Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München

# Parallele Festphasensynthese und biologische Evaluation niedermolekularer Integrinantagonisten

Dirk Gottschling

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. W. Domcke

Prüfer der Dissertation:

Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
 Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
 Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken

Die Dissertation wurde am 18. September 2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30. Oktober 2001 angenommen.

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München und im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München in der Zeit von Januar 1998 bis Juni 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Meinem Lehrer Herrn Professor Kessler danke ich für die interessante Themenstellung, sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung in allen Belangen sowie die Bereitstellung sehr guter Arbeitsmöglichkeiten. Besonderer Dank gilt seinem unermüdlichen Streben, uns eine Bildung zu vermitteln, die weit über die Grenzen der Chemie hinausgeht.

Mein weiterer Dank gilt:

- Dr. Jürgen Boer für die hervorragende Zusammenarbeit auf dem Gebiet der α4-Integrine und für die ständige Diskussionsbereitschaft sowohl in dienstlichen als auch in privaten Angelegenheiten,
- meinen Laborkollegen Niko Schmiedeberg und Manuel Tönnis für das gute Laborklima,
- Prof. Dr. Bernhard Holzmann f
  ür die freundliche Aufnahme in seinem Labor, die Bereitstellung der Zelltests und sein Interesse an meiner Arbeit,
- Anja Schuster f
  ür die Einf
  ührung in biologische Arbeitstechniken und f
  ür die großartige Unterst
  ützung bei der Durchf
  ührung der Zelladh
  äsionsassays,
- den anderen "Holzfrauen" Bernadett Bartsch, Dr. Sandra Beer, Marit Harzenetter, Monika Semmrich und Anne f
  ür die sch
  öne Zeit in deren Labor,
- Priv. Doz. Dr. habil. Ute Reuning f
  ür die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der α3-Integrine,

- Bobby Arndt, Uli Hersel, Armin Modlinger, Elsa Locardi und Sandra H\u00e4berle f\u00fcr das engagierte Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Dr. Christoph Gibson f
  ür das Bereitstellen zahlreicher N-Fmoc-gesch
  ützter Aminos
  äuren,
- Mona Wolff für die Durchführung zahlreicher Synthesen,
- Dr. Rainer Hae
  ßner und Monika Goede f
  ür die Hilfe bei allen NMR-, Hardwareund Software
  fragen,
- Markus Urzinger und Burghard Cordes f
  ür die reibungslose und prompte Aufnahme der ESI-Spektren,
- Maria Kranawetter f
  ür die Durchf
  ührung von zahlreichen HPLC-Analytiken und Trennungen,
- allen anderen, namentlich nicht genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern, die dem Arbeitskreis das hervorragende Arbeitsklima verleihen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren einzigartige Unterstützung in allen Belangen weder das Studium noch die Erstellung dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Ferner danke ich Sandra Häberle für das entgegengebrachte Verständnis und ihren Einsatz, daß es auch noch andere Dinge außer der Arbeit gibt.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen der Medizinischen Chemie	
2.	1 Allgemeines	
2.2	2 Modifizierung der Leitstruktur	4
2	3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffs	5
2.4	4 Parallelsynthese und kombinatorische Chemie	6
	2.4.1 Festphasensynthese	
	2.4.2 Das one-bead one-compound-Konzept	9
3	Integrine als targets in der Medizinischen Chemie	
3.	1 Struktur und Funktion der Integrine	
3.2	2 Integrine und ihre Liganden	
3.	3 α3β1-Integrin-Rezeptor	
3.4	4 α4-Integrin-Rezeptoren	
	3.4.1 α4β1-Integrin-Rezeptor	
	3.4.2 $\alpha 4\beta$ 7-Integrin-Rezeptor (lymphocyte homing factor receptor)	
3.	5 Liganden für α4-Integrine	
	3.5.1 Fibronektin	
	3.5.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)	
	3.5.3 Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1)	
3.	6 Bindungsstellen in α4-Integrinen	
3.'	7 Pathologische Bedeutung von α4-Integrinen	
3.	8 Synthetische α4-Integrinantagonisten als Therapeutika	
4	Entwicklung von α4β7-Integrinantagonisten	
4.	1 Peptidische α4β7-Integrinantagonisten	
	4.1.1 Einführung	
	4.1.2 Synthese von cyclischen und linearen Peptiden	

	4.2	Peptidmimetika als $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten	41
	4.2	.1 Peptoide als LDT-Mimetika	42
	4.2	.2 Azapeptide als LDT-Mimetika	46
	4.2	.3 Schrittweise Reduktion der Amidbindungen	55
	4.3	Parallele Festphasensynthese niedermolekularer LDT-Mimetika	58
	4.3	.1 Synthesekonzept	58
	4.3	.2 Synthese, Reaktionsbedingungen und Eigenschaften der einzelnen Bausteine	60
	4.4	N-terminale Modifikationen	66
	4.4	.1 Alken-Aryl- bzw. Alkin-Aryl- Struktureinheiten	66
	4.4	.2 Aminothiazol als N-terminales scaffold	70
	4.4	.3 Fluor-nitrobenzoesäure als N-terminales scaffold	74
	4.5	C-terminale Modifikationen	77
	4.5	.1 Substitution der Asp-Thr-Struktureinheit durch 3-Amino-3-arylpropionsäure-	
		Derivate	77
	4.5	.2 Substitution der Leu-Asp-Thr-Struktureinheit durch N-Isobutyl-hydrazino-5-	
		oxo-3-aryl-pentansäure-Derivate	83
5	i Bi	choische Evaluation von $\alpha$ 4-Integrinantagonisten	85
5		blogische Evaluation von $\alpha$ 4-Integrinantagonisten	85
5	5.1	Dogische Evaluation von α4-Integrinantagonisten Zelladhäsionsassays	85 85
5	5.1 5.1	Dologische Evaluation von α4-Integrinantagonisten         Zelladhäsionsassays         .1 Allgemeine Testbedingungen	85 85 85
5	5.1 5.1 5.1 5.1	Diogische Evaluation von α4-Integrinantagonisten         Zelladhäsionsassays         .1 Allgemeine Testbedingungen         .2 Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 85 87
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Dologische Evaluation von α4-Integrinantagonisten         Zelladhäsionsassays         .1 Allgemeine Testbedingungen         .2 Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 87 91
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<b>Zelladhäsionsassays</b> .         .1 Allgemeine Testbedingungen.         .2 Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 85 87 91 93
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Zelladhäsionsassays.         .1       Allgemeine Testbedingungen.         .2       Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 85 87 91 93 95
5	<b>5.1</b> 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Zelladhäsionsassays.         .1         Allgemeine Testbedingungen.         .2       Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 85 91 93 95 98
5	<b>5.1</b> 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<b>Zelladhäsionsassays</b> .         .1       Allgemeine Testbedingungen.         .2       Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden	85 85 87 91 93 95 98 99
5	<b>5.1</b> 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Dologische Evaluation von α4-Integrinantagonisten	85 85 85 91 93 95 98 99 102
5	<b>5.1</b> 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Dologische Evaluation von α4-Integrinantagonisten	85 85 85 91 93 93 95 98 99 102 103
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Zelladhäsionsassays	85 85 85 91 93 93 95 98 99 102 103 105
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<ul> <li>Zelladhäsionsassays</li></ul>	85 85 85 91 93 93 95 98 98 99 102 103 105
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<b>Zelladhäsionsassays</b> 1 Allgemeine Testbedingungen         2 Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden         3 Biologische Evaluation des Peptoid-scans         4 Biologische Evaluation des Aza-scans         5 Biologische Evaluation von reduzierten Verbindungen         6 Biologische Evaluation der N-terminalen Modifikationen         7 Biologische Evaluation linearer LDT-Sequenzen mit L-Modifikationen         8 Biologische Evaluation linearer LDT-Sequenzen mit D-Modifikationen         9 Biologische Evaluation von thiazolhaltigen LDT-Mimetika         11 Biologische Evaluation von LDT-Mimetika mit N-terminalem Nitrophenyl-scaffold	85 85 85 91 91 93 93 95 98 99 102 103 105
5	<b>5.1</b> 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	Zelladhäsionsassays	85 85 85 91 93 93 95 98 99 102 103 105
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<ul> <li>Zelladhäsionsassays</li></ul>	85 85 85 91 93 93 95 98 98 99 102 103 105 107 109
5	5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1 5.1	<ul> <li>Zelladhäsionsassays</li></ul>	85 85 85 91 93 93 93 93 93 93 93 93 95 98 99 102 103 107 109

5.2 Zusammenfassung der Testergebnisse	
5.2.1 Die Vorgehensweise im Überblick	
5.2.2 Vergleich mit RGD-Mimetika	
5.3 Etablierung eines zellulären on-bead assays	
5.3.1 Synthesestrategie	
5.3.2 Biologische Evaluation	
5.4 Massenspektrometrische Analyse	
5.4.1 Peptid-Massenspektrometrie	
5.4.2 Massenspektrometrische Analyse der LDT-Mimetika	
6 α3β1-Integrinantagonisten	
7 Zusammenfassung und Ausblick	
8 Experimenteller Teil	
8.1 Material und allgemeine Arbeitstechniken	
8.2 Synthese der Bausteine	
8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	
8.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften	
8.3 Festphasensynthese	
8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	
8.3.2 Synthese von α4-Integrinantagonisten	
8.3.3 Ala- und Asp- <i>scan</i> von $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrinantagonisten	
8.4 Biologische Evaluation	
8.4.1 Adhäsionsassays mit $\alpha$ 3-Integrin-exprimierenden Zel	len 212
<ul><li>8.4.1 Adhäsionsassays mit α3-Integrin-exprimierenden Zel</li><li>8.4.2 Adhäsionsassays mit α4-Integrin-exprimierenden Zel</li></ul>	len 212 len 213

# Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift		
ACN	Acetonitril		
All	Allyl		
Äquiv.	Äquivalent(e)		
AS	Aminosäure		
Bn	Benzyl		
Boc	tert-Butyloxycarbonyl-		
br.	breit		
BSA	Bovine Albumin; Rinderserumalbumin		
Bu	Butyl		
tBu	<i>tert</i> -Butyl		
CAM	cell adhesion molecule		
CD49d/CD29	α4β1		
СНО	chinese hamster ovarial		
CID	collision-induced dissociation		
Col	Kollagen		
COSY	correlated spectroscopy		
CS1-CS5	Peptide aus epitope mapping der IIICS-Region (Fibronektin)		
CVFF	consistance valence force field		
d	Dublett		
δ	chemische Verschiebung		
1D, 2D	eindimensional, zweidimensional		
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm		
dd	Doppeldublett		
dest.	destilliert		
Diazald <sup>®</sup>	N-Methyl-N-nitroso-4-toluolsulfonsäureamid		
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid		
DIPC	1,3-Diisorpopylcarbodiimid		
DIPEA	Diisopropylethylamin		
Dmab	4{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6dioxocyclohexyliden)-3-		
	methylbutyl]-amino}benzylalkohol		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		
DMF	<i>N</i> , <i>N</i> -Dimethylformamid		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DPPA	Diphenylphosphorsäureazid		
DQF	Doppelquantenfilter		
EDCI	N-Ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid		
Ep	Epiligrin		

ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
Et	Ethyl
FABMS	fast atom bombardment mass spectrometry
FCS	Fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fn	Fibronektin
ges.	gesättigt
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N',-tetramethyluronium-
	hexafluorophosphat
H-Abz-OH	Aminobenzoesäure
H-Amob-OH	4-Amino-3-methoxybenzoesäure
H-Ani-OH	6-Aminonicotinsäure
H-Atob-OH	4-Amino-3-(trifluormethoxy)benzoesäure
H-(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-Azpc-OH	(2S,4S)-4-Amino-1-benzoylpyrrolidin-2-carbonsäure
Н-Вра-ОН	Benzoylphenylalanin
H-Cha-OH	Cyclohexylalanin
H-cisCyh-OH	cis-4-Aminocyclohexancarbonsäure
H-Cmp-OH	4-Carboxymethylpiperazin
Н-Сор-ОН	R,S-2-Carboxymorpholin
H-Cpb-OH	4-Amino-3-(4-chlorophenyl)buttersäure
H-Cpdc-OH	cis-2,5-Piperidindicarbonsäure
H-cisCyh-OH	cis-4-Aminocyclohexancarbonsäure
H-Cysa-OH	Cysteinsäure
HepII	zweite Heparinbindngsdomäne (Fibronektin)
H-Hda-H	1,6-Hexandiamin
H-Inp-OH	Isonipecotinsäure
H-Mab-OH	<i>m</i> -Aminobenzoesäure
H-Mamb-OH	<i>m</i> -(Aminomethyl)benzoesäure
H-Mape-OH	2-( <i>m</i> -Aminophenyl)essigsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HMQC-COSY	heteronuclear multiple quantum correlation mit COSY-
	Sequenz
H-Nal-OH	Naphtylalanin
H- <i>N</i> -βPraMamb-OH	3-{[(2-Carboxyethyl)amino]methyl}benzoesäure
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
H-Pab-OH	<i>p</i> -Aminobenzoesäure
HPLC	high performance liquid chromatography

HSQC	heteronuclear single quantum coherence		
H-Tic-OH	Tetrahydroisoquinolin-3-carbonsäure		
HV	Hochvakuum		
IBD	inflammatory bowel disease		
IC	inhibitory capacity		
ICAM	intercellular cell adhesion molecules		
Ichin	Isochinolin-3-carbonyl		
Ig	immunoglobulin		
IgCAM	immunoglobulin cell adhesion molecule		
IgSF	immunoglobulin superfamily		
IIICS	typeIII connecting segment (Fibronektin)		
In	Invasin		
konz.	konzentriert		
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry		
LeuCAM	leukocyte cell adhesion molecule		
Ln	Laminin		
LPAM	lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule-1, $\alpha 4\beta$ 7-		
	Integrin		
m	Multiplett		
Μ	molar		
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1		
MB	macrobead		
MD	Moleküldynamik		
Me	Methyl		
МеОН	Methanol		
MG	Molgewicht		
MS	Massenspektrometrie		
$^{N}J_{(X,Y)}$	skalare Kopplungskonstante zwischen den Kernen X und Y		
	über n Bindungen		
Ν	normal		
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin		
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon		
NMR	nuclear magnetic resonance		
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy		
PBS	phosphate buffered saline		
PBL	peripheral blood lymphocytes		
P.E.COSY	primitive exclusive correlated spectroscopy		
PEG	Polyethylenglycol		
Ph	Phenyl		
PL	Photolinker		

PP	Polypropylen		
ppm	parts per million		
РуВОР	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium		
	Hexafluorophosphat		
PyBroP	Bromtripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat		
Pym	Pyrimidyl		
q	Quartett		
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor		
rh	recombinant human		
ROESY	rotating frame nuclear Overhauser and exchange spectroscopy		
R <sub>t</sub>	Retentionszeit		
RT	Raumtemperatur		
S	Singulett		
Smp	Schmelzpunkt		
SPPS	solid phase peptide synthesis		
t	Triplett		
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-		
	tetrafluoroborat		
ТСР	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz		
TEA	Triethylamin		
TFA	Trifluoressigsäure		
TFE	Trifluorethanol		
THF	Tetrahydrofuran		
TIPS	Triisopropylsilan		
TMOF	Trimethylorthoformiat		
TMS	Trimethylsilyl-		
TOCSY	total correlation spectroscopy		
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan		
UV	Ultraviolett		
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1		
VLA	very late activation antigen		
VLA-4	$\alpha 4\beta$ 1-Integrin		
Vn	Vitronectin		
vWF	von Willebrand Faktor		
Xaa	beliebige Aminosäure		
Ζ	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* gedruckt.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

In its early youth, organic chemistry was so closely connected to biology. I do consider it not only possible but desirable, that the close connection of chemistry with biology [...] should be reestablished, as the great chemical secrets of life are only to be unveiled by cooperative work. Emil Fischer, [1] 1907

Ganz im Sinne von Emil Fischer hat sich in den letzten Jahrzehnten sowohl in der Chemie als auch in der Biologie eine enormer Wandel vollzogen. Durch hervorragende Leistungen auf dem Gebiet der organischen Synthese konnten komplexe Moleküle, wie biologische Cofaktoren, Naturstoffe und Hormone synthetisiert werden.<sup>[2]</sup> Auch wurde durch intensive Forschungsarbeiten sowohl die Synthese als auch die (DNA/RNA, [3])Strukturaufklärung Biopolymeren Peptide/Proteine,[4] von Kohlenhydrate) möglich. Diese Errungenschaften stimulierten die modernen Entwicklungen in der Biologie, wie z.B. die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).<sup>[5]</sup> Die PCR stellt ein besonders gelungenes Beispiel für das Zusammenspiel von Biologie und Chemie dar. Ohne die routinemäßige Bereitstellung von synthetischen DNA/RNA-Molekülen wäre die heutige Molekularbiologie nicht möglich. Auch in der organischen Synthese werden heutzutage immer häufiger Enzyme und Antikörper eingesetzt, um bestimmte Reaktionen zu katalysieren. Weiterhin werden Konzepte, wie sie die Natur schon seit Jahrmillionen praktiziert, in das Repertoire der Chemie aufgenommen. Das prominenteste Beispiel hierfür ist die Entwicklung der kombinatorischen Chemie:<sup>[6]</sup> In der Biologie beruht die Vielzahl der Rezeptoren des Immunsystems auf der kombinatorischen Vielfalt.<sup>[7,8]</sup> Hierbei werden die vier verschiedenen Gensegmente für die Rezeptorproteine, V (variable), D (diversity), C (constant) und J (joining), in vielen verschiedenen Möglichkeiten miteinander kombiniert. Anschließend erfolgt die paarweise Zusammenlagerung zweier verschiedener Rezeptorketten. Es resultieren Lymphocyten, die alle einen eigenen, spezifischen Rezeptor tragen. Dadurch kann das Immunsystem nahezu jeden neuen, bisher unbekannten Krankheitserreger erkennen und bekämpfen. In Analogie dazu wird in der präparativen Chemie versucht, durch Kombination verschiedener Bausteine eine große Anzahl von modular aufgebauten Verbindungen zu synthetisieren. Aus diesem Pool an verschiedenen Verbindungen (Bibliothek genannt) soll anschließend durch biologische oder physikalische Evaluation (*screening*) ein Molekül gefunden werden, das eine bestimmte Eigenschaft aufweist. Besonders in der Medizinischen Chemie ist die kombinatorische Chemie eine herausragende Methode, um einen neuen Wirkstoff zu finden bzw. zu optimieren. Da eine chemische Bibliothek nicht beliebig viele Verbindungen umfassen kann, kam in den letzten Jahren dem Design von Bibliotheken eine große Bedeutung zu. Bei sogenannten *biased libraries* werden bereits existierende Informationen über ein Zielmolekül (*target*) bei dem Design einer Bibliothek berücksichtig, um so die Anzahl der zu synthetisierenden Verbindungen handhabbar zu halten.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Kombination von organischer Synthese und biologischer Evaluation niedermolekulare, nichtpeptidische Antagonisten für das  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin zu entwickeln.  $\alpha$ 4-Integrine sind an einer Reihe pathologischer Vorgänge wie Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen beteiligt. Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. J. Boer sollen zunächst mit cyclischen Peptiden und Peptidmimetika Informationen über die räumliche Anordnung der pharmakophoren Gruppen erhalten werden. Diese strukturellen Informationen dienen anschließend zur Entwicklung niedermolekularer, nichtpeptidischer α4β7-Integrinantagonisten. Diese Verbindungen sollen parallel an der Festphase synthetisiert werden und den Aufbau einer biased library ermöglichen. Um eine rasche biologische Evaluation einer Bibliothek zu gewährleisten, muß daher noch ein leistungsfähiges Testsystem etabliert werden. Hierfür ist geplant, ein zellbasiertes on-bead screening auszuarbeiten. Die anschließende Identifizierung der Verbindungen soll mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgen.

In einem weiteren Projekt soll mit Hilfe eines Alanin- und Asparaginsäure-*scans* geklärt werden, ob die HEPIII-Sequenz aus Collagen Typ IV eine Bindungssequenz für  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrine darstellt.

# 2 Grundlagen der Medizinischen Chemie

### 2.1 Allgemeines

Die Medizinische Chemie beschäftigt sich mit der Entdeckung, Identifizierung, Entwicklung und Synthese biologisch aktiver Verbindungen. Sie umfaßt darüber hinaus die Interpretation der molekularen Wirkungsweise und den Metabolismus von Wirkstoffen. Ziel der Medizinischen Chemie ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit therapeutischem Effekt, den sogenannten Medikamenten.<sup>[9,10]</sup>

Die Leitstruktur stellt den Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Die häufigsten Quellen zur Auffindung neuer Leitstrukturen sind u.a. Zufall, Inhaltsstoffe von Pflanzen, tierische Gifte, tierische und mikrobielle Wirkstoffe, Untersuchung des Wirkstoffmetabolismus, klinische Beobachtungen, rationales Design, virtuelles *screening, molecular modelling, screening* von synthetischen Substanzen und Nachahmung endogener Liganden. Eine Leitverbindung ist ein Prototyp, der neben der gewünschten biologischen Aktivität noch zahlreiche unerwünschte Eigenschaften, wie etwa Toxizität, schlechte Löslichkeit, mangelnde Selektivität, etc. aufweist.

Aufbauend auf einer gefundenen Leitstruktur müssen durch chemische Synthese die gewünschten Eigenschaften optimiert und die Nebenwirkungen minimiert werden. Diese Wirkstoffoptimierung ist ein cyclischer, iterativer Prozeß aus chemischer Synthese und biologischer Testung. Die Ergebnisse, die aus dieser biologischen Evaluation resultieren, fließen wiederum in die Entwicklung neuer Verbindungen ein.

Neben der biologischen Wirkung eines Arzneimittels, der sogenannten Pharmakodynamik, spielt auch die Pharmakokinetik eine sehr wichtige Rolle. Die Pharmakokinetik umfaßt die Aufnahme (Resorption), Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung einer Substanz im Körper. Diese Eigenschaften werden in den ADME-Parametern zusammengefaßt (*absorption*, *distribution*, *metabolism*, *excretion*).

Aufgrund der Vielfältigkeit der Thematik sollen im Folgenden nur solche Themen kurz erläutert werden, die in der vorliegenden Arbeit bei der Synthese neuartiger Integrinantagonisten berücksichtigt wurden.

## 2.2 Modifizierung der Leitstruktur

Ein Wirkstoff setzt sich aus unterschiedlichen "Funktionseinheiten" zusammen. Als Pharmakophor werden jene Gruppen eines Moleküls bezeichnet, die für die Bindung an einen Rezeptor erforderlich sind. Sogenannte Haftgruppen sind für die biologische Wirkung einer Verbindung nicht unbedingt nötig, führen aber zu höheren Aktivitäten. Ferner gibt es Teile in einem Wirkstoff, die die Lipophilie und damit die Pharmakokinetik beeinflussen.

Gängige Modifikationen der Leitstruktur sind u.a. die Variation der Substituenten und des Substitutionsmusters, Einführung bzw. Eliminierung von Heteroatomen, Einführung bzw. Eliminierung von Chiralitätszentren, Änderung der Ringgröße und Kettenlänge, Einbau von Verzweigungen, etc.. Besondere Bedeutung kommt auch dem Austausch bestimmter Gruppen in einem biologisch aktiven Molekül zu. Der Ersatz sterisch und elektronisch verwandter Gruppen wird als isosterer Ersatz bezeichnet. Bioisostere sind chemisch oder physikalisch ähnliche Substituenten, die die gleiche biologische Wirkung hervorrufen, z.B. eine Carboxyl-Gruppe und Tetrazol. Die Änderung der konformativen Flexibilität, z.B. Erhöhung der Rigidität einer Seitenkette oder eines ganzen Moleküls durch Cyclisierung, kann zu erhöhter Aktivität und Selektivität führen. Als grobe Orientierung gilt: die Vergrößerung eines Moleküls, die Einführung von Stereozentren und eine konformative Fixierung erhöhen die Selektivität, falls es nicht zu einem Verlust der biologischen Aktivität kommt.

Gibt die Natur bereits einen peptidischen Liganden für einen Rezeptor als "Leitstruktur" vor, so kann durch einen Alanin-*scan* (jede Aminosäure wird schrittweise durch Alanin ersetzt) die Bedeutung der einzelnen Seitenketten ermittelt werden. Oftmals sind jedoch Peptide nur eingeschränkt als Medikamente einsetzbar, da (1) durch das hohe Molekulargewicht und die hohe Polarität Peptide nicht oral bioverfügbar sind, (2) Peptide metabolisch nicht sehr stabil sind und (3) Peptide sehr rasch im Körper über die Leber und Niere ausgeschieden werden können. Ziel ist es daher, Peptide in sogenannte Peptidmimetika zu überführen.<sup>[11]</sup> Peptidmimetika sollen an den selben Rezeptor binden und folgende Eigenschaften aufweisen: (1) metabolische Stabilität durch Verzicht auf Amidbindungen, (2) Erhöhung der Bioverfügbarkeit durch geringes Molekulargewicht und (3) feste Bindung an den Rezeptor durch gleiche räumliche Anordnung der pharmakophoren Gruppen. Es gibt sehr vielfältige Möglichkeiten ein Peptid nachzuahmen,<sup>[12]</sup> wie z.B. Modifikation der Aminosäuren,<sup>[13]</sup> Cyclisierung,<sup>[14]</sup> Modifikation der Amidbindung,<sup>[15]</sup> Substitution des Rückgrates durch ein Gerüstmimetikum,<sup>[16,17]</sup> etc..

### 2.3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffs

Mit der Etablierung der kombinatorischen Chemie glaubte man zunächst, daß sich die Zahl der Medikamente einfach dadurch erhöhen läßt, daß man eine große Zahl von Verbindungen synthetisiert und biologisch evaluiert. In der Zwischenzeit zeigte sich jedoch, daß die ersten Generationen von kombinatorisch erzeugten Bibliotheken nicht optimal waren, da sie meist große, lipophile, flexible Moleküle enthielten.<sup>[18]</sup> Aus dieser Erfahrung heraus wird nun bereits bei dem Design von Bibliotheken versucht, *drug-like molecules* zu generieren. Hierzu werden verschiedenste Methoden vom simplen Abzählen von Wasserstoff-Donatoren bis hin zu komplexen neuronalen Netzwerken verwendet.<sup>[19]</sup>

Damit ein Wirkstoff seinen Wirkort erreichen kann, muß er sowohl mit einer wäßrigen Umgebung (z.B. Cytoplasma) als auch mit einer lipophilen Umgebung (z.B. Membran) wechselwirken können. Nur Substanzen mit einer mittleren Lipophilie vermögen sowohl durch wäßrige als auch durch lipophile Phasen zu gelangen. Zudem setzen sich viele Bindungsstellen in Proteinen aus polaren und unpolaren Bereichen zusammen. Viele quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen daher einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Lipophilie einer Verbindung und deren biologischer Wirkung. Die Lipophilie beeinflußt auch die metabolische Aktivität und die Bindung Plasmaproteine.[20] Zur Beschreibung der Lipophilie an hat sich der Verteilungskoeffizient P (partition coefficient) zwischen Octan-1-ol und Wasser als sehr geeignet erwiesen.<sup>[21]</sup>

$$P = \frac{[\text{Verbindung}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Verbindung}]_{\text{Wasser}} \cdot (1 - \alpha)} \qquad \alpha: \text{Dissoziationsgrad der Verbindung in Wasser}$$

Für Verbindungen, die in Octan-1-ol besser löslich sind, ist P>1 und logP wird dadurch positiv. Der logP-Wert setzt sich additiv aus den Gruppenbeiträgen einzelner

Teile des Moleküls zusammen. Einige Chemie-Software-Programme haben bereits eine Funktion zur Berechnung des log*P*-Wertes für eine beliebige Verbindung implementiert.[22]

Durch die Analyse von 2245 oral bioverfügbaren Wirkstoffen, konnten Lipinski *et al.* von der Firma Pfizer Inc. einige allgemeine Eigenschaften für die Entwicklung von oral bioverfügbaren Substanzen ableiten.<sup>[23]</sup> Diese als "*Pfizer's rule of five*" bekannt gewordenen Eigenschaften trafen auf ca. 90% der untersuchten Verbindungen zu:

- $\log P < 5$
- Molekulargewicht < 500 g/mol
- Anzahl der Wasserstoff-Donatoren <5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren <10

Trotz der Verletzung der *rule of five* waren viele Antibiotika, Fungizide, Vitamine und herzwirksame Glykoside oral bioverfügbar. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, daß diese Moleküle Substrate für Transportsysteme darstellen. Die *rule of five* ist nicht verbindlich, sondern sie gibt nur eine Orientierungshilfe.<sup>[24,25]</sup> Ferner stellte Rishton eine Liste mit nahezu 25 funktionellen Gruppen zusammen, die aufgrund von Solvolyse und Reaktivität mit Nukleophilen ungeeignet für die Verwendung in Wirkstoffen sind.<sup>[26]</sup> Weitere Methoden, um *drug-like molecules* zu finden, sind u.a. Analyse des *chemistry space*,<sup>[27]</sup> Analyse der Bausteine von bekannten Medikamenten<sup>[28,29]</sup> und neuronale Netzwerke.<sup>[30,31]</sup>

### 2.4 Parallelsynthese und kombinatorische Chemie

Noch Ende der 80-iger Jahre stellte die biologische Testung den limitierenden Schritt bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Die Anzahl der Testsysteme war begrenzt, sie erforderten relativ große Substanzmengen und waren langwierig in der Durchführung. Durch Fortschritte in der Biochemie und Molekularbiologie konnten Anfang der 90-iger Jahre viele neue biologische Testmethoden entwickelt werden. Im *high-throughput-screening* (HTS) und im *ultra-high-throughput-screening* (UHTS) können heute in wenigen Tagen mehrere 100000 Verbindungen getestet werden.<sup>[32]</sup> Auch die Genomforschung liefert ständig eine Vielzahl an krankheitsrelevanten, im Assayformat verfügbaren biologischen *targets*. Die exponentiell angestiegene

Nachfrage nach zu testenden Verbindungen führte zur Entwicklung der Kombinatorischen Chemie.<sup>[33,34]</sup> Ziel dabei ist es, viele definierte Substanzen gleichzeitig herzustellen. Dazu muß die Zielverbindung **ABC** modular aus den einzelnen Bausteinen **A**, **B** und **C** aufgebaut werden (siehe Abbildung 2.1). Statt zwei Edukte **A** und **B** zu einem Produkt **AB** zu verknüpfen, werden unterschiedliche Bausteine vom Typ  $A(A^1-A^n)$  mit Bausteinen vom Typ  $B(B^1-B^n)$  verknüpft. Dabei reagiert jeder Baustein **A** mit jedem Baustein **B**. Die Reaktion kann simultan in einer Mischung (Mischungssynthese) oder parallel in getrennten Reaktionsgefäßen (Parallelsynthese) durchgeführt werden. Anschließend werden alle Produkte **AB** mit allen Bausteinen  $C(C^1-C^n)$  umgesetzt.



**Abbildung 2.1:** *a) Prinzip der kombinatorischen Synthese. b) Prinzip der mehrstufigen kombinatorischen Synthese.* 

Durch Kombination einiger Bausteine kann somit eine große Anzahl an Verbindungen, eine sogenannte Bibliothek, synthetisiert werden. Werden für die Bausteine **A**, **B** und **C** jeweils 10 verschiedene Verbindungen eingesetzt, so erhält man  $10x10x10=10^3$ Produkte. Auch die Natur bedient sich dieser Methodik. Neben dem bereits in der Einleitung erwähnten Beispiel der Rezeptoren des Immunsystems, sind die Proteine ein weiteres Beispiel. Mit nur 21 natürlichen Aminosäuren kann die Natur eine Vielzahl verschiedenster Proteine aufbauen.

Die Geburtsstunde der kombinatorischen Chemie basiert auf den bahnbrechenden Arbeiten von A. Furka, [35,36] R. Frank, [37] H.M. Geysen, [38] R.A. Houghten [39,40] und K. Lam. [41] Bibliotheken lassen sich sowohl in Lösung [42,43] als auch an der

Festphase synthetisieren.<sup>[44,45]</sup> Gegenwärtig erfolgen Bibliothekssynthesen meist an fester Phase, obwohl auch die Synthese in Flüssigphase zunehmend an Bedeutung gewinnt. Vorteile der Bibliothekssynthese in Lösung sind u.a., (1) maximale strukturelle Diversität, da es keine Einschränkungen bei den chemischen Reaktionen gibt, (2) größere Ansätze sind möglich, (3) keine größeren Überschüsse an Reagenzien sind nötig, (4) keine orthogonalen Linker sind nötig und (5) Reaktionskontrolle ist einfacher möglich. Ferner haben sich über die Jahre hinweg verschiedene Strategien zum Aufbau und zur Analyse von chemischen Bibliotheken entwickelt. Erwähnt seien hierbei die *split*-Methode nach Furka,<sup>[35,36]</sup> das *one-bead one-compound*-Konzept von Lam,<sup>[46]</sup> *array* Synthesen,<sup>[47]</sup> *tea-bag* Methode,<sup>[39]</sup> etc..

Zur Analyse von Bibliotheken und Festphasenreaktionen ist die Massenspektrometrie die Methode der Wahl.<sup>[52,53]</sup> Sie zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit, Automatisierbarkeit und hohe Geschwindigkeit aus. Ein weiter Vorteil besteht darin, daß die Massenspektrometrie sich mit anderen analytischen Verfahren wie HPLC und Kapillarelektrophorese koppeln läßt.

Die kombinatorische Chemie ist nicht mehr ausschließlich auf die Medizinische Chemie beschränkt, sondern findet auch in Materialwissenschaften,<sup>[54]</sup> Katalysatorforschung,<sup>[55,56]</sup> etc. Anwendung.

#### 2.4.1 Festphasensynthese

Die Festphasensynthese wurde gleichzeitig und unabhängig voneinander von Merrifield (Festphasensynthese von Peptiden) und Letsinger (Festphasensynthese von Oligonukleotiden) entwickelt.<sup>[57,58]</sup> Mit Ausnahme der Peptid- und Oligonukleotid-Synthese wurde die Festphasensynthese jahrzehntelang nur von wenigen Forschern wie Leznoff,<sup>[59]</sup> Camps<sup>[60]</sup> oder Patchornik<sup>[61]</sup> angewendet. Erst im Zeitalter der kombinatorischen Chemie erlebte die Festphasensynthese eine außerordentliche Renaissance.<sup>[33,62-64]</sup> Bei der Festphasensynthese sind die aufzubauenden Moleküle während der gesamten Synthese über einen Linker an einen polymeren Träger gebunden (siehe Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2: Allgemeines Prinzip der Festphasensynthese.

Der Linker muß gegenüber den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil sein. Ebenfalls muß aber das Produkt **AB** zerstörungsfrei wieder von dem Linker abgespalten werden können. Heutzutage gibt es viele verschiedene Linker und polymere Träger, so daß für nahezu alle Reaktionsfolgen ein geeignetes System kommerziell erhältlich ist. Die Vorteile der Festphasensynthese sind u.a. (1) einfache Automatisierbarkeit, (2) durch Verwendung hoher Überschüsse der Reagenzien können die Reaktionen beschleunigt und hohe Umsätze erzielt werden, (3) aufwendige Reinigungs- und Aufarbeitungsschritte entfallen, da nur das Harz gewaschen werden muß und (4) einfache Handhabung kleiner Mengen. In der Zwischenzeit wurde eine Großzahl an organischen Reaktionen auf die Festphase übertragen, so daß auch eine mehrstufige Festphasensynthese von komplexen Molekülen möglich ist.[44,65]

#### 2.4.2 Das one-bead one-compound-Konzept

Lam *et al.* erkannten, daß sich auf einem Harz-Kügelchen (*bead*) genau eine Verbindung in vielfacher Kopie befindet (*one-bead one-compound*).<sup>[46,66]</sup> Dabei ist es unabhängig davon, ob die Synthese nach der *split*-Methode oder als Parallelsynthese erfolgte. Die biologische Evaluation erfolgt, indem (1) das biologische *target* direkt an die harzgebundene Substanz bindet, oder (2) die biologische Wirkung der harzgebundenen Verbindung, z.B. Phosphorylierung detektiert wird.<sup>[67]</sup> Dieses *onbead screening* bezeichnet, wurde bereits häufig mit löslichen Rezeptoren, jedoch seltener mit ganzen Zellen durchgeführt.<sup>[68-71]</sup> Bei der Verwendung von orthogonalspaltbaren Linkern, können die Verbindungen auch von dem Harz abgespalten und anschließend in Lösung evaluiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein zellbasiertes *on-bead screening* Verfahren für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten zu etablieren.

# 3 Integrine als *targets* in der Medizinischen Chemie

Zell-Zell-Kontakte und Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix spielen bei der Entwicklung und Funktion des Gewebes eine herausragende Rolle. Diese Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch sogenannte Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules* (CAM)) vermittelt. Neben den Integrinen,[72-74] gehören auch *immunoglobulin-cell adhesion molecules* (IgCAM),[75] Cadherine,[76-78] Selektine,[79,80] CD44-ähnliche Moleküle,[81] und transmembrane Proteoglykane[82] in die Gruppe der CAMs.[83]

Die Integrine stellen die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie der CAMs dar. Der Begriff "Integrin" wurde erstmalig 1987 von Tamkun verwendet, um eine Familie strukturell, immunochemisch und funktionell ähnlicher Oberflächenrezeptoren zu beschreiben, die als integrale Membranproteine bei der Wechselwirkung der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett beteiligt waren.<sup>[84]</sup> Integrinen kommen vielfältige Funktionen zu. Sie wirken als Verankerungsproteine für Zellen, als Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine und können Signale von der Umgebung in die Zelle übertragen (*outside-in signaling*). Ferner können sie das Verhalten der Zellen, wie etwa Migration, *spreading* oder verankerungsabhängiges Wachstum steuern.<sup>[74]</sup> Umgekehrt kann die Zelle die Bindungsaffinität der Integrine bezüglich ihrer Liganden steuern (*inside-out signaling*).<sup>[85]</sup>

## 3.1 Struktur und Funktion der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Gegenwärtig sind 17 unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten sowie 8 verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten bekannt. Sie bilden insgesamt über 20 verschiedene  $\alpha\beta$ -Integrinheterodimere aus.<sup>[86]</sup> Die einzelnen Integrine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion und ihrer Liganden.

Integrine, die eine  $\beta$ 1-Untereinheit besitzen, werden als *very late antigen* (VLA) *integrins* bezeichnet.<sup>[87-89]</sup> Diese Bezeichnung stammt von den  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrinen, die erst nach einer Antigenstimulation auf der Oberfläche von Leukocyten exprimiert werden. Integrine mit einer  $\beta$ 1-Untereinheit spielen bei Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle, da sie an Matrixproteine binden. Integrine, die

eine  $\beta$ 2-Untereinheit besitzen, werden als *leukocyte integrins* bezeichnet, da sie nur auf Leukocyten exprimiert werden.<sup>[90,91]</sup> Sie sind im Immungeschehen beteiligt, da sie Zell-Zell-Wechselwirkungen vermitteln. Zytoadhesine setzten sich u.a. aus einer  $\beta$ 3-Untereinheit zusammen.<sup>[92]</sup> Andere  $\beta$ -Untereinheiten, die erst später entdeckt wurden, stellen keine eigenen Untergruppen dar.

Die α-Untereinheit der Integrine besteht aus 950 bis 1140 Aminosäuren. N-terminal weisen sie eine charakteristische Domänenstruktur von 7 repeat domains (jede ca. 50 Aminosäuren lang) auf.<sup>[93,94]</sup> Die letzten 3-4 repeat domains können zweiwertige Kationen binden. An diese repeat domains schließt sich eine stabartige Struktur an, die den extrazellulären Teil der α-Untereinheit mit der Transmembranregion verknüpft. Der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Untereinheit kann posttranslational z.B. durch Glykosylierung modifiziert sein. N-Terminal müssen sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Integrinuntereinheit glykosyliert sein. Nur dann ist die Ausbildung eines Heterodimers möglich. Die Transmembranregion der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einer  $\alpha$ -Helix. Dabei sind die Transmembranregionen der einzelnen α-Untereinheiten einander sehr ähnlich. Sie sind für die Ausbildung der Heterodimeren-Struktur nicht notwendig.<sup>[95,96]</sup> Die cytoplasmatische Region ist sehr kurz (ca. 20-50 Aminosäuren) und weist mit einer Ausnahme kaum Homologien auf.[97] Direkt an die Transmembrandomäne anschließend befindet sich in der cytoplasmatischen Domäne die Heptapeptid-Sequenz KXGFFKR, die in allen  $\alpha$ -Untereinheiten konserviert ist. Möglicherweise interagiert sie mit der, in der 
ß-Untereinheit konservierten Sequenz LLVXIHDR (siehe Abbildung 3.1).<sup>[98]</sup> Wird die Salzbrücke zwischen dem positiv Asparaginsäure in der  $\beta$ -Untereinheit zerstört, so führt dies bei  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinen zu signaling.[99] Ligand-unabhängigen Die einer Aktivierung und einem cytoplasmatische Region ist für die korrekte Ausbildung der Heterodimere notwendig.<sup>[96]</sup> Die Einteilung der α-Untereinheiten kann nach dem Vorhandensein einer sogenannten I-Domäne und der posttranslationalen Spaltung erfolgen.<sup>[74,88]</sup>



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Integrine.

Die  $\beta$ -Untereinheit unterscheidet sich genetisch von der  $\alpha$ -Untereinheit. Sie setzt sich aus 730 bis 800 Aminosäuren zusammen (Ausnahme:  $\beta$ 4-Untereinheit besteht aus 1820 Aminosäuren). Die  $\beta$ -Untereinheiten sind untereinander ähnlicher als die  $\alpha$ -Untereinheiten. 100 Aminosäuren vom *N*-Terminus entfernt, weist die  $\beta$ -Untereinheit eine Bindungsstelle für zweiwertige Kationen auf. Diese Bindungsstelle ist für die Ligandbindung essentiell.[100-103] Die Bindungsstelle für zweiwertige Kationen in der  $\beta$ -Untereinheit ist dem *EF-hand-motif* ähnlich. Auch hier wird das Kation in einer octahedralen Anordnung komplexiert. Die Aktivität des  $\alpha\beta$ -Heterodimers wird u.a. auch über die Bindung zweiwertiger Kationen an die  $\beta$ -Untereinheit gesteuert.[104]

An die Bindungsregion für zweiwertige Kationen schließt sich eine konservierte Region, bestehend aus ca. 250 Aminosäuren, an.[105] Sie ist an der Bindungen von Liganden beteiligt und stimmt zu 60-80% innerhalb der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten überein.[106,107] Möglicherweise spielt dieser Sequenzabschnitt auch für die Ausbildung des  $\alpha\beta$ -Heterodimers eine wichtige Rolle.[108] Jene Region, die den extrazellulären Teil der  $\beta$ -Untereinheit mit der Transmembranregion verknüpft, besteht zu 20% aus Cysteinen.[90,109] Die daran anschließende Transmembrandomäne besteht aus einer  $\alpha$ -Helix. Es folgt im Cytoplasma die schon erwähnte, konservierte LLVXIHDR-Sequenz. Mit Ausnahme von  $\beta$ 4 besitzen alle  $\beta$ -Untereinheiten eine cytoplasmatische Region, die aus 15 bis 65 Aminosäuren besteht.[97] Die cytoplasmatische Region der  $\beta$ -Untereinheit wechselwirkt mit  $\alpha$ -Actinin[110,111] und Talin.<sup>[112]</sup> Dadurch entsteht ein Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett. Ferner wird die Bildung von fokalen Adhäsionspunkten durch die cytoplasmatische Domäne von  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 bewirkt.<sup>[113,114]</sup> Die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten wird allerdings von der cytoplasmatischen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit solange verhindert, bis ein geeigneter Ligand an das Integrin gebunden hat.<sup>[115-117]</sup> Darüber hinaus wird die Bindung des Liganden an das Integrin durch die cytoplasmatische Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit verstärkt.<sup>[117-119]</sup> Die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten geht mit der Zusammenlagerung von Kinasen, wie z.B. der *focal adhesion kinase* p60<sup>e-sre</sup>, und einer Beteiligung an der Signaltransduktion einher.<sup>[120]</sup>

Integrine stellen nicht nur über Protein-Protein-Wechselwirkungen Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett her, sondern sie interagieren auch mit anderen Membranproteinen wie etwa mit den sogenannten *tetraspan proteins* (TM4).<sup>[121,122]</sup> Auch bilden die Integrine mit Kinasen einen supramolekularen Protein Komplex.<sup>[120]</sup>

Integrine können auf zwei gänzlich verschiedene Arten an der Signaltransduktion beteiligt sein. Einmal kann dies durch Ausbildung von *Integrin-Clustern* mit anderen Integrinen oder Effektormolekülen geschehen. Andererseits können Integrine selbst durch Konformationsänderungen, wie sie z.B. durch Bindung eines Liganden hervorgerufen werden, ein Signal von dem extrazellulären Raum in den intrazellulären Raum weiterleiten. Beim *inside-out signaling* können möglicherweise intrazelluläre Faktoren die Konformation der Integrin so beeinflussen, daß sich die Affinität und Spezifität für extrazelluläre Liganden ändert.[123-126]

## 3.2 Integrine und ihre Liganden

Integrine erkennen eine Vielzahl von Liganden. Die Erkennungssequenzen in den einzelnen Liganden unterscheiden sich. Dennoch gibt es zwei Motive, die sehr häufig auftreten: RGD und LDV. Die RGD-Sequenz ist invariant und stellt für viele Integrine die Bindungssequenz dar (z.B.  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 1$ , etc.). Bei der LDV-Sequenz hingegen können Sequenzmodifikationen auftreten.  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$ -Integrine erkennen beispielsweise in Fibronektin die LDVP-Sequenz[127] und in VCAM-1 die

IDSP-Sequenz.<sup>[128]</sup>  $\beta$ 2-Integrine erkennen in ICAM-1, -2 und -3 ebenfalls LDV Modifikation (IETP, LETS und LETS).<sup>[129]</sup> Allen Erkennungssequenzen ist jedoch gemeinsam, daß sie eine saure Aminosäure-Seitenkette beinhalten.

## **3.3** α3β1-Integrin-Rezeptor

Zunächst glaubte man, daß der α3β1-Integrin-Rezeptor eine Vielzahl verschiedener Liganden binden würde. So wurden Laminin-1, Fibronektin, Kollagen (Typ I und IV) und Nidogen/Entactin als Liganden für  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine beschrieben.<sup>[130-132]</sup> Auch wurden  $\alpha 2\beta 1/\alpha 3\beta 1$ -Integrin- und  $\alpha 3\beta 1/\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Wechselwirkungen für Zell-Zell-Interaktionen angenommen.<sup>[133,134]</sup> Transfektionsstudien konnten letzteres jedoch nicht bestätigen.<sup>[135]</sup> Neueren Untersuchungen zufolge, scheint das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an deutlich weniger Liganden zu binden, als zunächst vermutet wurde. So zeigten Untersuchungen, daß  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrine bevorzugt an Laminin-5, das auch Kalinin oder Nicein genannt wird, bindet.<sup>[136-139]</sup> Epiligrin ist ein Assoziat aus Laminin-5 und Laminin-6. Auch Laminin-10 und Laminin-11, die α5 enthalten, sind Liganden für das  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin.<sup>[140]</sup> Neuere Ergebnisse zeigen, daß möglicherweise auch Thrombospondin-1 in bestimmten Zelltypen ein Ligand für das  $\alpha 3\beta$ 1-Integrin sein kann.<sup>[141]</sup> Die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit kommt in zwei unterschiedlichen *splice*-Varianten vor: a3AB1 ist im Gehirn sowie im Herz exprimiert. a3BB1 kann in allen anderen Geweben gefunden werden.  $[142] \alpha 3$ -,  $\alpha 6$ - und  $\alpha 7$ -Untereinheiten weisen eine große Homologie auf. [131,143,144] Sie besitzen drei Bindungsstellen für zweiwertige Kationen zwischen den repeat domains V, VI und VII. Ferner fehlt ihnen allen die I-Domäne und sie werden proteolytisch 860 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt gespalten.[142,144-146]

Die biologische Funktion von  $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen ist erst in Ansätzen geklärt, da sie äußerst komplex zu sein scheinen.  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine sind häufig auf der basolateralen Membran vieler verschiedener Epithelzell-Typen exprimiert.<sup>[147]</sup> Verschiedenartigste Experimente zeigen, daß  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Epidermis und in der Wundheilung spielen.<sup>[148-150]</sup> Jedoch ist das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nicht nur ein Basalmembran-Rezeptor, sondern es kommt ihm vermutlich eine sehr komplexe Rolle bei der Migration, Organisation des Zytoskeletts und Modulation der Adhäsion zu.

Ferner werden  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine auch auf glomerulären Podocyten und zusammen mit  $\alpha 2\beta 1$ -und  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen auf den Sammelrohren in der Niere sehr stark exprimiert.<sup>[151]</sup> Auch hier spielt das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin eine wichtige Rolle bei der Organisation der Basalmembran.<sup>[152]</sup> Möglicherweise können  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine auch die Funktion anderer Adhäsionsrezeptoren, wie etwa Dystroglycan oder anderer Integrine, modulieren.<sup>[148,153]</sup>

 $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrine spielen u.a. auch in dem sich entwickelnden Nervensystem,[154,155] Lunge,[152] Muskeln,[156] und Leber [157] eine wichtige Rolle.

Welche Rolle den  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen zukommt, ist gegenwärtig von großem Interesse. Es scheint so zu sein, daß  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine bei Tumoren epitheliären Ursprungs weniger stark exprimiert werden, während nicht epitheliäre Tumore  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine sehr stark exprimieren.<sup>[158]</sup>  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine wechselwirken mit einigen der sogenannten Tetraspanin-Proteine, wie z.B. mit CD9, CD53, CD63 und CD81.<sup>[159]</sup> Mittels jener Komplexe können  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine an zellulären Prozessen beteiligt sein.

# 3.4 α4-Integrin-Rezeptoren

α4β1-, α4β7- und αΕβ7-Integrine und die sogenannten *leukocyte integrins* (αLβ2-, αMβ2-, αdβ2- und αXβ2-) sind an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt. Solche Integrin-vermittelten Zell-Wechselwirkungen führen u.a. zu Veränderungen der Zellform, Migration, Genaktivierung und Sekretion. α4β1-, α4β7- und αΕβ7-Integrine sind neben den sogenannten *leukocyte integrins* vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Sie spielen bei Entzündungen und dem Immunprozeß eine wichtige Rolle.[160,161] Die Extravasation von Leukocyten setzt sich aus verschiedenen Schritten, wie *rolling*, Adhäsion und schließlich Migration durch die Endothelschicht zusammen (siehe Abbildung 3.2).[162] Bei diesem Prozeß sind verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt. Der erste Kontakt (*tethering*) (1) zwischen Leukocyten und den Endothelzellen wird vor allem durch Selektine, aber auch in einigen Fällen durch Integrine (z.B. α4β7–Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung) vermittelt. Dies führt zu einem Herabsinken der Geschwindigkeit von zirkulierenden Leukocyten. Dadurch können die Leukocyten die Blutgefäße nach proadhäsiven Faktoren "durchsuchen". Die Aktivierung (3) der Leukocyten erfolgt durch Selektine und Cytokine. Chemokin-Rezeptoren sorgen für die Hochregulierung und Aktivierung der Integrine auf den Leukocyten. Diese Integrine vermitteln die Adhäsion (4) der Leukocyten auf der Oberfläche von Endothelzellen. Bisher konnte nur die Beteiligung von  $\alpha$ 4–Integrinen und  $\beta$ 2–Integrinen bei dem Adhäsionsschritt nachgewiesen werden. Integrine und Chemokine sowie ihre Rezeptoren sind bei der anschließenden Migration in das Gewebe beteiligt. Mit Hilfe von Cytokinen, die als Chemoattraktoren (Chemokine) wirken, wandern die Leukocyten schließlich durch das Gewebe.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der schrittweisen Extravasation von Leukocyten.

Im Immunsystem ist die Extravasation ein wichtiger Prozeß. Hierdurch wird der Zugang spezialisierter Leukocyten in ganz bestimmtes Gewebe kontrolliert und somit die Art der lokalen Immunität und die Immunantwort beeinflußt. Die Spezifität hängt dabei von der Art der vaskulären Phenotypen und von der Regulation der *chemoattractant* Rezeptoren und dem *homing* der Leukocyten ab. Als *homing* bezeichnet man den Vorgang, bei dem Leukocyten ihren Bestimmungsort in einem spezifischen Gewebe erreichen. In Tabelle 3.1 sind einige Adhäsionsmoleküle und

Chemokin-Rezeptor-Paare aufgeführt, die bei dem gewebespezifischen *homing* beteiligt sind.

In jedem der in Abbildung 3.2 gezeigten Schritten, kann das *homing* der Leukocyten reguliert werden. Im Gegensatz zu den Selektinen können  $\alpha$ 4-Integrine sowohl an dem *tethering* als auch an der Adhäsion der Leukocyten an das Endothel beteiligt sein.<sup>[163]</sup>  $\alpha$ 4-Integrine dienen auch dazu, die Geschwindigkeit der rollenden Leukocyten weiter zu vermindern.

**Tabelle 3.1:** Adhäsionsmoleküle und Chemokin-Rezeptor-Paare, die bei dem gewebespezifischen homing beteiligt sind. Vermutete Rezeptoren sind kursiv dargestellt.<sup>[164]</sup>

	Extravasation				
Ort	Zelltyp	tethering/ rolling	Aktivierung	Adhäsion	Diapedese
periphäre Lymphknoten	naive B- und T-Zellen	L-Selektin- PNAd	CCR7-SLC	LFA-1- ICAM-1	CCR7- MIP-3β
Peyersche Plaques	naive B- und T-Zellen	L-Selektin- PNAd; α4β7- MAdCAM-1	unbekannt	LFA-1- ICAM-1; α4β7- MAdCAM-1	unbekannt
Lamina propria	T- Gedächtnis- zellen des Darms	α4β7- MAdCAM-1	CCR9-TECK	LFA-1- ICAM-1; α4β7- MAdCAM-1	CCR9-TECK
Entzündete Haut	T- Gedächtnis- zellen der Haut	CLA-E- Selektin; α4β1- VCAM-1	CCR4-TARC	LFA-1- ICAM-1; <i>α4β1-</i> <i>VCAM-1</i>	CCR?- CTACK

Die  $\alpha$ 4-Integrinuntereinheit wird an der Zelloberfläche als 150000 Da Protein exprimiert. Durch die Aktivierung von T-Lymphocyten kann diese Interginuntereinheit zwischen Arg558 und Ser559 gespalten werden, was zur Bildung von Fragmenten mit 70000 und 80000 Da führt.<sup>[165]</sup> Die Adhäsion an VCAM-1 oder Fibronektin wird durch diese Spaltung nicht beeinflußt. Ferner existiert noch eine weitere Form der  $\alpha$ 4-Integrinuntereinheit mit einem Molekulargewicht von 180000.<sup>[166]</sup> Die beiden VCAM-1 bindenden  $\alpha$ d $\beta$ 2- und  $\alpha$ 9 $\beta$ 1-Integrine stehen in einem engen Bezug zu der Biologie der  $\alpha$ 4-Integrine.<sup>[167,168]</sup>

### **3.4.1** α4β1-Integrin-Rezeptor

α4β1-Integrine (VLA-4, CD49d/CD29) werden auf Lymphocyten und anderen Leukocyten exprimiert. Allerdings exprimieren neutrophile Granulocyten keine α4β1-Integrine. Bei reifen Blutzellen kommen α4β1-Integrine nur auf T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Monozyten, basophilen und eosinophilen Granulocyten vor.<sup>[169]</sup> Sie vermitteln das *homing* und die Verankerung von unreifen Blutzellen an *bone marrow stromal cells* und an ihre extrazelluläre Matrix.<sup>[170,171]</sup> Das Matrixprotein Fibronektin<sup>[172,173]</sup> und das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)<sup>[174,175]</sup> stellen u.a. die natürlichen Liganden für α4β1-Integrine dar. Auch α4β1-Integrine verschiedener Zellen können miteinander wechselwirken.<sup>[176]</sup> In Fibronektin binden α4β1-Integrine über die LDV-Sequenz an CS1,<sup>[177,178]</sup> mittels der REDV-Sequenz an humanes CS5<sup>[179]</sup> und über die IDA-Sequenz an HepII.<sup>[180]</sup> In VCAM-1 binden α4β1-Integrine über einen exponierten β-*turn* an die Sequenz QIDSP.<sup>[128,181-184]</sup>

Allen Bindungssequenzen (LDV aus CS-1, IDAPS aus HepII und QIDSP aus VCAM-1) für die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung ist gemein, daß der negativ geladene Asparaginsäure-Rest *N*-terminal von einer Aminosäure mit einer großen hydrophoben Seitenkette flankiert wird. *C*-terminal befindet sich entweder eine polare Aminosäure wie Thr bzw. Ser oder eine Aminosäure mit einer kleinen, hydrophoben Seitenkette wie etwa Ala bzw. Val. Zusammenfassend läßt sich das Erkennungsmotiv der  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine auf die allgemeine Sequenz <sup>I</sup>/<sub>L</sub>-D-<sup>S</sup>/<sub>V</sub>-P reduzieren.

Es konnte auch gezeigt werden, daß  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine über die RGDS-Sequenz an das zentrale Zellbindungsfragment von Fibronektin binden.<sup>[185]</sup> Sowohl CS1- und IDAPS- Peptide können die Adhäsion von  $\alpha 4\beta$ 1-Integrinen and die RGD-Bindungssequenz inhibieren und umgekehrt.

Ferner treten noch adhäsive Wechselwirkungen zwischen  $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen und Thrombospondin<sup>[186]</sup> und dem Membranprotein Invasin des Bakteriums *Yersinia Pseudotuberculosis* auf.<sup>[187]</sup> Mit löslichem uPAR D2D3 (uPAR, das nur mit dem Domänen 2 und 3 exprimiert wird) konnte gezeigt werden, daß die Bindung von uPAR an  $\alpha 4\beta 1$ -Integrine sehr ähnlich der  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/VCAM-1- bzw. der  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/CS-1-Wechselwirkung ist. Möglicherweise überlappt die uPAR-Bindungsstelle in  $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen mit jenen für VCAM-1 und CS-1.<sup>[188]</sup> Über die  $\alpha 4\beta 1$ - $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Wechselwirkung ist noch sehr wenig bekannt. Der Ersatz von Arg<sub>89</sub> und Asp<sub>90</sub> in der  $\alpha 4$ -Untereinheit unterbindet zwar die  $\alpha 4\beta 1$ - $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Wechselwirkung nicht aber die  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-VCAM-1-Wechselwirkung.[189]

Das  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin-Heterodimer dissoziiert sehr leicht wieder in die entsprechende  $\alpha$ und  $\beta$ -Untereinheit.<sup>[169]</sup> Ferner bilden  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine selbst nach Ligandbindung keine fokalen Adhäsionspunkte. Ihre Wechselwirkung mit dem Zytoskelett ist vergleichsweise schwach, was die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine in charakteristischer Weise dazu befähigt, Zellmigrationen zu unterstützen.<sup>[190,191]</sup>

 $\alpha 4\beta$ 1-Integrine können *in-vitro* entweder durch die Zugabe von Metallionen, wie z.B. Mn<sup>2+</sup> oder durch aktivierende Antikörper für die  $\beta$ 1-Kette aktiviert werden (siehe Abbildung 3.3).[192,193]



**Abbildung 3.3:** Unterschiedliche Affinitäts-Zustände der Integrine. Die Aktivierung der Integrine führt zu einer räumlichen Veränderung der Integrinuntereinheiten. Dadurch wird eine Integrin-Ligand-Wechselwirkung möglich.<sup>[86]</sup>

Der Aktivierungszustand der  $\alpha$ 4-Integrine ist für die Entwicklung von Antagonisten von entscheidender Bedeutung, da viele Tests mit *high affinity*  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrinen durchgeführt werden. Allerdings erweisen sich Antagonisten in einem Test mit lowaffinity  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrinen oftmals als um viele Größenordnungen schwächer.[194] Kürzlich konnte gezeigt werden, daß sowohl auf Jurkat- als auch auf PBL-Zellen  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrine zu einem gewissen Ausmaß (< 10%) in dem *high affinity state*  vorliegen.<sup>[195]</sup> Dabei bewirken  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine im *low affinity* Zustand das *tethering* und *rolling* der Zellen auf VCAM-1 während  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine im *high affinity* Zustand die feste Adhäsion der Zellen an VCAM-1 bewirken.

Die Emigration der Lymphocyten aus dem Blutstrom durch die Blutgefäße in das Gewebe an einen Entzündungsort wird durch die α4β1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung vermittelt.<sup>[196]</sup> In Melanomzellen ist das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin hochexprimiert. Über die α4β1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung können diese Melanomzellen aus dem Blut in das umgebende Gewebe eindringen und Metastasen Hämatopoese<sup>[198-200]</sup> bilden [197] Auch bei der und bei der Muskelentwicklung<sup>[201]</sup> spielt die α4-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung eine große Rolle.

