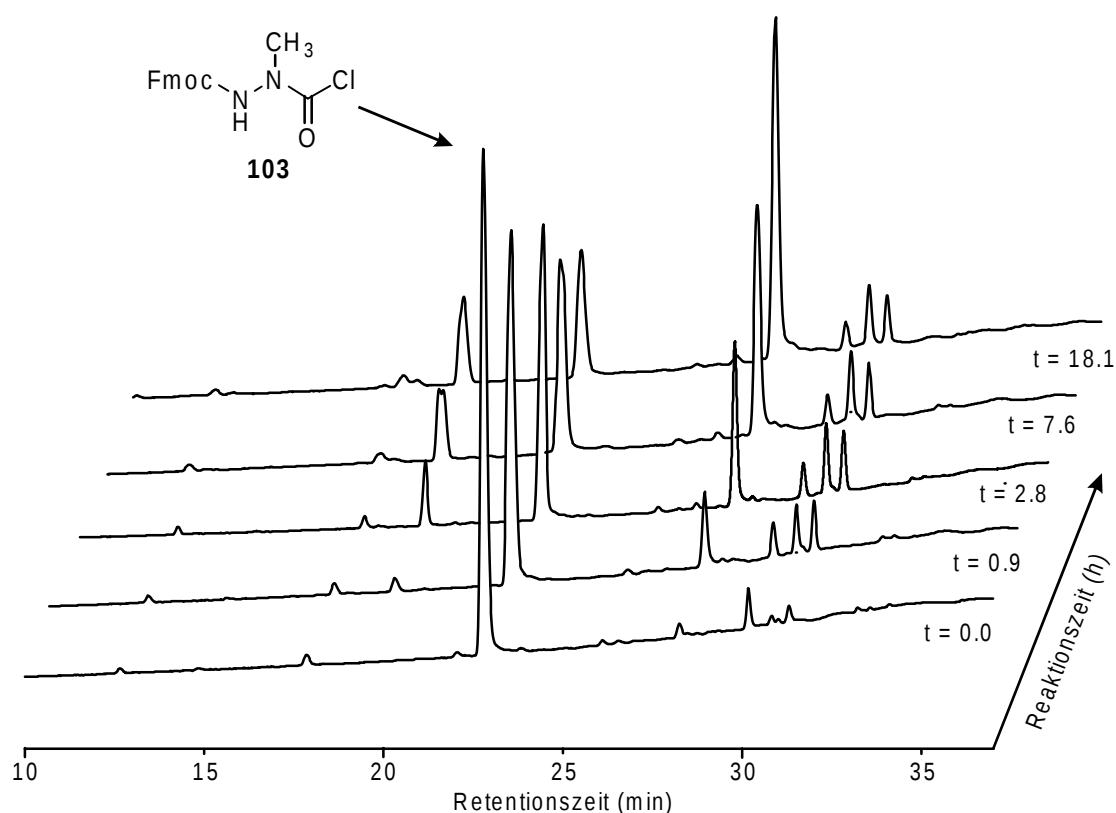


Abbildung 4.8: Zersetzung des als Carbazinsäurechlorid aktivierten Azaalanins **103** unter basischen Bedingungen (0.1 M Lösung von **103** und DIPEA in DMF).

Dieses Beispiel demonstriert eindrucksvoll den Vorteil einer Festphasenreaktion. Denn die entstandenen Zersetzungsprodukte können durch einfaches Waschen des festen Trägers entfernt werden. Darüber hinaus verdeutlicht dieses Beispiel den Vorzug unserer Strategie, die reaktiven Spezies in Lösung zu erzeugen. Denn auf diese Weise kann die Nebenproduktbildung am festen Träger minimiert werden.

Die wiederholt durchgeführte Kupplung des Carbazinsäurechlorids **103** an die harzgebundene Asparaginsäure (**105**) zeigte gute Reproduzierbarkeit und die HPLC-ermittelte Reinheit des resultierenden Azaeptids **118** betrug stets etwa 90%. Damit war die Reagenzpalette zur Einführung der Azabausteine B in die RGD-Mimetika abgerundet.

Somit war es gelungen, zur Einführung des Azaglycins, Azasarcosins sowie Azaalanins milde und reproduzierbare Reaktionsbedingungen zu entwickeln, die allen Anforderungen einer kombinatorischen Festphasensynthese gerecht wurden. Darüber

hinaus vermieden die ausgearbeiteten Methoden bei Reaktionen an der Festphase, die Anwesenheit des hochaktiven – aber auch toxischen Phosgens. Untersuchungen zur Kompatibilität der aktivierten Azabausteine mit verschiedenen Bausteinen A werden in Kap. 4.5.1 und 4.5.2 beschrieben.

4.4 Einführung des Bausteins D

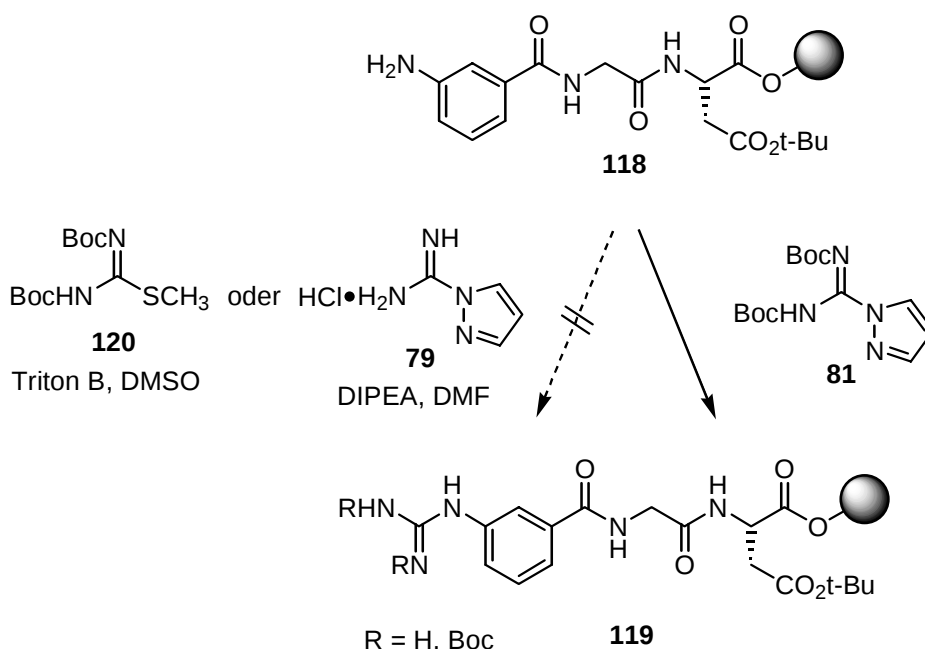
Nachdem es gelungen war, hoch effiziente Methoden zum festphasengestützten Einbau der Azabausteine B zu entwickeln, mußte noch eine weitere Hürde auf dem Weg zum fertigen aza-RGD-Mimetikum überwunden werden. Die Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika sollte mit Einführung der basischen Pharmakophore Guanidin oder Pyrimidin abgeschlossen werden. Wie beim Einbau des Azabausteins B mußten auch hier literaturbekannte Methoden weiterentwickelt und zur Pyrimidylierung von Anilinen ein neuer Syntheseweg ausgearbeitet werden.

4.4.1 Guanylierung an der Festphase

In ersten Studien wurden die kommerziell verfügbaren Reagenzien Bis-Boc-S-methylisothioharnstoff (**120**) und Guanylpyrazol (**79**) auf ihre Eignung zur Guanylierung harzgebundender Amine untersucht (Schema 4.17). Um die Diversität der geplanten aza-RGD-Mimetikabibliothek nicht unnötig einzuschränken, sah die Bibliotheksplanung vor, sowohl aromatische als auch aliphatische Amine als Spacerbausteine C einzubauen (siehe Kap. 4.2.3). Dies war jedoch mit einer großen Herausforderung an die Einführung des Basenbausteins D verbunden, da Aniline im Vergleich zu aliphatischen Aminen bedeutend schlechtere Nucleophile darstellen. Um Guanylierungsbedingungen zu finden, die dieses breite Reaktivitätsspektrum der harzgebundenen Amine tolerieren, wurde in einer *worst-case*-Untersuchung das TCP-Polystyrolharz-gebundene Anilin **118** als Modellverbindung gewählt. Gelänge es, dieses Anilin an der Festphase vollständig zu guanylieren, sollten aliphatische Amine unter den gefundenen Reaktionsbedingungen ebenfalls quantitativ in die korrespondierenden Guanidine überführt werden können.

In der Vergangenheit konnte die Guanylierung harzgebundener aliphatischer Amine mit Guanylpyrazol (**79**) bereits erfolgreich durchgeführt werden.^[241] Diese literatur-

bekannte Methode ließ sich jedoch nicht auf die Guanylierung des Anilins **118** übertragen. Nach vierstündiger Behandlung des Anilins mit einem 20-fachen Überschuß an Guanylpirazol (**79**) bei 50°C, war im ¹H-NMR-Spektrum der vom Harz abgespaltenen Produkte nur das Edukt **118** zu erkennen. M. Dechantsreiter konnte im Rahmen seiner Dissertationsarbeit zeigen, daß Bis-Boc-S-methylisothioharnstoff (**120**) in Anwesenheit der Base Triton B gut geeignet ist, aliphatische Amine in Lösung in die entsprechenden Bis-Boc-geschützten Guanidine umzuwandeln.^[261] Gemäß dieser Methode wurde versucht, das Anilin **118** mit einem zehnfachen Überschuß an **120** über einen Zeitraum von 19 h umzusetzen. Leider erwies sich das Anilin **118** auch unter diesen Reaktionsbedingungen als vollkommen inert.



Schema 4.17: Guanylierung der harzgebundenen Modellverbindung **118**. Mit den Guanylierungsreagenzien **120** und **79** konnte kein Umsatz erzielt werden. Die Reaktion des Bis-Boc-quanylpyrazols mit **118** war stark lösungsmittelabhängig.

Zum Durchbruch führte schließlich die Verwendung von Bis-Boc-guanylp¹razol **(81)**.^[243] Mit einem 4.5-fachen Überschuß einer 0.15 M Bis-Boc-guanylp¹razol-Lösung in DMF gelang es nach einer Reaktionszeit von 20 h 10% des harzgebundenen Anilins **118** in das Bis-Boc-geschützte Guanidin **119** zu überführen. Ein Lösungsmittelscreening enthüllte eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom verwendeten Lösungsmittel. In Tabelle 4.3 ist das Ergebnis der Lösungsmittelvariation aufgeführt. Bernatowicz *et al.* konnten zeigen, daß beim Guanylieren harzgebundener

aliphatischer Amine mit Guanylpyrazol (**79**) in DMF durch Zusatz geringer Mengen an Wasser die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden kann.^[241] Der Zusatz von ca. 5 Vol-% Wasser konnte jedoch die Guanylierung des Anilins (**118**) mit **81** nur geringfügig beschleunigen. Die ebenfalls polaren Lösungsmittel DMSO und NMP zeigten im Vergleich zu DMF keinen positiven Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Eine deutliche Steigerung konnte mit dem unpolaren THF erzielt werden. Nach 20 h konnten so 34% des Anilins **118** in das guanylierte Produkt **119** konvertiert werden. Im Gegensatz zu DMF bewirkte hier der Zusatz von Wasser jedoch eine leichte Inhibierung der Reaktion. Eine drastische Steigerung der Guanylierungsgeschwindigkeit gelang schließlich mit dem unpolaren CH₂Cl₂. Nach 20 h war das Guanylierungsprodukt **119** nur noch zu 6% mit dem Edukt **118** verunreinigt.

Tabelle 4.3: Lösungsmittelscan der Guanylierung von Anilin **118** mit Bis-Boc-guanylpyrazol (**81**). Dazu wurde **118** jeweils mit 4.5 Äquiv. einer 0.15 M Bis-Boc-guanylpyrazol-Lösung über einen Zeitraum von 20 h behandelt.

Lösungsmittel	Edukt:Produkt (118 : 119) ^a
DMF	90:10
DMF+H ₂ O	85:15
DMSO	93:7
NMP	94:6
THF	66:34
THF+H ₂ O	76:24
CH ₂ Cl ₂	6:94

^a Das Verhältnis von Edukt (**118**) zu Produkt (**119**) wurde anhand des Integrals des aromatischen C-6-Protons im ¹H-NMR-Spektrum bestimmt.

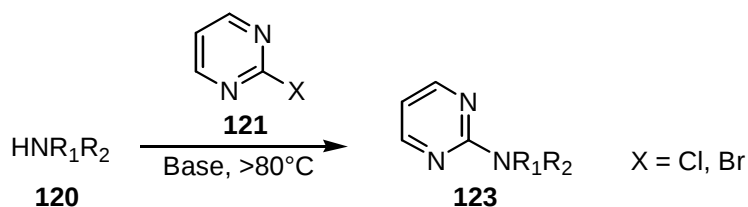
Im Vergleich zu Polystyrolharz-gebundenen Anilinen zeigten die TentaGel-gebundenen Aniline ein trägeres Reaktionsverhalten beim Guanylieren mit Bis-Boc-Guanylpyrazol (**81**). Dieser Befund kann mit den unterschiedlichen „Solvenseigenschaften“ der beiden Harze erklärt werden. Im gequollenen Zustand sind die Harzmoleküle innerhalb eines begrenzten Raumes beweglich und werden daher von den harzgebundenen Verbindungen als Lösungsmittel „wahrgenommen“. Daher ist es nicht verwunderlich, daß im Einklang mit dem Ergebnis des Lösungsmittelskans das

unpolare Polystyrolharz die Guanylierungsreaktion förderte, während das polarere TentaGel sich negativ auf die Guanylierungsgeschwindigkeit auswirkte. Zum gleichen Ergebnis führte eine Vergleichsstudie, in der verschiedene Festphasenreaktionen jeweils an TentaGel sowie an einem Polystyrolharz durchgeführt wurden.^[262]

Um die Guanylierung TentaGel-gebundener Aniline zu komplettieren, wurden sie 20 h bei 50 °C mit einem 20-fachen Überschuß einer 0.35 M Bis-Boc-guanylpurazol-Lösung in CHCl₃ umgesetzt. Das überschüssige Bis-Boc-guanylpurazol (**81**) konnte nach beendeter Reaktion durch einfaches Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum recycelt werden. Wie erwartet, ließen sich aliphatische Amine unter den oben beschriebenen Bedingungen in CH₂Cl₂ bereits bei Raumtemperatur vollständig guanylieren.

4.4.2 Pyrimidylisierung an der Festphase

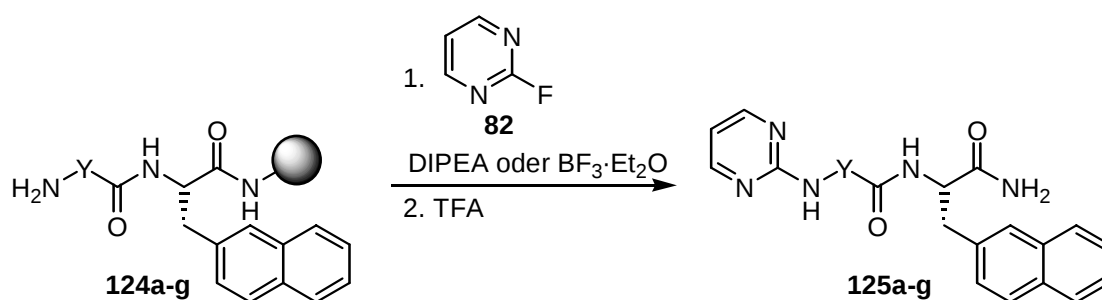
Ein gängiger Zugang zu 2-Aminopyrimidinen ist die Umsetzung eines Amins bzw. Anilins (**120**) über eine nucleophile aromatische Substitution mit kommerziell erhältlichem 2-Chlor oder 2-Brompyrimidin (**121**) in Gegenwart einer Base (siehe Schema 4.18). Aufgrund der dazu benötigten drastischen Reaktionsbedingungen (>80 °C) konnte diese Methode jedoch nicht zur Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika verwendet werden. Da Baustein D die Synthesesequenz abschließen sollte, war es hier besonders wichtig, milde Reaktionsbedingungen zu finden, um die Kompatibilität mit den bereits aufgebauten diversen Verbindungen zu garantieren.



Schema 4.18: Konventionelle Synthese von 2-Aminopyrimidinen in Lösung.

In Kinetikuntersuchungen zeigte 2-Fluorpyrimidin (**82**) bei der Umsetzung mit Piperidin eine etwa hundertfach höhere Reaktionsgeschwindigkeit als die entsprechenden Chlor- bzw. Bromverbindungen.^[252,253] Obwohl 2-Fluorpyrimidin nicht kommerziell erhältlich war, wurde es dank seiner herausragenden Reaktivität das

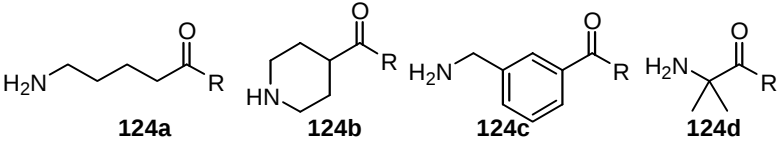
Reagenz der Wahl. In Schema 4.19 ist die Vorgehensweise zur Untersuchung der Pyrimidylierung der harzgebundenen Amine dargestellt. Mit einem Standard-Fmoc-Kupplungsprotokoll wurde zuerst das 2-Naphthylalanin (2-Nal) und anschließend das entsprechende Modellamin an Rink-Amid MBHA-Harz gekuppelt. 2-Naphthylalanin weist in der Nähe von 220 nm ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum auf und ermöglichte somit eine zuverlässige Quantifizierung der Reaktionsumsatzes mittels HPLC bei 220 nm.



Schema 4.19: Festphasensynthese der 2-Aminopyrimidine **125a-g**. Die Struktur des Restes *Y* ist in Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.4 zeigt das Ergebnis der Pyrimidylierung der aliphatischen Amine **124a-d** mit 2-Fluorpyrimidin (**82**). Die Umsetzung der aliphatischen Amine **124a-b** mit einer 0.1 M Lösung von 2-Fluorpyrimidin (**82**) und DIPEA in DMF war bereits nach einem Tag nahezu abgeschlossen. Das Benzylamin **124c** erwies sich als unreaktiver, konnte aber durch Konzentrationserhöhung von **82** und DIPEA auf 0.5 M ebenfalls mit zufriedenstellender Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt werden. Die nach dieser Methode dargestellten 2-Aminopyrimidine **125a-c** wiesen nach HPLC eine sehr gute Reinheit von >95% auf. Das sterisch gehinderte Amin **124d** konnte auch mit einer 0.5 M Reaktionslösung nach einer Reaktionszeit von 7 d nur zu 26% umgesetzt werden. Daher wurden sterisch gehinderte aliphatische Amine beim Bibliotheksdesign der aza-RGD-Mimetika ausgeschlossen.

Tabelle 4.4: Festphasengestützte Umsetzung der aliphatischen Amine **124a-d** mit 2-Fluorpyrimidin (**82**) und DIPEA zu den entsprechenden 2-Aminopyrimidinen **125a-d**

Amin ^a					
Bedingungen	Zeit	Reaktionsumsatz ^b (%)			
82 (3 eq., 0.1 M), DIPEA (3 eq., 0.1 M), DMF, 25 °C	7 h	89	98	60	2
	1 d	98	99	88	4
	2 d	98	99.5	93	4
	4 d	99	>99.5	95	9
82 (15 eq., 0.5 M), DIPEA (15 eq., 0.5 M), DMF, 25 °C	7 h	99	99.5	95	3
	1 d	99	>99.5	96	6
	2 d	99	>99.5	97	10
	4 d	99.5	>99.5	97	26
Produkt		125^a	125b	125c	125d
ESI-MS		392 [M+H ⁺]	304 [M+H ⁺]	464 [M+K ⁺]	400 [M+Na ⁺]
Reinheit^c (%)		96	>99.5	95	92

^a R = 2-Nal-Rink-Amid-MBHA-Harz^b Der relative Reaktionsumsatz wurde anhand der relativen Integralintensitäten der Produkte und Edukte aus dem bei 220 nm detektierten HPLC-Chromatogramm bestimmt.^c Die HPLC-Reinheit wurde bei 220 nm aus dem jeweils letzten Eintrag ermittelt; unumgesetztes Edukt wurde zur Bestimmung der Reinheit nicht berücksichtigt.

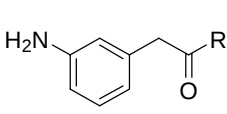
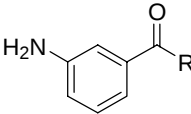
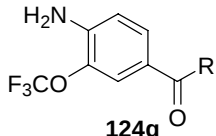
Die oben beschriebene Methode zur Pyrimidylierung aliphatischer Amine konnte jedoch nicht auf harzgebundene Aniline übertragen werden. Die Behandlung des Anilins **124f** mit überschüssigem Fluorpyrimidin (**82**) und DIPEA bei 50 °C lieferte auch nach einer Reaktionszeit von mehreren Tagen keine detektierbaren Mengen des entsprechenden 2-Aminopyrimidins **125f**. Daher mußte ein anderer Weg zur Pyrimidylierung harzgebundener Aniline gefunden werden. Die naheliegende Alternative, durch quantitative Deprotonierung die Nucleophilie der Aniline zu erhöhen, wurde nicht untersucht, da die dazu notwendigen stark basischen Bedingungen die Kompatibilität dieser Reaktion mit schon aufgebauten Strukturen erheblich eingeschränkt hätte.

Daher wurde eine dazu inverse Strategie verfolgt. Wir spekulierten, daß die Protonierung eines der beiden *N*-Atome in 2-Fluorpyrimidin (**82**) die Elektrophilie des benachbarten fluorsubstituierten *C*-Atoms erhöhen könnte. Mit der Wahl einer geeigneten Säure könnte die Protonierung des schwach basischen Anilins jedoch

weitgehend verhindert werden, so daß unter diesen Reaktionsbedingungen die Nucleophilie des Anilins erhalten bliebe. Modellversuche, das Anilin 4-Aminobenzoessäure-*n*-butylester in Lösung mit 2-Fluorpyrimidin (**82**) in Anwesenheit einer Säure umzusetzen, ergaben, daß die Reaktion tatsächlich mit TFA und ebenso mit der Lewis-Säure $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ katalysiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte mit Essigsäure kein katalytischer Effekt auf die Reaktion ausgeübt werden. Die Reaktion verlief in den Lösungsmitteln CH_2Cl_2 und DMF etwa gleich schnell, während in THF kaum Umsetzung stattfand.

Zur Pyrimidylierung harzgebundener Aniline wurde die $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -katalysierte Variante untersucht, da sie mit der permanenten *tert*-Butyl-Schutzgruppe in Säurebaustein A kompatibel war (s. u.). Das Ergebnis der Lewis-Säure-katalysierten Umsetzung der Aniline **124e-g** in die korrespondierenden 2-Aminopyrimidine **125e-g** ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Bei Raumtemperatur mußten die Aniline **124e-f** sieben Tage mit einer 1.0 M 2-Fluorpyrimidin-Lösung behandelt werden, um vollständigen Umsatz zu erzwingen. Eine akzeptable Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C verkürzte jedoch die Reaktionszeit auf zwei Tage. Die HPLC-ermittelte Reinheit der resultierenden 2-Aminopyrimidine **125e-f** betrug 99%. Das elektronenarme Anilin **124g** konnte bei 50 °C nach einer Reaktionszeit von sieben Tagen lediglich zu 42% in das entsprechende 2-Aminopyrimidin **124g** transformiert werden und wurde daher nicht zur RGD-Mimetikasyntese verwendet.

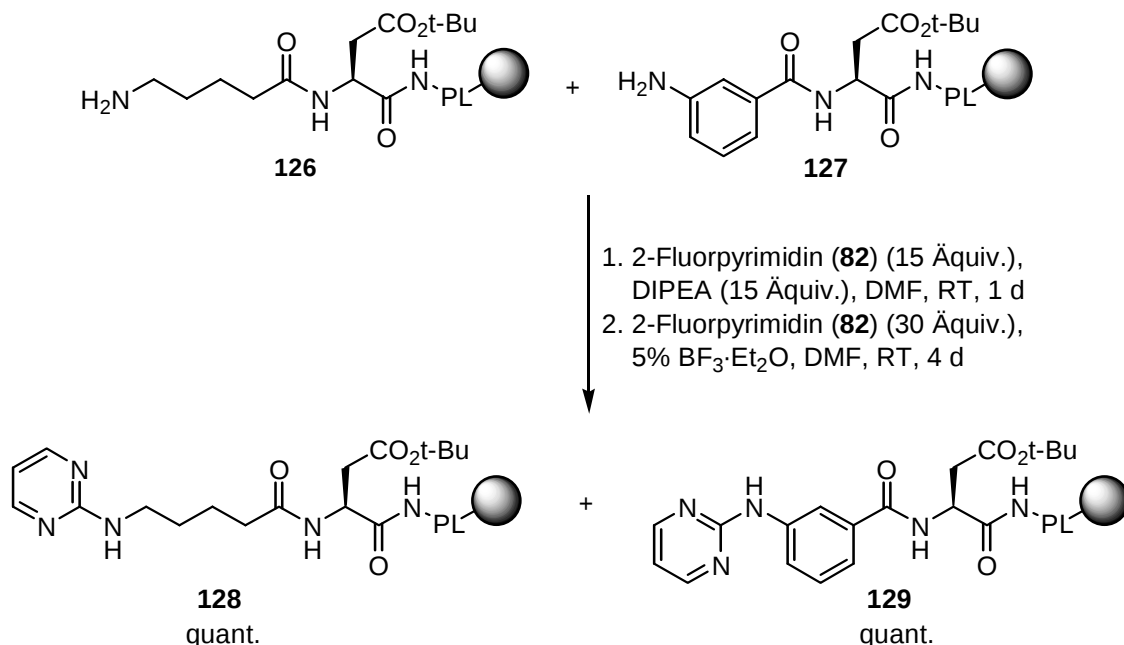
Tabelle 4.5: Festphasengestützte Umsetzung der Aniline **124e-g** mit 2-Fluorpyrimidin (**82**) und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zu den entsprechenden 2-Aminopyrimidinen **125e-g**

Anilin ^a	 124e  124f  124g				
	Bedingungen	Zeit	Reaktionsumsatz ^b (%)		
	82 (30 eq., 1.0 M), 5% BF ₃ · Et ₂ O in DMF, 25 °C	7 h	26	40	0
		1 d	58	76	2
		2 d	80	93	5
		4 d	95	99	10
		7 d	99.5	>99.5	18
	82 (30 eq., 1.0 M), 5% BF ₃ · Et ₂ O in DMF, 50 °C	7 h	82	95	5
		1 d	98	>99.5	15
		2 d	>99.5	>99.5	23
		4 d	>99.5	>99.5	34
		7 d	>99.5	>99.5	42
Produkt		125e	125f	125g	
ESI-MS		426 [M+H ⁺]	412 [M+H ⁺]	496 [M+H ⁺]	
Reinheit^c (%)		99	99	90	

^a Siehe Fußnote a in Tabelle 4.4; ^b Siehe Fußnote b in Tabelle 4.4; ^c Siehe Fußnote c in Tabelle 4.4 .

Wie erwartet konnten aliphatische Amine mit der Lewis-Säure-katalysierten Variante nicht in die entsprechenden 2-Aminopyrimidine konvertiert werden. Um wie geplant ein Gemisch aus Anilinen und aliphatischen Aminen am festen Träger zu pyrimidylisieren, sollten zuerst die aliphatischen Amine unter basischen und anschließend die Aniline unter Lewis-sauren Bedingungen mit 2-Fluorpyrimidin (**82**) umgesetzt werden. In einer Modellstudie wurde diese Vorgehensweise auf die Pyrimidylisierung eines 1:1-Gemisches aus TentaGel-gebundenem aliphatischen Amin **126** und Anilin **127** angewandt (siehe Schema 4.20). Dazu wurde das Harzgemisch zuerst mit einer 2-Fluorpyrimidin/DIPEA-Lösung in DMF behandelt und nach einer Reaktionszeit von einem Tag gründlich mit DMF gewaschen. Anschließend ließ man auf das Harzgemisch über einen Zeitraum von vier Tagen eine 2-Fluorpyrimidin/ $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Lösung in DMF einwirken. Die LC-MS-Analyse der photolytisch abgespaltenen Reaktionsprodukte zeigte, daß beide Amine **126** und **127** ohne signifikante Nebenproduktbildung quantitativ in die korrespondierenden 2-Amino-

pyrimidine **128** und **129** transformiert werden konnten. Erfreulicherweise erwies sich der säurelabile *tert*-Butylester in **126** und **127** unter den Lewis-sauren Reaktionsbedingungen als stabil.



Schema 4.20: Pyrimidylierung einer Mischung aus harzgebundenem aliphatischem Amin **126** und Anilin **127**. Zuerst wird das aliphatische Amin **126** unter basischen Bedingungen und anschließend das Anilin **127** unter Lewis-sauren Bedingungen jeweils mit 2-Fluorpyrimidin (**82**) umgesetzt.

Mit Hilfe des Reagenzes 2-Fluorpyrimidin (**82**) war es also gelungen, die konventionelle Pyrimidylierungsreaktion in Lösung auf die Festphasensynthese aliphatischer sowie aromatischer 2-Aminopyrimidine zu übertragen. Die optimierten milden Reaktionsbedingungen gewährleisteten ein hohes Maß an Kompatibilität mit diversen Verbindungsbibliotheken und werden somit dem hohen Anspruch einer kombinatorischen Festphasensynthese gerecht.

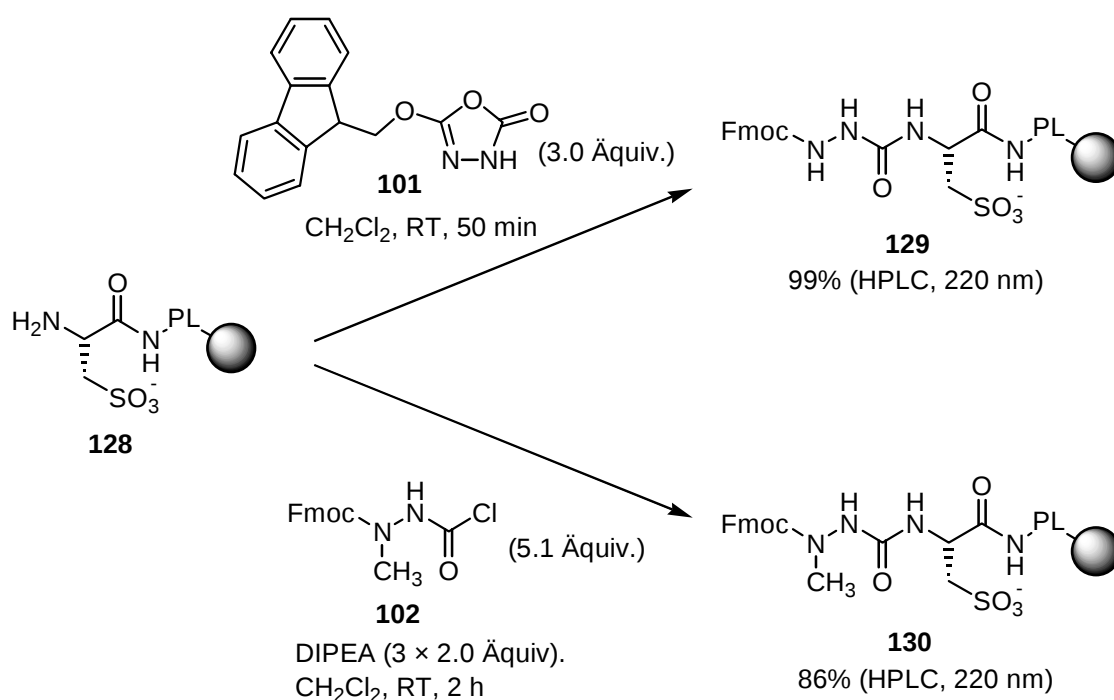
4.5 Überprüfung der Synthesesequenz zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika

Nachdem die Schlüsselreaktionen zur Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika optimiert waren, sollte nun die Verknüpfung einiger „kritischer“ Bausteine und

anschließend die gesamte Synthesesequenz anhand der Festphasensynthese von ausgewählten Einzelverbindungen überprüft werden.

4.5.1 Untersuchung der Kompatibilität von H-Cysa-OH mit den Azabausteinen B

Bisher wurde ausschließlich die Umsetzung der aktivierten Azabausteine **101-103** mit harzgebundenem H₂N-Asp(Bu)-NH₂ (**105**) beschrieben. Nun sollte die Kompatibilität der aktivierten Azabausteine mit harzgebundener Cysteinsäure (**128**) überprüft werden (siehe Schema 4.21). Diese wurde unter Standardkupplungsbedingungen von Fmoc-Cysa-OH (**43**) an Photolinker-TentaGel und anschließender Fmoc-Entschützung dargestellt. Da die Sulfonsäure in **128** ungeschützt vorlag, bestand hier die potentielle Gefahr, daß die Umsetzung vor allem mit den hoch reaktiven Azabausteinen **101** und **102** zu Nebenreaktionen führte.



Schema 4.21: Reaktion der harzgebundenen Cysteinsäure **128** mit aktiviertem azaGly **101** und azaSar **102**

Diese Befürchtung erwies sich jedoch als unbegründet. Die Umsetzung von harzgebundener Cysteinsäure **128** mit dem Oxadiazolon **101** verlief glatt zum gewünschten Fmoc-azaGly-Cysa-NH₂ (**129**) mit einer HPLC-ermittelten Reinheit von 99%. Die Reaktion von **128** mit dem Carbazinsäurechlorid **102** lieferte Fmoc-azaSar-Cysa-NH₂ (**130**) in 86% Reinheit. Die Verunreinigung von **130** ist vermutlich nicht auf die

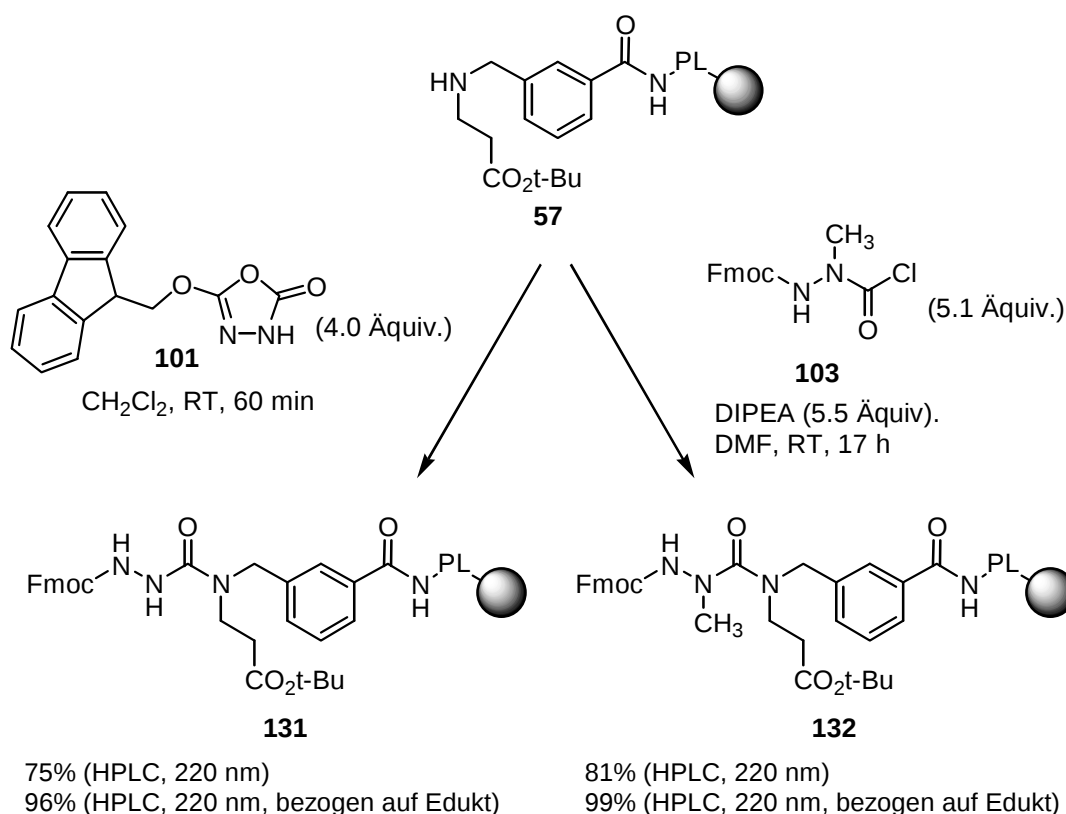
Reaktion von **128** mit **102** zurückzuführen, sondern wurde wahrscheinlich durch zu saure Bedingungen beim photolytischen Abspalten der harzgebundenen Reaktionsprodukte verursacht (siehe Kap. 4.5.3.1).

4.5.2 Untersuchung der Kompatibilität von *N*- β Pra(Bu)Mamb-NH₂ mit den Azabausteinen B

Abschließend sollte die Kompatibilität der aktivierten Azabausteine mit dialkylierten Aminen getestet werden. Hier bestand die Gefahr, daß insbesondere die Reaktion des vergleichsweise weniger reaktiven Fmoc-azaAla-Cl (**103**) mit den sekundären harzgebundenen Aminen nicht vollständig verlaufen würde. Als sekundäres Modellamin wurde die submonomer aufgebaute Verbindung **57** gewählt (siehe Kap. 4.2.1). Schema 4.22 zeigt die Umsetzungen von **57** mit dem Oxadiazolon **101** bzw. dem Carbazinsäurechlorid **103**.

Erwartungsgemäß ergab die HPLC-Analyse der photolytisch vom Harz abgelösten Reaktionsprodukte, daß das harzgebundene Amin **57** mit einem vierfachen Überschuß an hoch reaktivem Oxadiazolon **101** nahezu vollständig zum gewünschten Produkt **131** umgesetzt wurde. Die Reinheit von **131** betrug nach HPLC akzeptable 75%, wobei das Edukt **57** bereits zu 9% mit tertiärem Amin verunreinigt war (siehe Kap. 4.2.1, Schema 4.5). Erfreulicherweise konnte das harzgebundene Amin **57** auch mit Fmoc-azaAla-Cl (**103**) nahezu quantitativ umgesetzt werden. Die resultierende Verbindung **132** wies eine HPLC-ermittelte Reinheit von 81% auf.

Somit sollten die aktivierten Azabausteine B **101-103** ohne Probleme mit den beschriebenen Bausteinen A umgesetzt werden können.



Schema 4.22: Reaktion des harzgebundenen $N\text{-}\beta\text{Pra(Bu)Mamb-NH}_2$ (**57**) mit aktiviertem azaGly **101** und azaAla **103**.

4.5.3 Schwierigkeiten bei der aza-RGD-Mimetikasyntese

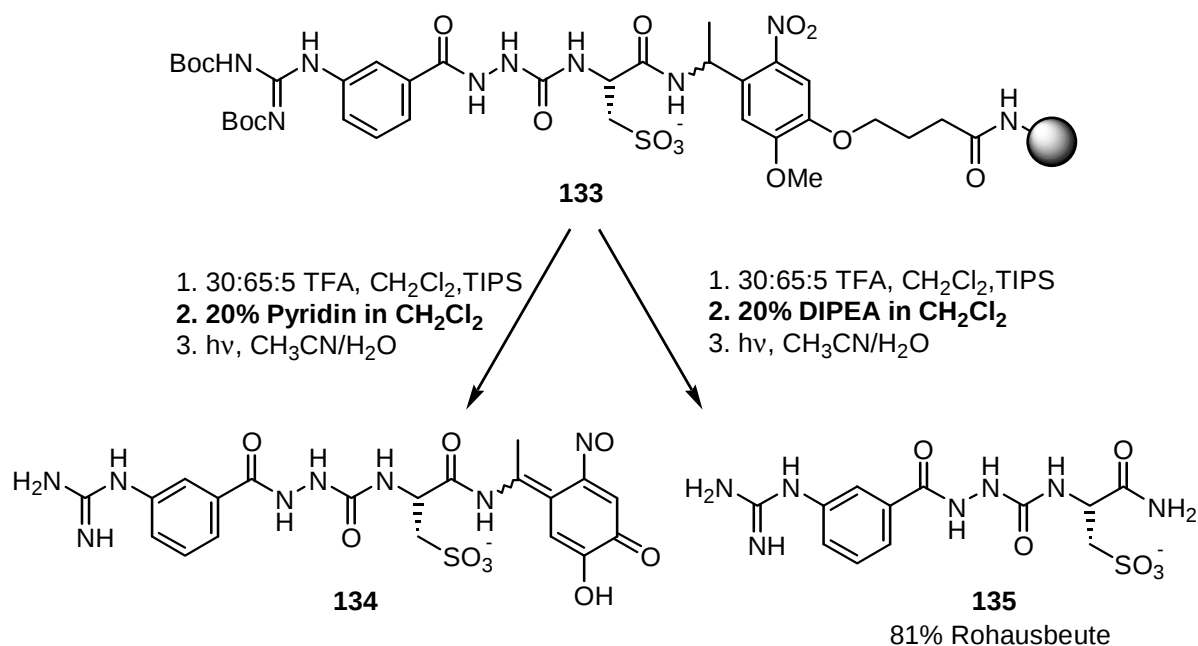
Obwohl die einzelnen Reaktionsschritte der Synthesesequenz zum Aufbau der aza-RGD-Mimetika sorgfältig untersucht und gegebenenfalls optimiert wurden, traten bei der Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika einige unerwartete Nebenreaktionen auf, die im Folgenden beschrieben werden.

4.5.3.1 Photolyse Cysa-haltiger aza-RGD-Mimetika

Eine sehr ungewöhnliche und bisher in der Literatur nicht beschriebene Reaktion trat bei der Photolyse der Bis-Boc-entschützten Cysteinsäure-haltigen Verbindung **133** auf (siehe Schema 4.23). Wurde das aza-RGD-Mimetikum **133** am festen Träger mit TFA entschützt und anschließend mit einem Pyridin/ CH_2Cl_2 -Gemisch neutralisiert, so ergab die Photolyse der resultierenden entschützten Verbindung fast ausschließlich das Cyclohexadienon **134** als 1:1 *cis/trans*-Isomerengemisch. Nach Reinigung mit Hilfe

präparativer HPLC konnte die Struktur der Verbindung **134** NMR- und Massenspektroskopisch zweifelsfrei aufgeklärt werden.

Diese Nebenreaktion wurde jedoch bei der Photolyse des Asparagin-analogen aza-RGD-Mimetikums **141a** (siehe Kap. 4.5.4.1) nicht beobachtet. Die Ursache für die Entstehung von **134** konnte somit nur auf die Sulfonsäure in **133** zurückzuführen sein. Vermutlich wurde die Sulfonsäure **133** nach saurem Entschützen mit der schwachen Base Pyridin nicht vollständig neutralisiert und ermöglichte infolgedessen die Entstehung des Cyclohexadienons **134**. Tatsächlich ergab die Photolyse nach Neutralisation der entschützten Sulfonsäure **133** mit der stärkeren Base DIPEA das gewünschte aza-RGD-Mimetikum **135** ohne detektierbare Mengen des Cyclohexadienons **134**.

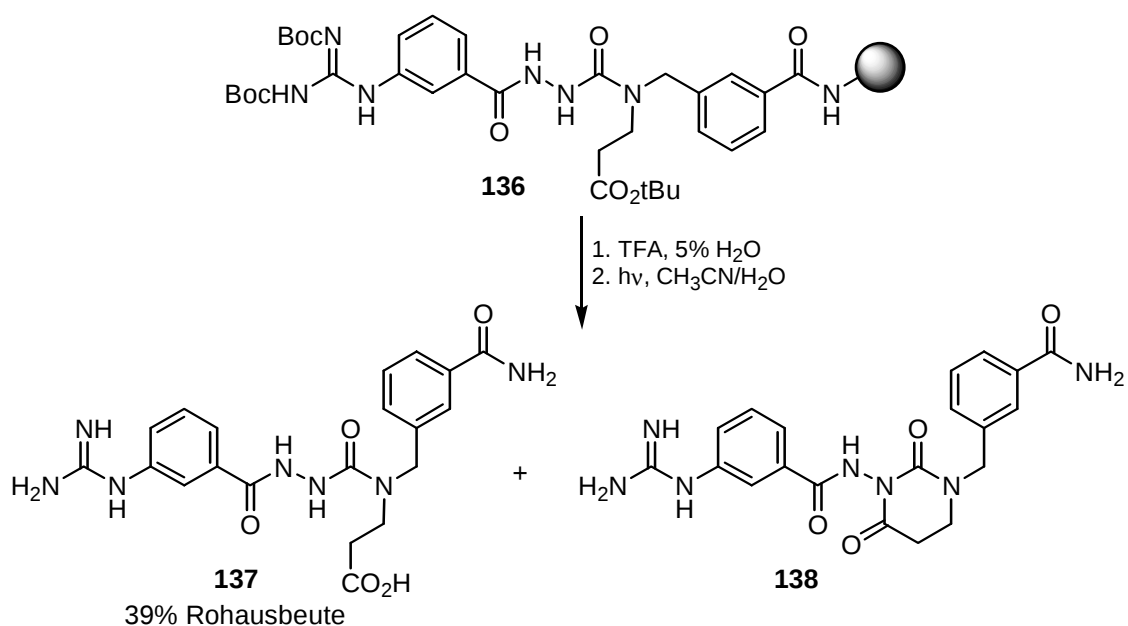


Schema 4.23: Seitenkettenentschützung und anschließende Photolyse des aza-RGD-Mimetikums **133**. Vor der Photolyse muß das Harz mit DIPEA behandelt werden, um das Nebenprodukt **134** zu vermeiden.

4.5.3.2 Seitenkettenentschützung N-βPra(Bu)Mamb-haltiger aza-RGD-Mimetika

Eine weitere unerwartete Nebenreaktion trat bei der sauren Seitenkettenentschützung des harzgebundenen aza-RGD-Mimetikums **136** auf (siehe Schema 4.24). Die LC-MS-Analyse der photolytisch vom festen Träger abgespaltenen Reaktionsprodukte zeigte neben dem gewünschten Produkt **137** erhebliche Mengen

eines Produktes mit einer um m/z 18 verminderten Molekülmasse. Vermutlich entspricht diese Verbindung dem cyclischen Kondensationsprodukt **138**.



Schema 4.24: Bei der Seitenkettenentschüttung von **136** wurde neben dem gewünschten aza-RGD-Mimetikum **137** abhängig von den Entschüttungsbedingungen zu unterschiedlichen Anteilen ein Nebenprodukt mit einer um m/z 18 verminderten Molekülmasse detektiert, das vermutlich der Struktur **138** entspricht.

