

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Niedermolekulare $\alpha4\beta7$ -Integrinantagonisten und Synthese transmembraner Peptide

Torsten Arndt

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. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken
3. apl. Prof. Dr. L. Moroder

Die Dissertation wurde am 02.09.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 03.11.2003 angenommen.

“Life is like Sanskrit read to a pony.”

- Lou Reed

*meinen Eltern und meiner geliebten Frau
in tiefster Dankbarkeit*

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 November 1999 bis Juni 2003 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:

- meinen Laborkollegen Georgette Thumshirn und Timo Weide für ihre Geduld mit meinen Launen umzugehen,
- Monika Semmrich und Anja Schuster für die Durchführung der Zelladhäsionsassays und schließlich die *in-vivo* Untersuchungen,
- Armin Modlinger und Timo Weide für das überstürzte Korrekturlesen von Teilen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Enrique Mann Morales, por su ingeniosidad científica, su carácter servicial y por ser un buen amigo,
- Mona Wolff für die Durchführung zahlreicher Synthesen und ihre Brillanz in labortechnischen Fragen ,
- Rainer Jordan für die Inseln der Entspannung ,
- Burghard Cordes für reibungslose ESI-MS-Analytiken,
- Maria Kranawetter für die Durchführung von zahlreichen HPLC-Analytiken und Trennungen und ihre soziale Kompetenz,
- Rainer Haeßner,
- Alex Frenzel,
- Zwergi, Herr Ebert, Herr Krause, Chris, Gudrun und allen anderen, namentlich nicht genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern, die dem Arbeitskreis das hervorragende Arbeitsklima verleihen.

Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| AAV | Allgemeine Arbeitsvorschrift |
| Å | Ångström, 10^{-10} m |
| Abs. | Absorption |
| abs. | absolutiert |
| Ac | Acetyl |
| ACN | Acetonitril |
| ADME | Absorption, distribution, metabolism, excretion |
| Äquiv. | Äquivalent(e) |
| AS | Aminosäure |
| Bn | Benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl- |
| br. | breit |
| BSA | <i>Bovine Albumin</i> ; Rinderserumalbumin |
| Bu | Butyl |
| tBu | <i>tert</i> -Butyl |
| CAM | <i>cell adhesion molecule</i> |
| CD | <i>Crohn disease</i> |
| CD49d/CD29 | $\alpha 4\beta 1$ |
| CHO | <i>chinese hamster ovarial</i> |
| CID | <i>collision-induced dissociation</i> |
| Col | Kollagen |
| COSY | <i>correlated spectroscopy</i> |
| CS1-CS5 | Peptide aus <i>epitope mapping</i> der IIICS-Region (Fibronectin) |
| d | Dublett or days |
| UC | <i>Colitis ulcerosa</i> |
| δ | chemische Verschiebung |
| 1D, 2D | eindimensional, zweidimensional |
| DC | Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm |
| dd | Doppeldublett |
| dest. | destilliert |
| DIAD | Azodicarbonsäure-diisopropylester |
| DHP | Dihydropyran |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| Dmab | 4 {N-[1-(4,4-dimethyl-2,6dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}benzylalkohol |
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |

| | |
|-----------|---|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPPA | Diphenylphosphorsäureazid |
| EDCI | <i>N</i> -Ethyl- <i>N,N'</i> -(dimethylaminopropyl)-carbodiimid |
| EE | Essigsäureethylester |
| Ep | Epiligrin |
| ESI-MS | <i>electrospray ionization mass spectrometry</i> |
| Et | Ethyl |
| FABMS | <i>fast atom bombardment mass spectrometry</i> |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| Fmoc-OSu | (<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyloxy)- <i>N</i> -succinimid |
| Fn | Fibronektin |
| ges. | gesättigt |
| GFP | Green fluorescent protein |
| h | Stunde |
| HATU | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HFIP | Hexafluoroisopropanol |
| HepII | zweite Heparinbindungsdomäne (Fibronektin) |
| HEV | <i>high endothelial venules</i> |
| Hmb | 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl |
| HMBC | <i>heteronuclear multiple bond correlation</i> |
| HMQC | <i>heteronuclear multiple quantum coherence</i> |
| HMQC-COSY | <i>heteronuclear multiple quantum correlation mit COSY-Sequenz</i> |
| HOAc | Essigsäure |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HOObt | 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazol |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HSQC | <i>heteronuclear single quantum coherence</i> |
| Hz | Hertz |
| H-Tic-OH | Tetrahydroisoquinolin-3-carbonsäure |
| HV | Hochvakuum |
| IBD | <i>inflammatory bowel disease</i> |
| IC | <i>inhibitory capacity</i> |
| ICAM | <i>intercellular cell adhesion molecules</i> |
| Ig | <i>immunoglobulin</i> |
| IgCAM | <i>immunoglobulin cell adhesion molecule</i> |
| IgSF | <i>immunoglobulin superfamily</i> |
| J | Skalare Kopplungskonstante |
| IIICS | <i>typeIII connecting segment</i> (Fibronektin) |

| | |
|----------------|---|
| In | Invasin |
| kDa | Kilodalton |
| konz. | konzentriert |
| LC-MS | <i>liquid chromatography mass spectrometry</i> |
| LDA | Lithiumdiisopropylamid |
| LeuCAM | <i>leukocyte cell adhesion molecule</i> |
| LFS | <i>Lung surfactant factor</i> |
| Ln | Laminin |
| LPAM | <i>lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule-1, $\alpha4\beta7$-Integrin</i> |
| m | Multipllett |
| M | molar |
| MAdCAM-1 | <i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> |
| Me | Methyl |
| MeIm | <i>N</i> -Methylimidazol |
| MeOH | Methanol |
| MHz | Megahertz |
| min. | Minuten |
| MG | Molgewicht |
| mL | Milliliter |
| mmol | millimol |
| MS | Massenspektrometrie oder Multiple Sklerose |
| MSNT | 1-(Mesityl-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol |
| MW | Molgewicht |
| $^N J_{(X,Y)}$ | skalare Kopplungskonstante zwischen den Kernen X und Y über n Bindungen |
| N | normal |
| NMM | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| NMP | <i>N</i> -Methylpyrrolidon |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| NOESY | <i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PBL | <i>peripheral blood lymphocytes</i> |
| Ph | Phenyl |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PyBroP | Bromtripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat |
| q | Quartett |
| R _f | Retentionsfaktor |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| rh | recombinant human |
| ROESY | <i>rotating frame nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i> |

| | |
|----------------|--|
| R _t | Retentionszeit |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett |
| Smp | Schmelzpunkt |
| SP-C | Surfaktant-Polypeptid C |
| SPPS | <i>solid phase peptide synthesis</i> |
| t | Triplett |
| TBTU | O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat |
| TCP | Tritylchlorid-Polystyrol-Harz |
| TEA | Triethylamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFE | Trifluorethanol |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIPS | Triisopropylsilan |
| TMOF | Trimethylorthoformiat |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| TMS | Trimethylsilyl- |
| TOCSY | <i>total correlation spectroscopy</i> |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| VCAM-1 | <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> |
| VLA | <i>very late activation antigen</i> |
| VLA-4 | α4β1-Integrin |
| Vn | Vitronectin |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| Xaa | beliebige Aminosäure |
| Z | Benzyloxycarbonyl |

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

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2. Grundlagen der Medizinischen Chemie | 4 |
| 2.1 Allgemeines | 4 |
| 2.2 Modifizierung der Leitstruktur | 5 |
| 2.3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffs | 6 |
| 2.4 Parallelsynthese und kombinatorische Chemie | 7 |
| 2.4.1 Festphasensynthese | 9 |
| 2.4.2 Das <i>one-bead one-compound</i> -Konzept | 11 |
| 3 Integrine als <i>targets</i> in der Medizinischen Chemie | 12 |
| 3.1 Funktion der Integrine | 12 |
| 3.2 Struktur der Integrine | 12 |
| 3.3 Integrinliganden | 16 |
| 3.4 Signaltransduktion | 17 |
| 3.5 $\alpha 4$-Integrin-Rezeptoren | 18 |
| 3.5.1 $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Rezeptor | 20 |
| 3.5.2 $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Rezeptor (lymphocyte homing factor receptor) | 22 |
| 3.6 Liganden für $\alpha 4$-Integrine | 23 |
| 3.6.1 Fibronectin | 23 |
| 3.6.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) | 25 |
| 3.6.3 Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) | 28 |
| 3.6.4 Osteopontin | 30 |
| 3.7 Pathologische Bedeutung von $\alpha 4$-Integrinen | 31 |
| 3.7.1 Übersicht: Autoimmunerkrankungen | 31 |
| 3.7.2 $\alpha 4$ -Integrine in der Pathogenese | 33 |
| 3.8 Synthetische $\alpha 4$-Integrinantagonisten als Therapeutika | 35 |
| 4 Entwicklung von $\alpha 4\beta 7$-Integrinantagonisten | 40 |
| 4.1 Einführung | 40 |
| 4.1.1 Vorarbeiten | 40 |
| 4.1.2 Prinzipien des Ansatzes der Entwicklung von Peptidmimetika als $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten | 46 |
| 4.2 Modifikation der <i>N</i>-terminalen Amidbindung durch Ketomethylen-Isostere | 49 |
| 4.2.1 Einführung | 49 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.2.2 | Synthese und biologische Evaluierung von Ketomethylensurrogaten | 49 |
| 4.2.3 | Enantioselektive Synthese von 3-Amino-3-phenyl-propionsäuren | 51 |
| 4.3 | Modifikation der <i>N</i>-terminalen Amidbindung durch Harnstoff- und Sulfonamidderivate | 54 |
| 4.4 | Substitution der <i>N</i>-terminalen Amidbindung durch aromatische Surrogate | 57 |
| 4.4.1 | Einführung | 57 |
| 4.4.2 | Amino-phenylelessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika | 58 |
| 4.4.3 | Amino-phenylelessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika mit reduzierten Amidbindungen | 62 |
| 4.4.4 | <i>N</i> -terminale Modifizierung mittels Mitsunobu-Reaktion | 66 |
| 4.4.4.1 | Zielsetzung der isosterischen Substitution der Amidbindung durch Benzylether | 66 |
| 4.4.4.2 | Festphasensynthese von Alkoxy-substituierten 2-Isobutyl-phenylelessigsäure-derivaten | 67 |
| 4.5 | Synthese von Sulfid-, Sulfoxid- und Sulfon-analoga | 71 |
| 4.6 | C-Terminale Modifikation der Leitstruktur | 76 |
| 4.7 | Thiazol-Gerüstmimetika | 82 |
| 4.8 | Phenolether als Gerüstmimetikum | 85 |
| 4.8.1 | 3-[[2(<i>S</i>)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren | 85 |
| 4.8.2 | Festphasensynthese von 3-[[2(<i>S</i>)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren | 88 |
| 4.8.3 | Biaryle als Gerüstmimetika | 89 |
| 4.8.3.1 | Die Suzuki-Reaktion | 89 |
| 4.8.3.2 | Festphasensynthese von [[2-(<i>S</i>)-Biaryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren | 91 |
| 4.9 | Reduzierte Amidbindung | 94 |
| 4.10 | Synthese <i>N</i>-alkylierter Peptidmimetika | 97 |
| 4.11 | Untersuchung des Einflusses des 3-Isochinolyl-carbonylrestes | 100 |
| 4.12 | Beiträge zur Synthese von Alken-Dipeptid-Isosteren | 102 |
| 4.13 | Biologische Evaluierung von α4-Intergrinantagonisten | 107 |
| 4.13.1 | Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen | 108 |
| 4.13.2 | In-vivo Migrationsassays | 109 |
| 4.13.3 | Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays | 111 |
| 4.13.4 | Selektivität | 111 |

| | |
|---|------------|
| 5 Das Lungensurfactantpeptid SPC | 113 |
| 5.1 Einführung-Physiologische Grundlagen der Surfactant-Peptide | 113 |
| 5.2 Das Lungen-Surfactant Polypeptid SP-C | 114 |
| 5.3 Chemische Synthese von SP-C-(2-12) und Analoga | 117 |
| 5.4 NMR-Spektroskopische Untersuchungen der verschiedenen SP-C Varianten | 119 |
| 5.4.1 Menschliches, FFI und depalmitoyliertes menschliches SPC (1-11) in H ₂ O / D ₂ O (90:10) | 120 |
| 5.4.2 Menschliches, FFI und depalmitoyliertes menschliches SPC (1-11) in CDCl ₃ /CD ₃ OH 1:1 (v:v) | 120 |
| 5.4.3 Menschliches, FFI und palmitoylierte menschliches SP-C Peptide in [² H ₃₈]DPC-Micellen in H ₂ O / D ₂ O (90:10) | 121 |
| 5.5 Vergleich der Strukturen untereinander | 122 |
| 5.5.1 Vergleich der Strukturen des menschlichen Peptids | 122 |
| 5.5.2 Vergleich der Strukturen der menschlichen depalmitoylierten Variante | 124 |
| 5.5.3 Vergleich der Strukturen der FFI Variante | 125 |
| 5.6 Zusammenfassung | 127 |
| 6. Synthese des Transmembranpeptids KdpF | 129 |
| 6.1 Der KdpFABC-Komplex | 129 |
| 6.2 Festphasensynthese von Peptiden | 131 |
| 6.3 Reversible Schutzgruppen des Rückgrats von Peptiden | 135 |
| 6.3.1 Die <i>N</i> -2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-Schutzgruppe | 136 |
| 6.3.2 Die <i>Mutter</i> 'schen Pseudoproline | 137 |
| 6.4 Aminosäuresequenz von KdpF und Synthesestrategie | 138 |
| 6.5 Batchsynthese | 140 |
| 6.6 Einsatz von Hmb-Derivaten | 140 |
| 6.7 Zwei-Fragment-Strategien | 140 |
| 6.8 Der vorteilhafte Einfluss von DBU auf die Fmoc-Entschützung | 142 |
| 6.9 Beiträge zur Synthese und Reinigung von hydrophoben Peptiden | 145 |
| 6.9.1 „Solubilising Tail“ Methode zur Reinigung von hydrophoben Peptiden | 145 |
| 6.9.2 Entwicklung eines neuen bifunktionalen 4-Hmb-DMPA-acetal –Linkers | 147 |
| 6.10 Neuartige Ansätze in der Peptidchemie | 154 |
| 6.10.1 <i>in-situ backbone</i> -Benzylierung | 154 |
| 6.10.2 Bifunktionaler Pac-Linker | 156 |