### **3.4.2** α4β7-Integrin-Rezeptor (lymphocyte homing factor receptor)

 $\alpha 4\beta$ 7-Integrine werden häufig auch als LPAM-1 bezeichnet (*lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule*), da sie das *homing*  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin-exprimierender Leukocyten an Mucoza-assoziiertes lymphatisches Gewebe steuern. In erwachsenen Menschen werden  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine unterschiedlich stark auf T- und B- Zellen exprimiert. Demgegenüber ist das Expressionsmuster der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine auf NK Zellen, eosinophilen Zellen und auf T- und B- Zellen von Neugeborenen homogen.<sup>[202]</sup> Wie  $\beta$ 7-*knockout* Mäuse zeigten, sind  $\beta$ 7-Integrine für die Bildung und den Erhalt des mucosa lymphatischen Gewebes essentiell.<sup>[203]</sup>

α4β7-Integrine binden spezifisch und mit hoher Affinität an MAdCAM-1. Die Affinität der α4β7-Integrine für MAdCAM-1 kann durch Aktivierung der Leukocyten deutlich gesteigert werden. Mit der Aktivierung der Leukocyten geht vermutlich eine konformative Änderung der extrazellulären Domäne der Integrine einher.[204,205] Tabelle 3.1 zeigt die Rolle der α4β7-Integrine bei dem *homing* von Leukocyten. Naive Leukocyten (L-Selektin<sup>pos</sup>, α4β7<sup>lo-med</sup>, LFA-1<sup>pos</sup>) können zwar an die *high endothelial venules* (HEV) der Peyerschen Plaques (PP) (L-Selektin-Ligand<sup>lo</sup>, MAdCAM-1<sup>hi</sup>, ICAM-1<sup>pos</sup>, ICAM-2<sup>pos</sup>) adhärieren, nicht aber an *lamina propria* (Selektin-Ligand<sup>neg</sup>, MAdCAM-1<sup>pos</sup>). Ursache hierfür ist das Fehlen des Selektin-Liganden auf *lamina propria*. Nur ein Zusammenspiel von Selektin und α4β7-Integrin-/MAdCAM-1-Wechselwirkungen erlaubt ein Adhärieren der naiven Leukocyten an HEV der Peyerschen Plaques. Durch diesen Mechanismus können naive Zellen zwar in *mucosa* und peripheres, sekundäres lymphatisches Gewebe gelangen, nicht aber an *mucosa* Effektorstellen. Zellen, die sehr stark  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine exprimieren, können hingegen ausschließlich über diese mit Blutgefäßen der *lamina propria* interagieren.<sup>[163]</sup> Die unterschiedliche Expression der hochspezialisierten *homing*-Rezeptoren und der entsprechenden Gegenrezeptoren können somit das *homing* regulieren.

Deutlich schwächer und erst nach Aktivierung mit Phorbol-Ester binden  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine an das CS-1 Fragment von Fibronektin und an die erste und vierte Ig-Domäne von 7D-VCAM-1.[206-208]  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine können durch Mn<sup>2+</sup> aktiviert werden.[209]

### **3.5 Liganden für α4-Integrine**

#### 3.5.1 Fibronektin

An Fibronektin (Fn) wurde erstmalig entdeckt, daß Integrine über die Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure an extrazelluläre Matrixproteine binden können.[210,211] Fibronektin besteht aus zwei ähnlichen Ketten, die in der Nähe des *C*-Terminus über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 3.4). Die beiden unterschiedlich langen Ketten sind einander ähnlich und bestehen aus *Fn type I* ( $\Diamond$ ), *Fn type II* ( $\circ$ ) und *Fn type III* ( $\Box$ ) *repeat domains*.

Die längere Kette A weist im Gegensatz zu Kette B eine zusätzliche *splice*-Region auf. Dieses sogenannte *type III connecting segment* (IIICS) bzw. *variable region* (V) ist zwischen den letzten beiden *Fn type III repeat domains* insertiert. Innerhalb dieser IIICS-Region führt alternatives *splicing* zu fünf verschiedenen Varianten.[212,213]

 $\alpha 4\beta$ 1-Integrine können über diese *splice* Region IIICS in einer RGD-unabhängigen Weise an Fibronektin binden.<sup>[127,214]</sup> Durch *epitop mapping* von IIICS wurden zwei nicht zusammenhängende Peptide CS1 und CS5 gefunden, die Adhäsion und *spreading* von  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin exprimierenden Melanomzellen vermitteln.<sup>[215]</sup> Das Peptid CS1 weist die minimale Erkennungssequenz LDV auf.<sup>[177,178]</sup> Die LDV vermittelte Erkennung von  $\alpha 4\beta$ 1-Integrinen ist nicht nur auf eine Spezies beschränkt, sondern diese LDV-Sequenz ist in humanem, Rinder-, Ratten- und Hühner-Fibronektin sehr stark konserviert.<sup>[177]</sup> Um LDV-haltige Peptide binden zu können müssen  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine zuvor mit Mn<sup>2+</sup>-Ionen oder mit einem Antikörper aktiviert werden.[123,193,216] Auch  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine binden nach vorheriger Aktivierung an das CS1-Fragment von Fibronektin. Allerdings ist die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/CS-1-Fragment - Wechselwirkung relativ schwach.[208]



**Abbildung 3.4:** Domänenstruktur von Fibronektin mit Integrinbindungsstellen.[211]Beiden Ketten sind aus jeweils drei verschiedenen Arten der repeat domains aufgebaut: Type I repeat domain ist als Raute ( $\diamond$ ), type II repeat domain ist als Kreis ( $\circ$ ) und type III repeat domain ist als Quadrat ( $\Box$ ) dargestellt. Type III repeat domains sind von 1 bis 15 durchnumeriert.

CS5, das aus humanem Fibronektin abgeleitet wurde, besitzt die minimale Erkennungssequenz REDV.[179]

In der zweiten Heparin Bindungsdomäne (HepII) der Fibronektin-Ketten A und B befindet sich eine weitere Bindungssequenz für  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine. Die Erkennung erfolgt über die IDAPS-Sequenz.<sup>[180]</sup>

Im Vergleich zur REDV-Sequenz (CS5-Peptid) und IDAPS-Sequenz (HepII) ist die Affinität der LDV-Sequenz in CS1 für  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrine 20-fach stärker.<sup>[180]</sup>

### 3.5.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

*Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) ist ein Ligand für  $\alpha D\beta_2, [167] \alpha 4\beta_1$ -[175,209] und  $\alpha 4\beta_7$ -Integrine. VCAM-1 weist jedoch eine deutliche Präferenz für  $\alpha 4\beta_1$ -Integrine auf. VCAM-1, [174] gehört mit ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 und MAdCAM-1 in die integrinbindende Untergruppe der *immunoglobulin superfamily* (IgSF)-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.5).[161]



**Abbildung 3.5:** Domänenstruktur der IgSF-Adhäsionsrezeptoren. Domänen, die mit  $\alpha$ 4-Integrinen wechselwirken, sind dunkel hervorgehoben.

Die extrazelluläre Domäne von VCAM-1 besteht je nach *splice*-Variante aus 3 (3D-VCAM-1),<sup>[217]</sup> 6 (6D-VCAM-1) oder 7 (7D-VCAM-1) Immunoglobulin (Ig) Domänen. Die Bezeichnung der einzelnen Domänen erfolgt vom *N*-Terminus aus mit D1 bis D7. Dabei ähneln die ersten drei Ig-Domänen D1-D3 sehr stark den Ig-Domänen D4-D6. Der *splice*-Variante 6D-VCAM-1 fehlt die Ig-Domäne D4.

Jede Ig-Domäne besteht wiederum aus 7  $\beta$ -Strängen, die mit A bis G bezeichnet werden. Die  $\beta$ -Stränge ABE und CDFG bilden jeweils ein  $\beta$ -Faltblatt aus. Wie bei allen Immunglobulinfaltungen sind die beiden  $\beta$ -Faltblätter über eine Disulfidbrücke zwischen den  $\beta$ -Strängen B und F miteinander verknüpft. VCAM-1 besitzt eine sehr kompakte Tertiärstruktur. In Ig-Domäne D1 ist nur der C-D-*loop*, der die  $\beta$ -Stränge C

und D miteinander verknüpft, exponiert und gut zugänglich (siehe Abbildung 3.6).[183,184]

Sowohl  $\alpha 4\beta 1$ -[182,218] als auch  $\alpha 4\beta 7$ -Integrine binden bei 6D-VCAM-1 und 7D-VCAM-1 an die erste Ig-Domäne D1. Bei 7D-VCAM-1 binden sie noch zusätzlich an die vierte Ig-Domäne D4.[206,207,219,220] Somit kann 7D-VCAM-1 über zwei verschiedene Bindungsstellen mit  $\alpha 4$ -Integrinen wechselwirken. Die Wechselwirkungen sind unabhängig voneinander. Da die Wechselwirkung mit der Bindungsstelle in der vierten Ig-Domäne nicht so stark ist wie mit jener in der ersten Ig-Domäne, müssen  $\alpha 4\beta 1$ -Integrine stärker aktiviert werden, um an D4 binden zu können.[206] Ferner müssen die benachbarten Ig-Domänen D2 und D5 im Molekül vorhanden sein, damit  $\alpha 4\beta 1$ -Integrine an die Ig-Domänen D1 bzw. D4 binden können.[128,181]

Punktmutationsstudien an rekombinantem VCAM-1 lieferten die QID<sub>40</sub>SP-Sequenz in der Ig-Domäne D1 als Bindungssequenz für  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine[128,181,182,221] und  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine. Sie befindet sich in einem  $\beta$ -*turn* in dem exponierten C-D-*loop* in der Domäne D1.<sup>[183,184]</sup> Der β-*turn* wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Aminosäuren und durch Prolin stabilisiert. Die starre räumliche Anordnung der Bindungssequenz im loop erklärt auch, warum lineare Peptide der selben Sequenz nahezu keine antagonistische Aktivität aufweisen.<sup>[184,221]</sup> Vermutlich aus dem selben Grund, können cyclische RGD-Peptide im Gegensatz zu linearen RGD-Peptiden die α4β1-Integrin-/VCAM-1-Wechselwirkung inhibieren.<sup>[222]</sup>

Darüber hinaus dienen die Sequenzen G<sub>66</sub>NEH im E-F-*loop* und K<sub>79</sub>LEK am Anfang des  $\beta$ -Stranges G als Auxilliare für die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung.<sup>[221,223]</sup> Die Wechselwirkung mit den  $\alpha$ 4-Integrinen ist abhängig von dem jeweiligen Aktivierungszustand des Rezeptors.

 $\alpha 4\beta$ 1-Integrine binden über die QID<sub>328</sub>SPL-Sequenz innerhalb des C-D-*loops* an die vierte Ig-Domäne D4 von 7D-VCAM-1.<sup>[182]</sup> Allerdings ist diese Sequenz im Gegensatz zur QID<sub>40</sub>SP-Sequenz in der Ig-Domäne D1 in Mensch, Maus und Ratte nicht konserviert. In Maus und Ratte ist QID<sub>328</sub>SPL durch TDSPL substituiert.<sup>[221]</sup>


**Abbildung 3.6:** Röntgenstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM-1.<sup>[183]</sup> Die QIDSP-Erkennungssequenz liegt innerhalb des CD-loops.

Alle drei Erkennungssequenzen liegen auf der selben Seite von VCAM-1, so daß das CDFG-Faltblatt jene Stelle ist , an der die Wechselwirkung mit dem  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin stattfindet. Allerdings ist die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine/VCAM-1-Wechselwirkung relativ schwach.[208]

Nach der Aktivierung durch Lipopolysaccharide exprimieren sowohl Endothelzellen von Blutgefäßen als auch Entzündungs-Zytokine VCAM-1.[197,224,225]

## 3.5.3 Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1)

*Mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) ist ein hochaffiner Ligand für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine. Häufig bezeichnet wird MAdCAM-1 auch als *lymphocyte homing factor* bezeichnet, da es das *homing*  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin exprimierender Leukocyten an mucosaassoziiertes lymphatisches Gewebe steuert.

MAdCAM-1 wird sehr stark auf den postkapillaren Venolen mit hohem Endothel (HEV) der Peyerschen Plaques und auf den mesenterialen Lymphknoten auf Venolen in der *lamina propria* des Darms exprimiert. Dort fungiert MAdCAM-1 als gewebespezifisches Addressin (=Moleküle auf Endothelzellen, an die Adhäsionsmoleküle der Leukocyten binden) oder als *homing* Faktor.<sup>[226-229]</sup> Die Peyerschen Plaques sind Ansammlungen von Lymphocyten entlang des Dünndarms und vor allem im Bereich des Ileums.<sup>[230]</sup>

MAdCAM-1 wird auch auf dem vaskulären Endothel der Brustdrüse, der Bauchspeicheldrüse, dem Randsinus in der Milz und auf den Blutgefäßen in Regionen chronischer Entzündungen exprimiert.<sup>[162,231]</sup> MAdCAM-1 besteht aus drei Ig-Domänen und einer Muzin-ähnlichen Domäne. MAdCAM-1 gehört in die integrinbindende Untergruppe der *immunoglobulin superfamily* (IgSF)-Rezeptoren. Die ersten beiden Ig-Domänen von MAdCAM-1 sind jenen D1/D2 bzw. D4/D5 von 7D-VCAM-1 sehr ähnlich.<sup>[226]</sup> Diese Verwandtschaft legt den Schluß nahe, daß  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrine über die erste Ig-Domäne mit MAdCAM-1 interagieren und die zweite Ig-Domäne als Auxiliar dient.<sup>[228,232]</sup>

Die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung erfolgt über die LD<sub>40</sub>T-Sequenz im C-D-*loop*.[232,233] Die LDT-Bindungssequenz ist in Abbildung 3.7 vergrößert dargestellt. Die Substitution von Leu innerhalb der LDT-Triade führt zu einem Verlust der Bindungsaktivität.[204,232]

Zwischen der zweiten und dritten Ig-Domäne ist eine Muzin-ähnliche Domäne insertiert. Sie ist durch O-glykosidisch verknüpfte und Sialyl-Säure tragende Kohlenhydrate modifiziert (siehe Abbildung 3.5). Die Unterschiede dieser Domäne zwischen murinem und human MAdCAM-1 sind sehr groß.<sup>[231]</sup> Diese Muzin-ähnliche Domäne vermittelt L-Selectin-abhängige Wechselwirkungen zwischen

Lymphocyten mit MAdCAM-1, was wiederum zu einem Kontakt zwischen Lymphocyten und Endothelzellen führt.[235]



**Abbildung 3.7:** *Röntgenstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von MAdCAM-*1.[234] Das LDT-Bindungsmotiv liegt innerhalb des CD-loops.

Sowohl die L-Selectin als auch die  $\alpha$ 4-Integrin vermittelte Wechselwirkungen mit MAdCAM-1 bewirken eine Emigration der Leukocyten aus dem Blutstrom in das Gewebe, um an eine Entzündungsstelle zu gelangen oder während des *lymphocyte homing*.<sup>[161]</sup> Bei der humanen IBD (*inflammatory bowel disease*) und in Mausmodellen der Colitis ist die Expression von MAdCAM-1 im Darm erhöht.<sup>[236]</sup>

## **3.6 Bindungsstellen in α4-Integrinen**

Bisher ist nur sehr wenig über die Bindungsstellen innerhalb der Integrine bekannt.<sup>[237,238]</sup>  $\alpha$ 4-Integrine besitzen das sogenannte *EF hand motif*. Es ist eine Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, die aus sechs Aminosäure-Seitenketten aufgebaut ist. Diese Aminosäure-Seitenketten fungieren als Chelatligand und bilden mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen einen oktaedrischen Komplex, bei dem der Chelatligand an Position 6 fehlt.<sup>[239]</sup> Diese freie Position wird durch eine negativ geladene Aminosäure, wie etwa Asp oder Glu, des Liganden besetzt. Dadurch entsteht die Integrin-Ligand-Wechselwirkung.<sup>[240]</sup> Punktmutationsstudien in dem *EF hand motif* von  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrinen führt zu einer Verminderung der Ligandbindung und der Bindung von zweiwertigen Kationen. Die Ausbildung der  $\alpha\beta$ -Heterodimerenstruktur wurde dadurch jedoch nicht beeinflußt.<sup>[123]</sup> Möglicherweise steuern zweiwertige Kationen über dieses *EF hand motif* die Ligandbindung.<sup>[104,241-243]</sup>

## **3.7** Pathologische Bedeutung von α4-Integrinen

Bei vielen Immunentzündungskrankheiten kommt es zu einer abnormalen Entzündungszellen (T-Lymphocyten, Akkumulierung von Plasmazellen, Moncyten/Makrophagen, Neutrophile). Dies führt zusammen mit Endothelzellen des Gewebes und Fibroblasten zur Freisetzung von Lipiden, Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Enzymen, die das Gewebe lokal schädigen. Gelegentlich tritt auch Proliferation und Fibrose auf. Die Ursachen für Entzündungskrankheiten bleiben weiter unklar, aber sowohl genetische als auch Umweltfaktoren spielen eine wichtige Rolle dabei. Auch heute noch gibt es nur wenige therapeutische Ansätze, um Entzündungskrankheiten und Autoimmunkrankheiten, wie rheumatoide Arthritis, inflammatory bowel diseases (IBD), Multiple Sklerose, Psoriasis und Asthma, zu behandeln. Gegenwärtig können solche Erkrankungen nur mit relativ alten Medikamenten, wie etwa Corticosteroiden und Methotrexat, behandelt werden, die teilweise geringe Wirksamkeiten und/oder Sicherheitsrisiken aufweisen. Langsam werden die molekularen und zellulären Vorgänge dieser Erkrankungen verstanden. Dies führte in den späten 90-iger Jahren zu einer Entwicklung neuartiger Medikamente gegen Entzündungskrankheiten wie etwa die Leukotrien-Antagonisten,<sup>[244]</sup> Cyclooxygenase 2 (COX2) Inhibitoren,<sup>[245]</sup> und *tumor necrosis factor* (TNF) *blockers*.<sup>[246,247]</sup> Weitere Therapieansätze stellen Zelladhäsionsmoleküle (Selektine und Integrine), abbauende Enzyme (Tryptase, Chymase, Matrixmetalloproteinasen) und Angiogenese-Inhibitoren dar.

Den Adhäsionsmolekülen kommt bei Entzündungskrankheiten eine große Bedeutung zu.[160,248] Sie spielen sowohl bei dem Kontakt unterschiedlicher Immunzellen, als auch bei der Wanderung von Entzündungszellen vom Blutstrom in das entzündete Gewebe eine wichtige Rolle. Bei vielen Krankheiten, bei denen Entzündungen und Immunzellen beteiligt sind, findet auch eine Hochregulierung bzw. Überexpression von Adhäsionsmolekülen statt. Auch Tumorzellen nützen Adhäsionsmoleküle, um sich im Körper auszubreiten.<sup>[249]</sup>

Die Inhibierung der Adhäsionsmoleküle stellt somit eine Möglichkeit dar, um Infiltration und/oder die Aktivierung der Immunzellen zu verhindern, was wiederum in einem Ausbleiben der Entzündung resultiert. Die Nachteile dieses Antiliegen darin, daß Adhäsionsmoleküle häufig auf Adhäsionstherapieansatzes verschiedenen Zelltypen sind und Zellen exprimiert daß viele mehrere Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ferner stellen verschiedene Moleküle Liganden für ein Adhäsionsmolekül dar. Somit kann die Inhibierung der Zelladhäsion große Einflüsse auf das Immungeschehen haben. Trotz dieser möglichen "Nebenwirkungen" stellen  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine vielversprechende *targets* zur Therapie von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten dar. So konnten α4β1-Integrinantagonisten bereits erfolgreich in einigen Tiermodellen eingesetzt werden.<sup>[194]</sup> Ferner befinden sich einige α4β1-Integrinantagonisten in Klinischer Phase II (z.B. BIO-1211) oder Klinischer Phase I (z.B. TR-14035).<sup>[250]</sup>

Bei der humanen *inflammatory bowel disease* (IBD) und in Mausmodellen der Colitis ist die Expression von MAdCAM-1 im Darm erhöht.<sup>[236]</sup> *Human inflammatory bowel disease* (IBD) ist eine chronische Entzündungskrankheit, deren Entstehungsursache unbekannt ist. Beide Geschlechter können von IBD betroffen werden. Klinisch kann diese Krankheit in zwei sich überschneidende Phenotypen eingeteilt werden: *colitis ulcerosa* (UC) und Crohn-Krankheit (CD, Enteritis regionalis). IBD betrifft meist den Dickdarm (UC und CD) und/oder den das terminale Ileum (CD). Im letzteren Fall kann die Entzündung entweder oberflächlich (UC) oder transmural (CD) auftreten.<sup>[251]</sup>

Lange Zeit deuteten alle wissenschaftlichen Untersuchungen darauf hin, daß sowohl genetische als auch Umweltfaktoren bei der Pathogenese eine wechselseitige Rolle spielen. Neuere immunologische Studien weisen darauf hin, daß IBD durch eine mangelnde Regulation der mucosalen Immunantwort auf ein oder mehrere Antigene hervorgerufen wird.<sup>[252]</sup> Diese Antigene kommen in der gewöhnlichen bakteriellen Flora vor.

Gerade weil MAdCAM-1 im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen nur auf sehr wenigen Geweben exprimiert wird, ist es ein idealer Ansatzpunkt für die Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen. Die Modulation der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung hat somit keinen tiefgreifenden Einfluß auf das übrige Immungeschehen. Der Erfolg dieses Therapieansatzes konnte bereits mit Antikörpern in einem Colitis-Modell unter Beweis gestellt werden.<sup>[253,254]</sup>



**Abbildung 3.8:** Effekte von  $\alpha$ 4-Integrinen innerhalb der Metastasierungskaskade. Tumormodelle, bei denen diese Effekte beobachtet werden konnten, sind aufgelistet. Das Plus- bzw. Minuszeichen zeigt an, ob  $\alpha$ 4-Integrine einen bestimmten Prozeß fördern bzw. inhibieren.

Wenngleich  $\alpha$ 4-Integrine vorwiegend als *targets* zur Bekämpfung von Entzündungskrankheiten angesehen werden, so lassen sich gegebenenfalls  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten auch zur Beeinflussung von Tumorzellen verwenden. In Abbildung 3.8 sind die einzelnen Effekte von α4-Integrinen innerhalb der Metastasierungskaskade zusammengestellt.<sup>[255]</sup>

α4-Integrine verhindern unter Umständen auf Zellen des Primärtumors die Loslösung und Invasion von malignen Zellen.  $\alpha$ 4-Integrine, die auf zirkulierenden Tumorzellen exprimiert sind, können die Dissemination verstärken. Möglicherweise kontrolliert die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung die Dissemination von MLP (lymphomatous polyposis) Lymphoma Zellen an die Darmschleimhaut.<sup>[256]</sup> Die wichtige Rolle der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine bei der Dissemination von Tumorzellen wurde auch Untersuchungen mit *non-Hodgkin's* Lymphomen bestätigt.<sup>[257]</sup> Die durch Ausbreitung von neuen Tumorkolonien in verschiedenen Organen kann durch α4-Integrine entweder verstärkt oder inhibiert werden. Im Falle von murinen Lymphomazellen können α4-Integrin das Wachstum der Tumorzellen entweder durch Apoptose oder durch Verminderung der Proliferationsrate inhibieren.

## **3.8** Synthetische α4-Integrinantagonisten als Therapeutika

Bisher sind nur wenige  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten in der wissenschaftlichen Literatur publiziert worden.<sup>[258]</sup> Der Großteil der chemischen Arbeiten auf diesem Gebiet findet sich in Patenten wieder.<sup>[194]</sup> In Tabelle 3.2 sind einige  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten aus der Literatur und Patenten zusammengestellt. Oftmals wird in Patenten nicht zwischen  $\alpha$ 4 $\beta$ 1- und  $\alpha$ 4 $\beta$ 7- Integrinantagonisten unterschieden. Es wird die Aktivität bezüglich beiden Rezeptoren untersucht.

Anfänglich ging man bei der Entwicklung von VLA-4 Integrinantagonisten von den Proteinen Fibronektin, VCAM-1 und einem anti- $\alpha$ 4 Antikörper aus. Die meisten peptidischen VLA-4 Integrinantagonisten sind von CS-1 aus Fibronektin abgeleitet. 1992 berichtete Wayner *et al.*, daß das Pentapeptid EILDV an VLA-4 Integrine bindet.<sup>[216]</sup> Bochner *et al.* konnte durch den Einbau eines Tyrosins in die Sequenz GPEYLDVP-NH<sub>2</sub> eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber dem natürlichen Liganden CS-1 beobachten.<sup>[259]</sup> Basierend auf diesen Entdeckungen konnte Vanderslice *et al.* potente, cyclische VLA-4 Integrinantagonisten 1 entwickeln.<sup>[260]</sup> Derivate, der von Arrhenius *et al.* synthetisierten Verbindung 2, konnten erfolgreich in einem Tiermodel gegen Asthma eingesetzt werden.<sup>[261,262]</sup> Der erste

niedermolekulare VLA-4 Antagonist (**3**), der in die klinische Phase eingebracht wurde, stammt von Lin *et al*.

Nr.	Struktur	Rezeptor	IC <sub>50</sub>	Lit.
1	c(*C-Y-L-D-V-C*)	α4β1	50 nM	[260]
2	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\$	α4β1	60 nM	[262]
3	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	α4β1	1 nM	[270]
4	NH H H H H H H H H H H H H H H H H H H	α4β1 α5β1	90 nM	[222, 263]
5		α4β1	1 nM	[264]
6		α4β1	3000 nM	[265]
7	$H_{3C}$ $H$	α4β1	n.d.	[266]
8		α4β1	2 nM	[267]
9	$H_3CO_2S$	α4β1	8 nM	[268]
25		α4β7	3100 nM	[271]

**Tabelle 3.2:** Auswahl von  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$  Integrinantagonisten.

Ausgehend von einem bekannten  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinantagonist entwickelte Nowlin *et al.* einen VLA-4 Antagonisten (4).[222,263] Weitere Optimierungsarbeit führte schließlich zu einen nanomolar aktiven VLA-4-Antagonisten (5).[264]

Auch beim *screening* von Bibliotheken ergaben sich VLA-4 Antagonisten. Saouers *et al.* konnte aus einer Bibliothek, die auf einem cyclischen  $\beta$ -*turn scaffold* basierte, einen im mikromolaren Bereich aktiven Antagonisten (6) finden.<sup>[265]</sup> Interessanterweise haben viele aus Bibliotheken gewonnene VLA-4 Antagonisten eine sehr starke Ähnlichkeit zu der Pro-Phe Dipeptid-Einheit (siehe 7,<sup>[266]</sup> 8,<sup>[267]</sup> 9<sup>[268]</sup>). Die Strukturen zeigen deutlich die hydrophobe Natur der  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin Bindungsstelle.

Bei der Entwicklung von  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten ist die Verwandtschaft zu den  $\alpha$ d $\beta$ 2und  $\alpha$ 9 $\beta$ 1-Integrinen zu berücksichtigen. So sind in der Patentliteratur  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrinantagonisten beschrieben, die ebenfalls  $\alpha$ 9 $\beta$ 1-Integrine blockieren.[269]

Ferner soll noch erwähnt werden , daß sich ein humanisierter anti- $\alpha$ 4 Antikörper (Antegren<sup>®</sup>) gegen Multiple Sklerose bereits in Klinischer Phase II befindet.

# **4** Entwicklung von α4β7-Integrinantagonisten

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Entwicklung niedermolekularer, nichtpeptidischer  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten. Die Entwicklung von Cyclopeptiden hin zu *small molecules* ist kapitelweise dargestellt. In jedem Kapitel ist die Konzeption und die Synthese der Verbindungen beschrieben. Die biologische Evaluation der Verbindungen wird ausführlich in Kapitel 5 beschrieben. Teilweise werden bereits in diesem Kapitel nach einem Absatz kurz die biologischen Ergebnisse zusammengefaßt, sofern diese für die weitere Vorgehensweise bei der Synthese von  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten wichtig sind.

# 4.1 Peptidische α4β7-Integrinantagonisten

Am Beispiel von  $\alpha 4\beta 1$ -[194] und  $\alpha v\beta 3$ -Integrinantagonisten[272,273] konnte bereits eindrucksvoll gezeigt werden, wie von peptidischen Leitstrukturen, die den natürlichen Liganden nachahmen, niedermolekulare nichtpeptidische Antagonisten entwickelt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, von MAdCAM-1 abgeleitete, hochaktive und selektive Cyclopeptide zu synthetisieren. Durch NMR-Spektroskopie und mittels Modellverbindungen konnten somit Strukturinformationen gewonnen werden, die Auskunft über die räumliche Orientierung der pharmakophoren Gruppen gaben.

## 4.1.1 Einführung

Die Verwendung von cyclischen Peptiden ist ein allgemein anwendbares Verfahren zur Aufklärung von bioaktiven Konformationen und zur Generierung von Leitverbindungen.<sup>[272]</sup> Durch die Cyclisierung des Peptidrückgrats wird eine drastische Reduktion des konformativen Freiraums erreicht, da lineare Peptide meist flexible Moleküle sind. Diese Reduktion der Freiheitsgrade kann aus entropischen Gründen auch zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität führen (siehe Abbildung 4.1).<sup>[274,275]</sup> Weiter Vorteile der Cyclisierung sind u.a. die Erhöhung der Protease-Stabilität und gegebenenfalls die Zunahme der Selektivität für einen bestimmten Rezeptor.



**Abbildung 4.1:** Flexible Moleküle können in Lösung unterschiedliche Konformationen einnehmen. Durch Restriktionen z.B. Cyclisierung kann die aktive Konformation fixiert werden.

Allerdings kann die Cyclisierung auch zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität führen. Dies tritt immer dann ein, wenn die pharmakophoren Gruppen der ehemals flexiblen, linearen Verbindung in eine ungünstige Konformation gezwungen werden.

Mittlerweile sind die Strukturen von cyclischen Peptiden in unserem wie auch in anderen Arbeitskreisen ausgiebig untersucht worden, so daß einige Strukturvorhersagen möglich sind.[276,277] In homodeten, cyclischen Peptiden bestimmt die Konfiguration der einzelnen Aminosäuren die Konformation. D-Aminosäuren im Allgemeinen, sowie D-Prolin im Besonderen bevorzugen die i+1Position einer  $\beta$ II'- bzw. einer  $\beta$ I-Schleife.[274]



Abbildung 4.2: Verschiedene Schleifentypen in Cyclopeptiden.

In cyclischen Hexapeptiden liegen meist zwei  $\beta$ -*turns* vor.<sup>[278]</sup> Die verschiedenen  $\beta$ *turns* sind in Abbildung 4.2 dargestellt. In einem Modellpeptid c(D-Pro-Ala<sub>5</sub>) (Lösungsmittel DMSO) nimmt D-Prolin die *i*+1 Position eines  $\beta$ II'-*turns* ein.<sup>[276]</sup> Die andere Molekülhälfte steht vermutlich in einem Gleichgewicht zwischen einer  $\beta$ I- und einer  $\beta$ II-Schleife. Cyclopeptide, die sich von der Leitstruktur c(L-D-T-A-p-A) ableiten, sollten somit pro und Asp jeweils in einer *i*+1-Position enthalten. Dadurch kommt der Asp-Seitenkette eine exponierte Lage zu, was auch aus der Röntgenstruktur des natürlichen Liganden (siehe Abbildung 3.7) ersichtlich ist.

## 4.1.2 Synthese von cyclischen und linearen Peptiden

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Peptidsynthese an fester Phase ist in Schema 4.1 schematisch dargestellt.[279]

Die linearen Peptidketten werden an fester Phase entweder nach der Fmoc/tert-Butyl-[280] oder nach der Boc-Schutzgruppenstrategie[281] schrittweise vom *C*- zum *N*-Terminus aufgebaut. Bei der Synthese von Cyclopeptiden wird die Sequenz so gewählt, daß die sich die Cyclisierungsstelle weder in einer *turn*-Struktur, noch an einer racemisierungsfreudigen Aminosäure wie Asp oder Cys befindet.



**Schema 4.1:** *Schematische Darstellung der Peptidsynthese nach der Fmoc/tert-Butyl-Schutzgruppenstrategie an fester Phase.* 

Im ersten Schritt wird eine vollständig geschützte Aminosäure über einen Linker an den polymeren Träger gebunden. Die Art des Linkers entscheidet, wie die synthetisierte Verbindung wieder von dem polymeren Träger entfernt werden kann. Im Folgenden wird das System Linker und polymerer Träger als feste Phase bzw. Harz bezeichnet.

Erfolgt die Peptidsynthese nach der Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie, so wird zur Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe 20% Piperidin in DMF verwendet. Die Kupplung einer weiteren Aminosäure wird mit Hilfe eines

Kupplungsreagenzes, wie 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU),<sup>[282]</sup> mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>[283,284]</sup> als Additiv und mit N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base in N-Methylpyrrolidon (NMP) durchgeführt. Die Schritte 2 bis 3 in Schema 4.1 werden solange wiederholt, bis die vollständige Sequenz aufgebaut ist. Je nach Beschaffenheit des Linkers können die Peptide entweder geschützt, d.h. unter Beibehalt der Seitenkettenschutzgruppen, vollständig entschützt, d.h. unter gleichzeitiger Abspaltung oder aller Seitenkettenschutzgruppen, vom Harz abgespalten werden. Sollen cyclische Peptide synthetisiert werden, so müssen die linearen Verbindungen zunächst geschützt vom Harz abgespalten werden. Die anschließende Cyclisierung erfolgt in stark verdünnten Lösungen entweder mit Diphenylphosphorsäureazid<sup>[285]</sup>/ Natriumhydrogencarbonat oder mit O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-DMF in hexafluoro-phosphat (HATU), 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) in DMF. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgt mit TFA: H<sub>2</sub>O: TIPS (95: 2.5: 2.5). Die Reinigung der Verbindungen erfolgt mittels HPLC.

In Zusammenarbeit mit Dr. J. Boer wurde versucht, die von ihm entwickelten cyclischen Hexapeptide c(A-L-D-T-A-p) zu optimieren.<sup>[286]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde eine Bibliothek cyclischer Peptide der allgemeinen Form c(Xaa-L-D-T-D-p) synthetisiert. Aufgrund besserer Löslichkeit wurde Ala<sup>5</sup> in der ursprünglichen Verbindung durch Asp ersetzt. Da es sich bereits bei der Synthese von  $\alpha 4\beta$ 1-Integrinantagonisten als vorteilhaft erwiesen hat, *N*-terminal hydrophobe Aminosäuren zu verwenden,<sup>[259]</sup> wurden für Xaa vorwiegend lipophile Aminosäuren eingebaut (siehe Abbildung 4.3).

Durch den Einbau von H-Cha-OH sollte untersucht werden, in wie weit an der Position 1 des cyclischen Peptids auch lipophile aliphatische Seitengruppen einen positiven Effekt auf die biologische Aktivität haben. Bei H-Phg-OH, H-Chg-OH und H-Tic-OH handelt es sich um Aminosäuren, bei denen die Seitenketten konformativ fixiert sind. Ihr Einbau in ein starres, cyclisches Peptid erlaubt somit Aussagen über die genaue Position der Seitenketten im Molekül und kann somit wichtige Aussagen über die räumliche Anordnung der pharmakophoren Gruppen liefern.



**Abbildung 4.3:** *Aminosäuren, die im Rahmen dieser Arbeit in cyclische Peptide der allgemeinen Form c(Xaa-L-D-T-D-p) eingebaut wurden.* 

Zunächst wurden die linearen Sequenzen der allgemeinen Form H<sub>2</sub>N-D-p-Xaa-L-D-T-OH mit Hilfe eines Syntheseroboters synthetisiert. Die Cyclisierungsstelle zwischen Thr und Asp bot sich an, da aufgrund von Modellverbindungen angenommen werden konnte, daß sich dort keine *turn*-Struktur befand. Das C-H<sup> $\alpha$ </sup> von H-Phg-OH ist auf Grund der Mesomeriestabilisierung des entstehenden Anions durch den Phenylring acide. Daher trat bei der Synthese von c(Phg-L-D-T-D-p) Racemisierung auf. Die Synthese der Cyclopeptide erfolgte mit Ausbeuten von 7-54% nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung. In analoger Weise wurde noch eine Vielzahl weiterer Cyclopeptide synthetisiert, die in Tabelle 4.1 und Kapitel 5 detailliert aufgelistet sind.

Nr.	Verbindung	% <sup>a</sup>	Nr.	Verbindung	<b>%</b> a
10	c(2Nal-L-D-T-D-p)	12%	16	c(F-L-D-T-D-tic)	22%
11	c(Bpa-L-D-T-D-p)	12%	17	c(K-L-D-T-2Nal-p)	54%
12	c(Cha-L-D-T-D-p)	7%	18	c(Phg-L-D-T-Phg-d)	12%
13	c(Phg-L-D-T-D-p)	10%	19	c(F-L-D-T-D-p)	n.d.
14	c(Chg-L-D-T-D-p)	26%	20	c(F-L-D-F-D-p)	48%
15	c(Tic-L-D-T-D-p)	25%	21	c(F-L-D-Phg-D-p)	n.d.

**Tabelle 4.1:** Liste der synthetisierten cyclischen Peptide

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

Hervorzuheben sind noch Cyclopeptide der allgemeinen Form c(F-L-D-Xaa-D-p). In Zusammenarbeit mit Dr. J. Boer wurden für Xaa eine große Zahl verschiedener Aminosäuren eingesetzt. In dieser Arbeit wurden wiederum aromatische Aminosäuren (Phe) bzw. Aminosäuren mit konformativ fixierten Seitenketten (Phg) verwendet.

Bei Verwendung einer geeigneten Synthesestrategie ist die Cyclisierung von Peptiden auch direkt an der festen Phase möglich.<sup>[287]</sup> Die Cyclisierung am Harz wurde für das FITC-markierte Cyclopeptid verwendet, um aufwendige Reinigungsschritte bei der Synthese in Lösung zu vermeiden. Die Cyclisierung und anschließende Derivatisierung am Harz erforderte eine orthogonale Schutzgruppenstrategie.



**Schema 4.2:** Orthogonale Schutzgruppenstrategie bei der Cyclisierung und anschließender Derivatisierung von Peptiden.

Wie Schema 4.2 zeigt, wurde zunächst Fmoc-Asp(OH)-Dmab über die Seitenkette an das Wang-Harz gekuppelt. Der Aufbau der linearen Peptidsequenz erfolgte wie in Schema 4.1 beschrieben. Zum *N*-terminalen Schutz der wachsenden Peptidkette kam die bewährte Fmoc-Schutzgruppe zum Einsatz. Zum temporären Schutz der *C*-terminalen Carboxylgruppe von Asp wurde die Dmab-Schutzgruppe verwendet. Sie ließ sich sehr einfach mit 2% Hydrazin in DMF entfernen. Bei Anwesenheit von Allylgruppen empfahl es sich, der Abspaltlösung Allylalkohol zuzufügen, damit die Reduktion der Allyl-Schutzgruppe durch eventuell vorhandenes Diazin verhindert wurde. Die Abspaltbarkeit der Dmab-Schutzgruppe beruht auf der 1,6-Eliminierung

von p-Aminobenzylester.<sup>[288]</sup> Die Dmab-Schutzgruppe ist gegenüber 20% Piperidin in DMF stabil. Um die Amino-Funktionalität der Lys-Seitenkette selektiv entschützen zu können, wurde die Aloc-Schutzgruppe verwendet.<sup>[289]</sup> Sie war gegenüber den zuvor genannten Bedingungen stabil und ließ sich durch Palladium-katalysierten Allyltransfer entfernen.<sup>[290]</sup> An die freie Amino-Gruppe der Lys-Seitenkette konnte mit HATU/HOAt und Collidin die Amino-Polyethylenglykol-Carbonsäure (PNA-*Linker*) und anschließend Fluoresceinisothiocyanat gekuppelt werden. Eine weitere Orthogonalität bestand zu den *tert*-Butylschutzgruppen, mit deren Hilfe die OH-Funktionalitäten permanent geschützt wurden. Nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung wurde das FITC-markierte Cyclopeptid mit 12%-iger Ausbeute erhalten. Die biologische Evaluation der cyclischen Peptide ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben.

## 4.2 Peptidmimetika als $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten

Ziel der Synthese von Peptidmimetika war es, Informationen über die Bedeutung einzelner Struktureinheiten wie Amidbindung, Abstand der Seitenketten oder Stereochemie zu erhalten. Der Übergang vom Peptid zum Peptidmimetikum führt oftmals auch zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften. In der Literatur finden sich viele Beispiele dafür, wie Peptide erfolgreich modifiziert werden konnten.<sup>[12,291]</sup> Einige bekannte Strukturmodifikationen von Peptiden sind in Abbildung 4.4 exemplarisch dargestellt. Die im Folgenden beschriebenen Strukturmodifikationen wurden sowohl an der von Dr. J. Boer gefundenen Leitstruktur c(F-L-D-T-D-p)<sup>[286]</sup> als auch an der in der Literatur beschriebenen Verbindung **25**<sup>[271]</sup> durchgeführt.



Abbildung 4.4: Vergleich zwischen verschiedenen Peptidmimetika.

## 4.2.1 Peptoide als LDT-Mimetika

### 4.2.1.1 Einführung

Werden die Seitenketten von natürlichen Aminosäuren formal auf das Stickstoffatom übertragen, so entstehen N-alkylierte Glycine. Die peptidartige Verknüpfung mehrerer dieser N-alkylierten Glycine führt zu sogenannten Peptoiden.<sup>[292]</sup> Soll die relative Anordnung der Carbonylgruppen zu den Seitenketten erhalten bleiben, so muß, wie Abbildung 4.5 zeigt, die Reihenfolge der Peptoid-Bausteine umgekehrt werden (Retrosequenz).



Abbildung 4.5: Vergleich Peptidkette und Peptoidkette.

Peptoide sind achiral. Es besteht allerdings die Möglichkeit zur E/Z-Isomerie um die tertiäre Amidbindung. Diese tertiäre Amidbindung führt dazu, daß Peptoide im Vergleich zu Peptiden eine höhere Flexibilität aufweisen und somit einen größeren Konformationsraum abtasten können. Durch das Fehlen von N-H-Protonen können Peptoid-Bausteine auch nicht als Wasserstoffbrücken-Donatoren auftreten. Peptoide sind gegenüber Proteasen stabil.<sup>[293]</sup> Der Einbau von Peptoid-Bausteinen kann zu vielversprechenden, biologisch aktiven Molekülen führen.<sup>[294,295]</sup> Oftmals wird nicht die gesamte Peptid-Sequenz in das entsprechende Peptoid übertragen, sondern es werden nur einzelne Peptoid-Bausteine in die Peptid-Sequenz eingebaut.<sup>[296]</sup> Peptid-Peptoid-Hybride werden nach Ostergaard *et al.* als Peptomere bezeichnet.<sup>[297]</sup> Peptoide können analog zu Peptiden an der Festphase synthetisiert werden. Die entsprechenden Monomerbausteine sind durch reduktive Aminierung, nukleophile Substitution oder Michael-Addition synthetisch zugänglich (siehe Abbildung 4.6).



Abbildung 4.6: Synthese der Peptoid-Monomerbausteine.

Bei der sogenannten Submonomer-Synthese können die einzelnen Peptoid-Bausteine auch durch nukleophile Substitution direkt am Harz synthetisiert werden.<sup>[298]</sup> In ähnlicher Weise lassen sich so auch  $\beta$ -Peptoide an der Festphase synthetisieren (siehe Schema 4.3). Die Submonomer-Synthese ist besonders zum Aufbau von Bibliotheken geeignet.



**Schema 4.3:** Submonomer-Synthese von Peptoiden und  $\beta$ -Peptoiden.<sup>[299]</sup>

## 4.2.1.2 Synthese

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Peptoid-Bausteine als *N*-Fmocgeschützte Monomer-Bausteine synthetisiert. Dadurch konnte man sie gemäß Schema 4.1 bei vielen verschiedenen Reaktionen einsetzen und mußte sie nicht immer neu am Harz aufbauen, wie es bei der Submonomer-Synthese erforderlich gewesen wäre. Die Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Nphe (**28**) erfolgte durch nukleophile Substitution an Bromessigsäureethylester mit anschließender Verseifung und Schutz des *N*-Terminus (siehe Schema 4.4).



Schema 4.4: Synthese von N-Fmoc geschütztem Nphe (28).

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung und anschließender Einführung der Fmoc-Schutzgruppe, wurde Fmoc-Nphe-OH (**28**) in guten Ausbeuten erhalten. Durch die Verwendung von Bromessigsäureestern anstelle von Chloressigsäureestern ließ sich eine Dialkylierung sehr stark minimieren.<sup>[300]</sup>

Wie Schema 4.5 zeigt, konnten Peptoid-Monomere mit polaren Seitenketten durch reduktive Aminierung aus Glyoxylsäure-Monohydrat und den entsprechenden Aminen bei hohen Wasserstoffdrücken (50-70 bar) im Autoklaven mit sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden. Vor der reduktiven Aminierung wurden die funktionellen Gruppen in den Seitenketten analog zu der in der Peptid-Chemie verwendeten Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie geschützt. Anschließend wurde der *N*-Terminus mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützt. Auf diese Weise konnten Fmoc-Nval-OH (**30**), Fmoc-Nleu-OH (**32**) und Fmoc-Nasp(tBu)-OH (**34**) in guten Ausbeuten synthetisiert werden.



 $\mathsf{R=(CH_3)_2,\ CH_2CH(CH_3)_2,\ CH_2COOC_4H_9}$ 

**Schema 4.5:** Synthese von N-Fmoc-geschützten Peptoid-Bausteinen durch reduktive Aminierung.

Die peptoidanaloge Verbindung zu Threonin ist chemisch instabil.<sup>[292]</sup> Boer *et al.* konnte zeigen, daß auch cyclische Hexapeptide mit der LDV-Sequenz die  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren können.<sup>[286]</sup> Anstelle von Thr wurde daher Nval in die entsprechenden LDT-Mimetika eingebaut. Tabelle 4.2 zeigt die synthetisierten LDT-Mimetika. Da es sich bei den Peptoid-Bausteinen um sekundäre Amine handelte, war die Kupplung einer Carbonsäure an diesen Baustein erschwert. Um dennoch einen nahezu vollständigen Reaktionsumsatz zu erzielen, mußte HATU/HOAt/Collidin in DMF verwendet werden. Die Ausbeuten nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung betrugen für die linearen LDT-Mimetika 14%-77% und für die cyclischen Verbindungen 8%-48%. Die biologische Evaluation der Verbindungen wird in Kapitel 5.1.3 beschrieben.

Nr.	Verbindung	% <sup>a</sup>	Nr.	Verbindung	% <sup>a</sup>
35	c(Nphe-L-D-T-D-p)	8%	40	H-Nphe-L-D-T-OH	68%
36	c(F-Nleu-D-T-D-p)	35%	41	Ichin-Nleu-D-T-OH	71%
37	c(F-L-Nasp-T-D-p)	48%	42	Ichin-L-Nasp-T-OH	41%
38	c(F-L-D-Nval-D-p)	35%	43	Ichin-L-D-Nval-OH	14%
39	H <sub>2</sub> N-F-L-D-T-OH	63%	44	Ichin-Nleu-Nasp-Nval-OH	77%
39		0370	44	iemi-ineu-inasp-invai-Off	///0

**Tabelle 4.2:** Liste der synthetisierten Peptoid-Peptid-Hybride.

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

### 4.2.2 Azapeptide als LDT-Mimetika

## 4.2.2.1 Einführung

Die Substitution des C<sup> $\alpha$ </sup>-Atoms in Aminosäuren durch ein Stickstoffatom führt zu der Gruppe der Azaaminosäuren. Peptide, die mindestens eine Azaaminosäure enthalten, werden als Azapeptide bezeichnet.<sup>[301]</sup> Durch die isoelektronische Substitution einer Aminosäure durch den entsprechenden Azaaminosäure-Baustein läßt sich u.a. die Proteasestabilität erhöhen.[302,303] Azapeptide konnten ihre Eignung als Peptidmimetika in der Medizinischen Chemie bereits an zahlreichen Beispielen unter Beweis stellen, [273,304,305] u.a. als oral absorbierbare Azadipeptid-Isostere zur Inhibierung der HIV-1-Protease, [306] oder als LHRH-Antagonist (Zoladex®), [301] Der Einbau einer Azaaminosäure in LDT-Mimetika könnte somit verbesserte pharmakokinetischen Eigenschaften bewirken. Der Einbau von Azaaminosäuren führt neben dem Verlust der Asymmetrie auch zu weiteren strukturellen Veränderungen. Die Konfiguration einer Azaaminosäure liegt gewissermaßen zwischen der D- und L-Konfiguration einer gewöhnlichen Aminosäure. Kristallstrukturen von substituierten Azapeptiden zeigen einen um 60°-120° verdrehten CO-N-N-CO-Dieder.[301,307,308] Ab initio Rechnungen liefern für Azapeptide Dihedralwinkel  $(\phi, \psi)$  von  $(\pm 90^\circ \pm 30^\circ)$ ,  $0^{\circ} \pm 30^{\circ}$ ) bzw. ( $\pm 90^{\circ} \pm 30^{\circ}$ ,  $\pm 180^{\circ} \pm 30^{\circ}$ ). Daher können Azaaminosäuren in der i+2Position einen  $\beta$ -*turn* induzieren.<sup>[309]</sup> Diese Daten wurden experimentell mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestätigt. Aufgrund der verringerten Elektronendichte am  $N^{\alpha}$  weisen die N-H Protonen von Azaaminosäuren neben einer erhöhten Acidität eine starke Tieffeldverschiebung (9 bis 10.5 ppm) im <sup>1</sup>H-NMR auf.

Die Synthese von Azaaminosäure-Vorstufen kann entweder über reduktive Alkylierungen oder nukleophile Substitutionen erfolgen.<sup>[310,311]</sup> In der Literatur wird der Einbau von Azaaminosäuren häufig in Lösung beschrieben.<sup>[312]</sup> Nur wenige Azapeptide sind bisher an fester Phase nach der Fmoc-Strategie synthetisiert worden (siehe Schema 4.6).<sup>[313-316]</sup>



**Schema 4.6:** Verschiedene Azapeptidsynthesen an der Festphase nach Quibell et al.,[314] Schmitt et al.,[313] Gibson et al.[315] und Han et al.[316]

### 4.2.2.2 Synthese

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bausteine N'-Isopropyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (48), N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (50) und N'-Benzyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (52) durch reduktive Aminierung von Fmoc-Hydrazin (46) und dem entsprechenden Aldehyd bzw. Keton erhalten (siehe Schema 4.8). Die Synthese von Fmoc-Hydrazin (46) ist in Schema 4.7 dargestellt. Fmoc-Hydrazin (46) ließ sich sehr einfach durch Umschützen aus dem kommerziell verfügbaren Boc-Hydrazin herstellen. Im Gegensatz zur Umsetzung von Hydrazin mit Fmoc-Chlorid entsteht bei dieser Vorgehensweise bis-Fmoc-Hydrazin. Dadurch konnte das Produkt ohne zeitkein und lösungsmittelaufwendige Flashchromatographie aufgereinigt werden. Insgesamt war somit diese neue Synthesevariante deutlich kostengünstiger und schneller.



Schema 4.7: Synthese von Fmoc-Hydrazin (46).

Durch zweistündiges Erhitzen von Fmoc-Hydrazin (**46**) mit der entsprechenden Carbonyl-Verbindung in THF bildete sich das Hydrazon. Die Reduktion von N'-Isopropyliden-hydrazin-carboxylsäure-9H-fluoren-9-yl-methylester (**47**) und N'-Isobutyliden-hydrazin-carboxylsäure-9H-fluoren-9-yl-methylester (**49**) gelang mit 1M BH<sub>3</sub> in THF.[310]



Schema 4.8: Synthese der Hydrazone mit anschließender Reduktion.

Bei der Umsetzung von Fmoc-Hydrazin (46) mit Benzaldehyd bildete sich das entsprechende Hydrazon. Dieses ließ sich aber nicht unter den oben beschriebenen Bedingungen zum Hydrazin-Derivat reduzieren. Schließlich gelang die Reduktion mit NaBH<sub>3</sub>CN in Essigsäure/THF über Nacht bei RT (siehe Schema 4.9).<sup>[317]</sup>



**Schema 4.9:** Synthese von N'-Benzyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (52).

Die in Schema 4.10 dargestellte Synthese von [N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)hydrazino]-essigsäure-*tert*-butylester (54) durch reduktive Aminierung von Fmoc-Hydrazin (46) mit Glyoxylsäure-*tert*-butylester lieferte nur unbefriedigende Resultate.



**Schema 4.10:** Synthese von [N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure-tert-butylester (54).

Insbesondere auf Grund der Labilität der Aldehyd-Funktionalität erwies sich die Synthese und Isolierung von Glyoxylsäure-*tert*-butylester als schwierig.

Deutlich einfacher gestaltete sich die Synthese von [N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure-*tert*-butylester (54) durch nukleophile Substitution von Fmoc-Hydrazin (46) an Bromessigsäure-*tert*-butylester in trockenem THF (siehe Schema 4.11).



**Schema 4.11:** Synthese von[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure-tert-butylester (54).

Die Reaktion verlief mit der noch steigerungsfähigen Ausbeute von 32%.

Wie Schema 4.12 zeigt, konnten die Hydrazin-Derivate nach einer Methode von Gibson *et al.* durch Umsetzen mit einer Phosgen/Toluol-Lösung in die entsprechenden Hydrazincarbonsäurechloride überführt werden.<sup>[315]</sup> Trotz der Bildung von HCl blieb unter diesen Reaktionsbedingungen die *tert*-Butylester-Schutzgruppe stabil.



Schema 4.12: Synthese von N-Fmoc-geschützten Hydrazincarbonsäurechlorid-

Derivaten.

In Analogie zu dem entsprechenden Peptoid-Baustein ist auch die aza-analoge Verbindung zu Threonin chemisch instabil. Da cyclische Hexapeptide mit der LDV-Sequenz die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren können,[286] wurde bei dem Aza-*scan* anstelle von Thr azaVal in LDT-Mimetika eingebaut. Die Reaktion der Hydrazincarbonsäurechloride mit einem harzgebundenen Amin gelang über Nacht bei RT in DMF.<sup>[315]</sup> Für einen vollständigen Umsatz wurden 5 Äquivalente des Carbonsäurechlorids verwendet. Das entstehende HCl konnte mit DIPEA neutralisiert werden.



 $R_1 = CH(CH_3)_2, CH_2CH(CH_3)_2, CH_2CO_2C_4H_9, CH_2(C_6H_5)$ 

Schema 4.13: Festphasensynthese von Diacylhydrazin-Derivaten.

Für die Kupplung einer weiteren Carbonsäure an den Aza-Baustein wurde HATU/HOAt/Collidin verwendet. Diese Vorgehensweise lieferte für alle Aza-Bausteine mit Ausnahme von azaVal gute Umsätze. Da sich die Kupplung einer Carbonsäure an azaVal sehr schwierig gestaltete, wird die Vorgehensweise in Kapitel 4.2.2.3 ausführlich beschrieben. Die synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 4.3 dargestellt. Die biologische Evaluation der Azapeptide ist in Kapitel 5.1.4 beschrieben.

Nr.	Verbindung	% <sup>a</sup>	-	Nr.	Verbindung	% <sup>a</sup>
59	c(azaPhe-L-D-T-D-p)	25		63	Ichin-azaPhe-L-D-T-OH	32
60	c(F-azaLeu-D-T-D-p)	25		64	H <sub>2</sub> N-azaPhe-L-D-T-OH	49
61	c(F-L-azaAsp-T-D-p)	18		65	Ichin-azaLeu-D-T-OH	37
62	c(F-L-D-azaVal -D-p)	4		66	Ichin-L-azaAsp-T-OH	35
				67	Ichin-L-D-azaVal-OH	6

**Tabelle 4.3:** Liste der synthetisierten Azapeptide.

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

### 4.2.2.3 Kupplungsreaktionen an den azaVal-Baustein

Die Kupplung von Fmoc-Asp(OtBu)-OH an den azaVal-Baustein erwies sich als äußerst problematisch. Mit dem gängigen Kupplungsreagenz HATU/HOAt/Collidin konnte innerhalb von 1 h kein merklicher Umsatz beobachtet werden. Auch längere Kupplungszeiten von 2 h bzw. über Nacht konnten den Reaktionsumsatz nur geringfügig erhöhen. Statt dessen traten viele unerwünschte Nebenreaktionen ein. Die Verwendung von PyBroP, das die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure nicht in den HOBt-Aktivester sondern in ein Säurebromid überführt, brachte keine Verbesserung. Der Einsatz von Pentafluorphenolester führte ebenfalls nur zu geringen Umsätzen. Erst mit der Verwendung des gemischten Anhydrids von Fmoc-Asp(OtBu)-OH konnten Ausbeuten von ca. 50% erzielt werden.<sup>[318]</sup> Die Synthese und Kupplung von gemischten Anhydriden ist in Schema 4.14 dargestellt.



R= AzaVal-Asp(OtBu)-pro-Phe-Leu

Schema 4.14: Synthese und Kupplung eines gemischten Anhydrids.

Vollständiger Reaktionsumsatz wurde nur mit den entsprechenden Säurechloriden erreicht.<sup>[319]</sup> Dazu mußte in einem ersten Schritt zunächst Fmoc-Asp(OBzl)-OH mit Thionylchlorid in Fmoc-Asp(OBzl)-Cl (**69**) überführt werden.<sup>[320]</sup> Die Kupplung des

Säurechlorids an das harzgebundene Amin erfolgte bei -20 °C in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Pyridin (siehe Schema 4.15). Die Reaktionslösung ließ man über Nacht auf RT erwärmen.



**Schema 4.15:** *Synthese und Kupplung eines N-Fmoc geschützten Aminosäurechlorids.* Die Reaktionsumsätze mit den einzelnen Kupplungsreagenzien sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

**Tabelle 4.4:** Verschiedene Reagenzien zur Kupplung von Fmoc-Asp-Derivaten anharzgebundenes azaVal.

Fmoc $\stackrel{H}{} \stackrel{O}{} X + \stackrel{H_2N}{} \stackrel{N}{} H_2^{-1} \stackrel{O}{} H_2^{-1} \stackrel{O}{$	→ Frr u)-pro-Phe	noc N H		R
Kupplungsmethode	SG	Zeit	Umsatz <sup>a</sup>	Ausbeute <sup>b</sup>
HATU/HOAt/Collidin in DMF	OtBu	2 h	61%	4%
HATU/HOAt/Collidin in DMF	OtBu	ü.N.	67%	19%
PyBroP/DIPEA/DMAP in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	2 h	58%	2%
PyBroP/DIPEA/DMAP in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	24 h	63%	6%
Pentafluorphenolester/DMAP in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	6 h	61 %	4%
Pentafluorphenolester/DMAP in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	24 h	53%	3%
gem. Anhydrid/NMM in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	6 h	79%	35%
gem. Anhydrid/NMM in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OtBu	ü.N.	85%	45%
Säurechlorid/Pyridin in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OBzl	6 h	100%	64%
Säurechlorid/Pyridin in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	OBzl	ü.N.	100%	n.d.

<sup>a</sup>Der relative Reaktionsumsatz wurde anhand der relativen Integralintensitäten der Edukte aus dem bei 220 nm detektierten HPLC-Chromatogramm bestimmt.

<sup>b</sup>Die Ausbeute bezieht sich auf den Anteil des Produktes in dem gesamten Reaktionsansatz.

Mit Fmoc-Asp(OBzl)-Cl (69) konnte eindrucksvoll die Eignung von Säurechloriden für schwierige Kupplungen unter Beweis gestellt werden. Allerdings war Fmoc-Asp(OBzl)-OH (69) für das weitere Vorgehen ungeeignet, da während der Fmoc-Abspaltung unter basischen Bedingungen Aspartatimid-Bildung auftrat. Es wurde somit ein *N*-Fmoc-geschütztes Asparaginsäure-Derivat benötigt, das sich in das entsprechende Säurechlorid überführen ließ und dessen Seitenkettenschutzgruppe nach erfolgter Synthese leicht abgespalten werden konnte. Die *tert*-Butylester, Allylester und Dmab-Schutzgruppen erwiesen sich bei der Synthese des Carbonsäurechlorids als ungeeignet, da sie entweder abgespalten wurden oder zu unerwünschten Nebenreaktionen mit Thionylchlorid führten. Sehr gute Ergebnisse konnten mit dem Methylester als Seitenkettenschutzgruppe erhalten werden. Allerdings führte die Abspaltung mit LiOH bzw. NaOH unter verschiedenen Reaktionsbedingungen stets zu unerwünschten Nebenreaktionen. Daher wurde schließlich Fmoc-Asp(OtBu)-OH über das gemischte Anhydrid eingeführt. Die cyclische Verbindung **62** wurde in 4%-iger Ausbeute bzw. die lineare Verbindung **67** in 6%-iger Ausbeute erhalten.