Um den Anteil von **138** im Produktgemisch zu minimieren, wurden die Entschüttungsbedingungen systematisch variiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 4.6 zusammengefaßt. Die Standardlösung zur Seitenkettenentschüttung, 5% Wasser in TFA, lieferte das gewünschte aza-RGD-Mimetikum **137** lediglich in 39% Produktanteil. Eine Erhöhung des Wasseranteils in der Entschüttungslösung begünstigte die Nebenproduktbildung. Wurde das Wasser dagegen durch den *scavenger* TIPS ersetzt, konnte der Anteil von **137** im Produktgemisch auf 55% erhöht werden. Darüber hinaus gelang es, den Anteil von **137** durch Verdünnen der TFA/TIPS-Lösung mit CH₂Cl₂ nochmals leicht anzuheben. Die LC-MS-Analyse nach Entschütten mit einer 80:15:5 CH₂Cl₂/TFA/TIPS-Lösung ergab jedoch, daß das Produktgemisch Spuren des Mono-Boc- bzw. *tert*-Butyl-geschützten aza-RGD-Mimetikums **137** enthält. Daher wurden die Seitenkettenschutzgruppen der aza-RGD-Mimetikabibliotheken mit einer 47.5:47.5:5 CH₂Cl₂/TFA/TIPS-Lösung entfernt. Obwohl die Kondensationsreaktion während der Seitenkettenentschüttung nicht

vollständig unterdrückt werden konnte, wurde der Baustein A *N*-βPra(Bu)Mamb (**57**) dennoch zur Bibliothekssynthese eingesetzt.

Tabelle 4.6: Verhältnis der Integralintensitäten von aza-RGD-Mimetikum **137** zu Eliminierungsprodukt **136** im HPLC-Chromatogramm bei 220 nm

Abspaltbedingungen	137 : 138
95% TFA, 5% H ₂ O, 70 min	39 : 61
90% TFA, 10% H ₂ O, 120 min	30 : 70
80% TFA, 20% H ₂ O, 120 min	30 : 70
90% TFA, 5% H ₂ O, 5% TIPS, 70 min	30 : 70
95% TFA, 5% TIPS, 85 min	55 : 45
47.5% DCM, 47.5% TFA, 5% TIPS, 85 min	57 : 43
80% DCM, 15% TFA, 5% TIPS, 60 min	65 : 35

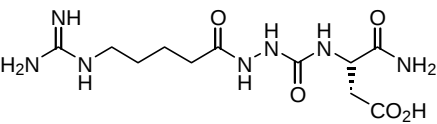
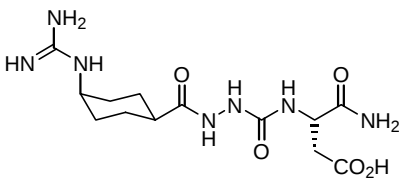
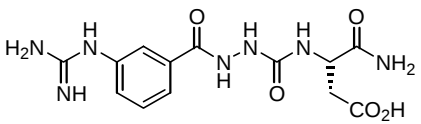
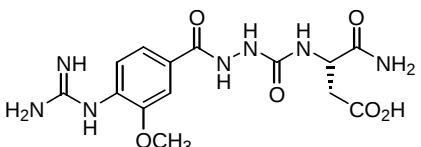
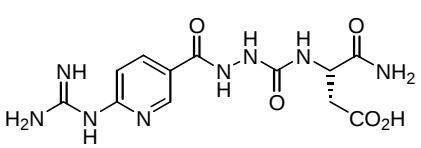
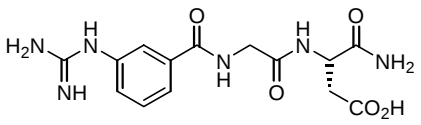
4.5.4 Festphasensynthese einzelner aza-RGD-Mimetika

Mit Hilfe der optimierten Reaktionsbedingungen wurden einige aza-RGD-Mimetika als Einzelverbindungen am festen Träger synthetisiert, um die Tragfähigkeit der ausgearbeiteten Synthesestrategie nochmals zu überprüfen.

4.5.4.1 Synthese von azaGly-RGD-Mimetika

Das Ergebnis der Festphasensynthese einer Auswahl verschiedener azaGly-RGD-Mimetika mit Asparaginsäure als Baustein A ist in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Die RGD-Mimetika mit aliphatischem Guanyrest **139** und **140** konnten in 70-100% Rohausbeute dargestellt werden, wobei die Ausbeute nach Reinigung mit Hilfe präparativer HPLC etwa halbiert wurde. Das RGD-Mimetikum mit aromatischem Guanyrest **141a** wurde in 55% Rohausbeute bzw. 18% Ausbeute nach HPLC-Trennung zugänglich gemacht.

Tabelle 4.7: Ergebnis der Festphasensynthese azaGly-haltiger (**139-143**) und Gly-haltiger (**144**) RGD-Mimetika an Photolinker-TentaGel

Nr.	Struktur	Guanylierungsbedingungen	Rohausbeute	Ausbeute nach präp. HPLC
139		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	70%	38%
140		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	quant.	44%
141a		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	55%	18%
142		CHCl ₃ , 60 °C, 2 d	89%	16%
143		CHCl ₃ , 60 °C, 7 d	84% (50% nicht guanyliert)	—
144		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	86%	—

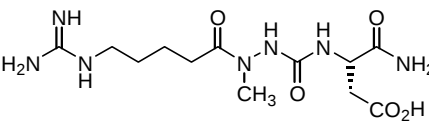
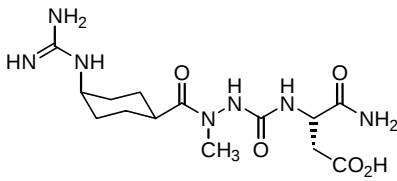
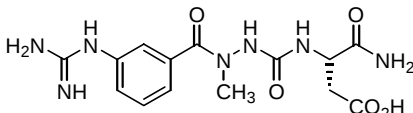
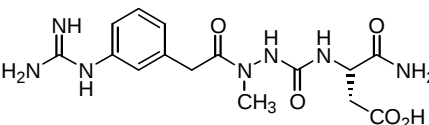
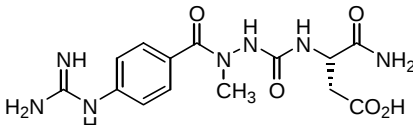
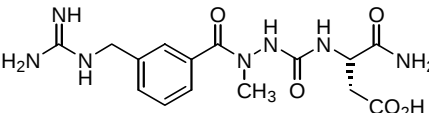
Die anilinischen Bausteine D in den Verbindungen **142** und **143** erwiesen sich zur Festphasensynthese der aza-RGD-Bibliotheken als weniger geeignet. Um das korrespondierende Anilin zu **142** vollständig zu guanylieren, mußte die Reaktionstemperatur auf 60 °C erhöht und die Reaktionszeit auf zwei Tage verlängert werden. Dies führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg des Nebenproduktanteils. Das Anilin in **143** konnte auch nach einer Reaktionszeit von sieben Tagen bei dieser Temperatur lediglich zu etwa 50% guanyliert werden. Infolgedessen wurden die anilinischen Bausteine C in **142** und **143** beim aza-RGD-Bibliotheksdesign nicht weiter berücksichtigt.

Da die Verbindung **141a** zum $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor die höchste Affinität aufwies (vgl. Kap. 6.1) wurde das carbanaloge RGD-Mimetikum **144**, das anstelle von azaGly ein Gly enthält, ebenfalls dargestellt.

4.5.4.2 Synthese von azaSar-RGD-Mimetika

Bei den Festphasensynthesen der azaSar-RGD-Mimetika **145-150** traten keine Schwierigkeiten auf (siehe Tabelle 4.8). Die RGD-Mimetika mit aliphatischem Guanyrest **145**, **146** und **150** konnten in 82-96% Rohausbeuten, die RGD-Mimetika mit aromatischem Guanyrest **147-149** in 74-100% Rohausbeute dargestellt werden. Die repräsentative Reinigung einiger Verbindungen mit Hilfe präparativer HPLC führte wie bei den azaGly-RGD-Mimetika jeweils etwa zu einer Halbierung der Rohausbeute. Die LC-MS-Spektren der ungereinigten aromatischen Verbindungen **147-149** enthielten keine detektierbaren Mengen der korrespondierenden unguanylierten Aniline.

Tabelle 4.8: Ergebnis der Festphasensynthese azaSar-haltiger RGD-Mimetika (145-150) an Photolinker-TentaGel

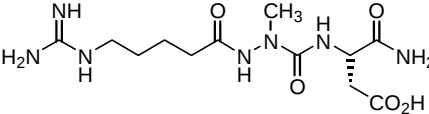
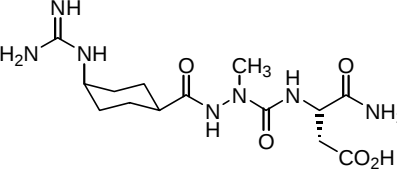
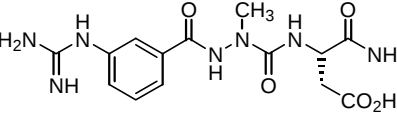
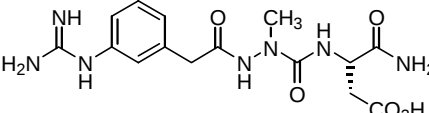
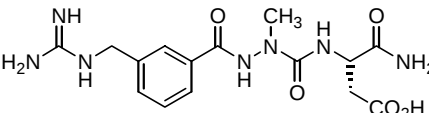
Nr.	Struktur	Guanylierungsbedingungen	Rohausbeute	Ausbeute nach präp. HPLC
145		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	96%	42%
146		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	83	—
147		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	quant.	38%
148		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	93%	45%
149		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	74%	47%
150		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	88%	—

4.5.4.3 Synthese von azaAla-RGD-Mimetika

Tabelle 4.9 zeigt das Ergebnis der Festphasensynthese der azaAla-RGD-Mimetika 151-155. Die Rohausbeute variierte von 75-100%, wobei die repräsentative Reinigung von 152 per präparativer HPLC analog zu den bereits beschriebenen aza-RGD-Mimetika die Ausbeute um etwa die Hälfte der Rohausbeute verminderte. Die Kupplung der Bausteine C an das N-terminale azaAla mit Hilfe von HATU/Collidin verlief im Vergleich zu den Reaktionen mit azaGly oder azaSar deutlich träger. Dennoch konnte ohne weitere Änderungen der Reaktionsbedingungen die Acylierung des Azaalanins vervollständigt werden, indem die Reaktionszeit auf 12 h verlängert wurde. Die schwache Elektrophilie des Azaalanins stand im Einklang mit der

Beobachtung von Gray *et al.*, daß mit Hilfe weniger effizienter Kupplungsreagenzien die Acylierung harzgebundener Azamino­säuren mit *N*-geschützten Aminosäuren nicht komplettiert werden konnte.^[205]

Tabelle 4.9: Ergebnis der Festphasensynthese azaAla-haltiger RGD-Mimetika (151-155) an Photolinker-TentaGel

Nr.	Struktur	Guanylierungsbedingungen	Rohausbeute	Ausbeute nach präp. HPLC
151		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	quant.	—
152		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	98%	48%
153		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	75%	—
154		CHCl ₃ , 50 °C, 20 h	86%	—
155		CH ₂ Cl ₂ , RT, 15 h	92%	—

Leider konnte die Reinheit der photolytisch vom Harz abgespaltenen aza-RGD-Mimetika nur unzureichend mit Hilfe von *reversed-phase* HPLC bzw. LC-MS bestimmt werden. Aufgrund ihrer hohen Polarität waren die RGD-Mimetika oft nicht vom Lösungsmittelpeak Basislinien-getrennt. Darüber hinaus wiesen die aliphatischen RGD-Mimetika nur sehr geringe UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 220 nm auf.

Die repräsentative Reinigung einiger Photolyseprodukte mittels präparativer HPLC führte in der Regel zu einer Verminderung der ursprünglichen Masse um etwa 50%. Dieser Befund impliziert eine Reinheit der photolytisch vom Harz abgelösten aza-RGD-Mimetika von mindestens 50%. Darüber hinaus zeigten die ^1H -NMR-Spektren der ungereinigten Verbindungen **146** und **151** neben ca. 20 Gew.-% PEG (resultierend aus mechanischem Abrieb der TentaGel-beads während der Photolyse) keine signifikanten Mengen an Nebenprodukten.

Die Synthesen einiger aza-RGD-Mimetika an Rink-Amid MBHA-Harz ergaben im Vergleich zum Photolinker-TentaGel sowohl höhere Ausbeuten nach saurer Abspaltung vom Harz als auch nach präparativer HPLC-Reinigung (vgl. Kap.6.3 und 6.4). So konnte die Rohausbeute des aromatischen RGD-Mimetikums **141a** von 55% auf 100% und die Ausbeute nach präparativer HPLC von 18% auf 65% gesteigert werden.

Entscheidend für die chemische Analyse positiver *beads* war jedoch die massenspektrometrisch ermittelte Reinheit der aza-RGD-Mimetika, da unser Konzept vorsah, die Verbindungen auf den selektierten *beads* mittels ESI-MS zu charakterisieren. D. h. im ESI-MS-Spektrum der vom Harz abgelösten Produkte sollte das Signal mit der höchsten Intensität dem aza-RGD-Mimetikum entsprechen. Diesem Anspruch wurden tatsächlich alle der oben beschriebenen RGD-Mimetika gerecht. Somit war es gelungen alle Kriterien zur geplanten kombinatorischen Festphasensynthese von aza-RGD-Mimetikabibliotheken nach dem *one-bead one-compound*-Prinzip zu erfüllen.

4.6 Synthese der aza-RGD-Bibliotheken

Nachdem durch sorgfältige Optimierung die Zuverlässigkeit der unterschiedlichen Verknüpfungsreaktionen sichergestellt worden war, konnte nun die kombinatorische Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetikabibliotheken in Angriff genommen werden. Um bei der geplanten ESI-MS-Analyse einzelner selektierter *beads* möglichst weit über die Nachweisgrenze zu gelangen, wurden die RGD-Mimetika an TentaGel Macrobeads aufgebaut. Mit einem Durchmesser von 280-320 μm und einem Funktionalisierungsgrad von ca. 5 nmol Amin/*bead* konnte mit diesem Harz im

Vergleich zu anderen TentaGel-Harzen der höchste Belegungsgrad pro Harzpartikel erzielt werden.

Die Zunahme der *bead*-Größe bewirkt jedoch eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, da die Reagenzien eine längere Strecke bei der Diffusion in das Partikelinnere zurücklegen müssen. Um dennoch vollständigen Umsatz der Macrobead-gebundenen Verbindungen zu gewährleisten, wurden daher die in Kap. 4.3 und 4.4 optimierten Reaktionszeiten sowie die Dauer der Waschschrötte verdoppelt.^[263] Zum Quellen der Macrobeads wurden diese zuerst mit Et₂O und dann stufenweise mit steigendem Anteil eines Lösungsmittels mit besseren Quelleigenschaften behandelt. Dieser Prozeß wurde zum Schrumpfen in umgekehrter Reihenfolge angewandt. Gemäß dieser Vorgehensweise konnten „Spannungen“ in den Harzpartikeln, die beim Quellen bzw. Schrumpfen auftreten, minimiert und so das Zerknacken der Macrobeads weitgehend verhindert werden.

Abbildung 4.9 veranschaulicht die kombinatorische Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetikabibliotheken. Die Bausteine der Gruppen A und C wurden so ausgewählt, daß innerhalb dieser Bausteingruppen jede Molekülmasse nur einmal auftrat. Dies ermöglichte später die genaue Strukturzuordnung der selektierten aza-RGD-Mimetika mit Hilfe von MSⁿ (siehe Kap. 5). Aus den Bausteinkombinationen A, B und C (ohne Baustein D) resultieren auch potentielle aza-RGD-Mimetika, da das Amin der Bausteine C bereits ein basisches Pharmakophor repräsentiert.

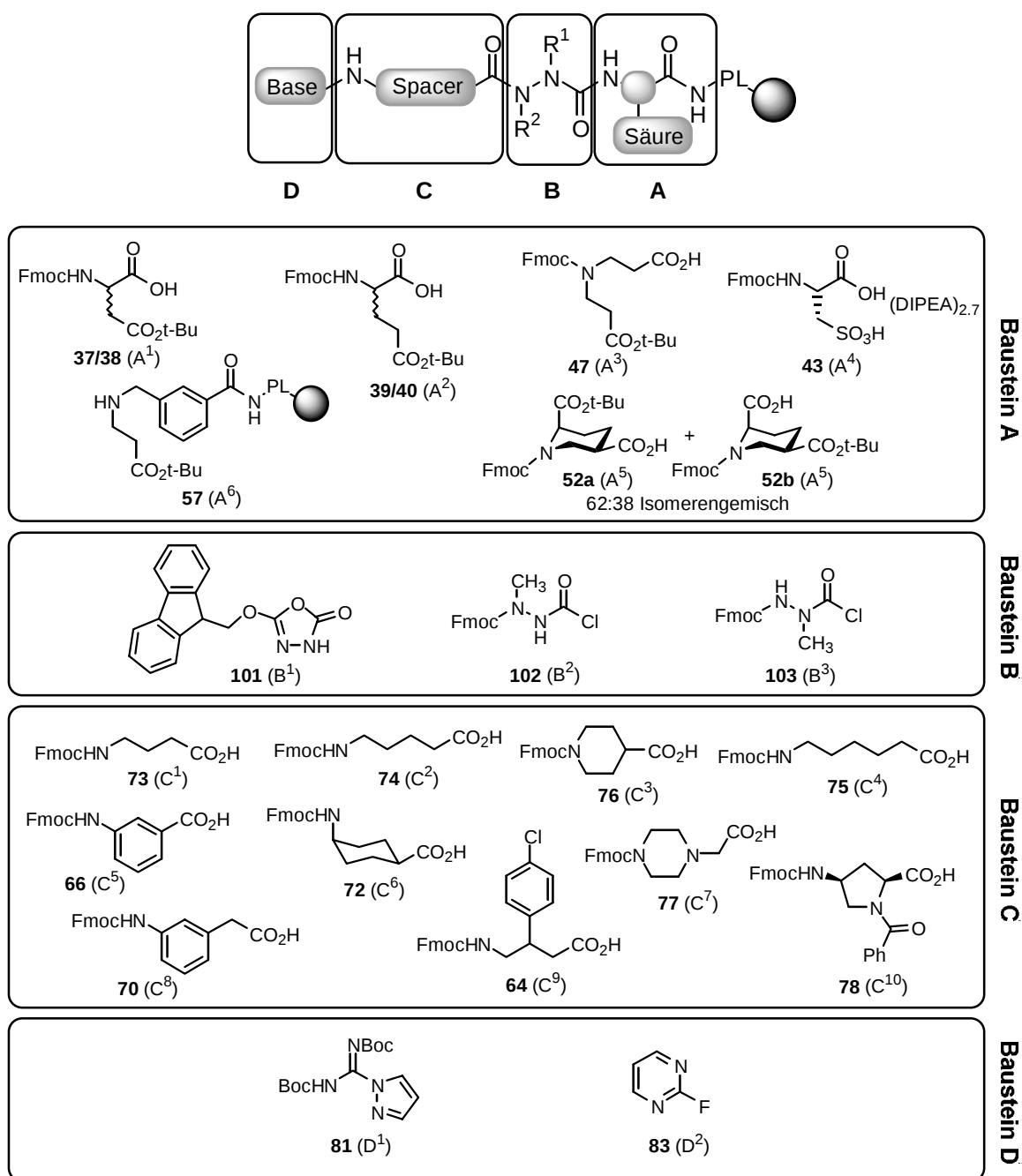


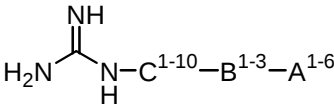
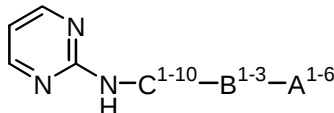
Abbildung 4.9: Kombinatorische Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika

Die Synthese der aza-RGD-Mimetikabibliotheken erfolgte gemäß der Split-Methode nach Furka (siehe Kap. 3.2.3).^[149,150] In sechs Reaktionsgefäßen wurde jeweils die gleiche Menge Photolinker-TentaGel-Macrobead-Harz gegeben. In einem Reaktionsgefäß wurde *N*-βPra(Bu)Mamb (57) nach der in Kap. 4.2.1 beschriebenen Submonomermethode am Harz aufgebaut. In den übrigen Reaktionsgefäßen wurden mit HATU/Collidin die Bausteine A Fmoc-Asp(Bu)-OH (37/38), Fmoc-Glu-OH (39/40) als Racemat, Fmoc-Cpdc(2Bu)-OH (52a)/Fmoc-Cpdc(5Bu)-OH (52b) als

62:38-Isomerengemisch, Fmoc-Idp(Bu)-OH (**47**) und Fmoc-L-Cysa-OH· (DIPEA)_{2.7} (**43**) getrennt an die Harze gekuppelt und anschließend Fmoc-entschützt. Die Harze wurden als Suspension in DMF vereinigt, gemischt und anschließend im lösungsmittelfreien Zustand auf drei Reaktionsgefäße zu gleichen Mengen aufgeteilt. Danach wurden die Harze einzeln mit den Azabausteinen **101-103** gemäß den in Kap. 4.3.2 beschriebenen Methoden umgesetzt, Fmoc-entschützt, gemischt und zu gleichen Teilen auf zehn Reaktionsgefäßen aufgeteilt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren Fmoc- γ Abu-OH (**73**), Fmoc- δ Ava-OH (**74**), Fmoc-Inp-OH (**76**), Fmoc- ϵ Ahx-OH (**75**), Fmoc-Mab-OH (**66**), Fmoc-cisCyh-OH (**72**), Fmoc-Cmp-OH (**77**), Fmoc-Mape-OH (**70**), Fmoc-Cpb-OH (**64**) sowie Fmoc-(2S,4S)-Azpc-OH (**78**) wurden mit HATU/Collidin einzeln an die harzgebundenen Hydrazide gekuppelt und anschließend Fmoc-entschützt. Von den zehn dargestellten Bibliotheken mit jeweils 18 verschiedenen Verbindungen wurde etwa 25% der jeweiligen Harzmenge entnommen und sauer entschützt. Die übrigen Harze wurden erneut gemischt und zu gleichen Teilen auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der eine Teil wurde nach der in Kap. 4.4.1 beschriebenen Methode guanyliert, der andere gemäß Schema 4.20 in Kap. 4.4.2 pyrimidyliert. Abschließend wurden die so erhaltenen Bibliotheken mit jeweils 180 verschiedenen Verbindungen sauer seitenkettenentschützt.

In Tabelle 4.10 ist das Ergebnis der kombinatorischen Festphasensynthese zusammengefaßt. Zur Bibliothekssynthese wurden sechs verschiedene Bausteine A verwendet, wobei Baustein A¹ sowie A² als Racemat - Baustein A⁵ als Racemat und Regioisomerengemisch eingesetzt wurden. Werden die isomeren Bausteine A berücksichtigt, resultierten insgesamt neun verschiedene Bausteine A. Durch Kombination dieser Bausteine mit den drei Bausteinen B¹⁻³ und den zehn Bausteinen C¹⁻¹⁰ erhielt man zehn Amino-aza-RGD-Mimetikabibliotheken mit jeweils 18 bzw. 33 verschiedenen Verbindungen (**X1-10**, Tabelle 4.10). Durch Guanylierung bzw. Pyrimidylierung dieser Bibliotheken konnten zwei weitere je 180 bzw. 330 Verbindungen umfassende RGD-Mimetikabibliotheken (**Y** und **Z**, Tabelle 4.10) dargestellt werden.

Tabelle 4.10: Synthetisierte aza-RGD-Mimetikabibliotheken. Baustein A^1 sowie A^2 wurden als Racemat, Baustein A^5 als Racemat und Regioisomerengemisch eingesetzt. Unter Berücksichtigung dieser Isomere wurden insgesamt neun verschiedene Bausteine A eingesetzt.

Name	Bibliothekstyp	Anzahl der Bibliotheken	Verbindungen pro Bibliothek (A-Isomere nicht berücksichtigt)	Verbindungen pro Bibliothek (A-Isomere berücksichtigt)
X1-10	$H_2N-C^{1-10}-B^{1-3}-A^{1-6}$	10	18	33
Y	 $H_2N-C(=NH)-NH-C^{1-10}-B^{1-3}-A^{1-6}$	1	180	330
Z	 $N-C^{1-10}-B^{1-3}-A^{1-6}$	1	180	330

Das Gelingen jeder einzelnen Verknüpfungsreaktion vorausgesetzt, konnten gemäß dieser Vorgehensweise in einem Zeitraum von etwa zwei Wochen 560 bzw. 990 verschiedene RGD-Mimetika dargestellt werden. Aufgrund der sorgfältigen Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte schien es wahrscheinlich, daß der Großteil der theoretisch denkbaren Verbindungen tatsächlich gebildet wurde. Dies auch zu beweisen stellt jedoch eines der ungelösten Probleme der kombinatorischen Synthese dar. Dennoch konnte durch LC-MS- sowie MSⁿ-Analyse einzelner *beads* der Erfolg der kombinatorischen Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetikabibliotheken untermauert werden (siehe Kap. 5.3).

5 Massenspektrometrische Analyse

Zur Qualitätskontrolle der synthetisierten aza-RGD-Mimetikabibliotheken sowie nach biologischer *on-bead*-Evaluation sollten die Verbindungen photolytisch von einzelnen *beads* abgelöst und mit Hilfe von LC-MS und ESI-MSⁿ charakterisiert werden. Durch die massenspektrometrisch ermittelte Molekülmasse kann die Struktur der selektierten Verbindung zumindest auf wenige Isomere eingeschränkt werden. Darüber hinaus kann anhand der Fragmentionen die Lösungsmenge im Idealfall auf eine konkrete Verbindung eingegrenzt werden.

5.1 Peptid-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Sequenzanalyse von Peptiden hat inzwischen einen hohen Entwicklungsstand erreicht. In einer bahnbrechenden Arbeit konnten Barber *et al.* bereits 1981 mit Einführung der FABMS-Technik von einem underivatisierten Undecapeptide ein klar definiertes Massenspektrum des $[M+H]^+$ -Ions erzeugen.^[264] In Abbildung 5.1 sind die bevorzugt gebildeten Fragmentionen protonierter Peptide unter Verwendung der von Roepstorff und Fohlman vorgeschlagenen Nomenklatur zusammengefaßt.^[265] Anhand zahlreicher literaturbekannter FAB-Massenspektren konnte gezeigt werden, daß die meisten Peptide nach einem dieser Prozesse fragmentieren, wobei die C"- und Y"-Fragmentierung am häufigsten beobachtet wurde.^[193]

Charakteristisch für schonende Ionisierungsquellen wie FAB oder ESI^[266] ist die Generierung von Ionen, die mit der Molekülmasse der untersuchten Verbindungen korrelieren. Der Anteil an Fragmentionen in den so erzeugten Massenspektren ist jedoch oft gering. Dieser Nachteil konnte durch Einführung der Tandem-Massenspektrometrie aufgehoben werden, mit deren Hilfe bestimmte Ionen gezielt fragmentiert werden können.^[193,267,268]

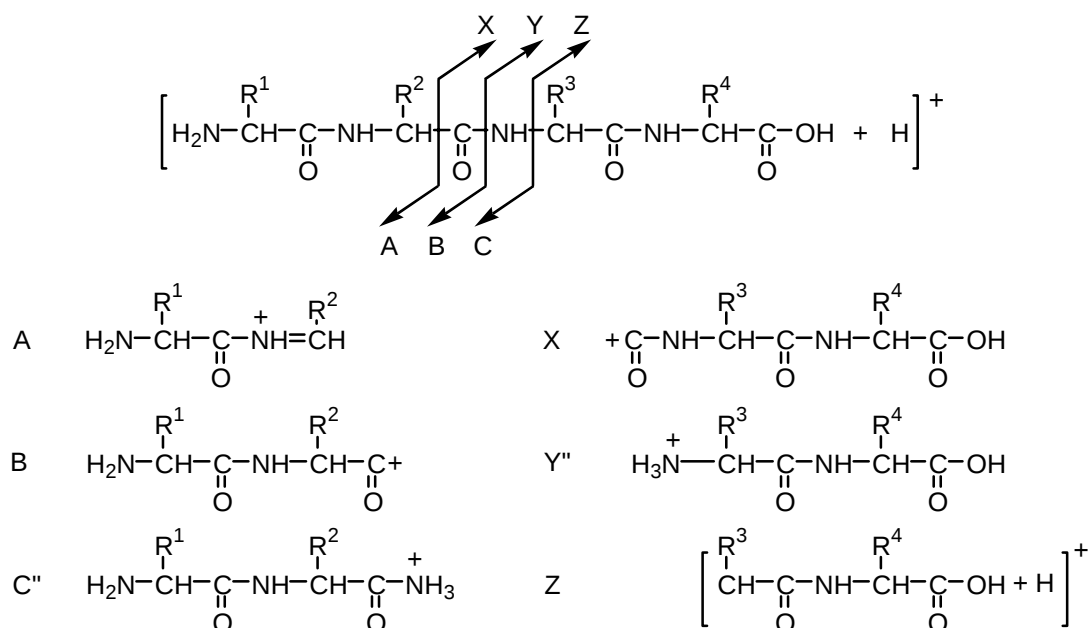


Abbildung 5.1: Die am häufigsten auftretenden Fragmentionen resultierend aus protonierten linearen Peptiden. Der Apostroph kennzeichnet die Addition eines Wasserstoffatoms im Fragmention (zwei Apostrophe bedeutet die Addition von zwei Wasserstoffatomen).

5.2 Charakteristische Fragmentionen der aza-RGD-Mimetika

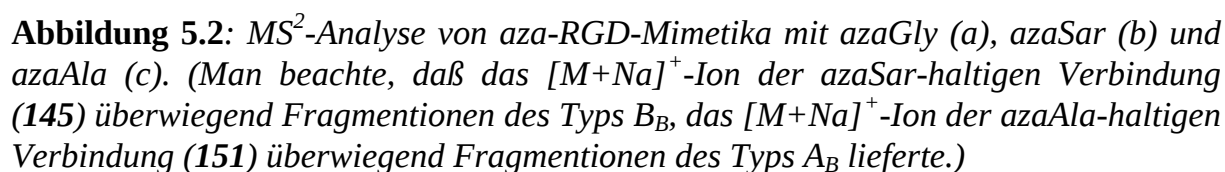
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die massenspektrometrischen Untersuchungen mit Hilfe einer Quadrupol-Ionenfalle durchgeführt.^[269] Der entscheidende Vorteil der Ionenfalle ist, daß aus einem Strom verschiedener Ionen ein einziger m/z -Wert bzw. ein enger Bereich um m/z isoliert und gespeichert werden kann. Die Bewegung der isolierten Ionen kann anschließend durch Resonanzanregung von einem eng begrenzten Raum im Zentrum der Ionenfalle auf einen größeren Bereich ausgedehnt werden. In einem als *collision-induced dissociation* (CID) bekannten Prozeß kollidieren die angeregten Ionen mit dem Puffergas (meist Helium) und bilden so die typischen Fragmentionen. Dieses Experiment wird als MS^2 , die n -fache Wiederholung dieses Experimentes mit den jeweils resultierenden Fragmentionen als MS^n bezeichnet.

Die massenspektrometrische Sequenzanalyse von Azapeptiden wurde bisher nur in einer Literaturpräzedenz von Han *et al.* beschrieben.^[228] Das CID-Fragmentionen-Muster des von ihnen untersuchten $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions des Azatids (Oligoazaaminosäure) azaTyr-azaGly-azaGly-azaPhe-azaLeu zeigte Fragmente vom Typ X und A. Erfolgte der Bindungsbruch auf C-terminaler Seite eines Azaglycins, wurden zudem Fragmentionen des Typs Y und B beobachtet.

Vor diesem Hintergrund schien die MS^n -Analyse eine brauchbare Methode zur Strukturbestimmung der selektierten aza-RGD-Mimetika zu sein. Um die Eignung dieser Technik auszuloten, wurden einige isoliert dargestellte aza-RGD-Mimetika mit Hilfe von MS^n untersucht. Abbildung 5.2 veranschaulicht das Ergebnis der MS^2 -Analyse der Verbindung **139**, **145** sowie **151**. Da diese Verbindungen abgesehen vom Azabaustein B identische Strukturelemente aufwiesen, konnte so der Einfluß des Substitutionsmusters des Hydrazins auf das Fragmentierungsverhalten der aza-RGD-Mimetika abgeschätzt werden. Untersucht wurde jeweils das $[M+H]^+$ -Ion (siehe Abbildung 5.2, links) sowie das $[M+Na]^+$ -Ion (siehe Abbildung 5.2, rechts). Um die Fragmentationen in der folgenden Diskussion eindeutig zu definieren, wurden sie zusätzlich mit dem zur Fragmentierungsstelle benachbarten Baustein im Fragmention indiziert.

Im Einklang mit dem Ergebnis der Untersuchungen von Han *et al.*^[228] wies das MS^2 -Spektrum des $[M+H]^+$ -Ions der azaGly-haltigen Verbindung **139** sowohl das B_B - bei m/z 200 als auch das A_B -Fragmention bei m/z 174 auf. Im MS^2 -Spektrum des $[M+Na]^+$ -Ions der selben Verbindung war die Intensität des B_B -Fragmention bei m/z 222 im Vergleich zum A_B -Fragmention etwa fünfmal höher.

Erfreulicherweise zeigten die MS^2 -Spektren der $[M+H]^+$ -Ionen der isomeren Verbindungen **145** und **151** deutlich unterschiedliche Intensitätsverhältnisse der B_B - bei m/z 214 und A_B -Fragmentionen bei m/z 188. Das $[M+H]^+$ -Ion des azaSar-RGD-Mimetikums **145** zerfiel mit marginaler Präferenz zum B_B -Fragmention, während das $[M+H]^+$ -Ion der isomeren azaAla-haltigen Verbindung **151** nahezu quantitativ das A_B -Fragmention lieferte. Noch deutlicher war dieser Effekt in den MS^2 -Spektren der $[M+Na]^+$ -Ionen ausgeprägt. Die azaSar-haltige Verbindung **145** zerfiel mit einer 10:1-Selektivität zum B_B -Fragmention bei m/z 236, die azaAla-haltige Verbindung **151** mit etwa gleicher Selektivität zum A_B -Fragmention bei m/z 210.



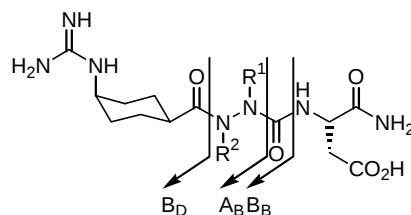
In den untersuchten aza-RGD-Mimetika **139**, **145** sowie **151** konnte also mit Hilfe der MS²-Analyse Baustein A zweifelsfrei identifiziert werden. Darüber hinaus konnte insbesondere anhand der MS²-Spektren der [M+Na]⁺-Ionen zwischen den isomeren Bausteinen B azaSar (B²) und azaAla (B³) differenziert werden.

Im MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions von **145** ist bei *m/z* 142 das schwach ausgeprägte Signal des B_C-Fragmentions zu erkennen. Dieses Fragmention trat hingegen in allen MS³-Spektren der B_B- sowie der A_B-Fragmentionen der protonierten Spezies von **139**, **145** sowie **151** mit deutlich höherer Intensität auf. Mit dieser Information ließen sich die Bausteine B und C zuordnen. (Alle Verbindungen in einer Bibliothek besitzen den gleichen Baustein D, der daher nicht zugeordnet werden muß). Somit war es gelungen, die massenspektrometrisch untersuchten aza-RGD-Mimetika vollständig und eindeutig zu sequenzieren.

Die Spezifität der beobachteten CID-Fragmentionen-Muster der aza-RGD-Mimetika wurde durch die massenspektrometrische Untersuchung der analogen C⁶-haltigen Verbindungen **140**, **146** sowie **152** bestätigt (siehe Tabelle 5.1). Die MS²-Spektren der [M+H]⁺- sowie der [M+Na]⁺-Ionen dieser Verbindungen zeigten im Vergleich zu den korrespondierenden Spektren der C²-analogen aza-RGD-Mimetika nahezu identische Verhältnisse der Signalintensitäten der Fragmentionen vom Typ B_C, A_B und B_B. Auch hier konnte anhand des ausgeprägten Intensitätsunterschiedes der A_B- und B_B-Signale in MS²-Spektren der [M+Na]⁺-Ionen zwischen dem azaSar- (**146**) und azaAla-RGD-Mimetikum **152** zweifelsfrei differenziert werden. Wie im oben beschriebenen Fall ergaben die MS³-Zerfälle der protonierten B_B- und A_B-Fragmentionen jeweils in hohem Anteil die B_C-Fragmentionen.

Die zu den Fragmentionen des Typs A und B korrespondierenden Fragmentionen des Typs X und Y wurden im Gegensatz zur Literaturpräzedenz^[228] in keinem der aza-RGD-Mimetika-Massenspektren beobachtet. Die massenspektrometrische Kontrollanalyse einzelner *beads* der aza-RGD-Mimetikabibliotheken ergab jedoch, daß diese Fragmentionen abhängig vom Baustein A ebenfalls auftreten können (siehe Kap. 5.3).

Tabelle 5.1: MS^2 -Analyse der aza-RGD-Mimetika **140**, **146** sowie **152**. (Wie die analogen Verbindungen mit Baustein C^2 wiesen die MS^2 -Spektren der $[M+Na]^+$ -Ionen der azaSar- und azaAla-haltigen Verbindung **146** und **152** konträre Intensitätsverhältnisse zwischen dem A_B - und B_B -Fragmentation auf.)



Nr.	Baustein B	Ion	Relative Intensität der Fragmentationen im MS^2 -Spektrum		
			B _C (%)	A _B (%)	B _B (%)
140	R ¹ =R ² =H (azaGly)	$[M+H]^+$	10	100	2
		$[M+Na]^+$	4	40	100
146	R ¹ =H; R ² =Me (azaSar)	$[M+H]^+$	20	50	100
		$[M+Na]^+$	5	5	100
152	R ¹ =Me; R ² =H (azaAla)	$[M+H]^+$	0	100	0
		$[M+Na]^+$	0	100	0

Anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen konnte somit belegt werden, daß eine vollständige Sequenzanalyse der aza-RGD-Mimetika mit Hilfe von MS^2 und MS^3 grundsätzlich möglich ist. Um mit absoluter Sicherheit aus dem CID-Fragmentionen-Muster die Struktur des entsprechenden aza-RGD-Mimetikums abzuleiten, müßte diese Studie auf zahlreiche und möglichst diverse aza-RGD-Mimetika ausgeweitet werden.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden einige der selektierten aza-RGD-Mimetika nachsynthetisiert (siehe Kap. 6.3 und 6.4). Der Vergleich der CID-Fragmentationen-Muster bestätigte jedoch in allen Fällen die vorhergesagte Struktur und untermauerte so die Zuverlässigkeit der massenspektrometrischen Strukturbestimmung der aza-RGD-Mimetika.

5.3 LC-MS- und MSⁿ-Kontrollanalyse der Bibliotheken

Um die Qualität der aza-RGD-Mimetikabibliotheken zu überprüfen, sollten die Verbindungen von einzelnen Macrobeads abgelöst und anschließend per LC-MS und MS² analysiert werden. Dazu wurden die Macrobeads getrennt in 80-100 µL eines 80:20 CH₃CN/H₂O-Gemisches photolysiert. 10 µL der so erhaltenen Abspaltlösung wurden per LC-MS untersucht, das restliche Volumen stand dann für die MSⁿ-Analyse zur Verfügung. Dabei stellte die Charakterisierung der geringen Substanzmengen von maximal 5 nmol eine weitere Herausforderung an die massenspektrometrische Analyse dar. Denn insbesondere die aza-RGD-Mimetika der Amino- bzw. Guanylbibliothek wiesen, vermutlich aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur, mangelhafte Ionisierungsausbeuten auf. Ihre hohe Polarität verhinderte zudem die Trennung vom Lösungsmittelpeak in den LC-MS-Chromatogrammen.

Beide Schwierigkeiten konnte durch Einführung einer Boc-Schutzgruppe am Amin bzw. Guanidin überwunden werden. Dazu wurden die *beads* mit einer Lösung von Boc₂O und DIPEA in CH₂Cl₂ behandelt und anschließend gründlich gewaschen. Im Vergleich zu den ungeschützten aza-RGD-Mimetika zeigten die entsprechenden Boc-geschützten Verbindungen eine deutlich bessere Ionisierungsausbeute. Die Boc-Schutzgruppe der [M+H]⁺-Ionen erwies sich als äußerst labil, so daß die ESI-MS-Spektren meist nur die korrespondierenden [M-Boc+H]-Ionen enthielten, die dann direkt mittels MSⁿ gemäß Kap. 5.2 untersucht werden konnten. Die Boc-Schutzgruppe der [M+Na]⁺-Ionen erwiesen sich hingegen als stabiler. Die ESI-MS-Spektren zeigten jedoch neben den [M+Na]⁺-Ionen die für die Boc-Schutzgruppe typischen Fragmentionen [M-Bu+Na]⁺ und [M-Boc+Na]⁺. Auch hier konnten also die [M-Boc+Na]⁺-Ionen direkt per MSⁿ gemäß Kap. 5.2 analysiert werden. Die LC-MS-Analyse der guanylierten aza-RGD-Mimetika zeigte, daß diese meist nicht vollständig Boc-geschützt wurden. Dies hatte jedoch auf die MSⁿ-Sequenzierung keinen negativen Einfluß.

Zur Kontrolle wurden aus den Amino-Bibliotheken (**X1-10**) mittels LC-MS 12 *beads*, aus der guanylierten Bibliothek (**Y**) sowie der pyrimidylierten Bibliothek (**Z**) jeweils 8 *beads* untersucht. Auf allen *beads* der Amino-Bibliotheken sowie auf jeweils 7 *beads* der guanylierten und der pyrimidylierten Bibliothek konnten aza-RGD-Mimetika nachgewiesen werden. Auf jeweils einem *bead* der guanylierten sowie der

pyrimidylierten Bibliothek konnten keine aza-RGD-Mimetika detektiert werden, da in diesen Fällen vermutlich die Nachweisgrenze unterschritten wurde.

Des weiteren wurden die Strukturen einiger der isolierten aza-RGD-Mimetika mit Hilfe von MS^2 bestimmt. In Tabelle 2.1 ist das Ergebnis von sechs repräsentativ ausgewählten MS^2 -Untersuchungen zusammengefaßt. Die aza-RGD-Mimetika **156** und **157** wurden aus der Amino-Bibliothek **X8** bzw. **X3** isoliert. Das LC-MS-Chromatogramm von **156** wies ausschließlich eine Verbindung mit m/z 373 (M-Boc) auf. Diese Information schränkte die Lösungsmenge auf das azaSar- und azaAla-Isomer der gezeigten Struktur ein. Die Fragmentationen im MS^2 -Spektrum des $[M-Boc+H]^+$ -Ions untermauerten die Struktur. Das gesonderte Auftreten des A_B -Fragmentions im MS^2 -Spektrum des $[M-Boc+Na]^+$ -Ions belegte, daß das aza-RGD-Mimetikum azaAla enthalten mußte. Im Fall **157** zeigte das LC-MS-Chromatogramm quantifiziert nach der UV-Spur bei 220 nm neben m/z 405 etwa 70% einer um m/z 18 leichteren Verbindung, die vermutlich aus der intramolekularen Kondensationsreaktion während der sauren Seitenkettenentschützung resultierte (siehe Kap. 4.5.3.2). Die ermittelte Molekülmasse schränkte auch in diesem Fall die in Frage kommenden Verbindungen auf die α -N- und β -N-methylierten Isomere der gezeigten Struktur ein. Im Gegensatz zu **156** wiesen die MS^2 -Spektren des $[M-Boc+H]^+$ - und $[M-Boc+Na]^+$ -Ions von **157** keine Fragmentationen des Typs A_B neben dem B_B -Fragmention auf. Somit mußte dieses aza-RGD-Mimetikum azaSar enthalten. Beide Spektren zeigten sowohl Y_A - als auch Y_B -Fragmentionen – charakteristisch für aza-RGD-Mimetika, welche die sekundären Amine A^3 , A^5 oder A^6 enthielten.

Tabelle 5.2: Repräsentative Ergebnisse der massenspektrometrischen Kontrollanalyse einzelner beads aus den Bibliotheken **X1-10**, **Y** und **Z**.

Bib.	Struktur	Ergebnis der MS-Analyse
X8	156	LC-MS: 496 $[M+Na]^+$, 374 $[M-Boc+H]^+$; MS ² auf $[M-Boc+H]^+$: 206 (30) $[B_B]$, 180 (100) $[A_B]$; MS ² auf $[M-Boc+Na]^+$: 202 (100) $[A_B]$
X3	157	LC-MS: 528 $[M+Na]^+$, 406 $[M-Boc+H]^+$; MS ² auf $[M-Boc+H]^+$: 295 (100) $[Y_B]$, 223 (45) $[Y_A]$, 184 (6) $[B_B]$; MS ² auf $[M-Boc+Na]^+$: 317 (5) $[Y_B]$, 245 (100) $[Y_A]$, 206 (3) $[B_B]$
Y	158	LC-MS: 482 $[M+H]^+$; MS ² auf $[M+H]^+$: 310 (100) $[B_B]$, 284 (30) $[A_B]$, 238 (15) $[B_C]$; MS ² auf $[M+Na]^+$: 332 (15) $[B_B]$, 306 (100) $[A_B]$, 267 (80) $[Y_B]$, 195 (100) $[Y_A]$
Y	159	LC-MS: 464 $[M+Na]^+$, 442 $[M+H]^+$; MS ² auf $[M+H]^+$: 296 (40) $[B_B]$, 270 (100) $[A_B]$, 238 (30) $[B_C]$; MS ² auf $[M+Na]^+$: 318 (50) $[B_B]$, 292 (100) $[A_B]$, 260 (10) $[B_C]$
Z	160	LC-MS: 444 $[M+Na]^+$, 422 $[M+H]^+$; MS ² auf $[M+H]^+$: 250 (100) $[A_B]$, 204 (5) $[B_C]$; MS ² auf $[M+Na]^+$: 298 (7) $[B_B]$, 272 (100) $[A_B]$
Z	161	LC-MS: 528 $[M+Na]^+$, 506 $[M+H]^+$; MS ² auf $[M+H]^+$: 284 (100) $[B_B]$, 223 (7) $[Y_A]$; MS ² auf $[M+Na]^+$: 306 (15) $[B_B]$, 245 (100) $[Y_A]$

Die aza-RGD-Mimetika **158** und **159** stammten aus der guanylierten Bibliothek **Y**. In den LC-MS-Chromatogrammen beider Verbindungen waren keine Nebenprodukte zu erkennen. Mit einer für die Boc-entschützte Verbindung **158** ermittelten Molekülmasse von m/z 481 mußte erneut lediglich zwischen den zwei regioisomeren

Azabausteinen unterschieden werden. Das Signalintensitätsverhältnis von B_B zu A_B von 15:100 im MS^2 -Spektrum des $[M+Na]^+$ -Ions wies darauf hin, daß das aza-RGD-Mimetikum mit hoher Wahrscheinlichkeit am α -N-Atom methyliert war. Für das Boc-entschützte aza-RGD-Mimetikum **159** wurde eine Molekülmasse von m/z 441 gefunden. In der guanylierten Bibliothek **Y** gab es insgesamt vier Verbindungen dieser Masse. Anhand der charakteristischen Fragmentationen B_B , A_B und B_C in den MS^2 -Spektren der $[M+Na]^+$ - und $[M+H]^+$ -Ionen konnte die Struktur von **159** jedoch zuverlässig bestimmt werden.