| | |
|---|------------|
| 7 Zusammenfassung und Ausblick | 159 |
| 8 Experimenteller Teil | 162 |
| 8.1 Material und allgemeine Arbeitstechniken | 162 |
| 8.2 Synthese von Bausteinen | 164 |
| 8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften | 164 |
| 8.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften | 167 |
| 8.3 Synthese von α4-Antagonisten in Lösung | 202 |
| 8.3.1 Phenolether über Mitsunobureaktion | 202 |
| 8.3.2 S-haltige Surrogate des <i>hits</i> 6a | 205 |
| 8.3.3 Enantiomerenreine Synthese des <i>hits</i> 6a | 208 |
| 8.3.4 Phosphonsäurederivate des <i>hits</i> 6a | 209 |
| 8.4 Synthese von Bausteinen für die Synthese von Transmembranen Peptiden | 211 |
| 8.5 Festphasensynthese | 213 |
| 8.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften | 213 |
| 8.5.2 Spezielle Arbeitsvorschriften | 217 |
| 8.5.2.1 Derivate mit reduzierter Amidbindung | 217 |
| 8.5.2.2 Benzyl-Phenylether des Phenylelessigsäuren- <i>scaffolds</i> | 219 |
| 8.5.2.3 Aminoessigsäurederivate mit reduzierter Amidbindung | 225 |
| 8.5.2.4 Bibliothek des Phenylelessigsäure- <i>scaffolds</i> | 229 |
| 8.5.2.5 Harnstoff-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe | 237 |
| 8.5.2.6 Ketomethylen-Surrogate des Dipeptids Leu- β Phe | 238 |
| 8.5.2.7 <i>N</i> -Acyl-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe | 240 |
| 8.5.2.8 Sulfonamid-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe | 242 |
| 8.5.2.9 Heterocyclische α -4 Antagonisten mit Thiazol- <i>scaffold</i> | 243 |
| 8.5.2.10 Weitere α 4-Antagonisten | 244 |
| 8.5.2.11 Biaryle als α 4-Antagonisten – Suzukireaktion an fester Phase | 248 |
| 8.6 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit α4-Integrin exprimierenden Zellen | 251 |
| 8.7 Synthese der SPC-Undecapeptid-Fragmente | 253 |
| 8.7.1 Synthese der menschlichen und der FFI Undecapeptid-Varianten von SPC | 253 |
| 8.7.2 Synthese des menschlichen palmitoylierten SPC Undecapeptids | 254 |
| 9 Literatur | 255 |

1 Einleitung und Zielsetzung

Sicher hat die Medizinische Chemie in den letzten Jahren ein neues Niveau erreicht. Nach einem Vierteljahrhundert der schnellen Entwicklung neuer Methoden in diesem Feld, hat sich gezeigt, dass „Rationales Drug Design“ und Kombinatorische Chemie sich als äußerst brauchbare Methoden im Wirkstoffentwicklungsprozess erwiesen haben. Von diesen Verfahren, in Verbindung mit modernem High-Throughput Screening und schneller Strukturaufklärung, kann eine Beschleunigung in der Identifizierung von Leitstrukturen, die gegen viele der Proteasen und Rezeptor-Targets gerichtet sind, die sich aus dem Human Genom Projekt ergeben, erwartet werden. Trotzdem wird die Entdeckung von effektiven Liganden gegen neue Proteinklassen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen die Forscher auch in Zukunft mit großen Herausforderungen konfrontieren.

Durch hervorragende Leistungen auf dem Gebiet der organischen Synthese konnten komplexe Moleküle, wie biologische Cofaktoren, Naturstoffe und Hormone synthetisiert werden.^[1] Auch wurde durch intensive Forschungsarbeiten sowohl die Synthese als auch die Strukturaufklärung von Biopolymeren (DNA/RNA,^[2] Peptide/Proteine,^[3] Kohlenhydrate) möglich. Diese Errungenschaften stimulierten die modernen Entwicklungen in der Biologie, wie z.B. die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).^[4] 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 Jahrtausenden praktiziert, in das Repertoire der Chemie aufgenommen. Das prominenteste Beispiel hierfür ist die Entwicklung der kombinatorischen Chemie.^[5-7] In der Biologie beruht die Vielzahl der Rezeptoren des Immunsystems auf der kombinatorischen Vielfalt. 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 „Bibliotheken“^[8] von Lymphocyten, die alle einen eigenen, spezifischen Rezeptor tragen. Dadurch kann das Immunsystem nahezu jeden neuen, bisher unbekanntem 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 berücksichtigt, 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. D. Gottschling^[9] soll eine weitere Optimierung von niedermolekularen, nichtpeptidischen $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten unter besonderer Beachtung eines verbesserten pharmakologischen Profils erreicht werden. Es werden unter anderem in rationalen Ansätzen Modifizierungen an der Leitstruktur vorgenommen und neue Bausteine für die Festphasensynthese von Peptidmimetika-Bibliotheken beschrieben. Die biologische Evaluierung von diversen parallel synthetisierten Bibliotheken sollte uns in die Lage versetzen, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erkennen. Im zweiten Teil der Arbeit werden Beiträge zur Synthese von transmembranen, physiologisch relevanten Peptiden beschrieben, die sich zum einen mit der Darstellung und strukturellen Aberration des oberflächenaktiven SP-C-Peptids und zum anderen mit konvergenten Synthesestrategien von hydrophoben Peptiden am Beispiel des KdpF befassen. Das sogenannte KdpF-Peptid ist ein kürzlich entdecktes kleines (31-mer), hydrophobes Peptid, welches in Zusammenhang mit dem K^+ -Transportersystem Kdp, einer P-typ ATPase, in *E.coli* gesehen wird. K^+ -Ionen besitzen eine bedeutende Rolle beim Aufrechterhalten des Turgors. Bei kleinen K^+ -Konzentrationen wird das Kdp-System als „Notsystem“ exprimiert, welches äquimolare Anteile der drei großen Untereinheiten A, B und C enthält, die wahrscheinlich als Oligomer der minimalen Stöchiometrie $A_2B_2C_2$ zusammenwirken. Auch wenn KdpF nicht essentiell für die Funktion des Kdp-Komplexes *in vivo* ist, so ist es doch Teil des Komplexes und stabilisiert denselben

in vitro. Eine strukturelle Analyse des KdpF-Peptides würde Einblicke in diesen Mechanismus erwarten lassen.

Bei dem Lungen-Surfactant-Protein C (SP-C) handelt es sich um ein lipophiles Peptid,^[10, 11] das Bestandteil der vier *surfactant-associated proteins* (SP) SP-A, SP-B, SP-C und SP-D ist.^[12] Diese wiederum bilden zusammen mit den Phospholipiden und anderen spezifischen Proteinen das Lungensurfactant, welches notwendig ist, um die Oberflächenspannung an der alveolären Luft-Wasser Grenzfläche zu erniedrigen und normale Atmung zu gewährleisten.^[13] Das 35-mer SP-C nimmt eine entscheidende Rolle bei der Funktion dieser oberflächenaktiven Peptide ein und strukturelle Einblicke mögen seine einzigartige Funktion verstehen helfen.^[14]

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.^[15, 16]

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 aber oft 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 ADMET-Parametern zusammengefaßt (*absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity*).

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 diese als Grundlage benutzt werden, um im Laufe der medizinisch-chemischen Entwicklung zu einem Wirkstoff weiterentwickelt zu werden.

Oftmals sind Peptide nur eingeschränkt als Medikamente einsetzbar, da sie (1) durch das hohe Molekulargewicht und die hohe Polarität nicht oral bioverfügbar sind, (2) Peptide metabolisch nicht sehr stabil sind und (3) sehr rasch im Körper über die Leber und Niere ausgeschieden werden können. Ziel ist es daher, Peptide in sogenannte Peptidmimetika zu überführen.^[17] Peptidmimetika sollen an denselben 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,^[18] wie z.B. Modifikation der Aminosäuren,^[19] Cyclisierung,^[20-22] Modifikation der Amidbindung,^[23] Substitution des Rückgrates durch ein Gerüstmimetikum,^[24, 25] 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. 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 Wasserstoffbrücken-Donatoren bis hin zu komplexen neuronalen Netzwerken verwendet.^[26]

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 an Plasmaproteine.^[27] Zur Beschreibung der Lipophilie hat sich der Verteilungskoeffizient P (*partition coefficient*) zwischen Octan-1-ol und Wasser als sehr geeignet erwiesen.^[28]

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

Für Verbindungen, die in Octan-1-ol besser löslich sind, ist $P > 1$ und $\log P$ wird dadurch positiv. Der $\log P$ -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.^[29]

Durch die Analyse von 2245 oral bioverfügbaren Wirkstoffen, konnten Lipinski *et al.* von der Firma Pfizer Inc. einige allgemeine Eigenschaften oral bioverfügbarer Substanzen ableiten.^[30] 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 (=100 x 5)
- Anzahl der Wasserstoff-Donatoren < 5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren < 10 (= 2 x 5)
- Eine der vier vorgenannten Regeln kann verletzt sein.

Trotz der Verletzung der *rule of five* waren jedoch 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.^[31, 32] 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.^[33] Weitere Methoden, um *drug-like molecules* zu finden, sind u.a. Analyse des *chemistry space*,^[34] Analyse der Bausteine von bekannten Medikamenten^[29, 35] und die sich daraus ergebende Postulierung von sog. privilegierten Unterstrukturen,^[36] sowie die Minimierung von flexiblen Bindungen und der polaren Oberfläche^[37] und neuronale Netzwerke.^[38, 39] Die sogenannten „Veber-Regeln“ postulieren eine bevorzugte orale Bioverfügbarkeit von Molekülen, die weniger als 10 rotierbare Bindungen enthalten und deren polare Oberfläche kleiner als 140 Å ist, was etwa zwölf oder weniger Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren entspricht. Im Gegensatz zu dem in den „Pfizer-Regeln“ verlangten Massenausschlusskriterium (MW < 500), gelten die „Veber-Regeln“ unabhängig von der Molekülgröße.^[37]

2.4 Parallelsynthese und kombinatorische Chemie

Noch Ende der 80er 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 90er 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.^[40] 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. 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 (Abb. 2.1). Statt zwei Edukte **A** und **B** zu einem Produkt **AB** zu verknüpfen, werden unterschiedliche Bausteine vom Typ **A(A¹-Aⁿ)** mit verschiedenen Bausteinen vom Typ **B(B¹-Bⁿ)** 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(C¹-Cⁿ)** umgesetzt.

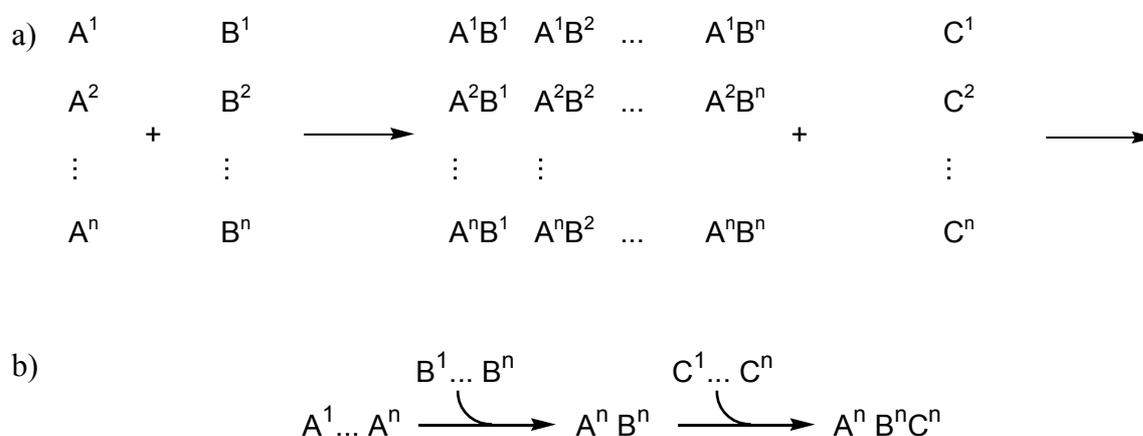


Abbildung 2.1: a) Prinzip der kombinatorischen Synthese. b) Prinzip der mehrstufigen kombinatorischen Synthese.

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 bereits $10 \times 10 \times 10 = 10^3$ 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,^[41] R. Frank,^[42] H.M. Geysen,^[43] R.A. Houghten^[44] und K. Lam.^[45] Bibliotheken lassen sich sowohl in Lösung^[46, 47] als auch an der Festphase synthetisieren.^[48, 49] 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 oder (4) keine orthogonalen Linker sind nötig und (5) Reaktionskontrolle ist einfacher möglich. Dagegen liegen die Vorteile der Festphasensynthese in der nicht notwendigen Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten durch die einfache Entfernung von Nebenprodukten in Waschschritten. Die dadurch resultierende Reinheit des Endproduktes hat sich insbesondere in der Peptidsynthese als überlegen erwiesen. Zudem erlaubt die Verwendung von Reagenzienüberschüssen bei der Reaktion hohe Ausbeuten. Als weitere Neuheit sei die Möglichkeit von immobilisierten Reagenzien wie Katalysatoren erwähnt.

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,^[41] das *one-bead one-compound*-Konzept von Lam,^[45] *array* Synthesen,^[50, 51] dynamische Bibliotheken,^[52] *fluorous synthesis*,^[53] *ladder synthesis*,^[54] *pin* Synthesen, *tea-bag* Methode,^[55] *spot synthesis*^[56] und nicht zuletzt die Entwicklung von harzgebundenen Katalysatoren^[57] und Reagentien.^[58]

Zur Analyse von Bibliotheken und Festphasenreaktionen ist die Massenspektrometrie die Methode der Wahl. 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,^[59] Katalysatorforschung,^[60, 61] etc. Anwendung.