#### 4.2.2.4 Einführung der Aza-Bausteine als 4-Nitrophenylester

Für die Synthese von Azapeptiden konnten verschiedene Arbeitsgruppen erfolgreich Hydrazin-Derivate als Boc-geschützte aktivierte 4-Nitrophenylester einsetzen.[312,317] In Anlehnung an jene Arbeiten, sollte der Einbau entsprechender N-Fmoc-geschützer Hydrazin-Derivate ebenfalls als aktivierte 4-Nitrophenylester versucht werden. Gegenüber der Methode von Gibson et al.[315] wies die Einführung der Azaaminosäure als aktivierte 4-Nitrophenylester mehrere Vorteile auf. Die aktivierten 4-Nitrophenylester sind ausreichend stabil. um sie per Flashchromatographie aufreinigen zu können. Zudem läßt sich die nukleophile Substitution der 4-Nitrophenolat-Gruppe spektroskopisch verfolgen und gibt somit Auskunft über den Fortgang der Reaktion. Aufgrund der geringeren Reaktivität der 4-Nitrophenyl-Aktivester gegenüber den Säurenchloriden sind die Reaktionen gegebenenfalls selektiver. Ferner lassen sich dadurch die einzelnen Bausteine länger aufbewahren. Auch entfällt die Verwendung von Phosgen. J. Wermuth verwendete bereits Festphasensynthese von Azapeptiden Chlorameisensäure-4zur

nitrophenylester.<sup>[321]</sup> Allerdings wurde in dieser Arbeit der harzgebundene Aminoterminus aktiviert. Diese Syntheseroute ist allerdings nur bedingt sinnvoll. Bei Reaktionen an der festen Phase erweist es von Vorteil, wenn das aktivierte Reagenz im Überschuß zugegeben werden kann und nicht an der festen Phase aktiviert werden muß.

Die Synthese der entsprechenden Aza-Bausteine als aktivierte 4-Nitrophenylester gelang durch Umsetzen der *N*-Fmoc-geschützten Hydrazin-Derivate mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester in einer Lösung aus CHCl<sub>3</sub> und 0.5 M wäßriger NaHCO<sub>3</sub> bei 0 °C (siehe Schema 4.16). Die 4-Nitrophenylester-Derivate wurden in Ausbeuten von 53-63% erhalten.



Schema 4.16: Synthese von 4-Nitrophenyl-Aktivester.

Der *N*-Fmoc-Hydrazin-4-Nitrophenylester (**70**) konnte erfolgreich zur Festphasensynthese von azaGly eingesetzt werden. Allerdings konnten alle anderen Derivate (R=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> auch bei 60°C über Nacht nicht mehr an das Harz gekuppelt werden. Daher wurde für die Festphasensynthese von Azapeptiden die Methode von Gibson *et al.* verwendet.[315]

#### 4.2.3 Schrittweise Reduktion der Amidbindungen

#### 4.2.3.1 Einführung

Auf dem Weg vom biologisch aktiven Peptid zu einem Wirkstoff kommt der Substitution der hydrolysierbaren Amidbindung durch stabilere Struktureinheiten eine große Bedeutung zu. Amidsurrogate sollen die Amidbindung im backbone ersetzen. Sie sind oftmals isoster und/oder isoelektronisch mit der Amidbindung. Allerdings ist die biologische Aktivität eines solchen Mimetikums nicht direkt mit der exakten Imitation der Amidbindung hinsichtlich Lipophilie, Geometrie, Wasserstoffdonor bzw. -akzeptoreigenschaften korreliert. Amidsurrogate dienen einerseits dazu, die Rolle der Amidbindung zu klären und andererseits die Eigenschaften des Peptids zu modifizieren. Die Substitution einer Amid-Bindung in einem Molekül soll auch zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Proteasen führen.<sup>[322]</sup> In der Literatur sind eine Vielzahl an Substitutionsmöglichkeiten, z.B. durch Olefine, Amine, Sulfonamide und Phosphordiester beschrieben. Die Reduktion einer Amidbindung führt zu einer der deutlichen Ânderung elektronischen Eigenschaften. Die strukturellen Eigenschaften von reduzierten Peptid-Derivaten im Vergleich zu einigen anderen Peptidmimetika sind ausführlich von Vanderesse *et al.* beschrieben worden.<sup>[323]</sup> Der Erfolg dieser Vorgehensweise konnte eindrucksvoll an der Entwicklung von Gastrin-[324] und Bombesinantagonisten[325] gezeigt werden.

### 4.2.3.2 Synthese von reduzierten Amidbindungen

Die Synthese von sekundären Aminen erfolgt meist durch reduktive Aminierung eines Aldehyds bzw. Ketons und eines primären Amins in Anwesenheit eines Reduktionsmittels. Die verwendeten *N*-Fmoc-geschützten Aminoaldehyde konnten gemäß Schema 4.17 aus den entsprechenden Aminosäuren synthetisiert werden. Aufgrund der höheren Reaktivität der Aldehyde gegenüber den Alkoholen erwies es sich als vorteilhaft, zunächst die Carboxylgruppe bis zum primären Alkohol zu reduzieren und anschließend diesen über eine Swern-Oxidation in den Aldehyd zu überführen. Die Reduktion der Carbonsäure zum Alkohol gelang über das Säurefluorid in Ausbeuten von 61%. Im Verlauf der Arbeit konnten alle *N*-Fmoc-geschützten Aminoalkohole auch kommerziell erworben werden.



**Schema 4.17:** *Reduktion einer N-Fmoc-geschützten Aminosäure zu dem entsprechenden Alkohol.* 

Die Oxidation des Alkohols zum Aldehyd gelang unter den typischen Swern-Bedingungen mit Oxalylchlorid, DMSO in  $CH_2Cl_2$  bei –78 °C (siehe Schema 4.18). Aufgrund der Labilität der erhaltenen *N*-Fmoc-geschützten Aminoaldehyde konnten diese nicht mit Flashchromatographie aufgereinigt werden.<sup>[326]</sup>

$$Fmoc^{-N} \underbrace{\stackrel{H}{\underset{\overline{R}_{1}}{\overset{}}}}_{\overline{R}_{1}} \underbrace{\stackrel{(COCI)_{2}/DMSO}{CH_{2}CI_{2}}}_{-78 °C, 80 min} Fmoc^{-N} \underbrace{\stackrel{H}{\underset{\overline{R}_{1}}{\overset{}}}_{\overline{R}_{1}} H$$

R<sub>1</sub>= CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CHCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OtBu, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>

## Schema 4.18: Swern-Oxidation von N-Fmoc-geschützten Aminoalkoholen.

Bei der reduktiven Aminierung tritt häufig eine zweifache Alkylierung zum tertiären Amin als Nebenreaktion auf.<sup>[327,328]</sup> Bei der Lösungssynthese läßt sich diese Nebenreaktion dadurch vermeiden, daß von der Carbonyl-Verbindung weniger als ein Äquivalent im Verhältnis zu der Amin-Komponente verwendet wird. Diese Vorgehensweise ist allerdings für die Festphasensynthese ungeeignet, da in diesem Falle keine vollständigen Reaktionsumsätze erzielt werden. Für reduktive Aminierungen an der Festphase hat es sich daher als vorteilhaft erwiesen, zunächst unter Verwendung von Trimethylorthoformiat (TMOF) als wasserentziehendes Mittel die Schiff Base zu synthetisieren.<sup>[329]</sup> In einem zweiten Schritt erfolgte die Reduktion mit Natriumtriacetoxyborhydrid (siehe Schema 4.19).<sup>[330,331]</sup>



Schema 4.19: Reduktive Aminierung an der Festphase.

Bei der Verwendung von aromatischen Aldehyden kann manchmal die Zugabe von Essigsäure als Katalysator nötig sein.<sup>[331]</sup> Allerdings mußten in der vorliegenden Arbeit die cyclischen Peptide mit einer reduzierten Amidbindung ohne Säurekatalyse synthetisiert werden, da ansonsten die Verbindungen von dem säurelabilen TCP-Harz abgespalten worden wären. Die Synthese der Peptide erfolgte wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Tabelle 4.5 zeigt die synthetisierten Verbindungen. Die Ausbeuten nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung betrugen für die linearen Verbindungen 29-75% und für die Cyclen 7%-26%. Die biologische Evaluation der Verbindungen ist in Kapitel 5.1.5 dargestellt.

**Tabelle 4.5:** Synthetisierte Verbindungen mit einer reduzierten Amidbindung.

Nr.	Verbindung	<b>%</b>	N r.	Verbindung	<b>%</b>
79	c(F $\psi$ (CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-D-p)	17	83	1Naphtyl-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-OH	55
80	$c(F-L\psi(CH_2NH)-D-T-D-p)$	n.d.	84	$2$ Naphtyl- $\psi$ (CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-OH	75
81	$c(F-L-D\psi(CH_2NH)-T-D-p)$	7	85	Ichin-L <sub>\u03c0</sub> (CH <sub>2</sub> NH)-D-T-OH	53
82	$c(F-L-D-T\psi(CH_2NH)-D-p)$	26	86	Ichin-L-D <sub>\u03c0</sub> (CH <sub>2</sub> NH)-T-OH	n.d.

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

## 4.3 Festphasensynthese niedermolekularer LDT-Mimetika

## 4.3.1 Synthesekonzept

Die Erkennungssequenzen der einzelnen Liganden für  $\alpha$ 4-Integrine sind nicht identisch, aber sie sind alle einander sehr ähnlich (siehe Kapitel 3.4). Sie setzen sich aus einer Säurekomponente zusammen, die von hydrophoben Aminosäuren flankiert ist. Die LDT-Sequenz stellte einen geeigneten Ausgangspunkt für das Design niedermolekularer, nichtpeptidischer  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrinantagonisten dar. Zudem erwies sich ein *N*-terminales aromatisches System als aktivitätssteigernd.<sup>[271]</sup>

An die Synthese niedermolekularer LDT-Mimetika wurden einige Anforderungen gestellt, die schon bei der Syntheseplanung berücksichtigt werden mußten:

- Die Verbindung sollte sich modular aufbauen lassen (siehe Abbildung 4.7).
- Von den benötigten Reaktionsschritten sollten möglichst viele unter Ausbildung einer neuen Bindung erfolgen.
- Die eingesetzten Bausteine sollten mit großer Strukturvielfalt leicht zugänglich oder kommerziell erhältlich sein.
- Eine neue Verknüpfung sollte unabhängig von dem zuvor eingesetzten Baustein möglich sein.
- Syntheseschritte sollten mit hoher Ausbeute und Selektivität ablaufen.
- Mit den zur Verfügung stehenden Geräten sollte die Synthese automatisierbar sein.
- Ein on-bead screening sollte idealerweise möglich sein, d.h. die Verbindungen müssen über einen orthogonalen Linker an der Festphase synthetisiert werden können. Daher sollte die Anknüpfung an die feste Phase nicht über die an der Integrin-Bindung beteiligte Carboxylgruppe erfolgen.

Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben läßt sich die natürliche LDT-Sequenz, wie in Abbildung 4.7 dargestellt, in die Bausteine A,B,C und D zerlegen. Dieser modulare Aufbau ermöglicht nun die kombinatorische Synthese von LDT-Mimetika.



Abbildung 4.7: Retrokombinatorische Analyse der LDT-Sequenz.

Aufgrund der Robustheit der Fmoc-Strategie wurde die Synthese einer *biased library* gemäß Schema 4.1 durchgeführt. Die parallele Festphasensynthese der einzelnen Verbindungen wurde teilweise an einem Syntheseroboter SyRoII der Firma Multisynthec durchgeführt. Die entstandene Bibliothek enthielt nur Verbindungen, die sich in einem Baustein von der Verbindung **25** unterschieden. Dadurch blieb die Anzahl der Verbindungen noch handhabbar. Dies war gerade zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein wichtiges Kriterium, da die Verbindungen alle einzeln aufgereinigt und anschließend in einem aufwendigen Zelladhäsionsassay getestet werden mußten. Abbildung 3.8 zeigt die verwendeten Bausteine.



**Abbildung 4.8:** Bausteine einer Bibliothek zur Auffindung neuer biologisch, aktiver LDT-Mimetika.

# 4.3.2 Synthese, Reaktionsbedingungen und Eigenschaften der einzelnen Bausteine

Für die Synthese von Bibliotheken sollten idealerweise eine Vielzahl der Bausteine kommerziell verfügbar sein, um den Zeitgewinn bei der Wirkstoffsuche zu steigern. Daher wurden bei dieser Bibliothek Aminosäuren, Carbonsäuren und Amine verwendet. Nicht verfügbare Verbindungen wurden synthetisiert.
## 4.3.2.1 Baustein A

Baustein A repräsentiert in der LDT-Sequenz L-Threonin. Er wurde entweder als *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure oder als Amin in der parallelen Festphasensynthese eingesetzt. Wurden *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren verwendet, so konnte TCP- bzw. auch Wang-Harz verwendet werden. Die weitere Vorgehensweise entsprach Schema 4.1. Häufig führt jedoch die Entfernung der *C*-terminalen Carboxylgruppe eines biologisch aktiven Peptidmimetikas zu einer Aktivitätssteigerung.<sup>[11]</sup> Um diese Verbindungen synthetisieren zu können, mußten zunächst Amine gemäß Schema 4.20 an ein Formylharz gekuppelt werden. In einem ersten Schritt bildete sich das Imin, welches anschließend mit Triacetoxyborhydrid reduziert wurde. Das harzgebundene, sekundäre Amin war sterisch abgeschirmt, so daß zur Ankupplung einer Carbonsäure HATU/HOAT als Kupplungsreagenz unbedingt erforderlich war. Die Abspaltung der *N*-Alkyl-Amide gelang mit 90% TFA in DCM.



Schema 4.20: Synthese von N-Alkyl-Amiden.

Im Gegensatz zur Literatur konnten mit dieser Vorgehensweise jedoch keine *N*-Aryl-Amide synthetisiert werden.<sup>[332]</sup> Wie die Fmoc-Abspaltung während der Synthese zeigte, konnten zwar Anilin-Derivate an das Harz gekuppelt und anschließend weiter umgesetzt werden. Jedoch schlug die Abspaltung mit TFA fehl. Auf diese Substanzklasse sollte nicht verzichtet werden, da sich bei der biologischen Evaluation der Cyclopeptide (siehe Kapitel 5.1.2) gezeigt hat, daß Thr durch Phg substituierbar war. Aus diesem Grund wurde für die Synthese von *N*-Aryl-Amiden zunächst die Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp(OtBu)-OH-Sequenz an einem TCP-Harz aufgebaut, geschützt mit Essigsäure in DCM abgespalten und anschließend in Lösung mit EDCI und den entsprechenden Anilin-Derivaten gekuppelt (siehe Schema 4.21). Aufgrund der geringen Reaktivität von Anilinen mußten lange Kupplungszeiten gewählt werden. Asparaginsäure ist relativ racemisierungslabil, so daß unter den gewählten Reaktionsbedingungen Racemisierung auftrat.



Schema 4.21: Synthese von N-Aryl-Amiden.

Die Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe erfolgte mit TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5). Nach der Reinigung mit HPLC fielen die Produkte nur in geringen Mengen an (Ausbeute pro Diastereomer: 7-15%). Die biologische Evaluation der Verbindungen ist in Kapitel 5.1.9 beschrieben.

Die gegenwärtig ausgearbeitete Synthesestrategie von N-Alkyl- bzw. N-Aryl-Amiden läßt kein *on-bead screening* zu.

## 4.3.2.2 Baustein B

Baustein B entspricht in der natürlichen LDT-Sequenz der L-Asparaginsäure. Dieser Baustein wurde bei der Bibliothekssynthese als *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure eingesetzt.

L-Cysteinsäure stellt ein nicht-klassisches Bioisoster für die Asparaginsäure dar.<sup>[333]</sup> Daher war der Einfluß der Cysteinsäure auf die biologische Aktivität der LDT-Mimetika von großem Interesse. Cysteinsäure konnte unter den milden Bedingungen der Festphasensynthese ohne Seitenketten-Schutzgruppen eingesetzt werden, da die Aktivierung der Sulfonsäuregruppe nur unter drastischen Bedingungen erfolgt. Im Gegensatz zu dem Natriumsalz der *N*-Fmoc-Cysteinsäure ist das *N*-Fmoc-Cysteinsäure-DIPEA-Salz in DMF sehr gut löslich. Dies war bei der Synthese der *N*-Fmoc-Cysteinsäure zu berücksichtigen. Auch Piperidindicarbonsäure kann als Asparaginsäure-Mimetikum angesehen werden. Die Synthese der orthogonal geschützten *N*-Fmoc-Piperidindicarbonsäuren sowie des *N*-Fmoc-Cysteinsäure-DIPEA-Salzes wurde von Dr. C. Gibson durchgeführt.<sup>[68]</sup> Die biologische Evaluation der LDT-Mimetika mit Asp-Modifikationen ist in Kapitel 5.1.8 beschrieben.

### 4.3.2.3 Baustein C

Der Baustein C repräsentiert in der natürlichen LDT-Sequenz L-Leucin. Besonderes Interesse galt dabei der Substituierbarkeit der Isobutyl-Seitenkette von Leucin durch homologe Aminosäuren. Da in den natürlichen Erkennungssequenzen der *CAMs* verschiedene hydrophobe Aminosäuren *N*-terminal zur Säuregruppe benachbart sind, sollte auch der Einfluß von aliphatischen und aromatischen Ringsystemen untersucht werden.

Wie der Syntheseplanung zu entnehmen ist, mußte der Baustein C als *N*-Fmocgeschützte Aminosäure eingesetzt werden. Viele Aminosäuren sind im Zeitalter der kombinatorischen Chemie bereits als *N*-Fmoc-geschützte Derivate kommerziell verfügbar. Einige Aminosäuren wurden unter Standardbedingungen mit Fmoc-Cl in Dioxan/Wasser in das entsprechende *N*-Fmoc-geschützte Derivat überführt. Diese Synthesen verliefen meist in sehr guten Ausbeuten (>85%).

Die biologische Evaluation der LDT-Mimetika mit Leu-Modifikationen ist in Kapitel 5.1.7 beschrieben

## 4.3.2.4 Baustein D

In der Literatur wurde beschrieben, daß sich ein *N*-terminaler, aromatischer Rest positiv auf die biologische Aktivität der LDT-Mimetika auswirkt.<sup>[271]</sup> Die Einführung dieses Bausteins gelang in der vorliegenden Arbeit entweder durch Kupplung mit HATU/HOAt/Collidin in NMP, durch Verzicht auf die Fmoc-Abspaltung vom vorhergehenden Baustein C oder auch durch nukleophile Substitution.

Durch den Verzicht auf die Fmoc-Abspaltung von Baustein C weisen die Verbindungen *N*-terminal ein großes aromatisches System auf. Es ist literaturbekannt, daß sich *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure-Derivate bereits als Inhibitoren für die HIV-

Protease erwiesen haben.<sup>[334]</sup> Diese Verbindung sollte jedoch weniger als Wirkstoff gesehen werden, sondern vielmehr als Modellverbindung.

Da sowohl die Carbonyl-Gruppe als auch das aromatische System planar ist, wurden Verbindungen synthetisiert, bei denen auf die Carbonyl-Gruppe verzichtet und statt dessen ein aromatisches System direkt an den *N*-Terminus geknüpft wurde. Diese aromatische nukleophile Substitution ist allerdings nur mit elektronenarmen Halogenaromaten möglich. Der Einsatz von elektronenarmen Fluoraromaten erfordert nur sehr milde Reaktionsbedingungen. Einige Fluoraromaten sind kommerziell erhältlich. Die Synthese von Fluoraromaten gelingt meist mit einer Balz-Schiemann-Reaktion.

Die Synthese von Fluorpyrimidin (**89**) gelingt durch Diazotierung von 2-Aminopyrimidin in HBF<sub>4</sub> (siehe Schema 4.22).<sup>[335]</sup>



Schema 4.22: Synthese von 2-Fluorpyrimidin (89).

Die Synthese der entsprechenden 2- bzw. 4-Fluorquinazoline gestaltete sich deutlich schwieriger. Dazu mußten zunächst die entsprechenden heterocyclischen Grundgerüste aufgebaut werden.

4-Aminoquinazolin (**91**) ließ sich nach literaturbekannten Methoden ausgehend von 4-Hydroxyquinazolin aufbauen (siehe Schema 4.23). Dazu wurde 4-Hydroxychinazolin zunächst mit PCl<sub>5</sub> in POCl<sub>3</sub> zu dem entsprechenden 4-Chlorquinazolin (**90**) umgesetzt.<sup>[336]</sup> Die Substitution des Chloridions gelang mit gesättigter, ammoniakalischer Ethanol-Lösung bei erhöhter Temperatur und Druck.<sup>[337]</sup>



Schema 4.23: Synthese von 4-Aminoquinazolin (91).

Der Versuch, 4-Aminoquinazolin (91) nach Brown *et al.*<sup>[335]</sup> zu diazotieren und anschließend in das 4-Fluorquinazolin zu überführen schlug fehl. Auch veränderte

Reaktionsbedingungen lieferten nur 4-Hydroxyquinazolin. Vermutlich war das intermediär entstehende 4-Fluorquinazolin ausreichend reaktiv, um bei der Aufarbeitung zu hydrolysieren. Aus denselben Gründen konnte auch das entsprechende 2-Aminoquinazolin (93), das aus 2-Aminobenzaldehyd (92) und Guanidiniumnitrat synthetisiert wurde (siehe Schema 4.24), nicht in das entsprechende Fluor-Derivat überführt werden.



Schema 4.24: Synthese von 2-Aminoquinazolin (93).

Die Synthese von 4-Fluorquinazolin (94) gelang schließlich durch Erhitzen von 4-Chlorquinazolin (90) mit trockenem KF in einer Argonatmosphäre bei 200 °C (siehe Schema 4.25).<sup>[338]</sup>



Schema 4.25: Synthese von 4-Fluorquinazolin (94).

An der festen Phase konnte der Einbau der Fluoraromaten in LDT-Mimetika gemäß einer in unserem Arbeitskreis entwickelten Synthesevorschrift durchgeführt werden.[339]



Schema 4.26: Festphasensynthese von 4-Aminquinazolin-Derivaten.

Die biologische Evaluation der Verbindungen ist in Kapitel 5.1.6 beschrieben.

# 4.4 N-terminale Modifikationen

Bei der biologischen Evaluation der in Kapitel 4.3 beschriebenen Bibliothek (siehe Kapitel 5.1.6) zeigte sich, daß nahezu alle verwendeten Bausteine D zu inaktiven Verbindungen führten. Daher war es nun das Ziel, die strukturellen Erfordernisse am *N*-Terminus zu erforschen, um biologisch aktive Verbindungen zu erhalten

## 4.4.1 Alken-Aryl- bzw. Alkin-Aryl- Struktureinheiten

Modellüberlegungen mit dem Strukturtemplat **15** und der literaturbekannten Verbindung **25** zeigten, daß der *N*-terminale Einbau von Alken-Aryl- bzw. Alkin-Aryl-Struktureinheiten zu sehr ähnlichen Verbindungen führen kann (vereinfacht in Schema 4.27 dargestellt).



**Schema 4.27:** *Schematische Überlagerung von Alken-Aryl und Alkin-Aryl-Struktureinheiten mit dem N-Terminus von* **25**.

Besonders der Einbau von 3-Aryl-cyclohex-2-en-1-carbonsäure bzw. 3-Arylcyclopent-2-en-1-carbonsäure anstelle von Aryl-Carbonyl-Leucin schien eine sehr interessante Modifikation zu sein (siehe Schema 4.28).



Schema 4.28: Cycloalkene als Mimetikum für Leucin.

Um eine möglichst große Diversität zu ermöglichen, sah die Syntheseplanung vor, diese Struktureinheiten modular aufzubauen. Die Aryl-Alkenyl-Kupplung sollte dabei mit einer Heck-Reaktion durchgeführt werden, da diese unter sehr milden Bedingungen abläuft. Ebenfalls unter sehr milden Bedingungen verläuft auch die Sonogashira-Reaktion zur Synthese von Aryl-Alkinyl-Bindungen. Bei der Durchführung von Palladium-katalysierten Reaktionen an der Festphase müssen mehr als 1 Äquivalent des betreffenden Katalysators eingesetzt werden. Die Ursache hierfür ist, daß der Katalysator zum einen unter den Reaktionsbedingungen teilweise oxidiert wird und zum anderen mit dem Harz in Wechselwirkung tritt. Selbst beim mehrmaligen Waschen mit 0.5% Dithiocarbamat in DMF ließ sich der Pd-Katalysator nicht vollständig aus dem Harz herauswaschen.

## 4.4.1.1 Heck-Reaktion zum Aufbau von Aryl-Alkenyl-Struktureinheiten

In der kombinatorischen Chemie werden Heck-Reaktionen sowohl an der Festphase als auch in Flüssigphase sehr häufig zur Diversifizierung eingesetzt.<sup>[64]</sup> Bei der typischen Heck-Reaktion erfolgt eine Palladium-katalysierte C-C- Verknüpfung zwischen einem Alkyl/Aryl-Halogen und einer Vinyl-Verbindung.<sup>[340]</sup>



Schema 4.29: Schematische Darstellung des Katalyse-Cycluses einer Heck-Reaktion.

Bei den meisten literaturbekannten Heck-Reaktionen an fester Phase werden harzgebundene Aryliodide mit Alken-Verbindungen umgesetzt. Yu *et al.* konnten jedoch keine harzgebundenen Olefine mit Halogenaromaten umsetzen.<sup>[341]</sup> In der vorliegenden Arbeit sah die Syntheseplanung aber genau jene Reaktionsfolge vor. Daher mußten zunächst geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um Halogenaromaten mit polymergebundenen Olefinen reagieren zu lassen. Mit Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, P(o-Tolyl)<sub>3</sub> in DMF und Iodaromat mit TEA über Nacht bei 60 °C konnte die Kupplung an das harzgebundene Olefin erreicht werden.



R<sub>1</sub>= Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu), Asp(OtBu)-Thr(OtBu)

## Schema 4.30: Heck-Reaktion an fester Phase.

Fmoc-Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu) bzw. Fmoc-Asp(OtBu)-Thr(OtBu) belegtes Wang-Harz wurde zunächst mit einer 0.1 M Lösung aus Alkencarbonsäure (10 Äquiv.) und DIC (15 Äquiv.) in NMP für 4 h umgesetzt. Die *N*-terminale Alken-Einheit konnte unter den oben beschrieben Bedingungen mit Iodbenzol zur Reaktion gebracht werden. Die synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung erfolgte die biologische Evaluation der Verbindungen in einem Zelladhäsionsassay (siehe Kapitel 5.1.6).

**Tabelle 4.6:** Liste der synthetisierten Verbindungen mit N-terminalen Alken-Struktureinheiten.

Nr.	Iodaromat	Alken	$\mathbf{R}_{1}$	Ausbeute <sup>a</sup>
101	Iodbenzol	Butensäure	Leu-Asp-Thr	29%
102	Iodbenzol	Methacrylsäure	Leu-Asp-Thr	10%
104	Iodbenzol	Butensäure	Asp-Thr	24%
105	Iodbenzol	Methacrylsäure	Asp-Thr	n.d.

<sup>a</sup> nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

#### 4.4.1.2 Sonogashira Kupplung zum Aufbau von Aryl-Alkinyl-Struktureinheiten

Bei der Sonogashira-Kupplung erfolgt die Palladium-katalysierte C-C-Verknüpfung zwischen Aryl-Bromiden bzw. -Iodiden mit nicht aktivierten terminalen Alkinen (siehe Schema 4.31).



R<sub>1</sub>= Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu), Asp(OtBu)-Thr(OtBu)

### Schema 4.31: Sonogashira-Reaktion an fester Phase.

Für die Reaktion ist ferner ein Cu(I)-Cokatalysator, meist CuI, nötig. Die Reaktion verläuft unter sehr milden Bedingungen und toleriert eine Vielzahl an funktionellen Gruppen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Fmoc-Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu) bzw. Fmoc-Asp(OtBu)-Thr(OtBu) belegtes Wang-Harz mit einer 0.1M Lösung aus Propiolsäure und DIC in NMP für 4 h umgesetzt. Die *N*-terminale, harzgebundene Propinsäure wurde mit CuI, Bis(triphenylphosphin)-palladium-(II)-chlorid, DIPEA und Iodbenzol bei RT über Nacht zur Reaktion gebracht. Nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung erfolgte die biologische Evaluation der Verbindungen in einem

Zelladhäsionsassay (siehe Kapitel 5.1.6). Tabelle 4.7 zeigt die synthetisierten Verbindungen.

**Tabelle 4.7:** Liste der synthetisierten Verbindungen mit N-terminaler Alkin-Struktur 

 einheit.

Nr.	Iodaromat	Alkin	R <sub>1</sub>	Ausbeute <sup>a</sup>
103	Iodbenzol	Propiolsäure	Leu-Asp-Thr	31%
106	Iodbenzol	Propiolsäure	Asp-Thr	58%

<sup>a</sup> nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

Mit der erfolgreichen Anwendung der Heck- und Sonogashira-Reaktion auf die Synthese von LDT-Mimetika wurden die Grundlagen für den Aufbau einer Bibliothek gelegt. Die Synthese einer Bibliothek mit Alken-Aryl bzw. Alkin-Aryl-Struktureinheiten wird in unserem Arbeitskreis von einem Kollegen fortgeführt.

## 4.4.2 Aminothiazol als *N*-terminales *scaffold*

2-Aminothiazole stellen in der Medizinischen Chemie eine weit verbreitete Struktureinheiten dar. Sie werden für die Entwicklung von Medikamenten gegen Allergien, [342] Bluthochdruck, [343] Entzündungen, [344] Schizophrenie [345] und HIV-Infektionen [346] verwendet. Ferner konnten Thiazole am Beispiel von NK-1-Antagonisten auch ihre Eignung als Dipeptidmimetika unter Beweis stellen (siehe Schema 4.32). [347]



Schema 4.32: Thiazole als konformativ eingeschränkte Dipeptidmimetika.

In der vorliegenden Arbeit wurden Thiazole zum *screening* des *N*-terminalen Raumes verwendet. Ausgehend von Modellüberlegungen mit Verbindung **15** konnten mit 2- (Alkyl)-amino-4-aryl-Thiazol-Derivaten eine gute räumliche Übereinstimmung der pharmakophoren Gruppen erzielt werden. Stilz *et al.* konnte mit ähnlichen

hydantoinhaltigen Verbindungen potente  $\alpha 4\beta$ 1-Integrinantagonisten entwickeln (siehe Abbildung 4.9).[348]



Abbildung 4.9: VLA-4-Antagonist von Aventis mit einem Hydantoin-scaffold.

Die Festphasensynthese von Thiazolen gelingt unter milden Bedingungen und erlaubt die Verwendung einer Vielzahl von Funktionalitäten, ohne diese schützen zu müssen. Ferner sind die dafür nötigen  $\alpha$ -Brom-Ketone häufig kommerziell erhältlich bzw. synthetisch gut zugänglich. Die Synthese von 2-Aminothiazol-Bibliotheken konnte bereits erfolgreich sowohl in Lösung als auch an der festen Phase durchgeführt werden.<sup>[349,350]</sup> Einen guten Überblick über den Aufbau von Heterocyclen an der festen Phase bietet R.G. Franzén.<sup>[62]</sup>

## 4.4.2.1 Synthese von α-Brom-Carbonyl-Verbindungen

Wie Schema 4.33 zeigt, gelang die Synthese von  $\alpha$ -Brom-Aldehyden über die entsprechenden Silyl-Enol-Ether.<sup>[351]</sup> Verbindung **131** lag als cis-/ trans-Isomerengemisch vor. Die elektrophile Addition von Brom an die C-C-Doppelbindung führte zu einer spontanen  $\beta$ -Eliminierung unter gleichzeitiger Freisetzung von leicht flüchtigem Trimethylsilylbromid.



Schema 4.33: Synthese von 2-Brom-3-phenyl-propionaldehyd (132).

Die Synthese von 1-Brom-3-phenyl-propan-2-on (133) ist in Schema 4.34 dargestellt. Zunächst wurde Phenylessigsäurechlorid mit Diazomethan umgesetzt. Unter Abspaltung von Chlorwasserstoff bildete sich das resonanzstabilisierte Diazoketon. Um eine Weiterreaktion des Diazoketons mit dem Chlorwasserstoff zu der entsprechenden  $\alpha$ -Chlor-Carbonyl-Verbindung zu vermeiden, mußte ein Überschuß an Diazomethan eingesetzt werden. Dieses reagierte mit HCl zu Methylchlorid. Die Umsetzung des Diazoketons mit 48%-iger Bromwasserstoffsäure führte schließlich zu 133.[352]



Schema 4.34: Synthese von 1-Brom-3-phenyl-propan-2-on (133).

### 4.4.2.2 Festphasensynthese von Aminothiazol-Derivaten

Die ringaufbauende Synthese durch Kondensation eines Thioamid-Derivats mit einer  $\alpha$ -Brom-Carbonyl-Verbindung geht bereits auf A.R. Hantsch zurück.<sup>[353]</sup> Die Festphasensynthese von 2-Aminothiazol-Derivaten ist in Schema 4.35 dargestellt. Zunächst wurde das harzgebundene Amin mit *N*-Fmoc-geschütztem Isothiocyanat (134) umgesetzt. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe konnte das entstandene Thioharnstoff-Derivat anschließend bei Raumtemperatur mit  $\alpha$ -Brom-Carbonyl-Verbindungen zu 2-Aminothiazol-Derivaten umgesetzt werden.<sup>[350]</sup>



Schema 4.35: Festphasensynthese von 2-Aminothiazolen.

Durch parallele Festphasensynthese wurde eine kleine Thiazol-Bibliothek synthetisiert. Tabelle 4.8 zeigt die synthetisierten Verbindungen. Die Ausbeuten nach HPLC-Reinigung betrugen 9-51%. Die biologische Evaluation der Verbindungen wird in Kapitel 5.1.10 beschrieben.

Tabelle	4.8:	Liste	der	synthetisierten	LDT-Mimetika	mit	einer	<i>N</i> -terminalen	Thiazol-
Einheit.									

Nr.	R <sub>3</sub>	$\mathbf{R}_{2}$	$\mathbf{R}_{1}$	%	Nr.	R <sub>3</sub>	<b>R</b> <sub>2</sub>	<b>R</b> <sub>1</sub>	%
135	Н	Ph	Leu-Asp-Thr	33	139	$\mathrm{CH}_3$	$\mathrm{CH}_3$	Leu-Asp-Thr	51
136	Ph	Ph	Leu-Asp-Thr	29	140	Η	Bn	Leu-Asp-Thr	10
137	H p-N	O <sub>2</sub> -Ph	Leu-Asp-Thr	43	141	Bn	Н	Leu-Asp-Thr	15
138	Indan-1	-onyl	Leu-Asp-Thr	9					

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

Die verwendeten Bausteine sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Da aromatische Systeme am *N*-Terminus der LDT-Erkennungssequenz einen günstigen Einfluß auf die biologische Aktivität von  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten ausüben, wurden die Bausteine nicht im Hinblick auf eine größtmögliche Diversität sondern nach deren aromatischen Charakter ausgewählt.



**Abbildung 4.10:** *Die ringaufbauende Kondensationsreaktion ist der diversitätseinführende Schritt.* 

## 4.4.3 Fluor-nitrobenzoesäure als N-terminales scaffold

Halogenierte Heterocyclen, wie beispielsweise Cyanurfluorid oder Trichlorpyrimidin werden in der kombinatorischen Chemie häufig als scaffolds oder Template eingesetzt. Fluor-nitroaromaten haben sich als sehr vielseitige Bausteine für die Synthese von Mono-, Bi- oder auch Makrocyclen erwiesen.<sup>[45]</sup> Aufgrund der vielfältigen Derivatisierungsmöglichkeiten ist Fluor-nitrobenzoesäure ein idealer Baustein, um den *N*-terminalen Raum von  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten zu untersuchen. In einem ersten Schritt kann das Fluoridion durch eine Vielzahl von Nukleophilen, wie etwa Aminen, Aminosäuren oder Alkoholen substituiert werden. Viele dieser Bausteine sind kommerziell erhältlich. In einem zweiten Schritt läßt sich die Nitro-Gruppe reduzieren. Die entstehende Amino-Funktionalität kann durch eine Vielzahl von organischen Reaktionen weiter umgesetzt werden. Der Vorteil dieses Reduktionsschritts zur einer Amino-Funktionalität liegt darin, daß keine orthogonale Erzeugung Schutzgruppenstrategie verwendet werden muß. Die Überführung der Nitro- in die Amino-Funktionalität stellt gewissermaßen die Orthogonalität dar. Bei der Verwendung von α-Aminosäuren als Nukleophile geht die anschließende Reduktion der Nitro-Gruppe mit einem Ringschluß einher. Dadurch lassen sich konformativ eingeschränkte 3-Alkyl-3,4-dihydro-1*H*-quinoxalin-2-on-Derivate synthetisieren.<sup>[354</sup>, <sup>355</sup> Die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten von Fluor-nitroaromaten waren auch deshalb ein wichtiger Aspekt bei der Syntheseplanung, da dieses scaffold u.a. anstelle von Leucin eingesetzt werden sollte. Abbildung 4.11 zeigt eine Übersicht zu Derivatisierungsmöglichkeiten von Fluor-nitroaromaten.

Verbindungen, die sich durch weitere Umsetzung von Fluor-nitroaromaten ergeben haben, wiesen teilweise interessante biologische Eigenschaften auf. So sind 3,4-Dihydro-1*H*-quinoxalin-2-on-Derivate potente Antagonisten für den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor.<sup>[356]</sup> Ferner konnte eine Bibliothek mit entsprechend substituierten Fluor-nitroaromaten neue Antagonisten für RGD-erkennende Integrine liefern.<sup>[357]</sup>



**Abbildung 4.11:** Einige Derivatisierungsmöglichkeiten von Fluor-nitroaromaten. Eine umfassendere Zusammenstellung findet sich bei Dolle.<sup>[45]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluor-nitrophenyl-*scaffolds* als 2-Fluor-5-nitrobenzoesäure bzw. als 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure eingeführt. Die Kupplung der Fluornitrobenzoesäure-Derivate an Fmoc-Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu)-OH bzw. Fmoc-Asp(OtBu)-Thr(OtBu)-OH belegtes Wang-Harz erfolgte mit einer 0.1M Lösung aus DIC in NMP für 4 h. Als Kupplungsreagenz mußte DIC verwendet werden, da Uronium-Kupplungsreagenzien zu ausgeprägten Nebenreaktionen führten. Das Fluoridion konnte über Nacht bei 60 °C durch eine 1M Lösung des entsprechenden Amins (50 Äquiv.) in DMF substituiert werden. Zur Einführung von Aminosäuren mußten zunächst geeignete Reaktionsbedingungen erarbeitet werden. Die besten Ergebnisse resultierten aus der Verwendung von Natrium-Salzen der entsprechenden Aminosäuren in einer 2:1 Lösung DMF:Wasser (siehe Schema 4.36). Die Quelleigenschaften des Wang-Harzes waren in diesem Lösungsmittelgemisch ausreichend, um einen vollständigen Ablauf der Reaktion zu gewährleisten.

Da der *N*-Terminus von  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten ein aromatisches System enthalten muß, wurden für die nukleophile Substitution vorwiegend aromatische Amine bzw. Aminosäuren verwendet. Nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung betrugen die Ausbeuten zwischen 22% und 86%. Die synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 4.9 zusammengefaßt.



R<sub>1</sub>= Leu-Asp(OtBu)-Thr(OtBu), Asp(OtBu)-Thr(OtBu)

**Schema 4.36:** *Festphasensynthese von 3-Alkyl-3,4-dihydro-1*H-*quinoxalin-2-on-Derivaten.* 

Bei der Abspaltung mit TFA:TIPS: $H_2O$  (95:2.5:2.5) konnte die Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe teilweise als ausgeprägte Nebenreaktion beobachten werden. Die biologische Evaluation der Verbindungen ist in Kapitel 5.1.11 beschrieben.

**Tabelle 4.9:** Nukleophile Substitutionen an 2-Fluor-5-nitrobenzoesäure und 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure-scaffolds.

		$\int_{1}^{1} \frac{R_2 - NH_2}{MF} = R_2$	$P_2 \rightarrow N_1 \rightarrow N_1 \rightarrow N_2 \rightarrow N_2 \rightarrow N_1 \rightarrow N_2 \rightarrow N_2 \rightarrow N_1 \rightarrow N_1 \rightarrow N_2 \rightarrow N_1 $	)
Nr.	$\mathbf{R}_2$	Substitution	$\mathbf{R}_{1}$	Ausbeute <sup>a</sup>
142	Benzylamin	4-Fluor-3-Nitro	Asp-Thr	58%
143	Benzylamin	4-Fluor-3-Nitro	Leu-Asp-Thr	86%
144	Benzylamin	2-Fluor-5-Nitro	Asp-Thr	69%
145	Benzylamin	2-Fluor-5-Nitro	Leu-Asp-Thr	71%
146	Phenylalanin	2-Fluor-5-Nitro	Leu-Asp-Thr	52%
148	Phenylalanin	4-Fluor-3-Nitro	Leu-Asp-Thr	40%
149	Alanin	4-Fluor-3-Nitro	Leu-Asp-Thr	22%

<sup>a</sup> nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

Für die Reduktion der Nitrogruppe wurden verschiedene Reaktionsbedingungen ausgetestet. Allerdings konnte das gewünschte Produkt stets nur als Nebenprodukt nachgewiesen werden. Daher wurde die Synthese von *N*-terminalen 3-Alkyl-3,4-dihydro-1*H*-quinoxalin-2-on-7-carbonyl-Derivaten nicht weiter verfolgt.

# 4.5 *C*-terminale Modifikationen

Bei der biologischen Evaluation der in Kapitel 4.3 beschriebenen Bibliothek (siehe Kapitel 5.1.9) zeigte sich, daß einige *C*-terminale Modifikationen ohne Verlust der biologischen Aktivität durchgeführt werden konnten. Daher sollte nun versucht werden, den peptidartigen Charakter der Verbindungen weiter zu reduzieren.

# 4.5.1 Substitution der Asp-Thr-Struktureinheit durch 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate

Die biologische Evaluation der cyclischen Hexapeptide zeigte, daß Thr durch Phg (**21a**) bzw. Phe (**20**) substituiert werden konnte (siehe Kapitel 5.1.2). In Übereinstimmung damit ergab auch die biologische Testung der in Kapitel 4.3 beschriebenen Bibliothek, daß Thr durch Anilin-Derivate (**125b**, **126b**, **127**, **128b**) oder durch Benzylamin (**124**) substituierbar war. Diese Ergebnisse zeigten, daß ein aromatischer *C*-Terminus toleriert wurde. In der Medizinischen Chemie konnte an einigen Beispielen eindrucksvoll gezeigt werden, daß die planare Amid-Bindung in einem Molekül durch einen Phenyl-Ring substituiert werden kann. Beide Struktureinheiten können ähnliche  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingehen. Ziel war es nun, die Amid-Bindung zwischen Asp und Thr in der Verbindung **25** durch einen substituierten Phenyl-Ring zu ersetzen (siehe Abbildung 4.12).

Ferner sollten konformativ eingeschränkte Derivate von 3-Amino-3-arylpropionsäure synthetisiert werden. Da in dieser Arbeit auch bereits Methoden zum Einbau von Peptoid-Bausteinen, Aza-Bausteinen und reduzierten Amidbindungen etabliert wurden, sah der Syntheseplan vor, auch diese Modifikationen mit der neuen 3-Amino-3-arylpropionsäure-Struktureinheit zu kombinieren.



**Abbildung 4.12:** *Substitution der Asp-Thr-Struktureinheit durch 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate.* 

## 4.5.1.1 Synthese

Nach einer literaturbekannten Methode konnten 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate in racemischer Form synthetisiert werden (siehe Schema 4.37).<sup>[358]</sup> In parallelen Ansätzen wurden aromatische Aldehyde mit Malonsäure und Ammoniumacetat in Ethanol umgesetzt. Ohne weitere Reinigungsschritte betrugen die Ausbeuten 46-91%. Die Amino-Funktionalität wurde anschließend mit der Fmoc-Gruppe geschützt.



R= o-Me, m-Me, p-Me, p-Ethyl, p-Isopropyl, o-NO<sub>2</sub>, m-NO<sub>2</sub>, p-NO<sub>2</sub>

# **Schema 4.37:** *Synthese von N-Fmoc-geschützten 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivaten.*

Die Synthese der *N*-Fmoc-geschützten 3-Amino-3-arylpropionsäure-*tert*-butylester ist in Schema 4.38 dargestellt. Sie erfolgte analog durch Umsetzen von aromatischen Aldehyden mit Malonsäure-mono-*tert*-butylester und Ammoniumacetat in Ethanol und anschließende Einführung der Fmoc-Schutzgruppe.

Die 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate wurden als Racemat synthetisiert und auch als solches in den weiteren Reaktionen eingesetzt. Eine Auftrennung erfolgte auf Stufe der Endprodukte, die als Diastereomere vorlagen. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, daß aus einem Reaktionsansatz zwei Diastereomere erhalten wurden (kombinatorisches Prinzip).



**Schema 4.38:** Synthese von N-Fmoc-geschützten 3-Amino-3-arylpropionsäure-tertbutylester-Derivaten.

Verbindungen vom Typ der 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-yl-essigsäure stellen konformativ eingeschränkte Derivate von 3-Amino-3-arylpropionsäure dar. Ausgehend von Phenylethylamin konnte nach einer literaturbekannten Methode durch eine Bischler-Napieralski Reaktion das Ringgerüst aufgebaut werden.<sup>[359]</sup> In einer Knoevenagel-analogen Reaktion wurde das 3,4-Dihydroisoquinolin (**170**) mit Malonsäure umgesetzt.<sup>[360]</sup> Abschließend erfolgte *N*-terminal die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe (siehe Schema 4.39).



Schema 4.39: Synthese von N-Fmoc-geschützter 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-ylessigsäure (172).

TCP-Harz bzw. Wang-Harz wurde mit den *N*-Fmoc-geschützten 3-Amino-3arylpropionsäure-Derivaten und mit der *N*-Fmoc-geschützten 1,2,3,4Tetrahydroisoquinolin-1-yl-essigsäure belegt. Die 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate wurden als Racemat eingesetzt. Unter Verwendung von TBTU/HOBt/DIPEA bzw. HOAT/HOAt/Collidin wurde an alle Harze zunächst Fmoc-Leu-OH und anschließend Isochinolin-3-carbonsäure gekuppelt. Nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung konnten die einzelnen Diastereomere in Ausbeuten von 4-58% erhalten werden. Tabelle 4.10 zeigt die synthetisierten Verbindungen. Die biologische Evaluation der Verbindungen ist in Kapitel 5.1.12 beschrieben.

**Tabelle 4.10:** Liste der synthetisierten Verbindungen mit einer 3-Amino-3arylpropionsäure- bzw. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-yl-essigsäure-Einheit. Die beiden Diastereomeren eines Verbindungstyps sind paarweise zusammengefaßt.

				2	
Nr.	R	<b>%</b>	Nr.	R	<b>0⁄0</b> <sup>a</sup>
174a/b	o-CH <sub>3</sub>	44/49	179a/b	o-NO <sub>2</sub>	58/56
175a/b	m-CH <sub>3</sub>	31/31	180a/b	m-NO <sub>2</sub>	42/39
176a/b	p-CH <sub>3</sub>	_/_	181a/b	p-NO <sub>2</sub>	47/41
177a/b	p-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	35/31	182a/b	р-СООН	17/4
178a/b	p-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	38/43	10.	1,2,3,4-	,
173a/b	Н	_/_	185 Tetra	hydroisoquinol	-/- in

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung. Ausbeuten beziehen sich auf die jeweiligen Diastereomere.

Die biologische Evaluation ergab, daß die Verbindungen mit einer 3-Amino-3arylpropionsäure-Struktureinheit potente  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten darstellten. In einem nächsten Schritt, sollte daher die neue Leitstruktur **176a** optimiert werden. Dazu wurde eine kleine Bibliothek mit den Bausteinen A bis C aufgebaut (siehe Abbildung 4.13). TCP-Harz, das mit *N*-Fmoc-geschützter 3-Amino-3-(tolyl)-propionsäure- (**152**) bzw. mit *N*-Fmoc-geschützter 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-yl-essigsäure- (**172**) belegt war, wurde mit den bereits beschriebenen Bausteinen Fmoc-Nleu-OH (**32**) und Fmoc-azaLeu-Cl (**56**) umgesetzt. Die reduktive Aminierung mit Fmoc-Leu-al (**76**) konnte nur mit *N*-Fmoc-3-Amino-3-(tolyl)-propionsäure-belegtem TCP-Harz durchgeführt werden. Abschließend wurde der *N*-Terminus mit Isochinolin-3- carbonsäure unter Verwendung von HATU/HOAt/Collidin in NMP *gecappt*.



Abbildung 4.13: Kombinatorische Synthese einer Bibliothek für LDT-Mimetika.

Die Entfernung der Schutzgruppen mit TFA:TIPS:Wasser (95:2.5:2.5) verlief unter gleichzeitiger Abspaltung der Verbindungen vom Harz. Nach der HPLC-Reinigung konnten die Produkte in 29-89%-iger Ausbeute erhalten werden. Tabelle 4.11 enthält die synthetisierten Verbindungen. Die biologische Evaluation der synthetisierten Verbindungen ist in Kapitel 5.1.13 beschrieben.

**Tabelle 4.11:** Liste der synthetisierten Verbindungen mit einer 3-Amino-3-arylpropionsäure- bzw. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-yl-essigsäure-Einheit.

Nr.	<b>Baustein</b> C	<b>Baustein B</b>	<b>Baustein</b> A	Ausbeute <sup>a</sup>
186 a/b <sup>b</sup>		Fmoc-Leu-al-OH	2	33%/29%
187	Isocninolin-3-	Fmoc-azaLeu-Cl	3-Amino-3-(tolyl)-	39%
188	carbonsaure	Fmoc-Nleu-OH	propionsaure	60%
189	Isochinolin-3-	Fmoc-Nleu-OH	Tetrahydroisoquinolin-	89%
190	carbonsäure	Fmoc-azaLeu-Cl	1-yl-essigsäure	46%

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

<sup>b</sup>beide Diastereomere konnten mittels HPLC getrennt werden.

Die Verbindungen, bei denen die Asp-Thr-Struktureinheit durch 3-Amino-3arylpropionsäure substituiert war, wiesen eine deutliche biologische Aktivität auf. Um die Konformation dieser Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie aufklären zu können, wurde versucht, in dem von Dr. J. Boer beschriebenen cyclischen Hexapeptid 19 c(Phe-Leu-Asp-Thr-Asp-pro) die Asp-Thr-Struktureinheit durch 3-Amino-3-(4carboxylphenyl)propionsäure (167) zu ersetzen (siehe Abbildung 4.14).<sup>[361]</sup> Dabei wurden die beiden Ringsysteme c(Phe-Leu-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)c(Phe-Leu-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)propionsäure)-Asp-pro) 192 und propionsäure)-Ala-Asp-pro) 191a/ 191b nach Schema 4.1 synthetisiert.



**Abbildung 4.14:** *Cyclische Peptide mit einer 3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)- propionsäure-Struktureinheit.* 

Da 3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)-propionsäure (167) als Racemat eingesetzt wurde, sollte die Cyclisierung zu zwei Diastereomeren führen. Allerdings wurde von c(Phe-Leu-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)-propionsäure)-Asp-pro) nur ein Diastereomer erhalten. Das andere Diastereomer ließ sich mit HATU/HOAt/Collidin nicht zyklisieren. Die Ausbeuten betrugen nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung 17-23% (siehe Tabelle 4.12).

**Tabelle 4.12:** Liste der cyclischen Peptide mit einer 3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl) 

 propionsäure-Struktureinheit.

Nr.	Sequenz	Ausbeute <sup>a</sup>
191a	c(F-L-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)-propionsäure)-A-D-p)	17%
191b	c(F-L-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)-propionsäure)-A-D-p)	n.d.
192	c(F-L-(3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)-propionsäure)-D-p)	23%

<sup>a</sup>Ausbeute in % nach Schutzgruppenabspaltung und HPLC-Reinigung.

Bei der biologischen Evaluation (siehe Kapitel 5.1.2) riefen diese Cyclen jedoch nur noch einen sehr schwachen biologischen Effekt hervor. Daher wurden diese Verbindungen entgegen der ursprünglichen Planung nicht mehr NMR-spektroskopisch untersucht.

# 4.5.2 Substitution der Leu-Asp-Thr-Struktureinheit durch *N*-Isobutylhydrazino-5-oxo-3-aryl-pentansäure-Derivate

Bei der biologischen Evaluation der in Kapitel 4.5.1 synthetisierten Verbindungen fiel Verbindung **187** durch einen schwachen biologischen Effekt auf. Eine Möglichkeit, die biologische Aktivität von Verbindung **187** zu erhöhen, lag in der Erhöhung der konformativen Flexibilität. Die große Anzahl an Heteroatomen ließ Verbindung **187** ebenfalls nicht als optimale Leitstruktur erscheinen. Daher sollten anstelle der 3-Amino-3-arylpropionsäure-Struktureinheit Glutarsäure-Derivate eingesetzt werden. Die Synthese der aromatischen Glutarsäure-Derivate erfolgte nach einer literaturbekannten Methode (siehe Schema 4.40).<sup>[362]</sup>



**Schema 4.40:** Synthese von N-Fmoc-geschützten N-Isobutyl-hydrazino-5-oxo-3-arylpentansäure-Derivaten.

Danach wurden die aromatischen Aldehyde mit Acetessigsäureethylester und Piperidin einige Tage lang umgesetzt und anschließend in Ethanol unter Rückfluß gekocht. Der erhaltene Feststoff wurde mit wäßriger Natronlauge für mehrere Tage bei 80 °C erhitzt. Die Glutarsäure-Derivate konnten in 45-95%-iger Ausbeute erhalten werden.

Zur weiteren Umsetzung wurde die Glutarsäure mit Essigsäureanhydrid in das entsprechende Glutarsäureanhydrid überführt. Dieses reagierte in einem weiteren Schritt mit *N*-Fmoc-geschütztem N'-Isobutylhydrazin (**50**) in 54-71%-iger Ausbeute zu einem *N*-Fmoc-geschützten *N'*-Isobutylhydrazino-5-oxo-3-aryl-pentansäure-Derivat. Um aufwendige Reinigungsschritte nach der Fmoc-Abspaltung zu vermeiden, wurde TCP-Harz mit *N*-Fmoc-geschützter *N'*-Isobutylhydrazino-5-oxo-3-(p-tolyl)pentansäure (**198**) belegt und Isochinolin-3-carbonsäure mit HATU/HOAt/Collidin in NMP angekuppelt. Wie in Schema 4.41 dargestellt, wurde 5-[*N*-Isobutyl-*N'*-(isoquinolin-3-carbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-*p*-tolyl-pentansäure (**199**) nach Abspalten der Schutzgruppen und HPLC-Reinigung in 21%-iger Ausbeute erhalten. Die biologische Evaluation der Verbindung **199** ist in Kapitel 5.1.13 beschrieben.



Schema 4.41: Synthese von Verbindung 199.

# **5** Biologische Evaluation von α4-Integrinantagonisten

Die Synthese der LDT-Mimetika diente zur Identifizierung der pharmakophoren Gruppen. Die daraus gewonnenen Informationen sollten für die Entwicklung neuartiger  $\alpha 4\beta7$ –Integrinantagonisten verwendet werden.

In diesem Kapitel werden zunächst die biologischen Aktivitäten der synthetisierten LDT-Mimetika auf  $\alpha 4\beta 1$ – und  $\alpha 4\beta 7$ –Integrin exprimierende Zellen diskutiert. Im Abschnitt 5.3 wird dann die Etablierung eines zellulären *on-bead* Testsystems beschrieben.

Die biologische Testung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

# 5.1 Zelladhäsionsassays

## 5.1.1 Allgemeine Testbedingungen

Die Testung der Verbindungen auf ihre biologische Aktivität erfolgte mit Zelladhäsionsassays. Dazu wurden 96-iger Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden natürlichen Liganden beschichtet.  $\alpha 4\beta 1$ - und  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimierende Zellen wurden zunächst fluoreszenzmarkiert und mit der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf der Mikrotiterplatte ausgesät und die Fluoreszenz bestimmt. Nach halbstündiger Inkubation wurden nicht adhärierte Zellen durch inverse Zentrifugation entfernt. Adhärierte Zellen konnten durch erneutes Messen der Fluoreszenz quantifiziert werden. Dabei ist die Abnahme der Fluoreszenz ein Maß dafür, wie stark die Verbindung die Ligand-Protein-Wechselwirkung inhibieren kann. Die so erhaltenen Werte stellen keine Fixgrößen dar, sondern sie erlauben aufgrund der Streuung des Testsystems nur Aussagen über aktive und nichtaktive Verbindungen. Dabei repräsentiert jeder Meßwert den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, bestehend aus drei Einzelmeßwerten. Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten kann durch Variation der Ligandkonzentration die Empfindlichkeit des Testsystems eingestellt werden. Die Um stets reproduzierbare Werte zu erhalten ist es wichtig, daß sich bei der biologischen Testung das Verhältnis Zellen/Ligand entweder im Sättigungsbereich bzw. knapp unterhalb davon befindet. Alle Verbindungen wurden mit jenem Testsystem untersucht, bei dem das Verhältnis Zellen/Ligand im Sättigungsbereich lag. Nur solche Verbindungen, die in diesem Test eine sehr schwache Aktivität aufwiesen, wurden nochmals mit einem empfindlicheren Testsystem evaluiert, bei dem das Verhältnis Zellen/Ligand knapp unterhalb des Sättigungsbereichs lag. Die Verwendung des jeweiligen Testsystems ist im Text erwähnt. Die Meßwerte, die mit dem empfindlicheren Testsystem erhalten wurden (in den Tabellen als *MAdCAM-1 verdünnt* bzw. *M verd*.bezeichnet), setzen sich aus mindestens einem Experiment bestehend aus drei Einzelmessungen zusammen.

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um  $\alpha 4\beta 1$ –Integrin exprimierende Jurkat-Zellen ( $\alpha 4\beta 1^{\text{pos}}$ ,  $\alpha 4\beta 7^{\text{neg}}$ ) und um  $\alpha 4\beta 7$ –Integrin exprimierende 38C13 $\beta$ 7-Zellen (B Lymphoma-Zellinie) ( $\alpha 4\beta 1^{\text{neg}}$ ,  $\alpha 4\beta 7^{\text{pos}}$ ).

Da bei der Entwicklung eines Wirkstoffes die Selektivität oftmals eine entscheidende Rolle spielt, wurden die synthetisierten Verbindungen in den folgenden Testsystemen evaluiert: 38C13 $\beta$ 7-Lymphoma-Zellen/MAdCAM-1, 38C13β7-Lymphoma-Zellen/VCAM-1 und Jurkat-Zellen/VCAM-1. Sowohl VCAM-1 als auch MAdCAM-1 gehören zu den endogenen Liganden der α4β7-Integrine. Die Bindungsmotive beider Liganden sind sehr ähnlich.  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine erkennen in MAdCAM-1 die (-GLDTS-)-Sequenz, in VCAM-1 die (-QIDSP-)-Sequenz und  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine binden ebenfalls über die (-QIDSP-)-Sequenz an VCAM-1 (siehe Kapitel 3.4). [363] Die Selektivitätstests stellen auch einen internen Kontrollversuch dar. Das Ausfallen einer Substanz während der Testung würde eine biologische Aktivität vortäuschen. Weist eine Verbindung nun in einem Testsystem eine biologische Aktivität auf und in einem anderen nicht, so kann ausgeschlossen werden, daß diese Verbindung einen unspezifischen Effekt hervorruft. Zudem wurden alle wells einer Mikrotiterplatte unter dem Mikroskop überprüft, ob sich während der biologischen Testung ein Niederschlag bildete.

Oftmals werden in der Literatur Integrinantagonisten an aktivierten Integrinrezeptoren getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind aber hinsichtlich ihrer *in-vivo* Aussagekraft fraglich. Zum einen fehlen isolierten Integrinrezeptoren wichtige Funktionen, wie etwa

die Möglichkeit zur Signaltransduktion oder auch die Möglichkeit andere Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen auszubilden. Darüber hinaus liegen unter physiologischen Bedingungen nur weniger als 10% der VLA4-Integrine in einem aktivierten Zustand vor.<sup>[195]</sup> Viele  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten, die selektiv für aktivierte Integrine sind, binden um Größenordnungen schlechter an nicht-aktivierte Integrine.<sup>[194]</sup> Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zelluläre Testsysteme verwendet, die auf eine Aktivierung der Integrine verzichteten. Allerdings sei noch angemerkt, daß auch den  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten, die selektiv an aktivierte Integrine binden, eine Rolle bei der Behandlung von Krankheiten zukommen kann.<sup>[364]</sup>

## 5.1.2 Biologische Evaluation von LDT-haltigen Cyclopeptiden

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Boer versucht, die Leitstruktur c(-Ala<sup>1</sup>-Leu<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup>-Thr<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-pro<sup>6</sup>-) zu optimieren.[286,361] Die biologische Evaluation der in dieser Arbeit synthetisierten Hexapeptidbibliothek lieferte die in Tabelle 5.1 und Abbildung 5.1 dargestellten Ergebnisse.