Die Verbindungen **160** und **161** wurden aus der pyrimidylierten Bibliothek **Z** isoliert. Die LC-MS-ermittelte Molekülmasse für **160** von m/z 421 wurde von insgesamt acht Isomeren repräsentiert. Die MS^2 -Spektren des $[M+H]^+$ -Ions wies jedoch auch hier die zur vollständigen Sequenzierung genügende Fragmentationen-Kombination A_B/B_C auf. Darüber hinaus konnte auch die Regioisomerie am Azabaustein durch das Verhältnis von B_B zu A_B im MS^2 -Spektrum des $[M+Na]^+$ -Ions geklärt werden. Das LC-MS-Chromatogramm von **161** zeigte neben m/z 505 das für Baustein A^6 -typische unpolare Wasserabspaltungsprodukt bei m/z 487 mit einem relativen Anteil von etwa 30% (UV, 220 nm). Mit dem Auftreten der Fragmentationen-Kombination B_B/Y_A in den MS^2 -Spektren der $[M+Na]^+$ - und $[M+H]^+$ -Ionen sowie mit der Abwesenheit von A_B -Ionen konnte die gezeigte Struktur aus einer Lösungsmenge von vier isomeren Verbindungen ebenfalls zuverlässig bestimmt werden.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse schien die massenspektrometrische Strukturbestimmung von aza-RGD-Mimetika auf selektierten positiven *beads* eine praktikable Methode zu sein. Gegenüber der gängigen Vorgehensweise, nicht-peptidische Bibliotheken chemisch zu codieren (siehe Kap. 3.2.5), um so indirekt auf die Struktur der aktiven Verbindung zu schließen, bot die massenspektrometrische Analyse einige Vorteile. Zum einen konnte so die Effizienz der Reaktionsführung gesteigert werden, da die chemischen Codierungsreaktionen während der kombinatorischen Synthese entfielen. Zum anderen mußten die optimierten Reaktionsbedingungen nicht zusätzlich auf Kompatibilität mit der chemischen Codierungsmethode überprüft werden. Darüber hinaus gab die massenspektrometrische Untersuchung Aufschluß über die tatsächlich vorhandenen Reaktionsprodukte auf einem selektierten *bead*.

6 Biologische Evaluation

Die kombinatorische Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika wurde mit dem Ziel durchgeführt, neue Integrinliganden zu finden. In diesem Kapitel werden zuerst die Aktivitäten der in Einzelsynthesen dargestellten aza-RGD-Mimetika am isolierten $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -, $\alpha\text{v}\beta 3$ - sowie $\alpha\text{v}\beta 5$ -Rezeptor diskutiert. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Merck KGaA, Darmstadt, im Labor von S. L. Goodman durchgeführt. Im Abschnitt 6.2 wird die Etablierung eines *on-bead*-Rezeptortests beschrieben. Im Anschluß daran wird das Ergebnis der *on-bead*-Evaluation der aza-RGD-Mimetikabibliotheken vorgestellt.

6.1 Bindungsstudien an isolierten Integrinen

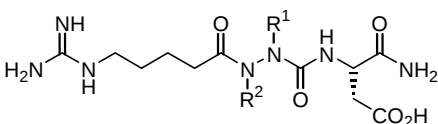
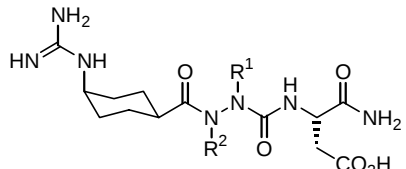
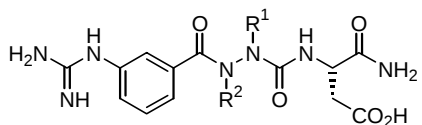
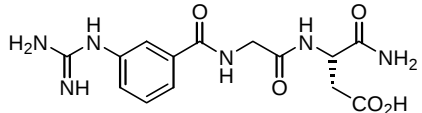
Die verwendeten αv -Integrine wurden aus Plazenta und das $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin aus Blutplättchen menschlichen Ursprungs isoliert bzw. als lösliche Integrinrezeptoren gentechnisch hergestellt. Die natürlichen Liganden Vitronectin und Fibrinogen wurden aus humanem Plasma isoliert. Die immobilisierten Integrine wurden in einem Verdrängungsexperiment mit dem löslichen biotinylierten Liganden und der Testsubstanz inkubiert. Aus Messungen bei verschiedenen Konzentrationen ließ sich nach enzymatischer Anfärbung des biotinylierten Liganden photometrisch die Inhibierungskonstante (IC_{50}) bestimmen. IC_{50} ist die Konzentration an Testsubstanz, die benötigt wird, um 50% der maximalen Rezeptorinhibierung zu erreichen. Definitionsgemäß ergibt sich, daß eine Verbindung ein um so *stärkerer* Inhibitor des entsprechenden Rezeptors ist, je *kleiner* die IC_{50} -Konstante ist.

Die isoliert dargestellten aza-RGD-Mimetika Gua-Mab-azaGly-Cysa-NH₂ (**134**), Gua-Mab-azaGly-N- β PraMamb-NH₂ (**137**), Gua-Amob-azaGly-Asp-NH₂ (**142**), Gua-Ani-azaGly-Asp-NH₂ (**143**), Gua-Mape-azaSar-Asp-NH₂ (**148**), Gua-Pab-azaSar-Asp-NH₂ (**149**), Gua-Mamb-azaSar-Asp-NH₂ (**150**), Gua-Mape-azaAla-Asp-NH₂ (**154**) und Gua-Mamb-azaAla-Asp-NH₂ (**155**) banden an den $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -, $\alpha\text{v}\beta 3$ - sowie $\alpha\text{v}\beta 5$ -Rezeptor mit IC_{50} -Werten $>10 \mu\text{mol}$. Sie zeigten also keine Aktivität innerhalb des Erfassungsbereichs des Testsystems.

Zusammen mit strukturanalogen inaktiven Verbindungen sind in Tabelle 6.1 die aza-RGD-Mimetika aufgeführt, die eine meßbare Affinität zu mindestens einem der

genannten Rezeptoren aufwiesen. Diese aza-RGD-Mimetika enthielten alle die Strukturelemente Guanidin und L-Asparaginsäure, unterschieden sich also nur hinsichtlich des Azabausteins B und Spacerbausteins C. Diese Verbindungen mit einem bestimmtem Baustein C wurden jeweils in Kombination mit azaGly, azaSar sowie azaAla dargestellt und getestet. So konnte insbesondere der Einfluß des Azabausteins B auf die Rezeptoraffinitäten der resultierenden aza-RGD-Mimetika abgeschätzt werden.

Tabelle 6.1: Inhibierungsverhalten der RGD-Mimetika hinsichtlich der Bindung von Fibrinogen an den isolierten $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Rezeptor und Vitronectin an den isolierten $\alpha\text{v}\beta 3$ - und $\alpha\text{v}\beta 5$ -Rezeptor (isoliert aus humaner Plazenta).

Struktur	Nr.	Baustein B	IC ₅₀ (µM)		
			$\alpha\text{v}\beta 3$	$\alpha\text{v}\beta 5$	$\alpha\text{IIb}\beta 3$
	139	R ¹ =H, R ² =H	6.8	>100	>100
	145	R ¹ =H, R ² =Me	>100	>100	2.7
	151	R ¹ =Me, R ² =H	>100	>100	>100
	140	R ¹ =H, R ² =H	5.4	8.9	4.0
	146	R ¹ =H, R ² =Me	>100	>100	22
	152	R ¹ =Me, R ² =H	>100	>100	>100
	141a	R ¹ =H, R ² =H	0.017	0.20	>100
	147	R ¹ =H, R ² =Me	>10	>10	>10
	153	R ¹ =Me, R ² =H	>10	>10	>10
	144		0.15	6.0	>10

Die azaAla-haltigen RGD-Mimetika **151**, **152** und **153** waren mit einem IC₅₀ von >10 µM bzw. >100 µM in allen Rezeptor-Bindungstests inaktiv. Die azaGly-haltigen RGD-Mimetika mit aliphatischem Guanylrest **139** und **140** zeigten mit einem IC₅₀ von 6.8 µM und 5.4 µM schwache Aktivität bei der Inhibierung der Bindung von Vitronectin an das $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin. Während **139** zum $\alpha\text{IIb}\beta 3$ - und $\alpha\text{v}\beta 5$ -Integrin keine

Affinität aufwies, zeigte **140** mit einem IC_{50} -Wert von 8.9 μ M am $\alpha v\beta 5$ - und 4.0 μ M am $\alpha IIb\beta 3$ -Rezeptor keine Präferenz für einen der drei Integrinrezeptoren. Im Gegensatz dazu ergaben die Rezeptor-Bindungstests der analogen azaSar-haltigen Verbindungen **145** und **146** eine Selektivität beider aza-RGD-Mimetika auf den Blutplättchenrezeptor: die Verbindung **145** inhibierte die Bindung von $\alpha IIb\beta 3$ an Fibrinogen mit einem IC_{50} -Wert von 2.7 μ M, Verbindung **146** mit einem IC_{50} -Wert von 22 μ M. Beide azaSar-RGD-Mimetika wiesen jedoch innerhalb des Erfassungsbereichs keine Affinität zum $\alpha v\beta 3$ - sowie $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor auf.

Das aromatische aza-RGD-Mimetikum **141a** zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 17 nM eine hohe Affinität zum $\alpha v\beta 3$ -Integrin, während es mit einem IC_{50} -Wert von 200 nM am $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor etwa zehnmal geringere Aktivität zeigte. Die Bindung von $\alpha IIb\beta 3$ an Fibrinogen wurde innerhalb des Erfassungsbereichs des Testsystems nicht inhibiert. Das azaSar-haltige Analogon **147** wies bis 10 μ M keine Aktivität an einem der drei Rezeptoren auf. Vor dem Hintergrund der guten Bindungseigenschaften von Verbindung **141a** an den $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor wurde zu diesem aza-RGD-Mimetikum die carbanaloge Verbindung, also das Gly-Analoge, **144** synthetisiert und biologisch evaluiert. Im Vergleich zu **141a** wies diese Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von 0.15 μ M am $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor und 6.0 μ M am $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor jeweils eine etwa zehnfach schlechtere Aktivität auf. Am Blutplättchenrezeptor zeigte diese Verbindung keine Aktivität.

Mit Blick auf die begrenzte Datenmenge wurde davon abgesehen, eine Struktur-Wirkungsbeziehung abzuleiten. Dennoch konnte anhand dieser Beispiele gezeigt werden, daß durch das Substitutionsmuster des Azabausteins B sowohl die Aktivität als auch die Selektivität der resultierenden RGD-Mimetika effizient beeinflusst werden kann. Offensichtlich war es tatsächlich gelungen, durch die Einführung der vergleichsweise wenig raumgreifenden Methylgruppen am Azabaustein B die Diversität der aza-RGD-Mimetikabibliothek erheblich zu steigern. Selbst der vollständige Aktivitätsverlust an den drei beschriebenen Integrinrezeptoren durch eine Methylgruppe am α -N-Atom untermauert die hohe Diversität. Denn auch in diesem Fall korrelierte mit der minimalen Strukturänderung eine ausgeprägte Aktivitätsänderung (Aktivitätsverlust). Würde eines der übrigen sieben RGD-abhängigen Integrine oder ein anderer Rezeptor an dieser Stelle die Methylgruppe in einem der

aza-RGD-Mimetika tolerieren, wäre die gefundene azaAla-haltige Verbindung vermutlich gegenüber den oben beschriebenen Integrinen selektiv.

6.2 Etablierung eines *on-bead*-Rezeptortests

Mit der isolierten Festphasensynthese von aza-RGD-Mimetika war es gelungen, Liganden für den $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ -Rezeptor zu finden. Diese Liganden eröffneten die Möglichkeit, einen *on-bead*-Rezeptortest zu etablieren. Da erfreulicherweise Liganden mit unterschiedlicher Affinität zum $\alpha v \beta 3$ - bzw. $\alpha v \beta 5$ -Integrinrezeptor gefunden wurden, bestand zudem die Möglichkeit, den *on-bead*-Rezeptortest zu kalibrieren. D. h. es konnten Testbedingungen ausgearbeitet werden, die es ermöglichten, zwischen harzgebundenen aza-RGD-Mimetika mit unterschiedlicher Affinität zu einem bestimmten Integrinrezeptor zu differenzieren bzw. aufgrund der Signalintensität die Aktivität der Verbindung abzuschätzen.

Unter Anwendung der in Kap. 4.6 beschriebenen Reaktionsbedingungen wurden die aza-RGD-Mimetika **141a** und **140** als immobilisierte Referenzverbindungen getrennt an Photolinker-TentaGel-Macrobeads aufgebaut (siehe Abbildung 6.1). Die photolytische Probeabspaltung und anschließende LC-MS-Analyse ergab in beiden Fällen, daß die RGD-Mimetika **141a** und **140** mit hoher Reinheit vorlagen. Als Negativ-Kontrolle zur Etablierung des *on-bead*-Rezeptortests wurde unmodifiziertes Amino-TentaGel-Macrobead-Harz verwendet.

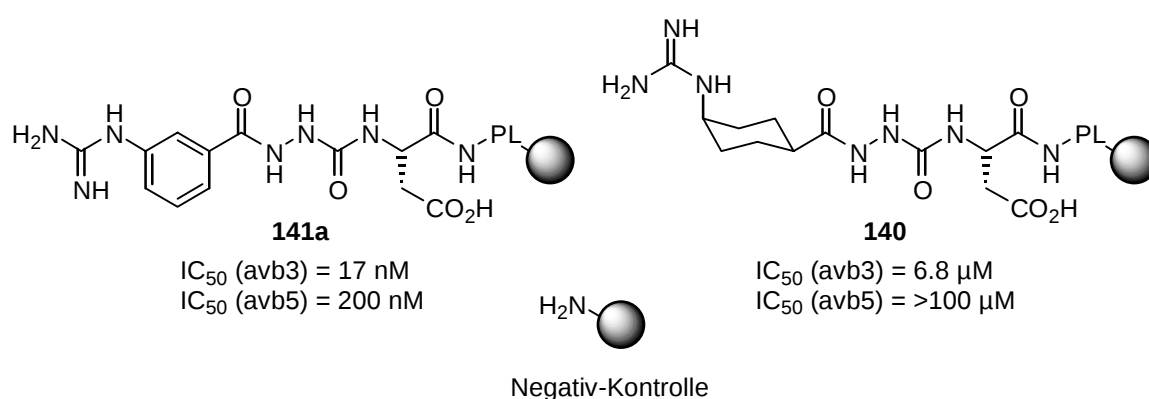


Abbildung 6.1: TentaGel-MB-gebundene aza-RGD-Mimetika zur Etablierung des *on-bead*-Rezeptortests.

Abbildung 6.2 veranschaulicht die Vorgehensweise bei der *on-bead*-Evaluation der aza-RGD-Mimetika. Zuerst wurden die komplett entschützten harzgebundenen aza-RGD-Mimetika mit einem biotinylierten löslichen Integrinrezeptor inkubiert (grün). Dann wurde mit Biotinantikörper-Phosphatase-Konjugat inkubiert (beige) und mit den Standardsubstraten BCIP (**162**) und NBT (**165**) angefärbt.

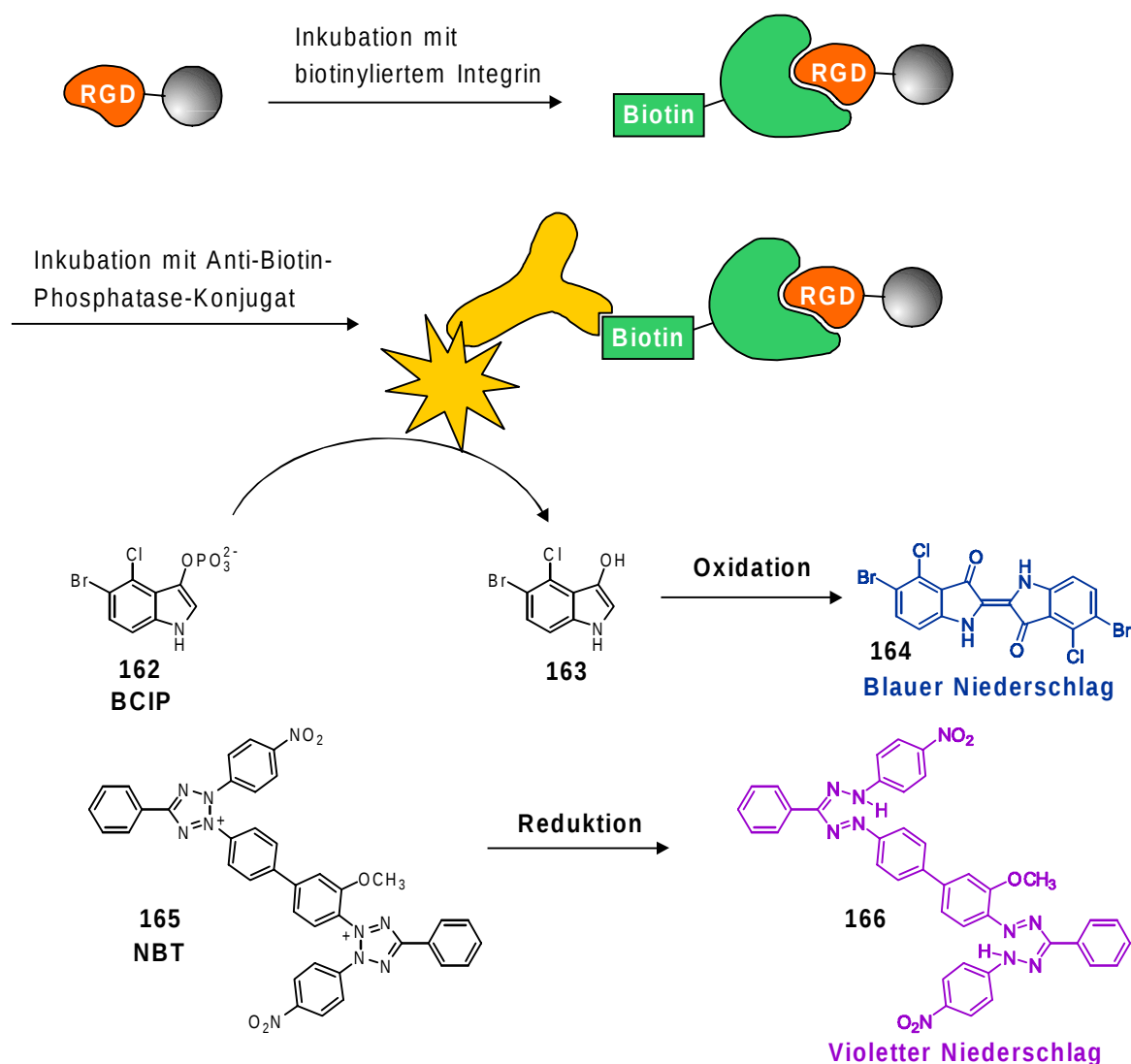


Abbildung 6.2: Prinzip des *on-bead*-Rezeptortests. Das harzgebundene aza-RGD-Mimetikum wird zuerst mit löslichem biotinyliertem Integrinrezeptor und anschließend mit Anti-Biotin-Phosphatase-Konjugat inkubiert. Wurde vom Rezeptor eine harzgebundene Verbindung erkannt, kann das entsprechende bead mit BCIP und NBT angefärbt werden.

Wies ein harzgebundenes aza-RGD-Mimetikum Affinität zum Integrinrezeptor auf, wurde dieser spezifisch an das *bead* gebunden. Die Biotin-Markierung des Rezeptors ermöglichte dann die Erkennung des gebundenen Rezeptors mit einem Biotin-

antikörper-Phosphatase-Konjugat. Die auf diese Weise an ein *bead* mit einer aktiven Verbindung immobilisierte Phosphatase konnte anschließend mit dem Standardsubstrat-System BCIP/NBT angefärbt werden. Sowohl das Alkylphosphatase-Substrat BCIP (**162**) als auch das Oxidationsmittel NBT (**165**) ist nahezu farblos und in Wasser gut löslich. Die Phosphatase katalysiert die Verseifung des Phosphorsäureesters **162** zum 3-Hydroxyindol **163**, das durch Oxidation mit NBT (**165**) in das schwer lösliche hellblaue Indigoderivat **164** überführt wird. Die reduzierte Form **166** des Oxidationsmittels **165** ist ebenfalls in Wasser schwer löslich und fällt als dunkelvioletter Niederschlag aus.

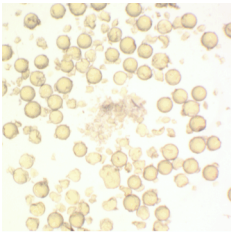
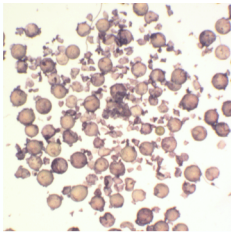
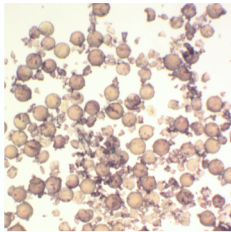
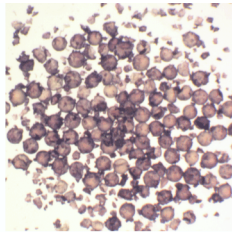
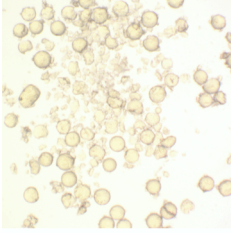
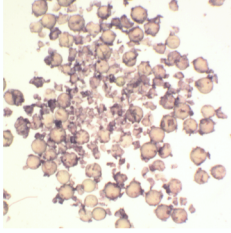
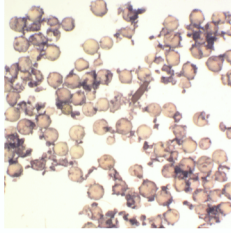
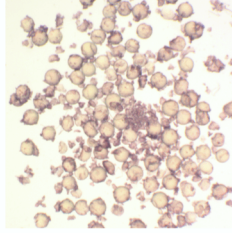
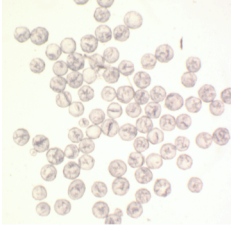
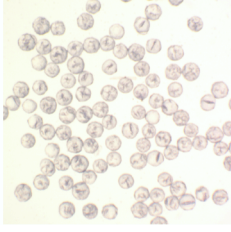
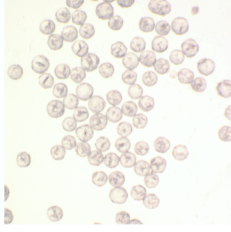
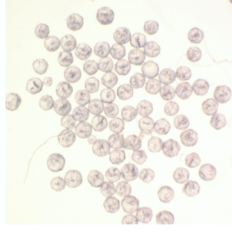
Trotz des denkbar einfachen Prinzips des *on-bead*-Rezeptortests konnten bei der experimentellen Umsetzung zahlreiche Parameter verändert werden. Zur Optimierung mußte daher der *on-bead*-Rezeptortest unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wiederholt durchgeführt werden. Als ideale Inkubationsgefäße erwiesen sich Kunststoffspritzen mit PP-Fritten. In diesen Gefäßen konnten die Inkubations- und Waschlösungen schnell und effizient ausgetauscht werden. Des weiteren konnte im Gegensatz zu offenen Gefäßen in den Kunststoffspritzen eine gute Durchmischung der Harzsuspension während der Inkubations- und Waschschrte gewährleistet werden.

Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und *bead* zu vermeiden, wurden die Harze zu Beginn der Rezeptortests mit einer 33 mg/mL BSA-Lösung in Tris-Puffer bei 37 °C blockiert und anschließend mit Tris-Bindungspuffer gewaschen. Die Inkubationen mit Rezeptor sowie mit polyklonalem Ziegen-Biotinantikörper-Alkylphosphatase-Konjugat erfolgten jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37 °C. Anschließend wurden die *beads* erneut gründlich gewaschen und mit einer BCIP/NBT-Lösung in Trispuffer über einen Zeitraum von 20-40 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Wasser abgebrochen. Die Bedingungen der Blockierung mit BSA sowie der Inkubation mit dem Antikörper wurden nicht variiert.

In ersten Untersuchungen wurde zur Inkubation mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin eine optimale Rezeptorkonzentration von 0.10-0.05 $\mu\text{g/mL}$ ermittelt. Zudem konnte durch Zusatz des Detergens Tween 20 das unspezifische Anfärben vermindert werden. In Tabelle 6.2 sind die entscheidenden Ergebnisse der Optimierung des *on-bead*-Rezeptortests mit dem $\alpha\beta 3$ -Rezeptor zusammengestellt. Nach der oben beschriebenen

Vorgehensweise zeigten die *beads* mit der aktiven Verbindung **141a** und der schwach aktiven Verbindung **140** nach dem Rezeptortest etwa gleiche Farbintensität. Die *beads* der Negativ-Kontrolle wurden hingegen nicht angefärbt (Tabelle 6.2, dritte Spalte von rechts). (Die *beads* mit Verbindung **141a** und **140** wurden während der Festphasensynthese erheblich beschädigt. Bei der Synthese der aza-RGD-Mimetikabibliotheken konnte durch stufenweises Schrumpfen und Quellen der Macrobeads diese Beschädigung jedoch weitgehend verhindert werden.) Wurde der Test in Abwesenheit eines Integrinrezeptors durchgeführt, so wurden die *beads* mit **141a** und **140** nicht angefärbt (Tabelle 6.2, vierte Spalte von rechts). Mit diesen Untersuchungen konnte somit belegt werden, daß der $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor sowohl an die *beads* mit Verbindung **141a** als auch an **140** gebunden hatte.

Tabelle 6.2: Ergebnis der Optimierung des on-bead- $\alpha v \beta 3$ -Rezeptortests

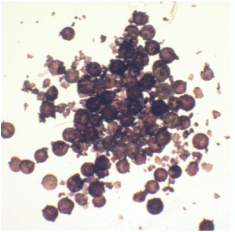
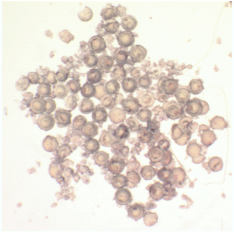
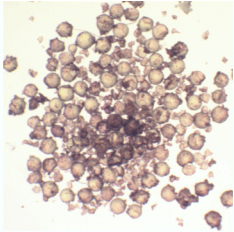
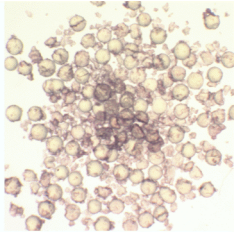
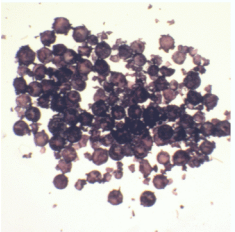
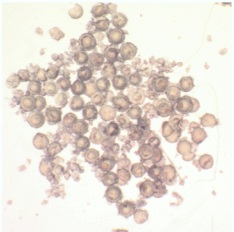
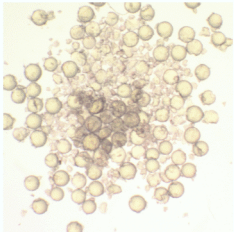
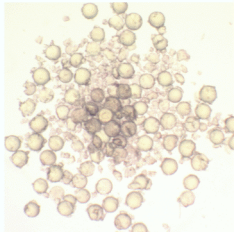
aza-RGD-Mimetikum	ohne $\alpha v \beta 3$ 100 mM NaCl 10 μ M $MnCl_2$	0.1 μ g/mL $\alpha v \beta 3$ 100 mM NaCl 10 μ M $MnCl_2$	0.1 μ g/mL $\alpha v \beta 3$ 100 mM NaCl 1 mM $MnCl_2$	0.1 μ g/mL $\alpha v \beta 3$ 250 mM NaCl 10 μ M $MnCl_2$
141a $IC_{50}(\alpha v \beta 3) = 17$ nM				
140 $IC_{50}(\alpha v \beta 3) = 5.4$ μ M				
Negativ-Kontrolle				

Die Erhöhung der Mn^{2+} -Ionenkonzentration im Bindungspuffer führte zu keinem sichtbaren Effekt (Tabelle 6.2, zweite Spalte von rechts). Wurde jedoch die NaCl-Konzentration im Bindungspuffer von 100 mM auf 250 mM erhöht, färbten die *beads* mit der aktiven Verbindung **141a** deutlich stärker als die mit der weniger aktiven Verbindung **140**. Die Harzpartikel der Negativ-Kontrolle wurden unter diesen Bedingungen nicht angefärbt (Tabelle 6.2, erste Spalte von rechts).

Abschließend sollte mit Verdrängungsexperimenten geklärt werden, ob die Rezeptoren $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha\text{v}\beta 5$ spezifisch an die harzgebundenen aktiven aza-RGD-Mimetika banden. Dazu wurden die Rezeptortests parallel unter gleichen Bedingungen mit c(RGDfV) sowie ohne Cyclopeptid durchgeführt. Das Cyclopeptid c(RGDfV) weist mit einem IC_{50} -Wert von 5.2 nM auf den $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor und einem IC_{50} -Wert von 400 nM auf den $\alpha\text{v}\beta 5$ -Rezeptor zu beiden Rezeptoren eine hohe bis mäßige Affinität auf.

In Tabelle 6.3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Wie die deutliche Unterdrückung der Anfärbung belegte, konnte mit dem Cyclopeptid die Bindung des $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptors an die harzgebundenen aza-RGD-Mimetika **141a** und **140** inhibiert werden (Tabelle 6.3, vierte und dritte Spalte von rechts). Das gleiche, wenn auch weniger prägnante Ergebnis lieferte das Verdrängungsexperiment mit Verbindung **141a** und dem $\alpha\text{v}\beta 5$ -Rezeptor. Aufgrund der schwachen Affinität des aza-RGD-Mimetikums **140** zum $\alpha\text{v}\beta 5$ -Integrinrezeptor wurde sowohl mit als auch ohne Cyclopeptid keine signifikante Anfärbung beobachtet (Tabelle 6.3, zweite und erste Spalte von rechts).

Tabelle 6.3: Verdrängungsexperiment der $\alpha v \beta 3$ - bzw. $\alpha v \beta 5$ -Rezeptorbindung an harzgebundene aza-RGD-Mimetika mit c(RGDfV)

	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 3$ + c(RGDfV) 10 μ M	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 5$ + c(RGDfV) 10 μ M
141a $IC_{50}(\alpha v \beta 3) = 17 \text{ nM}$ $IC_{50}(\alpha v \beta 5) = 200 \text{ nM}$				
140 $IC_{50}(\alpha v \beta 3) = 5.4 \text{ } \mu\text{M}$ $IC_{50}(\alpha v \beta 5) = 9.8 \text{ } \mu\text{M}$				

Mit diesen Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß das *on-bead screening* der dargestellten aza-RGD-Mimetikabibliotheken grundsätzlich möglich war. Wurden die Tests in Abwesenheit des Integrinrezeptors oder in Gegenwart des Cyclopeptids c(RGDfV) durchgeführt, wiesen die *beads* mit den aktiven Verbindungen keine signifikante Färbung auf. Somit schien sowohl das verwendete polyklonale Ziegen-Biotinantikörper-Alkylphosphatase-Konjugat als auch das BCIP/NBT-Substratsystem kompatibel mit den harzgebundenen aza-RGD-Mimetika zu sein. Erfreulicherweise war es durch Optimierung der Inkubationsbedingungen zudem gelungen, zwischen *beads* mit unterschiedlich aktiven aza-RGD-Mimetika zu differenzieren.

6.3 On-bead screening der aza-RGD-Mimetikabibliotheken I

Nachdem die Untersuchungen des Rezeptortests an bekannten Verbindungen zu konsistenten Ergebnissen führte, sollte er auf die Bibliotheken angewandt werden.

Mit Einführung der Split-Methode ergab sich die Frage, wie groß die Zahl der *beads* in einer gegebenen Bibliothek sein muß, um mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zu garantieren, daß eine bestimmte Anzahl unterscheidbarer *beads* vorliegt. K. Burgess gelang es mit Hilfe eines Computerprogramms diese Frage für den Einzelfall zu beantworten.^[270] Anhand dieser Computersimulationen ergab die Abschätzung, daß

jeweils etwa 180 Harzpartikel (zehnfache Redundanz) der Bibliotheken **X1-10** zur Testung vorliegen mußten, um mit 99%-iger Wahrscheinlichkeit sicherzustellen, daß 99% aller Verbindungen getestet wurden. Um die gleiche Wahrscheinlichkeit für die größeren Bibliotheken **Y** und **Z** zu erreichen, mußten hier jeweils 1260 Harzpartikel (siebenfache Redundanz) vorliegen.

Abbildung 6.3 zeigt die *beads* der Bibliotheken **X1-10**, **Y** und **Z** nach dem *on-bead*-Rezeptortest mit dem $\alpha\beta3$ -Integrin gemäß der in Kap. 6.2 ausgearbeiteten Bedingungen.

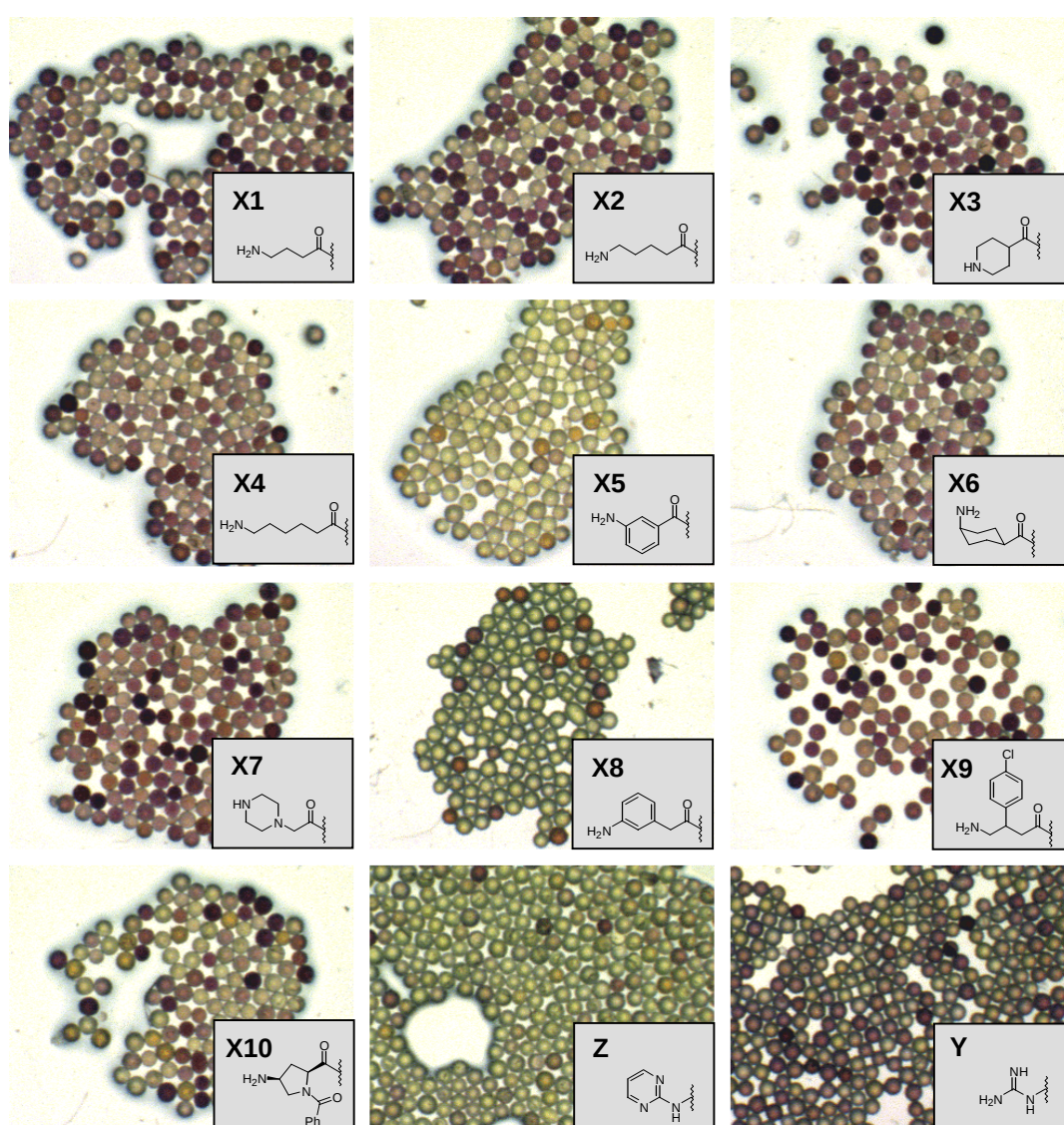


Abbildung 6.3: Bibliotheken **X1-10**, **Y** und **Z** nach dem *on-bead*-Rezeptortest mit dem $\alpha\beta3$ -Integrin gemäß der in Kap. 6.2 ausgearbeiteten Bedingungen

Nach dem *on-bead screening* der aza-RGD-Mimetikabibliotheken mit dem $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor wurde eine erstaunlich hohe Anzahl positiver *beads* vorgefunden. Innerhalb der meisten Bibliotheken wiesen die *beads* jedoch deutlich unterschiedliche Farbtintensitäten auf. Somit war es also gelungen, zwischen verschiedenen harzgebundenen aza-RGD-Mimetika eindeutig zu differenzieren. Aus den Amino-aza-RGD-Bibliotheken **X1-4** und **X6-10** wurden jeweils die sechs bis acht am intensivsten gefärbten *beads* selektiert. (Aufgrund der schwachen Anfärbung wurden aus **X5** keine *beads* selektiert). Aus der guanylierten aza-RGD-Mimetikabibliothek **Y** wurden 24, aus der pyrimidylierten Bibliothek **Z** acht *beads* selektiert. Die Harzpartikel wurden mit DMSO gewaschen und per LC-MS bzw. MS² nach der in Kap. 5.3 beschriebenen Vorgehensweise analysiert. Von den 97 isolierten *beads* gelang es in 78 Fällen die entsprechenden Verbindungen zu charakterisieren – obwohl auf zahlreichen *beads* unerwartete Verbindungen gefunden wurden.

In Abbildung 6.4 ist das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung der Bibliotheken **X1-4** und **X6-10** zusammengefaßt (Beschreibung der einzelnen Massenspektren siehe Anhang, Tabelle 11.1a-h). Alle sechs aus der anilinschen Bibliothek **X8** selektierten Verbindungen konnten nicht charakterisiert werden. Von sieben selektierten *beads* aus **X1** trugen mit hoher Wahrscheinlichkeit sechs die Nitrosoverbindung **167** und ein Harzpartikel die Nitrosoverbindung **168**. Bei Bibliothek **X2** ergab die Analyse von acht selektierten *beads* siebenmal die cyclisierte Verbindung **169**. Neben dieser Verbindung wurden ebenfalls Spuren der analogen Nitrosoverbindung gefunden (mögliche Erklärung s. u.). Von acht *beads* aus **X3** enthielten sechs das reine aza-RGD-Mimetikum **171**. An die übrigen *beads* war **172** im 1:1-Verhältnis mit dem für Baustein A⁶ typischen H₂O-Eliminierungsprodukt gebunden. Aus Bibliothek **X4** wurde ausschließlich **170**, aus **X6** ausschließlich **173** jeweils ohne signifikante Nebenprodukte selektiert. Die Analyse von sieben selektierter *beads* aus **X7** ergab zweimal reines **174** und fünfmal **175** – ohne das für Baustein A⁶ charakteristische Cyclisierungsprodukt. Auf den sieben selektierten *beads* aus Bibliothek **X9** wurde fünfmal **176** und zweimal **177** gefunden. Beide Verbindungen waren stark mit nicht identifizierten Produkten verunreinigt, konnten aber dennoch zweifelsfrei mit Hilfe von MSⁿ charakterisiert werden. Aus **X10** wurden auf acht selektierten *beads* je dreimal **178** und **179** als Reinverbindungen gefunden.

Auf den übrigen *beads* war **180** im 1:1-Verhältnis mit dem H₂O-Eliminierungsprodukt gebunden (nur ein Regioisomer gezeigt).

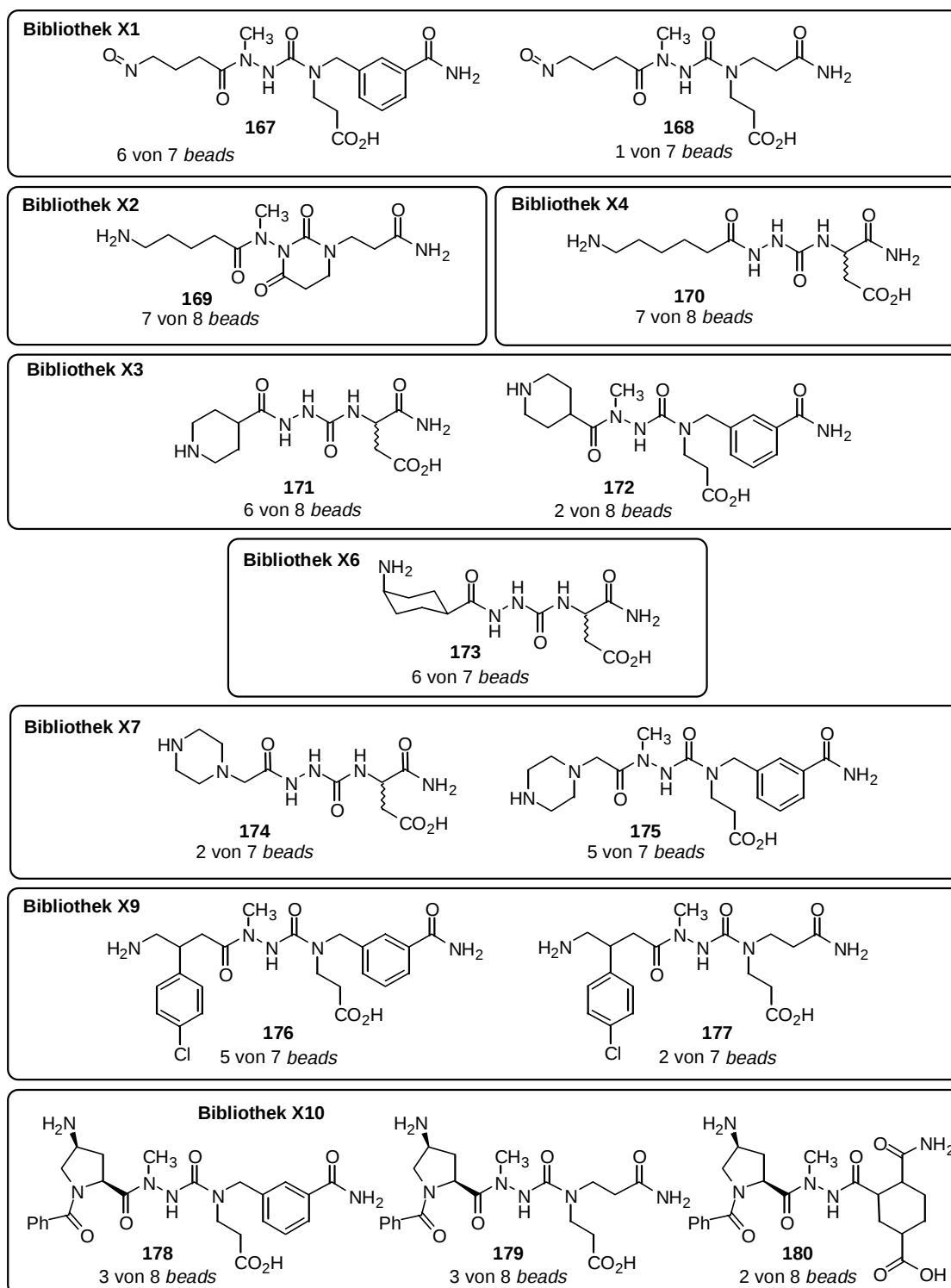


Abbildung 6.4: Ergebnis der LC-MS- und MS²-Analyse der positiven *beads* in den Bibliotheken X1-4 und X6-10

Auffällig war, daß immer nur die Kombination azaGly-Asp (B^1-A^1) bzw. azaSar mit sekundärem Amin ($B^2-A^3/A^5/A^6$) gefunden wurde. Die Verunreinigung der Verbindungen **172** und **180** mit dem H_2O -Eliminierungsprodukt resultierte vermutlich aus der sauren Entschützen der aza-RGD-Mimetika (vgl. Kap. 4.5.3.2). Für das Auftreten der Nitrosoverbindungen **167** und **168** konnte zunächst keine Erklärung gefunden werden.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse von 24 aus der guanylierten aza-RGD-Mimetikabibliothek **Y** selektierten *beads* warf zusätzliche Fragen auf. Von den untersuchten Harzpartikeln konnten die Verbindungen auf 18 *beads* charakterisiert werden (Beschreibung der einzelnen Massenspektren siehe Anhang, Tabelle 11.1i-j). Davon wies aber nur ein *bead* mit Verbindung **184** ein aza-RGD-Mimetikum mit erwarteter Struktur auf. Auf 17 *beads* hingegen wurden die entguanylierten Verbindungen **170**, **171**, **173** sowie **181** und **182** gefunden.