2.4.1 Festphasensynthese

Die Festphasensynthese wurde gleichzeitig und unabhängig voneinander von Merrifield (Festphasensynthese von Peptiden) und Letsinger (Festphasensynthese von Oligonukleotiden) entwickelt.^[62, 63] Während sich bei Peptiden und Oligonukleotiden die Festphasensynthese als wichtigste Methode etabliert hat, wurde sie bei anderen Verbindungsklassen mit wenigen Ausnahmen^[64-66] erst im letzten Jahrzehnt populär.

Bei der Festphasensynthese sind die aufzubauenden Moleküle während der gesamten Synthese über einen Linker an einen polymeren Träger gebunden (Abb. 2.2).

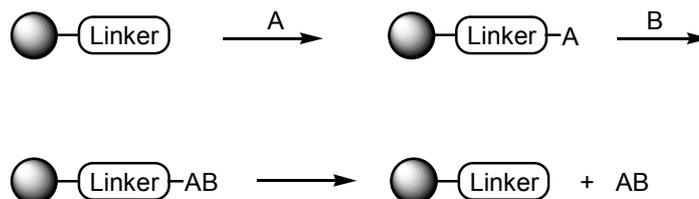


Abbildung 2.2: Allgemeines Prinzip der Festphasensynthese.

Der Linker muß gegenüber den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil sein. Ebenfalls muß aber das Produkt **AB** ohne Zersetzung 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) Beschleunigung der Reaktion und hohe Umsätze durch Verwendung von Überschüssen an Reagentien, (3) aufwendige Reinigungs- und Aufarbeitungsschritte entfallen, da nur das Harz gewaschen werden muß und (4) einfache Handhabung kleiner Mengen.

Erst im Zeitalter der kombinatorischen Chemie erlebte die Festphasensynthese eine außerordentliche Renaissance. Insbesondere der Festphasensynthese komplexer, von Naturstoffstrukturen inspirierter Moleküle wurde mit der Herstellung von Substanzbibliotheken besondere Aufmerksamkeit geschenkt. So gelangen an festen Trägern Synthesen von Deglycobleomycin A₅,^[67] Penticinnamin E^[68] sowie (-)-Saframycin A^[69] und verwandten Systemen.

Darüber hinaus gab es deutliche Fortschritte in der Synthese oligo- und polymerer Moleküle wie Oligosacchariden,^[70-72] Peptiden^[73] und Oligonukleotiden.^[74] Bemerkenswert ist der Einzug der für die Peptidsynthese etablierten automatisierten Synthese in die Oligosaccharidsynthese, wie in der Synthese von Malaria-Vaccinen mit Glycosylphosphatylinositen demonstriert wurde. Auch die racemisierungsfreie Kupplung *N*-alkylierter Aminosäuren z.B. zur Herstellung von Omphalotin A^[73] und die Makrolactamisierung^[75] sind außergewöhnliche Entwicklungen.

Kombinatorische Bibliotheken konnten die in den 90er Jahren an sie geknüpften enthusiastischen Erwartungen nicht erfüllen. Trotzdem sind durchaus Erfolge zu verzeichnen und kombinatorische Strategien werden sich in der Wirkstoffentwicklung weiter etablieren.

2.4.2 Das *one-bead one-compound*-Konzept

Furka und Lam *et al.* erkannten, dass sich auf einem Harz-Kügelchen (*bead*) genau eine Verbindung in vielfacher Kopie befindet (*one-bead one-compound*).^[41, 45, 76] 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.^[77] Diese als *on-bead screening* bezeichnete Methode, wurde bereits häufig mit löslichen Rezeptoren,^[78, 79] jedoch seltener mit ganzen Zellen durchgeführt.^[80, 81] Bei der Verwendung von orthogonal-spaltbaren Linkern, können die Verbindungen auch von dem Harz abgespalten und anschließend in Lösung evaluiert werden.

3 Integrine als *targets* in der Medizinischen Chemie

3.1 Funktion der Integrine

Für die Entwicklung, Erhalt und Funktion verschiedener Zell- und Gewebetypen sind adhäsive Wechselwirkungen von Zellen, entweder interzellulär oder mit der umgebenden extrazellulären Matrix (ECM), von großer Bedeutung. Entscheidende Prozesse, in die die Adhäsion involviert ist betreffen die Embryogenese, Hämostase, Homöostase, Wundheilung und Immunantwort.^[82-84] Vermittelt wird die Adhäsion durch Zelladhäsionsrezeptoren, welche in verschiedene Klassen eingeteilt werden können: Integrine, Immunglobulin-Superfamilie,^[85] Selektine,^[86, 87] Cadherine^[88-90] und sonstige.^[91] Die Integrine stellen hierbei die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie der CAMs dar, und repräsentieren die wichtigsten Rezeptoren zur physikalischen Verankerung der Zelle. 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.^[92]

Sie „integrieren“ durch die Zellmembran hindurch in fokalen Adhäsionskomplexen das Cytoskelett der Zelle in das Gerüst der ECM.^[93, 94] Über die mechanische Funktion hinaus vermitteln Integrine Signale durch die Zellmembran, sowohl von außen nach innen (*outside-in signaling*) als auch von innen nach außen (*inside-out signaling*).^[94] Integrine sind in eine Vielzahl pathologischer Prozesse involviert, z.B. Tumorwachstum,^[95, 96] Thrombosen,^[82, 97] Arthritis,^[98] Retinopathie,^[99] Osteoporose,^[100, 101] akutes Nierenversagen^[102, 103] und chronische Entzündungen.^[104, 105]

Auf einer Zelle gibt es typischerweise ca. 100000 Integrine.^[106] Sie liegen in der Membran bevorzugt in cholesterinreichen Bereichen, den sogenannten *rafts*.^[107, 108]

3.2 Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die beide nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Es sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die untereinander kombiniert 24 verschiedene Integrine bilden (Abb.3.1), welche sich hinsichtlich ihrer physiologischen Struktur und ihrer Liganden

unterscheiden. Erkenntnisse aus dem Human-Genom-Projekt postulieren die Existenz von weiteren sechs α - und einer β -Untereinheit, deren Expression bisher nicht nachgewiesen werden konnte.^[109] Zur Diversität der Integrine tragen weiterhin verschiedene Splice- und Glycosylierungs-Varianten bei.^[110, 111]

Die extrazelluläre Domäne der Integrine stellt den größten Teil dar. Sie besteht aus einer Kopf-Region, aus der eine gestreckte Stelzen-Region hervorgeht. Über eine sich jeweils anschließende kurze Transmembranhelix und die cytoplasmatische Domäne ist das Integrin mit Proteinen des Cytosols verknüpft (Abb. 3.1). Die größere α -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. N-terminal weisen α -Untereinheiten eine charakteristische Domänenstruktur von 7 *repeat domains* auf von denen die letzten 3-4 durch mehrere Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} - bindende Abschnitte gekennzeichnet sind.^[112] Die cytoplasmatische Region ist sehr kurz (ca. 20-50 Aminosäuren) und weist kaum Homologien auf, bis auf die hochkonservierte Heptapeptid-Sequenz KXGFFKR. Möglicherweise interagiert sie mit der, in der β -Untereinheit konservierten Sequenz LLVXIHDR.^[113]

Die β -Untereinheit besteht aus ca. 800 Aminosäuren (Ausnahme $\beta 4$, ca. 1750 Aminosäuren) und enthält u.a. vier hochkonservierte cysteinreiche Domänen nahe der transmembranen Region. Mit Ausnahme von $\beta 4$ besitzen alle β -Untereinheiten eine cytoplasmatische Region, die aus 15 bis 65 Aminosäuren besteht und mit dem Cytoskelett über α -Actin^[114, 115] und Talin^[116] verankert ist.

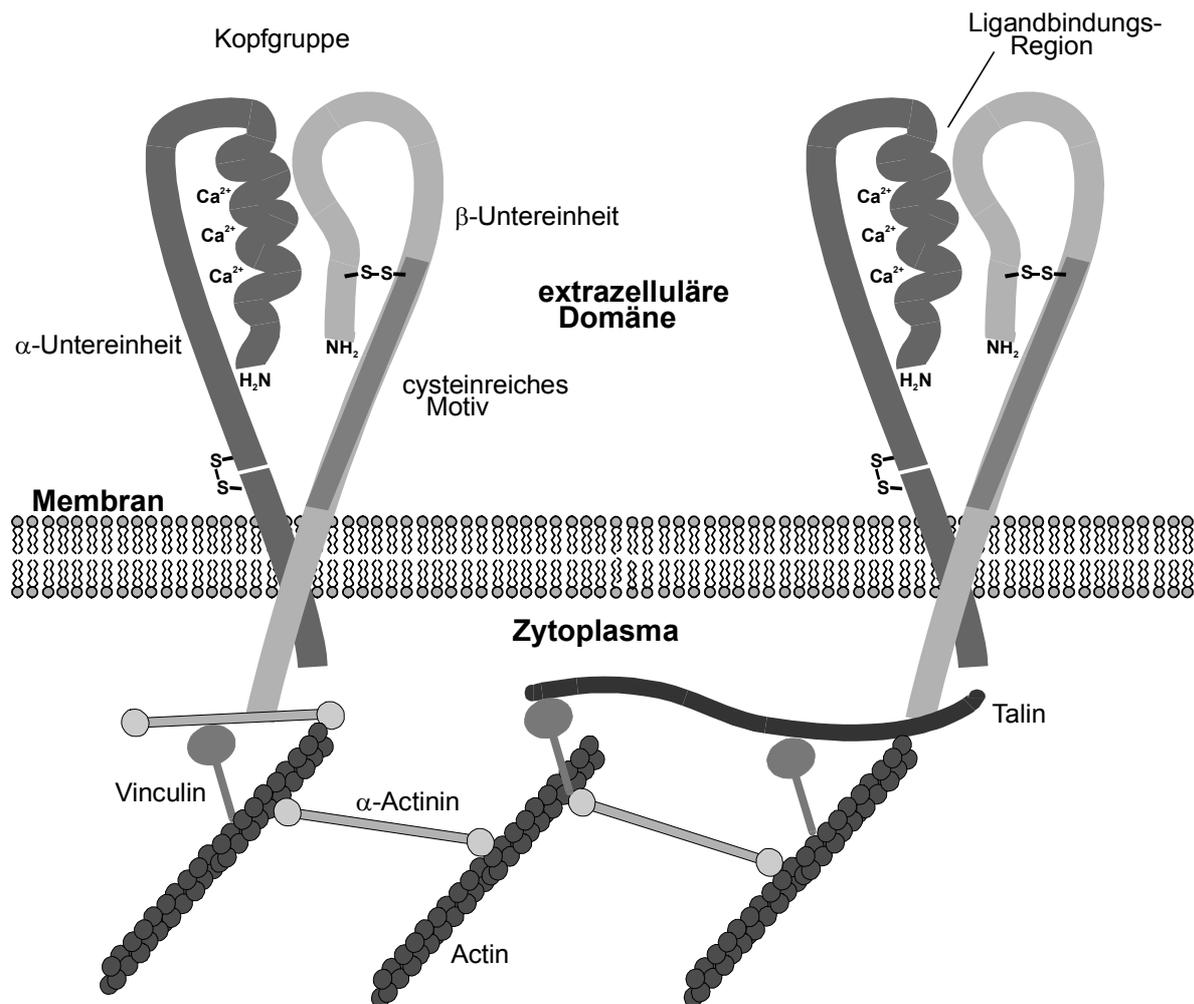


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Integrine. Die α - und β - Untereinheit sind nichtkovalent über Bereiche der Kopfgruppe und der Transmembrandomänen miteinander verknüpft. Über die C-terminale Domäne der β -Untereinheit sind die Integrine mit den Proteinen des Cytoskeletts verknüpft.

Als Durchbruch auf dem Weg zu einem tieferen Verständnis der molekularen Grundlagen der Integrinfunktion, muss die Aufklärung der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des $\alpha\beta$ -Integrins durch *Xiong et al.* gesehen werden (Abb. 3.2).^[117] In Übereinstimmung mit elektronen-mikroskopischen (EM) Aufnahmen^[118] wurden ein ovaler Kopf und zwei Stelzen-Regionen („stalk“-Regionen) gefunden. Der vorher nicht beobachtete Knick in den Stelzen-Regionen könnte ein Element der integrinvermittelten Signaltransduktion darstellen, wenn es sich hierbei nicht um ein Kristallisationsartefakt handeln sollte. Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller, die sich anschließende Stelzenregion aus drei linear angeordneten β -Faltblättern. Die Kopfgruppe der β -Untereinheit setzt sich aus der β I-Domäne, einem von acht Helices umgebenen sechssträngigem Faltblatt

(„Rossman-Faltung“) und einer Immunglobulin(Ig)-ähnlichen „Hybrid“ Domäne zusammen. Auf der β I-Domäne findet sich auch die MIDAS (metal ion dependend adhesion site)-Region, welche zusammen mit Teilen des Propellers der α -Untereinheit die Liganden-Bindungsstelle darstellt. Die Stelzen-Region der β -Untereinheit besteht aus sechs Domänen; bei vier davon handelt es sich um cysteinreiche EGF (epidermal growth factor)-artige Domänen.