Die Substitution von Ala<sup>1</sup> durch Aminosäuren mit großen aromatischen Seitenketten, wie z.B. 2-Nal oder Bpa, führte zu Verbindungen (**10**, **11**), die effektiv die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1- und teilweise die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung inhibieren konnten. Auch bei der Verwendung konformativ fixierter Aminosäuren, wie es in Verbindung **15** durch Einbau des Tic-Bausteins verwirklicht war, blieb die biologische Wirkung erhalten. Dieses Ergebnis legte den Schluß nahe, daß die rezeptorgebundene Konformation von Phe<sup>1</sup> in Verbindung **19** c(F-L-D-T-D-p) jener von Tic sehr ähnlich sein muß. Diese Information war für das Design neuartiger  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten von großer Bedeutung.

Wie Verbindungen 12 und 17 zeigten, mußte es sich in Position 1 nicht notwendigerweise um eine Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette handeln. Ganz allgemein schienen lipophile und in etwas geringerem Ausmaß basische Gruppierungen in Position 1 vorteilhaft für die Inhibierung der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1 Wechselwirkung zu sein. Nur saure Gruppierungen führten, wie Boer *et al.* zeigen konnte, zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität.<sup>[361]</sup>

		Zelladhäsion [%]				
Struktur	Nr.	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1		
c(2Nal-L-D-T-D-p)	10	$19 \pm 6$	$30 \pm 9$	$41 \pm 6$		
c(Bpa-L-D-T-D-p)	11	$14 \pm 4$	$32 \pm 7$	$57 \pm 9$		
c(Cha-L-D-T-D-p)	12	$19 \pm 27$	$57 \pm 24$	n.d.		
c(Phg-L-D-T-D-p)	13a	$94 \pm 4$	93 ±17	$96 \pm 2$		
c(phg-L-D-T-D-p)	13b	$96 \pm 8$	n.d.	n.d.		
c(Chg-L-D-T-D-p)	14	$71 \pm 3$	$87 \pm 24$	$96 \pm 2$		
c(Tic-L-D-T-D-p)	15	$13 \pm 3$	n.d.	n.d.		
c(F-L-D-T-D-tic)	16	$27 \pm 21$	$16 \pm 16$	$59 \pm 30$		
c(K-L-D-T-2Nal-p)	17	$31 \pm 9$	$65 \pm 19$	$98 \pm 4$		
c(Phg-L-D-T-Phg-d)*	18a	$77 \pm 19$	$88 \pm 16$	$94 \pm 2$		
c(Phg-L-D-T-Phg-d)*	18b	$84 \pm 3$	n.d.	n.d.		
c(F-L-D-T-D-p)	19	$3 \pm 4$	$38 \pm 20$	$72 \pm 10$		

**Tabelle 5.1:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

\* während der Synthese trat Racemisierung auf, daher sind keine Aussagen über die Stereochemie von Phg möglich.



■ α4β7/MAdCAM-1 □ α4β7/VCAM-1 □ α4β1/VCAM-1

Abbildung 5.1: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Eine andere Art der räumlichen Fixierung von Aminosäure-Seitenketten war in den Verbindungen **13a** und **14** realisiert. Die Anknüpfung des Ringsystems direkt an das Peptid*backbone* führte jedoch zu inaktiven Verbindungen.

Alle getesteten Verbindungen wiesen eine deutliche Selektivität für das  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin auf. Die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung wurde nur geringfügig inhibiert. Möglicherweise kann die Selektivität der Verbindungen für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM– 1 dadurch gesteigert werden, daß die (-LDT-)-Sequenz *C*-terminal durch eine hydrophobe Aminosäure flankiert wird (**17**).

Diese Hypothese wird auch dadurch gestärkt, daß das FITC-markierte Cyclopeptid **24** nur die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung teilweise inhibieren konnte. (siehe Tabelle 5.2)

Im Rahmen der Leitstrukturoptimierung wurden auch cyclische Hexapeptide der allgemeinen Form (F-L-D-Xaa-D-p) synthetisiert. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 5.2 und in Abbildung 5.2 dargestellt.

**Tabelle 5.2:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

		Zelladhäsion [%]					
Struktur	Nr.	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt		
(F-L-D-F-D-p)	20	$59 \pm 29$	$93 \pm 9$	81 ± 15	$15 \pm 13$		
(F-L-D- <i>Phg</i> -D-p)*	<b>21</b> a	$38 \pm 24$	$89 \pm 2$	$80 \pm 21$	$13 \pm 8$		
(F-L-D- <i>Phg</i> -D-p)*	21b	$73 \pm 20$	$101 \pm 3$	$98 \pm 3$	$69 \pm 15$		
с(F-L- <i>βAS</i> -A-D-р)*	191a	$59 \pm 26$	$100 \pm 7$	$97\pm 6$	$47 \pm 18$		
с(F-L- <i>βAS</i> -A-D-р)*	191b	$82 \pm 2$	$102 \pm 7$	$96\pm 8$	$60 \pm 8$		
с(F-L- <i>βAS</i> -D-р)*	192	$95 \pm 11$	$97 \pm 5$	$98 \pm 5$	n.d.		
(F-L-D-T-K(PEG-FITC)-p)	24	$46 \pm 4$	$121 \pm 21$	$118 \pm 8$	n.d.		

\* während der Synthese trat Racemisierung auf, daher sind keine Aussagen über die Stereochemie möglich;

 $\beta$ -AS= 4-(1-Amino-2-carboxy-ethyl)-benzoesäure (167)

■ α4β7/MAdCAM-1 □ α4β7/VCAM-1 □ α4β1/VCAM-1

■ α4β7/MAdCAM-1 verdünnt



Abbildung 5.2: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie aus Tabelle 5.2 ersichtlich ist, konnte Thr<sup>4</sup> in **19** c(F-L-D-T-D-p) durch Phe bzw. Phg substituiert werden. Die Verbindungen 20 und 21a konnten in dem Standardtestsystem die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM–1-Wechselwirkung nur noch teilweise inhibieren. Zum eindeutigen Nachweis wurden sie daher nochmals mit einem empfindlicheren Testsystem evaluiert.

Die Stereochemie von Phg konnte in den Cyclopeptiden 404 nicht eindeutig geklärt werden, da während der Synthese Racemisierung auftrat. Es ist zu vermuten, daß die aktive Verbindung 21a L-Phg enthielt. Der Einbau einer D-Aminosäure an dieser Stelle hätte dazu geführt, daß die Seitenkette auf Grund der Konfiguration am  $C^{\alpha}$  auf der dem Integrinrezeptor "abgewandten" Seite des Antagonisten gelegen hätte.

Wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, wurde in Verbindung 19 c(F-L-D-T-D-p) die Asp-Thr-Dipeptideinheit durch 3-Amino-3-(4-carboxyl-phenyl)propionsäure substituiert. Allerdings wiesen die entsprechenden Verbindungen 191a und 191b nur noch eine sehr schwache biologische Aktivität auf. Verbindung 192 zeigte keinen biologischen Effekt mehr

Die FITC-markierte Verbindung 24 teilweise die α4β7konnte nur Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Möglicherweise hatte Lys in Position 4 einen ungünstigen Einfluß auf die biologische Aktivität, da auch Boer et al. bei der Verbindung c(F-L-D-T-K-p) keine biologische Aktivität mehr feststellen konnte.

## 5.1.3 Biologische Evaluation des Peptoid-scans

Im ersten Teil dieses Kapitels soll der Einfluß eines Peptoid-Bausteins auf die biologische Aktivität der Leitstruktur **19** c(F-L-D-T-D-p) diskutiert werden. Im zweiten Teil wird der Einfluß eines Peptoid-Bausteins auf die biologische Aktivität der linearen Verbindung **25** Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-Thr beschrieben.

**Tabelle 5.3:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

		Zelladhäsion [%]					
Struktur	Nr.	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt		
c(Nphe-L-D-T-D-p)	35	$19 \pm 10$	$60 \pm 28$	$97 \pm 6$	n.d.		
c(F-Nleu-D-T-D-p)	36	$102 \pm 5$	$86 \pm 13$	$101 \pm 10$	$108 \pm 25$		
c(F-L-Nasp-T-D-p)	37	$88 \pm 22$	$94 \pm 12$	n.d.	$116 \pm 23$		
c(F-L-D-Nval-D-p)	38	$98 \pm 20$	92 ± 19	$106 \pm 11$	$115 \pm 18$		



#### Abbildung 5.3: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie Tabelle 5.3 und Abbildung 5.3 zeigen, führte die Substitution einer Aminosäure innerhalb der Erkennungssequenz (-LDT-) durch den entsprechenden Peptoidbaustein zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität. Nur bei dem Ersatz von Phe<sup>1</sup> in der Leitstruktur **19** c(F-L-D-T-D-p) durch Nphe konnte die Verbindung **41** 

weiterhin die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkungen effizient inhibieren. Ein möglicher Grund für diesen Effekt ist, daß Phe<sup>1</sup> nicht Teil der Erkennungssequenz ist sondern nur einen positiven Effekt als "Haftgruppe" aufweist.<sup>[10]</sup> Wie strukturelle Untersuchungen zeigten, war darüber hinaus das Stickstoffatom von Phe<sup>1</sup> innerhalb des Peptidrückgrads von Verbindung **19** nicht an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt.<sup>[286]</sup> Die Verbindung **41** inhibierte in deutlich geringerem Maße auch die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung. Es bestand allerdings im Vergleich zu den homodeten Cyclopeptiden eine sehr hohe Selektivität für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine.

**Tabelle 5.4:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

		Zelladhäsion [%]					
Struktur	Nr.	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt		
H <sub>2</sub> N-F-L-D-T-OH	39	$98 \pm 0$	$66 \pm 8$	$100 \pm 2$	$115 \pm 1$		
H <sub>2</sub> N-Nphe-L-D-T-OH	40	$87 \pm 15$	$87 \pm 16$	$97\pm 6$	$72 \pm 21$		
Ichin-Nleu-D-T-OH	41	$110 \pm 17$	$97 \pm 13$	$95\pm3$	$116 \pm 40$		
Ichin-L-Nasp-T-OH	42	$108 \pm 4$	$96 \pm 3$	$99\pm7$	$128 \pm 12$		
Ichin-Nleu-Nasp-Nval-OH	44	$97 \pm 13$	$80 \pm 25$	$97 \pm 5$	$118 \pm 10$		



■ α4β7/MAdCAM-1 ■ α4β7/VCAM-1 ■ α4β1/VCAM-1 ■ α4β7/MAdCAM-1 verdünnt

Abbildung 5.4: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie Tabelle 5.4 zeigt, führte innerhalb der Verbindung **25** die Substitution einer Aminosäure durch den entsprechenden Peptoid-Baustein zu einem völligen Verlust an biologischer Aktivität. Im Gegensatz zur cyclischen Verbindung **41** besaß die lineare Verbindung **35** keine biologische Aktivität mehr. Dies stellte den aktivitätssteigernden Effekt der Cyclisierung von Peptiden eindrucksvoll unter Beweis.

Auch die Substitution der gesamten Erkennungssequenz durch die entsprechenden Peptoid-Bausteine führte zu einer inaktiven Verbindung (**39**). Nur die Verbindung **40** schien einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen zu haben. Allerdings muß dieser Befund noch mittels eines empfindlicheren Testsystems evaluiert werden.

### 5.1.4 Biologische Evaluation des Aza-scans

Im ersten Teil dieses Kapitels sollen die Auswirkungen auf die biologische Aktivität diskutiert werden, die sich aus dem Ersatz einer Aminosäure durch den entsprechenden Aza-Baustein in der Leitstruktur **19** c(F-L-D-T-D-p) ergaben. Im zweiten Teil wird der Einfluß eines Aza-Bausteins auf die biologische Aktivität der linearen Verbindung **25** Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-Thr dargestellt.

**Tabelle 5.5:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur	Nr.	Zelladhäsion [%]			
		α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt
c(azaPhe-L-D-T-D-p)	59	$25 \pm 1$	$58 \pm 7$	89 ± 5	$7\pm0$
c(F-azaLeu-D-T-D-p)	60	$87\pm9$	$88\pm9$	$100 \pm 8$	$100 \pm 23$
c(F-L-azaAsp-T-D-p)	61	$106 \pm 3$	$103 \pm 12$	$99 \pm 5$	$107 \pm 43$
c(F-L-D-azaVal -D-p)	62	$89 \pm 17$	n.d.	$102 \pm 8$	n.d.



Abbildung 5.5: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

In Übereinstimmung mit den anderen Daten, hat sich die Position 1 in der Leitstruktur **19** auch bei dem Aza-*scan* sehr tolerant gegenüber Modifikationen erwiesen. Wie Tabelle 5.5 zeigt, konnte Phe<sup>1</sup> nicht nur durch den entsprechenden Peptoid-Baustein, sondern auch durch den entsprechenden Aza-Baustein azaPhe ersetzt werden, ohne die inhibierende Wirkung auf die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung zu verlieren. Die Verbindung **59** war selektiv für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine. Sie hatte nur einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung.

**Tabelle 5.6:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur	Nr.	Zelladhäsion [%]			
		α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt
Ichin-azaPhe-L-D-T-OH	63	$130 \pm 5$	$104 \pm 8$	99 ± 1	n.d.
H-azaPhe-L-D-T-OH	64	$95 \pm 25$	$89\pm8$	$101 \pm 4$	$68 \pm 6$
Ichin-azaLeu-D-T-OH	65	$92 \pm 12$	$96 \pm 2$	$99\pm8$	$111 \pm 27$
Ichin-L-azaAsp-T-OH	66	$103 \pm 21$	$108 \pm 10$	$102 \pm 4$	$134 \pm 15$
Ichin-L-D-azaVal-OH	67	$131 \pm 27$	n.d.	n.d.	n.d.



Abbildung 5.6: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wurde in Verbindung 25 eine Aminosäure durch den entsprechenden Aza-Baustein ersetzt, so führte dies, wie Tabelle 5.6 zeigt, zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität. Selbst Verbindungen mit einem stark aromatischen *N*-Terminus wie etwa 64 und 63 waren biologisch inaktiv. Ein Vergleich der Verbindungen 64 und 59 zeigte erneut die aktivitätssteigernde Wirkung der Cyclisierung von Peptiden.

#### 5.1.5 Biologische Evaluation von reduzierten Verbindungen

Im ersten Teil dieses Kapitels soll der Einfluß einer schrittweisen Reduktion der Amidbindungen auf die biologische Aktivität der Leitstruktur **19** c(F-L-D-T-D-p) diskutiert werden. Im zweiten Teil wird der Einfluß der schrittweisen Reduktion der Amidbindung auf die biologische Aktivität der linearen Verbindung **25** Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-Thr beschrieben.

Wie Tabelle 5.7 und Abbildung 5.7 zu entnehmen ist, blieb bei der schrittweisen Reduktion einzelner Amidbindungen in der Leitstruktur **19** nur bei Verbindung **82** die biologische Aktivität zur Inhibierung der  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung erhalten. Somit war für die Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung die *C*-terminale Amidbindung innerhalb der LDT-Erkennungssequenz nicht essentiell. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung neuartiger Peptidmimetika (siehe 5.1.9, 5.1.12 und 5.1.13), die keine *C*-terminale Carboxylgruppe besaßen. Die Meßwerte deuteten auch darauf hin, daß Verbindung **82** nicht nur eine Selektivität gegenüber  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1, sondern auch gegenüber  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1 aufwies.

**Tabelle 5.7:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur	Nr.	Zelladhäsion [%]			
		α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt
c(F $\psi$ (CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-D-p)	79	$113 \pm 19$	$102 \pm 3$	$98 \pm 9$	$95 \pm 25$
c(F-L\u03c7(CH2NH)-D-T-D-p)	80	$106 \pm 7$	$100 \pm 5$	$98 \pm 0$	$91 \pm 23$
c(F-L-D\u03c9(CH2NH)-T-D-p)	81	$114 \pm 13$	$108 \pm 2$	$99 \pm 7$	$159 \pm 11$
c(F-L-D-Tų(CH <sub>2</sub> NH)-D-p)	82	$36 \pm 19$	$95 \pm 5$	$78 \pm 19$	$24 \pm 14$





Abbildung 5.7: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie in Kapitel 5.1.2, 5.1.3 und 5.1.4 gezeigt werden konnte, ist die Position 1 in Verbindung **19** sehr tolerant gegenüber verschiedenartigen Modifikationen. Allerdings wies Verbindung **79** keine biologische Aktivität auf. Da Phe<sup>1</sup> in der *i*+2 Position eines  $\beta$ II'*-turns* saß, schien die Reduktion der Amidbindung die Ausbildung der *turn*-Struktur zu stören. NMR-Untersuchungen zur eindeutigen Klärung dieses Ergebnisses sind gegenwärtig in Arbeit.
Der Verlust der biologischen Aktivität bei den anderen Verbindungen kann ebenfalls dadurch erklärt werden, daß die Struktur des cyclischen Peptids einerseits durch den Wegfall stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen und andererseits durch den Übergang einer planaren Amid-Gruppierung in sp<sup>3</sup> hybridisierte C- und N-Atome destabilisiert wurde.

**Tabelle 5.8:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

			Zelladhä	sion [%]	
Struktur		α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	α4β7/ MAdCAM-1 verdünnt
1-Naphthylw(CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-OH	83	86 ± 15	$97\pm8$	$102 \pm 6$	$182 \pm 3$
2-Naphthylw(CH <sub>2</sub> NH)-L-D-T-OH	84	$122 \pm 26$	$103 \pm 2$	$103 \pm 1$	$95 \pm 15$
Ichin-L <sub>\u03c0</sub> (CH <sub>2</sub> NH)-D-T-OH	85	$102 \pm 23$	$97 \pm 4$	$98 \pm 7$	$90 \pm 22$
Ichin-L-D <sub>\u03c0</sub> (CH <sub>2</sub> NH)-T-OH	86	$81 \pm 4$	$106 \pm 2$	$97 \pm 4$	$59 \pm 38$



 $\square \alpha 4\beta 7/MAdCAM-1 \square \alpha 4\beta 7/VCAM-1 \square \alpha 4\beta 1/VCAM-1 \square \alpha 4\beta 7/MAdCAM-1verdünnt$ 

## Abbildung 5.8: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Tabelle 5.8 und Abbildung 5.8 zeigen, daß die Reduktion einzelner Amidbindungen in Verbindung 25 zum völligen Verlust der biologischen Aktivität führte. Verbindung 84 unterstrich die Bedeutung der N-terminalen Amidgruppe.

# 5.1.6 Biologische Evaluation der N-terminalen Modifikationen

Für die in Kapitel 4.3.2 beschriebene Bibliothek wurden verschiedene Bausteine D eingesetzt. Die Ergebnisse der biologischen Evaluierung sind in Tabelle 5.9 und in Abbildung 5.9 dargestellt. Ferner sind darin auch die Ergebnisse für die Verbindungen aus Kapitel 4.4.1 aufgeführt.

**Tabelle 5.9:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur				Ĺ				ЮН	
Nr.	α4β7/ MAdCAN	α4β7/ 1 VCAM-	α4β1/ 1 VCAM-1	$\frac{\alpha 4\beta 7}{M \text{ verd.}}$	95	$92 \pm 6$	$84 \pm 9$	$94 \pm 7$	n.d.
				1					
96	119±1	$98 \pm 6$	n.d.	n.d.	97	$94 \pm 1$	90 ± 1	n.d.	n.d.
	NO <sub>2</sub> N		он N Н О ООН						
98	114 ±2	116 ±2	n.d.	n.d.	99	100 ±0	91 ± 2	n.d.	n.d.
			он N он H о Оон						Н
100	100 ±6	$107 \pm 1$	$96 \pm 4$	77 ± 1	101	$90 \pm 1$	103 ±4	$98 \pm 8$	n.d.
[				ЭН	Į				ЭН
102	$78 \pm 1$	$75 \pm 2$	n.d.	n.d.	103	$83 \pm 1$	88 ± 5	$99 \pm 3$	$48 \pm 2$



Abbildung 5.9: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie die Daten in Tabelle 5.9 zeigten, schien nur Verbindung **103** noch schwach die  $\alpha 4\beta7$ -Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren zu können. Alle anderen Modifikationen führten zum Verlust der biologischen Aktivität. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Tabelle 5.8 führten solche *N*-terminalen Modifikationen zu inaktiven Verbindungen, bei denen das aromatische System nicht über eine Amidbindung sondern über eine Methylen-Einheit bzw. direkt an den *N*-Terminus gebunden wurden. Wie Verbindung **97** darüber hinaus zeigte, mußte das *N*-terminale aromatische System noch eine bestimmte Orientierung aufweisen. Diese Orientierung war vermutlich in Verbindung **15** realisiert.

## 5.1.7 Biologische Evaluation linearer LDT-Sequenzen mit L-Modifikationen

Für die in Kapitel 4.3.2 beschriebene Bibliothek wurden verschiedene Bausteine C eingesetzt. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 5.10 und in Abbildung 5.10 dargestellt.

Die Position von Leu innerhalb der LDT-Mimetika war sehr invariant gegenüber Modifikationen. Alle durchgeführten Modifikationen an dieser Stelle führten zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität.

**Tabelle 5.10:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

		Str	uktur			
Nr.	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1		α4β1/ VCAM-1	α4) MAdCAN	37/ Л-1 verd
						о — он гон
107	unlöslich unlöslich u	unlöslich unlöslich	108	99 $\pm$ 21 107 $\pm$	12 n.d.	n.d.
[						он
109	$93 \pm 24 \qquad 101 \pm 2$	$105 \pm 9$ $137 \pm 41$	110	$114 \pm 5$ $90 \pm 7$	7 $101 \pm 3$	$146 \pm 17$
[			110			ЭН
111	$104 \pm 12   110 \pm 2  $	$98 \pm 5$ $158 \pm 29$	112	$109 \pm 6$ $93 \pm 1$	$0   105 \pm 3  $	$101 \pm 11$
			Ĺ			_он ↓он
113	$125 \pm 20$ $113 \pm 7$	$104 \pm 2$ n.d.	114	91 $\pm$ 10 79 $\pm$	8 85 ± 12	$96 \pm 21$
						он ОН
115	$114 \pm 13$ $109 \pm 6$	$103 \pm 3$ n.d.	116	$108 \pm 11$ 107 ±	6 102 ± 6	n.d.
		OH N OH COOH	Ę			_он ₩он
117	$101 \pm 6$ $109 \pm 1$	$101 \pm 4$ $85 \pm 38$	118	$81 \pm 11$ $82 \pm 1$	$1 88 \pm 6$	$78 \pm 4$



Abbildung 5.10: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

## 5.1.8 Biologische Evaluation linearer LDT-Sequenzen mit D-Modifikationen

Für die in Kapitel 4.3.2 beschriebene Bibliothek wurden verschiedene Asp-Mimetika (Baustein B) verwendet. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 5.11 und in Abbildung 5.11 wiedergegeben. Auch die Position von Asp innerhalb linearer LDT-Mimetika war invariant gegenüber Modifikationen. Alle durchgeführten Modifikationen an dieser Stelle führten zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität.

**Tabelle 5.11:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

	Stru	ktur		[		K Y O H H O H O H O H O H O H	Н
Nr.	α4β7/ MAdCAM-	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	119a	$145 \pm 14$	$106 \pm 3$	n.d.
	HOOC		4				,OH ↓OH 0
119b	$141 \pm 16$	$107 \pm 6$	91 ± 6	120a	$104 \pm 4$	$107 \pm 4$	$97\pm7$
			ОН ООН				он Он О
120b	$133 \pm 12$	$115 \pm 7$	$97 \pm 2$	121	93 ± 17	$97 \pm 2$	$100 \pm 5$



Abbildung 5.11: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

## 5.1.9 Biologische Evaluation linearer LDT-Sequenzen mit T-Modifikationen

Für die in Kapitel 4.3.2 beschriebene Bibliothek wurde eine große Anzahl an Thr-Mimetika (Baustein A) verwendet. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 5.12 dargestellt. Im Gegensatz zu den cyclischen Verbindungen 82 (Kapitel 5.1.5), 20 und 21a (beide Kapitel 5.1.2) wiesen die entsprechenden offenkettigen Modifikationen 122, 130 und 129a und 129b keine biologische Aktivität auf. Jedoch führte die Substitution von Thr durch Benzylamin (124) bzw. durch Anilin-Derivate (126b und 128b) zu Verbindungen, die die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1- und teilweise die α4β7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen inhibieren konnten. Aufgrund der starken Testschwankung war eine eindeutige Aussage hinsichtlich der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Selektivität von Verbindung 126b und 128b nicht möglich. Aus jenem Grund wurden die Verbindungen auch mit einem empfindlicheren Testsystem evaluiert, um die biologische Aktivität zu bestätigen. Verbindung 124 und 129a/b unterschieden sich nur durch eine C-terminale Carboxylgruppe. Allerdings konnte nur Verbindung 124 die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Ein lipophiler C-Terminus schien demzufolge einen positiven Effekt auf die biologische Aktivität zu haben. 127 wurde als Diastereomeren-Gemisch getestet, da eine Auftrennung der Verbindungen mittels HPLC nicht möglich war. Somit stellte der Meßwert einen Mittelwert aus den biologischen Aktivitäten der jeweiligen Diastereomeren dar.

				Zelladhä	sion [%]	
Struktur	Nr.		α4β7/ M-CAM	α4β7/ VCAM	α4β1/ VCAM	α4β7/ M-CAM verdünnt
	122		94 ± 20	100 ± 11	98 ± 7	77 ± 16
	123		87 ± 7	92 ± 5	109 ± 2	112 ± 33
	124		44 ± 21	67 ± 13	103 ± 1	$0 \pm 0$
	125a	R=H	$74 \pm 22$	$117 \pm 3$	$104 \pm 6$	n.d.
	125b	R=H	$43 \pm 12$	$79 \pm 14$	$102 \pm 7$	n.d.
l	126a	$R=2-CH_3$	92 ± 23	$116 \pm 9$	$103 \pm 7$	n.d.
	126b	R=2-CH <sub>3</sub>	$24 \pm 10$	92 ± 22	$101 \pm 3$	n.d.
N H O Z H COOH	127	R=3-CH <sub>3</sub>	$47 \pm 7$	$86 \pm 10$	$89 \pm 19$	$86 \pm 25$
	128a	R=4-CH <sub>3</sub>	53 ± 24	$93 \pm 18$	$101 \pm 6$	$22 \pm 8$
	128b	R=4-CH <sub>3</sub>	$26 \pm 7$	$51 \pm 37$	98 ± 13	$25 \pm 19$
	129a	*****	$127 \pm 7$	110 ± 8	$102 \pm 2$	91 ± 11
	129b		75 ± 14	$87 \pm 3$	82 ± 3	n.d.
	130		aus- gefallen	aus- gefallen	aus- gefallen	aus- gefallen

**Tabelle 5.12:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).



Abbildung 5.12: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

## 5.1.10 Biologische Evaluation von thiazolhaltigen LDT-Mimetika

Wie die Ergebnisse aus der Optimierungsarbeit des Cyclopeptids (A-L-D-T-A-p) und Daten aus der Literatur zeigten, sollte ein aromatisches System am *N*-Terminus der linearen LDT-Sequenz zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führen.<sup>[271,286]</sup> Allerdings waren alle Verbindungen der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Thiazolbibliothek inaktiv (siehe Tabelle 5.13). In Übereinstimmung mit den Testergebnissen der Verbindungen **98**, **99** und **100** (siehe Abschnitt 5.1.6) führten aromatische Systeme, die nicht über eine Amidbindung sondern direkt an den *N*-Terminus gebunden waren, zu biologisch inaktiven Verbindungen. Wie auch Verbindung **97** zeigte, schien die daraus resultierende räumliche Anordnung des aromatischen Systems eine wichtige Rolle zu spielen.

**Tabelle 5.13:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

	Struktur				он н о оон
<b>Nr.</b> $\alpha 4\beta 7/M$	AdCAM-1	α4β7/VCAM-1	135	$96 \pm 8$	n.d.
			O <sub>2</sub> N-		о ОН И ОН СООН
136	$97 \pm 44$	n.d.	137	$135 \pm 4$	$135 \pm 36$
					ОН ОН ОН
138	$130 \pm 8$	n.d.	139	$138 \pm 1$	n.d.
		о ОН Н ОН ССООН	$\bigcirc$		
140	$87 \pm 7$	n.d.	141	$89 \pm 2$	$100 \pm 37$

■ α4β7/MAdCAM-1 ■ α4β7/MAdCAM-1 verdünnt



Abbildung 5.13: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

# 5.1.11 Biologische Evaluation von LDT-Mimetika mit *N*-terminalem Nitrophenylscaffold

Die in Kapitel 4.4.3 beschriebene Bibliothek enthielt verschieden substituierte Nitrophenyl-*scaffolds*. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 5.14 und in Abbildung 5.14 dargestellt.

**Tabelle 5.14:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur					H			I	
Nr.	α4β7/ MAdCAN	α4β7/ Δ VCAM-	α4β1/ -1 VCAM-	α4β7/ -1 Μ	142	$145 \pm 17$	$161 \pm 15$	$140 \pm 3$	n.d.
ĺ	O <sub>2</sub> N N H			DH					
143	$100 \pm 16$	$122 \pm 15$	118 ± 2	n.d.	144	$125 \pm 10$	$142 \pm 8$	$132 \pm 6$	n.d.
	NH NO <sub>2</sub>		о у он н он соон	4					ł
145	18 ± 5	64 ± 19	$32 \pm 10$	n.d.	146	41 ± 6	62 ± 9	$114 \pm 4$	$13 \pm 2$
			о ОН Н ОН ССООН		н				ОН
147	55 ± 7	$109 \pm 2$	$121 \pm 2$	$20 \pm 10$	148	72 ± 1	n.d.	$123 \pm 4$	$25 \pm 7$
нс				ОН	Н				ЭH
149	$79 \pm 30$	$102 \pm 10$	$122 \pm 1$	$38 \pm 8$	150	48 ± 11	106 ± 8	$123 \pm 10$	n.d.



Abbildung 5.14: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Wie die Verbindungen 142 und 144 zeigten, war es nicht möglich, Leu durch entsprechend substituierte Amino-nitrobenzoesäure-Derivate zu ersetzen. Wie schon in Abschnitt 5.1.6 gezeigt, war auch das Substitutionsmuster am *N*-Terminus sehr wichtig. Ein Vergleich von Verbindung 143 mit 145 bzw. von 146 mit 148 zeigte, daß nur bei einem 2,5 Substitutionsmuster die biologische Aktivität erhalten blieb. Verbindungen 148 und 149 wiesen erst in einem empfindlicheren Testsystem eine biologische Aktivität auf. Interessanterweise wurde mit 145 eine Verbindung gefunden, die sowohl  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1- als auch  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen effektiv inhibieren konnte. Im Vergleich dazu, konnte Verbindung 146, obwohl nur geringe Modifikationen durchgeführt wurden, die  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen nicht mehr inhibieren. Unter Berücksichtigung der Teststreuung schien Verbindung 145 eine höhere Aktivität als 146 und 147 zu besitzen.

# 5.1.12 Biologische Evaluation von Verbindungen mit einer 3-Amino-3-arylpropionsäure-Struktureinheit

Die in Kapitel 4.5.1 beschriebene Substitution der Asp-Thr-Dipeptideinheit durch 3-Amino-3-arylpropionsäure-Derivate führte zu Verbindungen, die sowohl die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1- als auch die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung in gleichem Maße inhibieren konnten (siehe Tabelle 5.15). Im Vergleich zu den bisher evaluierten Verbindungen wies diese Substanzklasse somit eine deutlich geringere Selektivität auf. Interessanterweise führten beide Diastereomere einer Verbindung zu einem biologischen Effekt. Jedoch war eines dieser Isomere deutlich aktiver. In Tabelle 5.15 spiegelt die Reihenfolge der Diastereomere einer Verbindung deren Retentionszeit in der HPLC wieder. Die zuerst genannte Substanz wies eine kürzere Retentionszeit auf. Am C-Terminus übte das Substitutionsmuster des Phenylrings nur einen geringen Effekt auf die biologische Aktivität auf. Es traten allerdings zwei Ausnahmen auf. Verbindung 173a und 182b wiesen eine deutliche Selektivität für die  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung auf. Zur eindeutigen Klärung dieser Eigenschaft müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Die untersuchten Substanzen konnten in dem verwendeten Testsystem die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung nicht inhibieren.

Eine Verkürzung der Carbonsäurekette um eine Methyleneinheit (**183 a/b**) führte zu einem völligen Verlust der biologischen Aktivität.

Die Substitution des Phenylrings am *C*-Terminus durch einen Benzylrest bei gleichzeitiger Verkürzung der Carbonsäurekette um eine Methyleneinheit führte zu einer Verbindung (**184**), die unter den Testbedingungen nicht mehr löslich war.

~		-	Zelladhäsion [%]			
Struktur	Nr.	R	α4β7/ MAdCAM-1	α4β7/ VCAM-1	α4β1/ VCAM-1	
	173a	R=H	21 ±2	80 ± 23	99 ± 3	
	173b	R=H	$26 \pm 9$	$37 \pm 20$	$80 \pm 27$	
	174a	$R=2-CH_3$	$60 \pm 26$	$79 \pm 21$	n.d.	
	174b	$R=2-CH_3$	$19 \pm 4$	$27 \pm 6$	n.d.	
	175a	R=3-CH <sub>3</sub>	$44 \pm 1$	$66 \pm 15$	n.d.	
	175b	R=3-CH <sub>3</sub>	$15 \pm 5$	$12 \pm 4$	n.d.	
	176a	$R=4-CH_3$	$47\pm8$	$65 \pm 5$	n.d.	
	176b	R=4-CH <sub>3</sub>	$18 \pm 11$	$35 \pm 11$	n.d.	
	177a	$R=4-C_2H_5$	$49 \pm 11$	$42 \pm 21$	n.d.	
	177b	$R=4-C_2H_5$	$17 \pm 9$	$19 \pm 14$	n.d.	
Соон	179a	$R=2-NO_2$	$31 \pm 1$	n.d.	n.d.	
	179b	$R=2-NO_2$	$23 \pm 7$	$42 \pm 22$	n.d.	
	180a	$R=3-NO_2$	$9\pm 6$	$16 \pm 5$	n.d.	
	180b	$R=3-NO_2$	n.d.	n.d.	n.d.	
	181a	R=4-NO <sub>2</sub>	$72 \pm 22$	$73 \pm 14$	n.d.	
	181b	R=4-NO <sub>2</sub>	$20\pm 8$	$13 \pm 10$	n.d.	
	182a	R=4-COOH	$65 \pm 10$	$88 \pm 3$	86 ± 15	
	182b	R=4-COOH	$23 \pm 4$	$96 \pm 7$	$78 \pm 25$	
	183a	R=H	84 ± 13	$107 \pm 5$	87 ± 0	
	183b	R=H	104 ± 9	$113 \pm 10$	$105 \pm 2$	
	184	R=H		ausgefallen		

**Tabelle 5.15:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).



Abbildung 5.15: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

# 5.1.13 Biologische Evaluation von modifizierten Verbindungen mit einer 3-Amino-3-arylpropionsäure-Struktureinheit

Die biologische Testung jener Verbindungen, die aus der Leitstrukturoptimierung (siehe Kapitel 4.5.2) hervorgegangen waren, führten zu den in Tabelle 5.16 und in Abbildung 5.16 dargestellten Ergebnissen. Die konformative Fixierung des Phenylrings von Verbindung 173 durch Verbrückung bewirkte eine deutliche Reduktion der biologischen Aktivität (185). Nur in einem empfindlicheren Testsystem konnte Verbindung 185 noch teilweise die α4β7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Verbindungen 189 und 190, die ebenfalls eine Cterminale 2-(1,2,3,4-Tetrahydro-1-isochinolin)-essigsäure enthielten, wiesen keine biologische Aktivität mehr auf. Die Substitution von Leu in Verbindung 176 a/b durch den entsprechenden Peptoid-Baustein führte ebenfalls zu einer biologisch inaktiven Verbindung (188). Wurde in 176 a/b Leu durch den entsprechenden Aza-Baustein substituiert, so konnte Verbindung 187 noch in geringem Ausmaß die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. getestet, d.h. der gemessene Wert repräsentierte einen Mittelwert. Wie in Abschnitt 5.1.12 gezeigt, konnten die dort getesteten Diastereomere unterschiedlich stark die α4β7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Möglicherweise besaßen daher bei den getesteten Verbindungen die einzelnen Isomere unterschiedliche biologische Aktivitäten. Zur weiteren Klärung müssen die Isomere getrennt voneinander evaluiert werden.

**Tabelle 5.16:** Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden. Die Meßwerte sind auf die Adhäsion von Zellen bezogen, die nicht mit einem Antagonisten vorinkubiert wurden (entspricht 100 % Zelladhäsion).

Struktur									
Ň	Ir.	α4β7/ΜΑ	dCAM-1	α4β7/V	CAM-1	α4β1/V	CAM-1	α4β7/MA ve	dCAM-1 rd
								СООН	
185	106±11	76±30	93±16	60±11	186a	10±4	41±0	71±14	16±7
2010030100000101010101010101010			СООН	ł				СООН	
186b	11±3	18±6	19±5	29±11	187	65±14	102±22	107±6	49±34
			Соон					СООН	
188	100±11	114±2	111±1	105±11	189	110±7	99±1	105±2	77±48
			П СООН					СООН	
190	83±27	111±5	110±2	125±5	199	64±2	91±27	79±24	53±8



## Abbildung 5.16: Inhibierung der Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden.

Verbindungen 185, 187, 199, 188, 189 und 190 wurden als Isomeren-Gemische Wurde in Verbindung 187 das *C*-terminale Stickstoff-Atom durch eine Methylengruppe ersetzt, so konnte Verbindung 199 die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung teilweise inhibieren. Verbindung 199 wurde als Enantiomerengemisch getestet. Daher müssen zur weiteren Klärung die einzelnen Enantiomere getrennt voneinander in den entsprechenden biologischen Testsystemen evaluiert werden.

Die Reduktion der *C*-terminalen Amidbindung von **176 a/b** führte zu den Verbindungen **186a** und **186b**. **186a** konnte die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung vollständig und die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung teilweise inhibieren. Unter den Testbedingungen konnte **186a** die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung nicht inhibieren. Demgegenüber wies das andere Diastereomer **186b** keine Selektivität bzgl. der verwendeten Testsysteme auf. **186b** konnte sowohl  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-,  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1- als auch die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung inhibieren.

# 5.2 Zusammenfassung der Testergebnisse

## 5.2.1 Die Vorgehensweise im Überblick

Die biologische Evaluation der in paralleler Festphasensynthese hergestellten Verbindungen lieferte wichtige Informationen über die strukturelle Beschaffenheit von  $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten.

In Abbildung 5.17 ist dargestellt, wie die Ergebnisse aus der biologischen Evaluation in die Entwicklung neuartiger  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten eingeflossen sind. Die essentiellen Strukturmerkmale der Ausgangsverbindung **15** werden durch schwarze Striche repräsentiert. Modifikationen sind grau dargestellt.



**Abbildung 5.17:** Überlagernde Darstellung einiger biologisch aktiver Verbindungen (Modifikationen sind grau gezeichnet) und ihr Einfluß auf das Design neuartiger  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten.

Mit Verbindung **15** wurde eine rigide Verbindung gefunden, die sich hervorragend als Modell für die weitere Entwicklung von hochaktiven und selektiven  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten eignet. Sie vereinigt viele Struktureinheiten, die sich in Einzelverbindungen als vorteilhaft für die biologische Wirksamkeit erwiesen haben. So enthält Verbindung **15** immanent an Position 1 den Peptoid-Baustein Nphe (in Abbildung 5.17 schwarz eingezeichnet). Die entsprechende Verbindung **41**, die anstelle von Tic Nphe enthält, inhibierte die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung.

Die Substitution von Tic in Verbindung 15 durch den entsprechenden Aza-Baustein azaPhe führte zu Verbindung 59, die ebenfalls die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-

Wechselwirkung effektiv inhibieren konnte. Verbindungen **41** und **59** waren selektiv für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine. Ferner stellten diese Verbindungen die aktivitätssteigernde Wirkung der Cyclisierung von Peptiden unter Beweis, da die entsprechenden linearen Verbindungen in den verwendeten Testsystemen keine biologische Aktivität zeigten.

In Verbindung **15** ist die optimale Anordnung des aromatischen Systems konformativ fixiert. Abweichende räumliche Orientierungen des aromatischen Systems, wie sie etwa bei Verbindung **21** bis **36**, **98**, **99**, **100** und **97** vorlagen, führten zu einem Verlust der biologischen Aktivität. Verbindungen **143** und **145** bewiesen, daß auch das Substitutionsmuster an dem aromatischen System einen großen Einfluß auf die biologische Wirksamkeit hatte.

Wie Verbindung **82** zeigte, war in Cyclopeptiden vom Typ c(F-L-D-T-D-p) die Amidbindung zwischen Thr<sup>4</sup> und Asp<sup>5</sup> nicht essentiell. Darüber hinaus konnte Thr<sup>4</sup> durch Phe bzw. Phg substituiert werden (**20** und **21a**). Übertrug man diese Informationen auf die entsprechende lineare Sequenz, so ergab sich Verbindung **124** 



**Abbildung 5.18:** Systematischer Übergang von einem Cyclopeptid zu einem 'small molecule'.

Schrittweises "Verschieben" des Phenylrings in Verbindung 124 entlang des Peptidbackbones in Richtung des *N*-Terminus führte zu Verbindung 126 und 173

(siehe Abbildung 5.18). Bei allen Verbindungen blieb dabei die biologische Aktivität erhalten.

Der Versuch, die verbliebenen Amidbindungen aus Molekül **173** zu entfernen, lieferte Verbindung **186** (siehe Abbildung 5.17). Die vorliegenden Testergebnisse zeigten, daß ein Diastereomer von **186** sowohl  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-,  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1- als auch  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen inhibieren konnte. Demgegenüber besaß das andere Diastereomer **186a** eine gewisse Selektivität für die Inhibierung der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkunge. **186a** konnte die  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen nicht inhibieren. Die IC<sub>50</sub>-Werte einiger Verbindungen sind in Tabelle 5.17 zusammengefaßt.

**Tabelle 5.17:** *Inhibierungsverhalten der LDT-Mimetika hinsichtlich der Bindung von* 38C13β7-Zellen an MAdCAM-1.

Verbindung	Struktur	IC <sub>50</sub> [μM]
12	c(Cha-L-D-T-D-p)	31 ± 9
15	c(Tic-L-D-T-D-p)	$219 \pm 4$
17	c(K-L-D-T-2Nal-p)	$218\pm109$
20	c(F-L-D-F-D-p)	$206 \pm 76$
21a	c(F-L-D-Phg-D-p)	$443 \pm 4$
41	c(Nphe-L-D-T-D-p)	n.d.
59	c(azaPhe-L-D-T-D-p)	$61 \pm 21$
82	c(F-L-D-T\u00c7(CH2NH)D-p)	$137 \pm 48$
128		n.d.
145	$ \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	285 ± 38
176a 176b	COOH	n.d. n.d.
186a 186b	COOH	$1402 \pm 267$ n.d.

Bei der biologischen Evaluierung sind zwei Verbindungen **145** bzw. **186b** aufgefallen, die neben der  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1- auch  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1- bzw.  $\alpha 4\beta$ 1-Integrin/VCAM-1- und  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/VCAM-1-Wechselwirkungen inhibieren konnten. Integrinantagonisten mit unterschiedlichen Selektivitäten eignen sich hervorragend, um die einzelnen Beiträge der verschiedenen  $\alpha$ 4-Integrine im Krankheitsgeschehen zu untersuchen.

Die Vorgehensweise zur Entwicklung niedermolekularer  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten ist schematisch in Abbildung 5.19 dargestellt.

Vorgehensweise	Struktur	Besonderheit	Lit.
Identifizierung der Bindungssequenz	RG- <b>L-D-T-</b> SL ↓↓		[232, 233]
Cyclisierung, Ala- Scan und 'spatial screening'	c(A-L-D-T-A-p) ↓	α4β7 selektiv	[286]
Optimierung	c(Tic-L-D-T-D-p) ↓	α4β7 selektiv, erhöhte Aktivität	[286]
	c(azaPhe-L-D-T-D-p)		
Aza- und Peptoid-Scan	c(Nphe-L-D-T-D-p)	α4β7 selektiv, erhöhte Aktivität	
Modifikationen	c(F-L-D-Phg-D-p) ↓	α4β7 selektiv, verringerte Aktivität	
Lineare Peptidmimetika		erfüllen <i>Pfizer's</i> rule of five	
Nichtpeptid		erfüllen <i>Pfizer's</i> rule of five	

**Abbildung 5.19:** Schematische Vorgehensweise bei dem Design von  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten. Die Verbindungen **126b** und **128b** (H-Donor: 4; H-Akzeptor: 5; MW= 490.6 g/mol; LogP 2.55), **173a** (H-Donor: 3; H-Akzeptor: 4; MW= 433.5 g/mol; LogP 3.11) und **186** (H-Donor: 3; H-Akzeptor: 3; MW= 433.5 g/mol; LogP 4.19) erfüllen alle die *Pfizer's rule of five* und inhibieren die  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung. Sie stellen somit äußerst vielversprechende Verbindungen zur Entwicklung von Arzneimitteln dar. Durch *in-vivo* Tests müssen diese Verbindungen nun ihre Wirksamkeit am lebenden Organismus unter Beweis stellen. Durch geeignete Substituenten an den *C*- und *N*-terminalen aromatischen Systemen können diese Verbindungen im Hinblick auf das mehrdimensionale Design eines Arzneistoffs noch optimiert werden.

#### 5.2.2 Vergleich mit RGD-Mimetika

Verbindungen **187** und **199** konnten nur in geringem Maße die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Dieses Ergebnis ist aber dahingehend sehr interessant, daß diese Verbindungen jenen RGD-Mimetika sehr ähnlich sind, die in unserem Arbeitskreis für die Tumortherapie entwickelt werden.[273]



**Abbildung 5.20:** Vergleich von  $\alpha 4\beta 7$ - und  $\alpha v\beta 3$ -Integrinantagonisten.

Wie Abbildung 5.20 zeigt, weisen beide Integrinantagonisten eine sehr ähnliche Struktur auf. Ihnen ist gemeinsam, daß eine Aminosäure innerhalb der Erkennungssequenz durch den entsprechenden Aza-Baustein ersetzt werden kann. Die strukturelle Ähnlichkeit wird auch dadurch unterstrichen, daß *C*-terminal in beiden Fällen sowohl eine  $\beta$ -Aminosäure als auch ein Glutarsäure-Derivat eingebaut werden kann. Die starken Unterschiede in ihren biologischen Aktivitäten können sich aus den unterschiedlichen biologischen Testsystemen ergeben. Die LDT-Mimetika wurden als Enantiomerengemisch mit einem zellulären Testsystem ohne Mn<sup>2+</sup>-Aktivierung evaluiert, während die RGD-Mimetika mit einem Rezeptortest getestet wurden. Ferner stellen die Integrin-Rezeptoren unterschiedliche strukturelle Anforderungen an ihre Liganden. Bei dem *spatial screening* LDT-enthaltender Cyclopeptide konnten nur die Hexacyclen c(L-D-T-A-p-A) und eingeschränkt c(L-D-T-A-A-p) die  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren. Die entsprechenden Pentacyclen waren inaktiv.[286]

Bei der Inhibierung der Bindung von Fibrinogen an das isolierte  $\alpha v\beta$ 3-Integrin hingegen, wiesen die Pentacyclen c(R-G-D-f-V) und c(R-G-D-F-v) die höchste Aktivität auf. Die Aktivitäten der cyclischen Hexapeptide c(R-G-D-F-Xaa-xaa), c(R-G-D-F-p-Xaa) und c(R-G-D-f-Xaa-A) entsprachen ungefähr der linearen GRGDSPK-Sequenz.[365]

# 5.3 Etablierung eines zellulären on-bead assays

## 5.3.1 Synthesestrategie

Mit der Parallelsynthese der LDT-Mimetika war es gelungen, selektive Liganden für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine zu finden. Durch die rationale Vorgehensweise war es zudem möglich, Informationen über die strukturellen Eigenschaften der pharmakophoren Gruppen zu erhalten. Damit wurden die Grundlagen für das Design einer *biased library* gelegt. Die biologische Evaluation einer Bibliothek erfordert jedoch ein Testsystem mit einem hohen Durchsatz (*high throughput screening*). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein zellulärer *on-bead assay* entwickelt.



**Abbildung 5.21:** An TentaGel-Macrobeads-gebundene LDT-Mimetika zur Etablierung des zellulären on-bead-Testsystems.

Die Verbindungen 200, 202 und 203 wurden als immobilisierte Referenzverbindungen getrennt an mit Photolinker belegten TentaGel-Macrobeads aufgebaut (siehe Abbildung 5.21). Verbindung 200 entspricht der literaturbekannten Verbindung 25.<sup>[271]</sup> Verbindung 202 unterscheidet sich von 200 nur durch den Einbau eines zusätzlichen Alanins als Spacer. Dadurch soll ein eventuell störender Einfluß des Photolinkers vermieden werden. Verbindung 203 enthält eine 3-Amino-3arylpropionsäure-Struktureinheit als Dipeptidmimetikum. Vertreter diese Substanzklasse haben sich in Kapitel 5.1.12 als vielversprechende  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten erwiesen. Als Negativkontrolle diente die Zufallssequenz 201. Die photolytische Probeabspaltung und anschließende LC-MS-Analyse ergab, daß alle Verbindungen in hoher Reinheit auf dem Harz vorlagen.

Die TentaGel-Macrobeads stellten sowohl für die Festphasensynthese als auch für das anschließende *on-bead screening* den optimale Träger dar. TentaGel besitzt als Polyethylenglycol-Polystyrol-Propfpolymer in nahezu allen gängigen organischen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften. Es lassen sich eine Vielzahl organischer Reaktionen an diesem Harz durchführen. Im Gegensatz zu den meisten anderen polymeren Trägern, weist TentaGel auch in wäßrigen Lösungen noch gute Quelleigenschaften auf. Dies ist besonders für die Durchführung der biologischen Tests sehr wichtig, da diese nahezu ausschließlich in wäßrigen Pufferlösungen erfolgen. Ferner sind TentaGel-Macrobeads in verschiedenen Größen kommerziell erhältlich. Für die Durchführung eines zellulären *on-bead screenings* müssen relativ große *beads* verwendet werden, so daß eine ausreichend große Zahl Zellen an diese *beads* adhärieren können. Außerdem müssen die Harzkügelchen auch groß genug sein, um sie mit einer Pasteur bzw. Mikropipette transferieren zu können.

Die Verwendung von Macrobeads erfordert allerdings längere Reaktionszeiten, da die Reagenzien bei der Diffusion in das Partikelinnere eine längere Strecke zurücklegen müssen. Auch sind im Vergleich zu herkömmlichen *beads* längere und mehrere Waschschritte nötig, um die Reagenzien wieder aus dem Macrobead zu entfernen. Es gilt, mechanische Einwirkungen und rasches Quellen bzw. Schrumpfen der Macrobeads zu vermeiden, da ansonsten aufgrund der Scherkräfte ein Zerbrechen der *beads* eintritt.<sup>[366]</sup>

Die Verwendung eines Photolinkers zum Aufbau der LDT-Mimetika an fester Phase ermöglicht den Einsatz vielfältigster Reaktionsbedingungen, ohne daß eine Abspaltung der Verbindung vom Harz eintritt. Der Linker erlaubt sowohl basische als auch saure Schutzgruppenabspaltungen. Die Verbindungen können somit am Harz vollständig entschützt und dem *on-bead screening* zugänglich gemacht werden. Die Abspaltung der harzgebundenen Verbindungen z.B. zur Reaktionskontrolle bzw. Identifizierung erfolgt mit Licht der Wellenlänge 360 nm.<sup>[367,368]</sup> Der Abspaltmechanismus ist in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.22:** Mechanismus der Photolyse. Wasserstoffabstraktion durch die angeregte Nitrogruppe. Entstandenes Biradikal lagert via Aci-Nitro-Form in das Nitroso-Derivat um. Entstandenes Halbaminal zerfällt unter Freisetzung des Carbonsäureamids.<sup>[369]</sup>

#### 5.3.2 Biologische Evaluation

Die allgemeine Vorgehensweise bei der biologischen Evaluation der LDT-Mimetika mittels eines zellulären *on-bead* Testsystems ist in Abbildung 5.23 schematisch dargestellt.



Abbildung 5.23: Prinzip des zellulären on-bead Testsystems.

Zunächst wurden die vollständig entschützten, harzgebundenen LDT-Mimetika getrennt voneinander mit den entsprechenden 38C13 $\beta$ 7-Lymphomazellen ( $\alpha 4\beta7^{\text{pos}}$ ,  $\alpha 4\beta1^{\text{neg}}$ ) bzw. den Jurkat-Zellen ( $\alpha 4\beta7^{\text{neg}}$ ,  $\alpha 4\beta1^{\text{pos}}$ ) in einer Einwegspritze inkubiert. Anschließend wurde die Zell-*bead*-Suspensionen vorsichtig in eine Petri-Schale überführt und unter einem Mikroskop analysiert. Zur Identifizierung der harzgebundenen Substanz konnten mit einer Pipette einige dieser *beads* wieder

aufgenommen und in einer Einwegspritze mit Puffer/1 M EDTA gewaschen werden. Die auf diese Weise von den Zellen befreiten *beads* wurden mit UV-Licht bestrahlt und die Verbindungen per LC-MS charakterisiert.

Für den zuverlässigen Einsatz dieses *on-bead* Testsystems mußten einige Parameter optimiert werden. Einwegspritzen mit handelsüblichen Polypropylen-Fritten erwiesen sich als optimale Inkubationsgefäße. Die Poren der Polypropylen-Fritten waren ausreichend groß, so daß die Zell-Lösung unversehrt in die Spritze aufgezogen werden konnte. Auch die Art der Inkubation erwies sich als äußerst wichtig. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, indem die *beads* über die Zellen hinweg rollten. Dazu wurden die Spritzen in horizontaler Lage entlang ihrer Längsachse gedreht. Gute Resultate ergaben sich mit 5\*10<sup>6</sup> 38C13β7-Lymphomazellen pro 10 mg Harz in 1 mL Puffer-Lösung.

Für eindeutige Ergebnisse mußten die Zellen mit 1 nM  $Mn^{2+}$  aktiviert werden. Ohne diese Aktivierung binden nur wenige Zellen an die *beads*, so daß die Analyse unter dem Mikroskop erschwert war (Abbildung 5.24).



**Abbildung 5.24:** Ergebnisse des on-bead Tests mit  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin exprimierenden 38C13 $\beta$ 7-Zellen ohne Integrinaktivierung. Nur sehr wenige Zellen adhärieren an die Referenzverbindungen.

Wie die mikroskopische Analyse der *beads* zeigte (Abbildung 5.25), adhärierten die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin exprimierenden Zellen besonders gut an die Verbindungen **200** und **202**. Die Zellen bildeten einen lückenlosen Saum um die *beads*. Allerdings konnte keine nennenswerte Adhäsion an die Verbindung **203** beobachtet werden, obwohl die entsprechende Verbindungen **182** a/b in den Zelladhäsionsassays eine starke bis

moderate biologische Aktivität aufwiesen (siehe Kapitel 5.1.12). Möglicherweise ist bei **203** die Anknüpfung an die feste Phase über den Phenylring ungeeignet, da dieser eine bestimmte Orientierung bei der Bindung an die Integrine einnehmen muß (vgl. Abbildung 5.18). Bei einer 3:1 Mischung aus **201** und **200** ("Mix") konnte schon bei geringer Vergrößerung ein deutlicher Unterschied zwischen "leeren" *beads* und vollständig mit Zellen umhüllten *beads* beobachtet werden. Bei allen Versuchen fand keine Adhäsion an die Zufallssequenz **201** statt.



**Abbildung 5.25:** Ergebnisse des on-bead screenings mit  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin exprimierenden Zellen und Integrinaktivierung (1 nM  $Mn^{2+}$ ). Damit die adhärierten 38C13 $\beta$ 7-Zellen auf den Bildern besser sichtbar sind, stellen die Bilder nur Ausschnitte aus den mikroskopischen Aufnahmen dar.

Die Aktivierung der  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine mit 1 nM Mn<sup>2+</sup> war ausreichend, damit auch Jurkat-Zellen an Verbindung **200**, **202** und **203** adhärierten (siehe Abbildung 5.26). Es bildete sich jedoch kein geschlossener Zellsaum aus, sondern auf den *beads* gab es Bereiche, die nicht mit Zellen bedeckt waren. Interessanterweise adhärierten Jurkat-Zellen im Gegensatz zu  $\beta$ 7-Zellen an die Verbindung **203**. In einem

Zelladhäsionsassay ohne  $Mn^{2+}$ -Aktivierung konnte gezeigt werden, daß Verbindung **182b** ein Ligand für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrine nicht aber für  $\alpha 4\beta$ 1-Integrine ist (siehe Tabelle 5.15). In allen Fällen konnte keine Zelladhäsion an die Zufallssequenz **201** festgestellt werden.



**Abbildung 5.26:** Ergebnisse des on-bead screenings mit  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin exprimierenden Jurkat-Zellen und Integrinaktivierung (1 nM Mn<sup>2+</sup>). Damit die adhärierten Zellen auf den Bildern besser sichtbar sind, stellen die Bilder nur Ausschnitte aus den mikroskopischen Aufnahmen dar.

# 5.4 Massenspektrometrische Analyse

Soll ein *on-bead screening* durchgeführt werden, so muß auch eine eindeutige Charakterisierung der harzgebundenen Substanz gewährleistet sein. Mit HPLC-MS steht eine äußerst empfindliche Methode zur Verfügung, um die nach der biologischen Evaluation vom Harz abgespaltenen Verbindungen auf ihre Reinheit und Molekülmasse hin zu untersuchen. Moleküle mit gleicher Molekülmasse lassen sich durch MS/MS unterscheiden. Um bei nicht-peptidischen Bibliotheken eine eindeutige Strukturbestimmung zu machen, ist oftmals eine Codierung der Verbindungen nötig.

## 5.4.1 Peptid-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie lassen sich Peptide sequenzieren bzw. es lassen sich auch nicht sequenzierbare Bestandteile von Peptiden bestimmen.[370,371] Abbildung 5.27 zeigt die am häufigsten auftretenden Fragmentionen protonierter Peptide. Die Bezeichnung der einzelnen Fragmente folgt der von Roepstorff und Fohlman vorgeschlagenen Nomenklatur.[372]



**Abbildung 5.27:** 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).

Am häufigsten fragmentieren Peptide nach C" und Y". Bei schonenden Ionisierungsquellen wie FAB und ESI<sup>[373]</sup> entstehen Ionen, die direkt mit der entsprechenden Molekülmasse korreliert sind. Fragmentionen entstehen nur in geringem Ausmaß. Mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie können bestimmte Ionen jedoch gezielt fragmentiert werden.<sup>[371,374,375]</sup>

## 5.4.2 Massenspektrometrische Analyse der LDT-Mimetika

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer Quadrupol-Ionenfalle durchgeführt.<sup>[376]</sup> Damit läßt sich aus einem Strom verschiedener Ionen ein schmaler Bereich um *m/z* isolieren. Durch Resonanzanregung kann die Bewegung der isolierten Ionen von einem eng begrenzten Raum im Zentrum der Ionenfalle auf einen größeren Bereich ausgedehnt werden. Die angeregten Ionen kollidieren mit dem Puffergas (Helium) und zerfallen in die entsprechenden Fragmentionen (*collision-induced dissociation*). Dieses Experiment wird als MS<sup>2</sup> bzw. die n-fache Wiederholung dieses Experiments mit den jeweils resultierenden Fragmentionen als MS<sup>n</sup> bezeichnet. Die Eignung dieser Methode für eine Strukturbestimmung wurde exemplarisch an den Verbindungen 200 und 201 durchgeführt. Sie besitzen die Molekülmasse 501.5 g/mol und unterscheiden sich nur in ihrer Sequenz.

In einem ersten Schritt wurden die adhärierten Zellen durch Waschen mit Puffer/1 mM EDTA von den Macrobeads entfernt. Anschließend wurden die Macrobeads photolysiert und die erhaltene Abspaltlösung mittels HPLC-MS und MS<sup>2</sup> analysiert.

Bei der  $MS^2$ -Analyse "setzte man" sich auf das  $[M+H]^+$  Signal und beobachtete welche Fragmentionen bei Erhöhung der Kollisionsenergie entstanden. Wie Abbildung 5.28 zeigt, spaltete sich bevorzugt unter Ausbildung einer Doppelbindung Wasser von Thr ab. Ferner trat sehr häufig das Fragmention B auf. Das charakteristische Signal für das  $[M+H]^+$ -Ion von **200** trat im  $MS^2$ -Spektrum bei *m/z* 384.1 bzw. für **201** bei *m/z* 370.1 auf. Mit diesen massenspektroskopischen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, daß eine vollständige Sequenzanalyse für die LDT-Mimetika mit Hilfe von  $MS^2$  möglich ist.