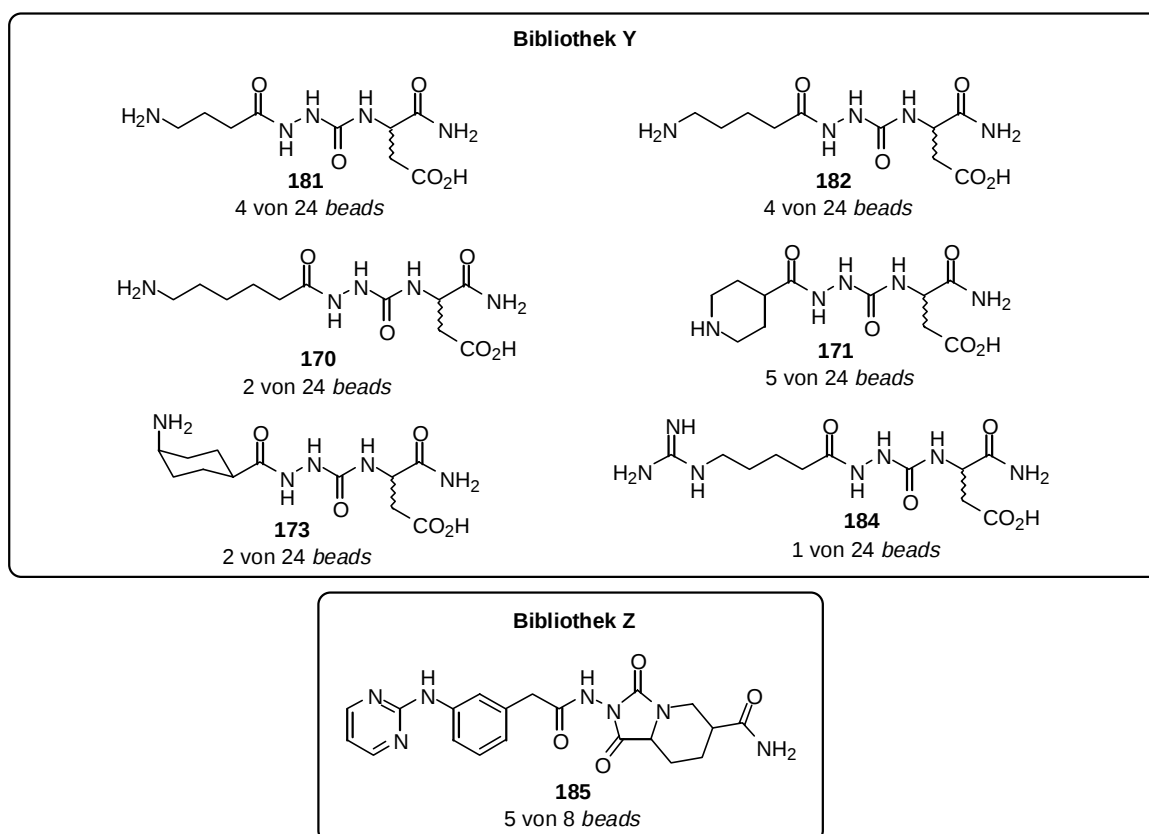


Abbildung 6.5: Ergebnis der LC-MS- und MS^2 -Analyse der positiven *beads* in den Bibliotheken **Y** und **Z**

Die isolierten *beads*, welche aus der guanylierten aza-RGD-Mimetikabibliothek **Y** zur Kontrolle entnommen und untersucht wurden, trugen aber jeweils vollständig guanylierte Verbindungen (vgl. Kap. 5.3). Offensichtlich wurde also der Guanylrest der selektierten RGD-Mimetika während des Rezeptortests abgespalten.

Auf fünf der acht aus Bibliothek **Z** selektierten *beads* wurde das H₂O-Eliminierungsprodukt **185** gefunden (nur ein Isomer gezeigt).

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchung konnte somit gezeigt werden, daß ein hoher Anteil der nach dem *on-bead screening* aussortierten Harzpartikel Verbindungen trug, deren Synthese nicht beabsichtigt war. Obwohl das Auftreten von Nitrosoverbindungen sowie der entguanylierten aza-RGD-Mimetika zunächst nicht erklärt werden konnte, unterstreicht dieses Ergebnis dennoch den Vorteil der *direkten* Analyse der auf positiven *beads* gefundenen Verbindungen. Mit Hilfe indirekter Methoden wie der chemischen Codierung von Bibliotheken hätte grundsätzlich keine Möglichkeit bestanden, die tatsächlich auf den *beads* vorhandenen Verbindungen zu charakterisieren.

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden einige der selektierten Amino-aza-RGD-Mimetika nachsynthetisiert (siehe Abbildung 6.6). Die RGD-Mimetika mit Asparaginsäure wurden als L-Enantiomere (**170a**, **171a**, **173a** und **174a**) und D-Enantiomere (**170b**, **171b**, **173b** und **174b**) an Rink-Amid MBHA-Harz jeweils in quantitativer Ausbeute aufgebaut. Da die Massenspektren dieser Verbindungen auf eine exzellente Reinheit hinwiesen, wurde von einer zusätzlichen Reinigung per HPLC abgesehen. Die ungereinigten aza-RGD-Mimetika **172**, **175**, **176** und **178** zeigten in den LC-MS-Chromatogrammen leichte Verunreinigungen und wurden daher mit Hilfe präparativer HPLC gereinigt. Die Ausbeute bezogen auf die Harzbelegung variierte von 43-84%.

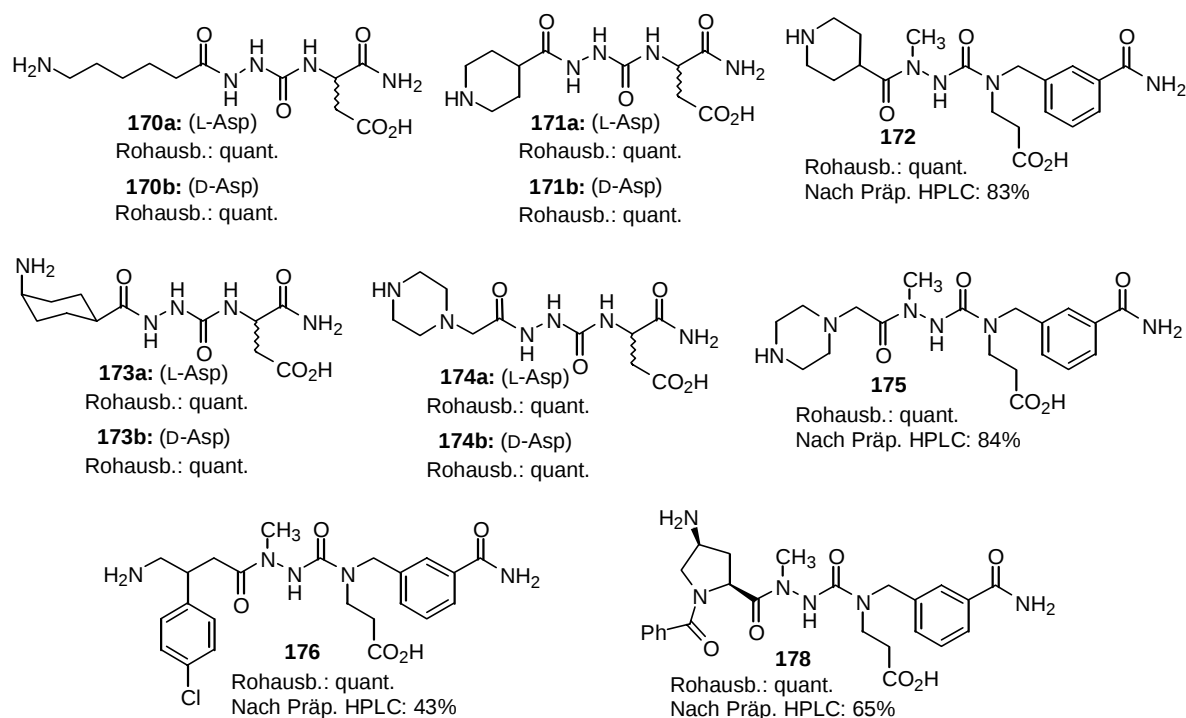


Abbildung 6.6: Ergebnis der Nachsynthese von Amino-aza-RGD-Mimetika, die auf selektierten beads gefunden wurden.

Die Bindungsuntersuchungen an isolierten Rezeptoren ergab jedoch, daß alle nachsynthetisierten aza-RGD-Mimetika keine nachweisbare Affinität zum $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor sowie zum $\alpha v \beta 5$ - und $\alpha II b \beta 3$ -Rezeptor aufwiesen. Der *on-bead*-Rezeptortest lieferte also ausschließlich falsch positive *hits*. Mit diesem Befund, zusammen mit dem inkonsistenten Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der selektierten Harzpartikel, bestand große Gewißheit, daß die ausgearbeiteten Bedingungen des *on-bead*-Rezeptortest nicht kompatibel mit den aza-RGD-Mimetikabibliotheken waren.

6.4 *On-bead screening* der aza-RGD-Mimetikabibliotheken II

Für die gefundenen falsch positiven *hits* waren drei potentielle Ursachen denkbar (vgl. dazu Abbildung 6.2 in Kap. 6.2):

- Der lösliche $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor band unspezifisch an die *beads*.
- Einige aza-RGD-Mimetika wurden vom polyklonalen Biotinantikörper-Alkylphosphatase-Konjugat erkannt.
- Das Alkylphosphatase-Substrat BCIP (**162**) und/oder das Oxidationsmittel NBT (**165**) verursachten das unspezifische Anfärben.

Die Spezifität der Rezeptorbindung könnte mit dem in Kap. 6.2 beschriebenen Verdrängungsexperiment überprüft werden (vgl. Tabelle 6.3). Dieses Experiment wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Der zum *on-bead*-Rezeptortest verwendete polyklonale Biotinantikörper schien die potentiell größte Fehlerquelle zu sein. Da polyklonale Antikörper als Gemisch verschiedener Antikörper vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß eine der zahlreichen Antikörperspezies eine oder mehrere Verbindungen in einer großen Substanzbibliothek erkennt. Um diese Gefahr zu minimieren, wurde die weiteren *on-bead*-Rezeptortests mit monoklonalem Biotinantikörper-Phosphatase-Konjugat durchgeführt.

Ein äußerst überraschendes Ergebnis lieferte die Behandlung der aza-RGD-Mimetikabibliotheken mit dem Oxidationsmittel NBT (**165**) (ohne Rezeptor oder Antibiotin). Nach Inkubation der Bibliotheken mit NBT (**165**) unter typischen Anfärbebedingungen zeigten die Harzpartikel eine ähnliche Farbverteilung wie sie nach dem *on-bead*-Rezeptortest gefunden wurde. Unter gleichen Bedingungen wurden die *beads* mit dem Alkylphosphatase-Substrat BCIP (**162**) nicht angefärbt. Demzufolge resultierte zumindest ein Teil der falsch positive *beads* aus der Reaktion von NBT (**165**) mit den entsprechenden harzgebundenen aza-RGD-Mimetika. Dieser Befund stand im Einklang mit den selektierten Nitrosoverbindungen **167** und **168**. Offensichtlich wurden hier die harzgebundenen Amine von NBT (**165**) oxidiert, während dieses zum dunkelvioletten **166** reduziert wurde und so das falsch positive Signal auslöste (vgl. dazu Abbildung 6.2 in Kap. 6.2). Des weiteren wurde die

beobachtete Guanylabspaltung in Bibliothek **Y** vermutlich ebenfalls von NBT (**165**) verursacht.

Erneut durchgeführte *on-bead*-Rezeptortests mit den harzgebundenen $\alpha\text{v}\beta 3$ -Liganden **141a** und **140** (siehe Kap. 6.2) enthüllten jedoch, daß das Oxidationsmittel NBT (**165**) für die Farbreaktion nicht essentiell war. Denn zur Oxidation des BCIP-Hydrolyseprodukts **163** zum hellblauen Indigoderivat **164** genügte bereits der gelöste Luftsauerstoff (vgl. dazu Abbildung 6.2 in Kap. 6.2).

Gemäß dieser Modifikation wurden jeweils etwa 180 *beads* (zehnfache Redundanz) der Bibliotheken **X1-10** sowie jeweils etwa 900 *beads* (fünffache Redundanz) der Bibliotheken **Y** und **Z** erneut mit dem $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor evaluiert. Zur Kontrolle wurden alle Bibliotheken zusätzlich nach dem gleichen *screening*-Protokoll – aber ohne $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor getestet. Unter diesen Bedingungen wurde keine Anfärbung beobachtet.

In den Amino-Bibliotheken **X1-10** wurden keine positiven Harzpartikel gefunden. Abbildung 6.7 zeigt die *beads* der Bibliotheken **Y** und **Z** nach dem *on-bead screening* mit dem $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor. Erfreulicherweise konnte durch Ausschluß des Oxidationsmittels NBT beim Entwickeln der inkubierten *beads* das Signal/Rausch-Verhältnis enorm verbessert werden. In der guanylierten Bibliothek **Y** waren vier intensiv und etwa zehn schwach angefärbte *beads* zu erkennen. Die pyrimidylierte Bibliothek **Z** enthielt lediglich zwei schwach angefärbte Harzpartikel.

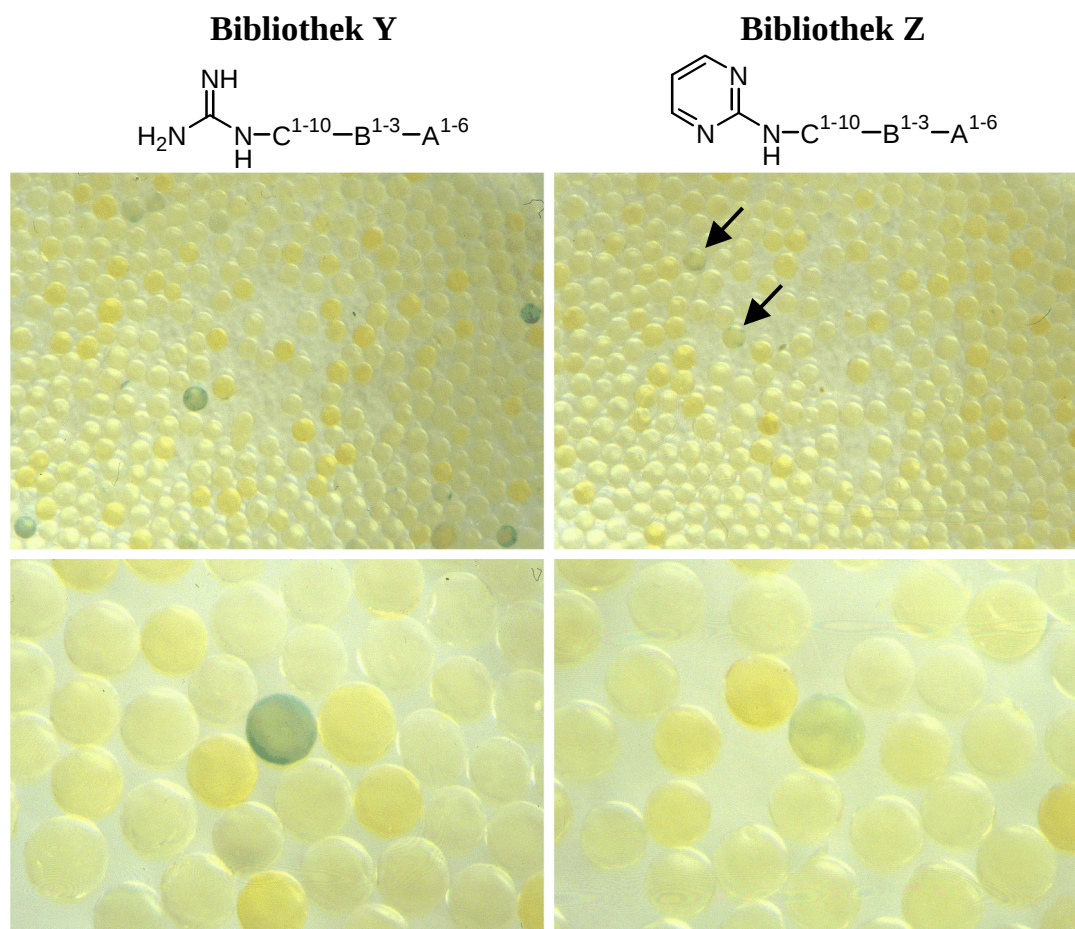
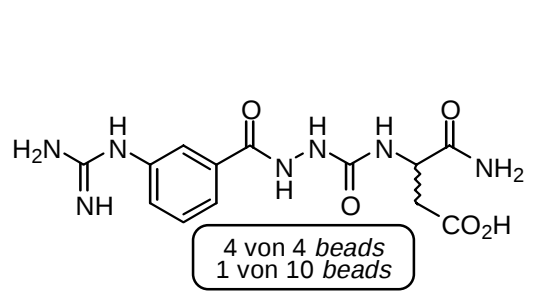


Abbildung 6.7: Bibliotheken **Y** und **Z** nach dem on-bead-Rezeptortest mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin. Abweichend von den in Kap. 6.2 ausgearbeiteten Bedingungen wurden die beads nicht mit BCIP/NBT, sondern nur mit BCIP entwickelt.

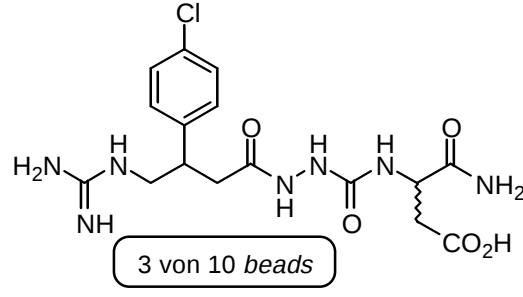
Aus der guanylierten Bibliothek **Y** wurden die vier intensiv gefärbten Harzpartikel sowie zehn schwach gefärbte *beads*, aus der pyrimidylierten Bibliothek **Z** die zwei schwach gefärbten *beads* selektiert. Mit Hilfe von LC-MS und MSⁿ konnten alle auf den aussortierten positiven *beads* gebundenen RGD-Mimetika eindeutig charakterisiert werden (siehe Anhang, Tabelle 11.2.a-e). In Abbildung 6.8 sind die ermittelten Strukturen der entsprechenden RGD-Mimetika dargestellt. Die vier intensiv gefärbten *beads* in Bibliothek **Y** trugen ausnahmslos die aromatische Verbindung **141**. Von den zehn schwach gefärbten Harzpartikeln aus der selben Bibliothek wurde noch einmal Verbindung **141**, dreimal **187**, fünfmal **186** sowie einmal Verbindung **139** gefunden. Auf den zwei aus Bibliothek **Z** selektierten *beads* wurde jeweils die zum aza-RGD-Mimetikum **141** analoge Verbindung **188** nachgewiesen. Alle ermittelten Verbindungen wiesen die Bausteinkombination azaGly-Asp (B¹-A¹) auf. Auf 15 der 16

aussortierten *beads* wurden RGD-Mimetika gefunden, deren Bausteine C zwischen Amin und Carbonylgruppe drei Kohlenstoffatome aufwiesen. Der Abstand der nur einmal selektierten Verbindung **139** betrug vier Kohlenstoffatome.



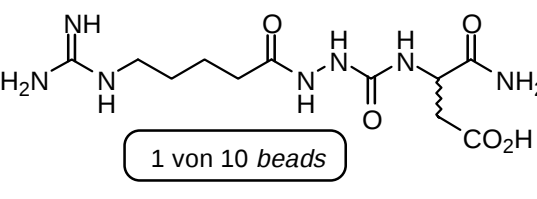
4 von 4 beads
1 von 10 beads

	L-Asp 141a (65%)	D-Asp 141b (45%)
IC ₅₀ (αvβ3)	0.15 μM	7.2 μM
IC ₅₀ (αvβ5)	8.3 μM	>100 μM
IC ₅₀ (αIIbβ3)	>100 μM	>100 μM



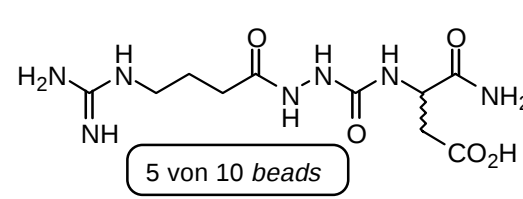
3 von 10 beads

	L-Asp 187a (53%)	D-Asp 187b (61%)
IC ₅₀ (αvβ3)	5.0 μM	41 μM
IC ₅₀ (αvβ5)	>100 μM	>100 μM
IC ₅₀ (αIIbβ3)	>100 μM	>100 μM



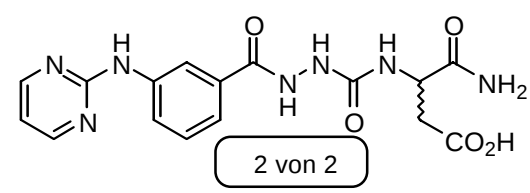
1 von 10 beads

	L-Asp 139
IC ₅₀ (αvβ3)	6.8 μM
IC ₅₀ (αvβ5)	>100 μM
IC ₅₀ (αIIbβ3)	>100 μM



5 von 10 beads

	L-Asp 186a (75%)	D-Asp 186b (59%)
IC ₅₀ (αvβ3)	3.1 μM	50 μM
IC ₅₀ (αvβ5)	57 μM	>100 μM
IC ₅₀ (αIIbβ3)	>100 μM	>100 μM



2 von 2

	L-Asp 188a (62%)	D-Asp 188b (69%)
IC ₅₀ (αvβ3)	15 μM	53 μM
IC ₅₀ (αvβ5)	>100 μM	>100 μM
IC ₅₀ (αIIbβ3)	>100 μM	>100 μM

Abbildung 6.8: Ergebnis der LC-MS- und MSⁿ-Analyse der positiven *beads* in den Bibliotheken **Y** und **Z**. Zudem sind die Ergebnisse der Nachsynthesen der entsprechenden RGD-Mimetika sowie deren IC₅₀-Werte an den Rezeptoren αvβ3, αvβ5 und αIIbβ3 aufgeführt (die αv-Integrine wurden gentechnisch hergestellt).

Um die IC_{50} -Werte zu bestimmen, wurden die selektierten RGD-Mimetika mit Ausnahme der schon isoliert dargestellten Verbindung **139** jeweils als L-Enantiomer (**141a**, **186a**, **187a** und **188a**) bzw. D-Enantiomer (**141b**, **186b**, **187b** und **188b**) an Rink-Amid MBHA-Harz nachsynthetisiert. Die Ausbeuten bezogen auf die Harzbelegung variierten hierbei nach Reinigung mit Hilfe präparativer HPLC von 45% bis 75%.

Die Bestimmung der Inhibierungskonstanten am isolierten $\alpha v\beta 3$ -Integrinrezeptor zeigte, daß sowohl die L- als auch die D-Enantiomere der selektierten Verbindungen eine meßbare Affinität zum $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor aufwiesen. Die aza-RGD-Mimetika mit L-Asparaginsäure erwiesen sich jedoch als 3.5- bis 48-fach aktiver am $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor als die analogen Verbindungen mit D-Asparaginsäure. Demgemäß erfolgte beim *on-bead screening* die Rezeptorerkennung der racemisch vorliegenden RGD-Mimetika **139**, **141** und **186-188** hauptsächlich über die L-Enantiomere.

Mit einem IC_{50} -Wert von 150 nM zeigte Verbindung **141a**, die auf den vier intensiv gefärbten Harzpartikeln in Bibliothek **Y** gefunden wurde, im Vergleich zu den übrigen selektierten aza-RGD-Mimetika die höchste Affinität zum $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor. Demnach korrelierte die Farbintensität der positiven *beads* deutlich mit der Affinität der harzgebundenen RGD-Mimetika zum Rezeptor. (In Kap. 6.1 wurde für **141a** ein IC_{50} -Wert von 17 nM am $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor ermittelt. Die Verwendung von rekombinantem anstelle von humanem Rezeptor könnte diese Abweichung erklären.) Auf einem der zehn weniger intensiv gefärbten *beads* aus Bibliothek **Y** wurde nochmals Verbindung **141** gefunden. Die restlichen neun Harzpartikel trugen die RGD-Mimetika **139**, **186** und **187**, deren L-Enantiomere **139a**, **186a** und **187a** im Vergleich zu **141a** etwa 20- bis 45-fach geringere Aktivität am $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor aufwiesen.

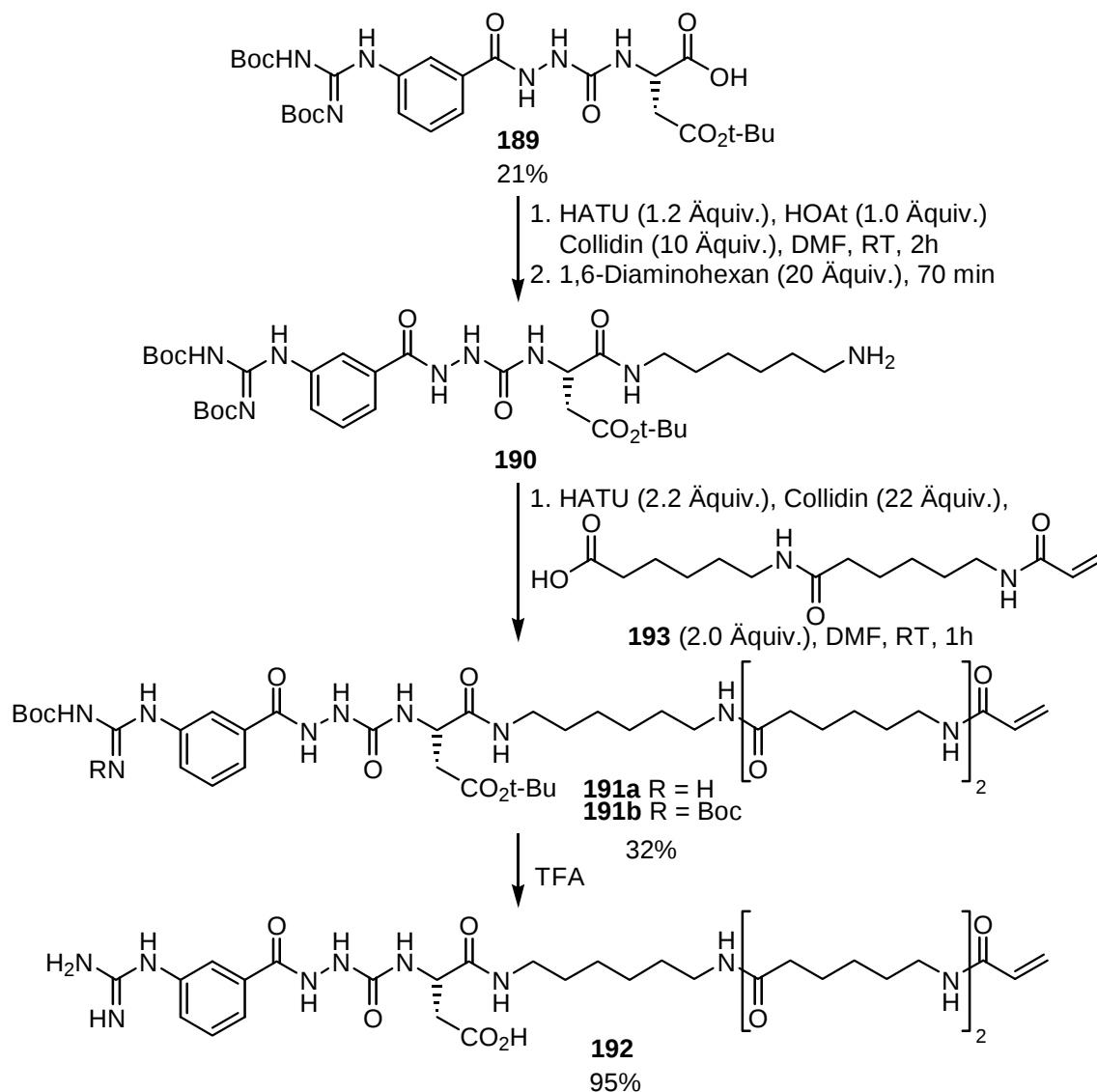
Wie aufgrund der schwachen Anfärbung zu erwarten war, zeigte Verbindung **188a**, die auf beiden selektierten *beads* der pyrimidylierten Bibliothek **Z** gefunden wurde, mit einem IC_{50} -Wert von 15 μ M ebenfalls nur geringe Aktivität bei der Inhibierung der Bindung von Vitronectin an das $\alpha v\beta 3$ -Integrin. Die pyrimidylierte Verbindung **188a** wies also im Vergleich zur analogen guanylierten Verbindung **141a** eine etwa 100-fach geringere Aktivität am $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor auf. Demzufolge scheint 2-Aminopyrimidin für den $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor kein geeignetes Guanidinmimetikum zu sein.

Alle selektierten aza-RGD-Mimetika banden an den $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptor mit IC_{50} -Werten $>100\ \mu\text{M}$, zeigten also keine Aktivität innerhalb des Erfassungsbereichs des Testsystems. Zum $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Rezeptor wiesen lediglich die Verbindungen **141a** und **186a** eine schwache Affinität auf, die jedoch in beiden Fällen im Vergleich zum $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor weniger ausgeprägt war. Somit zeigten alle selektierten aza-RGD-Mimetika eine klare Präferenz für den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor.

Mit Hilfe der *on-bead*-Evaluation konnte also keine Verbindung gefunden werden, die eine höhere Aktivität am $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor aufwies als das bereits bekannte aza-RGD-Mimetikum **141a**. Dennoch konnte demonstriert werden, daß der entwickelte *on-bead*-Rezeptortest gut geeignet ist, um nichtpeptidische niedermolekulare RGD-Mimetikabibliotheken zuverlässig und effizient zu evaluieren.

7 Aza-RGD-Mimetika in biokompatiblen Materialien

Wie in Kap. 6.2 gezeigt, wurde mit dem „C-Terminus“ der aza-RGD-Mimetika eine geeignete Stelle zur Verknüpfung an den festen Träger gefunden, welche die Erkennung der Rezeptoren $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ nicht behinderte. Daher war es naheliegend, über diese Verknüpfungsstelle das gängige Implantatmaterial Polymethylmethacrylat (PMMA) mit einem zu Verbindung **141a** (siehe Kap. 6.1) analogen aza-RGD-Mimetikum zu beschichten, um das Polymer auf diese Weise im natürlichen Knochengewebe zu integrieren (biologischer Hintergrund siehe Kap. 2.4).



Schema 7.1: Synthese des Acrylatanker-verknüpften RGD-Mimetikums **192**

Schema 7.2 zeigt die Synthese des Acrylatanker-verknüpften RGD-Mimetikums **192**. Zuerst wurde das seitenkettengeschützte RGD-Mimetikum **189** an TCP-Polystyrolharz gemäß der in Kap. 4 beschriebenen Reaktionsbedingungen mit einer noch zu verbessernden Ausbeute von 21% aufgebaut. Die Carbonsäure **189** wurde mit Hilfe von HATU in Gegenwart von HOAt und Collidin voraktiviert und mit einem 20-fachen Überschuß an 1,6-Diaminohexan umgesetzt. Das Produkt **190** wurde durch Extraktion mit Wasser von überschüssigem 1,6-Diaminohexan befreit und mit Hilfe von HATU/Collidin an den von M. Kantlehner synthetisierten Acrylatanker **193** gekuppelt. Nach präparativer HPLC-Reinigung erhielt man die Bis-Boc-geschützte Verbindung **191b** zusammen mit der Mono-Boc-geschützten Verbindung **191a** als 1:2-Gemisch in 32% Ausbeute. Entschützung mit TFA ergab schließlich das Acrylatanker-verknüpfte RGD-Mimetikum **192** in 95% Ausbeute.

Die Untersuchungen zur Adhäsion von Osteoblasten an beschichteten Oberflächen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Merck Biomaterial GmbH, Darmstadt, im Labor von Dr. J. Meyer durchgeführt. Die PMMA-Oberflächen wurden dazu durch Lösen von **192** in DMSO, sukzessive Verdünnung mit Isopropylalkohol und Campherchinon-vermittelte radikalische Polymerisation beschichtet. Zur Quantifizierung der Osteoblastenadhäsion an die beschichteten Oberflächen wurden diese mit einer Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die prozentuale Zelladhäsionsrate (Verhältnis der Zahl der adhärenierten Zellen zur Gesamtzahl der Zellen $\times$ 100) bestimmt.

Abbildung 7.1 veranschaulicht das Ergebnis dieser Untersuchungen. Wie erwartet, stieg die prozentuale Zelladhäsionsrate mit zunehmender Ligandendichte an der Oberfläche an. Um eine prozentuale Zelladhäsionsrate von etwa 70% zu erreichen, mußte zur Oberflächenbeschichtung die Konzentration des Acrylatanker-verknüpften RGD-Mimetikums **192** mindestens 1 mM betragen. Die gleiche prozentuale Zelladhäsionsrate wurde vom cyclischen Peptid c(RGDfK), welches über das Lysin ebenfalls mit dem Acrylatanker **193** verknüpft ist, bereits mit einer Konzentration der Belegungslösung von etwa 1 μ M erreicht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der höheren Aktivität von c(RGDfK) am α v β 3- sowie am α v β 5-Rezeptor. Möglicherweise könnten die adhäsiven Eigenschaften der aza-RGD-Mimetika durch Optimierung des Ankerbausteins noch verbessert werden.

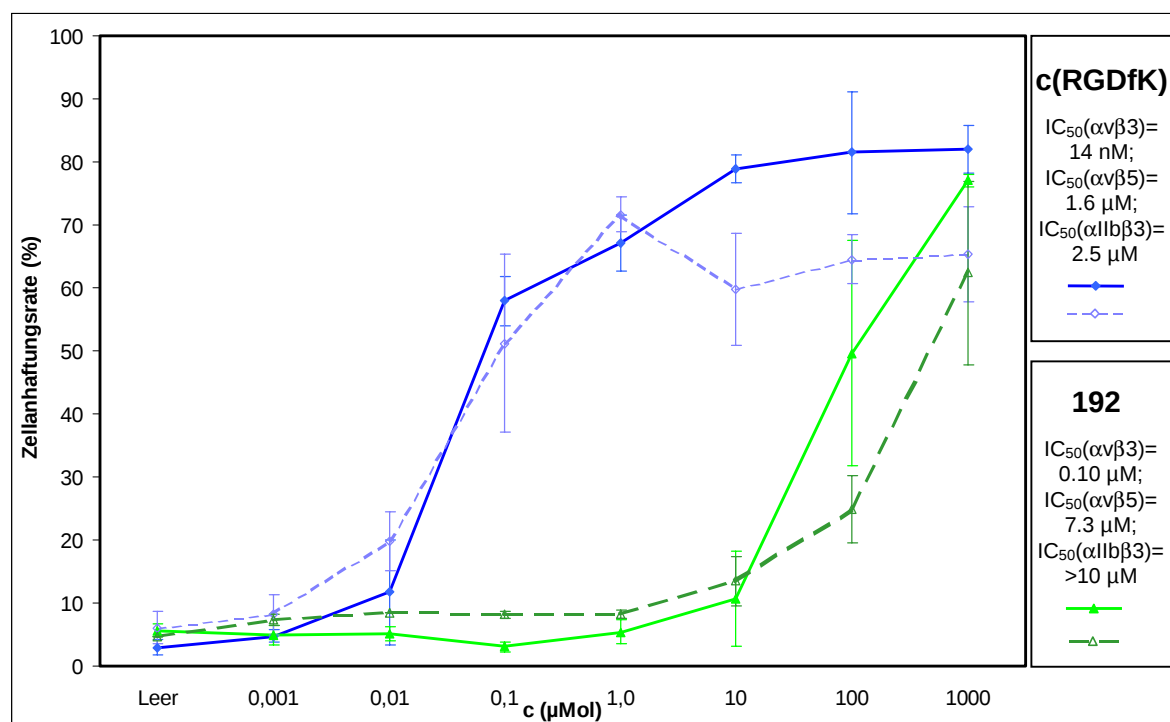


Abbildung 7.1: Zellanhaftungsrate von MC3T3E1-Maus-Osteoblasten in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration in der Beschichtungslösung. Getestet wurde jeweils zweimal c(RGDfK)-Acrylatanker^[110] und 192.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint die Entwicklung bioaktiver Implantate basierend auf aza-RGD-Mimetika möglich zu sein. Die gefundene Selektivität einiger aza-RGD-Mimetika für den $\alpha v \beta 3$ - und den $\alpha v \beta 5$ -Rezeptor gegenüber dem Blutplättchenrezeptor $\alpha II b \beta 3$ (siehe Kap. 6.4) könnte helfen, selektiv die zur Geweberegeneration beitragenden Zellen zu aktivieren und die unerwünschte Anheftung der Blutplättchen an die Implantatoberflächen zu verhindern. Im Hinblick auf die im Vergleich zu cyclischen Peptiden bessere synthetische Zugänglichkeit, sind aza-RGD-Mimetika eine interessante Alternative und könnten somit einen Beitrag zur Einsatzfähigkeit dieser Beschichtungstechnik leisten.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der kombinatorischen Festphasensynthese niedermolekularer RGD-Mimetika. Dies sind von der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) abgeleitete Verbindungen mit dem Potential, verschiedene Integrinrezeptoren zu inhibieren, die in diverse pathophysiologische Prozesse involviert sind. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor, welcher an adhäsiven Vorgängen während der Migration und Extravasation von Tumorzellen beteiligt ist und eine entscheidende Rolle bei der tumorinduzierten Angiogenese spielt.

Durch retrokombinatorische Analyse wurde die RGD-Sequenz in RGD-Mimetika transformiert, die modular aus den vier Bausteinen A-D an der Festphase aufgebaut werden konnten (siehe Abbildung 8.1). Die orthogonale Verknüpfung der RGD-Mimetika an die Festphase über einen Photolinker ermöglicht die Vorgehensweise nach dem *one-bead one-compound*-Konzept.

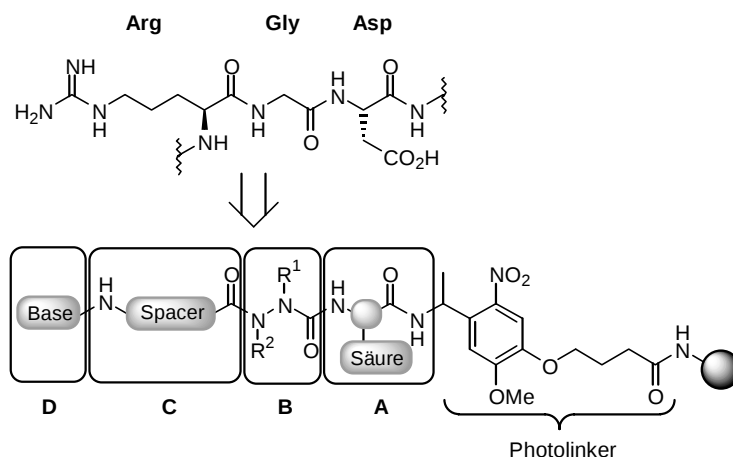


Abbildung 8.1: Transformation der RGD-Sequenz in RGD-Mimetika, die modular am festen Träger aufgebaut und biologisch evaluiert wurden.

Zur Festphasensynthese der RGD-Mimetika wurden sowohl kommerziell verfügbare Bausteine als auch die über einen kurzen Syntheseweg zugänglichen Bausteine A **43**, **47** und **52a/52b** sowie die Bausteine C **64-72** verwendet. Basierend auf der Fmoc-Strategie sollten die Bausteine A-D schrittweise am festen Träger miteinander verknüpft werden. Anhand von Modellreaktionen und der Synthese einer Auswahl von RGD-Mimetika wurden die einzelnen Verknüpfungsreaktionen hinsichtlich ihrer Eignung zur kombinatorischen Synthese überprüft. Die Bausteine A

und C konnten dabei ohne Probleme unter Standardbedingungen mit HATU/Collidin eingeführt werden.

Die literaturbekannten Methoden zur Inkorporation der Azabausteine B wurden jedoch den hohen Ansprüchen der kombinatorischen Festphasensynthese nicht gerecht. Daher mußte eine neue Strategie zur Einführung der Azabausteine B ausgearbeitet werden. Mit Hilfe einer Lösung von Phosgen in Toluol konnten aus den korrespondierenden Fmoc-Hydrazinen das als Oxadiazolon aktivierte Azaglycin **101** sowie die als Carbazinsäurechloride aktivierten Bausteine Azasarcosin **102** und Azaalanin **103** in hohen Ausbeuten dargestellt werden. In einer systematischen Untersuchung wurden milde, hocheffiziente und reproduzierbare Reaktionsbedingungen zur Einführung dieser Bausteine entwickelt.^[271]

Die Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika sollte mit Einführung der basischen Bausteine D Guanidin oder Pyrimidin abgeschlossen werden. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen gelang es, mit dem literaturbekannten Reagenz Bis-Boc-guanylpiprazol (**81**) harzgebundene aliphatische Amine sowie Aniline vollständig zu guanylieren. Mit Hilfe des Reagenzes 2-Fluorpyrimidin (**82**) konnte die konventionelle Pyrimidylierung von Aminen in Lösung, die unter äußerst drastischen Bedingungen verläuft, unter wesentlich milderer Bedingungen auf die Festphase übertragen werden.^[272]

Zuerst wurden 18 aza-RGD-Mimetika gemäß der optimierten Reaktionsbedingungen isoliert dargestellt. Danach wurden nach der Split-Methode zehn Bibliotheken ohne Baustein D (mit freiem Amin) mit je 33 Verbindungen (**X1-10**) und zwei je 330 Verbindungen umfassende Bibliotheken mit Guanyl- (**Y**) bzw. Pyrimidylrest (**Z**) synthetisiert. Mittels systematischer MSⁿ-Analyse der isoliert dargestellten RGD-Mimetika konnten Regeln abgeleitet werden, mit deren Hilfe die Struktur einer aus den Bibliotheken selektierten Verbindung zuverlässig anhand ihres CID-Fragmentationen-Musters bestimmt werden konnte.

Die biologischen Aktivitäten der in Einzelsynthesen dargestellten aza-RGD-Mimetika wurden bei der Firma E. Merck, Darmstadt, am isolierten α IIb β 3-, α v β 3- sowie α v β 5-Rezeptor untersucht. Die RGD-Mimetika D¹-C²-B^X-A¹ (**139**, **145**, **151**) und D¹-C⁶-B^X-A¹ (**140**, **146**, **152**), die sich nur hinsichtlich ihres Bausteins B unterschieden, zeigten abhängig vom Substitutionsmuster des Azabausteins im

mikromolaren Bereich stark variierende Aktivitäten und Selektivitäten. Damit konnte gezeigt werden, daß der Azabaustein B als diversitätsinduzierendes Strukturtemplat verwendet werden kann. Mit dem aza-RGD-Mimetikum **141a** wurde ein gegenüber dem $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Rezeptor hoch selektiver $\alpha v\beta 3$ -Inhibitor mit Aktivität im nanomolaren Bereich gefunden. Mit Hilfe dieser Verbindung gelang es, einen zuverlässigen *on-bead*-Rezeptortest zu etablieren. Das *on-bead screening* der Bibliotheken und anschließende massenspektrometrische Identifikation der selektierten aza-RGD-Mimetika lieferte neben schon bekannten Verbindungen neue RGD-Mimetika, die schwache aber selektive Affinität zum $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor zeigten.

Zur kovalenten Beschichtung des gängigen Implantatmaterials Polymethylmethacrylat (PMMA) wurde das biologisch aktive Acrylatanker-verknüpfte RGD-Mimetikum **192** synthetisiert. Im Rahmen eines Modellsystems konnte die Stimulierung von Osteoblasten erreicht werden. Dies stellt den Ausgangspunkt für eine Verbesserung der Biokompatibilität von Knochenimplantaten dar.

Die vorliegende Arbeit beschreibt somit neuartige Methoden zur kombinatorischen Festphasensynthese niedermolekularer Verbindungen nach der Fmoc-Strategie sowie deren biologische *on-bead*-Evaluation und die massenspektrometrische Identifikation der selektierten Substanzen mittels MSⁿ. Am Beispiel der Entwicklung selektiver $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten konnte die Tragfähigkeit dieses Gesamtkonzepts zur Wirkstoffentwicklung belegt werden.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Leitstrukturen könnten neue hochaffine und selektive Integrininhibitoren abgeleitet werden. Zudem ist es naheliegend, das ausgearbeitete Konzept auf weitere Substanzklassen zu erweitern, um so den Umfang sowie die Diversität der resultierenden Bibliotheken zu steigern. Insbesondere die Einführung möglichst unpolarer Basenbausteine D bleibt hinsichtlich der Entwicklung von Wirkstoffen mit optimalem pharmakokinetischem Profil ein wichtiges Ziel. Des weiteren könnte der etablierte *on-bead*-Rezeptortest auf weitere Integrinrezeptoren übertragen werden.

9 Experimente

9.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden destilliert und gegebenenfalls absolutiert. Dichlormethan, Toluol, Ether, Acetonitril und Dimethylformamid wurden mit Natriumhydrid, Natrium bzw. Calciumhydrid unter Rückfluß gekocht, abdestilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt. Tetrahydrofuran wurde durch Rückflußkochen mit Natrium in Gegenwart von Benzophenon getrocknet, Methanol mit Magnesium unter Rückfluß gekocht und abdestilliert. Chloroform wurde lichtgeschützt über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.

Die **Reagenzien** wurden von den Firmen Alexis, Aldrich, Bachem, Fluka, Lancaster, Neosystem, Novabiochem oder Sigma bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Tritylchlorid-Polystyrol-**Harz** (TCP-Harz) stammte von der Firma PepChem, das TentaGel von der Firma RAPP Polymere und das Rink-Amid MBHA-Harz von der Firma Novabiochem. Der Fmoc-Aminoethyl-Photolinker wurde nach Holmes *et al.*^[223] selbst hergestellt. Abweichend von der Originalvorschrift wurde die Hydrierung des Hydroxylamins im Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 50-70 bar durchgeführt.

Sämtliche **Reaktionen unter Beteiligung hydrolyse- oder luftempfindlicher Substanzen** wurden in ausgeheizten Glasgeräten in einer Argonatmosphäre (99.996 %) durchgeführt. Lösungen wurden zu diesen Ansätzen über Gummisepten mit zuvor von Feuchtigkeit befreiten Transfernadeln, Kunststoff- oder Glasspritzen zugegeben.

Dünnschichtchromatographische Kontrolle (DC-Kontrolle) und R_f -Wert-Bestimmung erfolgte auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄). Die Detektion erfolgte anhand UV-Absorption bei 254 nm sowie durch Eintauchen in 5%ige methanolische Schwefelsäure, 3%ige ethanolische Ninhydrinlösung oder 5%ige ethanolische Molybdätophosphorsäurelösung und anschließender Wärmebehandlung.