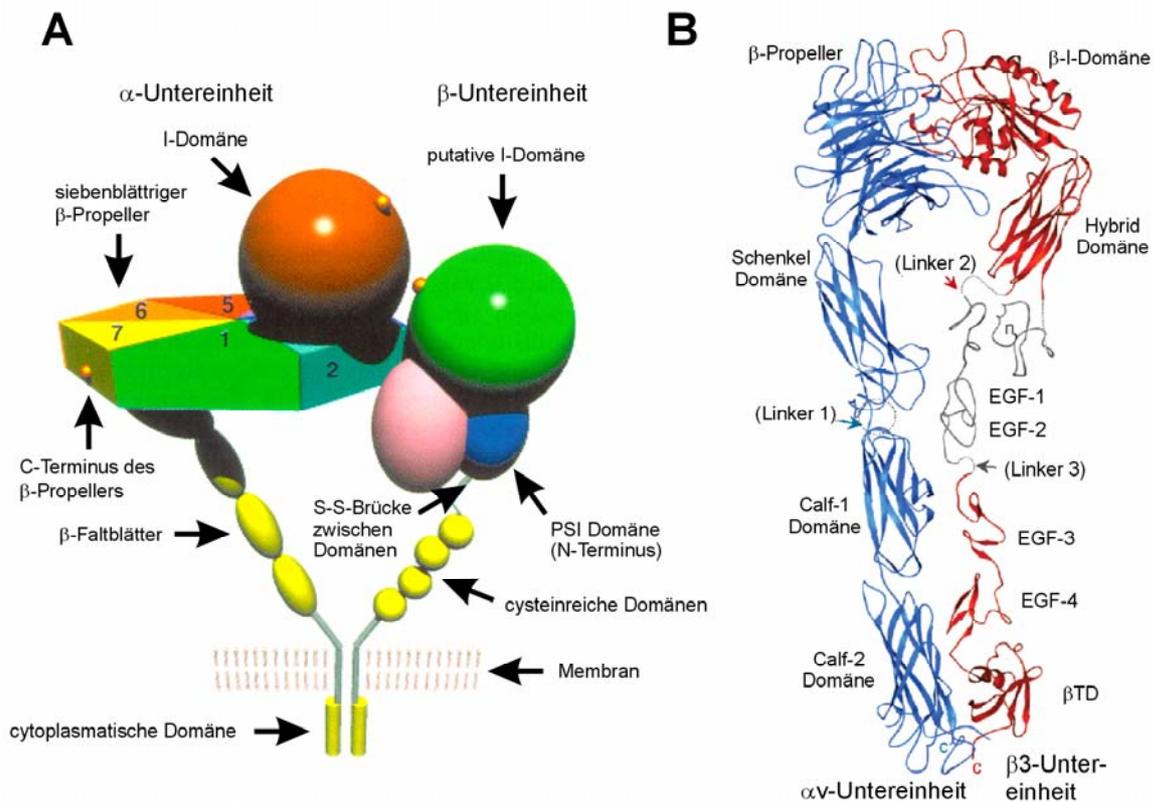


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Integrine nach Bella et Berman (A) ^[119] und Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Teils des α β 3-Integrins nach Xiong et al. (B) ^[117]

Die Kopfgruppen der α - und β - Untereinheit werden u.a. durch Kationen- π -Kontakt zusammengehalten. So ragt die eine Guanidiniumgruppe eines Arginins der β I-Domäne in den von aromatischen Resten umgebenen zentralen Hohlraum des Propellers der α -Untereinheit.

Das erste röntgenkristallographisch charakterisierte Integrinfragment war die α I-Domäne (*inserted domain* bzw. A-Domäne) im freien bzw. ligandgebundenem Zustand. ^[112]

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit weisen ein N-Glycosylierungsmuster auf.^[120, 121] Durch Veränderung des Glycosylierungsmusters wird die integrinvermittelte Adhäsion variiert, bis hin zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit.^[122-124]

3.3 Integrinliganden

Durch Kombination der verschiedenen α - und β -Untereinheiten entstehen Integrine mit bestimmter Ligandenspezifität. 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. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha \nu\beta 1$, etc.).^[125] Bei der LDV-Sequenz hingegen können Sequenzmodifikationen auftreten. $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ -Integrine erkennen beispielsweise in Fibronectin die LDVP-Sequenz^[126] und in VCAM-1 die IDSP-Sequenz.^[127] $\beta 2$ -Integrine erkennen in ICAM-1, -2 und -3 ebenfalls LDV Modifikation (IETP, LETS und LETS).^[128] Allen Erkennungssequenzen ist jedoch gemeinsam, daß sie eine saure Aminosäure-Seitenkette beinhalten. Zu den löslichen Integrinliganden zählen u.a. Matrix-Metalloproteasen (MMPs).

Die an Integrine bindenden Peptidsequenzen sind verschiedenster Natur. Sie enthalten jedoch meistens ein Aspartat oder Glutamat, das sich als essentiell für die Rezeptorbindung erweist. Die molekulare Grundlage dieser Tatsache lässt sich anhand der Kristallstruktur der Cokristallisation des $\alpha \nu\beta 3$ -Integrins mit dem cyclischen Pentapeptid c[R-G-D-f-(NMe)V] erklären, die demonstriert, dass die Carboxylatseitenkette ein zweiwertiges Kation der MIDAS-Region in der β -Untereinheit komplexiert.^[129] Eine entsprechende MIDAS-Region findet sich auch in der Ligandenbindungsstelle der Integrine mit αI -Domäne.^[112, 119] Die so gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur des $\alpha \nu\beta 3$ -Integrins ermöglichen in Zukunft nun auch ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign.

3.4 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion in Integrinen ist ein komplexes Netzwerk verschiedenster Prozesse.^[130] Integrine sind in der Lage, in zwei Richtungen Signale zu übertragen (*two-way-signaling*). Der cytoplasmatische Teil von VLA-4 ist sowohl mit dem intrazellulären Cytoskelett als auch mit Kinasen verbunden.^[131] Die Affinität von α -Integrinen gegenüber ihrem Liganden kann durch Wechselwirkung von Chemokinen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) auf Leukozyten gesteigert werden. Dieser Vorgang verläuft über ein sogenannten *outside-in-signaling*.^[132, 133] Zusätzlich verursacht die Bindung von Leukozyten an VCAM oder Fibronectin merkliche Veränderungen in der Zellmorphologie, was entscheidend für die Zellbeweglichkeit ist (*outside-in-signaling*).^[134] Die für die Ligandenaffinität verantwortliche gegenseitige Orientierung der beiden Integrinuntereinheiten wird durch den Kontakt mit Proteinen des Zytoskeletts determiniert.^[135] Die α - und β -Untereinheiten sind konformationell relativ mobil und bewegen sich zwischen high-affinity und low-affinity Zuständen als Antwort auf physiologische Anregungen.^[136, 137]

Die integrinvermittelte Signaltransduktion findet dabei auf verschiedenen Ebenen statt:^[138] Konformationsänderung, Clustern von Integrinen, Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen, Kraftübertragung und Translokation.

In Integrinen unterscheidet man niedrigaffine und ligandenkompetente Zustände. Modellrechnungen von *K.Gottschalk* legen nahe, dass der Übergang zwischen niedrigaffinen und ligandbindendem Zustand auf einer Verdrehung von α - und β -Untereinheit beruht. Im Falle der Bindung eines Liganden bewirkt die scherenartige Bewegung der beiden Integrinuntereinheiten eine Trennung der beiden Kopfgruppen.^[139, 140] Parallel wird angesichts der geknickten Form der Kristallstruktur ein sog. „Klappmesser-Modell“ als kausal für die Konformationsänderung und Signaltransduktion angenommen.^[141, 142]

Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen erfolgen im Zytosol, in der Membran und im extrazellulären Bereich mit Tetraspaninen, Proteinen der Ig-Superfamilie, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, uPAR (urokinaseartiger Plasminogenaktivator-Rezeptor), Insulinrezeptor, Ionenkanälen und anderen. Dabei beeinflussen sich beide Bindungspartner gegenseitig in der Funktion.^[109, 138, 143, 144]

Die integrinvermittelte Kraftübertragung kann neben der mechanischen Funktion in Zellverankerung und Migration auch eine signalgebende Komponente besitzen. Schon der

Widerstand, den ligandgebundene Integrine auf die kontraktile Kräfte der Zelle ausübt, kann in der Bildung von FAs oder *stress fibers* resultieren.^[145-147]

Die Translokation von Integrinen aus der Zellmembran kann ebenfalls zur Signalvermittlung beitragen. So aktivieren z.B. bei der Zellmigration aus der Membran gerissene $\beta 1$ -Integrine Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1).^[148, 149]

3.5 $\alpha 4$ -Integrin-Rezeptoren

$\alpha 4\beta 1$ -, $\alpha 4\beta 7$ - und $\alpha E\beta 7$ -Integrine und die sogenannten *leukocyte integrins* ($\alpha L\beta 2$ -, $\alpha M\beta 2$ -, $\alpha d\beta 2$ - und $\alpha X\beta 2$ -) sind an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt. Solche Integrin-vermittelten Zell-Wechselwirkungen führen u.a. zu Veränderungen der Zellform, Migration, Genaktivierung und Sekretion. $\alpha 4\beta 1$ -, $\alpha 4\beta 7$ - und $\alpha E\beta 7$ -Integrine sind neben den sogenannten *leukocyte integrins* vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Sie spielen bei Entzündungen und dem Immunprozess eine wichtige Rolle.^[105, 150] Die Extravasation von Leukocyten setzt sich aus verschiedenen Schritten, wie *rolling*, Adhäsion und schließlich Migration durch die Endothelschicht zusammen (Abb. 3.3).^[151] Bei diesem Prozess sind verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt. Der erste Kontakt (*tethering*) (1) zwischen Leukocyten und den Endothelzellen wird vor allem durch E-, L- und P-Selektine, aber auch in einigen Fällen durch Integrine (z.B. $\alpha 4\beta 7$ -Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung) vermittelt. Dies verursacht ein Herabsinken der Geschwindigkeit von zirkulierenden Leukocyten und führt schließlich zum Anhaften und *rolling* (2) der Leukocyten an das Endothelium.^[152-154] 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.

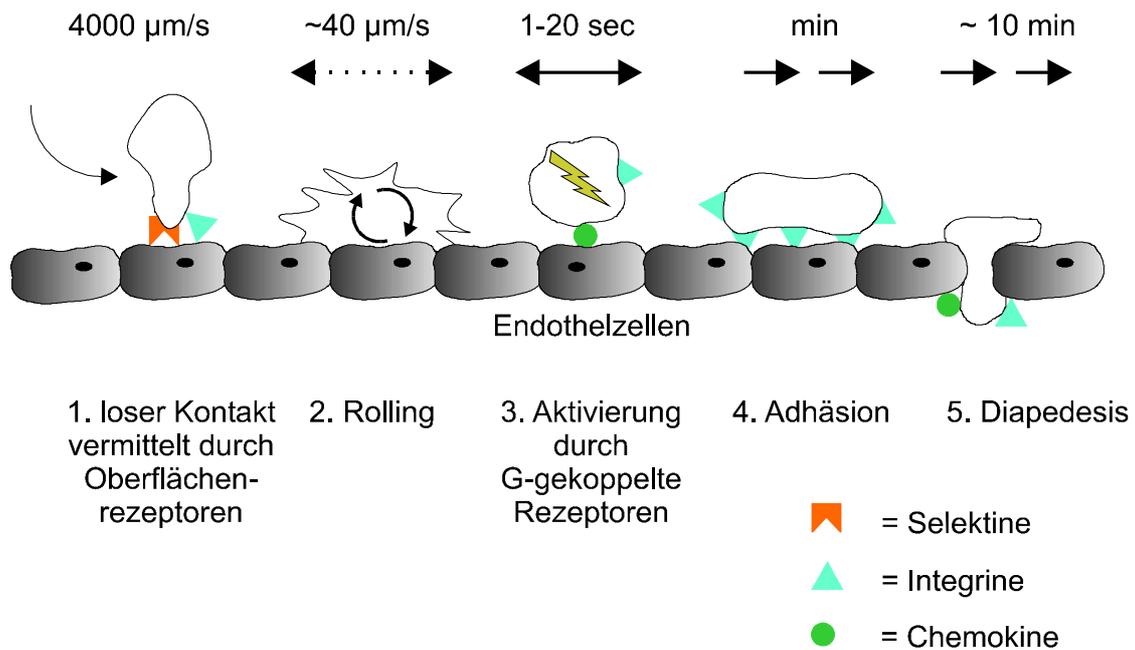


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der schrittweisen Extravasation von Leukocyten.

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 3.3 gezeigten Schritte 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.^[153] $\alpha 4$ -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.^[155]

| Ort | Zelltyp | Extravasation | | | |
|-----------------------|------------------------------|---|------------------|--|-------------------------------------|
| | | tethering/ rolling | Aktivierung | Adhäsion | Diapedese |
| periphere Lymphknoten | naive B- und T-Zellen | L-Selektin-PNAd | CCR7-SLC | LFA-1-ICAM-1 | <i>CCR7-MIP-3β</i> |
| Peysersche Plaques | naive B- und T-Zellen | L-Selektin-PNAd; $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 | unbekannt | LFA-1-ICAM-1; $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 | unbekannt |
| Lamina propria | T-Gedächtniszellen des Darms | $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 | <i>CCR9-TECK</i> | LFA-1-ICAM-1; $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 | <i>CCR9-TECK</i> |
| Entzündete Haut | T-Gedächtniszellen der Haut | CLA-E-Selektin; $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 | CCR4-TARC | LFA-1-ICAM-1; $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 | CCR?-CTACK |

Die $\alpha 4$ -Integrinuntereinheit wird an der Zelloberfläche als 150000 Da Protein exprimiert. Durch die Aktivierung von T-Lymphocyten kann diese Integrinuntereinheit zwischen Arg558 und Ser559 gespalten werden, was zur Bildung von Fragmenten mit 70000 und 80000 Da führt.^[104] Die Adhäsion an VCAM-1 oder Fibronectin wird durch diese Spaltung nicht beeinflusst. Ferner existiert noch eine weitere Form der $\alpha 4$ -Integrinuntereinheit mit einem Molekulargewicht von 180000.^[156] Die beiden VCAM-1 bindenden $\alpha \beta 2$ - und $\alpha \beta 1$ -Integrine stehen in einem engen Bezug zu der Biologie der $\alpha 4$ -Integrine.^[157, 158]

3.5.1 $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Rezeptor

$\alpha 4\beta 1$ -Integrine (VLA-4, CD49d/CD29) werden auf Lymphocyten und anderen Leukocyten exprimiert. Allerdings exprimieren neutrophile Granulocyten keine $\alpha 4\beta 1$ -Integrine. Bei reifen Blutzellen kommen $\alpha 4\beta 1$ -Integrine nur auf T- und B- Lymphocyten, natürlichen Killerzellen, Monozyten, basophilen und eosinophilen Granulocyten vor.^[159] Sie vermitteln das *homing* und die Verankerung von unreifen Blutzellen an *bone marrow stromal cells* und an ihre extrazelluläre Matrix.^[160, 161]

Das Matrixprotein Fibronectin^[162, 163] und das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)^[164, 165] stellen u.a. die natürlichen Liganden für $\alpha 4\beta 1$ -Integrine dar. Auch $\alpha 4\beta 1$ -Integrine verschiedener Zellen können miteinander wechselwirken.^[166]

In Fibronectin binden $\alpha 4\beta 1$ -Integrine über die LDV-Sequenz an CS1,^[167, 168] mittels der REDV-Sequenz an humanes CS5^[169] und über die IDA-Sequenz an HepII.^[170] In VCAM-1 binden $\alpha 4\beta 1$ -Integrine über einen exponierten β -turn an die Sequenz QIDSP.^[127, 171-174]

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 $^1/L-D-S/V-P$ reduzieren.