Abbildung 5.28: MS-Analyse der Verbindungen 200 und 201.

# 6 Synthese und biologische Evaluation von α3β1-Integrinantagonisten

Ausgehend von der publizierten Erkennungssequenz HEPIII von Collagen Typ IV für  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine (H<sub>2</sub>N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH,[377-380] sollten in einem ersten Schritt zunächst die einzelnen Aminosäuren schrittweise durch L-Alanin substituiert werden, um so die für die Ligand-Bindung essentiellen Aminosäuren zu ermitteln (Ala-*scan*). Weiter sollte durch Variation der Positionen der L-Asparaginsäuren in der natürlichen HEPIII-Sequenz deren Einfluß auf die Ligand-Bindung untersucht werden. Die linearen Peptide wurden mit Hilfe eines Syntheseroboters SyRo II synthetisiert und anschließend mit HPLC gereinigt. Eine Übersicht der synthetisierten Verbindungen befindet sind im Experimentellen Teil.

Die biologische Testung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Priv. Doz. Dr. habil. Ute Reuning, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

Die Testung der Verbindungen auf ihre biologische Aktivität erfolgte mit Zelladhäsionsassays. Dazu wurden 96-iger Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Glycoprotein beschichtet.  $\alpha 3\beta 1$ –Integrin exprimierende Zellen wurden mit der Testsubstanz versetzt und auf der Mikrotiterplatte ausgesät. Nach eineinhalbstündiger Inkubation wurden nicht adhärierte Zellen durch Waschen entfernt. Adhärierte Zellen konnten durch eine enzymatische Farbreaktion mit Hexoseamidase nachgewiesen und photometrisch quantifiziert werden. Alternativ wurde der Zelladhäsionsassay so durchgeführt, daß die Mikrotiterplatten direkt mit der Testsubstanz beschichtet wurden. Auch in diesem Fall wurden adhärierte Zellen durch die enzymatische Farbreaktion mit Hexoseamidasen konnten durch die enzymatische Farbreaktion mit der Testsubstanz beschichtet wurden. Auch in diesem Fall wurden adhärierte Zellen durch die enzymatische Farbreaktion mit Hexoseamidase nachgewiesen.

Das Vorhandensein von  $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen auf den verwendeten Ovarialkarzinomzellinien OVMZ-6 und OVCAR-3 konnte durch FITC-markierte Antikörper gegen die  $\alpha 3$ - bzw. gegen die  $\beta 1$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Im Laserfluoreszenzmikroskop zeigten beide Zellinien sowohl mit dem Antikörper gegen die  $\alpha 3$ -Untereinheit, als auch mit dem Antikörper gegen die  $\beta 1$ -Untereinheit eine fluoreszierende Zellwand (siehe Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1:** FITC-markierte Antikörper gegen die  $\alpha$ 3- bzw. gegen die  $\beta$ 1-Untereinheit von OVMZ-6- bzw. OVCAR3-Zellen. Die Aufnahmen sind farblich invertiert, d.h. der Hintergrund ist weiß und die Fluoreszenz schwarz dargestellt.

In Vorabversuchen wurden zunächst die Verbindungen **215** (Erkennungssequenz), **227** (Erkennungssequenz bei der Asp durch Ala ersetzt ist) und **228** (Zufallssequenz) exemplarisch evaluiert.

Diagramm 6.1: Inhibierung der OVMZ-6-Zelladhäsion durch verschiedene Peptide.



Wie Diagramm 6.1 zeigt, kann keine der getesteten Verbindungen die Zelladhäsion an die entsprechenden Liganden inhibieren. Die gemessenen Werte für die Bindungssequenz **215** entsprechen ungefähr jenen Werten, die auch für die Kontrollverbindungen (**227** und **228**) gemessen wurden. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnten somit nicht reproduziert werden.

Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von verschiedenen Testsystemen ausprobiert, um einen biologischen Effekt der vermeintlichen Erkennungssequenz messen zu können. Im einzelnen wurden folgende Tests durchgeführt:

- Zelladhäsionsassays mit unterschiedlicher Zellzahl.
- Zelladhäsionsassays mit Zellen, welche mit den entsprechenden Verbindungen vorinkubiert wurden und solche, die nicht vorinkubiert wurden.
- Durchführung der Tests mit unterschiedlichen Peptid-Konzentrationen.
- Verwendung von weiteren Zellinien, wie etwa HaCaT- oder auch OFFKA3-Zellen.
- Adhäsionsassays, bei denen die zu testende Verbindung *gecoatet* wurde und anschließend die Zelladhäsion bestimmt wurde.
- Synthese der fluoreszenzmarkierten Verbindungen 231 und 232. Anschließende Evaluation der fluoreszenzmarkierten Verbindungen mit OVMZ-6- Zellen im Laser-Fluoreszenzmikroskop sowie in FACS-Versuchen.

In allen durchgeführten Tests konnte kein Unterschied zwischen der vermeintlichen Erkennungssequenz **215** und den Kontrollpeptiden **227** und **228** festgestellt werden. Auch bei der biologischen Testung aller anderen Verbindungen konnte kein biologischer Effekt beobachtet werden. Erschwerend kam hinzu, daß sich die Verbindungen des Ala-*scans* nur bis zu einer Konzentration von ca. 0.75  $\mu$ M in dem verwendeten Adhäsionspuffer lösten. Ausgefallene Verbindungen täuschten in einem Zelladhäsionsassay eine biologische Aktivität vor. Ausgefallene Verbindungen konnte unter einem Stereomikroskop identifiziert werden.

Diese Ergebnisse zeigten, daß es sich bei der publizierten Sequenz nicht um die Erkennungssequenz von Collagen Typ IV für  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine handelte. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand auch u.a. Eble *et al.*, daß Collagen Typ IV kein Ligand für  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine ist.<sup>[381]</sup>

# 7 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der parallelen Festphasensynthese von niedermolekularen  $\alpha$ 4-Integrinantagonisten.  $\alpha$ 4 $\beta$ 1- und  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrine sowie ihre endogenen Liganden Fibronektin, VCAM-1 und MAdCAM-1 spielen bei einer Vielzahl pathologischer Vorgänge wie chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Inhibierung der  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin /MAdCAM-1-Wechselwirkung, denn diese bietet einen sehr spezifischen Ansatzpunkt zur Bekämpfung der *inflammatory bowel disease* (IBD). Ausgehend von cyclischen Hexapeptiden konnten selektive, nichtpeptidische  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrinantagonisten entwickelt werden (siehe Abbildung 7.1).



**Abbildung 7.1:** Überlagernde Darstellung von biologisch aktiven Cyclopeptiden (Modifikationen sind grau dargestellt) und ihr Einfluß auf das Design nichtpeptidischer  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. J. Boer konnten zunächst hochaktive und selektive Cyclopeptide als  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten entwickelt werden.<sup>[286]</sup> Beim *screening* einer Bibliothek aus cyclischen Hexapeptiden konnte im Rahmen dieser Arbeit die Verbindung **15** c(Tic-L-D-T-D-p) gefunden werden, die durch konformative Fixierung sowohl der Seitenkette als auch des Peptidbackbones wichtige strukturelle Eigenschaften für die Entwicklung niedermolekularer  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten lieferte. Eine weitere wichtige Entdeckung bei der biologischen Evaluation dieser cyclischen Hexapeptid-Bibliothek war Verbindung **21a** c(F-L-D-Phg-D-p). Damit konnte gezeigt werden, daß Threonin innerhalb der LDT-Erkennungssequenz durch ein aromatisches System substituiert werden konnte.
Auf dem Weg zu nichtpeptidischen Verbindungen wurden sowohl in Verbindung **19** c(F-L-D-T-D-p) als auch in der literaturbekannten Verbindung **25** Isochinolin-3carbonyl-Leu-Asp-Thr-OH<sup>[271]</sup> zunächst alle Aminosäuren der LDT-Erkennungssequenz einzeln durch die entsprechenden Azaaminosäuren und Peptoid-Bausteine substituiert. Ferner wurden ebenfalls alle Amidbindungen innerhalb der Erkennungssequenz schrittweise reduziert. Dabei konnte in Verbindung **19** Phe durch azaPhe (**57**) bzw. durch Nphe (**27**) ohne Aktivitätsverlust substituiert werden. Auch war in Verbindung **19** die Amidbindung zwischen Thr und Asp nicht essentiell.

Im nächsten Schritt wurden LDT-Mimetika modular aus vier Bausteinen A bis D an der Festphase aufgebaut. Die Bibliothekssynthese erfolgte in parallelen Ansätzen nach der Fmoc-Strategie. Die verwendeten Bausteine waren entweder kommerziell erhältlich oder über einen kurzen Syntheseweg zugänglich. Die biologische Evaluation der Bibliothek zeigte, daß Thr durch Anilin-Derivate substituiert werden konnte.

Zur Evaluierung des *N*-terminalen Raumes der linearen LDT-Sequenz wurden kleine Bibliotheken mit unterschiedlich substituierten *scaffolds* synthetisiert. Als *scaffold* kamen Thiazole, Fluor-nitrobenzoesäure, Alkene und Alkine zum Einsatz. Bei der biologischen Evaluation konnte Verbindung **145** sowohl die  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin- als auch die  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-Integrin-Wechselwirkung inhibieren.

Bisherige Ergebnisse zeigten, daß in linearen LDT-Mimetika Thr durch aromatische Systeme substituierbar war. Daher wurden weitere Verbindungen synthetisiert, die unterschiedliche aromatische Systeme anstelle von Thr aufwiesen. Mit 3-Amino-3-arylpropionsäure konnte so ein hervorragendes Dipeptidmimetikum für die Asp-Thr-Struktureinheit gefunden werden.

Zur Optimierung der neuen Leitstruktur **176b** wurde eine kleine Bibliothek durch parallele Festphasensynthese aufgebaut. Mit Verbindung **186a** konnte ein  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin-selektiver Antagonist bzw. mit Verbindung **186b** ein  $\alpha 4$ -Integrin-selektiver Antagonist gefunden werden. Beide Verbindungen erfüllen die *Pfizer's rule of five* und stellen somit ideale Leitstrukturen für die Entwicklung eines Medikaments dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit Antagonisten gefunden, die selektiv die  $\alpha 4\beta$ 7-Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung inhibieren konnten. Ferner wiesen einige Verbindungen eine  $\alpha 4\beta7$ -Integrin- bzw. eine  $\alpha 4$ -Integrin-Selektivität auf. Diese Verbindungen mit unterschiedlichen Selektivitäten eignen sich hervorragend zur Aufklärung der Rolle von einzelnen  $\alpha 4$ -Integrinen im Krankheitsgeschehen.

Ferner gelang es, ein zelluläres *on-bead screening* für  $\alpha 4\beta$ 7-Integrinantagonisten zu etablieren. Dazu wurden entsprechende Verbindungen über einen Photolinker an der Festphase aufgebaut. Nach Mn<sup>2+</sup>-Aktivierung konnten  $\alpha$ 4-Integrin exprimierende Zellen an die harzgebundene Referenzverbindung adhärieren. Die Detektion erfolgte mit einem Mikroskop. Durch massenspektrometrische Analyse war eine eindeutige Identifizierung der harzgebundenen Verbindungen möglich.

In einem weiteren Projekt konnte durch einen Alanin- und Asparaginsäure-*scan* gezeigt werden, daß HEPIII keine Bindungsstelle innerhalb von Collagen Typ IV für  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrine ist.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Leitstrukturen können nun sowohl  $\alpha 4\beta$ 7- als auch  $\alpha 4$ -selektive Integrinantagonisten weiter in Richtung Medikament entwickelt werden. Besonders die Eliminierung von Heteroatomen stellt ein wichtiges Ziel dar. Der etablierte zelluläre *on-bead assay* erlaubt zukünftig die rasche biologische Evaluierung harzgebundener Verbindungen. Des weiteren könnte dieser *on-bead* Zelltest auch auf Zellen mit anderen Integrinrezeptoren übertragen werden.

# 8 Experimenteller Teil

#### 8.1 Material und allgemeine Arbeitstechniken

Die **UV-Absorption** wurde entweder mit einem Perkin-Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 10 oder mit einem Varian Carey 100 Bio bestimmt.

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

Die Massenspektren wurden durch Laser-Desorption (MALDI), *chemical ionisation* (CI) oder *electrospray ionisation* (ESI) erhalten. HPLC-ESI-MS Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System Hewlett Packard HP 1100 (Säulenmaterial Nucleosil 100 5C<sub>18</sub>) durchgeführt. Die ESI-Spektren werden in der Form "X (Y) [M + Z]" angegeben, wobei die Molekülmasse X mit der Intensität Y % detektiert wurde. X entspricht dabei dem Anlagerungsprodukt aus dem untersuchten Molekül mit dem Molekulargewicht M und dem Kation Z<sup>+</sup>.

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

**HPLC-Trennungen** wurden mittels *reversed-phase*-Chromatographie an Geräten der Firmen *Beckmann* (System Gold, Hochdruckpumpenmodul 126, UV-Detektor 166) oder *Pharmacia Biotech* (Äkta Basic 10/100, Autosampler A-900) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte meist bei 220 nm. Es wurden folgende Säulen verwendet: YMC-Pack ODS-A (250 x 20 mm, S-5 μm, 12 nm und 250 x 4.6 mm, S-5 μm, 12nm). Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Acetonitril und Wasser mit jeweils 0.1% TFA im Gradientenbetrieb.

Dünnschichtchromatographische Kontrollen (DC-Kontrolle) und R<sub>f</sub>-Wertwurden mit Merck DC Kieselgel 60 F-254 Aluminium-Folien Bestimmungen durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm und/oder durch 5%ige ethanolische Ninhydrinlösung und/oder ein wäßriges Cer-(IV)sulfat/Molybdänsäurebad (Lösung aus 6.25 g Phosphormolybdänsäurehydrat, 2.5 g Cer-(IV)-sulfat und 15 mL Schwefelsäure in 235 mL Wasser) und jeweils anschließender Wärmebehandlung.

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach den gängigen Verfahren absolutiert.

Die eingesetzten **Reagenzien** stammten von den Firmen *E. Merck, Fluka, Sigma, Aldrich* und entsprachen der Qualität "zur Synthese" oder "per analysis" und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Tritylchlorid-Polystyrol-Harz (TCP-Harz) wurde von der Firma *PepChem* (Tübingen) und das TentaGel-Harz von der Firma *Rapp Polymere* bezogen. Die Harze Rink-Amid, MBHA und Wang stammten von der Firma *Novabiochem*. Die Aminosäuren, falls diese nicht selbst synthetisiert wurden, HOBt und Fmoc-Cl kamen von den Firmen *Alexis, Advanced Chemtech, Bachem, Neosystem, Novabiochem* oder *Senn*. Aminosäuren und Palladium/Aktivkohle waren Stiftungen der Firma *Degussa*.

Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 bzw. 40 (63-200  $\mu$ m bzw. 40-63  $\mu$ m) der Firma Merck und 1.0-1.4 bar Überdruck durchgeführt. Die Rohsubstanzen wurden für gewöhnlich auf Kieselgel 60 (63-200  $\mu$ m) aufgezogen.

Sämtliche **luft- oder hydrolyseempfindliche** Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Argonatmosphäre (99.996%) durchgeführt. Das Entfernen des Luftsauerstoffs aus Reagenzien erfolgte durch Behandlung der Probe im Ultraschallbad mit anschließendem Durchleiten von Argon.

Die **Peptidsynthese** wurde entweder manuell oder auf einem Multisyntech Syro II-Synthesizer ausgeführt. Manuelle Peptidkupplungen wurden bei größeren Ansätzen in Schüttelgefäßen aus Glas (sogenannte "Enten") durchgeführt. Bei kleinen Harzmengen erfolgten die Kupplungen in den handelsüblichen 2 mL, 5 mL oder 10 mL Einmalspritzen der Firma *Becton-Dickinson*. Die hierfür nötigen PE-Fritten stammten von der Firma *Vetter Labortechnik*.

**Reaktionen an fester Phase** wurden ebenfalls in 2 mL, 5 mL, 10 mL oder 20 mL Einmalspritzen der Firma *Becton-Dickinson* durchgeführt. Die hierfür nötigen PE-Fritten stammten von der Firma *Vetter Labortechnik*. Die Durchmischung der Harzsuspension erfolgte durch Rotation der Kunststoffspritzen. Typischerweise wurde 1 mL gequollenes Harz dreimal mit je 5 mL Lösungsmittel für 5 min. gewaschen. Um bei Festphasenreaktionen sowohl die Reaktionsäquivalente als auch die Ausbeute berechnen zu können, wurden entweder die UV-spektroskopisch bestimmten, gravimetrisch bestimmten oder die vom Hersteller angegebenen Belegungen verwendet. Bei luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden die Reaktionslösungen unter absoluten Bedingungen in einem mit Septum verschlossenen Spitzkolben vorgelegt. Mittels einer Kanüle wurden sie anschließend in eine mit Harz befüllte Kunststoffspritze überführt. Festphasenreaktionen bei höheren Temperaturen führte man in Schott-Druckflaschen durch. Hierbei wurde ein Papiertuch mit dem verwendeten Lösungsmittel angefeuchtet und mit der Spritze in die Flasche gelegt. Mit Hilfe eines temperierbaren Trockenschranks wurde das Reaktionsgefäß auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Ferner verwendete man auch kombinierte Heiz- und Schüttelapparaturen der Firma Advanced ChemTech. In diesen Fällen wurden die Reaktionen entweder in 2 mL bzw. 4 mL Schraubflaschen oder in kleinen Glasapparaturen mit Rückflußkühler durchgeführt.

Bei **lichtempfindlichen Reaktionen** wurde sowohl während der Reaktionsdurchführung als auch bei der Lagerung direkte Lichteinstrahlung vermieden. Dazu umhüllte man sämtliche Reaktions- und Aufbewahrungsgefäße mit Alu-Folie.

Die **log P**-Werte wurden nach Crippen *et al.* berechnet.<sup>[22]</sup> Alternativ wurde der **log P**-Wert nach Broto bestimmt.<sup>[382]</sup> Dies wird im Text gesondert aufgeführt. Diese Funktionen sind in dem Computerprogramm CS ChemDraw Pro der Firma *CambridgeSoft* enthalten.

Alle <sup>1</sup>**H-NMR** und <sup>13</sup>**C-NMR** Spektren wurden mit den Geräten AC250, DMX500 und DMX600 der Firma Bruker aufgenommen. Das Prozessieren der NMR-Daten erfolgte an Bruker Aspekt 1000 (AC250) bzw. Silicon Graphics Indy-, O2- und Octane-Arbeitsstationen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind relativ zu Tetramethylsilan in *parts per million* (ppm) angegeben. Als interner Standard wurde entweder Tetramethylsilan oder der Lösungsmittelpeak verwendet: DMSO-d<sub>5</sub>: 2.49 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 39.5 ppm (<sup>13</sup>C-NMR); CHCl<sub>3</sub>: 7.24 ppm (<sup>1</sup>H-NMR) und 77.0 ppm (<sup>13</sup>C-NMR).

Sämtliche Experimente zur Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffresonanzen sowie zur Strukturbestimmung wurden an den Hochfeldgeräten DMX 500 und DMX 600 durchgeführt. Dabei wurden Proben, mit DMSO als Lösungsmittel, durch mehrmaliges einfrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendem Auftauen im Hochvakuum von gelöstem Sauerstoff befreit. Die Probenröhrchen wurden unter Vakuum abgeschmolzen. Die Standardmeßtemperatur betrug bei den zweidimensionalen Experimenten 300 K. Die verwendeten Pulsprogramme stammten entweder von Bruker oder wurden von Arbeitskreismitgliedern selbst geschrieben. In Abhängigkeit von den spektroskopischen Eigenschaften der Proben wurden die Sendefrequenzen SFO1 sowie die spektrale Breiten (SW) der Experimente in beiden Dimensionen angepaßt. Die 90° Pulslängen sowie die sich daraus ergebenden Pulse und delays wurden für jede Meßreihe neu bestimmt. Um Wasserstoffbrückengebundende NH-Protonen zu ermitteln, wurde bei den Cyclopeptiden eine Temperaturreihe aufgenommen. Dazu wurden <sup>1</sup>H-Spektren bei 305 K, 310K, 315 K, 320 K und 325 K aufgenommen.

Die Adhäsionsassays führte man in 96-iger Mikrotiterplatten der Firma Corning durch. rhVCAM-1 stammte von *R&D Systems*. MAdCAM-1 wurde aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen gewonnen. Der *donkey anti-human IgG* wurde von *Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.* hergestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff H33342 wurde von der Firma *Calbiochem* bezogen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Cytofluor 2300 der Firma *Millipore* gemessen. Zur einheitlichen Durchführung der Adhäsionsassays wurden die Verbindungen in DMSO gelöst. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1 mg/10µL und wurden bei –20 °C aufbewahrt.

#### 8.2 Synthese der Bausteine

#### 8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV 1: Verseifung von C-terminalen Methylestern:

Zu einer Lösung aus Methylester (1.0 mmol) und MeOH (5 mL) gibt man unter Rühren 1N Natronlauge (1.5 mL) hinzu. Enthält der Methylester saure funktionelle Gruppen, so muß entsprechend mehr Base verwendet werden. Die Reaktion ist nach einigen Minuten beendet (DC-Kontrolle).

#### AAV 2: Synthese von Diazomethan:

Man legt KOH (2 g, 35.64 mmol), H<sub>2</sub>O (3.5 mL), Ethanol (3.5 mL) in Methoxyethanol (10 mL) vor und tropft langsam eine Lösung aus Diazald<sup>®</sup> (5.35 g, 24.97 mmol) in Diethylether (35 mL) hinzu. Die Reaktionslösung wird vorsichtig auf 50 °C erwärmt. Das entstehende Gasgemisch Diazomethan/Diethylether wird an Aceton/Trockeneis kondensiert und in eine, mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlte Vorlage getropft.

## AAV 3: Modifizierte Darstellung von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren nach Chang *et al.*:[383]

Zu einer eisgekühlten Lösung aus Aminosäure (5.0 mmol), Dioxan (5 mL) und 10 % iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) tropft man langsam Fmoc-Cl (5.5 mmol) in Dioxan (7.5 mL) zu. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend gibt man Eiswasser (150 mL) hinzu und extrahiert die wäßrige Phase zweimal mit kaltem Diethylether (150 mL). Bei *tert*-Butyl-geschützten Derivaten wird die eisgekühlte, wäßrige Phase mit 10 % iger Zitronensäure auf pH 4 eingestellt. Bei säurestabilen Derivaten stellt man die eisgekühlte, wäßrige Phase mit 1N HCl auf pH 2 ein. Der ausgefallene Feststoff wird dreimal mit je 150 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wäscht man mit verdünnter HCl (pH 3) und dreimal mit Wasser. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Gradient von Methanol in Chloroform mit 0.1 % Essigsäure) aufgereinigt.

## AAV 4: Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäurechloriden modifiziert nach Carpino *et al.*:[320]

Eine Lösung aus Fmoc-Aminosäure (0.88 mmol), DMF (0.09 mmol), SOCl<sub>2</sub> (8.8 mmol) in trockenem  $CH_2Cl_2$  (5 mL) wird unter einer Argonatmosphäre 1h bei 30 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit trockenem Toluol, einmal mit trockenem Benzol und abschließend wieder mit trockenem Toluol koevaporiert.

#### AAV 5: Darstellung der Peptoid-Monomere:

#### AAV 5.1: durch reduktive Aminierung:

Man löst Glyoxylsäure-Monohydrat (5.5 mmol) sowie die entsprechende Aminkomponente (5.0 mmol) in Methanol (10 mL, *Gradientgrade*) und Wasser (5 mL). Mit 2N Natronlauge wird die Lösung auf pH 6 eingestellt. Nach Zugabe von nassem Palladium auf Aktivkohle (0.1 g) als Katalysator setzt man in einem Autoklaven die Reaktionslösung über Nacht mit Wasserstoff (50 bar) um. Anschließend wird der Katalysator mit einem Membranfilter abfiltriert und die Reaktionslösung bis zur Trockne einrotiert. Zum Abtrennen der anorganischen Salze wird der Rückstand in einer kleinen Menge absolutem Methanol gelöst und filtriert. Auf eine weitere Reinigung der Produkte kann meist verzichtet werden.

#### AAV 5.2: durch direkte Alkylierung:

Zu einer eisgekühlten Lösung, bestehend aus einem lipophilen Amin (20.0 mmol), TEA (20.0 mmol) und Toluol (15 mL) tropft man innerhalb von 4 h Bromessigsäureethylester (20.0 mmol) in Toluol (7 mL) zu. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser mehrmals extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel abrotiert. Den Rückstand reinigt man mittels Flashchromatographie (Gradient aus n-Hexan und Essigsäureethylester) auf.

### AAV 6: Synthese von 1-Fmoc-2-Alkylhydrazin -Derivaten modifiziert nach Ghali et al.:[310]

Zu einer Lösung aus Fmoc-Hydrazin (**46**) (2.54 g, 10 mmol) in abs. THF (80 mL) tropft man bei RT die entsprechende Carbonylverbindung (11 mmol, 1.1 Äquiv.) langsam hinzu. Die Lösung wird zunächst 1h bei RT und anschließend 1h bei 60 °C gerührt. Nach dem Erkalten wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in einer 1M BH<sub>3</sub>/THF-Lösung gelöst und 10 min. bei RT gerührt. Man fügt tropfenweise wäßrige HCl (6 N, 5 mL) hinzu. Unter starker Gasentwicklung bildet sich ein farbloser Niederschlag. Die Lösung wird für 10 min auf 60 °C erhitzt. Anschließend rotiert man die Suspension bis zur Trockne ein und löst den Rückstand

in abs. THF (20 mL) auf. Die unlösliche Borsäure wird über Kieselgur abfiltriert und das Filtrat wird bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

## AAV 7: Synthese von 2-(Chlorocarbonyl)-1-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2alkylhydrazin-Derivaten modifiziert nach Gibson *et al.*:[315]

Zu einer Lösung aus 1-Fmoc-2-Alkylhydrazin (1.60 mmol) in trockenem Dioxan (5 mL) tropft man bei 10 °C und einer Argonatmosphäre Phosgen (1.89 M in Toluol, 1.7 mL, 3.2 mmol, 2 Äquiv.) langsam hinzu. Die Lösung wird zunächst 5 min bei 10 °C und anschließend 90 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird aus trockenem Dioxan über Nacht lyophilisiert.

# AAV 8: Synthese von 2-(p-Nitrophenoxycarbonyl)-1-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-alkylhydrazin-Derivaten modifiziert nach Calabretta *et al.*:[317]

1-Fmoc-2-Alkylhydrazin (15.75 mmol) wird in CHCl<sub>3</sub> (47 mL) und wäßriger 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (63 mL) gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Man tropft unter heftigem Rühren eine Lösung aus Chlorameisensäure-4-nitrophenylester (3.17 g, 15.75 mmol, 1 Äquiv.) in trockenem CHCl<sub>3</sub> (16 mL) hinzu. Die Eiskühlung wird entfernt und das Reaktionsgemisch wird weitere 30 min bei RT gerührt. Man verdünnt die Lösung mit CHCl<sub>3</sub> (157 mL) und wäscht die organische Phase mit gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung, gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub> und abschließend nochmals mit gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wird die Lösung bis zur Trockne eingeengt und der Rückstand mittels Flashchromatographie aufgereinigt.

#### AAV 9: Lösungssynthese von Phenylamid-Derivaten:

Zu einer eisgekühlten Lösung aus Carbonsäure-Derivat (5.0 mmol), Anilin-Derivat (5.0 mmol) und HOBt\*H<sub>2</sub>O (0.76 g, 6.5 mmol) in trockenem THF (10 mL) wird langsam EDCI\*HCl (1.15 g, 6.5 mmol) und NMM (1.32 mL, 12.0 mmol) hinzugefügt. Durch weitere Zugabe von NMM wird der pH-Wert auf 7-8 eingestellt. Man entfernt

das Eisbad und läßt die Reaktionsmischung über Nacht bei RT rühren. Nach dem Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum, wird der Rückstand in Essigsäureethylester (20 mL) gelöst und mit H<sub>2</sub>O (1 x 20 mL), wäßriger HCl-Lösung (pH 3, 2 x 20 mL), 5%-iger, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 20 mL) und H<sub>2</sub>O (1 x 20 mL) gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bis zur Trockne eingeengt.

# AAV 10: Cyclisierung von seitenkettengeschützten Peptiden in Lösung mit DPPA nach Shiori *et al.*:[285]

Eine Suspension aus seitenkettengeschütztem Peptid (1 mmol), DPPA (3 mmol, 3 Äquiv.), NaHCO<sub>3</sub> (5 mmol, 5 Äquiv.) und trockenem DMF (500 mL) läßt man 24 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird der Feststoff abfiltriert und das Filtrat im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in CH<sub>3</sub>CN (30 mL) gelöst und von ungelöster Diphenylphosphorsäure befreit. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgt nach AAV 31.

# AAV 11: Cyclisierung von seitenkettengeschützten Peptiden in Lösung mit HATU modifiziert nach Ehrlich *et al.*:[384]

Eine Lösung aus seitenkettengeschütztem Peptid (1 mmol), HATU (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.), HOAt (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) und Collidin (1.32 mL, 10 mmol, 10 Äquiv.) in trockenem DMF (1 L) werden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt. Die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgt nach AAV 31.

### AAV 12: Synthese von 3-Amino-3-aryl-propionsäure-Derivaten modifiziert nach Cardillo *et al.*:[358]

Ein aromatischer Aldehyd (20 mmol), Malonsäure (2.08 g, 20 mmol) und Ammoniumacetat (3.08 g, 40 mmol) werden in Ethanol (30 mL) gelöst und für 6 h unter Rückfluß gekocht. Man läßt den Reaktionsansatz erkalten und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird der ausgefallene Feststoff abgesaugt und mehrmals mit kaltem Ethanol gewaschen. Auf eine weitere Reinigung der Produkte kann meist verzichtet werden. Anderenfalls werden die Produkte umkristallisiert.

# AAV 13: Synthese von 3-Aryl-glutarsäure-Derivaten modifiziert nach Perregaard *et al.*:[362]

Zu einer eisgekühlten Lösung eines aromatischen Aldehyds (30 mmol) in Acetessigsäureethylester (7.65 mL, 60 mmol) tropft man langsam Piperidin (0.405 mL, 4.1 mmol) hinzu und läßt den Ansatz drei Tage bei RT stehen. Der entstehende Feststoff wird in Ethanol (16 mL) gelöst und 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Der Feststoff (14.4 mmol) wird portionsweise unter Rühren zu einer 90 °C warmen Lösung aus NaOH (4.1 g, 102.5 mmol) in H<sub>2</sub>O (3.5 mL) hinzugefügt. Den Ansatz läßt man für weitere 2 h bei 80 °C rühren. Es wird Eis (23 g) und Ethylacetat (5.9 mL) hinzugefügt, die wäßrige Phase abgetrennt und mit konz. HCl auf pH 1 eingestellt. Das ausgefallene Glutarsäure-Derivat wird abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

# AAV 14: Synthese von 3-Aryl-glutarsäureanhyrid-Derivaten nach Perregaard *et al.*:[362]

3-Aryl-glutarsäure-Derivate (12.8 mmol) werden mit Essigsäureanhydrid (12.2 mL) 20 min bei 120 °C gekocht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die 3-Aryl-glutarsäureanhyrid-Derivate sind ausreichend sauber, so daß auf eine Aufreinigung verzichtet werden kann.

### AAV 15: Synthese von 5-[*N*'-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-isobutylhydrazino]-5-oxo-3-aryl-pentansäure-Derivaten:

N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure 9*H*-fluoren-9-ylmethylester (**48**) (0.60 g, 1.93 mmol) und ein Tolyl-glutarsäureanhyrid-Derivat (0.40 g, 1.96 mmol) werden unter einer Argonatmosphäre in trockenem THF (40 mL) gelöst und 24 h bei 70 °C erhitzt. Das

Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie gereinigt.

# AAV 16: Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminoalkoholen modifiziert nach Kokotos *et al.*:[385]

Die Aminosäure (14.15 mmol) wird unter einer Argonatmosphäre in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL) suspendiert und auf -20 °C gekühlt. Man tropft Pyridin (1.14 mL, 14.15 mmol, 1 Äquiv.) Cyanurfluorid (2.55 mL)und hinzu, rührt das Reaktionsgemisch 1 h bei -20 °C und stoppt die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser (70 mL) und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL). Die erhaltene Emulsion filtriert man über eine Glasfritte, worauf Phasentrennung einsetzt. Die Wasserphase wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 70 mL) gewaschen. Man vereinigt die organischen Phasen, trocknet sie mit MgSO<sub>4</sub> und engt die Lösung auf ein Volumen von 30 mL ein. Man fügt NaBH<sub>4</sub> (1.08 g) hinzu und tropft bei RT MeOH (29 ml) innerhalb von 35 min zu. Nach dem Neutralisieren der Lösung mit einer, wäßrigen 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung wird die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Den Rückstand nimmt man in Ethylacetat:H<sub>2</sub>O (140:70 mL) auf, trennt die wäßrige Phase ab und extrahiert sie mit Ethylacetat (2 x 113 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit wäßriger, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung (1 x 70 mL) und mit H<sub>2</sub>O (2 x 140 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der Lösung über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Flashchromatographie (Ethylacetat/Petrolether) gereinigt.

### AAV 17: Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminoaldehyden nach Blaskovich *et al.*:[326]

Oxalylchlorid (70 µL, 0.8 mmol, 1.6 Äquiv.) wird unter Schutzgas in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) gelöst, auf –78 °C abgekühlt und mit trockenem DMSO (115 µL, 1.63 mmol, 3.3 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 10 min bei –78 °C gerührt. Währenddessen wird eine Lösung des *N*-Fmoc-geschützten Aminoalkohols (0.50 mmol) in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) unter einer Argonatmosphäre auf -78 °C abgekühlt. Mittels einer Kanüle überführt man nach 10 min die Lösung des *N*-Fmoc-geschützten Aminoalkohols in die Oxalylchlorid-Lösung. Die Reaktionslösung wird

80 min bei -78 °C gerührt und anschließend mit DIPEA (430 µL, 2.47 mmol, 5. Äquiv.) versetzt. Man läßt die Lösung 40 min bei 0 °C rühren und gibt anschließend CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) hinzu. Die Lösung wird mit eiskalter, wäßriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (3%, 2 x 75 mL) und gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung (1 x 75 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Aldehyd wird ohne weitere Reinigung eingesetzt, da eine säulenchromatographische Trennung zur Zersetzung führt.

#### 8.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

#### Benzylamino-essigsäureethylester (H-Nphe-OEt) (26):

Benzylamin (5.47 mL, 50 mmol), Bromessigsäureethylester (5.55 mL, 50 mmol) und TEA (6.93 mL, 50 mmol) wurden in Toluol (37.5 mL) nach AAV 5.2 umgesetzt. Nach Reinigung per Flashchromatographie erhielt man **26** (6.74 g, 70%) als farblosen Feststoff.

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: 193.24 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.30-7.21 (m, 5H), 4.12 (q, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.41 (br. s, 1H), 1.18 (t, 3H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 11.69 min; ESI-MS: *m/z* 194.1 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### Fmoc-Nphe-OH (28):

Benzylamino-essigsäureethylester (**26**) (6.74 g, 35 mmol) wurden nach AAV 1 verseift und ohne weiter Aufarbeitung nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (13.94 g, 53.88 mmol, 1.5 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **28** (11.60 g, 86%) als farblosen Feststoff.

C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: 387.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.94 (br. s, 1H), 7.88-7.06 (m, 13H), 4.59-4.41 (m, 4H), 4.30-4.25 (m, 1H), 3.96 (s, 2H); HPLC (10-90% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.11 min; ESI-MS: *m/z* 813.0 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 774.6 (40) [2M+H<sup>+</sup>], 410.1 (24) [M+Na<sup>+</sup>], 387.9 (22) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isopropylamino-essigsäure (H-Nval-OH) (29):

Isopropylamin (1.70 mL, 20 mmol), Glyoxylsäure (2.03 g, 22 mmol) und Pd auf Aktivkohle (0.4 g) wurden in einem MeOH:H<sub>2</sub>O Gemisch (40 mL:20 mL) nach AAV 5.1 umgesetzt. Man erhielt **29** (2.67 g, 114%) als farblosen Feststoff.

C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>: 117.15 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 3.19-3.11 (m, 3H), 1.17 (d, 6H).

#### (N-Fmoc-isopropyl-amino)-essigsäure (Fmoc-Nval-OH) (30):

Isopropylamino-essigsäure (**29**) (2.34 g, 20.0 mmol) wurde nach AAV 3 über Nacht mit Fmoc-Cl (5.69 g, 22 mmol) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **30** als farblosen Feststoff.

C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>: 339.39 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO, zwei Isomere):  $\delta = 11.00$  (br. s, 2H), 7.89 (d, 4H), 7.65 (d, 4H), 7.43-7.27 (m, 8H), 4.42 (d, 2H), 4.31-4.17 (m, 6H), 3.85 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 1.06 (d, 6H), 0.90 (d, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO, zwei Isomere):  $\delta = 171.93$ , 171.57, 155.35, 155.08, 144.18, 144.00, 141.07, 140.88, 127.86, 127.80, 127.30, 125.37, 125.04, 120.28, 67.13, 66.80, 47.42, 47.31, 46.99, 46.90, 44.12, 43.50, 20.26, 19.93; HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 26.47 min; ESI-MS: *m/z* 717.1 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 701.1 (26) [2M+Na<sup>+</sup>], 362.1 (9) [M+Na<sup>+</sup>].

#### Isobutylamino-essigsäure (H-Nleu-OH) (31):

Isobutylamin (2.48 mL, 25 mmol), Glyoxylsäure (2.53 g, 25.0 mmol) und Pd auf Aktivkohle (0.5 g) wurden in einem MeOH: $H_2O$  Gemisch (50 mL:25 mL) nach AAV 5.1 umgesetzt. Man erhielt **31** (2.83 g, 86%) als farbloses Öl.

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 131.17 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 3.09$  (s, 2H), 2.62 (d, 2H, J= 7.0 Hz), 1.89 (heptett, 1H), 0.90 (d, 6H, J= 6.6 Hz); HPLC (0-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 11.70 min.

#### Fmoc-Nleu-OH (32):

Isobutylamino-essigsäure (**31**) (2.57 g, 19.6 mmol) wurde nach AAV 3 über Nacht mit Fmoc-Cl (5.58 g, 21.57 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **32** (4.48 g, 65%) als farblosen Feststoff.

C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: 353.41 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO, zwei Isomere):  $\delta = 11.86$  (br. s, 2H), 7.88 (d, 4H), 7.63 (t, 4H), 7.42-7.27 (m, 8H), 4.50 (d, 2H), 4.24 (m, 4H), 3.94 (s, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.07 (d, 2H), 2.70 (d, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 0.83 (d, 6H), 0.54 (d, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 171.35$ , 171.01, 155.99, 155.91, 144.21, 143.94, 141.16, 140.87, 127.84, 127.65, 127.27, 127.19, 125.30, 124.83, 120.27, 120.16, 67.14, 66.54, 66.39, 55.52, 54.97, 49.34, 48.84, 46.91, 26.87, 26.81, 19.99, 19.60; HPLC (10-90% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.10 min; ESI-MS: *m/z* 745.1 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 729.1 (21) [2M+Na<sup>+</sup>], 376.1 (21) [M+Na<sup>+</sup>].

#### (tert-Butoxycarbonylmethyl-amino)-essigsäure (H-Nasp(OtBu)-OH) (33):

Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid (13.41 g, 80 mmol), Glyoxylsäure (8.10 g, 88 mmol) und Pd auf Aktivkohle (1.6 g) wurden in einem MeOH:H<sub>2</sub>O Gemisch (160 mL:80 mL) nach AAV 5.1 umgesetzt. Man erhielt **33** (19.46 g, 129%) als farbloses Öl.

C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>:189.21 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 4.15 (br. s, 2H), 3.16 (s, 2H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 172.12, 170.35, 80.85, 60.17, 50.13, 27.97.

#### Fmoc-Nasp(OtBu)-OH (34):

(*tert*-Butoxycarbonylmethyl-amino)-essigsäure (**33**) (1.89 g, 10 mmol) wurden nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (2.85 g, 11 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **34** (3.19 g, 78%) als farbloses Öl.

C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>: 411.45 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 11.85 (br. s, 1H), 7.90 (d, 2H), 7.64 (d, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.30 (t, 2H), 4.31-4.22 (m, 3H), 4.06-3.96 (m, 4H), 1.39 (s, 9H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 171.01, 168.71, 155.64, 143.79, 140.89, 127.92, 127.27, 125.20, 120.34, 81.30, 66.52, 49.55, 46.70, 46.63, 27.90; HPLC (10-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.26 min; ESI-MS: *m/z* 860.9 (50) [2M+K<sup>+</sup>], 434.0 (100) [M+Na<sup>+</sup>].

#### **Fmoc-Hydrazin (46):**

Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester (5.0 g, 37.83 mmol) und DIPEA (7.9 mL, 45.36 mmol) wurden unter einer Argonatmosphäre in trockenem THF (50 mL) gelöst. Man fügte portionsweise Fmoc-Cl (9.78 g, 37.83 mmol, 1 Äquiv.) hinzu. Man ließ den Ansatz über Nacht bei RT rühren und trennte anschließend den Niederschlag ab. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in einem 1:1 Gemisch TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Die Lösung rotierte man im Vakuum bis zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen (200 mL) und mit 10%iger, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x je 100 mL) und mit gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung (1 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne einrotiert. Den Rückstand lyophilisierte man aus Dioxan. Man erhielt **46** (7.8 g, 81%) als weißen Feststoff.

C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 254.28 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8.33$  (br. s, 1H), 7.89 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.44-7.28 (m, 4H), 4.29- 4.20 (m, 3H), 4.07 (br. s, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 158.37$ , 144.00, 140.89, 127.82, 127.26, 125.43, 120.29, 65.85, 46.87; HPLC (0-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 19.60 min; ESI-MS: *m/z* 509.1 (1) [2M+H<sup>+</sup>].

#### N'-Isopropyl-hydrazincarbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (48):

Fmoc-Hydrazin (**46**) (2.54 g, 10 mmol) wurde in Aceton (50 mL) gelöst und analog zu AAV 6 verfahren. Nach Reduktion des Hydrazons mit 1M BH<sub>3</sub>/THF wurde die Borsäure über Kieselgur abfiltriert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (250 mL)

gelöst und mit wäßriger, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 x 120 mL), anschließend mit wäßriger, gesättigter NaCl-Lösung (1 x 100 mL) und abermals mit wäßriger, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 x 120 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde die organische Phase bis zur Trockne eingeengt. Man erhielt **48** (2.70 g, 91%) als farblosen Feststoff.

 $C_{18}H_{20}N_2O_2$ : 296.36 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 10.76$  (br. s, 1H), 7.88 (d, 2H), 7.72 (d, 2H), 7.44-7.28, 4H), 4.52 (d, 2H), 4.28 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 1.16 (d, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 155.21$ , 143.52, 141.01, 127.98, 127.32, 125.40, 120.39, 67.21, 52.82, 46.68, 17.41; HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 20.85 min; ESI-MS: *m/z* 614.8 (4) [2M+Na<sup>+</sup>], 319.1 (3) [M+Na<sup>+</sup>].

#### N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (50):

Fmoc-Hydrazin (**46**) (2.54 g, 10.0 mmol) wurde in trockenem THF (110 mL) gelöst und man tropfte analog zu AAV 6 Isobutyraldehyd (0.91 mL, 10.0 mmol) hinzu. Nach Reduktion des Hydrazons mit 1M BH<sub>3</sub>/THF wurde die Borsäure über Kieselgur abfiltriert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (250 mL) gelöst und mit wäßriger, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 x 120 mL), anschließend mit wäßriger, gesättigter NaCl-Lösung (1 x 100 mL) und abermals mit wäßriger, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 x 120 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde die organische Phase bis zur Trockne eingeengt. Man erhielt **50** (2.38 g, 77%) als farblosen Feststoff. C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 310.39 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 10.77$  (br. s, 1H), 7.90 (d, 2H), 7.73 (d, 2H), 7.44-7.29 (m, 4H), 4.52 (d, 2H), 4.28 (t, 1H), 2.85 (d, 2H), 1.97-1.89 (m, 1H), 0.93 (d, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 155.18$ , 143.51, 140.99, 127.96, 127.31, 125.40, 120.38, 67.02, 57.12, 46.64, 24.11, 20.41; HPLC (10-90% in 30 min) R<sub>t</sub> = 20.03 min; ESI-MS: *m*/*z* 642.9 (2) [2M+Na<sup>+</sup>], 333.1 (2) [M+Na<sup>+</sup>].

### *N*'-Benzyl-hydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester modifiziert nach Calabretta *et al.* (52):[317]

Zu einer Lösung aus Fmoc-Hydrazin (46) (2.54 g, 10 mmol) in trockenem THF (80 mL) wurde langsam Benzaldehyd (1.12 mL, 11 mmol) zugegeben und 2 h bei 60 °C erwärmt. Das Lösungsmittel entfernte man im Vakuum. Der Rückstand wurde mit NaBH<sub>3</sub>CN (1.57 g, 25 mmol), Essigsäure (30 mL) in trockenem THF (50 mL) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (100 mL) und Wasser (100 mL) wurde mit festem NaHCO<sub>3</sub> der pH-Wert der wäßrigen Lösung auf 8 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung und abermals mit gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit einer Lösung aus 1N NaOH (30 mL) und MeOH (50 mL) hydrolysiert. Es bildete sich ein weißer Niederschlag. Nach 2 h wurde das Reaktionsgemisch mit Et<sub>2</sub>O (100 mL) und Ethylacetat (150 mL) verdünnt. Man trennte die organische Phase ab und engte die Lösung im Vakuum ein. Der Rückstand wurde in trockenem THF (170 mL) gelöst und von unlöslichem Feststoff abgetrennt. Die Lösung wurde bis zur Trockne eingeengt. Man erhielt **52** (2.48 g, 72%) als farblosen Feststoff.

C22H20N2O2: 344.41 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 9.36$  (br. s, 1H), 7.90 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.68 (d, 2H, J= 6.9 Hz), 7.45-7.27 (m, 9H), 5.66 (br. s, 1H), 4.43-4.38 (m, 2H), 4.26-4.20 (m, 1H), 4.00 (br. s, 2H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 26.70 min; ESI-MS: *m/z* 710.8 (4) [2M+Na<sup>+</sup>], 367.1 (9) [M+Na<sup>+</sup>], 344.9 (7) [M+H<sup>+</sup>].

### [*N'-*(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure-*tert*butylester modifiziert nach Corrie *et al.* (54):[311]

Fmoc-Hydrazin (**46**) (1.68 g, 6.61 mmol), Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.16 mL, 7.87 mmol) und DIPEA (1.15 mL, 6.61 mmol) wurden in trockenem THF gelöst und über Nacht bei 70 °C erhitzt. Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockne einrotiert. Nach Reinigung mittels Flashchromatographie erhielt man **54** (0.93 g, 32%) als farblosen Feststoff.

C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 368.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8.69$  (br. s, 1H), 7.89 (d, 2H), 7.69 (d, 2H), 7.43-7.27 (m, 4H), 4.30-4.20 (m, 3H), 3.37 (s, 2H), 1.41 (s, 9H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 29.98 min; ESI-MS: *m/z* 759.0 (6) [2M+Na<sup>+</sup>], 737.0 (12) [2M+H<sup>+</sup>], 391.0 (44) [M+Na<sup>+</sup>], 368.9 (20) [M+H<sup>+</sup>].

#### N'-Chlorocarbonyl-N'-isopropyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-

#### ylmethylester (Fmoc-azaVal-Cl) (55):

In einer Argonatmosphäre tropft man zu einer Lösung aus N'-Isopropylhydrazincarbonsäure 9*H*-fluoren-9-ylmethylester (**48**) (803 mg, 2.71 mmol) in trockenem Dioxan (16.5 mL) gemäß AAV 7 Phosgen (1.89 M in Toluol, 2.9 mL, 5.42 mmol, 2. Äquiv.) hinzu. Lyophilisieren aus trockenem Dioxan ergab **55** (928 mg, 95%) als leicht gelblichen Feststoff.

 $C_{19}H_{19}ClN_2O_3$ : 358.82 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.73$  (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.37 (t, 2H), 7.29 (t, 2H), 4.73-4.45 (m, 3H), 4.22-4.16 (m, 1H), 1.24 (m, 6H), 0.84 (d, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 155.47$ , 151.19, 143.16, 141.31, 127.73, 127.03, 124.71, 119.90, 66.86, 52.94, 47.18, 19.27; GC-MS: *m/z* 358.0 (3) [M<sup>-</sup>].

## 2-(Chlorocarbonyl)-1-9*H*-fluoren-9-ylmethylester -2-isobutylhydrazin (FmocazaLeu-Cl) (56):

In einer Argonatmosphäre tropfte man zu einer Lösung aus N'-Isobutylhydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester (**50**) (2.0 g, 6.44 mmol) in trockenem Dioxan (18 mL) gemäß AAV 7 Phosgen (1.89 M in Toluol, 6.85 mL, 12.9 mmol, 2. Äquiv.) hinzu. Lyophilisieren aus trockenem Dioxan ergab **56** (2.54 g, 106%) als leicht gelblichen Feststoff.

 $C_{20}H_{21}ClN_2O_3$ : 372.85 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.78 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 7.61 (d, 2H, J= 7.2 Hz), 7.45-7.40 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.30 (br. s, 1H), 4.69-4.61 (m, 2H),

4.25 (t, 1H, J= 5.9 Hz), 3.47-3.36 (m, 2H), 1.93-1.83 (m, 1H), 0.93 (d, 6H, J= 6.4 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.52, 152.06, 143.16, 141.35, 127.80, 127.07, 124.74, 119.95, 66.92, 58.82, 47.18, 26.37, 19.68; GC-MS: *m/z* 372.0 (6) [M<sup>-</sup>].

#### N'-Benzyl-N'-chlorocarbonyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-

#### ylmethylester (Fmoc-azaPhe-Cl) (57):

In einer Argonatmosphäre tropfte man zu einer Lösung aus *N'*-Benzylhydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester (**52**) (2.0 g, 5.81 mmol) in trockenem THF (18 mL) gemäß AAV 7 Phosgen (1.89 M in Toluol, 6.85 mL, 12.95 mmol, 2.2 Äquiv.) hinzu. Lyophilisieren aus trockenem Dioxan ergab **57** (2.28 g, 96%) als leicht gelblichen Feststoff.

C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 406.86 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.75$  (d, 2H, J= 7.7 Hz), 7.53 (d, 2H, J=7.3 Hz), 7.43-7.26 (m, 9H), 7.22 (br. s, 1H), 4.64-4.57 (m, 2H), 4.23-4.16 (m, 1H), 3.66 (s, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 154.19$ , 143.14, 141.40, 129.11, 128.88, 128.56, 127.90, 127.15, 124.78, 120.04, 67.90, 67.43, 66.90, 54.43, 47.08; EI-MS: *m/z* 405.8 (1)[M<sup>-</sup>].

### [*N*-Chlorocarbonyl-*N'*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure*tert*-butylester (Fmoc-azaAsp(tBu)-Cl) (58):

In einer Argonatmosphäre tropfte man zu einer Lösung aus [N'-(9H-Fluoren-9ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-essigsäure-*tert*-butylester (**54**) (1.0 g, 2.71 mmol) in trockenem THF (20 mL) gemäß AAV 7 Phosgen (1.89 M in Toluol, 3.6 mL, 6.80 mmol, 2.5 Äquiv.) hinzu. Lyophilisieren aus trockenem Dioxan ergab **58** (1.10 g, 94%) als leicht gelblichen Feststoff.

C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 430.88 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.74 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.64 (br. s, 1H), 7.55 (d, 2H, J=6.4 Hz), 7.39 (t, 2H, J=7.3 Hz), 7.30 (t, 2H, J=7.3 Hz), 4.57 (d, 2H, J=6.0 Hz), 4.22 (t, 1H, J=6.4 Hz), 1.48 (s, 2H), 1.45 (s, 9H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 143.14, 141.39, 127.92, 127.15, 124.82, 120.07,

83.44, 68.14, 67.74, 67.02, 55.67, 52.35, 47.07, 28.00; EI-MS: *m/z* 429.8 (2)[M<sup>·</sup>].

#### 2-(p-Nitrophenoxycarbonyl)-1-Fmoc-hydrazin (70)

Fmoc-Hydrazin (46) (3 g, 11.80 mmol) wurden gemäß AAV 8 mit p-Nitrophenylchloroformiat (2.38 g, 11.80 mmol) umgesetzt. Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat-Gradient) lieferte 70 (3.14 g, 63%) als gelbliches Öl.  $C_{22}H_{17}N_3O_6$ : 419.39 g/mol

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 28.01$  min; ESI-MS: m/z 1280.2 (5) [3M+Na<sup>+</sup>], 861.1 (14) [M+Na<sup>+</sup>].

#### 2-(p-Nitrophenoxycarbonyl)-1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-

#### isopropylhydrazin (71):

N'-Isopropyl-hydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester Hydrochlorid (48)
(3.13 g, 9.40 mmol) wurden gemäß AAV 8 mit p-Nitrophenylchloroformiat (1.89 g, 9.40 mmol) umgesetzt. Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat-Gradient) lieferte 71
(2.56 g, 59%) als gelbliches Öl.

C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 461.47 g/mol

ESI-MS: m/z 961.0 (34) [2M+K<sup>+</sup>], 944.9 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 922.8 (62) [2M+H<sup>+</sup>], 461.9 (22) [M+H<sup>+</sup>].

#### 2-(p-Nitrophenoxycarbonyl)-1-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-

#### isobutylhydrazin (72):

N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester Hydrochlorid (**50**) (3.36 g, 9.69 mmol) wurden gemäß AAV 8 mit p-Nitrophenylchloroformiat (1.95 g, 9.69 mmol) umgesetzt. Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat-Gradient) lieferte **72** (2.45 g, 53%) als gelbliches Öl. C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 475,49 g/mol

ESI-MS: m/z 988.8 (16) [2M+K<sup>+</sup>], 272.7 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 950.7 (16) [2M+H<sup>+</sup>], 498.1 (20) [M+Na<sup>+</sup>], 475.9 (7) [M+H<sup>+</sup>].

#### 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-leucinol (74):

Fmoc-Leu-OH (5 g, 14.15 mmol) wurde gemäß AAV 16 zum entsprechenden Alkohol reduziert. Nach Flashchromatographie erhielt man **74** (2.94 g, 61%) als farblosen Feststoff.

C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>: 339.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  =7.87 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.44-7.27 (m, 4H), 6.98 (d, 1H), 4.65-4.60 (m, 1H), 4.36-4.16 (m, 3H), 3.52-3.48 (m, 1H), 3.40-3.19 (m, 2H), 1.62-1.55 (m, 1H), 1.30-1.23 (m, 2H), 0.84 (dd, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 156.09, 144.12, 140.92, 127.76, 127.18, 125.39, 120.27, 82.03, 65.25, 64.26, 51.07, 47.04, 24.39, 23.62, 21.98; HPLC (20-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 26.88 min; ESI-MS: *m/z* 700.8 (16) [2M+Na<sup>+</sup>], 362.2 (86) [M+Na<sup>+</sup>], 340.0 (28) [M+H<sup>+</sup>].

# [3-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-3-formyl]-propansäure-*tert*-butylester (75):

3-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-4-hydroxy-butansäure-*tert*-butylester (2.0 g, 5.03 mmol) wurde gemäß AAV 17 oxidiert. Man erhielt **75** (2.37 g, 119%) als bräunliches Öl.

C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>: 395.45 g/mol

GC-MS: *m/z* 394.8 (18) [M·].

#### 1-Formyl-3-methyl-butyl)-carbamidsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (76):

Fmoc-Leucinol (74) (2.94 g, 8.66 mmol) wurde gemäß AAV 17 oxidiert. Man erhielt 76 (3.37 g, 115%) als gelbes Öl.

C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>: 337.41 g/mol

ESI-MS: *m*/*z* 714.9 (17) [2M+K<sup>+</sup>], 675.0 (16) [2M+Na<sup>+</sup>], 337.9 (14) [M+H<sup>+</sup>].

# 1-Benzyl-2-oxo-ethyl)-carbamidsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester (77): Fmoc-Phenylalaninol (2.0 g, 5.36 mmol) wurde gemäß AAV 17 oxidiert. Man erhielt 77 (1.97 g, 99%) als bräunliches Öl. C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>: 371.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 9.63 (s, 1H), 7.77 (d, 2H), 7.56 (d, 2H), 7.42-7.10 (m, 9H), 5.31 (m, 1H), 4.54-4.35 (m, 3H), 4.20 (t, 1H), 3.15 (d, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 198.64, 155.80, 143.64, 141.30, 135.42, 129.29, 128.77, 128.55, 127.73, 127.15, 124.99, 119.98, 66.94, 61.08, 47.15, 35.33; ESI-MS: *m*/*z* 1507.6 (10) [4M+Na<sup>+</sup>], 1136.9 (6) [3M+Na<sup>+</sup>], 372.1 (8) [M+H<sup>+</sup>].

#### 2-Fluorpyrimidin modifiziert nach Brown *et al.* (89):[335]

Zu einer Lösung aus 2-Aminopyrimidin (16.0 g, 0.168 mol) in wäßriger HBF<sub>4</sub> (48-%ig, 577 mL) wurde bei -15 °C langsam eine Lösung aus Natriumnitrit (24.4 g, 0.353 mol) in H<sub>2</sub>O (100 mL) zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde die Lösung weitere 20 min bei -15 °C gerührt und anschließend mit einer wäßrigen 10 N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Nach dem Ausschütteln der Lösung mit Et<sub>2</sub>O (3 x 320 mL), wurde das Extrakt mit wäßriger Natriumcarbonat-Lösung (2-%ig, 1 x 64 mL) und mit H<sub>2</sub>O (2 x 64 mL) gewaschen. Die organische Phase trocknete man mit MgSO<sub>4</sub> und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde unter vermindertem Druck destillativ gereinigt. Man erhielt **89** (1.08 g , 7%) als farblose Flüssigkeit.

C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>FN<sub>2</sub>: 98.08 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8.81$  (dd, 2H), 7.58-7.52 (m, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 164.09$ , 162.00, 161.81, 160.68, 120.54, 120.47; GC-MS: *m/z* 98.0 (100) [M<sup>-</sup>].

#### 4-Chlorquinazolin modifiziert nach Schönowsky et al. (90):[336]

Eine Suspension aus 4-Hydroxychinazolin (50 g, 0.32 mol),  $PCl_5$  (70.5 g, 0.34 mol) in Phosphoroxychlorid (130 mL, 0.14 mmol) wurden 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abdestillieren von Phosphoroxychlorid wurde der Rückstand in  $CH_2Cl_2$  (500 mL) gelöst, mit Eiswasser (300 mL) gewaschen und schließlich wieder bis zur Trockne eingeengt. Nach dem Umkristallisieren in Hexan erhielt man **90** (24.5 g, 47%) als leicht gelblichen Feststoff.

C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>: 164.59 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 9.07$  (s, 1H), 8.18-8.15 (m, 1H), 8.00-7.89 (m, 2H), 7.71-7.64 (m, 1H) ; <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 159.54$ , 148.61, 140.71, 135.99, 128.79, 126.89, 121.87, 121.52; GC-MS: *m/z* 164.0 (66) [M<sup>-</sup>].

#### 4-Fluorquinazolin modifiziert nach van den Ham *et al.* (94):<sup>[338]</sup>

Eine Mischung aus 4-Chlorquinazolin (**90**) (2 g, 12.15 mmol) und trockenem KF (12 g, 206.5 mmol) wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit 8 h bei 250 °C erhitzt. Dabei schied sich sowohl gelbes 4-Chlorquinazolin als auch farblose Nadeln von 4-Fluorquinazolin am Rückflußkühler ab. Die farblosen Kristalle wurden vom Rückflußkühler abgekratzt und ohne weitere Reinigung für weitere Reaktionen eingesetzt.