Säulenchromatographische Trennungen^[273] wurden an Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, Merck) bei 0.6-1.2 bar Überdruck durchgeführt. Die Bedingungen der Chromatographie werden in der Form „(Ethylester:Hexan **K:L**, ab Fr. **M N:O**, ...)“ angegeben, d. h. es wurde mit einem Gemisch von **K** Teilen Ethylester und **L** Teilen Hexan eluiert. Ab Fraktion **M** erhöhte man die Polarität auf **N:O** Anteile usw. Die Volumina der aufgefangenen Fraktionen betrugen 30-50 mL.

(RP)-HPLC-Analytik und semipräparative Trennungen wurden an Geräten der Firmen Waters (Hochdruck-Pumpen 510, Multiwellenlängendetektor 490E und Chromatographie-Arbeitsstation Maxima 820), Beckman (Hochdruck-Pumpen 110B, Gradientenmischer, Controller 420) mit UV-Detektor (Uvicord) von Knauer und Amersham Pharmacia Biotech (Äkta Basic 10/100, Autosampler A-900) präparative Trennungen an einem System von Beckman (System Gold, Hochdruckpumpenmodul 126, UV-Detektor 166) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte in der Regel bei der Wellenlänge 220 nm. Folgende Säulenmaterialien wurden für die Analytik (Ø 4 mm und 4.6 mm) und die semipräparativen bzw. präparativen Trennungen (Ø 21 mm bzw. Ø 40 mm) benutzt: Nucleosil RP18 5µ, Nucleosil RP18 HD 5µ und Nucleosil RP18 7µ von Macherey & Nagel, Ultrasphere ODS 5µ von Beckman sowie ODS-A 5µ von YMC. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Acetonitril und Wasser mit jeweils 0.1 Vol-% TFA im Gradientenbetrieb.

EI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ MAT 8200 durchgeführt. Die ESI-Massenspektren sowie die LC-MS-Untersuchungen wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System Hewlett Packard HP 1100 (Säulenmaterial Nucleosil 100 5C₁₈) durchgeführt. Die ESI-Spektren werden in der Form „**X** (**Y**) [**M** + **Z**⁺]“ angegeben, d. h. es wurde die Molekülmasse **X** mit der Intensität **Y**% detektiert, die dem Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit Kation **Z**⁺ entspricht.

Die **Schmelzpunkte** wurden an einer Apparatur nach Dr. Tottoli, Büchi 510, gemessen und sind nicht korrigiert.

IR-Messungen wurden an einem Gerät der Firma Perkin-Elmer durchgeführt.

Elementaranalysen wurden am Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München an einem C, H, N-Analyseautomaten EA 415/0 der Firma Heraeus durchgeführt.

Folgende **NMR-Spektrometer und Techniken** wurden verwendet: Bruker AC 250, AMX 500 und DMX 500. Das Prozessieren der NMR-Daten erfolgte an Bruker Aspect 1000- (AC 250), X32- bzw. Silicon Graphics Indy-, O2- und Octane-Arbeitsstationen bzw. auf Origin-Servern. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der Bruker Bibliothek oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Interner Standard für chemische Verschiebungen von ^1H und ^{13}C war das Lösungsmittelsignal von DMSO- d_5 : 2.49 ppm (^1H -NMR) und 39.5 ppm (^{13}C -NMR); CHCl_3 : 7.24 ppm (^1H -NMR) und 77.0 ppm (^{13}C -NMR) sowie HDO: 4.77 ppm (^1H -NMR). ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit ^1H -Breitbandentkopplung aufgenommen. Die Signal- und Konfigurationzuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe von HMQC-COSY-, HMBC- und NOESY-Experimenten.^[274]

9.2 Synthese der Bausteine

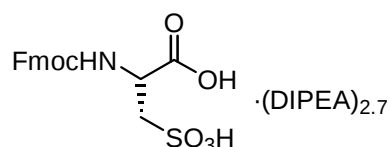
AAV 1 (Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren modifiziert nach Chang *et al.*^[237]):

Die Aminosäure (17.0 mmol) wird in einer 10%igen wässrigen Na_2CO_3 -Lösung (30 mL) gelöst und mit Dioxan (17 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und anschließend wird unter starkem Rühren eine Lösung von FmocCl (4.89 g, 18.9 mmol, 1.1 Äquiv.) in Dioxan (25 mL) innerhalb 15 min zugetropft. Nach 15 min wird das Kühlbad entfernt und 5-15 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch in Wasser (500 mL) gegossen und mit Et_2O (3×120 mL) extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mit konz. HCl auf 1-2 eingestellt. Fällt die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren als Feststoff aus, wird diese durch Filtration abgetrennt und mit Wasser (2×50 mL) gewaschen. *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die sich nach Ansäuern als Öl abscheiden, werden mit Ethylacetat (2×100 mL)

extrahiert, die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren oder Säulenchromatographie.

AAV 2 (Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren modifiziert nach Bolin *et al.*^[238]):

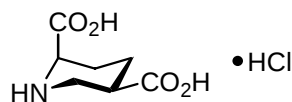
Die Aminosäure (22 mmol) wird unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit in absolutiertem CH_2Cl_2 (50 mL) suspendiert und mit TMSCl (5.5 mL, 4.7 g, 44 mmol, 2.0 Äquiv.) versetzt. Anschließend tropft man innerhalb von 15 min bei 0 °C wasserfreies DIPEA (15 mL, 11 g, 88 mmol, 4.0 Äquiv.) zu. Das Reaktionsgemisch wird weitere 10 min bei 0 °C und 40 min bei Raumtemperatur gerührt. (In der Regel entsteht nach DIPEA-Zugabe eine homogene Reaktionslösung). Danach wird das Reaktionsgemisch erneut auf 0 °C gekühlt und in einer Portion mit festem FmocCl (5.69 g, 22.0 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt. Dazu wird während der FmocCl-Zugabe das Gummiseptum vom Reaktionsgefäß abgenommen. Man läßt die Reaktion auf Raumtemperatur kommen und kontrolliert den Reaktionsverlauf per DC oder HPLC. Nach vollständigem Umsatz wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in Et_2O (120 mL) aufgenommen und mit 5%iger wäßriger Na_2CO_3 -Lösung (2×100 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen (bei manchen Aminosäuren heterogene Suspension) werden nochmals mit Et_2O (1×150 mL) extrahiert und mit 2N HCl (50 mL) auf pH = 0 angesäuert. Fällt die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren als Feststoff aus, wird diese durch Filtration abgetrennt und mit Wasser (2×50 mL) gewaschen. *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die sich nach Ansäuern als Öl abscheiden, werden in Ethylacetat (2×100 mL) aufgenommen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren oder Säulenchromatographie.



Fmoc-Cysa-OH· (DIPEA)_{2.7} (43):

L-Cysteinsäure Monohydrat (2.50 g, 13.4 mmol) wurde in Wasser (30 mL) gelöst, im Eisbad gekühlt und mit DIPEA (7.0 mL, 5.3 g, 41 mmol, 3.1 Äquiv.) versetzt. Zur Reaktionslösung wurde unter heftigem Rühren innerhalb 1 h eine Lösung von FmocCl (4.15 g, 16.0 mmol, 1.2 Äquiv.) in Dioxan (16 mL) getropft. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und nochmals DIPEA (2.0 mL, 1.5 g, 11 mmol, 0.8 Äquiv.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 130 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Hexan (2 × 20 mL) und Et₂O (1 × 20 mL) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit Et₂O (30 mL) überschichtet, über Nacht leicht gerührt, von der organischen Phase abgetrennt und im Vakuum eingengt. Lyophilisieren aus wasserfreiem Dioxan ergab Fmoc-Cysa-OH· (DIPEA)_{2.7} (43) (9.92 g, quant.) als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO, enthält 2.7 Äquiv. DIPEA): δ = 7.88 (d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.68 (br. d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.48-7.27 (m, 5H, arom., NH), 4.28-4.12 (m, 4H, O-CH₂-CH, CH-CO₂H), 3.52 (m_c, 5.4H, 2 × CH(CH₃)₂ von DIPEA), 3.03 (br. q, J = 7.3 Hz, 5.4H CH₂-CH₃ von DIPEA), 2.85 (br. d, J = 5.0 Hz, 2H, CH₂-SO₃H), 1.31-1.16 (m, 40.5H, 5 × CH₃ von DIPEA); HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 13.1 min; ESI-MS: m/z 821.0 (100) [2M+K⁺], 804.9 (80) [2M+Na⁺], 414.2 (20) [M+Na⁺], 391.9 (10) [M+H⁺].

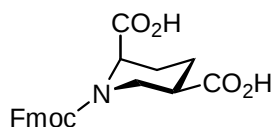


rac-cis-2,5-Piperidindicarbonsäure (H-Cpdc-OH) (50) modifiziert nach Mastafanova *et al.*^[233]:

2,5-Pyridindicarbonsäure (2.7 g, 16 mmol) wurde in 13%iger HCl (100 mL) gelöst und mit PtO₂ (190 mg, 0.837 mmol, 0.05 Äquiv.) versetzt. Anschließend wurde die Suspension 3 d bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck heftig gerührt. Entfernen des Katalysators durch Filtration über Celite, Einengen des

Filtrats im Vakuum und Lyophilisieren aus H₂O (50 mL) ergaben **50** (2.7 g, quant.) als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 4.20 (br. s, 1H, 2-H), 3.22 (br. s, 2H, 6-H₂), 2.85 (m_c, 1H, 5-H), 2.26-1.40 (m, 4H, 3-H₂, 4-H₂).

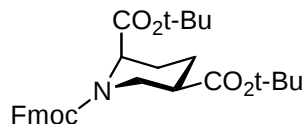


rac-cis-N-Fmoc- 2,5-Piperidindicarbonsäure (Fmoc-Cpdc-OH) (51):

rac-cis-2,5-Piperidindicarbonsäure (**50**) (2.70 g, 15.6 mmol) wurde nach AAV 1 (3.0 Äquiv. Na₂CO₃) umgesetzt. Reinigung per Flashchromatographie (CHCl₃/MeOH/HOAc 20:1:0.2) ergab **51** (4.08 g, 66%) als farblosen Feststoff.

R_f = 0.4 (CHCl₃/MeOH/HOAc 10:1:0.1); Smp.: 180-183 °C; ¹H-NMR (250 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar, Zuordnung abgeleitet von **247**)): δ = 12.73 (br. s, 2H, 2 × CO₂H), 7.88 (d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.68-7.54 (m, 2H, arom.), 7.47-7.24 (m, 4H, arom.), 4.68 (br. d, J = 4.6 Hz, 0.5H, 2-H), 4.63 (br. d, J = 4.8 Hz, 0.5H, 2-H), 4.45-4.18 (m, 3H, CH-CH₂-O), 4.10 (m_c, 1H, 6-H^{eq}), 2.99 und 2.84 (2 × t, J = 12.7 Hz, 1H, 6-H^{ax}), 2.32 (m_c, 1H, 5-H), 2.21-2.07 (m, 1H, 3-H^{eq}), 1.99-1.86 (m, 1H, 4-H^{eq}), 1.62 (m_c, 1H, 3-H^{ax}), 1.34-1.12 (m, 1H, 4-H^{ax}); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO, 350 K (Zuordnung abgeleitet von **247**)): δ = 7.85 (d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.61 (br. d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.41 (t, J = 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.31 (tm, J = 7.4 Hz, 2H, arom), 4.65 (br. s, 1H; 2-H), 4.45-4.20 (m, 3H, CH-CH₂-O), 4.10 (br. d, J = 11.4 Hz, 1H, 6-H^{eq}), 2.96 (br. t, J = 12.6 Hz, 1H, 6-H^{ax}), 2.30 (dddd, J = J' = 12.0, J = J' = 4.1 Hz, 1H, 5-H), 1.93 (dm, J = 13.6 Hz, 1H; 3-H^{eq}), 2.00-1.86 (m, 1H, 4-H^{eq}), 1.63 (dddd, J = J' = 13.6, J = 6.1, J = 3.7 Hz, 1H, 3-H^{ax}), 1.34 (dddd, J = J' = J'' = 13.0, J = 3.3 Hz, 1H, 4-H^{ax}); ¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): δ = 174.1, 172.2, 155.2, 155.0, 143.8, 143.1, 140.7, 127.7, 127.1, 125.0, 120.1, 67.1, 53.4, 53.1, 46.6, 42.6, 42.5, 25.5, 25.3,

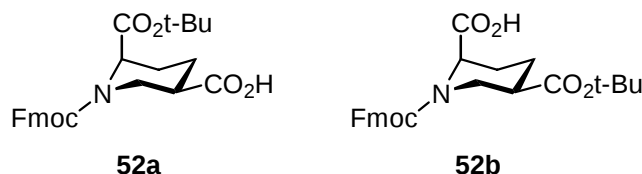
23.7; HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 20.8$ min; ESI-MS: m/z 829.0 (100) [$2M + K^+$], 812.9 (80) [$2M + Na^+$], 418.1 (60) [$M + Na^+$], 395.9 (15) [$M + H^+$].



rac-cis-N-Fmoc-Di(tert-butyl)-piperidin-2,5-dicarboxylat (Fmoc-Cpdc(Bu₂)) (53):

rac-cis-N-Fmoc-2,5-Piperidindicarbonsäure (51) (3.00 g, 7.60 mmol) wurde in wasserfreiem CH_2Cl_2 (40 mL) gelöst und mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroethanimidoat (9.0 mL, 11 g, 50 mmol, 6.6 Äquiv.) versetzt. Nach 4 d Rühren bei Raumtemperatur wurde von einem während der Reaktion entstandenen farblosen Niederschlag abfiltriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 5:1) ergaben **53** (3.365 g, 87%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.7$ (Hexan/Ethylacetat 2:1); 1H -NMR (250 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar, Zuordnung abgeleitet von **247**)): $\delta = 7.88$ (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.67-7.53 (m, 2H, arom.), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.36-7.24 (m, 2H, arom.), 4.59 (br. d, $J = 4.3$ Hz, 0.5H, 2-H), 4.51 (br. d, $J = 4.9$ Hz, 0.5H, 2-H), 4.48-4.19 (m, 3H, CH-CH₂-O), 4.08 (br. d, $J = 12.7$ Hz, 0.5H, 6-H^{eq}), 3.91 (br. d, $J = 12.0$ Hz, 0.5H, 6-H^{eq}), 2.85 (t, $J = 12.6$ Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.78 (t, $J = 12.8$ Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.39-2.14 (m, 1H, 5-H), 2.14-2.01 (m, 1H, 3-H^{eq}), 1.94-1.78 (m, 1H, 4-H^{eq}), 1.68-1.49 (m, 1H, 3-H^{ax}), 1.38 (br. s, 18H, 2 $\times$ C(CH₃)₃), 1.26-1.05 (m, 1H, 4-H^{ax}); ^{13}C -NMR (62.5 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): $\delta = 169.8, 167.9, 153.4, 153.2, 142.0, 141.8, 138.9, 125.9, 125.2, 123.1, 118.3, 79.7, 79.5, 78.4, 65.3, 65.0, 51.9, 51.7, 44.8, 39.1, 25.8, 23.6, 21.6$; HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 36.7$ min; ESI-MS: m/z 530.1 (100) [$M + Na^+$].



62:38-Isomerengemisch aus *rac-cis-N-Fmoc-2-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-5-carbonsäure* (Fmoc-Cpdc(2-Bu)-OH) (52a) und *rac-cis-N-Fmoc-5-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-2-carbonsäure* (Fmoc-Cpdc(5-Bu)-OH) (52b):

rac-cis-N-Fmoc-Di(tert-butyl)-piperidin-2,5-dicarboxylat (**53**) (3.37 g, 6.64 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (150 mL) gelöst und mit TFA (8.0 mL) versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde per HPLC (10-90% in 30 min) kontrolliert. Nach 8 h betrug das Integralverhältnis von **51:52a:52b:53** 15:30:21:34. Nach weiteren 2 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit ges. wässriger NaHCO_3 -Lösung (40 mL) versetzt. Anschließend wurde unter heftigem Rühren durch Zugabe von festem NaHCO_3 der pH-Wert der wässrigen Phase auf 6 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und im Vakuum eingengt. Reinigung per Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat mit 1% HOAc 5:1, ab Fr. 10 2:1, ab Fr. 40 1:1) ergab ein Isomerengemisch von **52a** und **52b** im HPLC-Integralverhältnis von 62:38 (1.61 g, 54%) als farbloses Öl.

Trennung des 62:38-Isomerengemisches von **52a** und **52b** (394 mg) per HPLC (90%, isokratisch) ergab isomerenreines **52a** (209 mg, 53%) als farblosen Feststoff und **52b** (150 mg, 38%, verunreinigt mit 5% **52a**) als farbloses Öl.

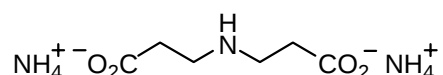
***rac-cis-N-Fmoc-2-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-5-carbonsäure*
(Fmoc-Cpdc(2-Bu)) (52a):**

R_f = 0.45 (Hexan/Ethylacetat 1:1 mit 1% HOAc); Smp. 124 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): δ = 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 7.66-7.54 (m, 2H, arom.), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.35-7.25 (m, 2H, arom.), 4.63 (br. d, J = 5.0 Hz, 0.5H, 2-H), 4.50 (br. d, J = 4.8 Hz, 0.5H, 2-H), 4.42-4.20 (m, 3H, CH-CH₂-O), 4.15-4.02 (m, 1H, 6-H^{eq}), 2.96 (t, J = 12.7 Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.80 (t, J = 12.7 Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.32 (m_c, 1H, 5-H), 2.10 (m_c, 1H, 3-H^{eq}), 1.92 (m_c, 1H, 4-H^{eq}), 1.61 (m_c, 1H, 3-H^{ax}), 1.39 und 1.38 (2 × s, 9H, C(CH₃)₃), 1.27-1.12 (m, 1H, 4-H^{ax}); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): δ = 173.9, 169.7, 155.2 und 155 (Singulett-

Paar)*, 143.7, 140.7, 127.6, 127.0, 124.8, 120.1, 81.4 und 81.3 (Singulett-Paar)*, 67.0, 53.7 und 53.5 (Singulett-Paar)*, 46.6, 42.5 und 42.4 (Singulett-Paar)*, 39.6 und 39.4 (Singulett-Paar)*, 27.5, 25.5, 23.4 und 23.3 (Singulett-Paar)*; HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 29.8$ min; ESI-MS: m/z 941.0 (50) $[2M + K^+]$, 924.9 (15) $[2M + Na^+]$, 474.0 (100) $[M + Na^+]$. *Wie im HMQC-COSY- und HMBC-Spektrum zu erkennen ist, entsprechen die Singulett-Paare einem Kohlenstoffatom und resultieren aus zwei verschiedenen Konformationen.

rac-cis-N-Fmoc-5-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-2-carbonsäure (Fmoc-Cpdc(5-Bu)) (52b):

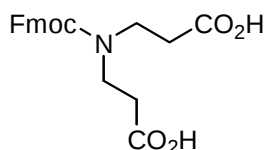
$R_f = 0.50$ (Hexan/Ethylacetat 1:1 mit 1% HOAc); 1H -NMR (500 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): $\delta = 7.87$ (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, arom.), 7.67-7.55 (m, 2H, arom.), 7.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, arom.), 7.35-7.27 (m, 2H, arom.), 4.65 (br. d, $J = 5.2$ Hz, 0.5H, 2-H), 4.61 (br. d, $J = 5.7$ Hz, 0.5H, 2-H), 4.47-4.21 (m, 3H, CH-CH₂-O), 4.09 (br. d, $J = 13.4$ Hz, 0.5H, 6-H^{eq}), 3.92 (br. d, $J = 12.8$ Hz, 0.5H, 6-H^{eq}), 2.87 (t, $J = 12.7$ Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.81 (t, $J = 12.6$ Hz, 0.5H, 6-H^{ax}), 2.30 und 2.21 ($2 \times m_c$, 1H, 5-H), 2.11 (m_c , 1H, 3-H^{eq}), 1.87 (m_c , 1H, 4-H^{eq}), 1.60 (m_c , 1H, 3-H^{ax}), 1.41 und 1.39 ($2 \times s$, 9H, C(CH₃)₃), 1.29-1.13 (m, 1H, 4-H^{ax}); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO, 300 K (zwei Konformationen im Verhältnis von ca. 1:1 sichtbar)): $\delta = 172.1$, 171.6, 155.2, 143.8, 140.8, 127.7, 127.1, 125.0, 80.3, 67.2 und 66.8 (Singulett-Paar)*, 53.4 und 53.0 (Singulett-Paar)*, 46.7 und 46.6 (Singulett-Paar)*, 42.5, 41.0, 27.7, 25.4 und 25.1 (Singulett-Paar)*, 23.6; HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 30.4$ min; ESI-MS: m/z 941.0 (60) $[2M + K^+]$, 696.7 (60) $[3M + H^+ + Na^+]$, 474.0 (100) $[M + Na^+]$. *Wie im HMQC-COSY-Spektrum zu erkennen ist, entsprechen die Singulett-Paare einem Kohlenstoffatom und resultieren aus zwei verschiedenen Konformationen.



3,3'-Iminodipropionsäurediammoniumsalz (H-Idp-OH) (45) nach Ashton et al.^[231]:

3,3'-Iminodipropionitril (10 g, 81 mmol) und Ba(OH)₂ (28 g, 0.16 mol) wurden zu H₂O (125 mL) gegeben und auf 70 °C erwärmt. Nach 16 h ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen und neutralisierte vorsichtig mit konz. H₂SO₄ (15.7 g, 0.160 mmol). Das ausgefallene BaSO₄ wurde durch Filtration abgetrennt und das Filtrat im Vakuum eingengt. Kristallisation des öligen Rückstands in wasserfreiem Methanol ergab **45** (11g, 70%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 3.10 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, N-CH₂), 2.46 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, CO-CH₂).

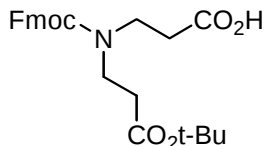


N-Fmoc-3,3'-Iminodipropionsäure (Fmoc-Idp-OH) (46):

3,3'-Iminodipropionsäurediammoniumsalz (**45**) (3.0 g, 15 mmol) und Na₂CO₃ (4.8 g, 45 mmol, 3.0 Äquiv.) wurden in H₂O (50 mL) gelöst. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde erneut in H₂O (30 mL) aufgenommen, gemäß AAV 1 umgesetzt und aufgearbeitet. Fällung des in H₂O gelösten Dicarboxylats durch Ansäuern mit konz. HCl, Filtration, Waschen des Rückstandes mit H₂O und Trocknen im Vakuum ergaben die Verbindung **46** (3.6 g, 63%) als farblosen Feststoff.

Smp. 140 °C; ¹H-NMR (250 MHz, DMSO, zwei Konformationen sichtbar): δ = 12.2 (s, 2H, 2 × CO₂H), 7.85 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.62 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, arom.), 4.54-4.18 (m, 3H, O-CH₂-CH), 3.31 (br. s, 4H, 2 × N-CH₂), 2.20 (br. s, 2H, CO-CH₂), 1.94 (br. s, 2H, CO-CH₂); ¹³C-NMR (DMSO, 125.0 MHz, zwei Konformationen sichtbar): δ = 172.7, 154.9, 143.9, 140.8, 127.6, 127.0, 124.8, 120.1, 66.5, 46.7, 43.7, 43.2, 33.1, 32.7; HPLC (10-90% in 30 min) R_t =

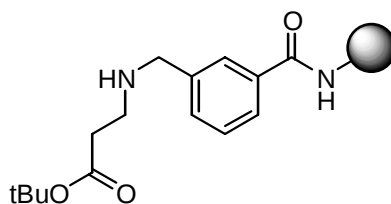
18.6 min; ESI-MS: m/z 805.0 (100) $[2M + K^+]$, 789.9 (60) $[2M + Na^+]$, 422.1 (10) $[M + K^+]$, 406.1 (10) $[M + Na^+]$, 383.9 (10) $[M + H^+]$.



***N*-Fmoc-3,3-Iminodipropionsäuremono-*tert*-butylester (Fmoc-Idp(Bu)-OH) (47):**

Eine Lösung von *N*-Fmoc-3,3-Iminodipropionsäure (**46**) (3.55 g, 9.27 mmol) in wasserfreiem CH_2Cl_2 (40 mL) und DMF (4 mL) wurde mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroethanimidoat (8.0 mL, 9.6 g, 45 mmol, 4.9 Äquiv.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde per Dünnschichtchromatographie verfolgt (**46** R_f = 0.2; **47** R_f = 0.5; Di-*tert*-butylester R_f = 0.9; Hexan/Ethylacetat 1:1 mit 1% HOAc). Nach 24 h betrug das Verhältnis von **46**:**47**:*N*-Fmoc-3,3-Iminodipropionsäuredi-*tert*-butylester ca. 1:2:1 und das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt. Reinigung per Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat mit 1% HOAc 4:1, ab Fr. 15 2:1) ergab die Verbindung **47** (1.99 g, 49%) als gelben Feststoff.

R_f = 0.5 (Hexan/Ethylacetat 1:1 mit 1% HOAc); Smp. 98 °C; 1H -NMR (250 MHz, DMSO): δ = 7.86 (d, J = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.62 (d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.40 (t, J = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 4.48-3.41 (m, 2H, O-CH-CH₂), 4.27 (t, J = 5.8 Hz, 1H, O-CH-CH₂), 3.42-3.08 (m, 4H, 2 × N-CH₂), 2.44-2.02 (m, 4H, 2 × CO-CH₂), 1.37 (br. s, 9H, C(CH₃)₃); ^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 176.2, 170.8, 155.8, 143.9, 141.3, 127.6, 127.0, 124.8, 119.9, 80.8, 67.1, 47.2, 44.3, 43.7, 34.7, 34.4, 33.5, 28.0; HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 26.5 min; ESI-MS: m/z 916.9 (90) $[2M + K^+]$, 900.9 (40) $[2M + Na^+]$, 462.0 (100) $[M + Na^+]$.

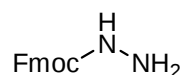


Harzgebundenes *tert*-Butyl-3-[[3-(aminocarbonyl)benzyl]amino]propanoat (*N*- β Pra(Bu)Mamb) (57):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.358 g, 0.26 mmol/g, 93 μ mol) wurde nach AVV 9 entschützt und anschließend mit DMF (6×7 mL, je 3 min), Et₂O (3×7 mL, je 3 min) sowie trockenem CH₂Cl₂ (4×7 mL, je 3 min) gewaschen. Eine Lösung von Chloro[3-(chloromethyl)phenyl]methanon (**54**) (0.120 g, 0.633 mmol, 6.8 Äquiv.) und DIPEA (0.224 mL, 0.163 g, 1.27 mmol, 13.6 Äquiv) in trockenem CH₂Cl₂ (4 mL) wurde über ein Gummiseptum in das Reaktionsgefäß (Kunststoffspritze mit PP-Fritte) transferiert. Nach 75 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Waschen mit CH₂Cl₂ (6×7 mL, je 3 min) abgebrochen. Das Harz wurde in Et₂O (3×7 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

Tert-Butyl-3-aminopropanoathydrochlorid (**56**) (2.49 g, 13.7 mmol, 147 Äquiv.) wurde zu einem Gemisch aus DMF (1.8 mL) und DIPEA (3.6 mL) gegeben. Nach 30 min heftigem Rühren beließ man das Gemisch 10 min ohne Rühren. Es entstand ein Zweiphasensystem, von dem die untere Phase (*tert*-Butyl-3-aminopropanoat mit 30 Mol-% DIPEA) zum getrockneten Harz gegeben wurde. Man beließ die Reaktion 12 h bei 45 °C und schüttelte das Reaktionsgefäß im Abstand von 1-2 h, bis eine „homogene“ Suspension entstand. Danach wurde das Harz mit DMF (6×7 mL, je 3 min) CH₂Cl₂ (3×7 mL, je 3 min) gewaschen, in Et₂O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet. Zur Reaktionskontrolle wurde eine Probe des Harzes (10 mg) nach AAV 17 (1.5 h) photolysiert.

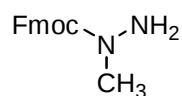
HPLC (10-90% in 30 min (verunreinigt mit 9% tertiärem Amin **58** bei R_t = 13.9 min) R_t = 12.4 min; ESI-MS: m/z 301.0 (30) [$M + Na^+$], 278.9 (40) [$M + H^+$].



Fmoc-Hydrazin (**60**) modifiziert nach Carpino *et al.*^[235]:

Eine Lösung von Hydrazinhydrat (40 mL, 40 g, 0.81 mol) in H₂O (1.0 l) wurde mit einem Eisbad gekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einem KPG-Rührer heftig durchmischt, während man eine Lösung von FmocCl (5.17 g, 20.0 mmol) in CH₃CN (100 mL) innerhalb 2 h zutropfte. Absaugen des Niederschlags und Lyophilisieren aus Dioxan (100 mL) ergaben **60** (4.98 g, 98%) als farblosen Feststoff.

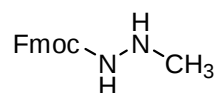
Smp.: 165 °C (Lit.: 171 °C); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 8.34 (br. s, 1H, H₂N-NH), 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 4.15-4.32 (m, 3H, CH₂-CH), 4.07 (br. s, 2H, H₂N-NH).



1-Fmoc-1-Methylhydrazin (**62**):

Eine Lösung von Methylhydrazin (1.0 mL, 0.88 g, 19 mmol) und Et₃N (2.9 mL, 2.1 g, 21 mmol, 1.1 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (20 mL) wurde bei -78 °C tropfenweise mit einer Lösung von FmocCl (3.802 g, 14.70 mmol, 0.8 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) versetzt. Man ließ innerhalb von 4 h auf Raumtemperatur auftauen und rührte das Reaktionsgemisch über Nacht. Anschließend wurde mit H₂O (1 × 40 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung per Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 1:1, ab Fr. 11 1:2, ab Fr. 24 1:5) ergaben **62** (3.31 g, 84%) als farblosen Feststoff.

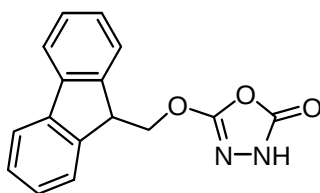
R_f = 0.5 (Hexan/Ethylacetat 1:2); Smp.: 84 °C; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.26 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.72 (br. d, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.36 (tm, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.30 (tm, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 4.42 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH₂-CH), 4.10 (br. s, 2H, NH₂), 3.11 (s, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125.0 MHz): δ 157.6, 143.8, 141.3, 127.7, 127.0, 124.9, 120.0, 67.8, 47.2, 38.4; HR-EI-MS: ber. für C₁₆H₁₆N₂O₂: 268.1212; gef.: 268.1213.



1-Fmoc-2-Methylhydrazin (**63**):

Eine Lösung von Boc_2O (1.76 g, 10.1 mmol, 1.3 Äquiv.) in wasserfreiem CHCl_3 (10 mL) wurde bei -78°C über einen Zeitraum von 5 s mit Methylhydrazin (0.25 mL, 0.36 g, 7.8 mmol) versetzt. Unmittelbar nach der Zugabe bildete sich ein farbloser Niederschlag, der sich nach Entfernen des Kühlbads vollständig auflöste. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in einer Portion mit FmocCl (2.02 g, 7.81 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt. Dazu wurde während der Fmoc-Zugabe das Gummiseptum vom Reaktionsgefäß abgenommen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch innerhalb 10 min mit DIPEA (1.6 mL, 1.2 g, 9.3 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur tropfte man TFA (10 mL) über einen Zeitraum von 15 min zu. Die Reaktionslösung wurde gerührt, bis per DC-Kontrolle (Edukt $R_f = 0.8$; Produkt $R_f = 0.5$; Hexan/Ethylacetat 1:2) vollständiger Umsatz von FmocHN-NMeBoc detektiert wurde (nach ca. 2 h). Anschließend wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (70 mL) aufgenommen und mit 10%iger wässriger NaHCO_3 -Lösung (3×70 mL) sowie mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Trocknen über Na_2SO_4 , Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung per Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 2:1, ab Fr. 11 1:1, ab Fr. 20 1:2, ab Fr. 26 1:5) ergaben **63** (1.22 g, 64%) als farblosen Feststoff.

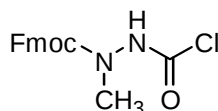
$R_f = 0.5$ (Hexan/Ethylacetat 1:2); Smp.: 155°C ; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.75$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.57 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 6.27 (br. s, 1H, CO-NH), 4.45 (br. s, 2H, CH- CH_2), 4.22 (br. s, 1H, CH- CH_2), 3.88 (br. s, 1H, HN- CH_3), 2.62 (br. s, 3H, N- CH_3); ^{13}C -NMR (125.0 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.2$, 143.8, 141.4, 127.8, 127.1, 125.0, 120.0, 67.0 (br. s), 47.2 (br. s), 39.3 (br. s); HR-EI-MS: ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: 268.1212; gef.: 268.1212.



5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-on (**101**):

Bei 0 °C wurde eine Suspension von Fmoc-Hydrazin (0.995 g, 3.91 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) und ges. wäßriger NaHCO₃-Lösung (40 mL) über einen Zeitraum von 5 min heftig gerührt. Danach beließ man die Reaktionsmischung 5 min ohne zu rühren, gab mit einer Spritze Phosgen (1.89 M in Toluol, 5.3 mL, 10 mmol, 2.6 Äquiv.) zur organischen (unteren) Phase und begann unmittelbar nach Zugabe die Reaktionsmischung wieder zu rühren. Nach 10 min wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren mit H₂O (15 mL) und CH₂Cl₂ (15 mL) versetzt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wäßrige Phase mit CH₂Cl₂ (2 × 40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **101** (0.958 g, 87%) als farblosen Feststoff.

Dec: >260 °C; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.19 (br. s, 1H, NH), 7.75 (dm, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.58 (dm, *J* = 7.9 Hz, 2H, arom.), 7.45 (tm, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.35 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 2H, arom.), 4.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH₂-CH); ¹³C-NMR (62.50 MHz, CDCl₃): δ = 156.1, 152.5, 142.4, 141.3, 128.2, 127.3, 125.1, 120.2, 72.9, 46.2; IR (KBr): ν = 3300s, 1780s, 1650s, 1451m, 1426m, 1347m, 1224m, 918m, 758w, 740m cm⁻¹; Elementaranalyse (%): ber. für C₁₆H₁₂N₂O₃: C 68.56, H 4.32, N 9.99; gef.: C 68.17, H 4.51, N 9.49.

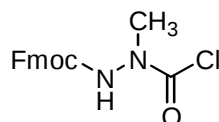


2-(Chlorocarbonyl)-1-Fmoc-1-methylhydrazin (Fmoc-azaSar-Cl) (**102**):

Eine Lösung von 1-Fmoc-1-Methylhydrazin (**62**) (0.925 g, 3.30 mmol) in wasserfreiem Dioxan (20 mL) wurde bei 0 °C über einen Zeitraum von 5 min zu Phosgen (1.89 M in Toluol, 4.4 mL, 8.3 mmol, 2.5 Äquiv.) getropft. Nach vollständiger Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und man rührte die Reaktion weitere

70 min bei Raumtemperatur. Während der Zugabe bildete sich ein farblos Niederschlag, der sich nach ca. 15 min Rühren bei Raumtemperatur vollständig auflöste. Einengen der Reaktionslösung im Vakuum und Lyophilisieren aus Dioxan ergaben **102** (1.092 g, quant.) als farblosen Feststoff.

Smp. 146 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 7.54 (dm, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.39 (tm, J = 7.9 Hz, 2H, arom.), 7.31 (tm, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 4.48 (d, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2CH), 4.23 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH_2CH), 3.19 (s, 3H, N- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.0 MHz, CDCl_3): δ = 155.9, 148.2, 143.8, 141.8, 128.4, 127.7, 125.4, 120.5, 69.3, 47.5, 37.8; IR (KBr): ν = 3250m, 3048w, 1782s, 1694s, 1479m, 1452m, 1403w, 1355m, 1301w, 1200m, 1141m, 941w cm^{-1} ; Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3$: C 61.73, H 4.57, N 8.47; gef.: C 62.27, H 4.72, N 8.31.

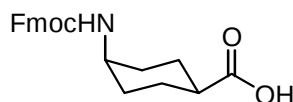


2-(Chlorocarbonyl)-1-Fmoc-2-methylhydrazin (Fmoc-azaAla-Cl) (**103**):

Eine Lösung von 1-Fmoc-2-Methylhydrazin (**63**) (0.449 g, 1.60 mmol) in wasserfreiem Dioxan (5 mL) wurde bei 0 °C über einen Zeitraum von 5 min zu Phosgen (1.89 M in Toluol, 1.7 mL, 3.2 mmol, 2.0 Äquiv.) getropft. Nach vollständiger Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und man rührte die Reaktion weitere 70 min bei Raumtemperatur. Einengen der Reaktionslösung im Vakuum und Lyophilisieren aus Dioxan ergaben **103** (0.531 g, quant.) als farblosen Feststoff.

Smp: 62 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.56 (br. d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.40 (tm, J = 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.31 (tm, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 6.95 und 6.72 (2 $\times$ br. s, 1H, NH), 4.64-4.36 (m, 2H, CH_2CH), 4.23 (t, J = 6.2 Hz, 1H, CH_2CH), 3.37, 3.24 und 2.99 (3 $\times$ br. s, 3H, N- CH_3); (250 MHz, CDCl_3 , 335 K): δ = 7.75 (d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.56 (dm, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.39 (tm, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.30 (tm, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 6.76 (br. s, 1H, NH), 4.59 (br. d, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2CH), 4.23 (t, J = 6.2 Hz, 1H, CH_2CH), 3.17 (br. s, 3H, N- CH_3); $^{13}\text{C-}$

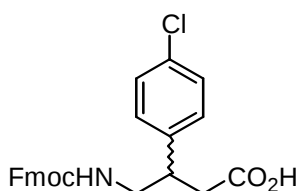
NMR (62.50 MHz, CDCl_3 , 335 K): δ = 154.4, 151.6, 143.3, 141.5, 127.9, 127.2, 124.8, 120.1, 68.1, 47.2, 39.2; IR (KBr, cm^{-1}): ν = 3298 m , 2954 w , 1749 s , 1257 m , 1103 m , 916 w , 740 m , 667 m ; HR-EI-MS: ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ 330.0771; gef.: 330.0778; Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3$: C 61.73, H 4.57; gef.: C 61.99, H 4.62.



Cis-N-Fmoc-4-Aminocyclohexancarbonsäure (Fmoc-Cyh-OH) (72):^[275]

4-Aminocyclohexancarbonsäure (1.04 g, 7.26 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 1 h mit FmocCl (1.88 g, 7.26 mmol, 1.0 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **72** (2.58 g, 97%) als farblosen Feststoff.

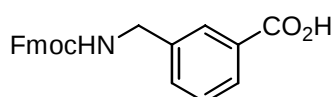
Smp. 133-135 °C (Lit.: 128-130 °C); ^1H -NMR (250 MHz, DMSO): δ = 12.08 (br. s, 1H, CO_2H), 7.87 (br. d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.70 (br. d, 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.44-7.23 (m, 5H, NH, arom.), 4.28-4.12 (m, 3H, O- CH_2 -CH), 3.39 (br. s, 1H, 1-H), 2.37 (br. s, 1H, 4-H), 1.98-1.77 (m, 2H, aliphat.), 1.64-1.37 (m, 6H, aliphat.); HPLC (30-80% in 30 min) R_t = 22.5 min; ESI-MS: m/z 388.3 (15) [$\text{M}+\text{Na}^+$], 366.0 (100) [$\text{M} + \text{H}^+$].



rac-N-Fmoc-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)buttersäure (Fmoc-Cpb-OH) (64):

4-Amino-3-(4-chlorophenyl)buttersäure (1.83 g, 8.58 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 1 h mit FmocCl (2.00 g, 7.73 mmol, 0.9 Äquiv.) umgesetzt. Der nach dem Ansäuern entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit H_2O (3×20 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in wasserfreiem Dioxan (50 mL) aufgenommen und vom Unlöslichen abfiltriert. Lyophilisieren ergab **64** (3.25 g, 87%) als farblosen Feststoff.

Smp. 170-171 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.71 (d, 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.45-7.17 (m, 8H, arom.), 4.34-4.11 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.16 (br s, 3H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}$), 2.69-2.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$); HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 27.8$ min; ESI-MS: m/z 908.9 (100) $[2\text{M} + \text{K}^+]$, 893.0 (40) $[2\text{M} + \text{Na}^+]$, 474 (20) $[\text{M} + \text{K}^+]$, 458 (20) $[\text{M} + \text{Na}^+]$, 435.9 (10) $[\text{M} + \text{H}^+]$.



***N*-Fmoc-*m*-(Aminomethyl)benzoessäure (Fmoc-Mamb-OH) (65) modifiziert nach Jackson *et al.*^[236]:**

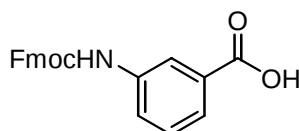
m-Cyanobenzoessäure (5.0 g, 34 mmol) wurde in Ethanol (100 mL) bei 50 °C unter Rühren gelöst. Unter Argonatmosphäre wurde 5% Pd/C (0.53 g) zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 2 d bei 35 °C unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck heftig gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celite abgetrennt und mit H_2O gewaschen. Im Filtrat bildete sich dabei ein farbloser Niederschlag (Edukt), der durch erneute Filtration entfernt wurde. Einengen des Filtrats im Vakuum und Lyophilisieren aus H_2O (50 mL) ergaben *m*-(Aminomethyl)benzoessäure (H-Mamb-OH) (2.42 g, 42% verunreinigt mit 10 Mol-% *m*-Aminomethyl-benzoessäureethylester) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 12.61$ (s, 1H, CO_2H), 8.51 (s, 2H, NH_2), 8.09 (s, 1H, 2-H), 7.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 6-H), 7.75 (d, $J = 8.1$, 1H, 4-H), 7.55 (dd, $J = J' = 7.6$, 1H, 5-H), 4.08 (s, 2H, CH_2).

m-(Aminomethyl)benzoessäure (2.42 g, 12.9 mmol) wurde nach AAV 1 über einen Zeitraum von 5 h mit FmocCl (3.34 g, 12.9 mmol, 1.0 Äquiv.) umgesetzt. Reinigung per Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 5:1, ab Fr. 10 2:1, ab Fr. 30 1:1) ergab die Verbindung **65** (0.76 g, 16%) als farblosen Feststoff.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat 1:1); Smp. 205-208 °C (Lit.: 200-201°C); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 7.96\text{-}7.79$ (m, 5H, arom.), 7.69 (d, $J = 7.5$

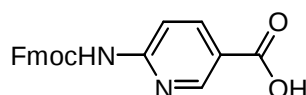
Hz, 2H, arom.), 7.45-7.27 (m, 6H, arom., NH), 4.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 4.25-4.10 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, Ar- CH_2). HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 30.8$ min; ESI-MS: m/z 785.2 (100) $[2\text{M}+\text{K}^+]$, 747.0 (30) $[2\text{M}+\text{H}^+]$, 396.2 (20) $[\text{M}+\text{Na}^+]$, 373.9 (30) $[\text{M}+\text{H}^+]$.



Fmoc-Mab-OH nach AAV1 (**66**):

m-Aminobenzoesäure (2.34 g, 17.0 mmol), FmocCl (4.89 g, 18.9 mmol, 1.1 Äquiv.) und Kristallisation aus Hexan/Ethylacetat 3:1 ergaben nach AAV1 Fmoc-Mab-OH (**66**) (5.30 g, 87%) als farblosen Feststoff.

Smp.: 224 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 12.9$ (br. s, 1H, CO_2H), 9.90 (s, 1H, NH), 8.06 (br. s, 1H, arom.), 7.90 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, arom.), 7.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, arom.), 7.72-7.28 (m, 7H, arom.), 4.49 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 4.31 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); HPLC (10-90% in 30 min) $R_t = 20.4$ min; ESI-MS: m/z 757.0 (60) $[2\text{M}+\text{K}^+]$, 740.8 (20) $[2\text{M}+\text{Na}^+]$, 718.8 (20) $[2\text{M}+\text{H}^+]$, 359.8 (10) $[\text{M}+\text{H}^+]$.

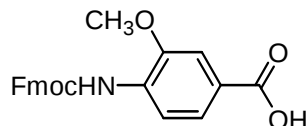


N-Fmoc-6-Aminonicotinsäure (Fmoc-Ani-OH) (**67**):

6-Aminonicotinsäure (3.02 g, 21.8 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 3 h mit FmocCl (4.55 g, 17.6 mmol, 0.8 Äquiv.) umgesetzt. Das Rohprodukt (4.70 g) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan (140 mL) und DMF (35 mL) bei 110 °C gelöst und mit H_2O (25 mL) versetzt. Abkühlen und Abtrennen des Niederschlags durch Filtration ergaben **67** (4.00 g, 63%) als farblosen Feststoff.

Smp. >240 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 13.08$ (br. s, 1H, CO_2H), 10.86 (s, 1H, NH), 8.79 (dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 8.20 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, 3-H), 7.94-7.78 (m, 5H, arom.), 7.47-7.28 (m, 4H, arom.), 4.45-

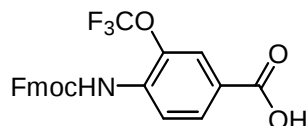
4.25 (m, 3H, CH₂-CH); HPLC (30-80% in 30 min) R_t = 23.4 min; ESI-MS: *m/z* 461.1 (55) [M+H⁺].



N-Fmoc-4-Amino-3-methoxybenzoessäure (Fmoc-Amob-OH) (68):

4-Amino-3-methoxybenzoessäure (1.04 g, 6.24 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 3 d mit FmocCl (1.91 g, 7.37 mmol, 1.2 Äquiv.) umgesetzt. Umkristallisieren aus einem CHCl₃/Hexan-Gemisch ergab **68** (1.10 g, 45%) als farblosen Feststoff.

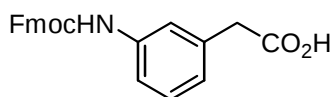
Smp. 230-233 °C; ¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 8.91 (s, 1H, NH), 7.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.78 (d, 7.5 Hz, 3H, arom.), 7.54-7.29 (m, 6H, arom.), 4.44 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.30 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH₂-CH), 3.87 (s, 3H, CH₃); HPLC (30-80% in 30 min) R_t = 27.5 min; ESI-MS: *m/z* 389.9 (100) [M + H⁺].



N-Fmoc-4-Amino-3-(trifluormethoxy)benzoessäure (Fmoc-Atob-OH) (69):

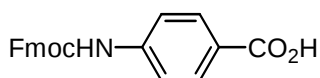
4-Amino-3-(trifluormethoxy)benzoessäure (1.42 g, 6.43 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 5 d mit FmocCl (1.66 g, 7.72 mmol, 1.2 Äquiv.) umgesetzt. Umkristallisieren aus einem Ethylacetat/Hexan-Gemisch ergab **69** (1.30 g, 46%) als farblosen Feststoff.