Es konnte auch gezeigt werden, daß $\alpha 4\beta 1$ -Integrine über die RGDS-Sequenz an das zentrale Zellbindungsfragment von Fibronectin binden.^[175] Sowohl CS1- und IDAPS- Peptide können die Adhäsion von $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen an die RGD-Bindungssequenz inhibieren und umgekehrt.

Ferner treten noch adhäsive Wechselwirkungen zwischen $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen und Thrombospondin^[176] und dem Membranprotein Invasin des Bakteriums *Yersinia Pseudotuberculosis* auf.^[177] 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.^[178]

Über die $\alpha 4\beta 1$ - $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Wechselwirkung ist noch sehr wenig bekannt. Der Ersatz von Arg₈₉ und Asp₉₀ 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.^[179]

Das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Heterodimer dissoziiert sehr leicht wieder in die entsprechende α - und β -Untereinheit.^[180] 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.^[181, 182]

$\alpha 4\beta 1$ -Integrine können *in-vitro* entweder durch die Zugabe von Metallionen, wie z.B. Mn²⁺ oder durch aktivierende Antikörper für die $\beta 1$ -Kette aktiviert werden.^[183]

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 Liganden in einem Test mit low-affinity $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen oftmals als um viele Größenordnungen schwächer.^[184] 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.^[185] 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 $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung vermittelt.^[186] In Melanomzellen ist das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin hochexprimiert. Über die $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung können diese Melanomzellen aus dem Blut in das umgebende Gewebe eindringen und Metastasen bilden.^[187] Auch bei der Hämatopoese^[188-190] und bei der Muskelentwicklung^[191] spielt die $\alpha 4$ -Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung eine große Rolle.

3.5.2 $\alpha 4\beta 7$ -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 Mucosa-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.^[192] Wie $\beta 7$ -*knockout* Mäuse zeigten, sind $\beta 7$ -Integrine für die Bildung und den Erhalt des mucosa lymphatischen Gewebes essentiell.^[193]

$\alpha 4\beta 7$ -Integrine binden spezifisch und mit hoher Affinität an MAdCAM-1. Die Affinität der $\alpha 4\beta 7$ -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.^[194, 195] Tabelle 3.1 zeigt die Rolle der $\alpha 4\beta 7$ -Integrine bei dem *homing* von Leukocyten. Naive Leukocyten (L-Selektin^{pos}, $\alpha 4\beta 7$ ^{lo-med}, LFA-1^{pos}) können zwar an die *high endothelial venules* (HEV) der Peyerschen Plaques (PP) (L-Selektin-Ligand^{lo}, MAdCAM-1^{hi}, ICAM-1^{pos}, ICAM-2^{pos}) adhären, nicht aber an *lamina propria* (Selektin-Ligand^{neg}, MAdCAM-1^{pos}). Ursache hierfür ist das Fehlen des Selektin-

Liganden auf *lamina propria*. Nur ein Zusammenspiel von Selektin und $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-/MAdCAM-1-Wechselwirkungen erlaubt ein Adhärenz der naiven Leukozyten 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.^[153] 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 Fibronectin und an die erste und vierte Ig-Domäne von 7D-VCAM-1.^[196-198] $\alpha 4\beta 7$ -Integrine können durch Mn^{2+} aktiviert werden.^[199]

3.6 Liganden für $\alpha 4$ -Integrine

3.6.1 Fibronectin

An Fibronectin (Fn) wurde erstmalig entdeckt, daß Integrine über die Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure an extrazelluläre Matrixproteine binden können.^[200, 201] Fibronectin besteht aus zwei ähnlichen Ketten, die in der Nähe des C-Terminus über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Abb. 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* (\square) 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.^[202, 203]

$\alpha 4\beta 1$ -Integrine können über diese *splice* Region IIICS in einer RGD-unabhängigen Weise an Fibronectin binden.^[126, 204] 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.^[205] Das Peptid CS1 weist die minimale Erkennungssequenz LDV auf.^[167, 168] 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-Fibronectin sehr stark konserviert.^[167] Um LDV-haltige Peptide binden zu können, müssen $\alpha 4\beta 1$ -Integrine zuvor mit Mn^{2+} -Ionen oder mit einem Antikörper

aktiviert werden.^[168, 183, 206] 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.^[196]

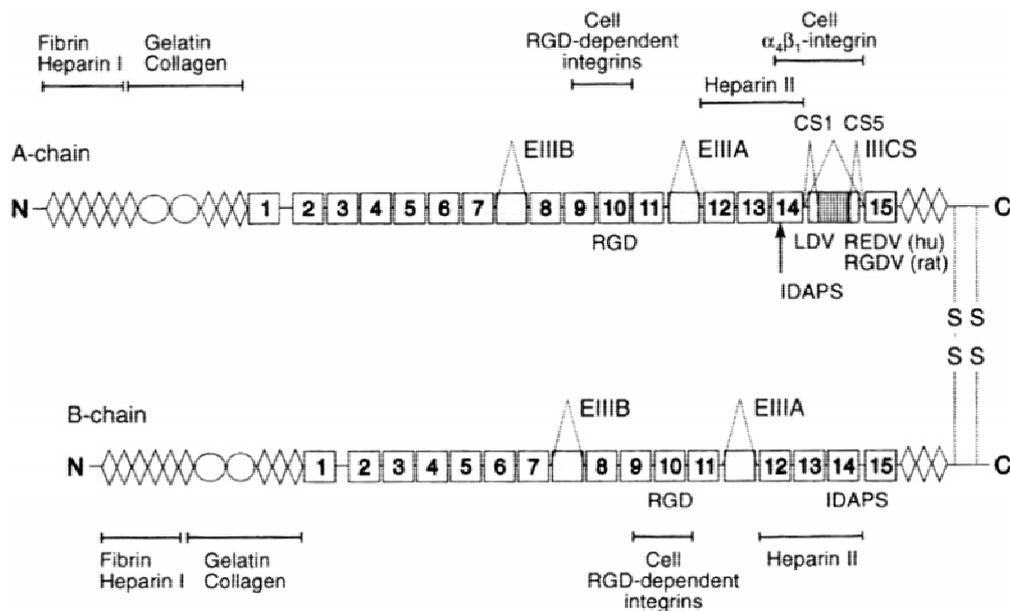


Abbildung 3.4: Domänenstruktur von Fibronektin mit Integrinbindungsstellen.^[201] Beiden Ketten sind aus jeweils drei verschiedenen Arten der repeat domains aufgebaut: Type I repeat domain ist als Raute (\diamond), type II repeat domain ist als Kreis (\circ) und type III repeat domain ist als Quadrat (\square) dargestellt. Type III repeat domains sind von 1 bis 15 durchnummeriert.

CS5, das aus humanem Fibronektin abgeleitet wurde, besitzt die minimale Erkennungssequenz REDV.^[170]

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.^[169]

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.^[170]

3.6.2 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ist ein Ligand für $\alpha_D\beta_2$,^[157] $\alpha_4\beta_1$ -^[165, 199] und $\alpha_4\beta_7$ -Integrine. VCAM-1 weist jedoch eine deutliche Präferenz für $\alpha_4\beta_1$ -Integrine auf. VCAM-1 gehört mit ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 und MAdCAM-1 in die integrinbindende Untergruppe der *immunoglobulin superfamily* (IgSF)-Rezeptoren (Abb. 3.5).^[164, 172] Die VCAM-Expression erstreckt sich über die peripheren Organe.

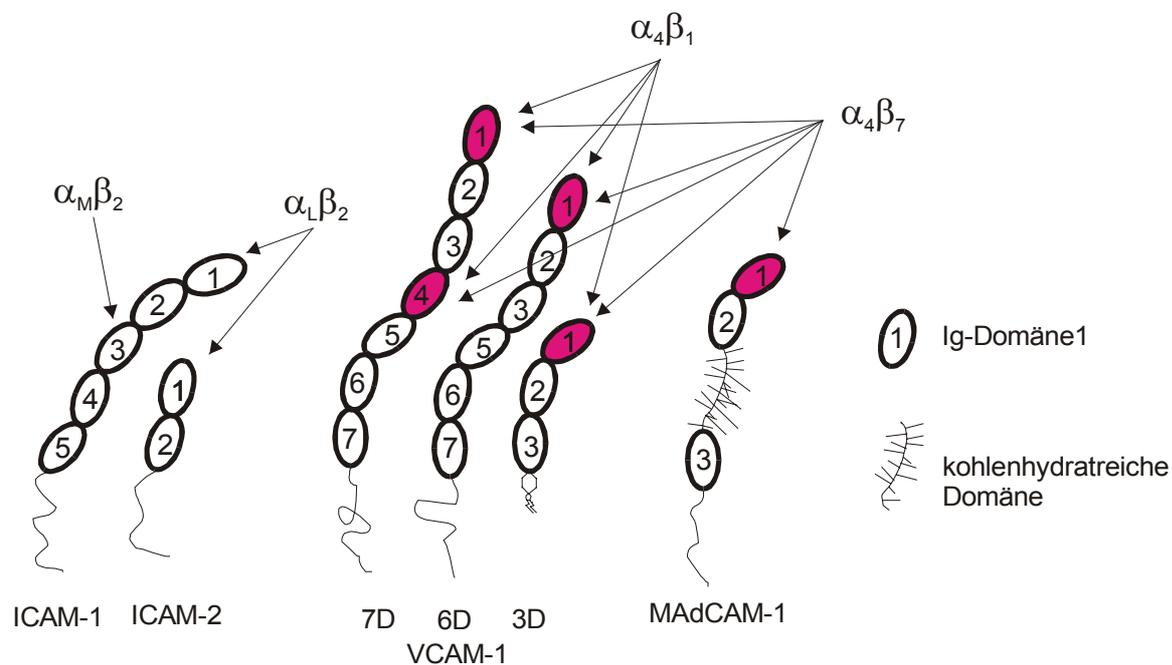


Abbildung 3.5: Domänenstruktur der IgSF-Adhäsionsrezeptoren. Domänen, die mit α_4 -Integrinen wechselwirken, sind dunkel hervorgehoben.

Die extrazelluläre Domäne von VCAM-1 besteht je nach *splice*-Variante aus 3 (3D-VCAM-1),^[207] 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 β -Strängen, die mit A bis G bezeichnet werden. Die β -Stränge ABE und CDFG bilden jeweils ein β -Faltblatt aus. Wie bei allen Immunoglobulinfaltungen sind die beiden β -Faltblätter über eine Disulfidbrücke zwischen den

β -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 β -Stränge C und D miteinander verknüpft, exponiert und gut zugänglich (Abb. 3.6).^[173, 174]

Sowohl $\alpha 4\beta 1$ -^[172, 208] 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.^[197, 198, 209, 210] 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.^[198] 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.^[127, 171] Punktmutationsstudien an rekombinantem VCAM-1 lieferten die QID₄₀SP-Sequenz in der Ig-Domäne D1 als Bindungssequenz für $\alpha 4\beta 1$ -Integrine und $\alpha 4\beta 7$ -Integrine.^[127, 171, 172, 211] Sie befindet sich in einem β -turn in dem exponierten CD-loop in der Domäne D1.^[173, 174] 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.^[174, 211] Vermutlich aus dem selben Grund, können cyclische RGD-Peptide im Gegensatz zu linearen RGD-Peptiden die $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-/VCAM-1-Wechselwirkung inhibieren.^[212]

Darüber hinaus dienen die Sequenzen G₆₆NEH im E-F-loop und K₇₉LEK am Anfang des β -Stranges G als Auxilliare für die $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/VCAM-1-Wechselwirkung.^[211, 213] Die Wechselwirkung mit den $\alpha 4$ -Integrinen ist abhängig von dem jeweiligen Aktivierungszustand des Rezeptors.