C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>FN<sub>2</sub>: 148.14 g/mol

#### Trimethyl-(3-phenyl-propenyloxy)-silan nach House et al. (131):<sup>[386]</sup>

Unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit wurde zu einer Lösung aus Trimethylsilylchorid (2.54 mL, 0.02 mol), Triethylamin (5.6 mL, 0.04 mol) in trockenem DMF (6.6 mL) 3-Phenylpropan-1-al (2.19 mL, 0.017 mol) langsam hinzugetropft. Unmittelbar nach Zugabe bildete sich ein gelblicher Niederschlag. Das Reaktionsgemisch ließ man 6 h unter Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit Pentan (13 mL) verdünnt, mit kalter, gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen und die wäßrige Phase nochmals mit Pentan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden schnell mit kalter 1.5 N HCl (1 x 20 mL) und kalter, gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Man trocknete die Lösung mit MgSO<sub>4</sub> und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Man erhielt Trimethyl-(3-phenyl-propenyloxy)-silan (2.89 g, 82%) als gelbe Flüssigkeit.  $C_{12}H_{18}OSi: 206.36$  g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, cis- und trans-Isomerengemisch):  $\delta = 7.29-7.17$  (m, 10H), 6.35-6.28 (m, 2H), 5.20 (dt, 1H), 4.71 (dt, 1H), 3.47 (d, 2H), 3.27 (d, 2H), 0.21 (s, 18H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>, cis- und trans-

Isomerengemisch): δ =141.88, 141.43, 140,73, 138.47, 128.34-128.21, 125.86, 125.60, 110.51, 109.84, 33.62, 29.91,-0.44, -0.51; GC-MS: *m/z* 206.1 (49) [M<sup>-</sup>].

#### 2-Brom-3-phenyl-propionaldehyd nach Reuss et al. (132):[351]

Zu einer Lösung aus Trimethyl-(3-phenyl-propenyloxy)-silan (**131**) (15 g, 73 mmol) in trockenem Tetrachlorkohlenstoff (360 mL) wurde Brom (3.7 mL, 73 mmol, 1 Äquiv.) in Tetrachlorkohlenstoff (100 mL) so zugetropft, daß die Lösung stets farblos blieb. Nach ca. 4.5 h war die Zugabe beendet und das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Membranpumpenvakuum (ca. 20 mbar) destillativ aufgereinigt. Man erhielt 2-Brom-3-phenyl-propionaldehyd (11.05 g, 71%) als farblose Flüssigkeit.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO: 213.07 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 9.52$  (d, 1H), 7.32-7.24 (m, 5H), 4.92 (m, 1H), 3.52 (dd, 1H), 3.13 (dd, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 193.28, 137.00, 129.33, 128.37, 126.99, 56.02, 37.05;$  GC-MS: *m/z* 211.9 (<1) [M<sup>-</sup>].

#### 1-Brom-3-phenyl-propan-2-on nach Lohrisch et al. (133):[352]

Zu einer eisgekühlten, etherischen Lösung von Diazomethan, die aus Diazald® (5.35 g, 24.97 mmol, 3 Äquiv.) hergestellt wurde, tropfte man langsam ein Lösung aus Phenylessigsäurechlorid (1.10 mL, 8.32 mmol) in trockenem Diethylether (8 mL) hinzu. Nach erfolgter Zugabe wurde die Lösung 1 h bei RT gerührt, auf -10 °C gekühlt und langsam mit wäßriger HBr-Lösung (48%-ig. 8.32 mL. 64.70 mmol, 2.6 Äquiv.) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abermals 1 h bei RT gerührt, die Etherphase entfernt und die wäßrige Phase mit Diethylether (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x 10 mL) und mit Wasser (1 x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der Lösung über MgSO<sub>4</sub> entfernte man im Vakuum das Lösungsmittel. Ohne weiter Aufreinigung erhielt man 1-Brom-3-phenyl-propan-2-on (1.7 g, 96%) als farblose Flüssigkeit.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO: 213.07 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.32-7.20 (m, 5H), 4.44 (s, 2H), 3.94 (s, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 199.38, 134.22, 129.79, 128.63, 126.94, 45.96, 37.09; GC-MS: *m/z* 211.9 [M<sup>-</sup>].

#### 9-H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-isothiocyanat (134) nach Kearney et al.: [350]

Man löste trockenes Kaliumisothiocyanat (2.14 g, 22 mmol) in trockenem Essigsäureethylester (20 mL) und tropfte unter Eiskühlung in einer Argonatmosphäre eine Lösung aus Fmoc-Cl (5.2 g, 20 mmol) in trockenem Essigsäureethylester (20 mL) langsam hinzu. Nach erfolgter Zugabe entfernte man das Eisbad und ließ die Reaktionslösung 7 h bei RT rühren. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC-Chromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hexan 1:3) bestimmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels Flashchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hexan 2:3) aufgereinigt. Man erhielt **134** (1.41 g, 25 %) als gelbes Öl.

C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S: 281.33 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.78 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.44-7.24 (m, 4H), 4.47 (d, 2H), 4.28 (t, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  =150.53, 147.63, 142.78, 141.31, 128.11, 127.28, 125.04, 120.19, 70.71, 46.31; HPLC (40-100% in 30 min) R<sub>t</sub> = 24.82 min; GC-MS: *m/z* 280.8 (8) [M·].

#### 3-Amino-3-(4-methylphenyl)propionsäure (151):

p-Tolylaldehyd (4.72 mL, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **151** (3.27 g, 46%) als farblosen Feststoff.  $C_{10}H_{13}NO_2$ : 179.22 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA):  $\delta = 6.91$  (s, 4H), 4.54-4.48 (m, 1H), 3.12-3.04 (dd, 1H, J= 18.3, 10.4 Hz), 2.87-2.80 (dd, 1H, J= 18.3, 3.1 Hz), 1.98 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, TFA):  $\delta = 179.49$ , 144.81, 133.04, 132.08, 128.98, 56.30, 38.80, 21.99; HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 10.60 min; ESI-MS: *m/z* 359.0 (92) [2M+H<sup>+</sup>], 179.9 (100) [M+H<sup>+</sup>].

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(4-methylphenyl)propionsäure (152):

3-Amino-3-(4-methylphenyl)propionsäure (**151**) (2 g, 11.16 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (3.18 g, 12.28 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **152** (3.14 g, 70%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: 401.45 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.24$ , (br. s, 1H), 7.89 (m, 3H,), 7.68 (d, 2H, J= 6.9 Hz), 7.44-7.02 (m, 8H), 4.93-4.87 (m, 1H), 4.30-4.17 (m, 3H), 2.73-2.59 (m, 2H), 2.29 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 172.00$ , 155.47, 144.10, 140.88, 140.06, 136.23, 128.98, 127.77, 127.21, 126.46, 125.36, 120.28, 65.52, 51.55, 46.87, 41.30, 20.81; HPLC (0-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 28.58 min; ESI-MS: *m/z* 841.1 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 825.0 (68) [2M+Na<sup>+</sup>], 802.8 (28) [2M+H<sup>+</sup>], 424.1 (44) [M+Na<sup>+</sup>], 401.9 (22) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(3-methylphenyl)propionsäure (153):

m-Tolylaldehyd (4.72 mL, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **153** (3.55 g, 50%) als farblosen Feststoff.  $C_{10}H_{13}NO_2$ : 179.22 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA):  $\delta = 7.32-7.21$  (m, 2H), 7.16-7.07 (m, 2H), 4.83-4.44 (dd, 1H, J= 10.3, 3.7 Hz), 3.40 (dd, 1H, J= 18.7, 10.3 Hz), 3.14 (dd, 1H, J= 18.7, 3.7 Hz), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, TFA):  $\delta = 179.48$ , 143.21, 134.96, 134.07, 132.01, 129.49, 125.71, 56.15, 38.67, 21.90.

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(3-methylphenyl)propionsäure (154):

3-Amino-3-(3-methylphenyl)propionsäure (**153**) (2 g, 11.16 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (3.18 g, 12.28 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **154** (2.84 g, 63%) als farblosen Feststoff.  $C_{25}H_{23}NO_4$ : 401.45 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.23$  (s, 1H), 7.93-7.84 (m, 3H), 7.67 (d, 2H, J= 7.4 Hz), 7.46-7.02 (m, 8H), 4.95-4.86 (m, 1H), 4.31-4.14 (m, 3H), 2.74-2.58 (m, 2H), 2.29 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 171.94$ , 155.50, 144.11, 143.95, 143.02, 140.90, 137.47, 128.41, 127.79, 127.21, 125.38, 125.33, 123.62, 120.29, 65.57, 51.82, 46.88, 41.30, 21.30; HPLC (20-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.43 min; ESI-MS: *m/z* 841.1 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 825.1 (52) [2M+Na<sup>+</sup>], 802.9 (18) [2M+H<sup>+</sup>], 424.2 (24) [M+Na<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(2-methylphenyl)propionsäure (155):

o-Tolylaldehyd (4.63 mL, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **155** (3.27 g, 46%) als farblosen Feststoff.

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 179.22 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA):  $\delta = 7.32-7.21$  (m, 2H), 7.16-7.07 (m, 2H), 4.83-4.44 (dd, 1H, J= 10.3, 3.7 Hz), 3.40 (dd, 1H, J= 18.7, 10.3 Hz), 3.14 (dd, 1H, J= 18.7, 3.7 Hz), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, TFA):  $\delta = 179.35$ , 138.60, 134.44, 133.66, 133.15, 130.02, 127.02, 52.02, 39.00, 19.91; HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 9.79 min; ESI-MS: *m/z* 359.1 (75) [2M+H<sup>+</sup>], 180.0 (94) [M+H<sup>+</sup>].

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(2-methylphenyl)propionsäure (156):

3-Amino-3-*o*-tolyl-propionsäure (**155**) (2 g, 11.16 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (3.18 g, 12.28 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **156** (2.62 g, 58%) als farblosen Feststoff.  $C_{25}H_{23}NO_4$ : 401.45 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.26 (br. s, 1H), 7.98 (d, 1H, J= 8.6 Hz), 7.91-7.86 (m, 2H), 7.67 (d, 2H, J= 7.3 Hz), 7.45-7.08 (m, 8H), 5.22-5.15 (m, 1H), 4.31-4.16 (m, 3H), 2.71-2.55 (m, 2H), 2.36 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 171.93, 155.43, 143.99, 143.84, 141.34, 140.79, 127.63, 127.07, 126.85, 126.14, 125.71, 125.24, 125.18, 120.08, 65.54, 48.08, 46.85, 40.51, 18.77; HPLC (0-80% in 30 min)  $R_t = 28.47$  min; ESI-MS: *m/z* 841.1 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 825.1 (46) [2M+Na<sup>+</sup>], 802.9 (20) [2M+H<sup>+</sup>], 424.2 (26) [M+Na<sup>+</sup>], 401.9 (22) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(4-isopropylphenyl)-propionsäure (157):

4-Isopropylbenzaldehyd (6.07 mL, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **157** (4.16 g, 50%) als farblosen Feststoff.

C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>: 207.27 g/mol

#### 3-[N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(4-isopropylphenyl)-

#### propionsäure (158):

3-Amino-3-(4-isopropylphenyl)-propionsäure (157) (2 g, 9.65 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (2.74 g, 10.61 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab 158 (2.62 g, 72%) als farblosen Feststoff.  $C_{27}H_{27}NO_4$ : 429.51 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.23$  (s, 1H), 7.92-7.83 (m, 3H), 7.67 (d, 2H, J= 7.4 Hz), 7.44-7.13 (m, 8H), 4.95-4.87 (m, 1H), 4.30-4.15 (m, 3H), 2.91-2.81 (m, 1H), 2.74-2.58 (m, 2H), 1.19 (d, 6H, J= 6.9 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 171.94$ , 156.79, 155.47, 147.21, 144.16, 140.90, 127.76, 127.22, 126.50, 126.36, 125.32, 120.28, 65.16, 51.52, 46.91, 40.71, 33.26, 24.06; HPLC (0-80% in 30 min)  $R_t = 30.87$  min; ESI-MS: *m/z* 897.1 (30) [2M+K<sup>+</sup>], 881.0 (26) [2M+Na<sup>+</sup>], 858.8 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 452.2 (11) [M+Na<sup>+</sup>], 429.9 (57) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(4-ethylphenyl)-propionsäure (159):

4-Ethylbenzaldehyd (5.48 mL, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **159** (3.82 g, 49%) als farblosen Feststoff.

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: 193.24 g/mol

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 12.63$  min; ESI-MS: m/z 409.0 (27) [2M+Na<sup>+</sup>], 387.0 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 194.0 (100) [M+H<sup>+</sup>].

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(4-ethylphenyl)-propionsäure (160):

3-Amino-3-(4-ethylphenyl)-propionsäure (**159**) (2 g, 10.35 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (2.94 g, 11.38 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **160** (2.44 g, 57%) als farblosen Feststoff.

C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>: 415.48 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.26$  (s, 1H), 7.92-7.85 (m, 3H), 7.70-7.65 (m, 2H), 7.43-7.12 (m, 8H), 4.97-4.87 (m, 1H), 4.27-4.18 (m, 3H), 2.77-2.48 (m, 4H), 1.15 (t, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 171.96$ , 156.83, 155.50, 144.12, 142.62, 140.90, 140.31, 127.78, 127.23, 126.54, 125.34, 120.30, 65.53, 51.57, 46.93, 41.27, 27.99, 15.81; ESI-MS: *m/z* 869.1 (80) [2M+K<sup>+</sup>], 853.0 (91) [2M+Na<sup>+</sup>], 830.8 (65) [2M+H<sup>+</sup>], 438.1 (62) [M+Na<sup>+</sup>], 415.9 (40) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(4-nitrophenyl)-propionsäure (161):

4-Nitrobenzaldehyd (6.04 g, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **161** (7.65 g, 91%) als gelben Feststoff.  $C_9H_{10}N_2O_4$ : 210.19 g/mol

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 16.00$  min; ESI-MS: m/z 496.1 (100).

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(4-nitrophenyl)-propionsäure (162):

3-Amino-3-(4-nitrophenyl)-propionsäure (**161**) (2.56 g, 12.18 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (3.47 g, 13.40 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **162** (2.10 g, 40%) als gelblichen Feststoff.

 $C_{24}H_{20}N_2O_6$ : 432.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.93$  (s, 1H), 8.20 (d, 2H), 8.09 (d, 1H), 7.89 (d, 2H), 7.67-7.63 (m, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.42-7.27 (m, 4H), 5.05-4.99 (m, 1H), 4.31-4.18 (m, 3H), 2.74-2.63 (m, 2H);<sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 167.48$ , 164.99, 148.10, 140.96, 139.74, 136.62, 132.00, 130.38, 129.08, 127.83, 127.27, 125.31, 124.16, 123.79, 120.33, 66.58; ESI-MS: *m/z* 903.0 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 864.9 (10) [2M+H<sup>+</sup>], 432.9 (6) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(3-nitrophenyl)-propionsäure (163):

3-Nitrobenzaldehyd (2.72 g, 18 mmol), Malonsäure (1.87 g, 18 mmol) und Ammoniumacetat (2.78 g, 36 mmol) wurden in EtOH (27 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **163** (2.22 g, 59%) als gelblichen Feststoff.  $C_9H_{10}N_2O_4$ : 210.19 g/mol

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 15.77$  min; ESI-MS: m/z 496.1 (100).

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(3-nitrophenyl)-propionsäure (164):

3-Amino-3-(3-nitrophenyl)-propionsäure (**163**) (2.50 g, 11.89 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (3.39 mmol, 13.09 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **164** (2.94 g, 57%) als gelblichen Feststoff.  $C_{24}H_{20}N_2O_6$ : 432.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.92$  (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.12 (d, 2H), 7.87-7.62 (m, 6H), 7.38-7.28 (m, 4H), 5.05 (m, 1H), 4.31-4.21 (m, 3H), 2.74 (m, 2H); HPLC (0-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 27.54 min; ESI-MS: *m/z* 903.0 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 864.8 (48) [2M+H<sup>+</sup>], 423.9 (22) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propionsäure (165):

2-Nitrobenzaldehyd (6.04 g, 40 mmol), Malonsäure (4.16 g, 40 mmol) und Ammoniumacetat (6.17 g, 80 mmol) wurden in EtOH (60 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **165** (6.06 g, 72%) als beigefarbenen Feststoff.  $C_9H_{10}N_2O_4$ : 210.19 g/mol

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 14.35$  min; ESI-MS: m/z 496.1 (100)

# 3-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino]-3-(2-nitrophenyl)-propionsäure (166):

3-Amino-3-(2-nitrophenyl)-propionsäure (**165**) (2.20 g, 10.47 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (2.98 g, 11.52 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **166** (2.05 g, 45%) als gelblichen Feststoff.

 $C_{24}H_{20}N_2O_6$ : 432.43 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.92$  (s, 1H), 8.23 (d, 1H), 7.92-7.24 (m, 12H), 5.37 (m, 1H), 4.25-4.17 (m, 3H), 2.73 (d, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 171.40$ , 155.49, 148.33, 144.01, 143.76, 140.86, 138.05, 133.93, 128.61, 128.38, 127.78, 127.21, 125.24, 124.18, 120.29, 65.64, 47.51, 46.79; ESI-MS: *m/z* 903.8 (51) [2M+K<sup>+</sup>], 864.8 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 455.1 (12) [M+Na<sup>+</sup>], 432.9 (77) [M+H<sup>+</sup>].

#### 4-(2-Amino-1-tert-butoxycarbonylmethyl-ethyl)-benzoesäure (167):

4-Carboxybenzaldehyd (2.81 g, 18.73 mmol), Malonsäure-*tert*-butylester (3.0 g, 18.73 mmol) und Ammoniumacetat (2.88 g, 37.3 mmol) wurden in EtOH (28 mL) nach AAV 12 umgesetzt. Man erhielt **167** als gelblichen Feststoff.  $C_{14}H_{19}NO_4$ : 265.31 g/mol

ESI-MS: *m/z* 265.9 (44) [M+H<sup>+</sup>].

### $\label{eq:2-1} 4-(2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy carbony lamino)-1-\textit{tert}-butoxy carbony lmethyl-butoxy carbony lmet$

#### ethyl)-benzoesäure (168)

4-(2-Amino-1-*tert*-butoxycarbonylmethyl-ethyl)-benzoesäure (**167**) (1.5 g, 5.65 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (1.56 g, 6.03 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **168** als farblosen Feststoff.  $C_{29}H_{29}NO_6$ : 487.54 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.22$  (s, 1H), 8.10-7.29 (m, 13H), 5.03-4.96 (m, 1H), 4.37-4.18 (m, 3H), 2.68 (d, 2H), 1.30 (s, 9H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 29.81 min; ESI-MS: *m/z* 997.0 (88) [2M+Na<sup>+</sup>], 975.0 (72) [2M+H<sup>+</sup>], 510.2 (88) [M+Na<sup>+</sup>], 487.9 (94) [M+H<sup>+</sup>].

#### N-Phenethylformamid nach Gretler et al. (169):[359]

Eine Lösung aus 2-Phenylethylamin (41.45 mL, 0.33 mol) in 97%-iger Ameisensäure (100 mL) wurde langsam auf 200 °C erhitzt. Dabei destillierte überschüssiges Wasser und Ameisensäure ab. Nach einstündigem Rühren bei 200 °C ließ man die Reaktionsmischung abkühlen und reinigte sie mittels Destillation im Hochvakuum (Ölbadtemperatur 200 °C) auf. Man erhielt *N*-Phenethylformamid als farblose Flüssigkeit.

#### 3,4-Dihydroisoquinolin nach Gretler et al. (170):[359]

Polyphosphorsäure (25 g) wurde unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit mit  $P_2O_5$  (5.4 g, 19.02 mmol) 1 h bei 180 °C erhitzt. Zu dieser "Super-PPA" tropfte man langsam *N*-Phenethylformamid (169) (4.3 g, 28.82 mmol) hinzu und ließ den Reaktionsansatz 1.5 h bei 160 °C rühren. Nach langsamen Abkühlen wurde der Ansatz mit Wasser (40 mL) verdünnt, unter Eiskühlung mit gesättigter, wäßriger NaOH-Lösung (ca. 100 mL) auf pH 9 eingestellt und mit Diethylether (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaOH getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Um eine Disproportionierung zu vermeiden wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet und man erhielt 3,4-Dihydroisoquinolin (3.5 g, 93%) als braunes Öl.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N: 131.17 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 8.32$  (m, 1H), 7.40-7.18 (m, 4H), 3.66-3.59 (m, 2H), 2.75-2.62 (m 2H).

#### (1,2,3,4 Tetrahydroisoquinolin-1-yl)-essigsäure nach Pelletier et al. (171):[360]

Eine Mischung aus 3,4-Dihydroisoquinolin (**170**) (2 g, 15.24 mmol) und Malonsäure (1.74 g, 16.72 mmol) wurde in einem auf 120 °C vorgeheizten Kolben eingebracht und 1 h bei 120 °C erhitzt. Dabei entwich CO<sub>2</sub>. Ohne weiter Reinigung erhielt man (1,2,3,4 Tetrahydroisoquinolin-1-yl)-essigsäure (2.89 g, 99%) als leicht bräunlichen Feststoff.

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: 191.23 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA): δ =7.35-7.26 (m, 2H), 7.23-7.12 (m, 2H), 5.03 (br. s, 1H), 3.84-3.74 (m, 1H), 3.67-3.56 (m, 1H), 3.40-3.32 (m, 4H), 3.29-3.20 (m, 1H), 3.19-3.10 (m, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, TFA): δ = 179.35, 132.95, 131.89, 131.80, 130.60, 130.35, 127.52, 55.90, 43.71, 38.10; 27.25; HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t$  = 9.82 min; ESI-MS: *m/z* 404.9 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 214.1 (26) [M+Na<sup>+</sup>], 192.1 (36) [M+H<sup>+</sup>].

### 1-Carboxymethyl-3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-carboxylsäure-9-*H*-fluoren-9ylmethylester (172):

(1,2,3,4 Tetrahydroisoquinolin-1-yl)-essigsäure (**171**) (1.50 g, 7.84 mmol) wurde über Nacht nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (2.23 g, 8.63 mmol, 1.1 Äquiv.) umgesetzt. Lyophilisieren aus *tert*-Butanol ergab **172** (2.79 g, 86%) als gelbes Öl.

C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: 413.47 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.36$  (br. s, 1H), 7.93-7.75 (m, 2H), 7.70-7.58 (m, 2H), 7.44-7.04 (m, 8H), 5.59-5.46 (m, 1H), 4.48-4.37 (m, 1H), 4.35-4.22 (m, 2H), 4.04-3.92 (m, 1H), 3.75-3.65 (m, 1H), 2.85-2.53 (m, 4H); <sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, DMSO):  $\delta = 171.65$ , 154.49, 143.96, 140.78, 136.33, 133.94, 128.77, 127.58, 127.04, 126.83, 126.09, 125.15, 124.93, 120.03, 66.64, 51.53, 46.76, 41.25, 38.12, 27.53; HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 15.51 min; ESI-MS: *m/z* 865.3 (68) [2M+K<sup>+</sup>], 849.2 (45) [2M+Na<sup>+</sup>], 826.8 (40) [2M+H<sup>+</sup>], 436.3 (20) [M+Na<sup>+</sup>], 414.1 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-(3-Methylphenyl)-glutarsäure (193):

m-Tolylaldehyd (3.5 mL, 30 mmol), Acetessigsäureethylester (7.7 mL, 60 mmol) und Piperidin ( $405\mu$ L, 4.09 mmol) wurden nach AAV 13 umgesetzt. Man erhielt **193** (3.00 g, 45%) als braunes Öl.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>: 222.24 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta = 12.05$  (br. s, 2H), 7.18-7.12 (m, 1H), 7.06-6.97 (m, 3H), 3.44-3.32 (m, 1H), 2.66-2.44 (m, 4H), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta = 173.16$ , 143.69, 137.45, 128.41, 128.38, 127.39, 124.74, 40.50, 38.19, 21.36.

#### 3-(4-Methylphenyl)-glutarsäure (194):

p-Tolylaldehyd (3.5 mL, 30 mmol), Acetessigsäureethylester (7.7 mL, 60 mmol) und Piperidin ( $405\mu$ L, 4.09 mmol) wurden nach AAV 13 umgesetzt. Man erhielt **194** (1.90 g, 29%) als gelbe Nadeln.

 $C_{12}H_{14}O_4$ : 222.24 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.02 (s, 2H), 7.13 (d, 2H, J= 7.9 Hz), 7.06 d 2H, J= 8.3 Hz), 3.42-3.33 (m, 1H), 2.60 (dd, 2H, J= 15.7, 6.6 Hz), 2.47 (dd, 2H, J= 15.3, 8.3 Hz), 2.24 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (128.7 MHz, DMSO):  $\delta$  = 172.76, 140.36, 135.31, 128.75, 127.25, 40.27, 37.56, 20.55.

#### 3-(3-Methylphenyl)-glutarsäureanhydrid (195):

3-(3-Methylphenyl)-glutarsäure (**193**) (2.85 g, 12.82 mmol) und Essigsäureanhydrid (12.2 mL, 129.30 mmol) wurden nach AAV 14 umgesetzt. Man erhielt 3-(3-Methylphenyl)-glutarsäureanhydrid (3.13 g, 120%) als braunen Feststoff.  $C_{12}H_{12}O_3$ : 204.22 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.27-7.21 (m, 1H), 7.10-7.06 (m, 3H), 3.57-3.44 (m, 1H), 3.10-2.89 (m, 4H), 2.29 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.63, 140.98, 138.17, 128.92, 128.10, 127.58, 123.87, 36.45, 33.04, 21.25; EI-MS: *m/z* 203.9 (54) [M·].

#### 3-(4-Methylphenyl)-glutarsäureanhydrid (196):

3-(4-Methylphenyl)-glutarsäure (**194**) (1.80 g, 8.10 mmol) und Essigsäureanhydrid (7.7 mL, 81.61 mmol) wurden nach AAV 14 umgesetzt. Man erhielt 3-(4-Methyl)-glutarsäureanhydrid (1.57 g, 95%) als gelben Feststoff.

C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>: 204.22 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.18-7.13 (m, 4H), 3.56-3.44 (m, 1H), 3.01-2.89 (m, 4H), 2.26 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.66, 138.00, 136.61, 129.53, 126.73, 36.50, 32.70, 20.79; EI-MS: *m/z* 204.0 (31) [M·].

# 5-[*N*'-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-isobutyl-hydrazino]-5-oxo-3-*m*-tolyl-pentansäure (197):

N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester (50) (0.60 g, 1.93 mmol)
und 3-(m-Tolyl)-glutarsäureanhyrid (195) (0.40 g, 1.96 mmol) wurden gemäß AAV
15 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flashchromatographie erhielt man 197 (0.54 g, 54%) als gelblichen Feststoff.

 $C_{31}H_{34}N_2O_5{:}\ 514.61\ g/mol$ 

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 30.03$  min; ESI-MS: m/z 1067.4 (48) [2M+K<sup>+</sup>], 1051.4 (36) [2M+Na<sup>+</sup>], 553.2 (82) [M+K<sup>+</sup>], 537.3 (100) [M+Na<sup>+</sup>], 515.3 (20) [M+H<sup>+</sup>].

### 5-[*N*'-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-isobutyl-hydrazino]-5-oxo-3-(4methylphenyl)-pentansäure (198):

N'-Isobutyl-hydrazincarbonsäure-9*H*-fluoren-9-ylmethylester (**50**) (0.60 g, 1.93 mmol) und 3-(4-Methylphenyl)-glutarsäureanhyrid (**196**) (0.40 g, 1.96 mmol) wurden gemäß AAV 15 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flashchromatographie erhielt man **198** (0.71 g, 71%) als gelblichen Feststoff.

 $C_{31}H_{34}N_2O_5{:}\ 514.61\ g/mol$ 

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 30.07$  min; ESI-MS:  $m/z \ 1067.1 \ (100) \ [2M+K^+],$ 1051.3 (19)  $[2M+Na^+], \ 553.3 \ (82) \ [M+K^+], \ 537.3 \ (30) \ [M+Na^+], \ 515.3 \ (21) \ [M+H^+].$
#### 8.3 Festphasensynthese

#### 8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV 18: Belegung des TCP-Harzes:

Zu trockenem TCP-Harz (maximale Belegungsdichte 0.9 mmol/g Harz, 1.0 g) werden die *N*-terminal geschützte Aminosäure (1.26 mmol, 1.4 Äquiv.), trockenes  $CH_2Cl_2$ (8 mL) und DIPEA (1.01 mmol, 1.12 Äquiv.) hinzugefügt. Nach fünfminütigem Schütteln bei RT gibt man weiteres DIPEA (2.38 Äquiv.) in trockenem  $CH_2Cl_2$  (2 mL) langsam hinzu. Diese Suspension wird für 45 min bei RT geschüttelt. Zum *Cappen* von nicht umgesetzten Trityl-Gruppen wird anschließend Methanol (1 mL) hinzugefügt und weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit folgenden Waschlösungen gewaschen:  $CH_2Cl_2$  (3 x je 3 min), DMF (3x je 3 min) und abschließend nochmals mit  $CH_2Cl_2$  (3 x je 3 min). Das Harz wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung der Beladung konnte entweder photometrisch (AAV 21) oder gravimetrisch nach folgender Formel ermittelt werden:

Belegungsgrad 
$$[mmol / g] = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 1000}{(Mw - 36.46) \cdot m_2}$$

m<sub>1</sub> = Masse des eingesetzten Harzes [g]

 $m_2$  = Gesamtmasse des Harzes nach der Belegung [g]

Mw = Molgewicht der *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure [g/mol]

Der Fehler, der durch die unterschiedlichen Massen von Cl- und MeO- entsteht, ist vernachlässigbar.

### AAV 19: Belegung von OH-funktionalisierten Harzen nach Blankemeyer-Menge et al.:[387]

Die Quellung des Harzes erfolgt jeweils 5 min mit trockenem DMF und anschließend mit trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Zu einer 0.1 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter, wasserfreier Aminosäure (2 Äquiv.) (Fmoc-Aminosäuren mit Kristallwasser werden zuvor aus

Dioxan lyophilisiert) in trockenem  $CH_2Cl_2$  fügt man *N*-Methylimidazol (1.5 Äquiv.) und MNST (2 Äquiv.) hinzu. Falls die Fmoc-Aminosäure nur sehr schlecht löslich sein sollte, so wird etwas abs. THF zugegeben. Diese Lösung wird unter Argon zum Harz gegeben. Nach 1 h wird das Harz mit  $CH_2Cl_2$  (3 x je 3 min) und DMF (3x je 3 min) gewaschen. Nicht umgesetzte OH-Gruppen werden mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid (2 mL), DIPEA (3.4 mL) und DMF (30.6 mL) *gecappt*. Abschließend wird das Harz jeweils mit DMF (3 x je 3 min), Methanol (3x je 3 min) und  $CH_2Cl_2$  (3 x je 3 min) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung der Beladung erfolgt photometrisch (AAV 21).

#### AAV 20: Belegung von Formyl-Harzen mit Aminen:

Zunächst läßt man das Formyl-Harz (0.26 g, 0.13 mmol) 5 min in einer Lösung aus DCE (2 mL) und TMOF (2 mL) quellen. Anschließend wird das entsprechende Amin (2 mmol) und NaBH(OAc)<sub>3</sub> (0.422 g, 2 mmol) hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht bei RT geschüttelt. Während der gesamten Reaktionsdauer löst sich das NaBH(OAc)<sub>3</sub> nicht vollständig auf. Das Harz wird mit DMF (3 x je 5 min), 10% DIPEA in DMF (3 x je 5 min), DMF (3 x je 5 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x je 5 min) gewaschen und abschließend im Hochvakuum getrocknet.

## AAV 21: Photometrische Bestimmung der Harzbelegung nach Meienhofer *et al.*:[388]

Bei dieser Methode wird die Belegung des Harzes indirekt über die UVspektroskopische Quantifizierung des Benzofulven-Piperidin-Komplexes bestimmt. Dazu wird ein mit einer Fmoc-Aminosäure beladenes Harz (0.02 g) zweimal je 15 Minuten mit einer 20%-igen Piperidin/DMF-Lösung versetzt. Anschließend wäscht man das Harz je dreimal mit DMF und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Wird ein TentaGel-Harz verwendet, so muß dieses noch zusätzlich zweimal mit Diethylether gewaschen werden. Die Abspaltlösungen und Waschlösungen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf 50 mL verdünnt. Daraus werden wiederum 0.100 mL entnommen und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf 1 mL verdünnt. Die Absorption wird bei den Wellenlängen 267 nm ( $\epsilon$ =17500), 290 nm ( $\epsilon$ =5800), 301 nm ( $\epsilon$ =7800) bestimmt . Der Belegungsgrad kann mit folgender Formel ermittelt werden:

$$Belegungsgrad[mmol/g] = \frac{E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot m_{Harz}} \cdot 10^{6}$$

*E*= Extinktion, *V*= Gesamtvolumen der verdünnten Probe [1],  $\varepsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient, *d*= Küvettendicke [cm], *m*<sub>Harz</sub>= Masse des eingesetzten Harzes [mg]

#### AAV 22: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe:

Das Harz (1 g) wird für 5 min mit DMF (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 20 %-iger Piperidin/DMF Lösung (2 x 10 mL, 15 min). Das Harz wird anschließend mit DMF (5 x 10 mL, je 3 min) gewaschen.

#### AAV 23: Kupplungen mit TBTU/HOBt:

Das harzgebundene, freie Amin wird mit NMP (3 x je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1-0.25 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), TBTU (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), HOBt·H<sub>2</sub>O (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) und DIPEA (9 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 min. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x je 3 min) gewaschen.

#### AAV 24: Kupplungen mit HATU/HOAt:

Das harzgebundene, freie Amin wird mit NMP (3 x je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1-0.25 M Lösung aus Fmoc-geschützter Aminosäure (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), HATU (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) und *sym*-Collidin (30 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 min. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x je 3 min) gewaschen.

#### AAV 25: Kupplungen mit DIC:

Das harzgebundene, freie Amin wird mit NMP (3 x je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1 M Lösung der entsprechenden Säurekomponente (10 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) und DIC (15 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 4 h. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x je 3 min) gewaschen.

## AAV 26: Kupplungen mittels gemischter Anhydride modifiziert nach Frochot *et al.*:[318]

In einer Argon-Atmosphäre wird die zu kuppelnde, Fmoc-geschützte Aminosäure (0.5 mmol, 5 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung) und trockenes NMM (55  $\mu$ L, 0.5 mmol, 5 Äquiv.) in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) gelöst und mit einer Eis-Kochsalzmischung auf -15 °C abgekühlt. Anschließend fügt man Methylchloroformiat (39  $\mu$ L, 0.5 mmol, 5 Äquiv.) hinzu. Die Lösung wird für 15 min gerührt. Dabei bildet ein farbloser Niederschlag. Die Lösung wird mit jener Spritze aufgezogen, in der sich auch das Harz mit den freien Amino-Gruppen (0.1 mmol, 1 Äquiv.) befindet. Die Suspension aus Harz und Kupplungslösung läßt man auf RT erwärmen und rotiert die Spritze für weitere 5 h bei RT. Das Harz wird anschließend mit NMP (10 mL, 5 x je 3 min) gewaschen.

#### AAV 27: Kupplungen mit Säurechloriden modifiziert nach Kunz et al.: [319]

Zu einer auf -20 °C gekühlten Lösung aus Fmoc-Aminosäurechlorid (25 mmol) in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) fügt man unter Feuchtigkeitsausschluß trockenes Pyridin (25 mmol) hinzu. Diese Lösung wird zum Harz hinzugefügt. Die Harzsuspension läßt man über Nacht bei RT rühren. Das Harz wird anschließend mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL, 3 x je 3 min) und NMP (10 mL, 5 x je 3 min) gewaschen.

# AAV 28: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppen-strategie:

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure und die Kupplung einer weiteren *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	NMP	Quellen	2	3
2	20% Piperidin/DMF	Entschützten	2	15
3	NMP	Waschen	4	3
4	Fmoc-AS-OH	Kuppeln	1	60
	Kupplungsreagenz/Base			
5	NMP	Waschen	7	3

Wird die Synthese an einer Stelle unterbrochen, so wäscht man das Harz mit DMF (5 x 10 mL, je 3 min),  $CH_2Cl_2$  (5 x 10 mL, je 3 min) und trocknet es im Vakuum. Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe analog der Schritte 1-3 des Fließschemas entfernt.

#### AAV 29: Abspaltung seitenkettengeschützter Peptide vom TCP-Harz:

Das Harz (0.6 g) wird zunächst mit  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min) gewaschen und dann 1 h mit einem 8:1:1 Gemisch aus  $CH_2Cl_2$ :TFE:HOAc (10 mL) versetzt. Man wäscht das Harz mit einem 8:1:1 Gemisch aus  $CH_2Cl_2$ :TFE:HOAc (3 x 10 mL, je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert. Abschließend lyophilisiert man das vollgeschützte Peptid aus *tert*-Butanol.

## AAV 30: Abspaltung der *tert*-Butyl-Seitenkettenschutzgruppen von harzgebundenen Verbindungen:

Das mit Photolinker belegte TentaGel-Harz (0.5 g) wird mit  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min) gewaschen und mit einem 95:2.5:2.5 Gemisch TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O für 1-2 h versetzt. Anschließend wäscht man das Harz mit  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min) und einer Lösung von 20% DIPEA in  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min). Es folgen abermals Waschschritte mit  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min) und  $Et_2O$  (3 x 10 mL, je 5 min). Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet.

#### AAV 31: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom Wang-Harz:

Das Harz (0.6 g) wird zunächst mit  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL, je 5 min) gewaschen und dann mit einem 95:2.5:2.5 Gemisch aus TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O (10 mL) für 1 h versetzt. Das Harz wird mit einem 95:5 Gemisch TFA:H<sub>2</sub>O gewaschen (3 x 10 mL, je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert.

#### AAV 32: Abspaltung vom Fmoc-Aminoethyl-Photolinker-TentaGel-Harz:

Die photolytische Abspaltung seitenkettengeschützter Verbindungen vom Harz erfolgt in Kunststoffspritzen mit PP-Fritten und einer 3:1 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O Mischung als Lösungsmittel. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines Magnetrührers. Die Suspension wird mit einer 150 W Quecksilber-Hochdruck-Lampe (TQ 150 Z2 von *Heraeus*) bestrahlt (1-3 h). Der Überstand wird abgetrennt und das zurückbleibende Harz wird mit einer 3:1 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O Mischung (3 x je 3 min) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

Die Abspaltung ungeschützter Verbindungen erfolgt analog. Allerdings wird hierfür CH<sub>3</sub>CN:MeOH (1:3) als Lösungsmittel verwendet.

## AAV 33: Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe an der Festphase nach Kates *et al.*:[389]

Alle verwendeten Lösungen werden zuvor im Ultraschallbad entgast und mit einem Argonstrom von eventuell gelöstem Luftsauerstoff befreit. Alle Schritte werden unter Argon durchgeführt. Das Harz (1 g) wird mit einem 37:2:1 Gemisch aus CHCl<sub>3</sub>:HOAc:NMM (2 x 10 mL, je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer  $Pd(PPh_3)_4$  (3 Äquiv. Lösung bezogen auf die Harzbelegung) aus und CHCl<sub>3</sub>:HOAc:NMM (37:2:1) (15 mL) versetzt. Nach 16 h wäscht man das Harz mit 0.5 % DIPEA in DMF (3 x 20 mL, je 5 min), 0.5 % Natriumdiethlydithiocarbamat in DMF (5 x 20 mL, je 10 min), DMF (3 x 20 mL, je 3 min) und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL, je 3 min). Danach wird das Harz im Vakuum getrocknet.

#### AAV 34: Abspaltung von Dmab-Schutzgruppen an der Festphase:

Vor Abspaltung der Dmab-Schutzgruppe muß die Fmoc-Schutzgruppe entfernt werden (s. AAV 22). Das Harz (1 g) wird mit DMF (3 x 10 mL, je 3min) gewaschen und mit einer Lösung aus 2 % Hydrazin in DMF (2 x 10 mL, 5min) entschützt. Das Harz wird anschließend mit einer 5 %-igen Lösung DIPEA in DMF (2 x 10 mL, 5 min) und DMF (6 x 10 mL, 5 min) gewaschen.

#### AAV 35: Cyclisierung von geschützten Peptiden am Harz:

Das Harz (1 g) wird mit DMF (3 x 10 mL, je 3 min) gewaschen und anschließend 26 h mit einer Lösung aus DIC (3 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), HOAt (6 Äquiv.) und *sym*-Collidin (25 Äquiv.) in DMF (10 mL) versetzt. Die Kupplung wird durch Waschen mit DMF (3 x 10 mL, je 3 min) und  $CH_2Cl_2$  (3 x 10mL, je 3 min) beendet.

# AAV 36: Einbau von 2-(Chlorocarbonyl)-1-Fmoc-2-alkylhydrazin-Derivaten an der Festphase nach Gibson *et al.*:[315]

Unter einer Argonatmosphäre wird das freie harzgebundene Amin (1 Äquiv.) mit trockenem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und mit einer 0.1 M Lösung aus dem

entsprechenden Fmoc-azaXaa-Cl (5.1 Äquiv.) in trockenem DMF und DIPEA (5.5 Äquiv.) versetzt. Nach 15 h beendet man die Reaktion durch Waschen mit NMP (5 x je 5 min) und  $CH_2Cl_2$  (5 x je 5 min). Das Harz wird im Vakuum getrocknet.

## AAV 37: Synthese von 2-(2-Nitro-phenylamino)-3-alkyl/aryl-propionsäure-Derivaten an der Festphase:

Das harzgebundene Fluor-nitrobenzoesäurederivat wird zunächst mit DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 1M Lösung aus dem Natrium-Salz einer Aminosäure (50 Äquiv.) in DMF:H<sub>2</sub>O (2:1) versetzt. Man läßt die Harzsuspension ü.N. bei 60 °C schütteln. Danach wird das Harz mit DMF (3 x je 5 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x je 5 min) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Wird hingegen ein Amin als Nukleophil verwendet, so setzt man eine 1M Lösung des Amins (50 Äquiv.) in DMF ein.

### AAV 38: Reduktive Alkylierung an der Festphase nach Krchnak *et al.*:[390]

Das freie, harzgebundene Amin wird mit trockenem DMF (3 x je 5 min) und TMOF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.17 M Lösung aus dem entsprechenden Aldehyd (5 Äquiv.) in TMOF versetzt. Nach 5 h wäscht man das Harz mit  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) und füllt eine 0.1 M Suspension Natriumtriacetoxyborhydrid (5 Äquiv.) in  $CH_2Cl_2$  in die Spritze ein. Nach 16 h wird das Harz mit DMF (3 x je 5 min) und  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) gewaschen. Das Trocknen des Harzes erfolgt im Hochvakuum.

#### AAV 39: Reduktion von Nitroaromaten an der Festphase:

Der harzgebundene Nitroaromat wird mit DMF (3 x je 5 min) gewaschen und mit einer 2 M SnCl<sub>2</sub>-Lösung (38 Äquiv.) in DMF versetzt. Man läßt die Harzsuspension 48 h bei RT schütteln. Danach wird das Harz mit DMF (3 x je 5 min),  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

## AAV 40: Synthese von *N*-subsituierten Thiazole an der Festphase nach Kearney *et al.*:[350]

Das freie, harzgebundene Amin wird mit DMF (3 x je 5 min) und trockenem  $CH_2Cl_2$ (3 x je 5 min) gewaschen und mit einer 0.2 M Lösung aus Fmoc-NCS in trockenem  $CH_2Cl_2$  versetzt. Nach 20 min wird das Harz mit  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) und DMF (3 x je 5 min) gewaschen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt nach AAV 22. Anschließend wird das Harz mit DMF (3 x je 5 min) und trockenem Dioxan (3 x je 5 min) gewaschen. Man versetzt das harzgebundene Thioharnstoffderivat mehrmals mit einer 0.1 M Lösung des entsprechenden Brom-Ketons (5 Äquiv., 3 x je 1 h) in trockenem Dioxan. Das Harz wird mit  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

## AAV 41: Einführung von elektronenarmen Aromaten durch nukleophile,

#### aromatische Substitution an der Festphase modifiziert nach Gibson *et al.*:[339]

Das harzgebundene Amin wird zunächst mit trockenem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.5 M Lösung aus 2-Fluorpyrimidin (15 Äquiv.), DIPEA (15 Äquiv.) in trockenem DMF versetzt. Nach 24 h Schütteln bei RT wir die Reaktion durch Waschen mit DMF (3 x je 5 min) und  $CH_2Cl_2$  (3 x je 5 min) abgebrochen. Abschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

## AAV 42: Sonogashira-Kupplung an der Festphase nach Tan et al.:[391]

Das Harz wird mit trockenem, entgastem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer trockenen, entgasten Lösung aus CuI (2.2 Äquiv.), Bis(triphenylphosphin)-palladium-(II)-chlorid (1.5 Äquiv.), DIPEA (30 Äquiv.), Iodaromat (20 Äquiv.) in DMF (41  $\mu$ L DMF pro mmol Harzbelegung) versetzt. Die Suspension wird mindestens 2 h bei RT geschüttelt und anschließend mit DMF (3 x je 5 min), 0.5% DIPEA in DMF (3 x je 5 min), 0.5% Dithiocarbamat in DMF (3 x je 5 min), DMF (3 x je 5 min) und abschließend mit CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> gewaschen. Die Trocknung des Harzes erfolgt im Hochvakuum.

#### AAV 43: Heck-Kupplungen an der Festphase

Das Harz wird mit trockenem, entgastem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer trockenen, entgasten Lösung aus  $Pd_2(dba)_3$  (2.1 Äquiv.), Tris(2tolylphosphin) (4.2 Äquiv.) in DMF (17 mL DMF pro mmol Harzbelegung) versetzt. In einem zweiten Schritt fügt man die trockene, entgaste Lösung des Iodaromaten (12.5 Äquiv.) und trockenes Triethylamin (30.1 Äquiv.) hinzu. Die Suspension wird mindestens 24 h bei 60 °C geschüttelt und anschließend mit DMF (3 x je 5 min), 0.5% DIPEA in DMF (3 x je 5 min), 0.5% Dithiocarbamat in DMF (3 x je 5 min), DMF (3 x je 5 min) und abschließend mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen. Die Trocknung des Harzes erfolgt im Hochvakuum.

#### **8.3.2** Synthese von α4-Integrinantagonisten

Die Synthese cyclischer LDT-Peptide wurde an einem automatischen Peptidsynthesizer Syro II nach AAV 28 und AAV 23 durchgeführt. Die Cyclisierung der Verbindungen erfolgte gemäß AAV 29 und AAV 10.

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 20-80</sub>	log P	%
10	c(2Nal-L-D-T-D-p)	C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub>	738.80	739.2 (99)	15.60	-1.91	12%
11	c(Bpa-L-D-T-D-p)	$C_{39}H_{48}N_6O_{12}$	792.85	793.2 (89)	15.45	n.d.	12%
12	c(Cha-L-D-T-D-p)	$C_{32}H_{50}N_6O_{11}$	694.79	695.2 (92)	15.58	-2.60	7%
13	c(Phg-L-D-T-D-p)	$C_{31}H_{42}N_6O_{11}$	674.71	675.1 (54)	10.03	-3.19	10%
14	c(Chg-L-D-T-D-p)	$C_{31}H_{48}N_6O_{11}$	680.76	681.2 (50)	13.90	-2.95	26%
15	c(Tic-L-D-T-D-p)	$C_{33}H_{44}N_6O_{11}$	700.75	701.2 (46)	13.38	-2.98	25%
16	c(F-L-D-T-D-tic)	$C_{37}H_{46}N_6O_{11}$	750.81	751.2 (90)	17.93	-2.98	22%
17	c(K-L-D-T-2Nal-p)	$C_{38}H_{53}N_7O_9$	751.88	752.2 (100)	13.48	n.d.	54%
18	c(Phg-L-D-T-Phg-d)	$C_{34}H_{42}N_6O_{11}$	710.74	710.74 (80)	18.78	-1.02	12%
19	c(F-L-D-T-D-p)	$C_{32}H_{44}N_6O_{11}$	688.74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	c(F-L-D-F-D-p)	$C_{37}H_{46}N_6O_{10}$	734.81	735.3 (70)	19.61	-0.70	48%
<b>21</b> a	c(F-L-D-Phg-D-p)	$C_{36}H_{44}N_6O_{10}$	720.78	721.3 (68)	18.38	-0.98	n.d.
21b	c(F-L-D-Phg-D-p)	C <sub>36</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	720.78	721.5 (100)	18.44	-0.98	n.d.

#### cyclo(T-K(PEG-FITC)-p-F-L-D) (24):

An Fmoc-Asp(OH)-Dmab belegtem Wang-Harz (0.351 g, 0.41 mmol/g, 144  $\mu$ mol) wurde nach AAV 23 und AAV 22 die Sequenz H<sub>2</sub>N-Thr(tBu)-Lys(Alloc)-pro-Ala-Leu-Asp(Wang-Harz)-(Dmap) aufgebaut. Nach der Abspaltung der Dmap-Schutzgruppe (AAV 34) führte man die Cyclisierung nach AAV 35 am Harz durch. Nach dem Entfernen der Alloc-Schutzgruppe (AAV 33) konnte der PEG-*spacer* (2 Äquiv.) mittels einer Doppelkupplung (2 x je 1 h) nach AAV 24 eingeführt werden. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz zweimal je 3 h mit

Fluoresceinisothiocyanat (2.5 Äquiv.), DIPEA (2.5 Äquiv.) in trockenem DMF versetzt. Das Abspalten der Verbindung vom Harz mit 95:2.5:2.5 TFA:H<sub>2</sub>O:TIPS und Reinigen mittels HPLC sowie anschließendem Lyophilisieren lieferten **24** als gelben Feststoff (21 mg, 12%). Da FITC lichtempfindlich ist, wurden alle Reaktionen in abgedunkelten Gefäßen durchgeführt.

 $C_{61}H_{73}N_9O_{17}S_1$ : 1236.37 g/mol

ESI-MS: *m*/*z* 1258.4 (20) [M+Na<sup>+</sup>], 1236.4 (100) [M+H<sup>+</sup>].

Die Synthese **cyclischer LDT-Peptoide** (**35-38**) wurde manuell nach AAV 28 und AAV 24 durchgeführt. Der Einbau bzw. die Kupplung der bzw. an die modifizierten Bausteine ist bei den entsprechenden linearen Verbindungen beschrieben. Die Cyclisierung der Verbindungen erfolgte gemäß AAV 29 und AAV 11.

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	log P	%
35	c(Nphe-L-D-T-D-p)	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub>	688.74	689.3	17.31	-3.11	8%
36	c(F-Nleu-D-T-D-p)	$C_{32}H_{44}N_6O_{11}$	688.74	689.4	17.08	-3.18	35%
37	c(F-L-Nasp-T-D-p)	$C_{32}H_{44}N_6O_{11}$	688.74	689.2	16.96	-3.12	48%
38	c(F-L-D-Nval-D-p)	$C_{33}H_{46}N_6O_{10}$	686.77	687.2	n.d.	-1.98	35%

#### H<sub>2</sub>N-Phe-Leu-Asp-Thr-OH (39):

Mit Fmoc-Thr(tBu)-OH belegtes TCP-Harz (0.305 g, 0.55 mmol/g, 168 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **39** (57.2 mg, 63%) als farblosen Feststoff.

 $C_{23}H_{34}N_4O_8*TFA: \ 494.54*114.02 \ g/mol; \ Log \ P:-1.27$ 

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 11.96$  min; ESI-MS: m/z 1027.2 (12)  $[2M+K^+]$ , 989.1 (49)  $[2M+H^+]$ , 517.2 (16)  $[M+Na^+]$ , 495.1 (100)  $[M+H^+]$ .

#### H-Nphe-Leu-Asp-Thr-OH (40):

Mit Fmoc-Thr(tBu)-OH belegtes TCP-Harz (0.306 g, 0.54 mmol/g, 165 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **40** (68.3 mg, 68%) als farblosen Feststoff.

C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 494.54\*114.02 g/mol; Log P: -1.04

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 10.46$  (br. s, 2H), 8.59 (d, 1H, J=8.3 Hz), 8.49 (d, 1H, J=7.4 Hz), 7.47-7.39 (m, 6H), 4.67-4.61 (m, 1H), 4.45-4.39 (m, 1H), 4.17-4.08 (m, 4H), 3.64 (m, 2H), 2.76-2.69 (m, 1H), 2.52-2.45 (m, 1H), 1.62-1.53 (m, 1H), 1.50-1.39 (m, 2H), 1.02 (d, 3H), 0.86 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 12.92$  min; ESI-MS: m/z 1027.2 (4) [2M+K<sup>+</sup>], 1011.1 (8) [2M+Na<sup>+</sup>], 989.1 (58) [2M+H<sup>+</sup>], 517.2 (5) [M+Na<sup>+</sup>], 495.1 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Nleu-Asp-Thr-OH (41):

Mit Fmoc-Thr(tBu)-OH belegtes TCP-Harz (0.304 g, 0.56 mmol/g, 170 µmol) ergab nach AAV 22, AAV 24 (Doppelkupplung an H-Nleu, 1.5 h, 2.5 Äquiv., 0.58 M), AAV 28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **41** (74.1 mg, 71%) als farblosen Feststoff.

 $C_{24}H_{30}N_4O_8*TFA: 502.52*114.02 \text{ g/mol}; Log P:-0.64$ 

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, 2 Isomere 2:1):  $\delta = 12.33$  (br. s), 9.34 (s), 9.30 (s), 8.48 (d, J=8.0 Hz), 8.41 (d, J=8.0 Hz), 8.22-8.02 (m), 7.87-7.80 (m), 7.79-7.73 (m), 7.59-7.52 (m), 4.76-4.69 (m), 4.64-4.57 (q), 4.23-4.04 (m), 3.40-3.24 (m), 2.89-2.41 (m), 2.09-1.98 (m), 1.92-1.82 (m), 1.10 (d, J=5.7), 1.06 (d, J=6.2 Hz), 0.96 (d, J=6.6 Hz), 0.93 (d, J=6.4 Hz), 0.70 (d, J= 6.6 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 17.68 min; ESI-MS: *m/z* 1044.2 (14) [2M+K<sup>+</sup>], 1027.0 (32) [2M+Na<sup>+</sup>], 1004.9 (24) [2M+H<sup>+</sup>], 525.1 (32) [M+Na<sup>+</sup>], 503.0 (55) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Nasp-Thr-OH (42):

Mit Fmoc-Thr(tBu)-OH belegtes TCP-Harz (0.305 g, 0.54 mmol/g, 165 µmol) ergab nach AAV 22, AAV 24 (Doppelkupplung an H-Nasp, 1.5 h, 2.5 Äquiv., 0.58 M), AAV

28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **42** (42.0 mg, 41%) als farblosen Feststoff.

 $C_{24}H_{30}N_4O_8*TFA: 502.52*114.02 \text{ g/mol}; Log P:-0.59$ 

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, 2 Isomere):  $\delta = 12.66$  (br. s), 9.38 (s), 8.77 (d, J=8.9 Hz), 8.73 (d, J=8.9 Hz), 8.57-8.54 (m), 8.38 (d, J= 8.7 Hz), 8.25 (d, J=8.3 Hz), 8.20-8.16 (m), 8.03 (d, J=8.7 Hz), 7.88 (t, J=7.1 Hz), 7.81 (t, J=7.5 Hz), 5.10-5.03 (m), 4.97-4.92 (m), 4.52-4.38 (m), 4.27-3.94 (m), 1.72-1.48 (m), 1.10 (d, J=6.2 Hz), 1.02 (d, J=6.2 Hz), 0.96-0.91 (m), 0.88-0.83 (m); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 18.47 min; ESI-MS: *m/z* 1043.2 (52) [2M+K<sup>+</sup>], 1027.1 (23) [2M+Na<sup>+</sup>], 1005.0 (27) [2M+H<sup>+</sup>], 525.1 (26) [M+Na<sup>+</sup>], 503.0 (28) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-Nval-OH (43):

Mit Fmoc-Nval-OH belegtes TCP-Harz (0.232 g, 0.43 mmol/g, 100 µmol) ergab nach AAV 22, AAV 24 (Doppelkupplung an H-Nval, 1.5 h, 2.5 Äquiv., 0.58 M), AAV 28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **236** (8.3 mg, 14%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 500.54\*114.02 g/mol; Log P: 0.56

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 15.60$  min.

#### Isochinolin-3-carbonyl-Nleu-Nasp-Nval-OH (44):

Mit Fmoc-Nval-OH belegtes TCP-Harz (0.301 g, 0.54 mmol/g, 162  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 24 (Doppelkupplungen, 1.5 h, 2.5 Äquiv., 0.58 M), AAV 28, AAV 31 und HPLC-Reinigung das TFA-Salz von **44** (76.3 mg, 77%) als farblosen Feststoff. C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 500.54\*114.02 g/mol; Log P:0.08

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 16.90$  min; ESI-MS:  $m/z \ 1039.2 \ (10) \ [2M+K^+],$ 1001.0 (1) [2M+H], 523.1 (18) [M+Na<sup>+</sup>], 501.0 (7) [M+H<sup>+</sup>]. Die Synthese **cyclischer Azapeptide** (**59-62**) wurde manuell nach AAV 28 und AAV 24 durchgeführt. Der Einbau bzw. die Kupplung der bzw. an die modifizierten Bausteine ist bei den entsprechenden linearen Verbindungen beschrieben. Die Cyclisierung der Verbindungen erfolgte gemäß AAV 29 und AAV 11.

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	log P	%
59	c(azaPhe-L-D-T-D-p)	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub>	689.73	690.1	15.87	-2.83	25%
60	c(F-azaLeu-D-T-D-p)	$C_{31}H_{43}N_7O_{11}$	689.73	690.3	16.905	-5.20	25%
61	c(F-L-azaAsp-T-D-p)	$C_{31}H_{43}N_7O_{11}$	689.73	690.3	16.60	-2.84	18%
62	c(F-L-D-azaVal-D-p)	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub>	687.75	688.2	17.32	n.d.	4%

#### Isochinolin-3-carbonyl-azaPhe-Leu-Asp-Thr-OH (63):

Fmoc-azaPhe-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (97.1 mg, approx. 0.39 mmol/g, 39 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 36, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **63** (9.6 mg, 32%) als farblosen Feststoff.

C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>\*TFA: 650.68\*114.02 g/mol; Log P: 0.73

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.48$  (br. s, 2H), 10.69 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.26 (t, 2H, J= 8.2 Hz), 8.20 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.38-7.21 (m, 5H), 6.78 (d, 1H, J= 7.7), 4.74 (br. s, 2H), 4.65 (q, 2H, J= 7.1 Hz), 4.25 (q, 1H, J= 7.7 Hz), 4.18-4.14 (m, 1H), 4.13-4.08 (m, 1H), 3.91 (br. s, 1H), 2.83 (dd, 1H, J= 17.0, 6.6 Hz); 2.57 (dd, 1H, J= 16.5, 7.1 Hz), 1.64 (sep., 1H), 1.47 (t, 2H, J= 7.1 Hz), 1.04 (d, 3H, J= 6.6 Hz), 0.85 (dd, 6H, J= 14.3, 6.6 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 22.08 min; ESI-MS: *m/z* 1339.4 (5) [2M+K<sup>+</sup>], 689.2 (18) [M+K<sup>+</sup>], 673.3 (31) [M+Na<sup>+</sup>], 651.2 (14) [M+H<sup>+</sup>].

#### H<sub>2</sub>N-azaPhe-Leu-Asp-Thr-OH (64):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.220 g, 0.39 mmol/g, 85.8 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 36, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **64** (25.7 mg, 49%) als farblosen Feststoff.

C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 495.53\*114.02 g/mol; Log P: -0.96

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.46$  (br. s, 2H), 8.44 (d, 1H, J= 8.44), 7.42 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 7.37-7.21 (m, 5H), 6.98 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 4.66-4.60 (m, 2H), 4.56-4.50 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.18-4.14 (m, 1H), 4.14-4.08 (m, 1H), 2.76 (dd, 1H, J= 16.5, 5.7 Hz), 2.54 (dd, 1H, J= 16.5, 7.8 Hz), 1.68-1.59 (m, 1H), 1.50-1.45 (m, 2H), 1.03 (d, 3H, J= 6.1 Hz), 0.90-0.88 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 16.56; ESI-MS: *m*/*z* 1029.2 (42) [2M+K<sup>+</sup>], 1013.1 (65) [2M+Na<sup>+</sup>], 990.9 (24) [2M+H<sup>+</sup>], 534.1 (4) [M+K<sup>+</sup>], 518.2 (81) [M+Na<sup>+</sup>], 496.0 (71) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-azaLeu-Asp-Thr-OH (65):

Fmoc-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.395 g, 0.36 mmol/g, 142 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 36, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **65** (32.2 mg, 37%) als farblosen Feststoff.

C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 503.51\*114.02 g/mol; Log P: -1.57 (nach Broto)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.36$  (br. s, 2H), 10.91 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.20 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz, J= 7.5 Hz), 7.84 (t, 1H), 7.45 (d, 1H, J= 8.4 Hz), 7.03 (d, 1H, J= 8.4 Hz), 4.56-4.49 (m, 1H), 4.16-4.11 (m, 2H), 3.86 (br. s, 1H), 3.35 (br. s, 2H), 2.71 (dd, 1H, J= 16.6, 6.0 Hz), 2.53 (dd, 1H, J= 16.6, 6.2 Hz), 1.85-1.77 (septett, 1H), 1.05 (d, 3H, J= 6.2 Hz), 0.91-0.86 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 17.81 min; ESI-MS: *m/z* 1029.0 (6) [2M+K<sup>+</sup>], 526.1 (15) [M+Na<sup>+</sup>], 504.1 (12) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu-azaAsp-Thr-OH (66):

Fmoc-Thr(tBu)-TCP-Harz (303.9 mg, 0.5 mmol/g, 152.0 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 36, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren 66 (32.7 mg, 35%) als farblosen Feststoff.