Smp. 232-233 °C; ¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 13.23 (br. s, 1H, CO₂H), 9.94 (s, 1H, NH), 7.96-7.85 (m, 4H, arom.), 7.83-7.72 (m, 3H, arom.), 7.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 4.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.32 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH₂-CH); HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 27.8 min; ESI-MS: *m/z* 924.7 (80) [2M + K⁺], 908.8 (40) [2M + K⁺], 703.5 (100) [3M + 2K⁺], 482.0 (20) [M + K⁺].

**N-Fmoc-2-(*m*-Aminophenyl)essigsäure (Fmoc-Mape-OH) (70):**

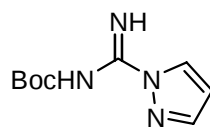
2-(*m*-Aminophenyl)essigsäure (2.56 g, 17.0 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 3 h mit FmocCl (4.39 g, 17.0 mmol, 1.0 Äquiv.) umgesetzt. Umkristallisieren aus einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch ergab **70** (5.60 g, 88%) als farblosen Feststoff.

Smp. 192 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ = 12.30 (br. s, 1H, CO_2H), 9.70 (s, 1H, NH), 7.89 (d, J = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.75 (d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.48-7.26 (m, 6H, arom.), 7.19 (t, J = 7.8 Hz, 1H, arom.), 6.89 (d, J = 7.5 Hz, 1H, arom), 4.45 (d, J = 6.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 4.30 (t, J = 6.8 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.49 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$); HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 25.0 min; ESI-MS: m/z 784.9 (100) [$2\text{M}+\text{K}^+$], 769.0 (60) [$2\text{M}+\text{Na}^+$], 412.1 (35) [$\text{M}+\text{K}^+$], 396.1 (50) [$\text{M}+\text{Na}^+$], 373.9 (20) [$\text{M}+\text{H}^+$].

**N-Fmoc- *p*-Aminobenzoessäure (Fmoc-Pab-OH) (71):**

p-Aminobenzoessäure (2.66 g, 19.4 mmol) wurde nach AAV 2 über einen Zeitraum von 3 h mit FmocCl (5.00 g, 19.4 mmol, 1.0 Äquiv.) umgesetzt. Umkristallisieren aus einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch ergab **71** (5.47 g, 79%) als farblosen Feststoff.

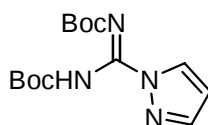
Smp. >260 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ = 12.65 (br. s, 1H, CO_2H), 10.05 (s, 1H, NH), 7.95-7.79 (m, 4H, arom.), 7.75 (d, J = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.54 (br. d, J = 8.2 Hz, 2H, arom.), 7.47-7.29 (m, 4H, arom.), 4.53 (d, J = 6.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 4.32 (t, J = 6.4 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 25.1 min; ESI-MS: m/z 756.9 (40) [$2\text{M}+\text{K}^+$], 740.9 (40) [$2\text{M}+\text{Na}^+$], 718.7 (50) [$2\text{M}+\text{H}^+$], 359.8 (20) [$\text{M}+\text{H}^+$].



N-Boc-1-guanylpyrazol modifiziert nach Wu *et al.*^[243] (80):

1-Guanylpyrazolhydrochlorid (3.37 g, 23.1 mmol) und DIPEA (11.9 mL, 8.97 g, 69.4 mmol, 3.0 Äquiv.) wurden in CH₂Cl₂ (20 mL) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit eine Lösung von Boc₂O (5.58 g, 25.6 mmol, 1.1 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (6 mL) versetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch noch weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Et₂O (40 mL) verdünnt, mit H₂O (3 × 40 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Einengen im Vakuum und Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 4:1) ergaben **80** (4.74 g, 98%) als farbloses Öl.

R_f = 0.8 (Hexan/Ethylacetat 2:1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 8.80 (br. s, 2H, 2 × NH), 8.40 (br. d, *J* = 2.6 Hz, 1H, 5-H), 7.87 (br. s, 1H, 3-H), 6.54 (dd, *J* = 2.7, 1.6 Hz, 1H, 4-H), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).



N,N'-Bis-Boc-1-guanylpyrazol modifiziert nach Wu *et al.*^[243] (81):

Eine Lösung von **80** (0.570 g, 2.71 mmol) in trockenem THF (2 mL) wurde bei 0 °C innerhalb von 6 min zu einer Suspension von NaH (55-60% in Paraffin, 0.25 g, ca. 6.3 mmol, ca. 2.1 Äquiv.) in trockenem THF (3 mL) getropft. Nach 5 min wurde das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch noch weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine Lösung von Boc₂O (0.650 g, 2.98 mmol, 1.1 Äquiv.) in trockenem THF (4 mL) zugegeben und anschließend mit THF (15 mL) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei 65 °C gerührt, auf 0 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit Essigsäure/THF (2 mL/6 mL) versetzt. Das ausgefallene Natriumacetat wurde abfiltriert und mit Et₂O (2 × 30 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum auf ein Volumen von ca. 10 mL eingengt, mit 10%iger Na₂CO₃-Lösung (25 mL) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Extraktion mit Et₂O (3 × 20 mL), Trocknen über Na₂SO₄, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und

Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 10:1, ab Fr. 8 5:1) ergaben **81** (0.654 g, 78%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat 2:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.91$ (br. s, 1H, NH), 8.30 (dd, $J = 2.8, 0.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.62 (dd, $J = 1.6, 0.7$ Hz, 1H, 3-H), 6.41 (dd, $J = 2.8, 1.6$ Hz, 1H, 4-H), 1.55 und 1.49 ($2 \times$ s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$).

9.3 Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika

Allgemeine Anmerkungen zur Festphasensynthese

Die Festphasensynthesen wurden in Schüttelgefäßen aus Glas (Harzmasse >1 g) oder in 10 mL-, 5 mL- bzw. 2 mL-Kunststoffspritzen mit PP-Fritten der Firma Vetter-Laborbedarf (Tübingen) durchgeführt. Die Kunststoffspritzen wurden zur Durchmischung der Harzsuspension mit ca. 15 rpm über Kopf rotiert.

Die Umsetzungen der Azabausteine, die Guanylierungen sowie die Pyrimidylierungen an der Festphase wurden unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Dazu werden feste Reagenzien in einen Spitzkolben gegeben und mindestens 10 min im Vakuum getrocknet. Der Spitzkolben wird mit Argon belüftet und mit einem Gummiseptum verschlossen (Argonüberdruck). Wasserfreie Lösungsmittel und flüssige Reagenzien werden über das Gummiseptum mit einer Kunststoffspritze zugegeben. Die Reaktionslösungen werden ebenfalls über das Gummiseptum direkt in das Reaktionsgefäß (Kunststoffspritze mit PP-Fritte) transferiert.

Bei Verwendung von Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-Harzen wurde sowohl während der Reaktionsdurchführung als auch bei der Lagerung direkte Lichteinstrahlung vermieden. Um dies zu gewährleisten, wurden die Reaktions- und Aufbewahrungsgefäße mit Aluminiumfolie umhüllt. Bei Arbeitsschritten, die visuelle Kontrollen des Gefäßinnenraums erforderten, wurde vor Entfernen der Aluminiumfolie Tageslicht vollständig ausgeschlossen und die Deckenbeleuchtung im Umkreis von ca. 4 m ausgeschaltet.

Bei Verwendung von Rink-Amid-MBHA- und Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel-Harz wurde zur Berechnung der Reagenz-Äquivalente sowie der Ausbeuten die vom Hersteller angegebenen Belegungsdichten verwendet. Da die RGD-Mimetika nach saurem Abspalten vom Rink-Amid-MBHA-Harz sowie nach Reinigung per HPLC mit sehr großer Wahrscheinlichkeit als TFA-Salze vorlagen, wurden die Ausbeuten der so erhaltenen RGD-Mimetika auf die molaren Massen der entsprechenden TFA-Salze bezogen.

9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese

AAV 3 (Belegung des TCP-Harzes):

Das TCP-Harz (Kapazität ca. 0.9 mmol/g, 1.0 g) wird in absolutem CH_2Cl_2 (15 mL) suspendiert. Zu dieser Suspension wird die *N*-terminal-geschützte Aminosäure (1.2 mmol) sowie DIPEA (0.5 mL, 3 mmol) gegeben und die Mischung 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von DIPEA (0.5 mL, 3 mmol) und Methanol (3 mL) wird weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit DMF (3×20 mL, je 3 min), CH_2Cl_2 (3×20 mL, je 3 min) und Et_2O (3×20 mL, je 3 min) gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum über Nacht wird die Belegungsdichte des Harzes nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{m_{\text{ges}} - m_{\text{Harz}}}{MG_{\text{Xxx}} - MG_{\text{Cl}}}$$

n	Mol Aminosäure am Harz
m_{ges}	Gesamtmasse des Polymers nach der Kupplung [g]
m_{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]
MG_{Xxx}	Molmasse der Fmoc-Aminosäure minus 1 (Fmoc-Xxx-O) [g/mol]
MG_{Cl}	Molmasse Chlorid (35.45 g/mol)

Der Fehler, der dabei durch die unterschiedliche Massen von Cl^- und MeO^- entsteht, ist zu vernachlässigen.

AAV 4 (Kupplung nach der HOBt/TBTU-Methode):

Das harzgebundene freie Amin (1.0 g) wird mit DMF (1×10 mL, 5 min) gewaschen und anschließend mit einer ca. 0.1 M Lösung von Fmoc-geschützter Aminosäure (2.5 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), TBTU (2.4 Äquiv.) sowie HOBt·H₂O (2.5 Äquiv.) in DMF versetzt. Der pH-Wert wird mit DIPEA auf etwa 8 eingestellt und während der Reaktion durch Nachtitration mit DIPEA konstant gehalten. Da sich in nicht wässrigen Systemen kein pH-Wert ermitteln lässt, wurde als Anhaltspunkt der Wert verwendet, den angefeuchtete Indikatorstäbchen (Merck Neutralit) nach 30 s anzeigen, wenn sie mit 3 Tropfen der Reaktionslösung versetzt wurden. Nach einer Kupplungszeit von ca. 1.5 h wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (5×10 mL, je 3 min) beendet. Das Harz wird anschließend nochmals mit CH₂Cl₂ (2×10 mL, je 3 min) gewaschen, in Et₂O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 5 (Kupplung nach der HATU-Methode):

Das harzgebundene freie Amin (1.0 g) wird mit DMF (1×10 mL, 5 min) gewaschen und anschließend mit einer ca. 0.1 M Lösung von Fmoc-geschützter Aminosäure (3.0 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), HATU (2.8 Äquiv.) sowie sym-Collidin (30 Äquiv.) in DMF versetzt. Nach einer Kupplungszeit von 1-12 h wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (5×10 mL, je 3 min) beendet. Danach wird das Harz nochmals mit CH₂Cl₂ (2×10 mL, je 3 min) gewaschen, in Et₂O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 6 (Einbau von Fmoc-azaGly an der Festphase):

Das harzgebundene freie Amin (1.12 g, 0.18 mmol/g, 0.20 mmol) wird mit trockenem CH₂Cl₂ (3×10 mL, je 5 min) gewaschen und mit einer Lösung von 5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-on (**101**) (0.176 g, 0.629 mmol, 3.1 Äquiv.) in trockenem CH₂Cl₂ (5 mL) oder DMF (5 mL) versetzt. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit NMP (5×5 mL, je 3 min) und CH₂Cl₂ (3×5 mL) abgebrochen. Anschließend wird das Harz in Et₂O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 7 (Einbau von Fmoc-azaSar an der Festphase):

Das freie harzgebundene Amin (0.372 g, 0.18 mmol/g, 67 μ mol) wird mit trockenem CH_2Cl_2 (3×5 mL, je 5 min) gewaschen und mit einer Lösung von Fmoc-azaSar-Cl (**102**) (0.112 g, 0.339 mmol, 5.1 Äquiv.) in trockenem CH_2Cl_2 (3 mL) versetzt. Nach 10 min Schütteln bei Raumtemperatur wird innerhalb 1 h eine Lösung von DIPEA (69 μ l, 52 mg, 0.40 mmol, 6.0 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (0.9 mL) in drei gleich großen Portionen zugegeben. Um Nebenprodukte zu vermeiden, muß das Reaktionsgemisch unmittelbar nach Zugabe von DIPEA geschüttelt werden! Nach vollständiger DIPEA-Zugabe wird die Suspension noch 1 h geschüttelt. Anschließend wird die Reaktion durch Waschen mit NMP (5×10 mL, je 3 min) und CH_2Cl_2 (3×10 mL, je 3 min) abgebrochen. Danach wird das Harz in Et_2O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 8 (Einbau von Fmoc-azaAla an der Festphase):

Das freie harzgebundene Amin (0.577 g, 0.17 mmol/g, 98 μ mol) wird mit trockenem DMF (3×5 mL, je 5 min) gewaschen und mit einer Lösung von Fmoc-azaAla-Cl (**103**) (0.164 g, 0.496 mmol, 5.1 Äquiv.) und DIPEA (92 μ l, 69 mg, 0.54 mmol, 5.5 Äquiv.) in trockenem DMF (5 mL) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit NMP (5×10 mL, je 3 min) und CH_2Cl_2 (3×10 mL, je 3 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz in Et_2O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 9 (Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe):

Das Harz (1 g) wird mit DMF (1×10 mL) 5 min gewaschen, mit 20% Piperidin in DMF (2×10 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Das Harz wird anschließend mit DMF (7×10 mL, je 3 min) und CH_2Cl_2 (2×10 mL, je 3 min) gewaschen, in Et_2O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 10 (Guanylierung von harzgebundenen aliphatischen Aminen):

Das freie harzgebundene aliphatische Amin (0.336 g, 0.17 mmol/g, 57 μ mol) wird mit wasserfreiem CH_2Cl_2 (2×7 mL, je 5 min) gewaschen und mit einer Lösung von *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpurazol (**81**) (35.6 mg, 0.115 mmol, 2.0 Äquiv.) in CH_2Cl_2

(1.6 mL) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei Raumtemperatur wird das Harz mit CH_2Cl_2 (6×7 mL, je 3 min) gewaschen, in Et_2O (4×7 mL, je 3 min) geschrumpft und anschließend im Vakuum getrocknet. Um nicht umgesetztes *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol (**81**) zurückzugewinnen, werden die vereinigten CH_2Cl_2 -Filtrate im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in Dioxan aufgenommen und von den in Dioxan unlöslichen Weichmachern, resultierend aus den verwendeten Kunststoffspritzen, abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum vom Dioxan befreit, in Hexan aufgenommen und das in Hexan unlösliche Pirazol abfiltriert. Nach Entfernen des Hexans im Vakuum erhält man reines *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol (**81**).

AAV 11 (Guanylierung von harzgebundenen Anilinen):

Das getrocknete freie harzgebundene Anilin (0.347 g, 0.16 mmol/g, 56 μmol) wird mit wasserfreiem CHCl_3 (2×5 mL, je 5 min) gewaschen und mit einer Lösung von *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol (**81**) (0.328 g, 1.06 mmol, 19 Äquiv.) in CHCl_3 (3.0 mL) versetzt. Das verwendete CHCl_3 wurde über Na_2CO_3 gelagert, um Spuren von HCl zu entfernen. Um das Eintrocknen der Reaktionssuspension zu verhindern, wird das Reaktionsgefäß (Kunststoffspritze mit PP-Fritte) zusammen mit einem in CHCl_3 -getränkten Zellstoff in eine 1 l-Flasche mit Schraubverschluß gegeben. Die Flasche wird verschlossen und in einem Trockenschrank auf 50 °C erwärmt. Nach 10 min wird die Flasche kurz geöffnet, um einen kritischen Überdruck abzubauen. Man beläßt die Reaktion 20 h bei 50 °C und schüttelt das Reaktionsgefäß im Abstand von 2-3 h, bis eine „homogene“ Suspension entsteht. Danach wird das Harz mit CH_2Cl_2 (6×10 mL, je 3 min) gewaschen, in Et_2O (4×10 mL, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet. Die Rückgewinnung von nicht umgesetztem Bis-Boc-1-guanylpirazol (**81**) wird analog zu der in AAV 10 beschriebenen Methode durchgeführt.

AAV 12 (Pyrimidylierung von harzgebundenen aliphatischen Aminen):

Das getrocknete freie harzgebundene Alkylamin (30 mg, 0.20 mmol/g, 6.0 μmol) wird in einer Lösung von 2-Fluorpyrimidin (**83**) (8.9 mg, 90 μmol , 15 Äquiv.) und DIPEA (15 μL , 12 mg, 90 μmol , 15 Äquiv.) in trockenem DMF (180 μL) suspendiert. Nach 24 h Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit DMF ($4 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) und CH_2Cl_2 ($2 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz in Et_2O ($4 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 13 (Pyrimidylierung von harzgebundenen Anilinen):

Das getrocknete freie harzgebundene Anilin (30 mg, 0.20 mmol/g, 6.0 μmol) wird in einer Lösung von 2-Fluorpyrimidin (**83**) (18 mg, 0.18 mmol, 30 Äquiv.) und $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (9 μL) in trockenem DMF (180 μL) suspendiert. Nach 7 d Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit DMF ($6 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) und CH_2Cl_2 ($2 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz in Et_2O ($4 \times 1 \text{ mL}$, je 3 min) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 14 (Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen):

Das Harz (0.7 g) wird mit CH_2Cl_2 ($2 \times 10 \text{ mL}$) gewaschen, mit einem 50:50:5-Gemisch aus CH_2Cl_2 , TFA und TIPS (10 mL) oder einem 95:5-Gemisch aus TFA und H_2O (10 mL) versetzt und 1-2 Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit CH_2Cl_2 ($3 \times 10 \text{ mL}$, je 3 min) gewaschen und mit einer 20%igen Lösung von DIPEA in CH_2Cl_2 (10 mL, 5 min) neutralisiert. Danach wird das Harz mit CH_2Cl_2 ($5 \times 10 \text{ mL}$, je 3 min) gewaschen, in Et_2O ($4 \times 10 \text{ mL}$) geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

AAV 15 (Abspaltung vom TCP-Harz):

Das Harz (0.7 g) wird zunächst mit CH_2Cl_2 ($2 \times 10 \text{ mL}$, je 5 min) gewaschen und dann einmal 1 h, einmal 30 min und einmal 3 min mit einem 3:1:6-Gemisch aus Essigsäure, MeOH und CH_2Cl_2 (10 mL) geschüttelt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden eingeeengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert.

AAV 16 (Abspaltung vom Rink-Amid-MBHA-Harz mit Seitenkettenentschützung):

Das Harz (0.7 g) wird zunächst mit CH_2Cl_2 (2×10 mL, je 5 min) gewaschen und dann einmal 1 h mit einem 95:5-Gemisch aus TFA und H_2O (10 mL) und dann 1 h mit einem 4:1 Gemisch aus CH_3CN und H_2O (10 mL) geschüttelt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden eingengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert.

AAV 17 (Abspaltung vom Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel-Harz):

Das Harz (0.3 g) wird in einer 4:1-Lösung (seitenkettengeschützte Verbindungen) bzw. 1:1-Lösung (seitenkettenentschützte Verbindungen) von CH_3CN und H_2O (8 mL) suspendiert. Die Suspension wird im Abspaltgefäß (Kunststoffspritze mit PP-Fritte) 1-6 h mit einem 150 W Quecksilber-Hochdruckstrahler (TQ 150 Z2 von Heraeus) aus einer Entfernung von ca. 1 cm bestrahlt und mit Hilfe eines Magnetrührers leicht gerührt. Bei Probeabspaltungen wird der Überstand nach Filtration direkt per HPLC bzw. LC-MS analysiert. Bei quantitativen Abspaltungen wird der Überstand abfiltriert, nochmals mit dem entsprechenden $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ -Gemisch (3×8 mL, je 3 min) gewaschen, die vereinigten Filtrate im Vakuum eingengt und aus H_2O (3 mL) lyophilisiert.

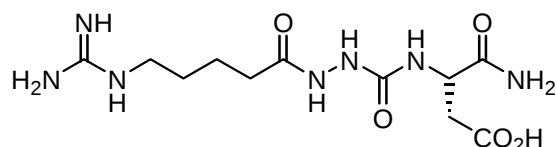
9.3.2 Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika

Das Vorgehen bei der Festphasensynthese der aza-RGD-Mimetika ergibt sich aus folgendem Fließschema. Die in AAV 4-17 beschriebenen Quell- und Schrumpfschritte sowie das Trocknen im Vakuum wurden nur bei Unterbrechung der Synthese befolgt.

Tabelle 9.1 Festphasensynthese der *aza-RGD-Mimetika* nach der *Fmoc-Strategie* bei Verwendung von *Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel-* bzw. *Rink-Amid-MBHA-Harz*.

Schritt [Nr.]	Funktion	AAV
1	Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe (20% Piperidin in DMF)	9
2	Belegung des Harzes mit <i>N</i> -Fmoc-geschützter Aminosäure nach der HATU- oder TBTU-Methode	4 oder 5
3	Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe (20% Piperidin in DMF)	9
4	Einbau der aktivierten <i>aza</i> -Bausteine	6, 7 oder 8
5	Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe (20% Piperidin in DMF)	9
6	Einbau einer <i>N</i> -Fmoc-geschützten Aminosäure nach der HATU-Methode	5
7	Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF	9
8 ^[a]	Guanylierung oder Pyrimidylierung des <i>N</i> -Terminus	10, 11, 12 oder 13
9	Entfernen der permanenten Schutzgruppen mit TFA (und Abspaltung vom Harz bei Verwendung von Rink-Amid-MBHA-Harz)	14 oder 16
10	Abspaltung vom Harz durch Photolyse	17

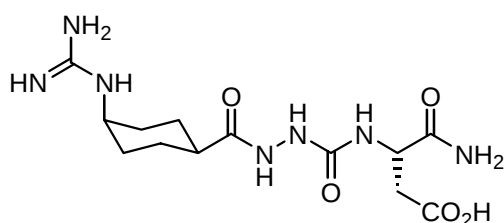
[a] Bei Festphasensynthesen der *aza-RGD-Mimetika* mit freiem *N*-Terminus wird dieser Schritt ausgelassen.



Gua-δAva-azaGly-Asp-NH₂ (139):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.336 g, 0.17 mmol/g, 57 μmol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **139** (13.2 mg, 70% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **139** (9.6 mg, 38%) als farblosen Feststoff.

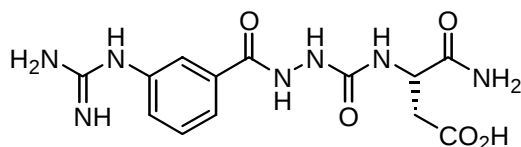
^1H -NMR (500 MHz, DMSO, 320 K): δ = 9.45 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-CO-NH-NH}$), 7.91 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-CO-NH-NH}$), 7.54 (br. s, 1H, $\text{H}_2\text{N-CN}(\text{H}_2\text{-NH})$), 7.25-6.85 (m, 6 H, $\text{H}_2\text{N-CN}(\text{H}_2\text{-NH})$, CO-NH_2), 6.57 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CO-NH-CH), 4.35 (m_c , 1H, NH-CH-CO), 3.09 (m_c , 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$) 2.60 (m_c , 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$), 2.13 (t, J = 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 1.61-1.44 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2$); ^{13}C -NMR (125.0 MHz, DMSO, 320 K): δ = 172.8, 171.8, 171.7, 157.3, 156.8, 49.7, 40.3, 36.4, 32.4, 27.8, 21.7; HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 4.4 min; ESI-MS: m/z 332.3 (100) $[\text{M} + \text{H}^+]$.



cis-Gua-Cyh-azaGly-Asp-NH₂ (140):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.310 g, 0.17 mmol/g, 53 μmol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 10, 14 (95:5 TFA/ H_2O -Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **140** (20.8 mg, quant. Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **140** (11.0 mg, 44%) als farblosen Feststoff.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO, 320 K): δ = 9.44 (s, 1H, CH-CO-NH-NH), 7.87 (s, 1H, CH-CO-NH-NH), 7.61 (br. s, 1H, $\text{H}_2\text{N-CN}(\text{H}_2\text{-NH})$), 7.22-6.83 (m, 6H, $\text{H}_2\text{N-CN}(\text{H}_2\text{-NH})$, CO-NH_2), 6.64 (br. s, 1H, CO-NH-CH), 4.33 (m_c , 1H, NH-CH-CO), 3.63 (br. s, 1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2)_2$), 2.59 (m_c , 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$), 2.30 (m_c , 1H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH-CO}$), 1.81-1.53 (m, 8H, aliphat.); ^{13}C -NMR (128.0 MHz, DMSO, 300 K): δ = 174.7, 173.1, 172.4, 157.5, 155.9, 49.7, 46.2, 39.0, 36.6, 28.6, 23.8 und 23.6 (Singulett-Paar)*; HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 10.8 min; ESI-MS: m/z 358.3 (100) $[\text{M} + \text{H}^+]$. *Wie im HMQC-COSY-Spektrum zu erkennen ist, resultieren die beiden Singuletts aus zwei verschiedenen Konformeren.

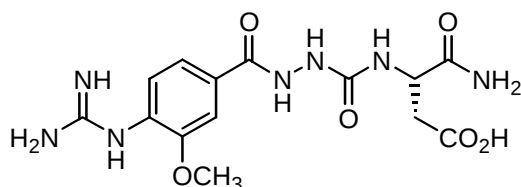


Gua-Mab-azaGly-Asp-NH₂ (**141a**):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.349 g, 0.17 mmol/g, 59 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **141a** (11.3 mg, 55% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **141a** (4.8 mg, 18%) als farblosen Feststoff.

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.36 g, 0.59 mmol/g, 0.21 mmol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 11 und 16 die Verbindung **141a** (179 mg, quant. Rohausbeute) als farbloses Öl. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **141a** (63.4 mg, 65%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ = 12.30 (br. s, 1H, CO₂H), 10.32 (s, 1H, Ar-CO-NH-NH), 10.02 (s, 1H, NH-Ar), 8.27 (s, 1H, Ar-CO-NH-NH), 8.26-7.54 (m, 7H, 3 $\times$ Ar-H, H₂N-CN(H)₂-NH), 7.42 (m_c, 1H, 1 $\times$ Ar-H), 7.18 und 7.13 (2 $\times$ br. s, 2H, CO-NH₂), 6.82 (br. s, 1H, CO-NH-CH), 4.40 (m_c, 1H, NH-CH-CO), AB-Signal (δ_A = 2.67, δ_B = 2.58, J_{AB} = 16.2, zusätzlich aufgespalten durch $J_{A,H(\alpha)}$ = 5.3 Hz und $J_{B,H(\alpha)}$ = 7.1 Hz, 2H, CH-CH₂-CO₂H); ¹³C-NMR (150.0 MHz, DMSO): δ = 174.0, 172.0, 166.0, 158.0, 136.4, 134.7, 130.5, 128.3, 125.9, 124.2, 50.6, 39.0; HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 10.8 min; ESI-MS: m/z 352.2 (100) [M + H⁺].

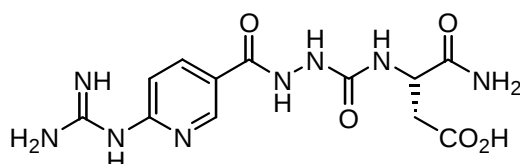


Gua-Amb-azaGly-Asp-NH₂ (**142**):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.407 g, 0.17 mmol/g, 69 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 11 (20 Äquiv., 0.4 M, 60 °C, 2 d), 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **142** (23.4 mg, 89% Rohausbeute) als

gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **142** (5.4 mg, 16%) als farblosen Feststoff.

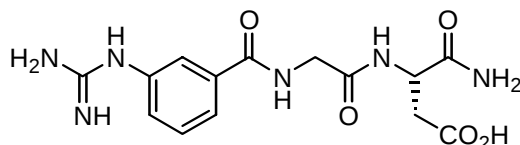
HPLC (0-20% in 15 min) $R_t = 2.0$ min; ESI-MS: m/z 382.2 (100) $[M + H^+]$.



Gua-Ani-azaGly-Asp-NH₂ (143):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.370 g, 0.17 mmol/g, 63 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 11 (15 Äquiv., 0.4 M, 60 °C, 7 d), 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die stark verunreinigte Verbindung **143** (18.6 mg, 84% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

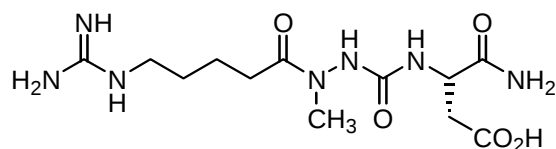
HPLC (0-20% in 15 min) $R_t = 4.7$ min; ESI-MS: m/z 353.1 (100) $[M + H^+]$.



Gua-Mab-Gly-Asp-NH₂ (144):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.306 g, 0.17 mmol/g, 52 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **144** (15.6 mg, 86% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

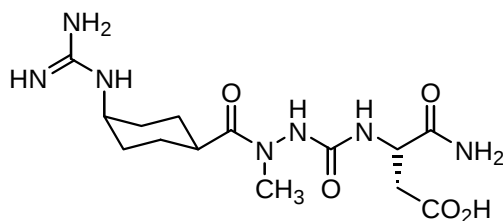
HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 18.8$ min; ESI-MS: m/z 351.2 (100) $[M + H^+]$.



Gua- δ Ava-azaSar-Asp-NH₂ (145):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.372 g, 0.18 mmol/g, 67 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **145** (22.3 mg, 96% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **145** (12.8 mg, 42%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, 320 K): δ = 8.48 (s, 1H, N-NH), 7.54 (br. s, 1H, H₂N-CN₂-NH), 7.29-6.83 (m, 6H, H₂N-CN₂-NH, CO-NH₂), 6.68 (d, J = 7.7 Hz, 1H, CO-NH-CH), 4.39 (q, J = 6.8 Hz, 1H, NH-CH-CO), 3.09 (q, J = 6.1 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂), 2.95 (s, 3H, N-CH₃), AB-Signal (δ_A = 2.64, δ_B = 2.56, J_{AB} = 16.1, zusätzlich aufgespalten durch $J_{A,H(\alpha)}$ = 5.3 Hz und $J_{B,H(\alpha)}$ = 7.4 Hz, 2H, CH-CH₂-CO₂H), 2.29 (br. s, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.48 (br. s, 4H, CH₂-(CH₂)₂-CH₂); ¹³C-NMR (128.0 MHz, DMSO, 300 K): δ = 175.0, 172.9, 172.0, 156.7, 156.4, 50.1, 40.5, 36.8, 35.3, 30.8, 28.1, 21.3; HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 14.0 min; ESI-MS: m/z 346.3 (100) [M + H⁺].

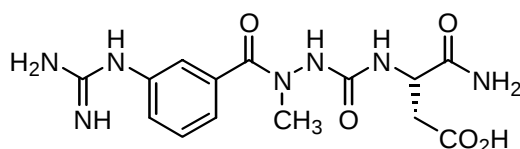


Gua- cisCyh-azaSar-Asp-NH₂ (146):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.300 g, 0.18 mmol/g, 54 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 die Verbindung **146** (16.6 mg, 83% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, 320 K (Probe enthält PEG (s bei δ = 3.52))): δ = 8.49 (br. s, 1H, N-NH), 7.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H₂N-CN₂-NH), 7.23-6.82 (m, 4H, H₂N-CN₂-NH), 6.70-6.58 (m, 2H, CO-NH₂), 6.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CO-NH-CH), 4.40 (m_c, 1H, NH-CH-CO), 3.74-3.62 (m, 1H, NH-CH(CH₂)₂),

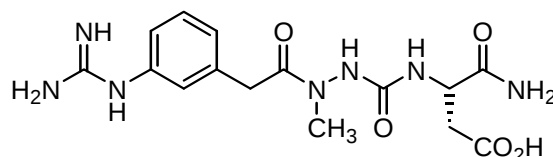
2.96 (s, 3H, N-CH₃), 2.79-2.69 (m, 1H, (CH₂)₂CH-CO), AB-Signal ($\delta_A = 2.65$, $\delta_B = 2.57$, $J_{AB} = 16.0$, zusätzlich aufgespalten durch $J_{A,H(\alpha)} = 5.4$ Hz und $J_{B,H(\alpha)} = 7.3$ Hz, 2H, CH-CH₂-CO₂H), 1.74-1.37 (m, 8H, aliphat.); ¹³C-NMR (128.0 MHz, DMSO, 300 K): $\delta = 177.9$ und 177.5 (Singulett-Paar)*, 172.8 , 171.9 , 156.5 , 155.9 , 50.0 , 45.8 und 43.1 (Singulett-Paar)*, 36.8 (2C), 35.4 , 28.6 , 23.3 (br. s); HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 16.0$ min; ESI-MS: m/z 372.4 (100) [M + H⁺]. *Wie im HMQC-COSY- und HMBC-Spektrum zu erkennen ist, entsprechen die Singulett-Paare einem Kohlenstoffatom und resultieren aus zwei verschiedenen Konformationen.



Gua-Mab-azaSar-Asp-NH₂ (147):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.308 g, 0.18 mmol/g, 55 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **147** (20.4 mg, quant. Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **147** (10.0 mg, 38%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 14.8$ min; ESI-MS: m/z 366.3 (100) [M + H⁺].

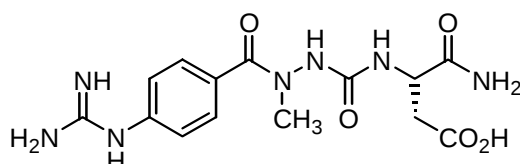


Gua-Mape-azaSar-Asp-NH₂ (148):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.311 g, 0.18 mmol/g, 56 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die

Verbindung **148** (19.7 mg, 93% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **148** (12.3 mg, 45%) als farblosen Feststoff.

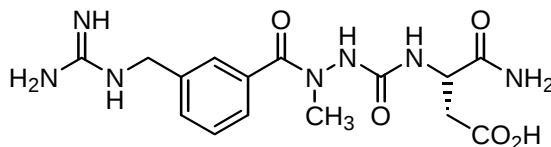
HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 20.6$ min; ESI-MS: m/z 380.3 (100) $[M + H^+]$.



Gua-Pab-azaSar-Asp-NH₂ (149):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.369 g, 0.18 mmol/g, 66 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **149** (17.9 mg, 74% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **149** (14.8 mg, 47%) als farblosen Feststoff.

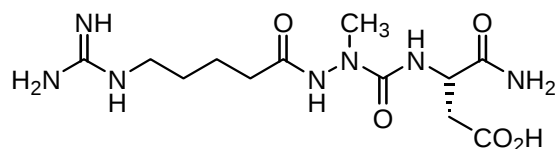
HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 11.6$ min; ESI-MS: m/z 366.3 (100) $[M + H^+]$.



cis-Gua-Mamb-azaSar-Asp-NH₂ (150):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.289 g, 0.18 mmol/g, 52 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **150** (17.3 mg, 88% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

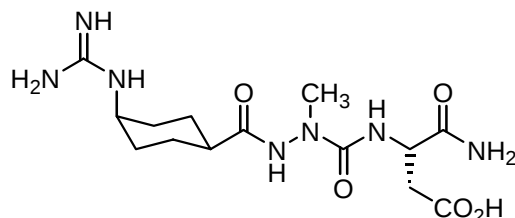
ESI-MS: m/z 759.2 (20) $[2M + H^+]$, 380.2 (100) $[M + H^+]$.



Gua- δ Ava-azaAla-Asp-NH₂ (151):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.306 g, 0.18 mmol/g, 55 μ mol) ergab nach AAV 5 (12 h), 8, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **151** (18.9 mg, quant. Rohausbeute) als gelben Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, 320 K (Probe enthält PEG (s bei δ = 3.51))): δ = 9.94 (s, 1H, N-NH), 8.11 (br. s, 1H, H₂N-CN_H₂-NH), 7.30-6.75 (m, 7H, H₂N-CN_H₂-NH, CO-NH₂, CO-NH-CH), 4.27 (m_c, 1H, NH-CH-CO), 3.11 (m_c, 2H, NH-CH₂-CH₂), 2.93 (s, 3H, N-CH₃), 2.59-2.55 (m, 2H, CH-CH₂-CO₂H), 2.23-2.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.66-1.43 (m, 4H, CH₂-(CH₂)₂-CH₂); ¹³C-NMR (128.0 MHz, DMSO, 300 K): δ = 173.6, 173.1, 172.1, 157.1, 156.9, 50.7, 40.3, 36.4, 35.7, 32.7, 27.8, 21.8; HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 12.0 min; ESI-MS: *m/z* 691.2 (30) [2M+ H⁺], 346.1 (100) [M + H⁺].

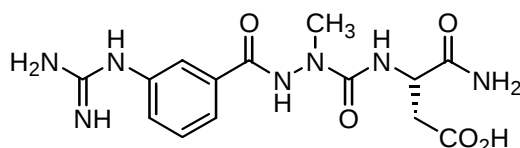


Gua- cisCyh-azaAla-Asp-NH₂ (152):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.261 g, 0.18 mmol/g, 47 μ mol) ergab nach AAV 5 (12 h), 8, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **152** (17.1 mg, 98% Rohausbeute) als gelben Feststoff. Reinigung per HPLC (0-20% in 30 min) ergab **152** (11.0 mg, 48%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, 320 K): δ = 9.91 (s, 1H, N-NH), 7.48 (br. s, 1H, H₂N-CN_H₂-NH), 7.19-6.78 (m, 6H, H₂N-CN_H₂-NH, CO-NH₂), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CO-NH-CH), 4.34 (m_c, 1H, NH-CH-CO), 3.65 (br. s, 1H, NH-CH(CH₂)₂), 2.92 (s, 3H, N-CH₃), 2.62 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH-CH₂-CO₂H), 2.31 (m_c, 1H, (CH₂)₂CH-CO), 1.78-1.55 (m, 8H, aliphat); ¹³C-NMR

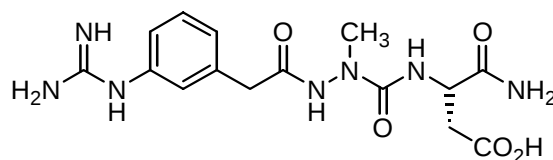
(128.0 MHz, DMSO, 300 K): δ = 174.5, 173.2, 172.5, 157.2, 155.9, 50.4, 46.1, 38.9, 36.1, 35.6, 28.5, 23.6 und 23.3 (Singulett-Paar)*; HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 19.2 min; ESI-MS: m/z 743.3 (30) $[2M + H^+]$, 372.2 (100) $[M + H^+]$. *Wie im HMQC-COSY-Spektrum zu erkennen ist, entsprechen die Singulett-Paare einem Kohlenstoffatom und resultieren aus zwei verschiedenen Konformationen.



Gua-Mab-azaAla-Asp-NH₂ (153):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.335 g, 0.16 mmol/g, 54 μ mol) ergab nach AAV 5 (12 h), 8, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **153** (14.9 mg, 75% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

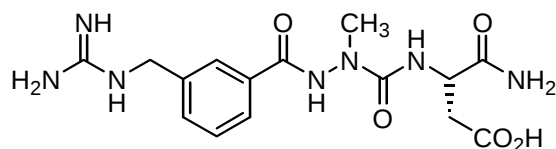
HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 22.8 min; ESI-MS: m/z 366.1 (100) $[M + H^+]$.



Gua-Mape-azaAla-Asp-NH₂ (154):

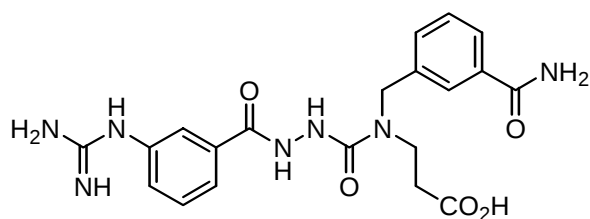
Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.347 g, 0.16 mmol/g, 56 μ mol) ergab nach AAV 5 (12 h), 8, 9, 11, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **194** (18.3 mg, 86% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 24.4 min; ESI-MS: m/z 759.1 (20) $[2M + H^+]$, 380.2 (100) $[M + H^+]$.


Gua-Mamb-azaAla-Asp-NH₂ (155):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.285 g, 0.16 mmol/g, 46 μ mol) ergab nach AAV 5 (12 h), 8, 9, 10, 14 (95:5 TFA/H₂O-Gemisch, 1 h) und 17 (6 h) die Verbindung **155** (16.1 mg, 92% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

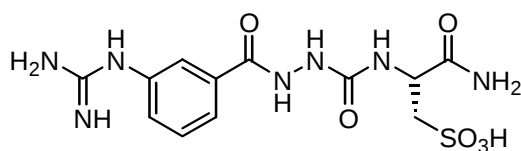
HPLC (0-20% in 30 min) R_t = 24.8 min; ESI-MS: m/z 380.2 (100) [$M + H^+$].


Gua-Mab-azaGly- N- β PraMamb-NH₂ (137):

N- β Pra(Bu)Mamb-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (**57**) (0.192 g, 0.36 mmol/g, 55 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 11, 14 (50:50:5 TFA/CH₂Cl₂/TIPS-Gemisch, 1.5 h) und 17 (6 h) die Verbindung **137** (9.45 mg, 39% Rohausbeute) als gelben Feststoff.

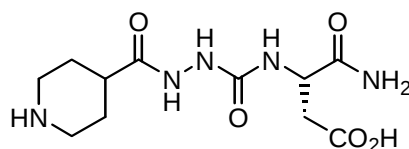
HPLC (10-90% in 30 min (verunreinigt mit 59% M - 18 bei R_t = 9.7 min))

R_t = 8.6 min; ESI-MS: m/z 442.0 (60) [$M + H^+$], 424.1 (100) [$M - H_2O + H^+$].


Gua-Mab-azaGly-Cysa-NH₂ (135):

Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel (0.394 g, 0.17 mmol/g, 67 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9, 11, 14 (50:50:5 TFA/CH₂Cl₂/TIPS-Gemisch, 1.5 h) und 17 (6 h) die Verbindung **135** (21.4 mg, 81% Rohausbeute) als braunen Feststoff.

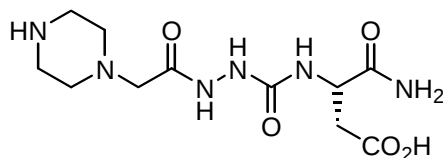
HPLC (0-20% in 30 min) $R_t = 9.0$ min; ESI-MS: m/z 426.0 (10) $[M + K^+]$, 410.0 (20) $[M + Na^+]$, 388.0 (80) $[M + H^+]$.



H-Inp-azaGly-Asp-NH₂ (171a):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **171a** (49.8 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

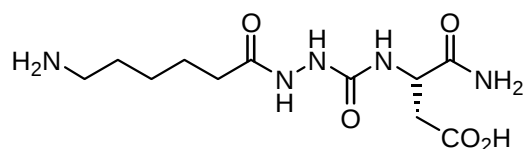
HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 1.8$ min; ESI-MS: m/z 641.0 (10) $[2M + K^+]$, 603.0 (30) $[2M + H^+]$, 302.1 (100) $[M + H^+]$.



H-Cmp-azaGly-Asp-NH₂ (174a):

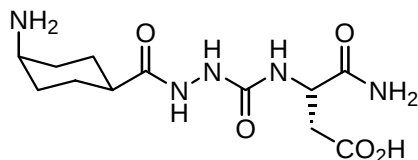
Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **174a** (59.9 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 1.8$ min; ESI-MS: m/z 671.1 (20) $[2M + K^+]$, 632.9 (10) $[2M + H^+]$, 317.1 (100) $[M + H^+]$.

**H-εAhx-azaGly-Asp-NH₂ (170a):**

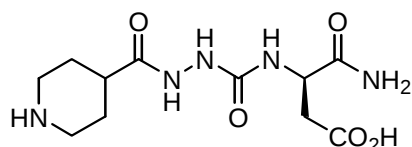
Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μmol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **170a** (47.6 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 2.2$ min; ESI-MS: m/z 645.1 (20) $[2M + K^+]$, 606.9 (10) $[2M + H^+]$, 304.1 (100) $[M + H^+]$.

**H-cisCyh-azaGly-Asp-NH₂ (173a):**

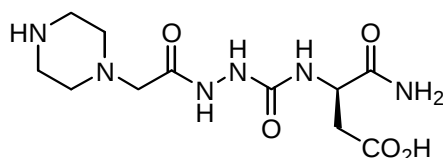
Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μmol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **173a** (47.7 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 2.2$ min; ESI-MS: m/z 669.2 (10) $[2M + K^+]$, 631.1 (20) $[2M + H^+]$, 316.0 (100) $[M + H^+]$.

**H-Inp-azaGly-D-Asp-NH₂ (171b):**

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μmol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **171b** (48.3 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

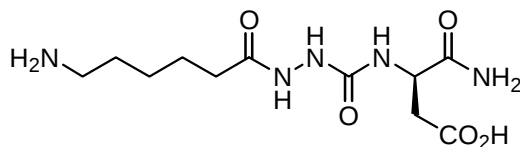
HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 1.9$ min; ESI-MS: m/z 603.0 (20) $[2M + H^+]$, 302.1 (100) $[M + H^+]$.



H-Cmp-azaGly-D-Asp-NH₂ (174b):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **174b** (59.2 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

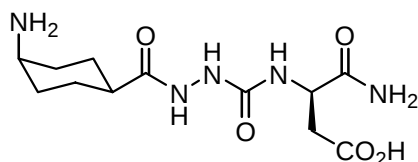
HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 1.8$ min; ESI-MS: m/z 671.0 (10) $[2M + K^+]$, 633.0 (10) $[2M + H^+]$, 317.1 (100) $[M + H^+]$.



H-εAhx-azaGly-D-Asp-NH₂ (170b):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **170b** (42.2 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

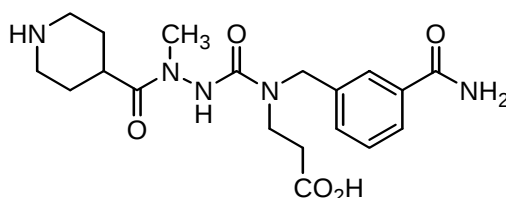
HPLC (0-60% in 20 min) $R_t = 2.2$ min; ESI-MS: m/z 606.9 (10) $[2M + H^+]$, 304.1 (100) $[M + H^+]$.



H-cisCyh-azaGly-D-Asp-NH₂ (173b):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.20 g, 0.43 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 6, 9 und 16 die Verbindung **339d** (51.0 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff.