$\alpha 4\beta 1$ -Integrine binden über die QID₃₂₈SPL-Sequenz innerhalb des CD-loops an die vierte Ig-Domäne D4 von 7D-VCAM-1.^[172] Allerdings ist diese Sequenz im Gegensatz zur QID₄₀SP-Sequenz in der Ig-Domäne D1 in Mensch, Maus und Ratte nicht konserviert. In Maus und Ratte ist QID₃₂₈SPL durch TDSPL substituiert.^[211]

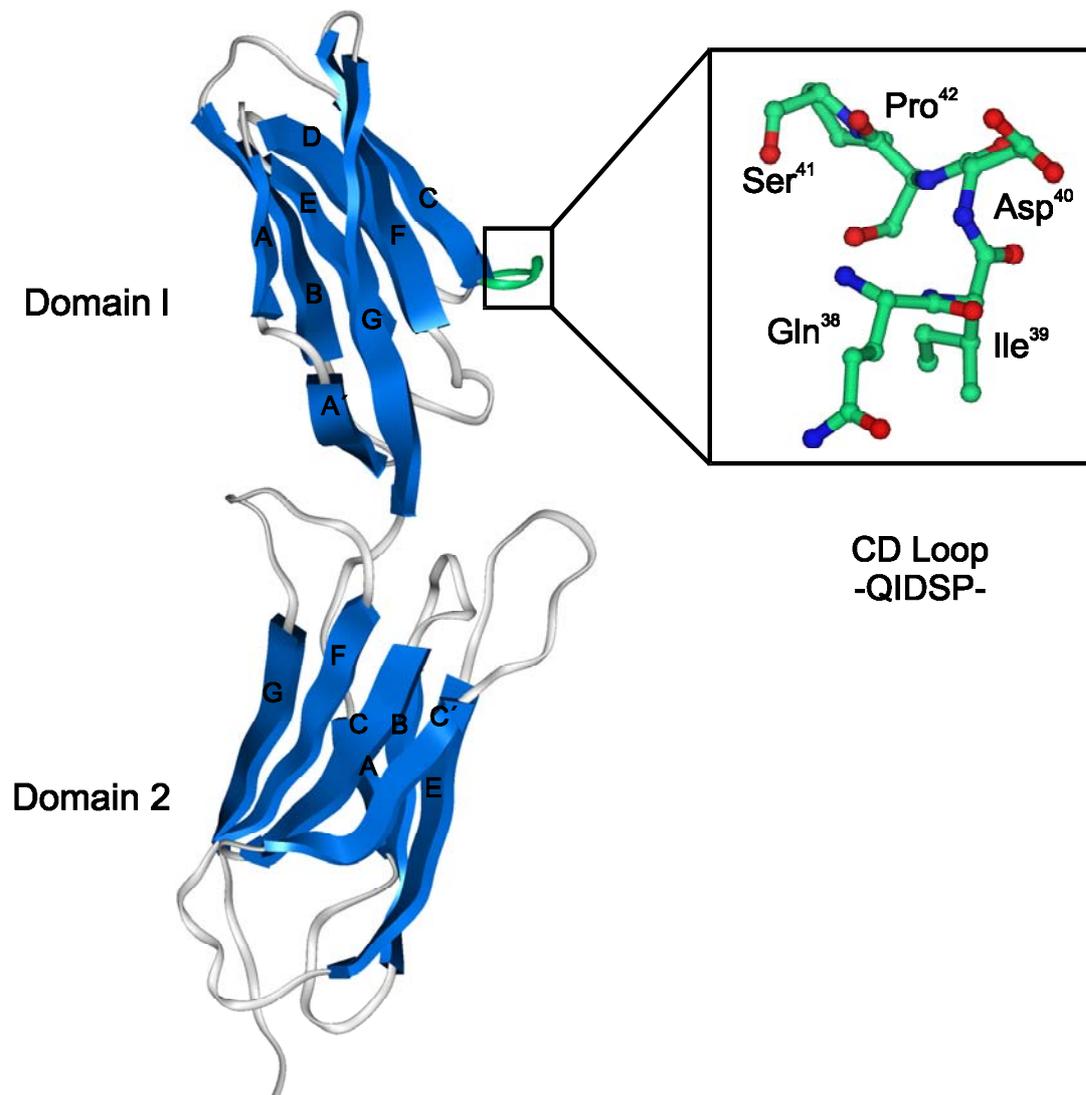


Abbildung 3.6: Röntgenstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM-1.^[173] Die QIDSP-Erkennungssequenz liegt innerhalb des CD-loops.

Alle drei Erkennungssequenzen liegen auf derselben 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.^[196]

Nach der Aktivierung durch Lipopolysaccharide exprimieren sowohl Endothelzellen von Blutgefäßen Entzündungs-Zytokine und VCAM-1.^[187, 214, 215]

3.6.3 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 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.^[216-220] Die Peyerschen Plaques sind Ansammlungen von Lymphocyten entlang des Dünndarms, hier vor allem im Bereich des Ileums.^[221]

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.^[151, 222] MAdCAM-1 besteht aus drei Ig-Domänen und einer Mucin-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.^[219] 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.^[218, 223]

Die $\alpha 4\beta 7$ -Integrin/MAdCAM-1-Wechselwirkung erfolgt über die LD₄₀T-Sequenz im C-D-loop.^[223, 224] Die LDT-Bindungssequenz ist in Abbildung 3.7 vergrößert dargestellt. Die Substitution von Leu innerhalb der LDT-Triade führt zu einem Verlust der Bindungsaktivität.^[195, 223]

Zwischen der zweiten und dritten Ig-Domäne ist eine Mucin-ähnliche Domäne insertiert. Sie ist durch O-glykosidisch verknüpfte und Sialylsäure tragende Kohlenhydrate modifiziert (Abb. 3.7). Die Unterschiede dieser Domäne zwischen murinem und human MAdCAM-1 sind sehr groß.^[222] Diese Mucin-ähnliche Domäne vermittelt L-Selectin-abhängige Wechselwirkungen zwischen Lymphocyten mit MAdCAM-1, was wiederum zu einem Kontakt zwischen Lymphocyten und Endothelzellen führt.^[225]

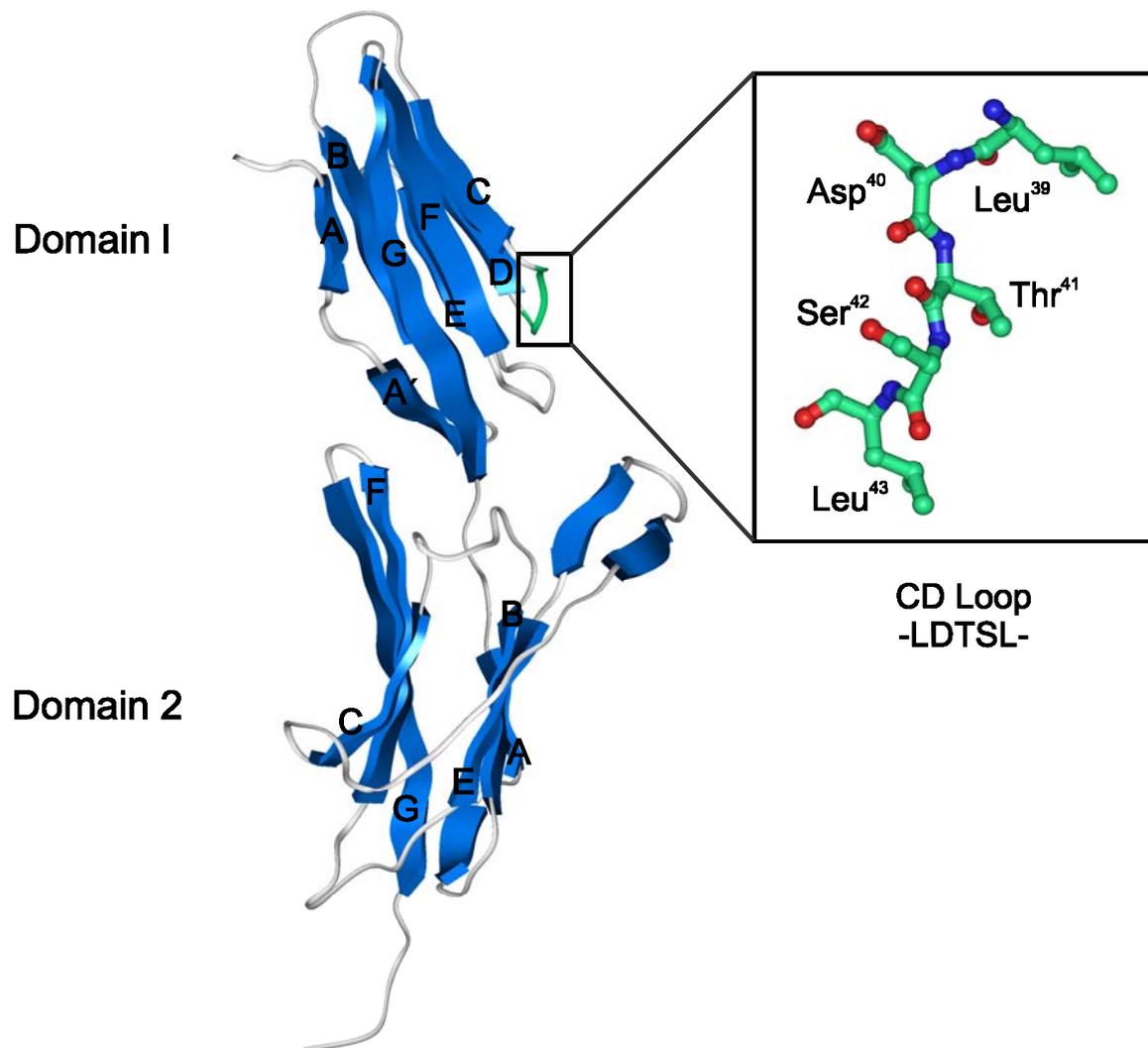


Abbildung 3.7: Röntgenstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von MAdCAM-1.^[226] Das LDT-Bindungsmotiv liegt innerhalb des CD-loops.

Sowohl die L-Selectin als auch die $\alpha 4$ -Integrin vermittelten Wechselwirkungen mit MAdCAM-1 bewirken eine Emigration der Leukocyten aus dem Blutstrom in das Gewebe, um während des *lymphocyte homing* an eine Entzündungsstelle zu gelangen.^[172] Bei der humanen IBD (*inflammatory bowel disease*) und in Mausmodellen der Colitis ist die Expression von MAdCAM-1 im Darm erhöht.^[227]

Es sollte erwähnt werden, dass die beschriebene Kristallstruktur zur Zeit wieder Gegenstand von Diskussionen ist, da eine neue unabhängige Struktur eine kleine, aber nicht unbedeutende Abweichung im CD-loop beschreibt, von dem angenommen wird, dass er eine Schlüsselrolle in der Integrinbindung einnimmt. Ferner wurde die Möglichkeit der MAdCAM-Dimerenbildung als mögliche Funktionsregulation beschrieben.^[228] Dies zeigt, dass es

problematisch ist, eine im Kristall konformativ eingefrorene Loop-Struktur als Ausgangspunkt für rationales Design für Liganden zu verwenden.

3.6.4 Osteopontin

Kürzlich wurde beschrieben, dass $\alpha 4$ -Integrine ebenfalls an das N-terminale Fragment, jedoch nicht das vollständige Protein, von Osteopontin (OPN) binden, welches nach enzymatischer Spaltung durch Thrombin entsteht. Dies könnte von Bedeutung sein, da sowohl Osteopontin als auch Thrombin in entzündeten Geweben nachgewiesen werden können. Das Osteopontinfragment (OPN 17-168) und die beiden Peptide ELVTDFPTDLPAT (OPN 131-142) und SVVYGLR (OPN 162-168) inhibieren unabhängig voneinander die Adhäsion von $\alpha 4$ -Integrin-exprimierenden Zellen.^[229] Es wird angenommen, dass OPN mitunter über die Wechselwirkung mit $\alpha \nu \beta 3$ - und $\alpha \nu \beta 5$ -Integrinen auf Osteoclasten mit verantwortlich für den Verlauf der Gelenkzerstörung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) ist.^[230-235] OPN ist ein ECM-Protein, welches die Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz repräsentiert und dessen Hochregulierung in aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Chondrozyten und Synoviozyten in Verbindung mit entzündlichen Erkrankungen gebracht wird.^[236-238] Das OPN ist unter anderem verantwortlich für Zelladhäsion, Chemotaxie und Immunregulierung über Wechselwirkungen mit $\alpha \nu \beta 3$ - und $\alpha \nu \beta 5$ -Integrinen.^[239] Die oben erwähnten proteolytischen OPN-Fragmente besitzen „kryptische“ Bindungsstellen für $\alpha 9 \beta 1$ - bzw. $\alpha 4 \beta 1$ -Integrine, welche auf Neutrophilen bzw. auf Monozyten und Lymphozyten exprimiert werden.^[240] Die neuerdings beschriebene OPN-Bindungsstelle SVVYGLR vermittelt die Adhäsion und Migration von Leukozyten RGD-unabhängig. Es wurde gezeigt, dass nicht nur Makrophagen und Lymphozyten, sondern auch Neutrophile an der Pathogenese der RA beteiligt sind.^[241, 242] Zudem wurden bei der RA in Gelenkflüssigkeit verminderte Konzentrationen an Koagulationsfaktoren einhergehend mit erhöhten Werten an Thrombinaktivität beobachtet, was eine Aktivierung der Koagulationskaskade widerspiegelt.^[243, 244] Darum ist es vorstellbar, dass die durch Thrombin gespaltene Form des OPN eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Arthritis einnimmt.

3.7 Pathologische Bedeutung von α 4-Integrinen

3.7.1 Übersicht: Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen umfassen ein breites Spektrum an Erkrankungen (Tab. 3.2).^[245, 246] Diese chronischen inflammatorischen Erkrankungen können in ihren Auswirkungen von relativ milden, lokalen Symptomen, wie z.B. bei der Psoriasis, bis zu schweren, lebensbedrohenden Organbeteiligungen, z.B. der Lungenfibrose bei Sklerodermie oder der Leberzirrhose bei der Hepatitis C reichen. Auf den ersten Blick ist es nicht offensichtlich, wie viele anscheinend verschiedenste Krankheiten miteinander verwandt sind, da sie praktisch jedes Organ in fast jedem System des Körpers befallen können. Einige sind akuter Natur, während andere chronisch sind und wiederum andere nur wenige Male im Laufe des Lebens auftreten. Autoimmunerkrankungen betreffen jede Altersschicht und geschätzte zehn Prozent der Bevölkerung in unterschiedlichem Ausmaß. Alle derartigen Erkrankungen besitzen ein gemeinsames Krankheitsprofil, dass durch eine ungeeignete Immunantwort auf den eigenen Körper gekennzeichnet ist. Dies führt schließlich zur Zerstörung des betroffenen Gewebes. Bei der Multiplen Sklerose z.B. wird die Nervenbahnen umgebende Markscheide im Gehirn und Rückenmark durch die körpereigene Abwehr angegriffen.^[247] Beim Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa ist die Magenschleimhaut im Darm und Dickdarm betroffen,^[248] während Rheumatoide Arthritis und Asthma durch ähnliche Angriffe auf Gelenkinnenhaut und Knorpel bzw. die Lunge gekennzeichnet sind.^[249, 250]

Die derzeitige Therapie von Autoimmunerkrankungen beruht auf Steroiden oder anderen immunsuppressiven Wirkstoffen, die bei chronischen Erkrankungen über einen längeren Behandlungszeitraum ineffektiv oder auch toxisch wirken können.^[248] Zudem verlangt das Fehlen von adäquaten Therapien bei Patienten mit schweren Krankheitsbildern invasive chirurgische Eingriffe, z.B. das Entfernen von Teilen des Darms von am Morbus Crohn leidenden Patienten.