C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 503.51\*114.02 g/mol; Log P: -0.30

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.62$  (br. s, 2H), 10.70 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.94 (d, 1H, J= 6.0 Hz), 8.53 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.18 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.84 (t, 1H, 7.7 Hz), 6.26 (s, br., 1H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 3H), 3.95 (br. s, 2H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.70-1.62 (m, 2H), 0.99 (d, 3H, J= 5.5 Hz), 0.94 (dd, 6H, J= 6.0, 5.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 18.39 min; ESI-MS: *m*/*z* 1029.0 (5) [2M+Na<sup>+</sup>], 526.1 (15) [M+Na<sup>+</sup>], 504.1 (12) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-azaVal-NH<sub>2</sub> (67):

Sieber-Amid-Harz (250 mg, 0.62 mmol/g, 155  $\mu$ mol) ergab nach AAV 36, AAV 22, AAV 26 (Kupplung von Fmoc-Asp(tBu)-OH an das Harz), AAV 28, AAV 24, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **504** (5.56 mg, 6%) als farblosen Feststoff. C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>\*TFA: 500.55\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

Die Synthese **cyclischer LDT-Mimetika mit reduzierten Amidbindungen** (**79-82**) wurde manuell nach AAV 28 und AAV 24 durchgeführt. Der Einbau bzw. die Kupplung der bzw. an die modifizierten Bausteine ist bei den entsprechenden linearen Verbindungen beschrieben. Die Cyclisierung der Verbindungen erfolgte gemäß AAV 29 und AAV 11.

	Sequenz	Σ	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	log P	%
79	c(F\u03c9(CH2NH)L-D-T-D-p)	$C_{32}H_{46}N_6O_{10}$	675.5	14.64	-2.31	17%
80	c(F-L\u03c7(CH <sub>2</sub> NH)D-T-D-p)	$C_{32}H_{46}N_6O_{10}$	675.2	16.23	-2.31	n.d.
81	c(F-L-D $\psi$ (CH <sub>2</sub> NH)T-D-p)	$C_{32}H_{46}N_6O_{10}$	675.2	16.20	-2.31	7%
82	c(F-L-D-T\u00fc(CH <sub>2</sub> NH)D-p)	$C_{32}H_{46}N_6O_{10}$	675.3	16.43	-2.31	26%

#### Naphthalen-1-yl-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Leu-Asp-Thr-OH (83):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.220 g, 0.39 mmol/g, 85.8 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 38, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **83** (28.4 mg, 55%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 487.55\*114.02 g/mol, Log P: 1.10

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.50$  (br. s, 1H), 9.28 (br. s, 2H), 9.15 (br. s, 1H), 8.17 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.04-7.99 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 7.71-7.55 (m, 4H), 5.06-4.94 (m, 2H), 4.53-4.39 (m, 2H), 4.24-4.14 (m, 2H), 3.98 (br. s, 1H), 2.85 (dd, 1H, J= 17.1, 4.2 Hz), 2.65 (dd, 1H, J= 17.1, 10.2 Hz), 1.77-1.64 (m, 2H), 1.60-1.52 (m, 1H), 1.07 (d, 3H, J= 6.5 Hz), 0.89 (dd, 6H, J= 43.0, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 14.18$  min; ESI-MS: *m/z* 997.1 (15) [2M+Na<sup>+</sup>], 975.0 (10) [2M+H<sup>+</sup>], 488.1 (60) [M+H<sup>+</sup>].

#### Naphthalen-2-yl-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Leu-Asp-Thr-OH (84):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.220 g, 0.39 mmol/g, 85.8 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 38, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **84** (38.7 mg, 75%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 487.55\*114.02 g/mol, Log P: 1.10

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.52$  (br. s, 1H), 9.39 (br. s, 2H), 9.07 (d, 1H, J= 6.5 Hz), 8.01-7.94 (m, 4H), 7.83 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.61-7.57 (m, 3H), 5.04-4.88 (m, 2H), 4.26-4.08 (m, 4H), 3.74 (br. s, 1H), 2.82 (dd, 1H, J= 17.1, 4.6 Hz), 2.60 (dd, 1H, J= 16.7, 9.3 Hz), 1.73-1.64 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 1H), 1.05 (d, 3H, J= 6.0 Hz), 0.84 (dd, 6H, J= 36.1, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 15.44$  min; ESI-MS: *m/z* 1013.6 (24) [2M+K<sup>+</sup>], 997.5 (34) [2M+Na<sup>+</sup>], 975.4 (46) [2M+H<sup>+</sup>], 510.4 (15) [M+Na<sup>+</sup>], 488.3 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu- $\psi$ (CH<sub>2</sub>NH)-Asp-Thr-OH (85):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.374 g, 0.46 mmol/g, 172 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 38, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **85** (55.3 mg, 53%) als farblosen Feststoff.

 $C_{24}H_{32}N_4O_7$ \*TFA: 488.53\*114.02 g/mol; Log P: 0.22

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 12.88 (br. s, 2H), 9.42 (s, 1H), 9.04 (br. s, 1H), 8.97 (d, 1H, J= 9.6 Hz), 8.78 (s, br, 1H), 8.64 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.60 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.0 Hz),

7.83 (t, 1H, J= 7.0 Hz), 4.58-4.49 (m, 1H), 4.40-4.34 (m, 1H), 4.24-4.18 (m, 2H), 3.31-3.22 (m, 1H), 3.13-3.06 (m, 1H), 2.91-2.86 (m, 2H), 1.71-1.64 (m, 1H), 1.63-1.54 (m, 1H), 1.44-1.36 (m, 1H), 1.10 (d, 3H, J= 6.1 Hz), 0.90 (d, 6H, J= 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t$  = 17.92 min; ESI-MS: *m/z* 977.0 (13) [2M+H<sup>+</sup>], 511.2 (17) [M+Na<sup>+</sup>], 489.2 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Thr-OH (86):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.220 g, 0.46 mmol/g, 101.2 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 38, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **86** als farblosen Feststoff.

C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 488.53\*114.02 g/mol; Log P: 0.22

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.48$  (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 9.00 (br. s, 1H), 8.75 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.48 (d, 2H, J= 6.9 Hz), 8.27 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.20 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.9 Hz), 7.84 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 5.79 (br. s, 1H), 4.68-4.62 (m, 1H), 4.38-4.31 (m, 1H), 4.11-4.05 (m, 1H), 3.88 (d, 1H, J= 5.1 Hz), 3.26-3.19 (m, 2H), 2.69 (dd, 1H, J= 16.7, 5.6 Hz), 2.59 (dd, 1H, J= 16.7, 7.4 Hz), 1.72-1.58 (m, 3H), 1.27 (d, 3H, J= 6.0 Hz), 0.92 (dd, 6H, J= 10.2, 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 17.45 min; ESI-MS: *m/z* 1015.5 (14) [2M+K<sup>+</sup>], 977.3 (8) [2M+H<sup>+</sup>], 511.5 (18) [M+Na<sup>+</sup>], 489.3 (88) [M+H<sup>+</sup>].

#### Fmoc-Leu-Asp-Thr-OH (95):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-TCP-Harz (0.211 g, 0.386 mmol/g, 81.4 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **95** (18.1 mg, 39%) als farblosen Feststoff.

 $C_{29}H_{35}N_3O_9$ : 569.60 g/mol, Log P: 1.47

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 23.85$  min; ESI-MS: m/z 1161.1 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 1139.2 (30) [2M+H<sup>+</sup>], 592.2 (100) [M+Na<sup>+</sup>], 570.0 (54) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-Thr-Asp-Leu-OH (96):

Fmoc-Leu-TCP-Harz (0.230 g, 0.436 mmol/g, μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **96** (38.9 mg, %) als farblosen Feststoff.

C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 502.52\*114.02 g/mol, Log P: -0.38

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 18.27$  min; ESI-MS: *m/z* 1005.3 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 525.4 (26) [M+Na<sup>+</sup>], 503.2 (59) [M+H<sup>+</sup>].

#### Naphthalen-1-carbonyl-Leu-Asp-Thr-OH (97):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.237 g, 0.595 mmol/g, 141.0 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **182** (36.5 mg, 52%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 501.53 g/mol; Log P: 0.54

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.44$  (br. s, 2H), 8.70 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.42 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.22-8.17 (m, 1H), 8.02 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 7.99-7.95 (m, 1H), 7.63 (d, 1H, J= 6.8 Hz), 7.58-7.53 (m, 3H), 7.47 (d, 1H, J= 8.1 Hz), 4.89 (br. s, 1H), 4.73-4.68 (m, 1H), 4.65-4.59 (m, 1H), 4.20-4.17 (m, 1H), 4.14-4.09 (m, 1H), 2.79 (dd, 1H, J= 16.7, 6.0 Hz), 2.61 (dd, 1H, J= 16.7, 7.7 Hz), 1.79-1.63 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 1H), 1.02 (d, 3H, J= 6.4 Hz), 0.97 (d, 3H, J= 6.4 Hz), 0.92 (d, 3H, J= 6.4 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 19.23 min; ESI-MS: *m*/*z* 1041.1 (36) [2M+K<sup>+</sup>], 1025.0 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 1003.0 (43) [2M+H<sup>+</sup>], 524.1 (76) [M+Na<sup>+</sup>], 502.0 (32) [M+H<sup>+</sup>].

#### 2-Nitrophenyl-Leu-Asp-Thr-OH (98):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.226 g, 0.595 mmol/g, 134.47 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 41, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **98** (10.3 mg, 16%) als gelben Feststoff.

C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>: 468.46 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.53 (br. s, 1H), 12.32 (br. s, 1H), 8.66 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.10-8.07 (m, 2H), 7.56-7.51 (m, 2H), 6.90 (d, 1H, J= 8.6 Hz),

6.75 (t, 1H, J= 7.3 Hz), 4.90 (br. s, 1H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.27 (q, 1H, J= 6.9 Hz), 4.15-4.09 (m, 2H), 2.75 (dd, 1H, J= 16.8, 5.2 Hz), 2.55-2.50 (dd, 1H), 1.77-1.65 (m, 3H), 1.00 (d, 3H, J= 6.5 Hz), 0.91 (dd, 6H, J= 43.1, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 20.10$  min; ESI-MS: *m/z* 975.1 (60) [2M+K<sup>+</sup>], 958.9 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 936.9 (32) [2M+H<sup>+</sup>], 491.1 (46) [M+Na<sup>+</sup>], 469.0 (34) [M+H<sup>+</sup>].

#### Pyrimidyl-Leu-Asp-Thr-OH (99):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.208 g, 0.595 mmol/g, 123.76  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 41, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **99** (15.3 mg, 29%) als farblosen Feststoff. C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 425.44 g/mol; Log P: -1.53

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 11.53$  min; ESI-MS: m/z 873.0 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 851.0 (60) [2M+H<sup>+</sup>], 448.1 (44) [M+Na<sup>+</sup>], 426.0 (82) [M+H<sup>+</sup>].

#### 4-Quinazolinyl-Leu-Asp-Thr-OH (100):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz ergab nach AAV 22, AAV 41, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **100** als farblosen Feststoff. C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 475.50 g/mol; Log P: 0.10

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.44$  (br. s, 2H), 9.59 (br. s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.66 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.62 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.00 (t, 1H, J= 7.6 Hz), 7.79 (d, 1H, J= 8.4 Hz), 7.75 (t, 1H, 7.6 Hz), 7.38 (d, 1H, J= 8.6 Hz), 5.02 (m, 1H), 4.90 (br. s, 1H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.17-4.08 (m, 2H), 2.76 (dd, 1H, J= 16.4, 5.3 Hz), 2.54 (dd, 1H, J= 16.4, 8.4 Hz), 2.01-1.91 (m, 1H), 1.76-1.67 (m, 2H), 0.98 (d, 3H, J= 6.5 Hz), 0.90 (dd, 6H, J= 24.6, 5.7 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 12.89 min; ESI-MS: *m/z* 989.1 (4) [2M+K<sup>+</sup>], 498.1 (4) [M+Na<sup>+</sup>], 476.1 (78) [M+H<sup>+</sup>].

#### 4-Phenyl-but-3-enoyl-Leu-Asp-Thr-OH (101):

But-3-ensäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.276 g, 0.37 mmol/g, 102.1 µmol) gekuppelt. Die Aryl-AlkenylKupplung wurde nach AAV 43 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten **101** (14.3 mg, 29%) als farblosen Feststoff.  $C_{23}H_{31}N_3O_8$ : 477.51 g/mol; Log P: -0.12

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 20.51$  min.

#### 2-Methyl-3-phenylacryloyl-Leu-Asp-Thr-OH (102):

Methacrylsäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.281 g, 0.37 mmol/g, 104.0  $\mu$ mol) gekuppelt. Die Aryl-Alkenyl-Kupplung wurde nach AAV 43 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten **102** (5.1 mg, 10%) als farblosen Feststoff. C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 491.53 g/mol; Log P: 0.23

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.54$  (br. s, 1H), 12.29 (br. s, 1H), 8.41 (d, 1H, J=7.8 Hz), 8.16 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 7.41-7.20 (m, 6H), 6.46 (d, 1H, J= 15.7 Hz), 6.32 (dt, 1H, J= 16.1, 7.4 Hz), 4.89 (d, 1H, J= 5.7 Hz), 4.63-4.58 (m, 1H), 4.32 (q, 1H, J= 7.0 Hz), 4.18-4.08 (m, 2H), 3.16-3.06 (m, 2H), 2.76 (dd, 1H, J= 16.5, 5.7 Hz), 2.53 (dd, 1H, J= 17.0, 7.8 Hz), 1.66-1.57 (m, 1H), 1.49-1.45 (m, 2H), 1.02 (d, 3H, J= 6.5 Hz), 0.86 (dd, 6H, J= 14.8, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 18.99 min; ESI-MS: *m*/*z* 1021.6 (51) [2M+K<sup>+</sup>], 1005.5 (61) [2M+Na<sup>+</sup>], 983.4 (23) [2M+H<sup>+</sup>], 514.4 (100) [M+Na<sup>+</sup>], 492.3 (49) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Phenyl-propinoyl-Leu-Asp-Thr-OH (103):

Propiolsäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.277 g, 0.37 mmol/g, 102.5  $\mu$ mol) gekuppelt. Die Aryl-Alkinyl-Kupplung wurde nach AAV 42 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten **103** (15.1 mg, 31%) als farblosen Feststoff. C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 475.49 g/mol; Log P: -0.19

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.54 (br. s, 1H), 12.34 (br. s, 1H), 9.01 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.47 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 7.61-7.45 (m, 5H), 7.41 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 4.88 (br. s, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.43-4.38 (m, 1H), 4.18-4.15 (m, 1H), 4.13 (br. s, 1H), 2.75 (dd, 1H, J= 16.5, 5.7 Hz), 2.53 (dd, 1H, J= 17.0, 5.7 Hz), 1.69-

1.44 (m, 3H),1.05 (d, 3H, J= 6.5 Hz), 0.88 (dd, 6H, J= 12.6, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 18.38$  min; ESI-MS: *m/z* 989.3 (33) [2M+K<sup>+</sup>], 973.2 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 951.1 (34) [2M+H<sup>+</sup>], 498.3 (65) [M+Na<sup>+</sup>], 476.1 (35) [M+H<sup>+</sup>].

#### 4-Phenyl-but-3-enoyl-Asp-Thr-OH (104)

But-3-ensäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.263 g, 0.38 mmol/g, 99.94  $\mu$ mol) gekuppelt. Die Aryl-Alkenyl-Kupplung wurde nach AAV 43 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten das TFA-Salz von **104** (9.2 mg, 19%) als farblosen Feststoff. C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 364.35\*114.02 g/mol, Log P: -0.70

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 15.66$  min.

#### 2-Methyl-3-phenylacryloyl-Asp-Thr-OH (105):

Methacrylsäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (269.6 g, 0.38 mmol/g, 102.4 μmol) gekuppelt. Die Aryl-Alkenyl-Kupplung wurde nach AAV 43 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten das TFA-Salz von **105** als farblosen Feststoff.

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 378.38 g/mol; Log P: -0.35

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 15.66$  min; ESI-MS: *m/z* 795.3 (45) [2M+K<sup>+</sup>], 779.2 (38) [2M+Na<sup>+</sup>], 757.0 (8) [2M+H<sup>+</sup>].

#### 3-Phenyl-propinoyl-Asp-Thr-OH (106):

Propiolsäure wurde gemäß AAV 22 und AAV 25 an Fmoc-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (263.7 g, 0.38 mmol/g, 100.2  $\mu$ mol) gekuppelt. Die Aryl-Alkinyl-Kupplung wurde nach AAV 42 durchgeführt. AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren lieferten das TFA-Salz von **106** (27.5 mg, 58%) als farblosen Feststoff. C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>\*TFA: 362.33\*114.02 g/mol; Log P: -0.77

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 12.36 (br. s, 2H), 9.14 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.73 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.62-7.45 (m, 5H), 4.74 (q, 1H, J= 4.74 Hz), 4.14 (m, 2H), 2.74 (dd, 1H, J= 16.8, 3.9 Hz), 2.57 (dd, 1H, J= 17.2, 9.5 Hz), 1.12 (s, 1H), 1.05 (d, 3H, J= 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 14.56$  min; ESI-MS: *m/z* 763 (100) [2M+K<sup>+</sup>], 746.9 (66) [2M+Na<sup>+</sup>], 385.1 (80) [M+Na<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-4Abz-Asp-Thr-OH (107):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.203 g, 0.44 mmol/g, 89.3 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **107** (10.0 mg, 18%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 508.48\*114.02 g/mol, Log P: -0.15

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 18.24$  min; ESI-MS:  $m/z \ 1054.9 \ (8) \ [2M+K^+],$ 1016.8 (14)  $[2M+H^+], 532.1 \ (8) \ [M+Na^+], 508.9 \ (32) \ [M+H^+].$ 

#### Isochinolin-3-carbonyl-3Abz-Asp-Thr-OH (108):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.215 g, 0.44 mmol/g, 94.6 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **108** (29.4 mg, 50%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 508.48\*114.02 g/mol, Log P: -0.15

HPLC (20-80% in 30 min)  $R_t = 12.90$  min; ESI-MS: m/z 1056.0 (4) [2M+K<sup>+</sup>], 1038.9 (8) [2M+Na<sup>+</sup>], 1016.8 (32) [2M+H<sup>+</sup>], 531.1 (12) [M+Na<sup>+</sup>], 508.9 (29) [M+H<sup>+</sup>].

#### Isochinolin-3-carbonyl-2Abz-Asp-Thr-OH (109):

Fmoc-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.208 g, 0.44 mmol/g, 251.2 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **109** (29.4 mg, 52%) als farblosen Feststoff.

C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>\*TFA: 508.48\*114.02 g/mol, Log P: -0.15

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 19.06$  min; ESI-MS:  $m/z \ 1055.0 \ (16) \ [2M+K^+],$ 1016.8 (14)  $[2M+H^+], 532.1 \ (12) \ [M+Na^+], 508.9 \ (44) \ [M+H^+].$ 

Die Synthese der in Kapitel 4.3 beschriebenen Bibliothek mit unterschiedlichen **Bausteinen C** wurde an einem vollautomatischen Syntheseroboter SyRo II durchgeführt. Fmoc-Thr(tBu) belegtes Wang-Harz (0.46 mmol/g) ergab nach AAV 22,

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	Log P	%
110	Ichin-A-D-T-OH	$C_{21}H_{24}N_4O_8$	460.44	461.0	13.40	-1.61	79%
111	Ichin-G-D-T-OH	$C_{20}H_{22}N_4O_8$	446.41	447.0	12.24	-2.10	94%
112	Ichin-V-D-T-OH	$C_{23}H_{28}N_4O_8$	488.49	489.0	16.56	-0.73	84%
113	Ichin-Cyh-D-T-OH	$C_{25}H_{30}N_4O_8$	514.53	515.2	14.58	-0.66	61%
114	Ichin-Mape-D-T-OH	$C_{26}H_{26}N_4O_8$	522.51	523.1	18.15	-0.20	60%
115	Ichin-Inp-D-T-OH	$C_{24}H_{28}N_4O_8$	500.50	501.3	11.14	-1.24	70%
116	Ichin-Cop-D-T-OH	$C_{23}H_{26}N_4O_9$	502.47	503.2	11.70	-2.11	72%
117	Ichin-Azpc-D-T-OH	$C_{30}H_{31}N_5O_9$	605.60	606.2	16.48	-0.94	30%
118	Ichin-Mamb-D-T-OH	$C_{26}H_{26}N_4O_8$	522.51	523.0	15.83	-0.08	53%

AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren folgende Verbindungen als TFA-Salze:

Die Synthese der in Kapitel 4.3 beschriebenen Bibliothek mit unterschiedlichen **Bausteinen B** wurde an einem vollautomatischen Syntheseroboter SyRo II durchgeführt. Mit Fmoc-Thr(tBu) belegtes TCP-Harz (0.5 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren folgende Verbindungen als farblose TFA-Salze:

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	%
119a	Ichin-Leu-Cpdc(5-OH)-T-OH	$C_{27}H_{34}N_4O_8$	542.58	n.d.	33%
119b	Ichin-Leu-Cpdc(5-OH)-T-OH	$C_{27}H_{34}N_4O_8$	542.58	543.0	18%
120a	Ichin-Leu-Cpdc(2-OH)-T-OH	$C_{27}H_{34}N_4O_8$	542.58	543.1	17%
120b	Ichin-Leu-Cpdc(2-OH)-T-OH	$C_{27}H_{34}N_4O_8$	542.58	n.d.	31%
121	Ichin-Leu-Cysa-T-OH	$C_{23}H_{30}N_4O_9S$	538.57	539.2	61%

## *N*-Isobutyl-3-{2-[(isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}bernsteinsäureamid (122):

Mit Isobutylamin belegtes Formyl-Harz (0.281 g, approx. 0.6 mmol/g, 169.0  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **122** (37.1 mg, 38%) als farblosen Feststoff. C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 456.53\*114.02 g/mol; Log P: 1.62

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 12.28 (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.81 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.57 (s, 1H), 8.46 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.89 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.82 (t, 1H, 7.7 Hz), 7.73 (t, 1H, J= 6.0 Hz), 4.67-4.62 (m, 1H), 4.55 (q, 1H), 2.87 (m, 2H), 2.68 (dd, 1H, J= 16.5, 6.0 Hz), 2.52 (dd, 1H, J= 17.0, 8.2 Hz), 1.70-1.58 (m, 4H), 0.91 (t, 6H, J= 6.6 Hz), 0.81-0.77 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 21.80$  min; ESI-MS: *m/z* 951.2 (30) [2M+K<sup>+</sup>], 935.0 (35) [2M+Na<sup>+</sup>], 912.9 (5) [2M+H<sup>+</sup>], 479.1 (25) [M+Na<sup>+</sup>], 457.0 (40) [M+H<sup>+</sup>].

#### 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-

#### (phenethylcarbamoyl)propansäure (123):

Mit Phenethylamin belegtes Formyl-Harz (approx. Belegung: 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **123** als farblosen Feststoff.

C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 504.58 g/mol; Log P: 2.41

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.23$  (br. s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.81 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 8.59 (s, 1H), 8.47 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.27 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.20 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.92 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 1H), 7.29-7.24 (m, 2H), 7.21-7.15 (m, 3H), 4.69-4.62 (m, 1H), 4.56-4.50 (m, 1H), 3.32-3.22 (m, 2H), 2.72-2.60 (m, 3H), 2.54-2.46 (m, 1H), 1.71-1.56 (m, 3H), 0.92 (dd, 6H, J= 8.7, 5.7 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.54 min; ESI-MS: *m/z* 1031.3 (37) [2M+Na<sup>+</sup>], 1009.4 (10) [2M+H<sup>+</sup>], 527.4 (34) [M + Na<sup>+</sup>], 505.3 (39) [M+H<sup>+</sup>].

## *N*-Benzyl-3-{2-[(isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}bernsteinsäureamid (124):

Mit Benzylamin belegtes Formyl-Harz (0.152 g, approx. 0.6 mmol/g, 91.6 µmol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **124** (5.1 mg, 9%) als farblosen Feststoff.

C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.13

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.30$  (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.81 (d, 1H, J= 8.6 Hz), 8.57-8.52 (m, 2H), 8.32 (t, 1H, J= 6.0 Hz), 8.27 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.19 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 7.90 (m, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.28-7.16 (m, 5H), 4.70-4.59 (m, 2H), 4.34 (dd, 1H, J= 15.5, 6.5 Hz), 4.24 (dd, 1H, J= 15.0, 5.6 Hz), 2.75 (dd, 1H, J= 16.4, 6.0 Hz), 2.57 (dd, 1H, 16.4, 7.8 Hz), 1.72-1.56 (m, 3H), 0.91 (dd, 6H, J= 9.5, 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 24.37 min; ESI-MS: *m/z* 1019.5 (14) [2M+K<sup>+</sup>], 981.1 (40) [2M+H<sup>+</sup>], 491.1 (32) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N*-phenylbernsteinsäureamid-Derivate:

Die Sequenz Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp(tBu)-OH (0.494 g, 1.08 mmol) wurde nach AAV 22, AAV 23 und AAV 29 am TCP-Harz synthetisiert. Die lyophilisierte Verbindung wurde in trockenem THF (2.16 mL) gelöst und man fügte HOBt\*H<sub>2</sub>O (215.1 mg, 1.40 mmol, 1.3 Äquiv.) hinzu. Jeweils 0.54 mL dieser Lösung (0.27 mmol) wurde unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit zu den entsprechenden Anilin-Derivaten (0.27 mmol) zugetropft. Die auf 0 °C abgekühlten Lösungen wurden mit EDCI\*HCl (67.3 mg, 0.351 mmol, 1.3 Äquiv.) und NMM (71.3  $\mu$ l, 0.648 mmol, 1.85 Äquiv.) versetzt und mit NMM auf pH 7-8 eingestellt. Gemäß AAV 9 wurde das Eisbad entfernt und die Lösungen über Nacht bei RT gerührt. Aufgrund der kleinen Mengen wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet. Der Rückstand wurde nach AAV 31 entschützt und mittels HPLC aufgereinigt. Man erhielt die farblosen TFA-Salze der folgenden Verbindungen:

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N*-phenylbernsteinsäureamid (125a):

Ausbeute: 23%; C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 476.52\*114.02 g/mol; Log P: 2.06

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.32 (br. s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.84 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.80 (d, 1H, J= 8.2), 8.58 (s, 1H), 8.26 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.20 (d, 1H, 8.8 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 8.2 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.67 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 7.32 (t, 2H, J= 7.7 Hz), 7.06 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 4.80-4.74 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 2.79 (dd, 1H, J= 16.5, 5.5 Hz), 2.61 (dd, 1H, J= 16.5, 8.8 Hz), 1.74-1.59 (m, 3H), 0.93 (t, 6H, J= 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 23.80 min; ESI-MS: *m/z* 991.5 (40) [2M+K<sup>+</sup>], 975.3 (50) [2M+Na<sup>+</sup>], 953.2 (18) [2M+H<sup>+</sup>], 499.3 (20) [M+Na<sup>+</sup>], 477.1 (43) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N*-phenylbernsteinsäureamid (125b):

Ausbeute: 13%; C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 476.52\*114.02 g/mol; Log P: 2.06

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.39$  (br. s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.63 (d, 1H, J= 7.7), 8.59 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.21 (d, 1H, 8.2 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 8.2 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.62 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 7.31 (t, 2H, J= 7.7 Hz), 7.06 (t, 1H, J= 7.1 Hz), 4.77-4.66 (m, 2H), 2.79 (dd, 1H, J= 16.5, 6.0 Hz), 2.62 (dd, 1H, J= 16.5, 8.2 Hz), 1.73-1.59 (m, 3H), 0.92 (dd, 6H, J= 8.2, 5.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 24.03 min; ESI-MS: *m/z* 991.4 (26) [M+K<sup>+</sup>], 975.3 (36) [2M+Na<sup>+</sup>], 953.2 (10) [2M+H<sup>+</sup>], 499.3 (18) [M+Na<sup>+</sup>], 477.1 (33) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N-o*-tolylbernsteinsäureamid (126a):

Ausbeute: 13%; C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 12.39 (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.87 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.76 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.53 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.18 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.89 (t, 1H, 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, 7.7 Hz), 7.38 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.20-7.12 (m, 2H), 7.07 (t, 1H, J= 7.1 Hz), 4.84-4.78 (m, 1H), 4.75-4.69 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, J= 16.5, 6.0 Hz), 2.65 (dd, 1H, J= 16.5, 8.2 Hz), 2.13 (s, 3H), 1.77-1.60 (m, 3H), 0.93 (t, 6H, J= 6.6 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 23.68$  min; ESI-MS: *m/z* 1019.5 (32) [2M+K<sup>+</sup>], 1003.3 (24) [2M+Na<sup>+</sup>], 981.2 (6) [2M+H<sup>+</sup>], 513.4 (20) [M+Na<sup>+</sup>], 491.2 (26) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N-o*-tolylbernsteinsäureamid (126b):

Ausbeute: 8%; C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.39 (br. s, 1H), 9.42 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.83 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.67 (d, 1H, J= 7.1 Hz), 8.57 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.20 (d, 1H, 8.2 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.39 (d, 1H, 7.7 Hz), 7.20 (d, 1H, J= 7.1 Hz), 7.15 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.08 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 4.82-4.76 (m, 1H), 4.75-4.69 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, J= 16.5, 6.0 Hz), 2.65 (dd, 1H, J= 16.5, 7.1 Hz), 2.16 (s, 3H), 1.77-1.60 (m, 3H), 0.92 (dd, 6H, J= 7.1, 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 23.98 min; ESI-MS: *m*/*z* 1019.5 (20) [2M+K<sup>+</sup>], 981.2 (2) [2M+H<sup>+</sup>], 513.3 (16) [M+Na<sup>+</sup>], 491.1 (18) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N-m*-tolylbernsteinsäureamid (127):

Ausbeute: 15%; C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.38$  (br. s, 1H), 9.79 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.85 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.79 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.57 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.19 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.1 Hz), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.22-7.16 (m, 1H), 6.88 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 4.78-4.63 (m, 2H), 2.79 (dd, 1H, J= 16.5, 5.5 Hz), 2.61 (dd, 1H, J= 16.5, 8.8 Hz), 2.27 (s, 3H), 1.74-1.59 (m, 3H), 0.96-0.89 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 24.91 min; ESI-MS: *m/z* 1019.5 (46) [2M+K<sup>+</sup>], 1003.3 (66) [2M+Na<sup>+</sup>], 981.2 (50) [2M+H<sup>+</sup>], 513.4 (26) [M+Na<sup>+</sup>], 491.1 (70) [M+H<sup>+</sup>].

### 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N-p*-tolylbernsteinsäureamid (128a):

Ausbeute: 12%; C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.36$  (br. s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.84 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.78 (d, 1H, J=8.2 Hz), 8.57 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.55 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 7.12 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 4.79-4.73 (m, 1H), 4.70-4.64 (m, 1H), 2.78 (dd, 1H, J= 16.5, 5.5 Hz), 2.60 (dd, 1H, J= 16.5, 8.2 Hz), 2.25 (s, 3H), 1.74-1.59 (m, 3H), 0.93 (t, 6H, J= 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 25.67$  min.

## 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoylamino}-*N-p*-tolylbernsteinsäureamid (128b):

Ausbeute: 7%; C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>\*TFA: 490.55\*114.02 g/mol; Log P: 2.55

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 12.37 (br. s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 8.61 (d, 1H, J= 7.7 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 8.2 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.50 (d, 2H, J= 8.8 Hz), 7.11 (d, 2H, 8.2 Hz), 4.76-4.65 (m, 2H), 2.77 (dd, 1H, J= 16.5, 6.0 Hz), 2.60 (dd, 1H, J= 16.5, 8.2 Hz), 2.25 (s, 3H), 1.73-1.58 (m, 3H), 0.92 (dd, 6H, J= 8.2, 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t$  = 25.82 min; ESI-MS: *m/z* 1019.5 (22) [2M+K<sup>+</sup>], 1003.3 (30) [2M+Na<sup>+</sup>], 981.2 (6) [2M+H<sup>+</sup>], 513.3 (22) [M+Na<sup>+</sup>], 491.1 (28) [M+H<sup>+</sup>].

#### Ersatz von Thr in Isochinolin-3-carbonyl-Leu-Asp-Thr-OH:

Mit den entsprechenden Fmoc-Aminosäuren belegtes Wang-Harz (Fmoc-Phe-OH: 0.577 mmol/g; Fmoc-Phg-OH: approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren folgende farblose TFA-Salze:

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS	R <sub>t 5-80</sub>	%
129a <sup>*</sup>	Ichin-Leu-Asp-Phg-OH	$C_{28}H_{30}N_4O_7$	534.56	535.1	21.85	29%
129b <sup>*</sup>	Ichin-Leu-Asp-Phg-OH	$C_{28}H_{30}N_4O_7$	534.56	535.2	22.26	26%
130	Ichin-Leu-Asp-Phe-OH	$C_{29}H_{32}N_4O_7$	548.59	549.2	25.15	34%

während der Reaktion trat Racemisierung auf, so daß keine Aussagen über die Stereochemie von Phg getroffen werden kann.

Die Synthese der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen **Thiazol-Bibliothek** wurde manuell durchgeführt. Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-TCP-Harz (200 mg, 0.386 mmol/g, 77.2  $\mu$ mol) bzw. Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz<sup>\*</sup> (118 mg, 0.595 mmol/g, 70.2  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 40, AAV 31, Lyophilisieren und HPLC-Reinigung folgende Feststoffe:

	$R_2$	<b>R</b> <sub>3</sub>	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 20-80</sub>	Log P	%
135	Ph	Н	$C_{23}H_{30}N_4O_7S$	506.57	507.0	14.42	1.71	33%
136	Ph	Ph	$C_{29}H_{34}N_4O_7S$	582.67	583.1	19.22	3.44	29%
137	p-NO <sub>2</sub> -Ph	Н	$C_{23}H_{29}N_5O_9S$	551.57	552.0	17.67	n.d.	43%
138	Indan-1-c	onyl	$C_{24}H_{28}N_4O_8S$	532.57	533.1	15.09	0.94	9%
139	Me	Me	$C_{19}H_{30}N_4O_7S$	458.53	459.1	7.43	0.65	51%
140	Bn	Н	$C_{24}H_{32}N_4O_7S$	520.60	n.d.	12.94	1.99	10%
141*	Н	Bn	$C_{24}H_{32}N_4O_7S$	520.60	521.1	12.15	1.62	15%

Die Synthese der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen **Bibliothek** mit einem *N*-terminalen **4-Alkylamino-3-nitrophenyl-***scaffold* wurde manuell durchgeführt. Fmoc-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.41 mmol/g) bzw. Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.372 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 25, AAV 37, AAV 31, Lyophilisieren und HPLC-Reinigung folgende gelbe Feststoffe als TFA-Salze:

## 2-[(1-{[4-(Benzylamino)-3-nitrophenyl]carboxamido}-2-carboxyethyl)carboxamido]-3-hydroxybutansäure (142): Ausbeute 58%; C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>\*TFA: 488.45\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 18.78$ ; ESI-MS: *m/z* 998.9 (68) [2M+Na<sup>+</sup>], 976.9 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 489.0 (58) [M+H<sup>+</sup>].

Die Synthese der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen **Bibliothek** mit einem *N*-terminalen **2-Alkylamino-5-nitrophenyl-***scaffold* wurde manuell durchgeführt. Fmoc-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.345 mmol/g) bzw. Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.372 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 25, AAV 37, AAV 31, Lyophilisieren und HPLC-Reinigung folgende gelbe Feststoffe als TFA-Salze:

## 2-[(1-{[5-(Benzylamino)-2-nitrophenyl]carboxamido}-2-carboxyethyl)carboxamido]-3-hydroxybutansäure (144):

Ausbeute: 69%; C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>\*TFA: 488.45\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 21.17$ ; ESI-MS: m/z 1015.3 (65) [2M+K<sup>+</sup>], 999.2 (87) [2M+Na<sup>+</sup>], 977.2 (100) [2M+H<sup>+</sup>], 511.3 (16) [M+Na<sup>+</sup>], 489.1 (73) [M+H<sup>+</sup>].

### 2-({1-[5-(Benzylamino)-2-nitrophenyl]carboxamido}-3-

## methylbutyl)carboxamido]-2-carboxyethyl}-carboxamido)-3-hydroxybutansäure (145):

Ausbeute: 71%; C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>\*TFA: 601.61\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 24.46$  ESI-MS: m/z 1241.1 (34) [2M+K<sup>+</sup>], 1225.0 (90) [2M+Na<sup>+</sup>], 1203.0 (74) [2M+H<sup>+</sup>], 624.2 (40) [M+Na<sup>+</sup>], 602.0 (100) [M+H<sup>+</sup>].

## 2-[(2-Carboxy-1-{[1-({5-[(1-carboxy-2-phenylethyl)amino]-2-nitrophenyl}carboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}ethyl)carboxamido]-3hydroxybutansäure (146):

Ausbeute 52%; C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>\*TFA: 659.64\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

ESI-MS: m/z 1358.2 (30) [2M+K<sup>+</sup>], 1341.0 (28) [2M+Na<sup>+</sup>], 1319.0 (26) [2M+H<sup>+</sup>], 682.2 (88) [M+Na<sup>+</sup>], 660.1 (72) [M+H<sup>+</sup>].

## 2-[(2-Carboxy-1-{[1-({4-[(1-carboxy-2-phenylethyl)amino]-3-nitrophenyl}carboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}ethyl)carboxamido]-3-

## hydroxybutansäure (148):

Ausbeute 40%; C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>\*TFA: 659.64\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 21.09$ ; ESI-MS: m/z 1358.3 (10) [2M+K<sup>+</sup>], 1341.1 (58) [2M+Na<sup>+</sup>], 1319.1 (32) [2M+H<sup>+</sup>], 682.2 (99) [M+Na<sup>+</sup>], 660.1 (61) [M+H<sup>+</sup>].

## 2-[(2-Carboxy-1-{[1-({4-[(carboxymethyl)amino]-3-nitrophenyl}-carboxamido)-3methylbutyl]carboxamido}ethyl)carboxamido]-3-hydroxybutansäure (149):

Ausbeute 22%; C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>\*TFA: 569.52\*114.02 g/mol; Log P: n.d.

ESI-MS: m/z 1177.9 (30) [2M+K<sup>+</sup>], 1161.8 (44) [2M+Na<sup>+</sup>], 1139.8 (98) [2M+H<sup>+</sup>], 592.7 (30) [M+Na<sup>+</sup>], 570.0 (100) [M+H<sup>+</sup>].

#### 2-Naphtalen-2-carbonyl-Leu-Asp-Thr-OH (168):

Fmoc-Leu-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Wang-Harz (0.222 mg, 0.595 mmol/g, 132.1  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **168** (17.4 mg, 26%) als farblosen Feststoff. C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 501.53 g/mol; Log P: 0.54

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 20.45$  min; ESI-MS: m/z 1041.1 (38) [2M+K<sup>+</sup>], 1025.0 (100) [2M+Na<sup>+</sup>], 1003.0 (74) [2M+H<sup>+</sup>], 524 (72) [M+Na<sup>+</sup>], 502.0 (44) [M+H<sup>+</sup>].

Die Synthese von Verbindungen mit einer 3-Amino-3-aryl-propionsäure-Struktureinheit wurde an einem vollautomatischen Syntheseroboter SyRo II durchgeführt. Mit den entsprechenden Fmoc-Aminosäuren belegtes TCP-Harz bzw. Wang-Harz ergab nach AAV 22, AAV 23, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren folgende Verbindungen als TFA-Salze:

## 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(2-methylphenyl)propionsäure (174a):

Ausbeute: 44%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.27$  (br. s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.74 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.66 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 8.55 (s, 1H), 8.25 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.19 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.88 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.81 (t, 1H, J= 7.8 Hz), 7.36 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 7.20-7.09 (m, 3H), 5.44-5.37 (m, 1H), 4.71-4.63 (m, 1H), 2.65 (d, 2H, J= 7.4 Hz), 2.35 (s, 3H), 1.69-1.55 (m, 3H), 0.97-0.89 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.21 min; ESI-MS: *m/z* 933.3 (30) [2M+Na<sup>+</sup>], 917.1 (8) [2M+Na<sup>+</sup>], 894.7 (2) [2M+H<sup>+</sup>], 470.1 (28) [M+Na<sup>+</sup>], 448.1 (24) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(2-methylphenyl)propionsäure (174b):

Ausbeute: 49%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.28 (br. s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.69 (d, 1H, J= 9.1 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.31 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 7.20-7.10 (m, 3H), 5.44-5.37 (m, 1H), 4.73-4.66 (m, 1H), 2.73-2.61 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.61-1.44 (m, 3H), 0.87 (dd, 6H, J= 13.0, 5.7 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.86 min; ESI-MS: *m/z* 933.3 (32) [2M+Na<sup>+</sup>], 917.1 (9) [2M+Na<sup>+</sup>], 894.8 (1) [2M+H<sup>+</sup>], 470.1 (24) [M+Na<sup>+</sup>], 448.0 (20) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(3-methylphenyl)propionsäure (175a):

Ausbeute: 31%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.31$  (br. s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.71 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.68 (d, 1H, J= 9.1 Hz), 8.56 (s, 1H), 8.25 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.19 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.88 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.82 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.21-7.11 (m, 3H), 7.03 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 5.17 (q, 1H, J= 7.8 Hz), 4.72-4.64 (m, 1H), 2.79 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 2.70-2.67 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.73-1.56 (m, 3H), 0.97-0.90 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 25.35$  min; ESI-MS: *m/z* 933.2 (16) [2M+K<sup>+</sup>], 917.1 (4) [2M+Na<sup>+</sup>], 470.2 (14) [M+Na<sup>+</sup>], 448.0 (8) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(3-methylphenyl)propionsäure (175b):

Ausbeute: 31%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.25$  (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.76 (d, 1H, J= 8.1 Hz), 8.73 (d, 1H, J= 9.0 Hz), 8.59 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.1 Hz), 8.21 (d, 1H, J= 8.1 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.7 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.3 Hz), 7.20 (t, 1H, J= 7.3 Hz), 7.14-7.08 (m, 2H), 7.04 (d, 1H, J= 7.3 Hz), 5.18 (q, 1H, J= 7.7 Hz), 4.73-4.67 (m, 1H), 2.75-2.64 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.65-1.48 (m, 3H), 0.88 (t, 6H, J= 6.0 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.91 min; ESI-MS: *m/z* 933.2 (16) [2M+K<sup>+</sup>], 917.1 (6) [2M+Na<sup>+</sup>], 470.2 (12) [M+Na<sup>+</sup>], 448.0 (8) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(4-methylphenyl)propionsäure (176a):

Ausbeute: n.d.%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.16$  (br. s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.68 (t, 2H, J= 9.3 Hz), 8.54 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.18 (d, 1H, 8.3 Hz), 7.89-7.85 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 1H), 7.19-7.10 (m, 3H), 7.01 (d, 1H, J= 7.2 Hz), 5.16 (q, 1H, J= 15.1, 7.8 Hz), 4.70-4.63 (m, 1H), 2.70-2.65 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.69-1.55 (m, 3H), 0.94-0.89 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t =$ 

24.38 min; ESI-MS: *m/z* 917.3 (26) [2M+Na<sup>+</sup>], 895.2 (44) [2M+H<sup>+</sup>], 471.1 (14) [M+Na<sup>+</sup>], 448.1 (52) [M+H<sup>+</sup>].

### 3-{[1-(3-Isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamido}-3-(4methylphenyl)propionsäure (176b):

Ausbeute: n.d.%; C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.60

HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 25.03$  min; ESI-MS: m/z 917.3 (34) [2M+H<sup>+</sup>], 895.2 (84) [2M+H<sup>+</sup>], 470.3 (10) [M+Na<sup>+</sup>], 448.1 (66) [M+H<sup>+</sup>]; HRMS m/z 447.2199.

## 3-(4-Ethylphenyl)-3-{[1-(3-isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamidopropionsäure (177a):

Ausbeute: 35%; C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 461.55\*114.02 g/mol; Log P: 4.01

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.16$  (br. s, 1H), 9.36 (s, 1H), 8.70-8.65 (m, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, J= 8.0 Hz), 8.18 (d, 1H, J= 8.0 Hz), 7.90-7.85 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 1H), 7.23 (d, 2H, J= 7.0 Hz), 7.12 (d, 2H, J= 7.2 Hz), 5.20-5.13 (m, 1H), 4.70-4.62 (m, 1H), 2.71-2.64 (m, 2H), 2.55-2.50 (m, 2H), 1.69-1.54 (m, 3H), 1.14-1.09 (m, 3H), 0.94-0.89 (m, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 26.71 min; ESI-MS: *m/z* 961.2 (31) [2M+K<sup>+</sup>], 945.0 (30) [2M+Na<sup>+</sup>], 922.9 (5) [2M+H<sup>+</sup>], 484.1 (19) [M+Na<sup>+</sup>], 462.0 (22) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-(4-Ethylphenyl)-3-{[1-(3-isoquinolylcarboxamido)-3-methylbutyl]carboxamidopropionsäure (177b):

Ausbeute: 31%; C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 461.55\*114.02 g/mol; Log P: 4.01

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.23$  (br. s, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.73 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.71 (d, 1H, J= 9.2 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.25 (d, 1H, J= 8.0 Hz), 8.20 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.91-7.86 (m, 1H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.21 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 7.14 (d, 2H, J= 8.0 Hz), 5.17 (q, 1H), 4.72-4.66 (m,1H), 2.75-2.62 (m, 2H), 2.55 (q, 2H, J=7.6 Hz), 1.63-1.46 (m, 3H), 1.14 (t, 3H, J= 7.5 Hz), 0.87 (dd, 6H, J= 14.2, 5.7 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 27.45$  min; ESI-MS:
m/z 961.2 (30) [2M+K <sup>+</sup> ], 945.1 (16) [2M+Na <sup>+</sup> ], 923.0 (1) [2M+H <sup>+</sup> ], 484.2 (26)
$[M+H^{+}], 462.0 (18) [M+H^{+}].$

	$R_1$	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	Log P	%
173a	Н	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	433.50	434.2	23.68	3.11	n.d.
173b	Н	$C_{25}H_{27}N_3O_4$	433.50	434.1	24.20	3.11	n.d.
178a	$4-C_3H_7$	$C_{28}H_{33}N_3O_4$	475.58	476.1	27.68	4.34	38%
178b	$4-C_3H_7$	$C_{28}H_{33}N_3O_4$	475.58	476.1	28.43	4.34	43%
180a	3-NO <sub>2</sub>	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.1	24.70	n.d.	42%
180b	3-NO <sub>2</sub>	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.1	25.17	n.d.	39%
179a	2-NO <sub>2</sub>	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.1	24.44	n.d.	58%
179b	2-NO <sub>2</sub>	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.1	25.10	n.d.	56%
181a	$4-NO_2$	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.1	24.71	n.d.	47%
181b	$4-NO_2$	$C_{25}H_{26}N_4O_6$	478.50	479.2	25.33	n.d.	41%
182a	4-COOH	$C_{26}H_{27}N_3O_6$	477.51	478.1	20.95	2.67	17%,
182b	4-COOH	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	477.51	478.1	21.14	2.67	4%

Die Synthese von **Verbindungen 183** und **184** wurde an einem vollautomatischen Syntheseroboter SyRo II durchgeführt. Mit den entsprechenden Fmoc-Aminosäuren belegtes Wang-Harz (Fmoc-Phe-OH: 0.577 mmol/g; Fmoc-Phg-OH: approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28 und AAV 31 folgende Verbindungen als farblose TFA-Salze:

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t 5-80</sub>	Log P	%
183a	Ichin-Leu-Phg-OH	$C_{24}H_{25}N_3O_4$	419.47	n.d.	24.13	2.99	n.d.
183b	Ichin-Leu-phg-OH	$C_{24}H_{25}N_3O_4$	419.47	420.0	24.64	2.99	n.d.
184	Ichin-Leu-Phe-OH	$C_{25}H_{27}N_3O_4$	433.50	434.2	25.08	3.27	46%

# (2-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentanoyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)-essigsäure) (185)

Fmoc-[(1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolin-1-yl)-essigsäure]-TCP-Harz (0.310 g, 0.632 mmol/g, 196  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 24 AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **185** als farblosen Feststoff. C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 459.54 g/mol; Log P: 3.32

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, 2 Isomere):  $\delta = 12.29$  (br. s), 9.42 (s), 9.39 (s), 9.28 (s), 8.94 (d, J= 7.7 Hz), 8.88 (d, J= 8.2 Hz), 8.83 (d, J= 8.8 Hz), 8.62-8.52 (m), 8.43 (s), 8.29-8.12 (m), 7.93-7.77 (m), 7.35-6.98 (m), 5.89 (t, J= 7.1 Hz), 5.81-5.74 (m), 5.53-5.39 (m), 5.23-5.12 (m), 4.39-4.32 (m), 4.04-3.98 (m), 3.97-3.90 (m), 3.84-3.75 (m), 3.73-3.65 (m), 3.31-3.16 (m), 3.06-2.58 (m), 1.85-1.48 (m), 1.23 (m), 1.02 (d, J= 6.0 Hz), 1.01-0.97 (m), 0.95-0.91 (m), 0.86 (d, J= 6.0 Hz), 0.70 (d, J= 6.6 Hz);HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 26.57 min; ESI-MS: *m/z* 957.5 (60) [2M+K<sup>+</sup>], 941.3 (39) [2M+Na<sup>+</sup>], 919.2 (25) [2M+H<sup>+</sup>], 482.3 (34) [M+Na<sup>+</sup>], 460.1 (46) [M+H<sup>+</sup>].

# 3-{2-[(Isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentylamino}-3-*p*-tolyl-propionsäure (186)

Fmoc-(3-Amino-3-*p*-tolyl-propionsäure)-TCP-Harz (0.213 g, approx. 0.6 mmol/g, 127.9 μmol) ergab nach AAV 22, AAV 38, AAV 24, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **186** (**186a**: 22.8 mg, 33%, **186b**: 20.3 mg, 29%) als farblosen Feststoff.

C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>\*TFA: 433.54\*114.02 g/mol; Log P: 4.19

**186a**: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.19$  (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.86 (d, 1H, J= 9.6 Hz), 8.59 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.22 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.38 (d, 2H, J= 8.3 Hz), 7.19 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 4.50-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.11-3.02 (m, 2H), 2.86-2.80 (m, 1H), 2.76-2.69 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.66-1.47 (m, 2H), 1.33-1.26 (m, 2H), 0.86 (t, 6H); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 22.69 ESI-MS: *m/z* 905.5 (32) [2M+K<sup>+</sup>], 889.9 (23) [2M+Na<sup>+</sup>], 456.3 (46) [M+Na<sup>+</sup>], 434.3 (82) [M+H<sup>+</sup>].

**186b**: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.58$  (br. s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.91 (d, 1H, J= 9.6 Hz), 8.61 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.22 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.90 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.41 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.26 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 4.68-4.61 (m, 1H), 4.53-4.43 (m, 1H), 3.13 (dd, 2H, J= 16.5, 5.2 Hz), 3.00-2.89 (m, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.64-1.54 (m, 1H), 1.53-1.45 (m, 1H), 1.32-1.17 (m, 1H), 0.85 (dd, 6H, J= 12.2, 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 22.84$ ; ESI-MS: *m/z* 905.2 (53) [2M+K<sup>+</sup>], 889.1 (45) [2M+Na<sup>+</sup>], 456.1 (100) [M+Na<sup>+</sup>], 434.1 (77) [M+H<sup>+</sup>].

# 3-{[*N*-Isobutyl-*N'*-(isoquinolin-3-carbonyl)-hydrazinocarbonyl]-amino}-3-*p*-tolylpropionsäure (187):

Fmoc-(3-Amino-3-*p*-tolyl-propionsäure)-TCP-Harz (0.228 g, approx. 0.6 mmol/g, 136.9  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 36, AAV 24, AAV 28 AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **187** (24.7 mg, 39%) als farblosen Feststoff. C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 448.51\*114.02 g/mol; Log P: 3.12 (nach Broto)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 12.10$  (br. s, 1H), 10.80 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.24 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.91 (t, 1H, J= 7.8 Hz), 7.84 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.22 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.08 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.02 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 5.10-5.03 (m, 1H), 4.01 (br. s, 2H), 2.71 (dd, 1H, J= 16.1, 6.5 Hz), 2.63 (dd, 1H, J= 15.7, 6.5 Hz), 2.26 (s, 3H), 1.79 (h, 1H), 0.87 (t, 6H, J= 5.7 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 23.93$  min; ESI-MS: *m/z* 935.2 (26) [2M+K<sup>+</sup>], 919.2 (20) [2M+Na<sup>+</sup>], 897.0 (2) [2M+H<sup>+</sup>], 471.1 (30) [M+Na<sup>+</sup>], 449.0 (9) [M+H<sup>+</sup>].

## 3-{2-[Isobutyl-(isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-acetylamino}-3-*p*-tolylpropionsäure (188):

Fmoc-(3-Amino-3-*p*-tolyl-propionsäure)-TCP-Harz (0.237 g, approx. 0.6 mmol/g, 142.5  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **188** (48.2 mg, 60%) als farblosen Feststoff. C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 3.33

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, 2 Isomere):  $\delta = 12.18$  (br. s), 9.35 (s), 9.24 (s), 8.48 (d, J=8.3 Hz), 8.34 (d, J=8.3 Hz), 8.27-8.00 (m), 7.85 (t, J= 7.8 Hz), 7.80-7.75 (m), 7.36 (d, J= 8.3 Hz), 7.28-7.22 (m), 7.14 (d, J= 7.4 Hz), 6.98 (d, J= 7.8 Hz), 6.92 (d, J= 7.8 Hz), 5.22 (q, J= 7.4 Hz), 5.04 (q, J= 7.4 Hz), 4.59-4.51 (m), 4.32 (s), 4.23-4.03 (m), 3.39-3.31 (m), 3.29-3.22 (m), 2.98-2.81 (m), 2.77-2.66 (m), 2.56 (d, J= 7.4 Hz), 2.31 (s), 2.27 (s), 2.21 (s), 2.07 (heptett), 1.88-1.79 (heptett), 0.96-0.90 (m), 0.72-0.65 (m); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 21.83 min; ESI-MS: *m/z* 933.2 (22) [2M+K<sup>+</sup>], 917.1 (8) [2M+K<sup>+</sup>], 894.8 (1) [2M+H<sup>+</sup>], 470.2 (12) [M+Na<sup>+</sup>], 448.0 (6) [M+H<sup>+</sup>].

## (2-{2-[Isobutyl-(isoquinolin-3-carbonyl)-amino]-acetyl}-1,2,3,4-tetrahydro-

## isoquinolin-1-yl)-essigsäure (189):

Fmoc-[(1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolin-1-yl)-essigsäure]-TCP-Harz (0.177 g, 0.63 mmol/g, 112  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren das TFA-Salz von **189** (56.9 mg, 89%) als farblosen Feststoff.

C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 459.54\*114.02 g/mol; Log P: 3.06

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO, 2 Isomere):  $\delta = 12.33$  (br. s), 9.37 (m), 9.18 (s), 8.47 (s), 8.23-7.64 (m), 7.35-7.09 (m), 7.05-7.00 (m), 6.92-6.86 (m), 5.83 (t, J= 6.5 Hz), 5.62 (t, J= 6.5 Hz), 5.52-5.47 (m), 5.15-5.09 (m), 5.00 (d, J= 17.4 Hz), 4.76 (d, J= 16.1 Hz), 4.52 (s), 4.50-4.31 (m), 4.23-4.14 (m), 3.92-3.85 (m), 3.74-3.65 (m), 3.56-3.48 (m), 3.46-3.35 (m), 3.35-3.10 (m), 3.07-2.62 (m), 2.59-2.42 (m), 2.26-2.16 (m), 2.11-1.97 (m), 1.95-1.84 (m), 1.00-0.89 (m), 0.75-0.68 (m); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 21.95$  min; ESI-MS: *m/z* 957.2 (28) [2M+K<sup>+</sup>], 941.1 (16) [2M+Na<sup>+</sup>], 919.1 (4) [2M+H<sup>+</sup>], 482.2 (18) [M+Na<sup>+</sup>], 460.0 (12) [M+H<sup>+</sup>].

# {2-[*N*-Isobutyl-*N*′-(isoquinolin-3-carbonyl)-hydrazinocarbonyl]-1,2,3,4tetrahydro-isoquinolin-1-yl}-essigsäure (190):

Fmoc-[(1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolin-1-yl)-essigsäure]-TCP-Harz (0.258 g, 0.63 mmol/g, 163  $\mu$ mol) ergab nach AAV 22, AAV 36, AAV 24, AAV 28 AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren **190** (42.8 mg, 46%) als farblosen Feststoff. C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 460.53\*114.02 g/mol; Log P: 2.92 (nach Broto)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 11.94$  (br. s, 1H), 11.07 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, J= 7.8 Hz), 8.16 (d, 1H, J= 8.3), 7.89 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.83 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.16 (d, 1H, J= 7.4 Hz), 7.07-6.99 (m, 2H), 6.96 (d, 1H, J= 7.0 Hz), 5.30 (t, 1H, J= 6.5 Hz), 4.05-3.98 (m, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 3.16-3.09 (m, 1H), 2.77 (dd, 1H, J= 14.8, 5.2 Hz), 2.73-2.55 (m, 3H), 1.90 (sep, 1H), 0.92 (t, 6H, J= 6.5 Hz); HPLC (5-80% in 30 min) R<sub>t</sub> = 25.10 min; ESI-MS: *m/z* 959.1 (34) [2M+K<sup>+</sup>], 943.1 (22) [2M+Na<sup>+</sup>], 920.9 (4) [2M+H<sup>+</sup>], 483.1 (43) [M+Na<sup>+</sup>], 461.0 (19) [M+H<sup>+</sup>].

Die Synthese **cyclischer Peptide** mit einer **3-Amino-3-aryl-propionsäure-Struktureinheit** (191-192) wurde manuell nach AAV 28 und AAV 24 durchgeführt. Die Cyclisierung der Verbindungen erfolgte gemäß AAV 29 und AAV 11.

	Sequenz	Σ	MG	ESI-MS [M+H <sup>+</sup> ]	R <sub>t</sub> (5-80)	log P	%
191a	c(F-L-βAS-A-D-p)	$C_{37}H_{46}N_6O_{10}$	734.81	735.5	16.38	n.d.	n.d.
191b	c(F-L-βAS-A-D-p)	$C_{37}H_{46}N_6O_{10}$	734.81	735.3	17.91	-0.53	17%
192	c(F-L-βAS-D-p)	$C_{34}H_{41}N_5O_9$	663.73	664.5	n.d.	0.13	23%

 $\beta AS = 4$ -(1-Amino-2-carboxy-ethyl)-benzoesäure (167)

# 5-[*N*-Isobutyl-*N'*-(isoquinolin-3-carbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-*p*-tolyl-pentansäure (199):

TCP-Harz (0.300 g, 0.9 mmol/g, 270  $\mu$ mol) wurde nach AAV 18 mit 5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N-isobutyl-hydrazino]-5-oxo-3-p-tolyl-pentansäure

(194.0 mg, 377.0  $\mu$ mol) belegt. AAV 22, AAV 24, AAV 28, AAV 31, HPLC-Reinigung und Lyophilisieren ergab **193** (31.8 mg, 21%) als farblosen Feststoff. C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>\*TFA: 447.53\*114.02 g/mol; Log P: 4.01 nach Broto

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 11.31$  (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.29 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.23 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 7.92 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.86 (t, 1H, J= 7.4 Hz), 7.08 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.00 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 6.2 (br. s, 1H), 3.52-3.45 (m, 2H), 2.59 (dd, 2H, J= 15.7, 5.7 Hz), 2.41 (dd, 2H, J= 15.7, 8.7 Hz), 2.20 (s, 3H), 1.81 (h, 1H), 0.87 (d, 4H, J= 6.5 Hz), 0.83 (d, 3H, J= 6.1 Hz); HPLC (5-80% in 30 min)  $R_t = 25.71$  min; ESI-MS: *m/z* 933.2 (42) [2M+K<sup>+</sup>], 917.1 (45) [2M+Na<sup>+</sup>], 894.9 (34) [2M+H<sup>+</sup>], 448.0 (45) [M+H<sup>+</sup>].