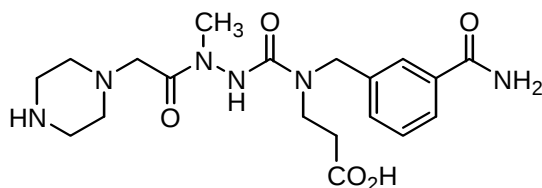
HPLC (0-60% in 20 min) R_t = 2.2 min; ESI-MS: m/z 631.0 (20) [$2M + H^+$], 316.0 (100) [$M + H^+$].



H-Inp-azaSar-N- β PraMamb-NH₂ (172):

Rink-Amid-MBHA-Harz-gebundenes **57** (0.168 g, 0.50 mmol/g, 84 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9 und 16 die Verbindung **172** (89.0 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **172** (36.3 mg, 83%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 16.6 min; ESI-MS: m/z 832.9 (20) [$2M + Na^+$], 811.0 (15) [$2M + H^+$], 428.1 (30) [$M + Na^+$], 406.1 (100) [$M + H^+$].

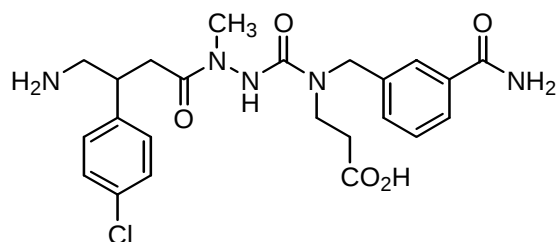


H-Cmp-azaSar-N- β PraMamb-NH₂ (175):

Rink-Amid-MBHA-Harz-gebundenes **57** (0.169 g, 0.50 mmol/g, 84 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9 und 16 die Verbindung **175** (80.8 mg, quant. Rohausbeute)

als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **175** (37.7 mg, 84%) als farblosen Feststoff.

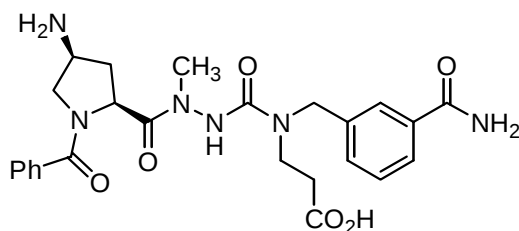
HPLC (0-30% in 30 min) $R_t = 15.7$ min; ESI-MS: m/z 879.0 (20) $[2M + K^+]$, 459.1 (30) $[M + K^+]$, 443.1 (40) $[M + Na^+]$, 421.1 (100) $[M + H^+]$.



H-Cpb-azaSar-N- β PraMamb-NH₂ (**176**):

Rink-Amid-MBHA-Harz-gebundenes **57** (0.231 g, 0.50 mmol/g, 115 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9 und 16 die Verbindung **176** (130.8 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-60% in 30 min) ergab **176** (40.0 mg, 43%) als farblosen Feststoff.

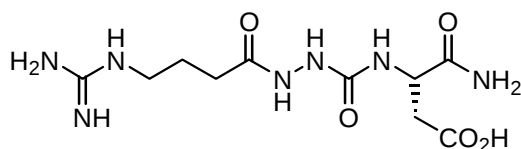
HPLC (0-60% in 30 min) $R_t = 17.0$ min; ESI-MS: m/z 1016.9 (30) $[2M + K^+]$, 978.8 (30) $[2M + H^+]$, 490.0 (100) $[M + H^+]$.



H-(2S,4S)-Azpc-azaSar-N- β PraMamb-NH₂ (**178**):

Rink-Amid-MBHA-Harz-gebundenes **57** (0.179 g, 0.43 mmol/g, 77 μ mol) ergab nach AAV 5 (1.5 h), 7, 9 und 16 die Verbindung **178** (56.0 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **178** (31.4 mg, 65%) als farblosen Feststoff.

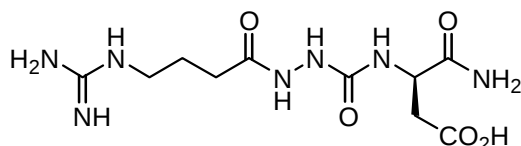
HPLC (0-30% in 30 min) $R_t = 15.7$ min; ESI-MS: m/z 1042.9 (30) $[2M + Na^+]$, 533.1 (60) $[M + Na^+]$, 511.0 (100) $[M + H^+]$.



Gua-γAbu-azaGly-Asp-NH₂ (186a):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μmol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 10 und 16 die Verbindung **186a** (45.0 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **186a** (27.9 mg, 75%) als farblosen Feststoff.

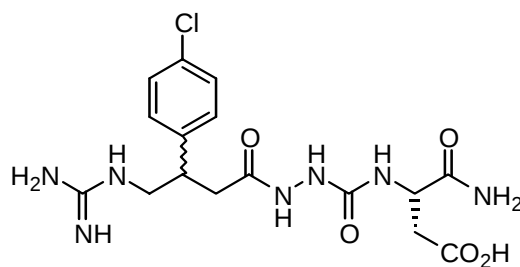
HPLC (0-30% in 30 min) $R_t = 6.4$ min; ESI-MS: m/z 635.1 (20) $[2M + H^+]$, 318.1 (100) $[M + H^+]$.



Gua-γAbu-azaGly-D-Asp-NH₂ (186b):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μmol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 10 und 16 die Verbindung **186b** (38.4 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **186b** (21.9 mg, 59%) als farblosen Feststoff.

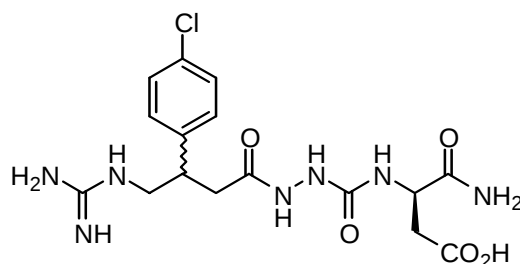
HPLC (0-30% in 30 min) $R_t = 6.1$ min; ESI-MS: m/z 635.1 (20) $[2M + H^+]$, 318.1 (100) $[M + H^+]$.



Gua-Cpb-azaGly-Asp-NH₂ (**187a**):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 10 und 16 die Verbindung **187a** (54.8 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **187a** (24.8 mg, 53%) als farblosen Feststoff.

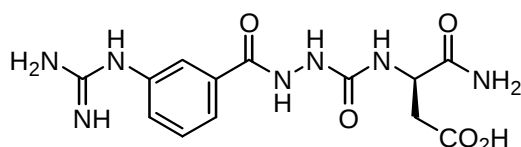
HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 20.7 min; ESI-MS: m/z 854.9 (15) [$2M + H^+$], 428.1 (100) [$M + H^+$].



Gua-Cpb-azaGly-D-Asp-NH₂ (**187b**):

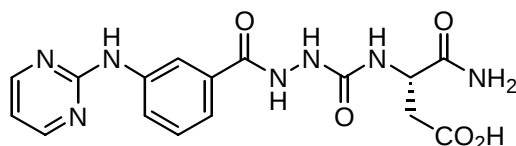
Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 10 und 16 die Verbindung **187b** (57.8 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **187b** (28.5 mg, 61%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 21.6 min; ESI-MS: m/z 855.0 (20) [$2M + H^+$], 428.1 (100) [$M + H^+$].


Gua-Mab-azaGly-L-Asp-NH₂ (141b):

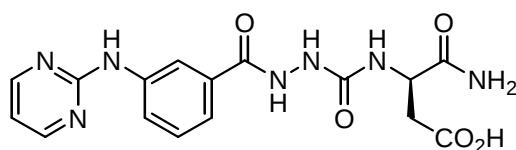
Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 11 und 16 die Verbindung **141b** (47.1 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-30% in 30 min) ergab **141b** (18.2 mg, 45%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-30% in 30 min) R_t = 9.0 min; ESI-MS: m/z 703.1 (20) $[2M + H^+]$, 352.0 (80) $[M + H^+]$.


Pym-Mab-azaGly-Asp-NH₂ (188a):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 13 und 16 die Verbindung **188a** (49.9 mg, quant. Rohausbeute) als farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-60% in 30 min) ergab **188a** (26.9 mg, 62%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-60% in 30 min) R_t = 12.2 min; ESI-MS: m/z 813.0 (40) $[2M + K^+]$, 797.0 (60) $[2M + Na^+]$, 774.9 (20) $[2M + H^+]$, 410.1 (40) $[M + Na^+]$, 388.0 (100) $[M + H^+]$.


Pym-Mab-azaGly-D-Asp-NH₂ (188b):

Rink-Amid-MBHA-Harz (0.15 g, 0.56 mmol/g, 86 μ mol) ergab nach AAV 4, 5 (1.5 h), 6, 9, 13 und 16 die Verbindung **188b** (59.9 mg, quant. Rohausbeute) als

farblosen Feststoff. Reinigung per HPLC (0-60% in 30 min) ergab **188b** (29.7 mg, 69%) als farblosen Feststoff.

HPLC (0-60% in 30 min) $R_t = 12.2$ min; ESI-MS: m/z 813.0 (20) $[2M + K^+]$, 796.9 (20) $[2M + Na^+]$, 774.9 (20) $[2M + H^+]$, 388.0 (100) $[M + H^+]$.

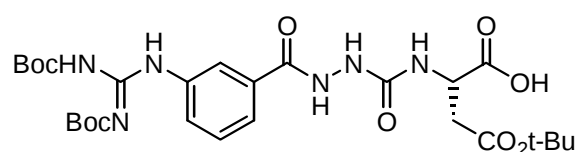
9.3.3 Kombinatorische Synthese von aza-RGD-Mimetika nach der Split-Methode^[150,182]:

Die kombinatorische Synthese der aza-RGD-Mimetika wurde an TentaGel Macrobeads (280-320 μm) durchgeführt. Um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten, wurden daher die in AVV 5-14 beschriebenen Reaktionszeiten sowie die Dauer der Waschschriffe verdoppelt.^[263] Beim Schrumpfen der Macrobeads wurde zuerst mit einem 1:1-Gemisch aus zuletzt verwendetem Lösungsmittel und Et_2O , dann mit einem 1:4-Gemisch und abschließend mit reinem Et_2O gewaschen. Zum Quellen der Macrobeads erfolgte die Lösungsmittelzugabe in umgekehrter Reihenfolge. Durch diese Vorgehensweise konnte das Zerschneiden von Macrobeads weitgehend verhindert werden.

Sechs 10 mL-Kunststoffspritzen mit PP-Fritte wurden jeweils mit Fmoc-entschütztem Aminoethyl-Photolinker-TentaGel-MB-Harz (180 mg, 0.29 mmol/g, 52 μmol) beladen. In einem Reaktionsgefäß wurde *N*- β Pra(Bu)Mamb (**57**) nach der oben beschriebenen Submonomermethode aufgebaut. In den übrigen Reaktionsgefäßen wurden nach AAV 5 (5 h) die Aminosäuren Fmoc-D,L-Asp(Bu)-OH (**37/38**), Fmoc-D,L-Glu-OH (**39/40**), Fmoc-Cpdc(2Bu)-OH (**52a**)/Fmoc-Cpdc(5Bu)-OH (**52b**) als 62:38-Isomerengemisch, Fmoc-Idp(Bu)-OH (**47**) und Fmoc-Cysa-OH·(DIPEA)_{2.7} (**43**) getrennt an die Harze gekuppelt und anschließend nach AAV 9 Fmoc-entschützt. Die Harze wurden als Suspension in DMF mit Hilfe einer Pipette in eine 10 mL-Spritze mit PP-Fritte transferiert, deren Leergewicht zuvor bestimmt wurde. Das überschüssige DMF wurde dabei durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Die vereinigten Harze wurden anschließend in DMF suspendiert, 15 min durch Rotation über Kopf durchmischt, in Et_2O geschrumpft und im Vakuum getrocknet. Danach betrug die Gesamtmasse des Harzes 1.169 g. Man erhielt drei mit gleicher Harzmenge

beladene Reaktionsgefäße, indem in zwei 10 mL-Spritzen mit PP-Fritte jeweils 0.290 g des Harzes übertragen wurde. Nach AAV 6-8 wurden die aktivierten Fmoc-geschützten Azaaminosäuren 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-on (**101**), Fmoc-azaSar-Cl (**102**) und Fmoc-azaAla-Cl (**103**) getrennt mit den Harzen zur Reaktion gebracht und anschließend nach AAV 9 Fmoc-entschützt. Gemäß der oben beschriebenen Methode wurden die drei Harzportionen vereinigt (1.165 g), gemischt und auf 10 Reaktionsgefäße (je 0.116 g) aufgeteilt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren Fmoc- γ Abu-OH (**73**), Fmoc- δ Ava-OH (**74**), Fmoc-Inp-OH (**76**), Fmoc- ϵ Ahx-OH (**75**), Fmoc-Mab-OH (**66**), Fmoc-*cis*Cyh-OH (**72**), Fmoc-Cmp-OH (**77**), Fmoc-Mape-OH (**70**), Fmoc-Cpb-OH (**64**) sowie Fmoc-(2*S*,4*S*)-Azpc-OH (**78**) wurden nach AAV 5 (16 h) getrennt an die Harze gekuppelt und anschließend nach AAV 9 Fmoc-entschützt. Jedem Reaktionsgefäß wurden ca. 85 mg Harz entnommen, nach der oben beschriebenen Methode, vereinigt (0.859 g), gemischt und auf zwei Reaktionsgefäße (je 0.430 g) aufgeteilt. Der eine Teil wurde zuerst nach AAV 10 dann nach AAV 11 guanyliert, der andere zuerst nach AAV 12 dann nach AAV 13 pyrimidylt. Abschließend wurden die Bibliotheken jeweils gemäß AAV 14 seitenkettenentschützt.

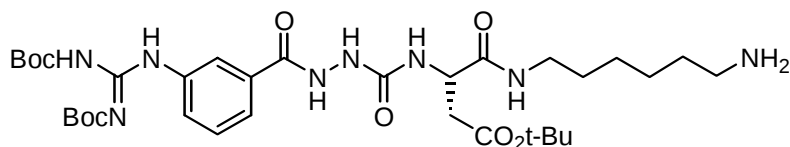
9.3.4 Synthese eines aza-RGD-Mimetikums mit Acrylatanker



Gua(Boc)₂-Mab-azaGly-Asp(Bu)-OH (**189**):

Asp(Bu)-TCP-Harz (1.00 g, 0.6 mmol/g, 0.6 mmol) ergab nach AAV 3, 5 (1.5 h), 6, 9, 11 und 15 die Verbindung **189** (75.5 mg, 21% Rohausbeute) als farbloses Öl.

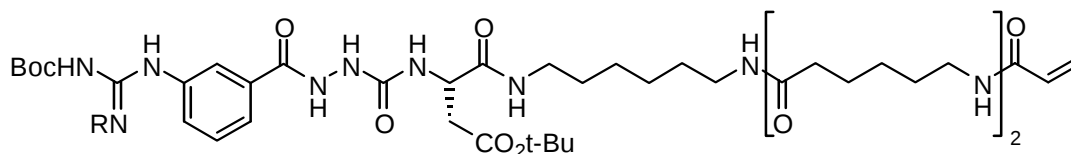
HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 21.9 min; ESI-MS: m/z 1239.1 (30) [2M + Na⁺], 1217.0 (30) [2M + H⁺], 631.1 (30) [M + Na⁺], 609.0 (100) [M + H⁺].



Gua(Boc)₂-Mab-azaGly-Asp(Bu)-Hda-H (**190**):

Gua(Boc)₂-Mab-azaGly-Asp(Bu)-OH (**189**) (75.2 mg, 0.123 mmol), HOAt (16.8 mg, 0.124 mmol, 1.0 Äquiv.) und HATU (56.5 mg, 0.148 mmol, 1.2 Äquiv.) wurden in wasserfreiem DMF (1.5 mL) gelöst und anschließend mit Collidin (163 µL, 149 mg, 1.23 mmol, 10 Äquiv.) versetzt. Nach 2 h wurde diese Lösung unter heftigem Rühren bei 10 °C innerhalb 5 min zu einer Lösung von 1,6-Diaminohexan (0.287 g, 2.47 mmol, 20 Äquiv.) in DMF (2 mL) getropft. Man beließ die Reaktion 10 min bei dieser Temperatur und rührte dann weitere 70 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Ölpumpenvakuum eingengt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ (15 mL) aufgenommen und mit H₂O (2 × 15 mL) extrahiert. Einengen im Vakuum ergab die Verbindung **190** (82.2 mg, 95% Rohausbeute) als braunen Feststoff.

HPLC (10-90% in 30 min) R_t = 20.1 min; ESI-MS: m/z 1435.2 (30) [2M + Na⁺], 1413.2 (30) [2M + H⁺], 729.2 (60) [M + Na⁺], 707.2 (100) [M + H⁺].



191a R = H
191b R = Boc

2:1-Gemisch von Gua(Boc)-Mab-azaGly-Asp(Bu)-Hda-εAhx-εAhx-Aca (**191a**) und Gua(Boc)₂-Mab-azaGly-Asp(Bu)-Hda-εAhx-εAhx-Aca (**191b**):

6-{{[6-(allanoylamino)hexanoyl]amino}hexansäure (Aca-εAhx-εAhx-OH) (69 mg, 0.23 mmol, 2.0 Äquiv.) und HATU (97 mg, 0.26 mmol, 2.2 Äquiv.) wurden in wasserfreiem DMF (2.5 mL) gelöst und anschließend mit Collidin (340 µL, 310 mg, 2.6 mmol, 22 Äquiv.) versetzt. Nach 1 h wurde unter Rühren innerhalb 5 min eine Lösung von Gua(Boc)₂-Mab-azaGly-Asp(Bu)-Hda-H (**190**) (82.0 mg, 0.116 mmol) in DMF (1 mL) zugetropft. Nach 2 h wurde das Reaktionsgemisch im Ölpumpenvakuum

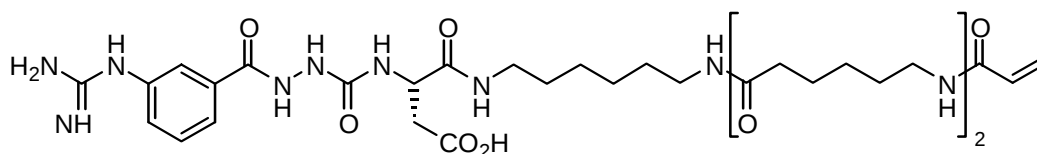
eingengt. Der Rückstand wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus CH_2Cl_2 (1 mL) und TFE (250 μL) aufgenommen und langsam zu CH_3CN (35 mL) getropft. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der durch Zentrifugieren und Abdekandieren abgetrennt wurde. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung per HPLC (30-80% in 30 min) ergab ein Gemisch von **191a** und **191b** im HPLC-Integralverhältnis von 2:1 (33.9 mg, 32%) als farblosen Feststoff.

191a:

HPLC (10-90% in 20 min) $R_t = 11.8$ min; ESI-MS: m/z 909.3 (70) $[\text{M} + \text{Na}^+]$, 887.3 (40) $[\text{M} + \text{H}^+]$.

191a:

HPLC (10-90% in 20 min) $R_t = 16.8$ min; ESI-MS: m/z 1009.3 (90) $[\text{M} + \text{Na}^+]$.

**Gua-Mab-azaGly-Asp-Hda-εAhx-εAhx-Aca (192):**

Ein 2:1-Gemisch von **191a** und **191b** (33 mg, 36 μmol) wurde in CH_2Cl_2 (0.5 mL) suspendiert und anschließend mit einem 95:5 TFA/ H_2O -Gemisch versetzt. Nach 1 h wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Lyophilisieren aus H_2O ergab die Verbindung **192** (29.0 mg, 95%, verunreinigt mit 10% der entguanylierten Verbindung) als farblosen Feststoff.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO): $\delta = 10.31$ (s, 1H, Ar-CO-NH-NH), 10.02 (s, 1H, NH-Ar), 8.24 (s, 1H, Ar-CO-NH-NH), 8.04 (m_c , 1H, CO-NH) 7.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, arom), 8.24-7.50 (m, 8H, $2 \times$ Ar-H, $\text{H}_2\text{N-CNH}_2\text{-NH}$, $2 \times$ CO-NH), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, arom), 7.17-7.09 (m, 1H, CO-NH), 6.80 (br. s, 1H, NH-NH-CO-NH), 6.19 (dd, $J = 17.2, 10.1$ Hz, 1H, CO-CH=CH₂), 6.04 (dd, $J = 17.1, 2.1$ Hz, 1H, CO-CH=CH^{cis}H^{trans}), 5.54 (dd, $J = 10.1, 2.1$ Hz, 1H, CO-CH=CH^{cis}H^{trans}), 4.42 (dt, $J = J' = 7.9$ Hz, 1H, NH-CH-CO), 3.13-2.94 (m, 8H, $4 \times$ CO-NH-CH₂) AB-Signal ($\delta_A = 2.63$, $\delta_B = 2.55$, $J_{AB} = 16.1$, zusätzlich

aufgespalten durch $J_{A,H(\alpha)} = 5.4$ Hz und $J_{B,H(\alpha)} = 7.2$ Hz, 2H, CH-CH₂-CO₂H), 2.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H, 2 × CO-CH₂), 1.51-1.15 (m, 20H, aliph.); ¹³C-NMR (125.0 MHz, DMSO): $\delta = 172.0, 171.83, 171.76, 170.6, 164.4, 157.6, 155.8, 135.6, 133.9, 131.9, 129.8, 127.6, 125.3, 124.7, 123.4, 50.1, 38.7, 38.4, 38.3, 38.2, 35.3, 29.0, 28.9, 28.8, 26.1, 25.9, 25.0$; HPLC (10-80% in 30 min) $R_t = 10.6$ min; ESI-MS: m/z 753.3 (10) [M + Na⁺], 731.3 (100) [M + H⁺].

9.4 On-bead screening und Analyse der aza-RGD-Bibliotheken

9.4.1 Zusammensetzung der screening-Lösungen

Bindungspuffer:

In H₂O (800 mL) werden gelöst: TRIS (6.06 g, 50.0 mmol)

NaCl (14.6 g, 250 mmol)

CaCl₂ · (H₂O)₆ (0.219 g, 1.00 mmol)

MgCl₂ · (H₂O)₆ (0.203 g, 1.00 mmol)

MnSO₄ (1.7 mg, 10 μmol)

BSA Fraktion V (1.00 g)

Tween 20 (1.00 mL)

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 2N HCl auf 7.4 eingestellt. Anschließend wird mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

Blockierungspuffer:

Dazu wird BSA (330 mg) in Bindungspuffer (10 mL) gelöst.

Biotinantikörperlösung:

Das monoklonale Biotinantikörper-Alkalinphosphatase-Konjugat (A-6561, Sigma) wird mit Bindungspuffer 1:10000 verdünnt.

AP-Entwickler:

In H₂O (800 mL) werden gelöst: TRIS (12.1 g, 100. mmol)

NaCl (5.84 g, 100 mmol)

$\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ (1.02 g, 5.00 mmol)

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 2N HCl auf 9.5 eingestellt. Anschließend wird mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

Substratlösungen:

NBT/BCIP-Lösung: NBT (2.5 mg) und BCIP (1.0 mg) werden jeweils in DMF (400 μL) mit Hilfe eines Ultraschallbades suspendiert und anschließend zur AP-Entwickler-Lösung (10 mL) gegeben.

BCIP-Lösung: BCIP (2.0 mg) wird in DMF (400 μL) mit Hilfe eines Ultraschallbades suspendiert und anschließend zur AP-Entwickler-Lösung (10 mL) gegeben.

9.4.2 On-bead screening- und Analysemethoden

Protokoll des on-bead screenings einer aza-RGD-Bibliothek, die 180 unterscheidbare beads enthält:

Die TentaGel-MB-gebundene aza-RGD-Bibliothek (14.3 mg, ca. 940 beads, 5.2facher Überschuß) wurde in eine 2 mL-Spritze mit PP-Fritte gegeben. Anschließend wurden die beads in Blockierungspuffer (1.6 mL) suspendiert und 1 h bei 37 °C mit Hilfe eines Orbitalschüttlers mit 120 rpm geschüttelt. Das Harz wurde mit Bindungspuffer (3×1.6 mL) jeweils 10 min gewaschen und dabei mit ca. 15 rpm über Kopf bei Raumtemperatur rotiert. Danach wurden die beads mit biotinyliertem $\alpha\text{v}\beta 3$ -Rezeptor (0.4 $\mu\text{g/mL}$ in Bindungspuffer, 1.6 mL) über einen Zeitraum von 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit Bindungspuffer (3×1.6 mL) jeweils 10 min bei Raumtemperatur gewaschen und 1 h mit Biotinantikörperlösung (1.6 mL) bei 37 °C inkubiert. Das Harz wurde anschließend mit Bindungspuffer (5×1.6 mL) jeweils 4 min bei Raumtemperatur gewaschen und dann mit BCIP-Lösung (1.6 mL) versetzt. Nach 25 min Rotieren bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Waschen mit H_2O (5×2 mL, je 3 min) unterbrochen.

Analyse der positiven *beads*

Nach dem *on-bead screening* wurde die TentaGel-MB-gebundenen aza-RGD-Bibliotheken als Suspension in H₂O (ca. 1.5 mL) mit einer Pipette jeweils in eine Vertiefung einer 24er Mikrotiterplatte transferiert. Die Bibliotheken wurden mit einem Stereomikroskop bei ca. 40facher Vergrößerung auf Anwesenheit von positiven (gefärbten) *beads* untersucht. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden angefärbte *beads* einzeln entnommen. *Beads*, die aus der selben Bibliothek isoliert wurden und die gleiche Farbtintensität aufwiesen, wurden zusammen in ein 1.5 mL PP-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluß gegeben. Man gab zu den *beads* DMSO (1 mL) und rotierte die Reaktionsgefäße 48 h mit ca. 15 rpm bei Raumtemperatur über Kopf. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert und die Überstände wurden vorsichtig mit einer Pipette abgetrennt. Dieser Waschschrift wurde mit einem 4:1 CH₃CN/H₂O-Gemisch viermal wiederholt, wobei die Waschzeit jeweils 3 h betrug. Danach wurden die *beads* mit CH₃CN (2 × 1 mL, je 20 min) und einem 4:1 CH₂Cl₂/Et₂O-Gemisch (1 × 1 mL, 20 min) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden in die Reaktionsgefäße jeweils eine Lösung von Boc₂O (20 mg, 92 µmol) und DIPEA (8.1 µL, 5.9 mg, 46 µmol) in CH₂Cl₂ (0.54 mL) und Et₂O (0.06 mL) gegeben und 12 h bei Raumtemperatur mit 15 rpm rotiert. Anschließend wurden mit CH₃CN (3 × 1 mL, je 15 min) gewaschen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde jeweils ein *bead* in einen 250 µL-Injektions-Vial-Glaseinsatz (kein Kuststoffeinsatz!) gegeben. Mit einer Glasspritze (keine Kunststoffspritze!) wurde zu jedem *bead* ein 4:1 CH₃CN/H₂O-Gemisch (100 µL) so zugegeben, daß das *bead* vom Boden des Glaseinsatzes während der Lösungsmittelzugabe aufgewirbelt wurde. Nach 10 min wurde das Lösungsmittel mit einer Spritze entfernt. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Anschließend gab man nochmals ein 4:1 CH₃CN/H₂O-Gemisch (100 µL) zu jedem *bead* und verschloß die Glaseinsätze mit Parafilm. Die *beads* wurden mit einem 150 W Quecksilber-Hochdruckstrahler (TQ 150 Z2 von Heraeus) aus einer Entfernung von ca. 1 cm zuerst 4 h und nach einer Unterbrechung von 12 h nochmals 2 h bestrahlt. Nach weiteren 4 h wurde der Überstand mit einer Glasspritze entnommen und direkt per LC-MS und MSⁿ analysiert.

10 Literatur

- [1] D. Applegate, R. Bixby, V. Chvátal, W. Cook, *Doc. Math. J. DMV Extra Volume ICM III* **1998**, 645-656.
- [2] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, 4, 2868-2880.
- [3] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, 238, 491-497.
- [4] J. Travis, *Science* **1993**, 260, 906-908.
- [5] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, 69, 11-25.
- [6] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, S. 1-40.
- [7] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, R. O. Hynes, *Cell* **1986**, 46, 271-282.
- [8] S. Dedhar, *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, 6, 37-43.
- [9] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 220-231.
- [10] N. J. Boudreau, P. L. Jones, *Biochem. J.* **1999**, 339, 481-488.
- [11] J. S. Bennett, M. A. Kolodziej, G. Vilaire, M. Poncz, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3580-3585.
- [12] A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 3579-3585.
- [13] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, 80, 631-638.
- [14] D. C. Altier, *J. Immunol.* **1991**, 147, 1891-1898.
- [15] T. Yanai, T. Shimooka, I. Ii, *Cell. Struct. Funct.* **1991**, 16, 149-156.
- [16] M. Busk, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 5790-5796.
- [17] I. Dransfield, C. Cabanas, A. Craig, N. Hogg, *J. Cell Biol.* **1992**, 116, 219-226.
- [18] A. P. Mould, S. K. Akiyama, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26270-26277.
- [19] S. Suzuki, Y. Naitho, *EMBO J.* **1990**, 9, 757-763.
- [20] N. Dana, D. M. Fathallah, M. A. Arnaout, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 3106-3110.

- [21] R. Briesewitz, M. R. Epstein, E. E. Marcantonio, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 2989-2996.
- [22] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, 48, 549-554.
- [23] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, 3, 179-205.
- [24] D. J. Rees, S. E. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature* **1990**, 347, 685-689.
- [25] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, 373, 197.
- [26] R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, 373, 261-264.
- [27] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1990**, 111, 721-729.
- [28] T. A. Springer, *Nature* **1990**, 346, 425-434.
- [29] V. W. Engleman, M. S. Kellogg, T. W. Rogers, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, 191-200.
- [30] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T.-L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, 3, 545-584.
- [31] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, S. 101-121.
- [32] M. Paulsson, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, 27, 93-127.
- [33] K. Kühn, in *Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, S. 41-83.
- [34] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, 14, 195-228.
- [35] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, 44, 517-518.
- [36] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 246-250.
- [37] M. E. Hemler, C. Huang, L. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 3300-3309.
- [38] S. A. Santoro, J. J. Walsh, W. D. Staatz, K. J. Baranski, *Cell. Regul.* **1991**, 2, 905-913.
- [39] J. L. Duband, A. M. Belkin, J. Syfrig, J. P. Thiery, V. E. Koteliansky, *Development* **1992**, 116, 585-600.
- [40] V. M. Belkin, A. M. Belkin, V. E. Koteliansky, *J. Cell Biol.* **1990**, 111, 2159-2170.
- [41] D. Gullberg, K. R. Gehlsen, D. C. Turner, K. Ahlen, L. S. Zijenah, M. J. Barnes, K. Rubin, *EMBO J.* **1992**, 11, 3865-3873.

- [42] N. Tawil, P. Wilson, S. Carbonetto, *J. Cell Biol.* **1993**, 120, 261-271.
- [43] R. H. Kramer, N. Marks, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 4684-4688.
- [44] E. L. Palmer, C. Ruegg, R. Ferrando, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1993**, 123, 1289-1297.
- [45] G. O. Delwel, A. Sonnenberg, *Laminin isoforms and their integrin receptors*, CRC Press **1996**, S. 9-36.
- [46] A. M. Belkin, N. I. Zhidkova, F. Balzac, F. Altruda, D. Tomatis, A. Maier, G. Tarone, V. E. Koteliansky, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1996**, 132, 211-226.
- [47] R. H. Kramer, K. A. McDonald, M. P. Vu, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15642-15649.
- [48] D. M. Noonan, E. A. Horigan, S. R. Ledbetter, G. Vogeli, M. Sasaki, Y. Yamada, J. R. Hassell, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 16379-16387.
- [49] D. M. Noonan, A. Fulle, P. Valente, S. Cai, E. Horigan, M. Sasaki, Y. Yamada, J. R. Hassell, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 22939-22947.
- [50] A. Sonnenberg, J. Calafat, H. Janssen, H. Daams, L. M. van der Raaij-Helmer, R. Falcioni, S. J. Kennel, J. D. Aplin, J. Baker, M. Loizidou, et al., *J. Cell Biol.* **1991**, 113, 907-917.
- [51] L. M. Schnapp, J. M. Breuss, D. M. Ramos, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Cell Sci.* **1995**, 108, 537-544.
- [52] E. Ruoslahti, *Adv. Cancer Res.* **1999**, 76, 1-20.
- [53] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Cell* **1990**, 60, 849-859.
- [54] J. J. Calvete, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, 208, 346-360.
- [55] K. V. Honn, Y. Q. Chen, J. Timar, J. M. Onoda, J. S. Hatfield, S. E. Fligiel, B. W. Steinert, C. A. Diglio, I. M. Grossi, K. K. Nelson, et al., *Exp. Cell Res.* **1992**, 201, 23-32.
- [56] N. S. Cook, G. Kottirsch, H.-G. Zerwes, *Drugs of the Future* **1994**, 19, 135-159.
- [57] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 5. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim **1987**, S. 311-331.
- [58] R. J. Gould, *Perspectives in Drug Discovery and Desig* **1994**, 1, 537-548.
- [59] T. A. Springer, *Cell* **1994**, 76, 301-314.
- [60] K. Venstrom, L. Reichardt, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 419-431.

- [61] J. M. Breuss, N. Gillett, L. Lu, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Histochem. Cytochem.* **1993**, *41*, 1521-1527.
- [62] F. Balzac, A. M. Belkin, V. E. Koteliansky, Y. V. Balabanov, F. Altruda, L. Silengo, G. Tarone, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 171-178.
- [63] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475-1482.
- [64] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209-218.
- [65] J. Savill, I. Dransfield, N. Hogg, C. Haslett, *Nature* **1990**, *343*, 170-173.
- [66] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050-1058.
- [67] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47-54.
- [68] H. Le Breton, E. F. Plow, E. J. Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, *28*, 1643-1651.
- [69] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453-464.
- [70] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
- [71] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- [72] F. G. Giancotti, F. Mainiero, *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1198*, 47-64.
- [73] H. P. Hammes, M. Brownlee, A. Jonczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 529-533.
- [74] J. W. McLean, D. J. Vestal, D. A. Cheresh, S. C. Bodary, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17126-17131.
- [75] H. Ramaswamy, M. E. Hemler, *EMBO J.* **1990**, *9*, 1561-1568.
- [76] J. M. Lewis, D. A. Cheresh, M. A. Schwartz, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 1323-1332.
- [77] G. Poste, I. J. Fidler, *Nature* **1980**, *283*, 139-146.
- [78] L. A. Liotta, *Cancer. Res.* **1986**, *46*, 1-7.
- [79] R. O. Hynes, A. D. Lander, *Cell* **1992**, *68*, 303-322.
- [80] M. M. Zutter, G. Mazoujian, S. A. Santoro, *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 863-870.
- [81] K. Koretz, P. Schlag, L. Bousnell, P. Moller, *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 741-750.

- [82] P. G. Natali, M. R. Nicotra, C. Botti, M. Mottolese, A. Bigotti, O. Segatto, *Br. J. Cancer* **1992**, 66, 318-322.
- [83] L. Damjanovich, S. M. Albelda, S. A. Mette, C. A. Buck, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, 6, 197-206.
- [84] J. E. Bridges, P. Englefield, I. E. Boyd, W. R. Roche, E. J. Thomas, *Int. J. Gynecol. Cancer* **1995**, 5, 187-192.
- [85] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1991**, 88, 1924-1932.
- [86] J. F. Marshall, S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Polakova, I. R. Hart, *Int. J. Cancer.* **1991**, 49, 924-931.
- [87] R. M. Lafrenie, S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, F. W. Orr, *Eur. J. Cancer* **1994**, 14, 2151-2218.
- [88] J. I. Jones, M. E. Doerr, D. R. Clemmons, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, 6, 319-327.
- [89] H. Rabb, E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, G. Ramirez, *Am. J. Nephrol.* **1996**, 16, 402-408.
- [90] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3247-3254.
- [91] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, 235, 442-447.
- [92] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, 64, 327-336.
- [93] P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, 264, 569-571.
- [94] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, 79, 1157-1164.
- [95] J. Folkman, K. Watson, D. Ingber, D. Hanahan, *Nature* **1989**, 339, 58-61.
- [96] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 1, 50-54.
- [97] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. a. Cheresh, *Science* **1995**, 270, 1500-1502.
- [98] M. Barinaga, *Science* **1999**, 285, 1475.
- [99] A. Miyauchi, J. Alvarez, E. M. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, D. Cheresh, et al., *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 20369-20374.

- [100] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich, *Exp. Cell Res.* **1991**, 195, 368-375.
- [101] M. A. Horton, *Bone* **1995**, 17, 51S-53S.
- [102] G. Shankar, T. R. Gadek, D. J. Burdick, I. Davison, W. T. Mason, M. A. Horton, *Exp. Cell Res.* **1995**, 219, 364-371.
- [103] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, 132, 1411-1413.
- [104] D. L. Hern, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 39, 266-276.
- [105] A. Rezanian, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 9-19.
- [106] D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Gioranni, M. G. Ehrlich, R. F. Valentini, *Biomaterials* **1999**, 20, 2323-2331.
- [107] D. Delforge, M. Art, B. Gillon, M. Dieu, E. Delaive, M. Raes, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 180-186.
- [108] C. Roberts, C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6548-6555.
- [109] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle, *FEBS Lett.* **1998**, 5, 87-91.
- [110] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 587-590.
- [111] D. Finsinger, *Dissertation* **1997**, Technische Universität München.
- [112] B. A. Molitoris, J. Marrs, *Am. J. Med.* **1999**, 106, 583-592.
- [113] D. A. Hamerski, S. A. Santoro, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **1999**, 8, 9-14.
- [114] M. S. Goligorsky, H. Kessler, V. I. Romanov, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1998**, 13, 254-263.
- [115] M. S. Goligorsky, E. Noiri, H. Kessler, V. Romanov, *Kidney International* **1997**, 51, 1487-1492.
- [116] V. Romanov, E. Noiri, G. Czerwinski, D. Finsinger, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney. Int.* **1997**, 52, 93-102.
- [117] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 911-921.

- [118] M. S. Goligorsky, G. F. DiBona, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5700-5704.
- [119] E. Noiri, V. Romanov, T. Forest, J. Gailit, G. F. DiBona, F. Miller, P. Som, Z. H. Oster, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1995**, 48, 1375-1385.
- [120] P. L. Barker, R. R. Webb, *Antiplatelet and antithrombotic agents: From viper venom proteins, to peptides and peptidomimetics to small organic molecules*, Vol. 3, JAI Press Inc., London **1995**, S. 57-111.
- [121] I. Ojima, S. Chakravarty, Q. Dong, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 337-360.
- [122] D. A. Cheresch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 6471-6475.
- [123] D. A. Cheresch, R. C. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17703-17711.
- [124] G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins* **1993**, 15, 235-251.
- [125] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. T. J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233-20238.
- [126] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1328-1335.
- [127] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440-1456.
- [128] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461-7472.
- [129] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7881-7891.
- [130] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033-3040.
- [131] H. N. Lode, T. Moehler, R. Xiang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1591-1595.
- [132] J. Wermuth, *Dissertation* **1996**, Technische Universität München.
- [133] J. S. Schmitt, *Dissertation* **1998**, Technische Universität München.
- [134] J. W. Corbett, N. R. Graciani, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1371-1376.
- [135] C. P. Carron, D. M. Meyer, J. A. Pegg, V. W. Engleman, M. A. Nickols, S. L. Settle, W. F. Westlin, P. G. Ruminski, G. A. Nickols, *Cancer Res.* **1998**, 58, 1930-1935.

- [136] R. M. Keenan, W. H. Miller, C. Kwon, F. E. Ali, J. F. Callahan, R. R. Calvo, S. M. Hwang, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, A. S. Wong, C. K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2289-2292.
- [137] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22-26.
- [138] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27-40.
- [139] D. G. Batt, J. J. Petraitis, G. C. Houghton, D. P. Modi, G. A. Cain, M. H. Corjay, S. A. Mousa, P. J. Bouchard, M. S. Forsythe, P. P. Harlow, F. A. Barbera, S. M. Spitz, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 41-58.
- [140] V. W. Engleman, G. A. Nickols, F. P. Ross, M. A. Horton, D. W. Griggs, S. L. Settle, P. G. Rumniski, S. L. Teitelbaum, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2284-2292.
- [141] K. C. Nicolaou, J. T. Trujillo, B. Janderleit, K. Chibale, M. Rosenfeld, B. Diefenbach, D. A. Cheresch, S. L. Goodman, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1185-1208.
- [142] W. H. Miller, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. R. Jakas, R. M. Keenan, T. W. Ku, K. A. Newlander, S. T. Ross, R. C. Haltiwanger, J. Bradbeer, F. H. Drake, M. Gowen, S. J. Hoffman, S. M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, B. Lechowska, D. J. Rieman, G. B. Stroup, J. A. Vasko-Moser, D. L. Zembryki, L. M. Azzarano, P. C. Adams, W. F. Huffman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1807-1812.
- [143] A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Breipohl, K. H. Scheunemann, D. Carniato, J. M. Ruxer, J. F. Gourvest, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 179-182.
- [144] A. L. Rockwell, M. Rafalski, W. J. Pitts, D. G. Batt, J. J. Petraitis, W. F. DeGrado, S. Mousa, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 937-942.

- [145] T. W. Ku, F. E. Ali, L. S. Barton, J. W. Bean, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, L. Chen, D. S. Eggleston, J. G. Gleason, W. F. Huffman, S. M. Hwang, D. R. Jakas, C. B. Karash, R. M. Keenan, K. D. Kopple, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. F. Parker, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8861-8862.
- [146] J. M. Samanen, F. E. Ali, L. S. Barton, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, W. Chen, L. Chen, K. Erhard, G. Feuerstein, R. Heys, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, R. M. Keenan, P. F. Koster, T. W. Ku, C. Kwon, C.-P. Lee, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. Parker, C. E. Peishoff, G. Rhodes, S. Ross, A. Shu, R. Simpson, D. Takata, J. A. Vasko-Moser, R. E. Valocik, T. O. Yellin, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C.-K. -. Y. A. Wong, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4867-4870.
- [147] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 612-617.
- [148] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [149] A. Furka, *Notariell beglaubigtes Dokument Nr. 36237/1982, Budapest* **1982**.
- [150] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [151] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.
- [152] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [153] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [154] F. Balkenhohl, C. v. d. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [155] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46.
- [156] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [157] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135-8173.

- [158] E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gollop, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1385-1401.
- [159] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1233-1251.
- [160] R. W. Armstrong, A. P. Combs, P. A. Tempest, S. D. Brown, T. A. Keating, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 123-131.
- [161] J. A. Ellman, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 132-143.
- [162] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 144-154.
- [163] P. Wentworth, K. D. Janda, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 109-115.
- [164] R. Brown, *Contemp. Org. Synth.* **1996**, 216-237.
- [165] A. R. Brown, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Synlett* **1998**, 817-830.
- [166] R. C. D. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3293-3320.
- [167] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 37-56.
- [168] C. Watson, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2025-2031.
- [169] R. S. Houghten, C. Pinilla, J. R. Appel, S. E. Blondelle, C. T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, J. M. Ostresh, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3743-3778.
- [170] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnák, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 411-448.
- [171] O. B. Wallace, D. L. Whitehouse, D. S. Dodd, *Combinatorial Synthesis of Peptidomimetics*, Vol. 2, JAI Press Inc. **1999**, S. 1-51.
- [172] R. E. Dolle, K. H. Nelson, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 235-282.
- [173] E. K. Wilson, *Chem. Eng. News* **1998**, 27 April, 31-37.
- [174] L. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 381-385.
- [175] M. G. Bures, Y. C. Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 376-380.
- [176] J. M. Fréchet, *Tetrahedron* **1981**, 37, 663-683.
- [177] C. C. Leznoff, *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 327-333.
- [178] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, 55, 4855-4946.
- [179] S. Booth, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15385-15443.
- [180] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1997**, 63, 5643-5678.

- [181] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, 52, 4527-4554.
- [182] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, 354, 82-84.
- [183] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Mol. Immunol* **1996**, 23, 709-715.
- [184] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84-86.
- [185] D. J. Ecker, T. A. Vickers, R. Hanecak, V. Driver, K. Anderson, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 37, 1385-1401.
- [186] R. A. Houghten, J. R. Appel, S. E. Blondelle, J. H. Cuervo, C. T. Dooley, C. Pinilla, *BioTechniques* **1992**, 13, 412-421.
- [187] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, M. A. Siani, S. C. Banville, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4505-4509.
- [188] Y.-H. Chu, C. P. Kirby, B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5419-5420.
- [189] Y.-H. Chu, Y. M. Dunayevskiy, D. P. Kirby, P. Vouros, B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7827-7835.
- [190] M. R. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6331-6334.
- [191] M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 979-982.
- [192] C. L. Brummel, I. N. Lee, Y. Zhou, S. J. Benkovic, N. Winograd, *Science* **1994**, 264, 399-402.
- [193] K. Biemann, S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, 6, 1-75.
- [194] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, *Science* **1993**, 262, 89-92.
- [195] R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 77-81.
- [196] J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2529-2531.
- [197] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9812-9813.
- [198] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinekel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10700-10704.

- [199] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10922-10926.
- [200] H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4723-4724.
- [201] D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9073-9087.
- [202] C. Y. Cho, R. S. Youngquist, S. J. Paikoff, M. H. Beresini, A. R. Hebert, L. T. Berleau, C. W. Liu, D. E. Wemmer, T. Keough, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7706-7718.
- [203] C. Y. Cho, C. W. Liu, D. E. Wemmer, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1171-1179.
- [204] J. Gante, *Synthesis* **1989**, 405-413.
- [205] C. J. Gray, M. Quibell, N. Baggett, T. Hammerle, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 351-362.
- [206] H.-J. Hess, W. T. Moreland, G. D. Laubach, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 4040-4041.
- [207] J. Magrath, R. H. Abeles, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4279-4283.
- [208] J. C. Powers, R. Boone, D. L. Carroll, B. F. Gupton, C. M. Kam, N. Nishino, M. Sakamoto, P. M. Tuhy, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 4288-4294.
- [209] B. F. Gupton, D. L. Carroll, P. M. Tuhy, C. M. Kam, J. C. Powers, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 4279-4287.
- [210] S. A. Barker, C. J. Gray, J. C. Ireson, R. C. Parker, J. V. McLaren, *Biochem. J.* **1974**, 139, 555-563.
- [211] D. T. Elmore, J. J. Smyth, *Biochem. J.* **1968**, 107, 103-107.
- [212] A. Fässler, G. Bold, H. Steiner, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4925-4928.
- [213] G. Bold, A. Fassler, H. G. Capraro, R. Cozens, T. Klimkait, J. Lazdins, J. Mestan, B. Poncioni, J. Rosel, D. Stover, M. Tintelnot-Blomley, F. Acemoglu, W. Beck, E. Boss, M. Eschbach, T. Hurlimann, E. Masso, S. Roussel, K. Ucci-Stoll, D. Wyss, M. Lang, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3387-3401.
- [214] C. H. Reynolds, R. E. Hormann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9395-9401.
- [215] S. Ro, C.-J. Yoon, *Ab Initio Studies of Azaamino Acids: Ac-azaAla-NHMe*, 16th American Peptide Symposium, Minneapolis, USA **1999**.