Die Vielzahl der in diesem Zusammenhang zu sehenden Erkrankungen zeigt auf, dass Autoimmunerkrankungen ein bedeutendes medizinisches Problem darstellen. Auch wenn die exakten Ursachen für die meisten der genannten Krankheiten noch unklar sind, so wird doch allgemein akzeptiert, dass Leukozytenakkumulationen in den betroffenen Geweben und /oder Organen wesentlich zu der Pathogenese der Krankheit beitragen.^[94, 251] Es gilt als sicher, dass Integrine und ihre natürlichen Liganden eine entscheidene Rolle bei der Migration, Adhäsion, Proliferation und anschließender Akkumulation von Leukozyten besitzen, was schließlich zu chronischen Entzündungen führt.^[105] Deshalb stellen Integrinantagonisten, welche die

Adhäsion von Integrinen an ihre natürlichen Liganden inhibieren können, einen Ansatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar.^[251]

| Nervensystem | Magen Darm | Endocrines System |
|---|--|--|
| Multiple Sklerose Gravierende Muskelschwäche Neuropathie Uveitis | Morbus Crohn Hanot-Krankheit Hepatitis Colitis Ulcerosa | Diabetes mellitus Morbus Basedow Hashimoto-Thyreoiditis Oophoritis |
| Kreislaufsystem Hämolytische Anemie Perniziöse Anemie Thrombozytopenie Temporal Arteriitis Antiphospholipid-Syndrom Wegeners Granulomatosis Behcets Erkrankung | Bewegungsapparat Rheumatoide Arthritis Lupus erythematosus Sklerodermie Polymyositis Spondyloarthropathie Sjögren-Syndrom Bechterew Krankheit | Haut Psoriasis Dermatitis herpetiformis Pemphigus vulgaris Dermatomyositis Atemwege Asthma |

Tabelle 3.2: Autoimmunerkrankungen (geordnet nach betroffenem System).^[246]

Bei vielen Autoimmunkrankheiten kommt es als Antwort auf inflammatorische Reize zu einer abnormalen Akkumulierung von Entzündungszellen (T-Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten/Makrophagen, Neutrophile). Dies führt zusammen mit Aktivierung von 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,^[252] Cyclooxygenase 2 (COX2) Inhibitoren^[253] und *tumor necrosis factor* (TNF) *blockers*.^[254, 255] Weitere Therapieansätze stellen Zelladhäsionsmoleküle (Selektine und Integrine), abbauende Enzyme (Trypsin, Chymase, Matrixmetalloproteinasen) und Angiogenese-Inhibitoren dar.

3.7.2 $\alpha 4$ -Integrine in der Pathogenese

Den Adhäsionsmolekülen kommt bei entzündlichen Erkrankungen eine große Bedeutung zu.^[256] 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 nutzen Adhäsionsmoleküle, um sich im Körper auszubreiten.^[257]

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 resultieren sollte. Die Nachteile dieses Anti-Adhäsionstherapieansatzes liegen darin, daß Adhäsionsmoleküle häufig auf verschiedenen Zelltypen exprimiert sind und daß viele Zellen 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 $\alpha 4\beta 1$ -Integrinantagonisten bereits erfolgreich in einigen Tiermodellen eingesetzt werden. Ferner befinden sich einige $\alpha 4\beta 1$ -Integrinantagonisten in Klinischer Phase II (z.B. BIO-1211)^[258] oder Klinischer Phase I (z.B. TR-14035).^[259, 260]

Bei der humanen *inflammatory bowel disease* (IBD) und in Mausmodellen der Colitis ist die Expression von MAdCAM-1 im Darm erhöht.^[227] *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 Phänotypen eingeteilt werden: *colitis ulcerosa* (UC) und Crohn-Krankheit (CD, Enteritis regionalis). IBD betrifft meist den Dickdarm (UC und CD) und/oder das

terminale Ileum (CD). Im letzteren Fall kann die Entzündung entweder oberflächlich (UC) oder transmural (CD) auftreten.^[261] 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.^[262] 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.^[263, 264]

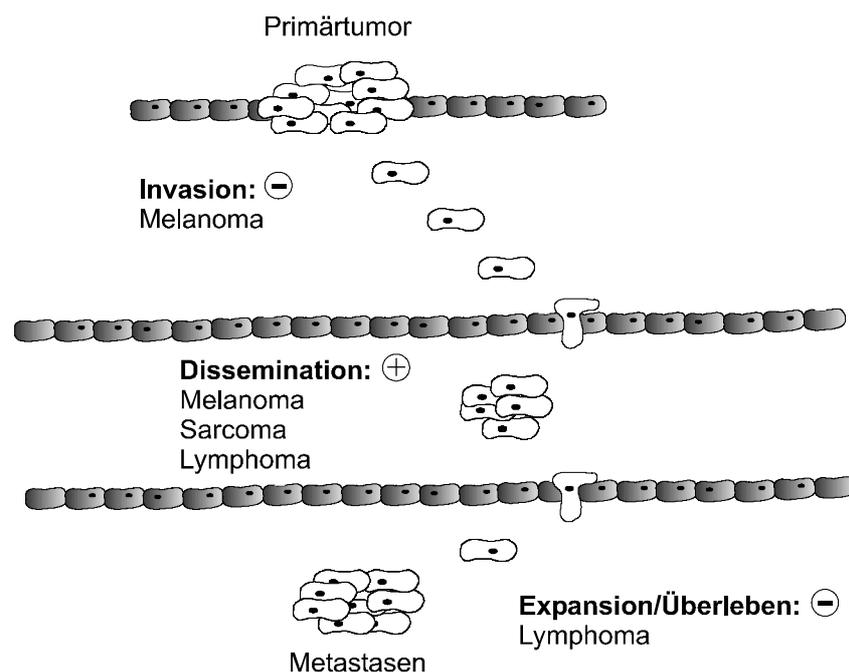


Abbildung 3.8: Effekte von $\alpha 4$ -Integrinen innerhalb der Metastasierungskaskade. Tumormodelle, bei denen diese Effekte beobachtet werden konnten, sind aufgelistet. Das Plus- bzw. Minuszeichen zeigt an, ob $\alpha 4$ -Integrine einen bestimmten Prozess fördern bzw. inhibieren.

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 $\alpha 4$ -Integrinen innerhalb der Metastasierungskaskade zusammengestellt.^[265]

$\alpha 4$ -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.^[266] Die wichtige Rolle der $\alpha 4\beta 7$ -Integrine bei der Dissemination von Tumorzellen wurde auch durch Untersuchungen mit *non-Hodgkin's* Lymphomen bestätigt.^[267] Die Ausbreitung von neuen Tumorkolonien in verschiedenen Organen kann durch $\alpha 4$ -Integrine entweder verstärkt oder inhibiert werden. Im Falle von murinen Lymphomazellen können $\alpha 4$ -Integrine das Wachstum der Tumorzellen entweder durch Apoptose oder durch Verminderung der Proliferationsrate inhibieren.

Kürzlich konnte in mikrochirurgischen Modellen der heterotopen Dünndarmtransplantation an der Maus gezeigt werden, dass die Inhibierung der $\beta 7$ -Untereinheit von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinen mit monoklonalen Antikörpern die Infiltration des Transplantates durch Empfänger-Lymphozyten vermindert und die Abstoßungsreaktion verzögert. $\beta 7$ -Integrine stellen somit einen möglichen Angriffspunkt für eine immunsuppressive Therapie nach klinischer Dünndarmtransplantation dar.^[268]

Monoklonale Antikörper gegen $\alpha 4$ -Integrine oder ihre natürlichen Liganden zeigten bislang einen positiven Effekt in Tiermodellen auf das Krankheitsgeschehen bei Asthma,^[269] rheumatoider Arthritis (RA) und inflammatory bowel disease (IBD).^[270] Zusätzlich zu ihrer Funktion im Entzündungsprozess, sind $\alpha 4$ -Integrine an der Stammzellenadhäsion an Knochenmarkbindegewebszellen^[271-273] beteiligt.

3.8 Synthetische $\alpha 4$ -Integrinantagonisten als Therapeutika

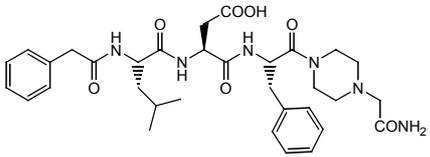
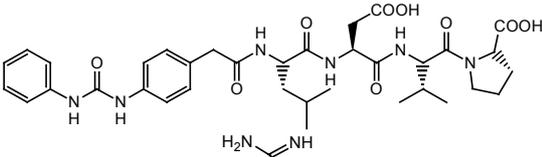
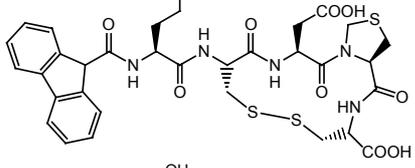
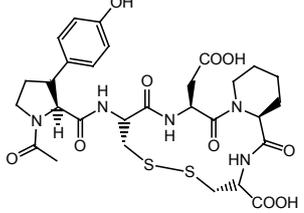
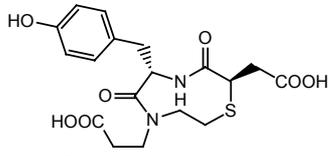
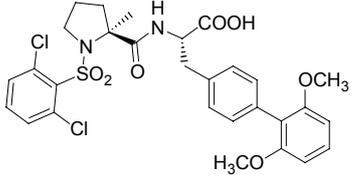
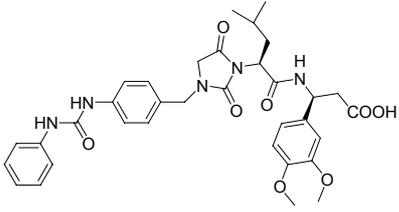
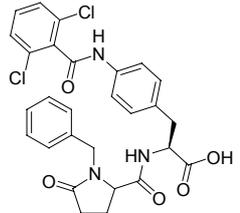
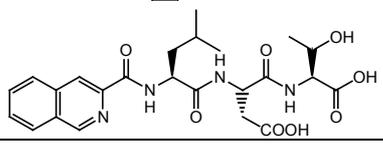
Bis heute nimmt die Zahl der in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen $\alpha 4$ -Integrinantagonisten kontinuierlich zu.^[246, 274] Der Großteil der chemischen Arbeiten auf diesem Gebiet findet sich in Patenten wieder. In Tabelle 3.3 sind einige $\alpha 4$ -Integrinantagonisten aus der Literatur 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 Fibronectin, VCAM-1 und einem anti- $\alpha 4$ Antikörper aus. Die meisten peptidischen VLA-4 Integrinantagonisten sind von CS-1 aus Fibronectin abgeleitet. 1992 berichtete Wayner *et al.*, daß das Pentapeptid EILDV an VLA-4 Integrine bindet.^[168] Bochner *et al.* konnte durch den Einbau eines Tyrosins in die Sequenz GPEYLDVP-NH₂ eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber dem natürlichen Liganden CS-1 beobachten.^[275] Basierend auf diesen Entdeckungen konnte Vanderslice *et al.* potente, cyclische VLA-4 Integrinantagonisten **I** entwickeln.^[276]

Derivate, der von Arrhenius *et al.* synthetisierten Verbindung **II**, konnten erfolgreich in einem Tiermodell gegen Asthma eingesetzt werden.^[277, 278] Der erste niedermolekulare VLA-4 Antagonist (**III**), der in die klinische Phase eingebracht wurde, stammt von Lin *et al.*^[279]

Tabelle 3.3: Auswahl von $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ Integrinantagonisten.

| Nr. | Struktur | Rezeptor | IC ₅₀ | Lit. |
|------|---|--|------------------|-------|
| I | c(*C-Y-L-D-V-C*) | $\alpha 4\beta 1$ | 50 nM | [276] |
| II |  | $\alpha 4\beta 1$ | 60 nM | [278] |
| III |  | $\alpha 4\beta 1$ | 1 nM | [279] |
| IV |  | $\alpha 4\beta 1$ $\alpha 5\beta 1$ | 90 nM | [280] |
| V |  | $\alpha 4\beta 1$ | 1 nM | [281] |
| VI |  | $\alpha 4\beta 1$ | 3000 nM | [282] |
| VII |  | $\alpha 4\beta 1$ | 0.08 nM | [283] |
| VIII |  | $\alpha 4\beta 1$ | 1.6 nM | [284] |
| IX |  | $\alpha 4\beta 1$ | 0.37 nM | [285] |
| X |  | $\alpha 4\beta 7$ | 3100 nM | [299] |

Ausgehend von einem bekannten α IIb β 3-Integrinantagonist entwickelte Nowlin *et al.* einen VLA-4 Antagonisten (IV).^[280] Weitere Optimierungsarbeit führte schließlich zu einen nanomolar aktiven VLA-4-Antagonisten (V).^[281]

Auch beim *screening* von Bibliotheken ergaben sich VLA-4 Antagonisten. Saouers *et al.* konnte aus einer Bibliothek, die auf einem cyclischen β -turn scaffold basierte, einen im mikromolaren Bereich aktiven Antagonisten (VI) finden.^[282]

Die aktuelle Forschung befasst sich mit der Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften von N-sulfonierten Dipeptiden (VII)^[283] und der Weiterentwicklung von Hydanthoin-Gerüsten (VIII)^[284] die sich als vielversprechende Substanzklassen für VLA-4 Antagonisten erwiesen haben.