	Sequenz	Σ	MW	ESI-MS
				$[M+H^+]$
204	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-A-Y-OH	$C_{80}H_{112}N_{18}O_{23}$	1693.88	1693.6
205	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-A-K-Y-OH	$C_{82}H_{119}N_{19}O_{21}$	1706.97	1706.7
206	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-A-D-K-Y-OH	$C_{84}H_{121}N_{19}O_{23}$	1765.01	17.64.6
207	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-A-G-D-K-Y-OH	$C_{80}H_{112}N_{18}O_{23}$	1693.88	1693.6
208	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-A-K-G-D-K-Y-OH	$C_{80}H_{113}N_{19}O_{23}$	1708.90	1708.6
209	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-A-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{80}H_{112}N_{16}O_{23}$	1665.87	1665.6
210	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-A-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{80}H_{113}N_{19}O_{23}$	1708.90	1708.6
211	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-A-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{82}H_{119}N_{19}O_{21}$	1706.97	1706.7
212	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-A-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	C <sub>77</sub> H <sub>115</sub> N <sub>19</sub> O <sub>23</sub>	1674.88	1674.6
213	H <sub>2</sub> N-G-E-F-A-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{77}H_{115}N_{19}O_{22}$	1658.88	1658.6
214	H <sub>2</sub> N-G-E-A-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{77}H_{115}N_{19}O_{23}$	1674.88	1674.6
215	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.6
216	H <sub>2</sub> N-G-A-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{81}H_{117}N_{19}O_{21}$	1692.94	1692.6
217	H <sub>2</sub> N-A-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-Y-OH	$C_{84}H_{121}N_{19}O_{23}$	1765.01	1764.7
218	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R-L-K-G-D-K-A-OH	$C_{77}H_{115}N_{19}O_{22}$	1658.88	1658.6
219	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}D\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}K\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}G\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.6
220	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}D\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}K\text{-}G\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
221	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-D-L-R- <b>D</b> -L-K-G-K-Y-OH	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
222	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}D\text{-}L\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}R\text{-}L\text{-}K\text{-}G\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1751.6
223	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}D\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}K\text{-}G\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.6
224	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}K\text{-}G\text{-}D\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
225	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}K\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}G\text{-}D\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
226	$H_2N\text{-}G\text{-}E\text{-}F\text{-}Y\text{-}F\text{-}L\text{-}R\text{-}L\text{-}K\text{-}G\text{-}\boldsymbol{D}\text{-}D\text{-}K\text{-}Y\text{-}OH$	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	n.d.
227	H <sub>2</sub> N-G-E-F-Y-F-A-L-R-L-K-G-A-K-Y-OH	$C_{81}H_{119}N_{19}O_{19}$	1662.96	1662.7
228	H <sub>2</sub> N-G-Y-D-K-R-F-G-L-F-D-E-K-L-Y-OH	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
229	H <sub>2</sub> N-D-Y-L-F-R-F-G-L-G-K-E-K-D-Y-OH	$C_{83}H_{119}N_{19}O_{23}$	1750.98	1750.7
230	H <sub>2</sub> N-D-G-F-Y-F-D-L-R-L-E-K-G-K-Y-OH	C <sub>83</sub> H <sub>119</sub> N <sub>19</sub> O <sub>23</sub>	1750.98	1750.7

# 8.3.3 Ala- und Asp-*scan* von α3β1-Integrinantagonisten

## 8.4 Biologische Evaluation

# 8.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit α3-Integrinexprimierenden Zellen

## Blockierungspuffer

Dazu wird PBS mit BSA (2%) versetzt.

## Bindungspuffer

Das Medium wird mit BSA (0.5%) und Hepes (20 mM) versetzt.

## Hexoseamidase-Reagenz

Man löst Natrium-Citrat-Puffer (100 mM), Triton-X 100 (0.5%) und p-Nitrophenol-Nacetyl-beta-D-glucosaminid (15 mM) in  $H_2O$ . Mit Citronensäure wird der pH-Wert auf 5.0 eingestellt.

## **Stop-Puffer**

NaOH (0.2 M) und EDTA (5 mM) werden in Wasser gelöst.

## Adhäsionspuffer

In PBS wird FCS (0.5%) gelöst.

## 8.4.1.1 Adhäsionsassay für α3-Integrin-exprimierende Zellen<sup>[392]</sup>

Die 96-iger Mikrotiterplatte wurde mit PBS ( $3 \times 100 \mu$ L/well) gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Glycoprotein (in 50  $\mu$ L/well) beschichtet. Anschließend wurde die Platte mit PBS ( $3 \times 100 \mu$ L/well) gewaschen und mit dem Blockierungspuffer ( $100 \mu$ L/well) für 2 h bei RT blockiert. Nach Waschen mit PBS ( $3 \times 100 \mu$ L/well) wurden Zellen (OVCAR: 30000 Zellen/well; OVMZ6: 40000 Zellen/well) und die zu testende Verbindung im Adhäsionsmedium ( $50 \mu$ L) gelöst und auf die Platte ausgesät. Die Platten wurden für 1.5 h bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit PBS ( $3 \times 100 \mu$ L/well) wurde in jedes *well* eine 1:1 Mischung ( $100 \mu$ L/well) aus PBS und Hexoseamidasereagenz pipettiert und für 1.5 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend gab man Stop-Puffer ( $100 \mu$ L/well) zu und vermaß die Platte bei 405 nm im ELISA *reader*.

Die Glycoproteine wurden in folgenden Mengen auf die Platte aufgetragen: Laminin, Collagen Typ I, Collagen Typ IV und Fibronectin je 5  $\mu$ g/mL, Vitronectin 10  $\mu$ g/mL, Poly-L-Lysin wurde unverdünnt eingesetzt.

Alternativ wurden anstelle der Glycoproteine die zu untersuchenden Verbindungen direkt auf die Platte *gecoated*. Der Adhäsionsassays wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings gab man in diesem Fall Zellen ohne Inhibitor zu.

## 8.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit α4-Integrinexprimierenden Zellen

## Adhäsionspuffer

Der Adhäsionspuffer besteht aus Click's RPMI Medium, 1 % BSA, 1.0 mM MgCl\_2 und 1.0 mM CaCl\_2

## Tris Buffer Saline (TBS-Puffer) für die Integrin-Stimulation mit Mn<sup>2+</sup>-Ionen

Der 1x TBS-Puffer besteht aus Tris (14 mM), NaCl (137 mM) und KCl (2.7 mM), Glucose (2 mM) und  $Mn^{2+}$  (1mM).

## Medium für 38C13B1- und 38C13B7- Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) werden mit FCS (35 mL), Glutamin (5 mL) und ß-Mercaptoethanol (1000 X, 0.5 mL) versetzt.

## Medium für Jurkat-Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) werden mit FCS (35 mL) und Glutamin (5 mL) versetzt.

## 38C13ß7-Zellen

B Zell-Lymphom aus der C3H/He Maus, infiziert mit L $\beta$ 7SN Virus und mit G418 selektiert.

## 38C13ß1- und 38C13ß7-Zellen in Kultur

Täglich wird ca.  $^{2}/_{3}$  der Zellösung abgesaugt und wieder mit neuem Medium aufgefüllt. Die Zellkulturen werden in einem Wärmeschrank bei 37 °C aufbewahrt.

## Beschichtung der Mikrotiterplatten mit VCAM

Es wird eine rhVCAM-1 Stammlösung (75  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.3  $\mu$ g rhVCAM in 100  $\mu$ L PBS pro *well*). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### Beschichtung der Mikrotiterplatten mit MAdCAM-1

Es wird eine *donkey*  $\alpha$  *human* IgG-Stammlösung (48 µL, 1.3 µg/µL) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.5 µg *donkey*  $\alpha$  *human* IgG in 100 µL PBS pro *well*). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wäscht man die Platte mit Adhäsionspuffer (1 x 100 µL/well) und inkubiert sie 30 min bei RT mit MAdCAM-1 Überstand (je nach Konzentration des MAdCAM-1 Überstands 100-150 µL/well).

#### 8.4.2.1 Zellbasierter Adhäsionsassay für α4-Integrin-exprimierende Zellen

Es wurden folgende Adhäsionsassays durchgeführt: 38C13ß7-Zellen auf MAdCAM-1 beschichteten Platten, 38C13ß7-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten und Jurkat-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten.

### Vorbereitung der Mikrotiterplatten:

Die mit VCAM-1 oder MAdCAM-1 beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit Adhäsionspuffer gewaschen (1 x 100  $\mu$ L/well) und anschließend mit Adhäsionspuffer für 1 h bei RT blockiert.

### Vorbereitung der Zellen:

Die entsprechende Zellsuspension (12.5 mL) wurde 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS (1 x 5 mL) gewaschen und abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Man resuspendierte die Zellen in Adhäsionspuffer (3 mL) und inkubierte die Zellsuspension 30 min bei 37 °C mit einem Fluoreszenzfarbstoff (H33342, 6  $\mu$ L). Die Zellsuspension wurde 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS/1 mM EDTA (5 mL) gewaschen, bei 1500 Upm für 3 min zentrifugiert und in PBS (10 mL) resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Adhäsionspuffer gelöst (ca. 8\*10<sup>5</sup> Zellen/mL).

### Durchführung des Adhäsionsassays:

Die Zellsuspension (350  $\mu$ L, ca. 8\*10<sup>5</sup> Zellen/mL) wurde mit der entsprechenden Substanz (3.5  $\mu$ L aus der Stammlösung, 1 mg/10  $\mu$ L DMSO) 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf die Platte aufgetragen (3 x je 100  $\mu$ L). Man zentrifugierte die Mikrotiterplatten für 10 min bei 15 g und analysierte sie im Fluorimeter. Die Mikrotiterplatten wurden 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, unter dem Mikroskop auf ausgefallene Verbindungen untersucht, in ein PBS-Bad eingetaucht und anschließend mit einer Klebefolie die einzelnen *wells* abgeklebt. Die Mikrotiterplatte wurde invers 10 min bei 50 g zentrifugiert. Von der invertierten Platte zog man die Klebefolie ab und drückte sie auf einem Zellstoffpapier aus. Die immer noch invertierte Mikrotiterplatte wurde mit einer Pasteur-Pipette ausgesaugt. Die Mikrotiterplatte wurde nun wieder umgedreht, mit Adhäsionspuffer befüllt (100  $\mu$ L/well) und im Fluorimeter vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel<sup>®</sup>.

## 8.4.2.2 On-bead screening und Identifizierung

## Vorbereitung der Zellen:

Bei der Durchführung des *on-bead screenings* wurden sowohl stimulierte als auch nicht stimulierte Zellen verwendet. Für die stimulierten Zellen wurde der TBS-Puffer mit 1 mM  $Mn^{2+}$  verwendet.

Die entsprechende Zellsuspension (20 mL) wurde 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS (1 x 5 mL) gewaschen und abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde in PBS (10 mL) resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Adhäsionspuffer gelöst (1\*10<sup>6</sup> Zellen/mL Jurkat-Zellen, 5\*10<sup>6</sup> Zellen/mL 38C13ß7-Zellen).

## **On-bead-assay**

Die an TentaGel-MB-Photolinker gebundenen Substanzen (10 mg Harz, 650 *beads*) wurden unter Lichtausschluß in eine mit Alufolie umhüllte, 2 mL-Spritze mit PP-Fritte überführt und mit Adhäsionspuffer (5 x 2 mL je 5 min) gewaschen. Man inkubierte anschließend die *beads* 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln mit Adhäsionspuffer (2 mL). Nach dem Waschen der *beads* mit Adhäsionspuffer (3 x 2 mL je 5 min) wurde die Zellsuspension (1.5 mL) hinzugefügt. Die Plastikspritzen wurden in einer Glasflasche fest verankert und auf einem Rolator bei 8 Upm für 1.5 h bei 37 °C entlang ihrer Längsachse gedreht. Durch Entfernen des Spritzenstempels konnte man die Zell-

*bead*-Suspension in eine kleine Petri-Schale überführen und unter einem Mikroskop untersuchen.

## Analyse der positiven beads

Haben Zellen an die Macrobeads gebunden, so wurden einige dieser Beads mit einer Pasteur-Pipette entnommen und in eine 2 mL-Spritze mit PP-Fritte überführt. Man wusch die *beads* mit PBS/1 mM EDTA (3 x 1 mL je 10 min) und anschließend mit PBS (3 x 1 mL je 10 min). Bis zu ihrer weiteren Analyse wurden die Macrobeads im Vakuum getrocknet. Die Abspaltung der Substanzen von der festen Phase erfolgte mit einem Quecksilber-Hochdruckstrahler (TQ 150 Z2 von Heraeus) in einem 4:1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O-Gemisch (1 mL) für 2.5 h. Abschließend wurden die Verbindungen mittels HPLC-MS und MS<sup>n</sup> analysiert.

# 9 Literatur

- [1] E. Fischer, J. Chem. Soc. 1907, 1749-1765.
- [2] K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 2000, 39, 44-122.
- [3] F. H. C. Crick, J. D. Watson, Proc. Roy. Soc. (London) 1954, 80-96.
- [4] F. Sanger, *Science* **1959**, *129*, 1340-1344.
- [5] K. B. Mullis, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1994, 33, 1209-1213.
- [6] D. R. Liu, P. G. Schultz, Angew. Chem. 1999, 111, 36-56.
- [7] D. W. Talmage, Science 1959, 129, 1643-1648.
- [8] S. Tonegawa, *Nature* **1983**, *302*, 575-581.
- [9] R. B. Silverman, Medizinische Chemie f
  ür Organiker, Biochemiker und pharmazeutische Chemiker, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1994.
- [10] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996.
- [11] D. C. Horwell, W. Howson, D. C. Rees, *Drug Design and Discovery* 1994, *12*, 63-75.
- [12] J. Gante, Angew. Chem. 1994, 106, 1780-1802.
- [13] D. C. Roberts, F. Vellaccio, in E. Gross, J. Meienhofer (Eds.): *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 5*, Academic, New York **1983**, p. 341-449.
- [14] D. P. Fairlie, G. Abbenante, D. R. March, Curr. Med. Chem. 1995, 2, 654-686.
- [15] A. F. Spatola, in B. Weinstein (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, Marcel Dekker, New York 1983, p. 267-357.
- [16] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem. accepted* **2001**, .
- [17] R. Hirschmann, Angew. Chem. 1991, 30, 1278-1301.
- [18] R. W. Spencer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *61*, 61-67.

- [19] W. P. Walters, A. Murcko, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, *3*, 384-387.
- [20] G. A. Sawada, C. L. Barshun, B. S. Lutzke, M. E. Houghton, G. W. Padbury, N.
   F. H. Ho, T. J. Raub, *Pharm. Exptl. Ther.* **1999**, *288*, 1317-1326.
- [21] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature* 1962, 194, 178-180.
- [22] A. K. Ghose, G. M. Crippen, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1987, 27, 21-25.
- [23] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Del. Rev.* 1997, 23, 3-25.
- [24] M. A. Navia, P. R. Chaturvedi, Drug Discov. Today 1996, 1, 179-189.
- [25] O. H. Chan, B. H. Stewart, Drug Discov. Today 1996, 1, 461-473.
- [26] G. M. Rishton, Drug Discov. Today 1997, 1997, 382-385.
- [27] R. S. Pearlman, K. M. Smith, Persp. Drug Design Discov. 1998, 9, 339-353.
- [28] G. W. Bemis, M. A. Murcko, J. Med. Chem. 1996, 39, 2887-2893.
- [29] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendelowski, J. Comb. Chem. 1999, 1, 55-67.
- [30] A. Ajay, W. O. Walters, M. A. Murcko, J. Med. Chem. 1998, 41, 3314-3324.
- [31] J. Sadowski, H. Kubinyi, J. Med. Chem. 1998, 41, 3325-3329.
- [32] A. Dove, Nature Biotech. 1999, 17, 859-863.
- [33] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1996, 108, 2288-2337.
- [34] D. Maclean, J. J. Baldwin, V. T. Ivanov, Y. Kato, A. Shaw, P. Schneider, E. M. Gordon, J. Comb. Chem. 2000, 2, 562-578.
- [35] A. Furka, Notariell beglaubigtes Dokument Nr. 36237/1982 **1982**.
- [36] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 37, 487-493.
- [37] R. Frank, W. Heikens, G. Heisterberg-Moutsis, H. Blöcker, *Nucl. Acid. Res.* 1983, 11, 4365-4377.
- [38] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81, 3998-4002.
- [39] R. A. Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985, 82, 5131-5135.

- [40] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* 1991, 354, 84-86.
- [41] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* 1991, 354, 82-84.
- [42] C. M. Baldino, J. Comb. Chem. 2000, 2, 89-103.
- [43] H. An, P. D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3311-3340.
- [44] D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, J. Comb. Chem. 2001, 3, 125-150.
- [45] R. E. Dolle, J. Comb. Chem. 2000, 2, 383-433 and literature cited herein.
- [46] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* 1991, 354, 82-84.
- [47] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, Mol. Immunol. 1986, 23, 709-715.
- [48] M. C. Pirrung, Chem. Rev. 1997, 97, 473-488.
- [49] A. Ganesan, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1998, 37, 2828-2831.
- [50] D. P. Curran, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1998, 37, 1174-1196.
- [51] P. M. S. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13312-13320.
- [52] V. Swali, G. J. Langley, M. Bradley, Curr. Opin. Chem. Biol. 1999, 3, 337-341.
- [53] D. B. Kassel, Chem. Rev. 2001, 101, 255-267.
- [54] B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1999, 38, 2494-2532.
- [55] M. T. Reetz, Angew. Chem. 2001, 113, 292-320.
- [56] S. Senkan, Angew. Chem. 2001, 113, 322-341.
- [57] R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149-2154.
- [58] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 3045-3046.
- [59] C. C. Leznoff, J. Y. Wong, Can. J. Chem. 1972, 50, 2892-2893.
- [60] F. Camps, J. Castells, M. J. Ferrando, J. Font, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 1713-1714.
- [61] A. Patchornik, M. A. Kraus, J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, 7587-7589.
- [62] R. G. Franzén, J. Comb. Chem. 2000, 2, 195-214.
- [63] B. A. Lorsbach, M. J. Kurth, Chem. Rev. 1999, 99, 1549-1581.

- [64] R. E. Sammelson, M. J. Kurth, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 137-202.
- [65] S. Wendeborn, A. D. Mesmaeker, W. K.-D. Brill, S. Berteina, Acc. Chem. Res.
   2000, 33, 215-224.
- [66] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, Chem. Rev. 1997, 97, 411-448.
- [67] M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F. I. Auzanneau, *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 1994, 91, 3314-3318.
- [68] C. Gibson, *Dissertation* **2000**, Technische Universität München.
- [69] M. D. Connolly, S. B. Park, B. M. Reedy, R. F. Standaert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 951-954.
- [70] J. Jezek, J. Velek, P. Veprek, V. Velkova, T. Trnka, J. Pecka, M. Ledvina, J. Vondrasek, M. Pisacka, *J. Peptide Sci.* 1999, *5*, 46-55.
- [71] M. E. Pennington, K. S. Lam, A. E. Cress, Mol. Diversity 1996, 2, 19-28.
- [72] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549-554.
- [73] S. K. Akiyama, K. Nagata, K. M. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta* 1990, *1031*, 91-110.
- [74] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [75] A. F. Williams, A. N. Barclay, Annu. Rev. Immunol. 1988, 6, 381-405.
- [76] M. Takeichi, *Science* **1991**, *251*, 1451-1455.
- [77] B. Geiger, O. Ayalon, Annu. Rev. Cell. Biol. 1992, 8, 307-332.
- [78] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, W. A. Hendrickson, *Nature* 1995, 374, 327-337.
- [79] L. A. Lasky, J. Cell. Biochem. 1991, 45, 139-146.
- [80] L. A. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- [81] P. Herrlich, M. Zöller, S. T. Pals, H. Ponta, *Immunology Today* 1993, 14, 395-399.
- [82] M. Brenfield, R. Kokenyesi, M. Kato, M. T. Hinkes, J. Spring, R. L. Gallo, E. J. Lose, Annu. Rev. Cell. Biol. 1992, 8, 365-393.
- [83] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2868-2880.

- [84] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz,
   R. O. Hynes, *Cell* 1986, 46, 271-282.
- [85] S. Dedhar, Curr. Opin. Hematol. 1999, 6, 37-43.
- [86] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, J. Biol. Chem. 2000, 275, 21785-21788.
- [87] M. E. Hemler, C. Huang, L. Schwarz, J. Biol. Chem. 1987, 262, 3300-3309.
- [88] Y. Takada, J. L. Strominger, M. E. Hemler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 3239-3243.
- [89] M. E. Hemler, Annu. Rev. Immunol. 1990, 8, 365-400.
- [90] T. K. Kishimoto, K. O'Connor, A. Lee, T. M. Roberts, T. A. Springer, *Cell* 1987, 48, 681-690.
- [91] R. S. Larson, T. A. Springer, Immunol. Reviews 1990, 114, 181-217.
- [92] M. H. Ginsberg, J. C. Loftus, E. F. Plow, *Thromb. Haemos.* 1988, 59, 1-6.
- [93] M. J. Ignatius, T. H. Large, M. Houde, J. W. Tawil, A. Barton, F. Esch, S. Carbonnetto, L. F. Reichardt, J. Cell. Biol. 1990, 111, 709-720.
- [94] D. S. Tuckwell, M. J. Humphries, A. Brass, *Cell Adhes. Commun.* 1994, *2*, 385-402.
- [95] J. S. Bennett, M. A. Kolodziej, G. Vilaire, M. Poncz, J. Biol. Chem. 1993, 268, 3580-3585.
- [96] R. Briesewitz, A. Kern, E. E. Marcantonio, Mol. Biol. Cell 1995, 6, 997-1010.
- [97] S. K. Sastry, A. F. Horwitz, Curr. Opin. Cell Biol. 1993, 5, 819-831.
- [98] M. J. Williams, P. E. Hughes, T. E. O'Toole, M. H. Ginsberg, *Trends Cell Biol.* 1994, 4, 109-112.
- [99] P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil,
   M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* 1996, *271*, 6571-6574.
- [100] Y. Takada, J. Ylänne, D. Mandelman, W. Puzon, M. H. Ginsberg, J. Biol. Chem. 1992, 119, 913-921.
- [101] M. L. Bajt, T. Goodman, S. L. McGuire, J. Biol. Chem. 1995, 270, 94-98.
- [102] J. C. Loftus, T. E. O'Toole, E. F. Plow, A. Glass, A. L. Frelinger, M. H. Ginsberg, Science 1990, 249, 915-918.

- [103] M. L. Bajt, J. C. Loftus, J. Biol. Chem. 1994, 269, 20913-20919.
- [104] D. Kirchhofer, J. Grzesiak, M. D. Pierschbacher, J. Biol. Chem. 1991, 266, 4471-4477.
- [105] M. A. Arnaout, Blood 1990, 75, 1037-1050.
- [106] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, T. A. Burke, S. C. T. Lam, E. F. Plow, Science 1988, 242, 91-93.
- [107] E. Lasz, M. A. McLane, M. Trybulec, *Biochem. Biophy. Res. Comm.* 1993, 190, 118-124.
- [108] M. A. Arnaout, N. Dana, S. K. Gupta, J. Clin. Invest. 1990, 85, 977-981.
- [109] M. V. Nermut, N. M. Green, P. Eason, S. S. Yamada, K. M. Yamada, *EMBO J.* 1988, 7, 4093-4099.
- [110] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, J. Cell. Biol. 1990, 111, 721-729.
- [111] F. M. Pavalko, S. M. LaRoche, J. Immunol. 1993, 151, 3795-3807.
- [112] A. Horwitz, K. Duggan, C. Buck, M. C. Beckerle, K. Burridge, *Nature* 1986, 320, 531-533.
- [113] L. Smilenov, R. Briesewitz, E. E. Marcantonio, *Mol. Biol. Cell* 1994, 5, 1215-1223.
- [114] J. Solowska, J. M. Edelmann, S. M. Albelda, C. A. Buck, J. Cell. Biol. 1991, 114, 1079-1088.
- [115] R. Briesewitz, A. Kern, E. E. Marcantonio, Mol. Biol. Cell 1993, 4, 593-604.
- [116] J. Ylänne, Y. Chen, T. E. O'Toole, J. Cell. Biol. 1993, 122, 223-233.
- [117] S. Kawaguchi, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, M. E. Hemler, *Mol. Biol. Cell* 1994, *5*, 977-988.
- [118] P. D. Kassner, M. E. Hemler, J. Exp. Med. 1993, 178, 649-660.
- [119] P. D. Kassner, S. Kawaguchi, M. E. Hemler, J. Biol. Chem. 1994, 269, 19859-19867.
- [120] E. L. Luna, A. L. Hitt, Science 1992, 258, 955-963.
- [121] E. Brown, L. Hooper, T. Ho, H. Gresham, J. Cell. Biol. 1990, 111, 2785-2794.
- [122] F. Berditchevski, M. M. Zutter, M. E. Hemler, Mol. Biol. Cell 1996, 7, 193-207.
- [123] A. Masumoto, M. E. Hemler, J. Cell Biol. 1993, 123, 245-253.

- [124] R. J. Faull, N. L. Kovach, J. M. Harlan, M. H. Ginsberg, J. Cell. Biol. 1993, 121, 155-162.
- [125] G. O. Delwel, A. A. d. Melker, F. Hogervorst, L. H. Jaspars, D. L. A. Fles, I. Kuikman, A. Lindblom, M. Paulsson, R. Timpl, A. Sonnenberg, *Mol. Biol. Cell* 1994, *5*, 203-215.
- [126] A. J. Pelletier, T. Kunicki, V. Quaranta, J. Biol. Chem. 1996, 271, 1364-1370.
- [127] A. P. Mould, L. A. Wheldon, A. Komoriya, E. A. Wayner, K. M. Yamada, M. J. Humphries, J. Biol. Chem. 1990, 265, 4020-4024.
- [128] L. Osborn, C. Vassallo, B. G. Browning, R. Tizard, D. O. Haskard, C. D. Benjamin, I. Dougas, T. Kirchhausen, J. Cell. Biol. 1994, 124, 601-608.
- [129] L. B. Klickstein, M. R. York, A. d. Fougerolles, T. A. Springer, J. Biol. Chem.
   1996, 271, 23920-23927.
- [130] M. J. Elices, L. A. Urry, M. E. Hemler, J. Cell. Biol. 1991, 112, 169-181.
- [131] Y. Takada, E. Murphy, P. Pil, J. Cell. Biol. 1991, 115, 257-266.
- [132] S. Dedhar, K. Jewell, M. Rojiani, V. Gray, J. Biol. Chem. 1992, 267, 18908-18914.
- [133] B. E. Symington, Y. Takada, W. G. Carter, J. Cell. Biol. 1993, 120, 523-535.
- [134] P. Sriramarao, P. Steffner, K. R. Gehlsen, J. Biol. Chem. 1993, 268, 22036-22041.
- [135] J. B. Weitzman, A. Chen, M. E. Hemler, J. Cell Sci. 1995, 108, 3635-3644.
- [136] W. G. Carter, M. C. Ryan, P. J. Gahr, Cell 1991, 65, 599-610.
- [137] E. A. Wayner, S. G. Gil, G. F. Murphy, M. S. Wilke, W. G. Carter, J. Cell. Biol. 1993, 121, 1141-1152.
- [138] J. B. Weitzman, P. R, Y. Takada, M. E. Hemler, J. Biol. Chem. 1993, 268, 8651-8657.
- [139] P. Rousselle, M. Aumailley, J. Cell. Biol. 1994, 125, 205-214.
- [140] Y. Kikkawa, N. Sanzen, K. Sekiguchi, J. Biol. Chem. 1998, 273, 15854-15859.
- [141] N. Guo, N. S. Templeton, H. Al-Barazi, J. A. Cashel, J. M. Sipes, H. C. Krutzsch, D. D. Roberts, *Cancer Res.* 2000, 60, 457-466.

- [142] R. N. Tamura, H. M. Cooper, G. Collo, V. Quaranta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 10183-10187.
- [143] W. K. Song, W. Wang, R. F. Foster, D. A. Bielser, S. J. Kaufmann, J. Cell. Biol.
   1992, 117, 643-657.
- [144] F. Hogervorst, I. Kuikman, A. G. van Kessel, A. Sonnenberg, *Eur. J. Biochem.* 1991, 199, 425-433.
- [145] W. K. Song, W. Wang, H. Sato, D. A. Bielser, S. J. Kaufmann, J. Cell Sci. 1993, 106, 1139-1152.
- [146] G. Collo, L. Starr, V. Quaranta, J. Biol. Chem. 1993, 268, 19019-19024.
- [147] M. D. Hertle, J. C. Adams, F. M. Watt, Development 1991, 112, 193-206.
- [148] K. M. Hodivala-Dilke, C. M. DiPersio, J. A. Kreidberg, R. O. Hynes, J. Cell. Biol. 1998, 142, 1357-1369.
- [149] M. Gonzales, K. Haan, S. E. Baker, M. Fitchmun, I. Todorov, S. Weitzman, J. C. Jones, *Mol. Biol. Cell* 1999, *10*, 259-270.
- [150] L. E. Goldfinger, S. B. Hopkinson, G. W. deHart, S. Collawn, J. R. Couchman,
   J. C. Jones, J. Cell Sci. 1999, 112, 2615-2629.
- [151] M. Korhonen, J. Ylanne, L. Laitinen, I. Virtanen, J. Cell. Biol. 1990, 111, 1245-1254.
- [152] J. A. Kreidberg, M. J. Donovan, S. L. Goldstein, H. Rennke, K. Shepherd, R. C. Jones, R. Jaenisch, *Development* 1996, 122, 3537-3547.
- [153] J. H. Miner, C. Li, Dev. Biol. 2000, 217, 278-289.
- [154] E. S. Anton, J. A. Kreidberg, P. Rakic, Neuron 1999, 22, 277-289.
- [155] J. K. Ivins, H. Colognato, J. A. Kreidberg, P. D. Yurchenco, A. D. Lander, J. Neurosci. 1998, 18, 9703-9715.
- [156] Y. Y. Kim, C. S. Lim, Y. H. Song, J. Ahnn, D. Park, W. K. Song, Cell Adhes. Commun. 1999, 7, 85-97.
- [157] A. Couvelard, A. F. Bringuier, M. C. Dauge, M. Nejjari, E. Darai, J. L. Benifla, G. Feldmann, D. Henin, J. Y. Scoazec, *Hepatology* 1998, 27, 1095-1104.
- [158] J. A. Kreidberg, Curr. Opin. Cell Biol. 2000, 12, 548-553.

- [159] F. Berditchevski, K. F. Tolias, K. Wong, C. L. Carpenter, M. E. Hemler, J. Biol. Chem. 1997, 272, 2595-2598.
- [160] T. A. Springer, Nature 1990, 346, 425-434.
- [161] T. A. Springer, Cell 1994, 76, 301-314.
- [162] E. C. Butcher, L. J. Picker, Science 1996, 272, 60-66.
- [163] C. Berlin, R. F. Bargatze, J. J. Campbell, U. H. von Andrian, M. C. Szabo, S. R. Hasslen, R. D. Nelson, E. L. Berg, S. L. Eriandsen, E. C. Butcher, *Cell* 1995, 80, 413-422.
- [164] J. J. Campbell, E. C. Butcher, Curr. Opin. Immunol. 2000, 12, 336-341.
- [165] G. Kilger, B. Holzmann, J. Mol. Med 1995, 73, 347-354.
- [166] C. M. Parker, C. Pojades, M. B. Brenner, M. E. Hemler, J. Cell. Biol. 1993, 268, 7028-7035.
- [167] M. H. Grayson, M. van der Vieren, S. A. Sterbinsky, W. M. Gallatin, P. A. Hoffman, D. E. Staunton, B. S. Bochner, *J. Exp. Med.* 1998, 188, 2187-2191.
- [168] Y. Taooka, J. Chen, T. Yednock, D. Sheppard, J. Cell. Biol. 1999, 145, 413-420.
- [169] M. E. Hemler, C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, J. L. Strominger, M. L. Clabby, J. Biol. Chem. 1987, 262, 11478-11485.
- [170] D. A. Williams, M. Rios, C. Stephens, V. P. Patel, *Nature* 1991, 352, 438-441.
- [171] T. Papayannopoulou, B. Nakamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, *90*, 9374-9378.
- [172] M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, J. Cell. Biol. 1986, 103, 2637-2647.
- [173] M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, J. Cell. Biol. 1988, 106, 1289-1297.
- [174] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, R. Lobb, *Cell* 1989, *59*, 1203-1211.
- [175] M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, R.
   R. Lobb, *Cell* 1990, *60*, 577-584.

- [176] M. R. Campanero, R. Pulido, M. A. Ursa, M. Rodriguez-Moya, M. O. D. Landazuri, F. Sanchez-Madrid, J. Cell. Biol. 1990, 110, 2157-2165.
- [177] A. Komoriya, L. J. Green, M. Mervic, S. S. Yamada, K. M. Yamada, M. J. Humphries, J. Biol. Chem. 1991, 266, 15075-15079.
- [178] E. A. Wayner, N. L. Kovach, J. Cell Biol. 1992, 116, 489-497.
- [179] A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* 1991, 3579-3585.
- [180] A. P. Mould, M. J. Humphries, *EMBO J.* 1991, 4089-4095.
- [181] M. E. Renz, H. H. Chiu, S. Jones, J. Fox, K. J. Kim, L. G. Presta, S. Fong, J. Cell. Biol. 1994, 125, 1395-1406.
- [182] R. H. Vonderheide, T. F. Tedder, T. A. Springer, D. E. Staunton, J. Cell. Biol. 1994, 125, 215-222.
- [183] E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* 1995, 373, 539-544.
- [184] J. H. Wang, R. B. Pepinsky, T. Stehle, J. H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, L. Osborn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 5714-5718.
- [185] P. S. Aparicio, C. D. Jimenez, J. Cell. Biol. 1994, 126, 271-279.
- [186] R. Yabkowitz, V. M. Dixit, N. Guo, D. D. Roberts, Y. Shimizu, J. Immunol. 1993, 149-158.
- [187] E. Ennis, R. R. Isberg, Y. Shimizu, J. Exp. Med. 1993, 177, 207-212.
- [188] T. Tarui, A. P. Mazar, D. B. Cines, Y. Takada, J. Biol. Chem. 2001, 276, 3983-3990.
- [189] M. Munoz, J. Serrador, F. Sánchez-Madrid, J. Teixido, J. Biol. Chem. 1996, 271, 2696-2702.
- [190] P. D. Kassner, R. Alon, T. A. Springer, M. E. Hemler, Mol. Biol. Cell 1995, 6, 661-674.
- [191] P.-Y. Chan, A. Aruffo, J. Biol. Chem. 1993, 268, 24655-24664.
- [192] R. R. Lobb, M. E. Hemler, J. Clin. Invest. 1994, 94, 1722-1728.

- [193] A. Jakubowski, M. D. Rosa, S. Bixler, R. Lobb, L. C. Burkly, Cell Adhes. Commun. 1995, 3, 131-142.
- [194] R. R. Lobb, S. P. Adams, Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 935-945.
- [195] C. Chen, J. L. Mobley, O. Dwir, F. Shimron, V. Grabovsky, R. R. Lobb, Y. Shimizu, R. Alon, J. Immunol. 1999, 162, 1084-1095.
- [196] R. P. Pelletier, R. G. Ohye, A. Vanbuskirk, D. D. Sedmak, P. Kincade, R. M. Ferguson, C. G. Orosz, J. Immunol. 1992, 149, 2473-2481.
- [197] G. E. Rice, M. P. Bevilacqua, Science 1989, 246, 1303-1306.
- [198] K. Miyake, K. Medina, K. Ishihara, M. Kimoto, R. Auerbach, P. W. Kincade, J. Cell. Biol. 1991, 114, 557-565.
- [199] P. J. Simmons, B. Masinovsky, B. M. Longenecker, R. Berenson, B. Torok-Storb, W. M. Gallatin, *Blood* 1992, *80*, 388-395.
- [200] D. H. Ryan, B. L. Nuccie, C. N. Abboud, J. M. Winslow, J. Clin. Invest. 1991, 88, 995-1004.
- [201] G. D. Rosen, J. R. Sanes, R. LaChance, J. M. Cunningham, J. Roman, D. C. Dean, *Cell* 1992, 69, 1107-1119.
- [202] D. J. Erle, M. J. Briskin, E. C. Butcher, A. Garcia-Pardo, A. I. Lazarovits, M. Tidswell, J. Immunol. 1994, 153, 517-528.
- [203] N. Wagner, J. Lohler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, W. Müller, *Nature* 1996, 382, 366-370.
- [204] H. H. Chiu, D. T. Crowe, M. E. Renz, L. G. Presta, S. Jones, I. L. Weissman, S. Fong, J. Immunol. 1995, 155, 5257-5267.
- [205] D. T. Crowe, H. Chiu, S. Fong, I. L. Weissman, J. Biol. Chem. 1994, 269, 14411-14418.
- [206] G. Kilger, L. A. Needham, P. J. Nielsen, J. Clements, D. Vestweber, B. Holzmann, J. Biol. Chem. 1995, 270, 5979-5984.
- [207] C. Rüegg, A. A. Postigo, E. E. Sikorski, E. C. Butcher, R. Pytela, D. J. Erle, J. Cell. Biol. 1992, 117, 179-189.
- [208] B. M. C. Chan, M. J. Elices, E. Murphy, M. E. Hemler, J. Biol. Chem. 1992, 267, 8366-8370.

- [209] R. R. Lobb, G. Antognetti, R. B. Pepinsky, L. C. Burkly, D. R. Leone, A. Whitty, Cell Adhes. Commun. 1995, 3, 385-397.
- [210] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Nature 1984, 309, 30-33.
- [211] J. A. Eble, in J. A. Eble, K. Kühn (Eds.): *Integrin-Ligand Interactions*, Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, p. 123-139.
- [212] E. Ruoslahti, Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 375-413.
- [213] A. R. Kornblihtt, K. Umezawa, K. Vibe-Pedersen, F. E. Baralle, *EMBO J.* 1985, 4, 1755-1759.
- [214] E. A. Wayner, A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald, W. G. Carter, J. Cell Biol. 1989, 109, 1321-1330.
- [215] M. J. Humphries, A. Komoriya, S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada, J. Biol. Chem. 1987, 262, 6886-6892.
- [216] E. A. Wayner, N. L. Kovach, J. Cell. Biol. 1992, 16, 489-497.
- [217] P. Moy, R. Lobb, R. Tizard, D. Olson, C. Hession, J. Biol. Chem. 1993, 268, 8835-8841.
- [218] B. Pepinsky, C. Hession, L.-L. Chen, P. Moy, L. Burkly, A. Jakubowski, E. P. Chow, C. Benjamin, G. Chi-Rosso, S. Luhowskyj, R. Lobb, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 17820-17826.
- [219] L. Osborn, C. Vassallo, C. D. Benjamin, J. Exp. Med. 1992, 176, 99-107.
- [220] R. H. Vonderheide, T. A. Springer, J. Exp. Med. 1992, 175, 1433-1442.
- [221] J. M. Clements, P. Newham, M. Shepherd, R. Gilbert, T. J. Dudgeon, L. A. Needham, R. M. Edwards, L. Berry, A. Brass, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* 1994, 107, 2127-2135.
- [222] P. M. Cardarelli, R. R. Cobb, D. M. Nowlin, W. Scholz, F. Gorcsan, M. Moscinski, M. Yasuhara, S. L. Chiang, T. J. Lobl, *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 18668-18673.
- [223] G. Kilger, J. Clements, B. Holzmann, Int. Immunol. 1997, 9, 219-226.
- [224] T. M. Carlos, B. R. Schwartz, N. L. Kovach, E. Yee, M. Rosa, L. Osborn, G. Chi-Rosso, B. Newman, R. Lobb, M. Rosso, J. M. Harlan, *Blood* **1990**, *76*, 965-970.

- [225] B. Masinovsky, D. Urdal, W. M. Gallatin, J. Immunol. 1990, 145, 2886-2895.
- [226] M. J. Briskin, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, *Nature* 1993, 363, 461-464.
- [227] M. Nakache, E. L. Berg, P. R. Streeter, E. C. Butcher, *Nature* 1989, 337, 179-181.
- [228] C. Berlin, E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann,I. L. Weissman, A. Hamann, E. C. Butcher, *Cell* 1993, 74, 185-195.
- [229] P. R. Streeter, E. L. Berg, B. T. Rouse, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature* 1988, 331, 41-46.
- [230] C. A. Janeway, P. Travers, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag 1997.
- [231] A. M. Shyjan, M. Bertagnolli, C. J. Kenney, M. J. Briskin, J. Immunol. 1996, 156, 2851-2857.
- [232] M. J. Briskin, L. Rott, E. C. Butcher, J. Immunol. 1996, 156, 719-726.
- [233] J. L. Viney, S. Joenes, H. H. Chiu, B. Lagrimas, M. E. Renz, L. G. Presta, D. Jackson, K. J. Hillan, S. Lew, S. Fong, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2488-2497.
- [234] K. Tan, J. M. Casasnovas, J. H. Liu, M. J. Briskin, T. A. Springer, J. H. Wang, *Structure* **1998**, *6*, 793-801.
- [235] E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature* 1993, 366, 695-698.
- [236] M. Briskin, D. Winsor-Hines, A. Shyjan, N. Cochran, S. Bloom, J. Wilson, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, N. Kassam, C. R. Mackay, W. Newman, D. J. Ringler, *Am. J. Pathol.* 1997, 151, 97-110.
- [237] M. S. Diamond, J. Garcia-Aguilar, J. K. Bickford, A. L. Corbi, T. A. Springer, J. Cell. Biol. 1993, 120, 1031-1043.
- [238] M. Michishita, V. Videm, M. A. Arnaout, Cell 1993, 72, 857-867.
- [239] R. H. Kretsinger, Annu. Rev. Biochem. 1976, 45, 239-266.
- [240] A. L. Corbi, L. J. Miller, K. O'Connor, R. S. Larson, T. A. Springer, *EMBO J.* 1987, 6, 4023-4028.
- [241] J. Gailit, E. Ruoslahti, J. Biol. Chem. 1988, 263, 12927-12932.
- [242] D. Kirchhofer, J. Gailit, E. Ruoslahti, J. Grzesiak, M. D. Pierschbacher, J. Biol. Chem. 1990, 265, 18525-18530.

- [243] A. P. Mould, S. K. Akiyama, M. J. Humphries, J. Biol. Chem. 1995, 270, 26270-26277.
- [244] J. M. Drazen, E. Israel, P. M. O'Byrne, New Engl. J. Med 1999, 340, 197-206.
- [245] J. R. Vane, Y. S. Bakhle, R. M. Botting, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998, 38, 97-120.
- [246] M. Feldmann, P. Charles, P. Taylor, R. N. Maini, Springer Semin. Immunopathol. 1998, 20, 211-228.
- [247] J. R. O'Dell, New Engl. J. Med 1999, 340, 310-312.
- [248] P. A. J. Henricks, F. P. Nijkamp, Eur. J. Pharmacol. 1998, 344, 1-13.
- [249] Y.-W. Huang, R. Baluna, E. S. Visetta, *Histol. Histopathol.* 1997, 12, 467-477.
- [250] D. M. Rose, A. Pozzi, R. Zent, Emerging Therapeutic Targets 2000, 4, 397-411.
- [251] R. S. Blumberg, L. J. Saubermann, W. Strober, Curr. Opin. Immunol. 1999, 11, 648-656.
- [252] C. Fiocchi, Gastroenterology 1998, 115B, 182-205.
- [253] D. Picarella, P. Hurlbut, J. Rottman, X. Shi, E. C. Butcher, D. J. Ringler, J. Immunol. 1997, 158, 2099-2106.
- [254] P. Hesterberg, D. Winsor-Hines, M. J. Briskin, D. Soler-Ferran, C. Merrill, C.
   R. Mackay, W. Newman, D. J. Ringler, *Gastroenterology* 1996, 111, 1373-1380.
- [255] B. Holzmann, U. Gosslar, M. Bittner, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1998, 231, 125-141.
- [256] S. T. Pals, P. Drillenburg, B. Dragosics, A. I. Lazarovits, T. Radaszkiewicz, *Gastroenterology* 1994, 107, 1519-1523.
- [257] P. Drillenburg, R. van der Voort, G. Koopman, B. Dragosics, J. van Krieken, P. Kluin, J. Meenan, A. I. Lazarovits, T. Radaszkiewicz, S. T. Pals, *Am. J. Pathol.* 1997, *150*, 919-927.
- [258] K.-C. Lin, A. C. Castro, Curr. Opin. Chem. Biol. 1998, 2, 453-457.
- [259] B. S. Bochner, F. W. Luscinskas, M. A. Gimbrone, W. Newman, S. A. Sterbinsky, C. P. Derse-Anthony, D. Klunk, R. P. Schleimer, J. Exp. Med. 1991, 173, 1553-1557.

- [260] P. Vanderslice, K. Ren, J. K. Revelle, D. C. Kim, D. Scott, R. J. Bjercke, E. T. Yeh, P. J. Beck, T. P. Kogan, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1710-1718.
- [261] S. Tamraz, T. Arrhenius, A. Chiem, M. J. Forrest, F. C. Gaeta, Y. B. He, J. Lei, A. Maewal, M. L. Phillips, L. W. Vollger, *Springer Semin. Immunopathol.* 1995, 16, 437-441.
- [262] W. M. Abraham, A. Ahmed, M. W. Sielczak, M. Narita, T. S. Arrhenius, M. J. Elices, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997, 156, 696-703.
- [263] D. M. Nowlin, F. Gorcsan, M. Moscinski, S. L. Chiang, T. J. Lobl, P. M. Cardarelli, J. Biol. Chem. 1993, 268, 20352-20359.
- [264] D. Y. Jackson, C. Quan, D. R. Artis, T. Rawson, B. Blackburn, M. Struble, G. Fitzgerald, K. Chan, S. Mullins, J. P. Burnier, W. J. Fairbrother, K. Clark, M. Berisini, H. Chui, M. Renz, S. Jones, S. Fong, *J. Med. Chem.* 1997, 40, 3359-3368.
- [265] A. J. Souers, A. A. Virgilio, S. S. Schurer, J. A. Ellman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 2297-2302.
- [266] Tanabe Seiyaku, WO9858902 1998.
- [267] Hoffmann-La Roche, WO9910313 1999.
- [268] Hoffmann-La Roche, WO9910312 1999.
- [269] Athena Neurosciences, WO9906391 1999.
- [270] K. C. Lin, S. P. Adams, A. C. Castro, C. N. Zimmerman, J. H. Cuervo, W. C. Lee, C. F. Hammond, M. B. Carter, R. G. Almquist, C. L. Ensinger, WO9200995 1997.
- [271] H. N. Shroff, C. F. Schwender, A. D. Baxter, F. Brookfield, L. J. Payne, N. A. Cochran, D. L. Gallant, M. J. Briskin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, *8*, 1601-1606.
- [272] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Angew. Chem. 1997, 109, 1440-1456.
- [273] G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, J. Med. Chem. 2001, 44, 1938-1950.
- [274] H. Kessler, Angew. Chem. 1982, 94, 509-520.

- [275] H. Kessler, in V. Claassen (Ed.): Trends in Drug Research, Vol. 13, Elsevier Science Publisher 1990, p. 73-84.
- [276] M. Kurz, *Dissertation* 1991, Technische Universität München.
- [277] C. Riemer, *Disseration* 1999, Technische Universität München.
- [278] R. Schweyzer, P. Sieber, B. Goroup, Chimia 1958, 12, 90-91.
- [279] R. B. Merrifield, Angew. Chem. 1985, 97, 801-892.
- [280] L. A. Carpino, G. Y. Han, J. Org. Chem. 1972, 37, 3404-3409.
- [281] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385-1389.
- [282] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, J. Org. Chem. 1998, 63, 9678-9683.
- [283] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 788-798.
- [284] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 2024-2033.
- [285] T. Shiori, K. Ninomiya, S. Yamada, J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 6203-6205.
- [286] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, J. Med. Chem. 2001, 44, 2586-2592.
- [287] C. Cabrele, M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, J. Org. Chem. 1999, 64, 4353-4361.
- [288] W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, P. D. White, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995, 21, 2209-2210.
- [289] H. Kunz, C. Unverzagt, Angew. Chem. 1984, 96, 426-427.
- [290] S. A. Kates, N. A. Sole, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 1549-1552.
- [291] A. Giannis, T. Kolter, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1993, 32, 1244-1267.
- [292] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, R. Tan, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, P. A. Bartlett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, *89*, 9367-9371.
- [293] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 2657-2662.

- [294] R. N. Zuckermann, E. J. Martin, D. C. Spellmeyer, G. B. Staubner, K. R. Shoemaker, J. M. Kerr, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, M. A. Siani, R. J. Simon, S. C. Banville, E. G. Brown, L. Wang, L. S. Richter, W. H. Moos, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 2678-2685.
- [295] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-Ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94, 3548-3553.
- [296] D. A. Goff, R. N. Zuckermann, J. Org. Chem. 1995, 60, 5748-5749.
- [297] S. Ostergaard, A. Holm, Mol. Diversity 1997, 3, 17-27.
- [298] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10646-10647.
- [299] B. C. Hamper, S. A. Kolodziej, A. M. Scates, R. G. Smith, E. Cortez, J. Org. Chem. 1998, 63, 708-718.
- [300] A. J. Speziale, E. G. Jaworski, J. Org. Chem. 1960, 25, 728-732.
- [301] J. Gante, Synthesis 1989, 405-413.
- [302] C. J. Gray, M. Quibell, N. Baggett, T. Hammerle, Int. J. Pept. Protein Res. 1992, 40, 351-362.
- [303] H.-J. Hess, W. T. Moreland, G. D. Laubach, J. Am. Chem. Soc. 1963, 1963, 4040-4041.
- [304] J. Magrath, R. H. Abeles, J. Med. Chem. 1992, 35, 4279-4283.
- [305] 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.
- [306] 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.
- [307] F. André, A. Vicherat, G. Boussard, A. Aubry, M. Marraud, J. Pept. Res. 1997, 50, 372-381.
- [308] F. André, G. Boussard, D. Bayeul, C. Didierjean, C. Aubry, M. Marraud, J. Pept. Res. 1997, 49, 556-562.

- [309] H.-J. Lee, I.-A. Ahn, S. Ro, K.-H. Choi, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Pept. Res.
   2000, 56, 35-46.
- [310] N. I. Ghali, D. L. Venton, J. Org. Chem. 1981, 46, 5413-5414.
- [311] J. E. T. Corrie, D. R. Trentham, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1995, 1993-2000.
- [312] J. Gante, M. Krug, G. Lauterbach, R. Weitzel, W. Hiller, J. Peptide Sci. 1995, 2, 201-206.
- [313] J. S. Schmitt, *Dissertation* 1998, Technische Universität München.
- [314] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1993, 2843-2849.
- [315] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler, J. Org. Chem. 1999, 64, 7388-7394.
- [316] H. Han, K. D. Janda, J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 2539-2544.
- [317] R. Calabretta, C. Giordano, C. Gallina, V. Morea, V. Consalvi, R. Scandurra, *Eur. J. Med. Chem.* 1995, 30, 931-941.
- [318] C. Frochot, R. Vanderesse, A. Driou, G. Linden, M. Marraud, M. T. Cung, Lett. Pept. Sci. 1997, 219-225.
- [319] H. Kunz, H.-H. Bechtolsheimer, Liebigs Ann. Chem. 1982, 2068-2078.
- [320] L. A. Carpino, B. J. Cohen, K. E. Stephens, S. Y. Sadat-Aalaee, J.-H. Tien, D.
   C. Langridge, J. Org. Chem. 1986, 51, 3732-3734.
- [321] J. Wermuth, *Dissertation* 1996, Technische Universität München.
- [322] T. K. Sawyer, in M. D. Taylor, G. L. Amidon (Eds.): Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, American Chemical Society, Washington DC 1995, p. 387-422.
- [323] R. Vanderesse, V. Grand, D. Limal, A. Vicherat, M. Marraud, C. Didierjean, A. Aubry, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 9444-9451.
- [324] J. Martinez, J. P. Bali, M. Rodriguez, B. Castro, R. Magous, J. Laur, M. F. Ligon, J. Med. Chem. 1985, 28, 1874-1879.
- [325] D. H. Coy, P. Heinz-Erian, N.-Y. Jiang, Y. Sasaki, J. Taylor, J.-P. Moreau, W.
   T. Wolfrey, J. D. Gardner, R. T. Jensen, *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 5056-5060.

- [326] M. A. Blaskovich, G. A. Lajoie, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 5021-5030.
- [327] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, J. Am. Chem. Soc. 1971, 93, 2897-2904.
- [328] J. P. Salvi, N. Walchshofer, J. Paris, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 1181-1184.
- [329] G. C. Look, M. M. Murphy, D. A. Campbell, M. A. Gallop, *Tetrahedron Lett.* 1995, *36*, 2937-2940.
- [330] D. W. Gordon, J. Steele, Bioorg. Med. Chem. 1995, 5, 47-50.
- [331] A. K. Szardenings, T. S. Burkoth, G. C. Look, D. A. Campbell, J. Org. Chem. 1996, 61, 6720-6722.
- [332] N. S. Gray, S. Kwon, P. G. Schultz, *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 1161-1164.
- [333] C. W. Thornber, Chem. Soc. Rev. 1979, 8, 563-580.
- [334] E. E. Rutenber, J. J. DeVoss, L. Hoffman, R. M. Stroud, K. H. Lee, J. Alvarez,
  F. McPhee, C. Craik, P. R. O. de Montellano, *Bioorg. Med. Chem.* 1997, 5, 1311-1320.
- [335] D. J. Brown, P. Waring, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1974, 204-208.
- [336] H. Schönowsky, B. Sachse, Z. Naturforsch. 1982, 37 b, 907-911.
- [337] M. J. S. Dewar, J. Chem. Soc. 1944, 619-623.
- [338] D. M. W. van den Ham, G. F. S. Harrison, A. Spaans, D. van der Meer, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 1975, 94, 168-173.
- [339] C. Gibson, H. Kessler, Tetrahedron Lett. 2000, 41, 1725-1728.
- [340] I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, Chem. Rev. 2000, 100, 3009-3066.
- [341] K. L. Yu, M. S. Deshpande, D. M. Vyas, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 8919-8922.
- [342] K. D. Hargrave, F. K. Hess, J. T. Oliver, J. Med. Chem. 1983, 26, 1158-1163.
- [343] W. C. Patt, H. W. Hamilton, M. D. Taylor, M. J. Ryan, D. G. Taylor, C. J. C. Connolly, A. M. Doherty, S. R. Klutchko, I. Sircar, B. M. Michniewicz, S. C. J. Olson, J. Med. Chem. 1992, 35, 2562-2572.
- [344] F. Haviv, J. D. Ratajczyk, R. W. DeNet, F. A. Kerdesky, R. L. Walters, S. P. Schmidt, J. H. Holms, P. R. Young, G. W. J. Carter, *J. Med. Chem.* 1988, *31*, 1719-1728.

- [345] J. C. Jaen, L. D. Wise, B. W. Caprathe, H. Tecle, S. Bergmeier, C. C. Humblet, T. G. Heffner, L. T. Meltzner, T. A. Pugsley, *J. Med. Chem.* 1990, *33*, 311-317.
- [346] F. W. Bell, A. S. Cantrell, M. Höberg, S. R. Jaskunas, N. G. Johansson, C. L. Jordon, M. D. Kinnick, P. Lind, J. M. Morin, R. Noréen, B. Öberg, J. A. Palkowitz, C. A. Parrish, P. Pranc, C. Sahlberg, R. J. Ternansky, R. T. Vasileff, L. Vrang, S. J. West, H. Zhang, X.-X. J. Zhou, *J. Med. Chem.* 1995, *38*, 4929-4936.
- [347] T. Gordon, P. Hansen, B. Morgan, J. Singh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 915-920.
- [348] H. U. Stilz, persönliche Mitteilung 1999.
- [349] N. Bailey, A. W. Dean, D. B. Judd, D. Middlemiss, R. Storer, S. P. Watson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1409-1414.
- [350] P. C. Kearney, M. Fernandez, J. A. Flygare, J. Org. Chem. 1998, 63, 196-200.
- [351] R. H. Reuss, A. Hassner, J. Org. Chem. 1974, 39, 1785-1787.
- [352] H.-J. Lohrisch, L. Kopanski, R. Herrmann, H. Schmidt, W. Steglich, *Liebigs* Ann. Chem. **1986**, 177-194.
- [353] A. R. Hantsch, J. H. Weber, Ber. 1887, 20, 3118.
- [354] J. Lee, W. V. Murray, R. A. Rivero, J. Org. Chem. 1997, 62, 3874-3879.
- [355] A. Mazurov, Tetrahedron Lett. 2000, 41, 7-10.
- [356] S. X. Cai, S. M. Kher, Z.-L. Zhou, V. Ilyin, S. A. Espitia, M. Tran, J. E. Hawkinson, R. M. Woodward, E. Weber, J. F. W. Keana, *J. Med. Chem.* 1997, 40, 730-738.
- [357] K. C. Nicolaou, J. I. Trujillo, B. Jandeleit, K. Chibale, M. Rosenfeld, B. Diefenbach, D. A. Cheresh, S. L. Goodman, *Bioorg. Med. Chem.* 1998, 6, 1185-1208.
- [358] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, J. Org. Chem. 1998, 63, 2351-2353.
- [359] R. Gretler, E. Askitoglu, H. Kühne, M. Hesse, *Helv. Chim. Acta* 1978, 61, 1730-1755.
- [360] J. C. Pelletier, M. P. Cava, Synthesis 1987, 474-477.

- [361] J. Boer, *Dissertation* **2000**, Technische Universität München.
- [362] J. Perregaard, E. K. Moltzen, E. Meier, C. Sánchez, J. Med. Chem. 1995, 38, 1998-2008.
- [363] P. Newham, S. E. Craig, G. N. Seddon, N. R. Schöfield, A. Rees, R. M. Edwards, E. Y. Jones, M. Humphries, *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 19429-19440.
- [364] K.-C. Lin, H. S. Ateeq, S. H. Hsiung, S. H. Hsiung, L. T. Chang, C. N. Zimmermann, A. Castro, W. C. Lee, C. E. Hammond, S. Kalkunte, L. L. Chen, R. B. Pepinsky, D. R. Leone, A. G. Sprague, W. M. Abraham, A. Gill, R. R. Lobb, S. P. Adams, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 920-934.
- [365] M. Gurrath, *Dissertation* 1992, Technische Universität München.
- [366] W. Rapp, persönliche Mitteilung 2000.
- [367] C. P. Holmes, J. Org. Chem. 1997, 62, 2370-2380.
- [368] C. P. Holmes, D. G. Jones, J. Org. Chem. 1995, 60, 2318-2319.
- [369] V. N. R. Pillai, Org. Photochem. 1987, 9, 225-323.
- [370] J. W. Metzger, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1994, 33, 723-725.
- [371] K. Biemann, S. A. Martin, Mass Spectrom. Rev. 1987, 6, 1-75.
- [372] P. Roepstorff, J. Fohlmann, Biomed. Mass Spectrom. 1984, 11, 601.
- [373] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* 1990, *9*, 37-70.
- [374] A. E. Ashcroft, P. J. Derrick, , CRC Press, Boca Raton 1991, p. 121-138.
- [375] 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, p. 289-314.
- [376] R. E. March, J. F. J. Todd, in C. Press (Ed.): Praktical aspects of Ion Trap Mass Spectrometry, Vol. 1, Boca Raton 1995.
- [377] A. J. Miles, A. P. N. Skubitz, L. T. Furcht, G. B. Fields, J. Biol. Chem. 1994, 269, 30939-30945.
- [378] B. A. Maldonado, L. T. Furcht, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995, 36, 364-372.
- [379] A. J. Miles, J. R. Knutson, A. P. N. Skubitz, L. T. Furcht, J. B. McCarthy, G. B. Fields, J. Biol. Chem. 1995, 270, 29047-29050.

- [380] C. Li, J. B. McCarthy, L. T. Furcht, G. B. Fields, *Biochemistry* 1997, 36, 15404-15410.
- [381] J. Eble, K. W. Wucherpfenning, L. Gauthier, P. Dersch, E. Krukonis, R. R. Isberg, M. E. Hemler, *Biochemistry* 1998, 37, 10945-10955.
- [382] P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke, *Eur. J. Med. Chem.- Chim. Ther.* **1984**, *19*, 71-78.
- [383] C.D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. C. Haug, Int. J. Peptide Protein Res. 1980, 15, 59-66.
- [384] A. Ehrlich, S. Rothemund, M. Brudel, M. Beyermann, L. A. Carpino, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4781-4784.
- [385] G. Kokotos, C. Noula, J. Org. Chem. 1996, 61, 6994-6996.
- [386] H. O. House, L. J. Czuba, M. Gall, H. D. Olmstead, J. Org. Chem. 1969, 34, 2324-2336.
- [387] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* 1990, *31*, 1701-1704.
- [388] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T.J. Lambros, R. C. Makofske, C.D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1979, 13, 35-42.
- [389] S. A. Kates, S. B. Daniels, N. A. Sole, G. Barany, F. Albericio, 13th American Peptide Symposium, Automated allyl chemistry for solid-phase peptide synthesis: applications to cyclic and branched peptides, pp. 113-115 (1994).
- [390] V. Krchnak, A. S. Weichsel, D. Cabel, Z. Flegelova, M. Lebl, *Mol. Diversity* 1995, 1, 149-164.
- [391] D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Shair, S. L. Schreiber, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8565-8566.
- [392] U. Landegren, J. Immunol. Methods 1984, 67, 379-388.