- [216] H. Hope, T. Ottersen, *Acta. Crystallogr.* **1978**, B34, 3623-3626.
- [217] H. Hope, T. Ottersen, *Acta. Crystallogr.* **1979**, B35, 370-372.
- [218] K. Tanaka, *Acta. Crystallogr.* **1978**, B24, 2487-2494.
- [219] F. André, A. Vicherat, G. Boussard, A. Aubry, M. Marraud, *J. Peptide Res.* **1997**, 50, 372-381.
- [220] F. André, M. Marraud, G. Boussard, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 183-186.
- [221] F. André, G. Boussard, D. Bayeul, C. Didierjean, A. Aubry, M. Marraud, *J. Pept. Res.* **1997**, 49, 556-562.
- [222] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2370-2380.
- [223] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2318-2319.
- [224] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214.
- [225] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2843-2849.
- [226] F. André, M. Marraud, T. Tsouloufis, S. J. Tzartos, G. Boussard, *J. Peptide Sci.* **1997**, 3, 429-441.
- [227] C. Frochot, R. Vandersesse, A. Driou, G. Linden, M. Marraud, M. T. Cung, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4, 219-225.
- [228] H. Han, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2539-2544.
- [229] J. Huang, T. S. Widlanski, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2657-2660.
- [230] C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2181-2183.
- [231] P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, N. Jayaraman, S. A. Nepogodiev, F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1115-1128.
- [232] A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson, J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2483-2486.
- [233] L. I. Mastafanova, K. F. Turchin, M. I. Evstratova, Y. N. Sheinker, L. N. Yakhontov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1985**, 21, 305-309.
- [234] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4. Aufl., John Wiley & Sons **1992**, S. 1025.
- [235] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409.

- [236] S. Jackson, W. DeGrado, A. Dwivedi, A. Parthasarathy, A. Higley, J. Krywko, A. Rockwell, J. Markwalder, G. Wells, R. Wexler, S. Mousa, R. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3220-3230.
- [237] Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. C. Haug, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [238] D. R. Bolin, I.-I. Sytwu, F. Humiec, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *33*, 353-359.
- [239] M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 3389-3392.
- [240] R. J. Bergeron, J. S. McManis, *J. Org. Chem.* **1997**, *52*, 1700-1703.
- [241] M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2497-2502.
- [242] D. R. Kent, W. L. Cody, A. M. Doherty, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8715-8718.
- [243] Y. Wu, G. R. Matsueda, M. Bernatowicz, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2055-3060.
- [244] S. Robinson, E. Roskamp, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6697-6705.
- [245] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, M. A. Lipton, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1540-1542.
- [246] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804-3805.
- [247] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, J. C. Thoen, M. A. Lipton, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 53-56.
- [248] D. Wustrow, T. Belliotti, S. Glase, S. R. Kesten, D. Johnson, N. Colbry, R. Rubin, A. Blackburn, H. Akunne, A. Corbin, M. D. Davis, L. Georgic, S. Whetzel, K. Zoski, T. Heffner, T. Pugsley, L. Wise, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 760-771.
- [249] M. Baumgarth, N. Beier, R. Gericke, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2017-2034.
- [250] A. J. Lin, L. Q. Li, D. L. Klayman, C. F. George, J. L. Flippen-Anderson, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2610-2614.
- [251] R. N. Misra, Y. F. Kelly, B. R. Brown, D. G. M. Roberts, S. Chong, S. M. Seiler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2165-2170.
- [252] D. J. Brown, P. Waring, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 204-208.

- [253] S. M. Shein, O. A. Zagulyaeva, A. I. M. Shvets, V. P., *Reakts. Sposobnost Org. Soedin.* **1972**, 9, 890-895.
- [254] X. Xiao, K. Ngu, C. Chao, D. V. Patel, *J. Org. Chem.* **1998**, 62, 6968-6973.
- [255] H. Eckert, B. Forster, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 922-924.
- [256] J. S. Nowick, D. L. Holmes, G. Noronha, E. M. Smith, T. M. Nguyen, S.-L. Huang, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3929-3934.
- [257] J. Gante, *Chem. Ber.* **1964**, 97, 2551-2554.
- [258] J. Gante, *Chem. Ber.* **1965**, 98, 530-547.
- [259] A. Stempel, J. Zelauskas, J. A. Aeschlimann, *J. Org. Chem.* **1955**, 20, 412-418.
- [260] E. Vedejs, N. S. Bennett, L. m. Conn, S. T. Diver, M. Gingras, S. Lin, P. A. Oliver, M. J. Peterson, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7286-7288.
- [261] M. A. Dechantsreiter, *Dissertation* **1998**, Technische Universität, München.
- [262] W. Li, B. Yan, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4092-4097.
- [263] W. Rapp, *Mündliche Mitteilung* **1998**.
- [264] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1981**, 325-327.
- [265] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, 11, 601.
- [266] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, 9, 37-70.
- [267] A. E. Ashcroft, P. J. Derrick, *Four-Sector Tandem Mass Spectrometry of Peptides*, CRC Press, Boca Raton **1991**, S. 121-138.
- [268] R. L. Cerny, M. L. Gross, *Tandem Mass Spectrometry for Determining the Amino Acid Sequence of Cyclic Peptides and for Assessing Interactions of Peptides and Metal Ions*, CRC Press, Boca Raton **1991**, S. 289-314.
- [269] R. E. March, J. F. J. Todd, *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry, Vol. 1*, CRC Press, Boca Raton **1995**, S.
- [270] K. Burgess, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2985-2987.
- [271] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7388-7394.
- [272] C. Gibson, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1825-1728.
- [273] W. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2924.

- [274] H. Kessler, S. Seip, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemist and Biochemists*, VCH Publishers, New York **1994**, S. 619 - 654.
- [275] K. R. Snyder, T. F. Murray, G. E. DeLander, J. V. Aldrich, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1100-1103.

11 Anhang

Tabelle 11.1a: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

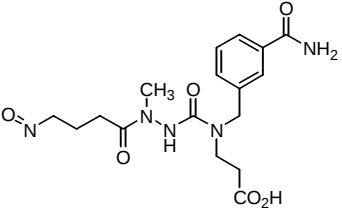
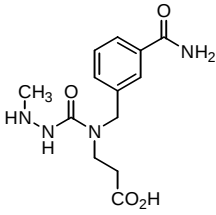
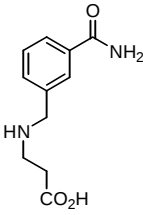
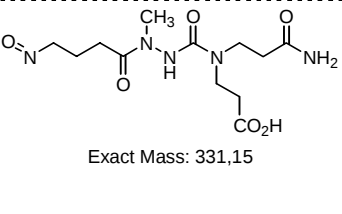
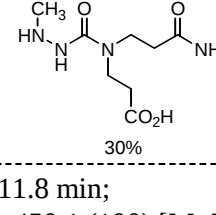
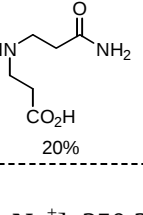
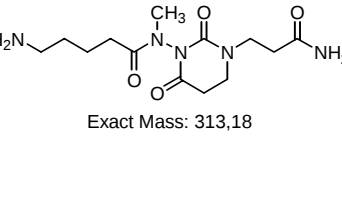
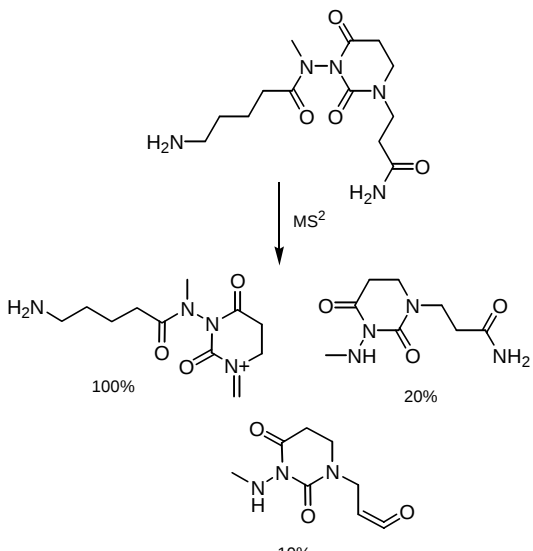
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
167 (6 × in X1)	 Exact Mass: 393,16	LC-MS (10→90)	$R_t = 12.1$ min; $m/z = 516.2$ (100) $[M+Boc+Na]^+$, 394.2 (80) $[M+H]^+$ H^+ -Fragmentationen erkennbar von:  
168 (1 × in X1)	 Exact Mass: 331,15	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.2$ min; $m/z = 454.2$ (100) $[M+Boc+Na]^+$, 332.2 (20) $[M+H]^+$ H^+ -Fragmentationen erkennbar von:  
169 (7 × in X2)	 Exact Mass: 313,18	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.8$ min; $m/z = 450.1$ (100) $[M+Boc+Na]^+$, 350.3 (15) $[M+Na]^+$, 328.3 (10) $[M+H]^+$
		MS ⁿ auf $[M+H]^+$	

Tabelle 11.1b: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

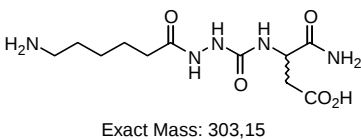
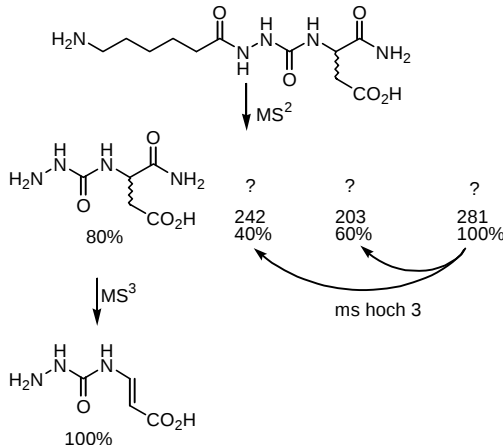
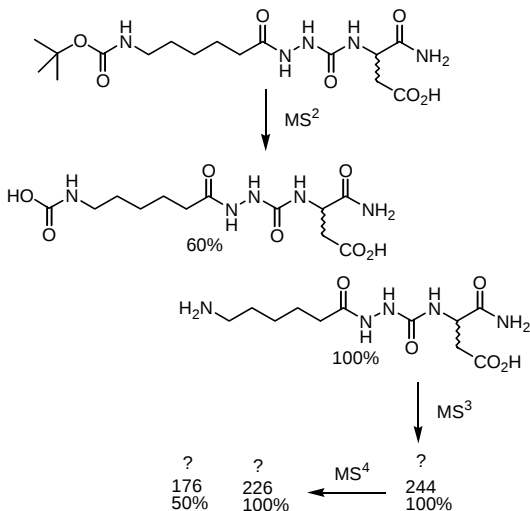
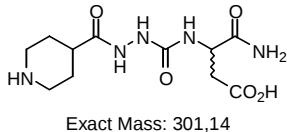
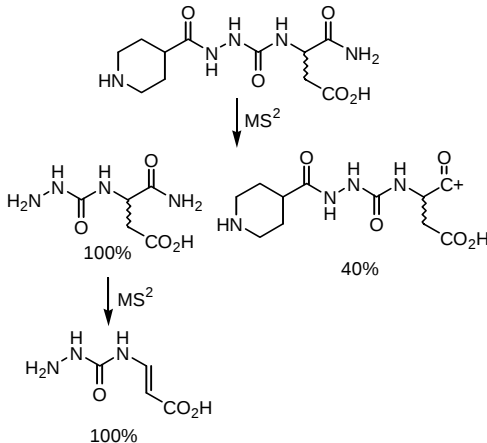
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
170 (7 × in X4)	 Exact Mass: 303,15	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.2 \text{ min};$ $m/z = 426.0 \text{ (40) } [M+Boc+Na]^+, 304.1 \text{ (30) } [M+H]^+$
MSⁿ auf [M+H]⁺			
MSⁿ auf [M+Boc Na]⁺			
171 (6 × in X3)	 Exact Mass: 301,14	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.2 \text{ min};$ $m/z = 424.0 \text{ (30) } [M+Boc+Na]^+, 302.0 \text{ (25) } [M+H]^+$
MSⁿ auf [M+H]⁺			

Tabelle 11.1c: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

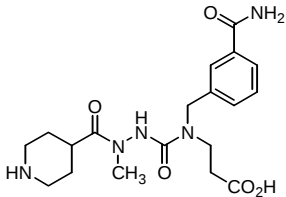
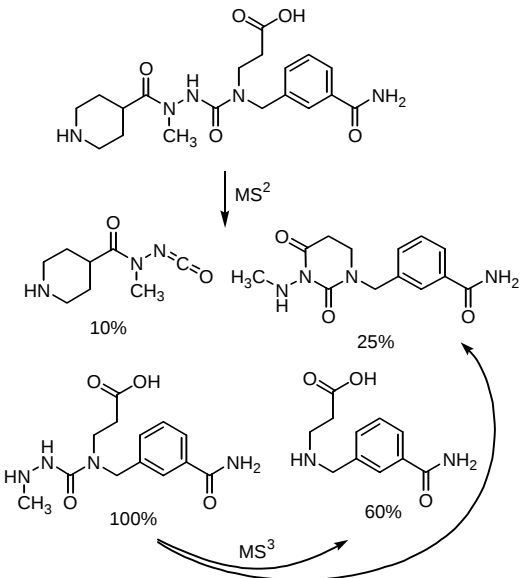
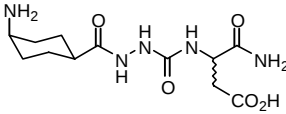
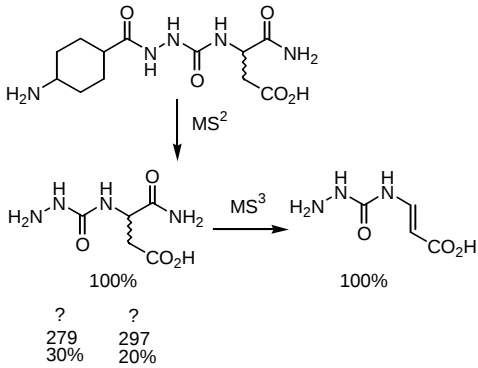
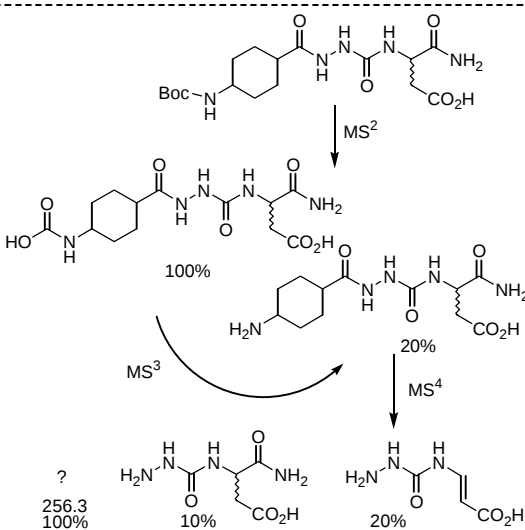
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
172 (2 × in X3)	 Exact Mass: 405,20	LC-MS (10→90)	$R_t = 12.2 \text{ min};$ $m/z = 528.2 \text{ (30) } [M+\text{Boc}+\text{Na}]^+, 406.2 \text{ (100) } [M+\text{H}]^+$
		MS ⁿ auf $[M+\text{H}]^+$	
173 (6 × in X6)	 Exact Mass: 315,15	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.7 \text{ min};$ $m/z = 438.0 \text{ (50) } [M+\text{Boc}+\text{Na}]^+, 316.2 \text{ (20) } [M+\text{H}]^+$
		MS ⁿ auf $[M+\text{H}]^+$	
		MS ⁿ auf $[M+\text{Boc}+\text{Na}]^+$	

Tabelle 11.1d: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

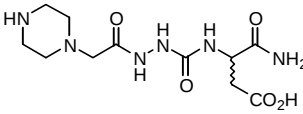
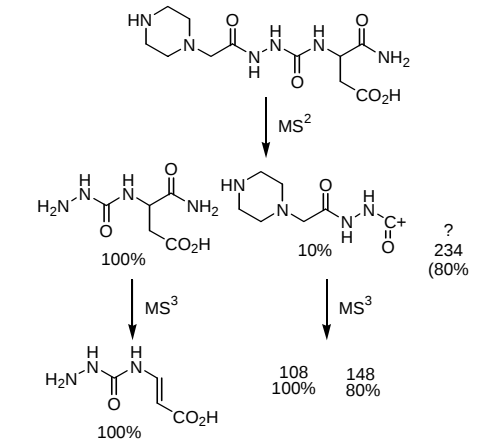
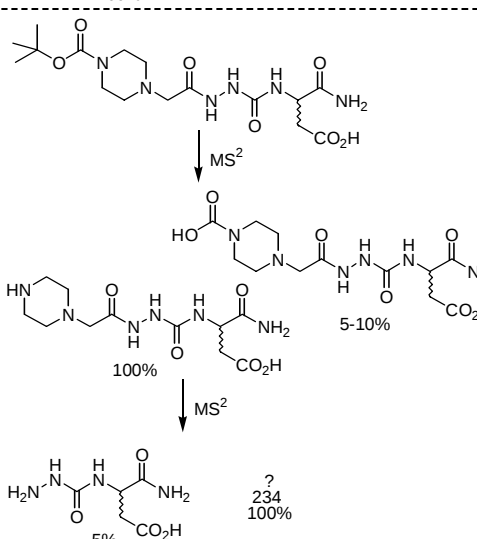
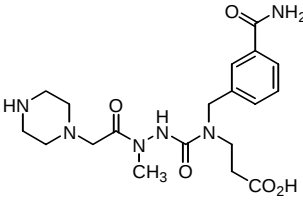
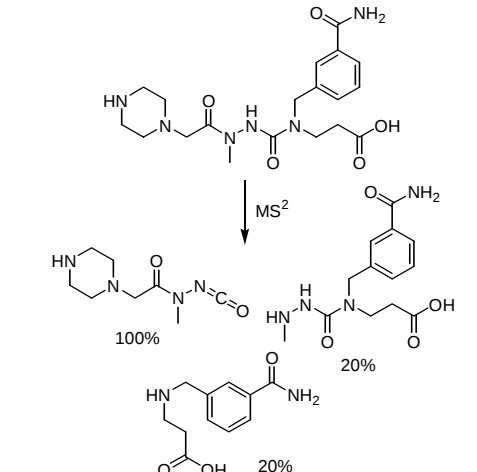
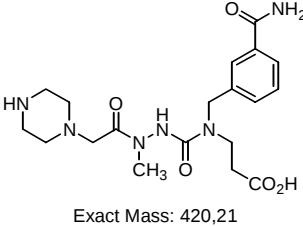
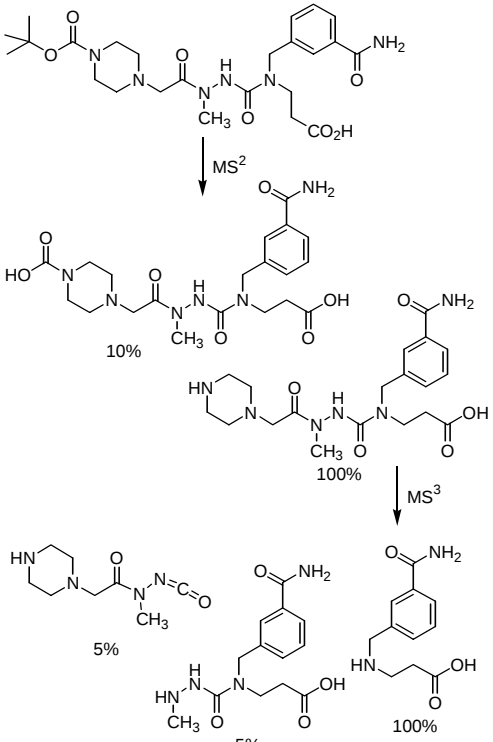
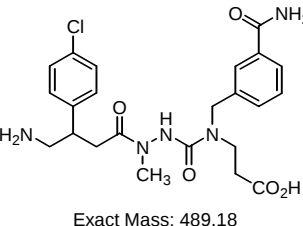
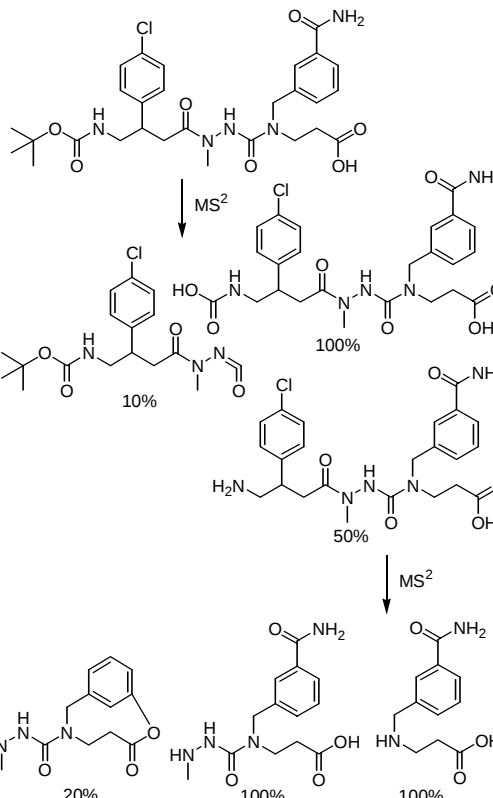
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
174 (2 × in X7)	 Exact Mass: 316,15	LC-MS $R_t = 7.5$ min; (10→90) $m/z = 339.1$ (100) $[M+Na]^+$, 317 (30) $[M+H]^+$	MSⁿ auf $[M+H]^+$  MSⁿ auf $[M+Boc+Na]^+$ 
175 (5 × in X7)	 Exact Mass: 420,21	LC-MS $R_t = 10.4$ min; (10→90) $m/z = 521.2$ (70) $[M+Boc+H]^+$, 421.2 (50) $[M+H]^+$	MSⁿ auf $[M+H]^+$ 

Tabelle 11.1e: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
175 (5 × in X7)	 Exact Mass: 420,21	MS ⁿ auf [M+Boc +Na] ⁺	
176 (5 × in X9)	 Exact Mass: 489,18	LC-MS $R_t = 14.3$ min; (10→90) $m/z = 612.1$ (50) [M+Boc+Na] ⁺ , 490.0 (30) [M+H] ⁺ , 295 (100), 223 (40) MS ⁿ auf [M+Boc +Na] ⁺	

Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
177 (2 × in X9)	Exact Mass: 427,16	LC-MS (10→90) MS ⁿ auf [M+H] ⁺	R _t = 13.7 min; m/z = 550.0 (70) [M+Boc+Na] ⁺ , 233.0 (100), 216.1 (45)
178 (3 × in X10)	Exact Mass: 510,22	LC-MS (10→90) MS ⁿ auf [M+H] ⁺	R _t = 13.2 min; m/z = 633.2 (100) [M+Boc+Na] ⁺ , 511.2 (30) [M+H] ⁺

Tabelle 11.1g: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

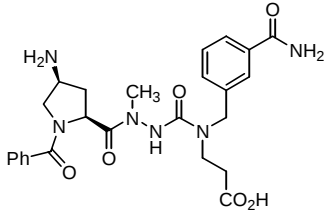
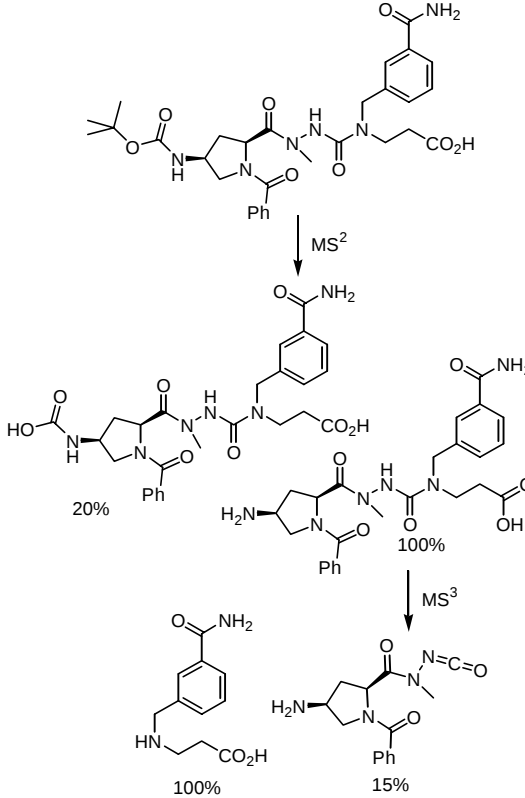
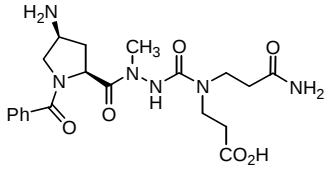
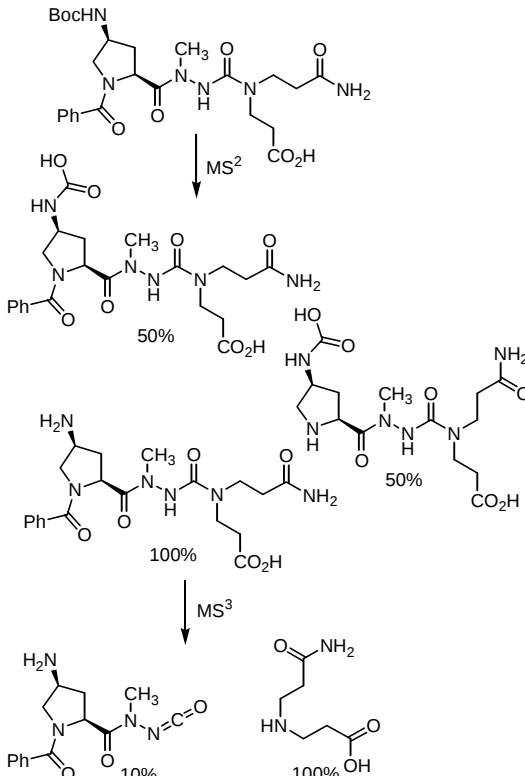
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
178 (3 × in X10)	 Exact Mass: 510,22	MS^n auf $[M+Boc+Na]^+$	
179 (3 × in X10)	 Exact Mass: 448,21	LC-MS $R_t = 12.5$ min; (10→90) $m/z = 571.2$ (100) $[M+Boc+Na]^+$, 449.1 (20) $[M+H]^+$ MS^n auf $[M+Boc+Na]^+$	

Tabelle 11.1h: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

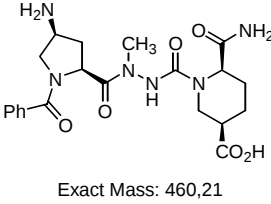
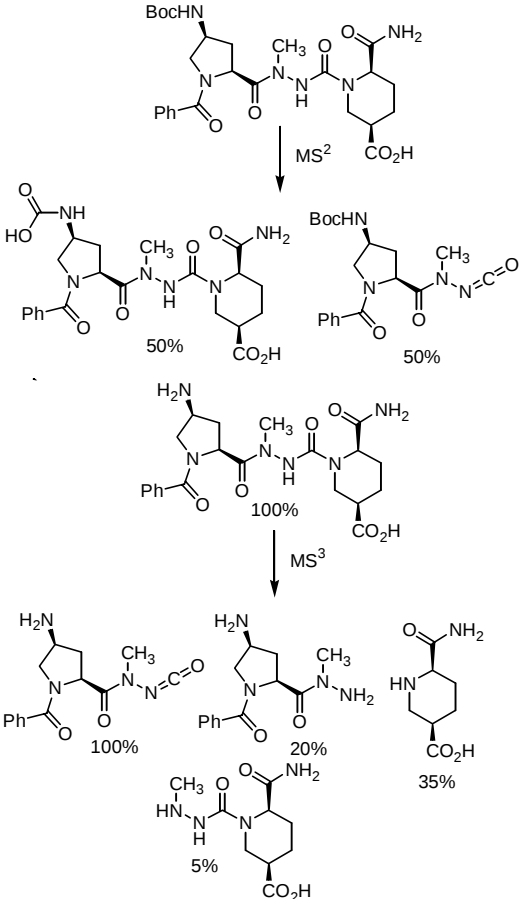
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
180 (2 × in X9)	 Exact Mass: 460,21	LC-MS (10→90)	$R_t = 12.7 \text{ min;}$ $m/z = 583.2 \text{ (60) } [M+Boc+Na]^+, 461.3 \text{ (20),}$ 261.1 (100)
MSⁿ auf $[M+Boc+Na]^+$ 			

Tabelle 11.1i: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

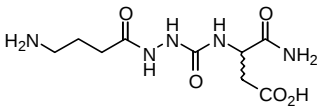
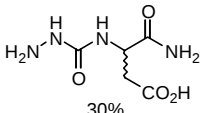
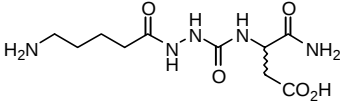
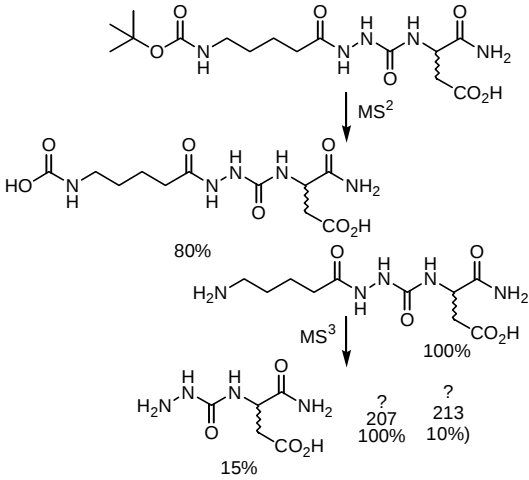
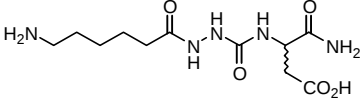
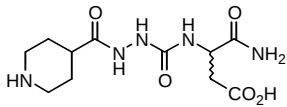
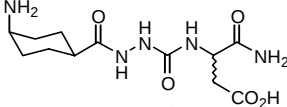
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
181 (4 × in Y)	 Exact Mass: 275,12	LC-MS (10→90)	$R_t = 9.0$ min; $m/z = 398.1$ (30) $[M+Boc+Na]^+$, 276.1 (20) $[M+H]^+$ H^+ -Fragmentationen erkennbar von:  30%
182 (4 × in Y)	 Exact Mass: 289,14	LC-MS (10→90)	$R_t = 9.9$ min; $m/z = 412.1$ (40) $[M+Boc+Na]^+$, 290.1 (30) $[M+H]^+$
		MS ⁿ auf $[M+Boc+Na]^+$	
170 (2 × in Y)	 Exact Mass: 303,15	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.7$ min; $m/z = 426.2$ (45) $[M+Boc+Na]^+$, 304.1 (30) $[M+H]^+$; identisch mit 170 aus Bibliothek X4
171 (5 × in Y)	 Exact Mass: 301,14	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.1$ min; $m/z = 424.0$ (35) $[M+Boc+Na]^+$, 302.0 (30) $[M+H]^+$; identisch mit 171 aus Bibliothek X3
173 (2 × in Y)	 Exact Mass: 315,15	LC-MS (10→90)	$R_t = 10.6$ min; $m/z = 438.1$ (60) $[M+Boc+Na]^+$, 316.1 (30) $[M+H]^+$ identisch mit 171 aus Bibliothek X6

Tabelle 11.1j: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.3 beschriebenen hits

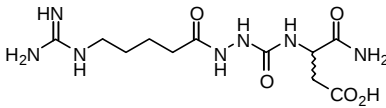
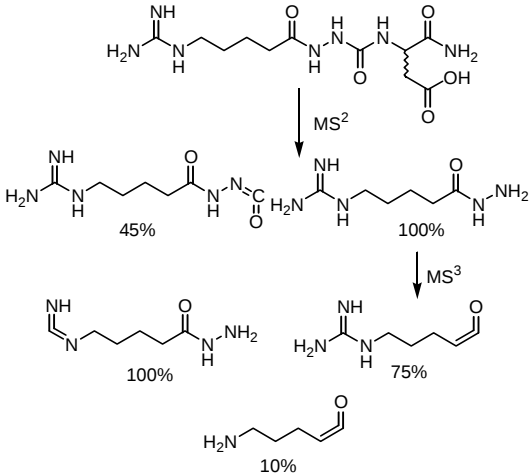
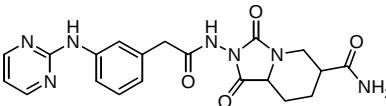
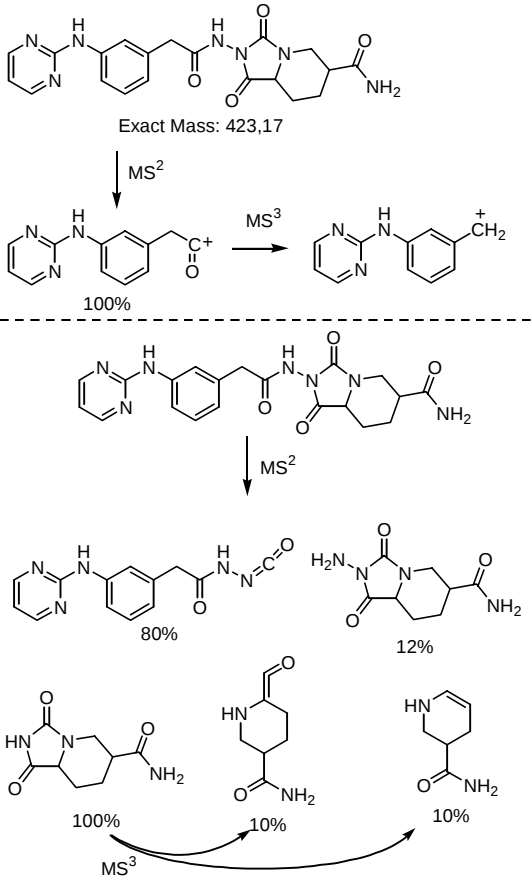
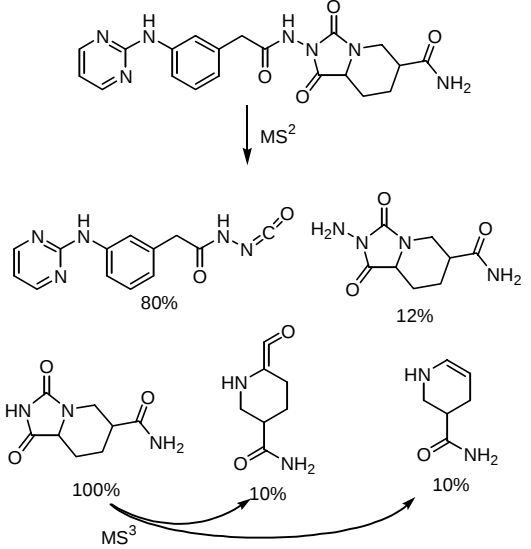
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
184 (1 × in Y)	 Exact Mass: 331,16	LC-MS (10→90)	$R_t = 2.2 \text{ min};$ $m/z = 354.2 \text{ (80) } [M+Na]^+, 332.2 \text{ (100) } [M+H]^+$
MSⁿ auf [M+H]⁺ 			
185 (5 × in Z)	 Exact Mass: 423,17	LC-MS (10→90)	$R_t = 13.4 \text{ und } 13.7 \text{ min};$ $m/z = 446.3 \text{ (100) } [M+Na]^+, 424.1 \text{ (80) } [M+H]^+$
MSⁿ auf [M+H]⁺ 			
MSⁿ auf [M+Na]⁺ 			

Tabelle 11.2.a: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.4 beschriebenen hits

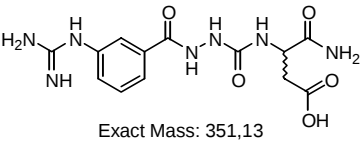
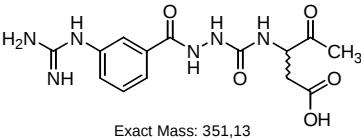
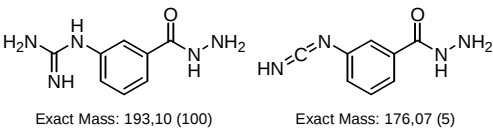
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
141	 Exact Mass: 351,13	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.8 \text{ min};$ $m/z = 352.1 (100) [M+H]^+, 194.0 (50).$ Vermutlich M+Boc, im Massenspektrum aber nicht zu erkennen.
	MSⁿ auf $[M+H]^+$  Exact Mass: 351,13 MS²  Exact Mass: 193,10 (100) Exact Mass: 176,07 (5)		
141	dto.	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.8 \text{ min};$ $m/z = 352.1 (100) [M+H]^+, 194.1 (50).$ vermutlich M+Boc, im Massenspektrum aber nicht zu erkennen.
141	dto.	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.9 \text{ min};$ $m/z = 352.1 (100) [M+H]^+, 194.0 (50).$ Vermutlich M+Boc, im Massenspektrum aber nicht zu erkennen.
141	dto.	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.8 \text{ min};$ $m/z = 352.0 (100) [M+H]^+, 194.0 (50).$ Vermutlich M+Boc, im Massenspektrum aber nicht zu erkennen.
141	dto.	LC-MS (10→90)	$R_t = 11.8 \text{ min};$ $m/z = 352.0 (100) [M+H]^+, 194.1 (50).$ Vermutlich M+Boc, im Massenspektrum aber nicht zu erkennen.

Tabelle 11.2.b: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.4 beschriebenen hits

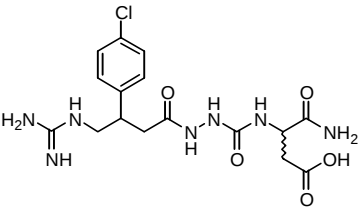
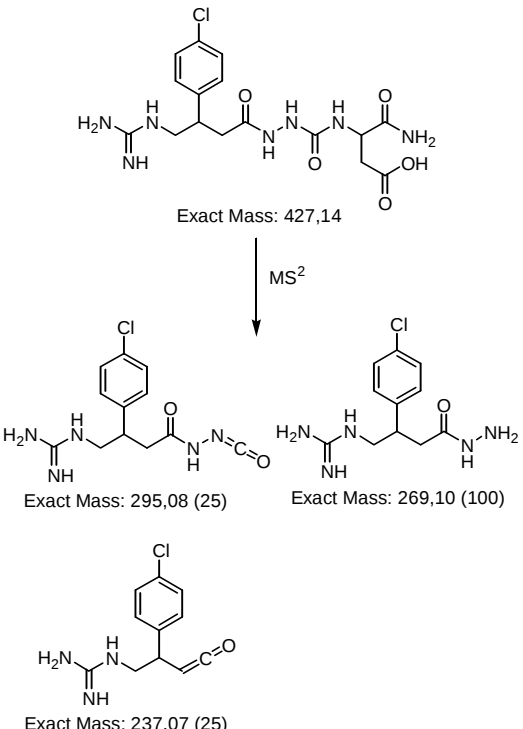
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
187	 Exact Mass: 427,14	LC-MS $R_t = 2.4$ min (10→90) $m/z = 428.0$ (80) $[M+H]^+$, 270 (100), 238.1 (40)	MSⁿ auf $[M+H]^+$  Exact Mass: 427,14 MS² Exact Mass: 295,08 (25) Exact Mass: 269,10 (100) Exact Mass: 237,07 (25)
187	dto.	LC-MS $R_t = 2.4$ min; (10→90) $m/z = 450.0$ (5) $[M+Na]^+$, 296.0 (45), 270.1 (100), 238.1 (40)	
187	dto.	LC-MS $R_t = 2.4$ min; (10→90) $m/z = 466.0$ (10) $[M+K]^+$, 296.0 (45), 270.1 (100), 238.1 (40)	

Tabelle 11.2.c: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.4 beschriebenen hits

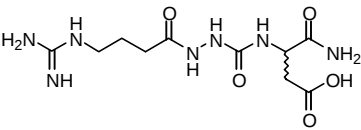
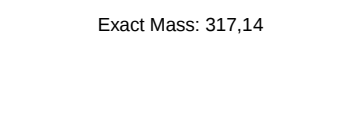
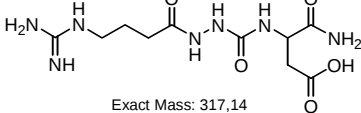
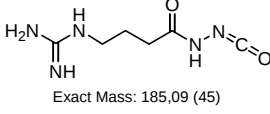
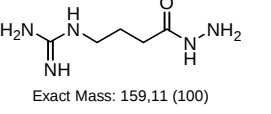
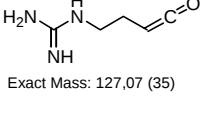
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
186	 Exact Mass: 317,14	LC-MS (10→90)	$R_t = 2.0 \text{ min};$ $m/z = 356.0 (45) [M+K]^+, 318.1 (100)$ $[M+H]^+, 186.0 (30), 160.1 (35), 128.0 (20)$
	 Exact Mass: 317,14	MS ⁿ auf $[M+H]^+$	 Exact Mass: 317,14 MS²  Exact Mass: 185,09 (45)  Exact Mass: 159,11 (100)  Exact Mass: 127,07 (35)
186	dto.	LC-MS	$R_t = 2.0 \text{ min};$ $m/z = 356.0 (55) [M+K]^+, 340.1 (45)$ $[M+Na]^+, 318.2 (100) [M+H]^+, 186.0 (30),$ $160.1 (50), 128.0 (20)$
186	dto.	LC-MS	$R_t = 1.9 \text{ min};$ $m/z = 356.3 (70) [M+K]^+, 318.2 (100)$ $[M+H]^+, 186.1 (50), 160.1 (70), 128.0 (20)$
186	dto.	LC-MS	$R_t = 2.0 \text{ min};$ $m/z = 356.1 (90) [M+K]^+, 318.1 (100)$ $[M+H]^+, 186.0 (30), 160.1 (60), 128.0 (40)$
186	dto.	LC-MS	$R_t = 1.9 \text{ min};$ $m/z = 356.3 (60) [M+K]^+, 318.1 (100)$ $[M+H]^+, 186.1 (30), 160.0 (30), 128.0 (30)$

Tabelle 11.2.d: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.4 beschriebenen hits

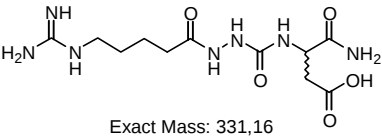
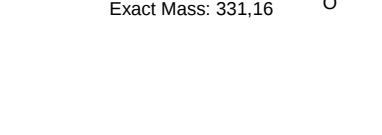
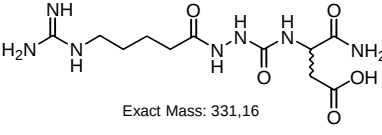
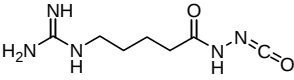
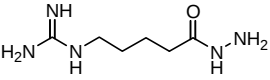
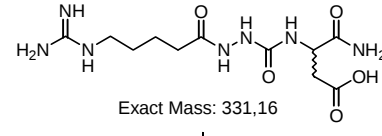
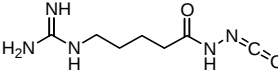
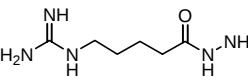
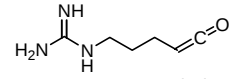
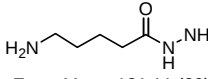
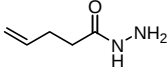
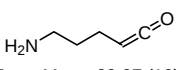
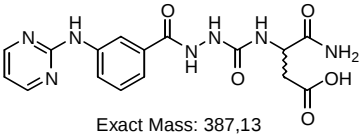
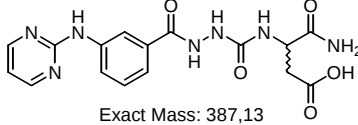
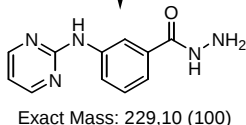
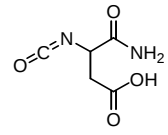
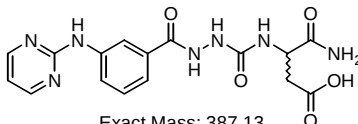
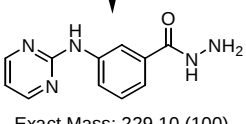
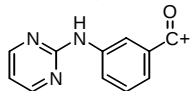
Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
139	 Exact Mass: 331,16	LC-MS (10→90)	$R_t = 2.3 \text{ min};$ $m/z = 370.0 \text{ (50)} [M+K]^+, 354.0 \text{ (40)}$ $[M+Na]^+, 332.2 \text{ (100)} [M+H]^+, 200 \text{ (50)}$
	 Exact Mass: 331,16	MS ⁿ auf [M+Na] ⁺	 Exact Mass: 331,16
			↓ MSⁿ  M-18 (60) Exact Mass: 199,11 (100)
			 Exact Mass: 173,13 (10)
		MS ⁿ auf [M+H] ⁺	 Exact Mass: 331,16
			m-17 (40) ↓ MS²  Exact Mass: 199,11 (50)  Exact Mass: 173,13 (100)
			↓ MS³  Exact Mass: 141,09 (80)  Exact Mass: 131,11 (20)
			 Exact Mass: 114,08 (100)  Exact Mass: 99,07 (10)

Tabelle 11.2.e: Massenspektrometrische Analyse der in Kap. 6.4 beschriebenen hits

Nr.	Struktur	Methode	Ergebnis
188	 Exact Mass: 387,13	LC-MS $R_t = 2.5$ min; (10→90) $m/z = 198.0$ (100), 230 (30), 170 (20)	
		MS $m/z = 410.2$ (100) $[M+Na]^+$	
		MS^n auf $[M+Na]^+$	 Exact Mass: 387,13 ↓ MS^2  Exact Mass: 229,10 (100)  Exact Mass: 158,03 (10)
		MS^n auf $[M+H]^+$	 Exact Mass: 387,13 ↓ MS^2  Exact Mass: 229,10 (100) ↓ MS^3  Exact Mass: 198,07 (100)
188	dto.	LC-MS $R_t = 2.4$ min; (10→90) $m/z = 426.1$ (20) $[M+K]^+$, 230 (30) 198.0 (100)	