Tilley *et al.* synthetisierten potente N-Benzylpyroglutamyl-L-phenylalanin-Derivate (IX), welche den von vielen Gruppen beschriebenen Phenylalanin-Baustein enthalten.^[285]

Bei der Entwicklung von α 4-Integrinantagonisten ist die Verwandtschaft zu den α D β 2- und α 9 β 1-Integrinen zu berücksichtigen. So sind in der Patentliteratur α 4 β 1-Integrinantagonisten beschrieben, die ebenfalls α 9 β 1-Integrine blockieren.^[286]

Ferner sollte erwähnt werden, daß sich derzeit zwei monoklonale Antikörper in klinischen Studien für die Behandlung von IBD befinden. Die Firma Millenium (früher Leukocyte) entwickelt den α 4 β 7 spezifischen Antikörper LPD-02, welcher sich in der klinischen Phase II befindet, während Elan Pharmaceuticals den humanisierten α 4 Antikörper Natalizumab (Antegren®) bisher erfolgreich in Phase III Studien geführt hat.^[287, 288]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine anti- α 4 Integrin Therapie theoretisch die in Bezug auf entzündliche Erkrankungen des Darmes selektivste Methode darstellen sollte. Von besonderem Interesse wird es sein, ob die Antiadhäsionsmolekültherapie sich effektiv in Patienten zeigen wird, welche nicht auf TNF-Antikörper ansprechen. Außerdem sollten über Kombinationsansätze von α 4-Antagonisten und Anti-TNF Strategien bzw. Immunsuppressiva evaluiert werden. Ein bedeutungsvolles Target für die zukünftige Forschung in Bezug auf Antiadhäsionsmolekültherapie stellen die Chemokine und ihre Rezeptoren dar. Der Chemokinrezeptor CCR9 scheint selektiv auf die Migration von T Zellen in den Darm zu wirken und könnte somit ein paralleler Ansatzpunkt in der Wirkstoffentwicklung werden.^[289]

Die molekulare Grundlage für die $\alpha 4\beta 7$ -Spezifität ist unbekannt, wenn auch eine Studie vor Kurzem demonstrierte, dass die Fusion der zweiten Domäne von MAdCAM mit der ersten Domäne von VCAM zu einem Hybridprotein führte, welches selektiv an $\alpha 4\beta 7$ gebunden wurde. Dieses würde nahe legen, dass die Spezifität größtenteils durch die Domäne II determiniert wird.^[223, 226]

4 Entwicklung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Entwicklung niedermolekularer, nichtpeptidischer $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten. Die Entwicklung von Bibliotheken, welche das Leitmotiv in verschiedener Weise variieren und zum Teil lediglich auf seine prinzipielle schematische Struktur reduzieren, ist im Folgenden dargestellt. Ein Hauptaugenmerk wurde auf die Reduzierung von im Molekül enthaltenen Amidbindungen gelegt, indem u.a. die in unserem Arbeitskreis erprobte Substitution von Amidbindungen durch planare aromatische Systeme durchgeführt worden ist.

4.1 Einführung

4.1.1 Vorarbeiten

Am Beispiel von $\alpha 4\beta 1$ -^[290, 291] $\alpha II\beta 3$ - und $\alpha v\beta 3$ -Integrinantagonisten^[79, 292] konnte bereits eindrucksvoll gezeigt werden, wie von peptidischen Leitstrukturen, die den natürlichen Liganden nachahmen, niedermolekulare nichtpeptidische Antagonisten entwickelt werden konnten.

Die Verwendung von cyclischen Peptiden ist ein allgemein anwendbares Verfahren zur Aufklärung von bioaktiven Konformationen und zur Generierung von Leitverbindungen. 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 auch zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität führen, wenn es gelingt, die bioaktive Konformation zu fixieren (Abb. 4.1).^[20] Weitere Vorteile der Cyclisierung sind u.a. die Erhöhung der Protease-Stabilität und gegebenenfalls die Zunahme der Selektivität für einen bestimmten Rezeptor-Subtyp.

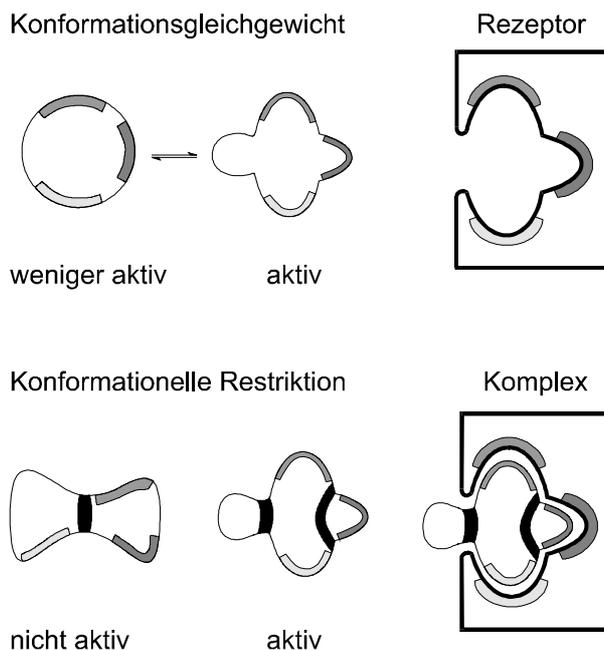


Abbildung 4.1: Flexible Moleküle können in Lösung unterschiedliche Konformationen einnehmen. Durch Restriktionen z.B. Cyclisierung kann die aktive Konformation fixiert werden.

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 oder verhindert wird, dass die bioaktive Konformation überhaupt eingenommen wird.

Mittlerweile sind die Strukturen von cyclischen Peptiden in unserem wie auch in anderen Arbeitskreisen ausgiebig untersucht worden, so daß einige Strukturvorhersagen möglich sind.^[293, 294] In homodeten, cyclischen Peptiden bestimmt die Konfiguration der einzelnen Aminosäuren die Konformation. D-Aminosäuren im Allgemeinen, sowie D-Prolin im Besonderen bevorzugen die $i+1$ Position einer $\beta II'$ - bzw. einer βI -Schleife (Abb. 4.2).^[20]

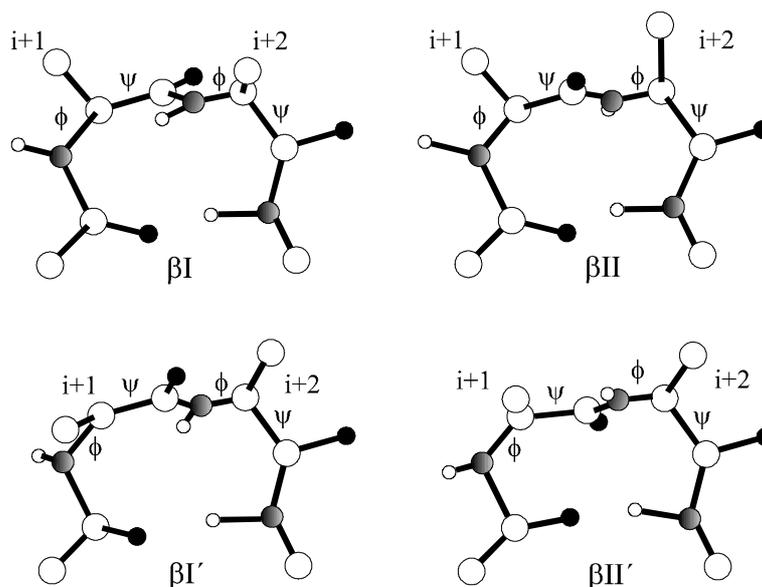


Abbildung 4.2: Verschiedene Schleifentypen in Cyclopeptiden.

Wir konzentrierten unser Design auf cyclische Penta- und Hexapeptide. In homodeten Cyclopeptiden ist die Rückgradkonformation stark abhängig von der Konfiguration der Aminosäureseitenketten. Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen der Seitenketten mit dem Peptidrückgrad sind weniger bedeutend.^[292, 295] Die Kenntnis dieses konformationellen Verhaltens in Abhängigkeit von der Konfiguration der Aminosäuren kann für ein templatgestütztes Wirkstoffdesign benutzt werden. Deshalb untersuchten wir intensiv die Lösungsstrukturen von cyclischen Penta- und Hexapeptiden, welche D- und L-Alanin, bzw. D- und L-Prolin als strukturinduzierende Aminosäuren enthalten.^[293, 294]

Für das *spatial screening*^[292, 296] der pharmkophoren LDT-Aminosäuresequenz wurden Bibliotheken von cyclischen Penta- und Hexapeptiden synthetisiert, welche D-Prolin als strukturinduzierende Aminosäure enthielten.^[297] Von diesen zeigte das Peptid cyclo(L-D-T-A-p-A) eine starke inhibierende Wirkung auf die Adhäsion von $\alpha 4\beta 7$ exprimierenden Zellen an MAdCAM-1 (Tab. 4.1). In Anlehnung an unsere Modelle werden in cyclischen Hexapeptiden zwei gegenüberliegende β -turns in Gegenwart des D-Prolins induziert: ein $\beta II'$ -turn in dem die D-Aminosäure die $i+1$ Position einnimmt und einen gegenüberliegenden β -turn der im Gleichgewicht einen βI - bzw. βII -Typ repräsentiert (Abb. 4.2).

| Verbindung | Adhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 |
|------------------|--|
| c(L-D-T-A-p-A) | 7 |
| c(L-D-T-A-p-F) | 7 +/- 3 |
| c(L-D-T-D-p-F) | 3 +/- 4 |
| c(L-D-T-D-p-Tic) | 9 +/- 1 |

Tabelle 4.1: Effekt von cyclischen Peptiden auf die $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 –Adhäsion.

Die anschließende Optimierung dieses Cyclopeptids führte zu weiteren aktiven Vertretern (Tabelle 4.1) und ermöglichte die Abschätzung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (Abb. 4.3).

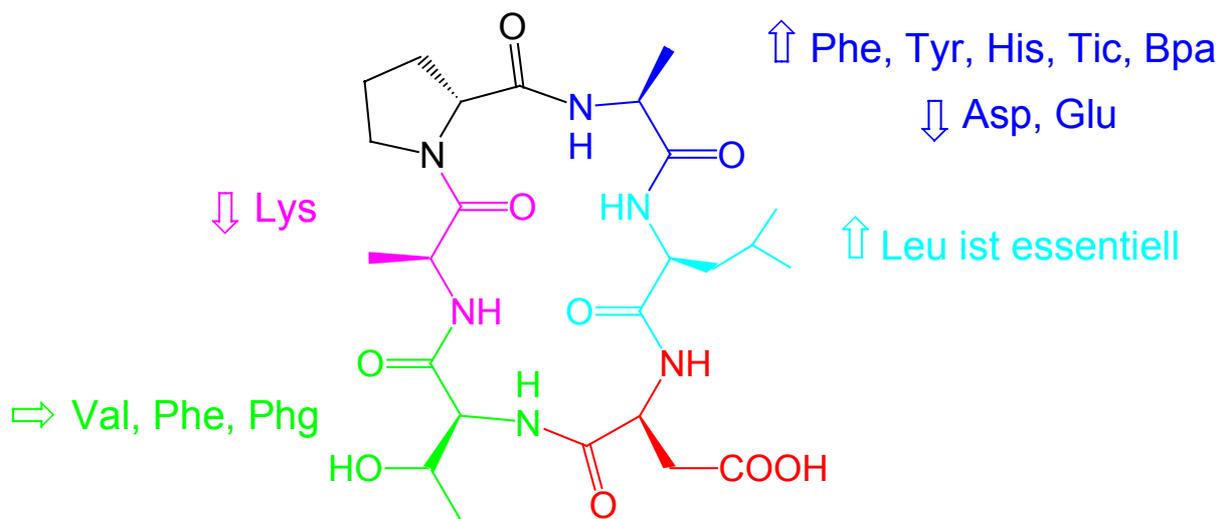


Abbildung 4.3: Abgeleitete Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aus Bibliotheken von cyclischen Hexapeptiden im Rahmen der Optimierung des Peptids c(L-D-T-A-p-A).^[297]

Anhand der Analyse von in unserem Arbeitskreis synthetisierten Cyclopeptide konnten wir durch NMR-Spektroskopie Strukturinformationen gewinnen, die Auskunft über die räumliche Orientierung der pharmakophoren Gruppen der Erkennungssequenz LDT gaben (Abb. 4.4).^[297]

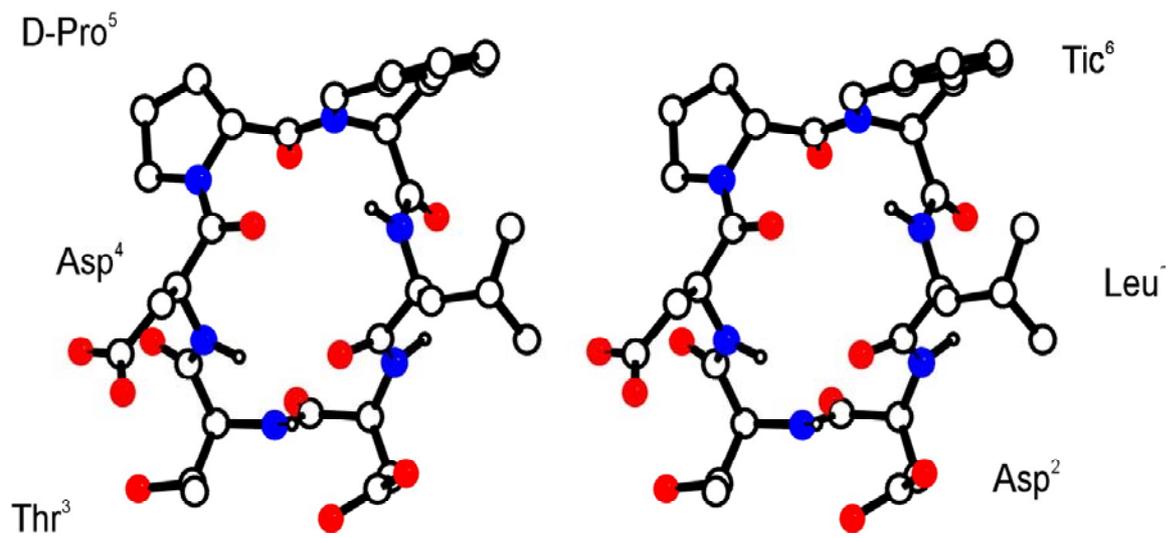


Abbildung 4.4: Struktur des Cyclopeptids *c(L-D-T-D-p-Tic)* in DMSO.

Ausgehend von diesen Ergebnissen waren wir in der Lage, das Erkennungsmotiv auf ein Mannosegerüst zu übertragen (Abb. 4.5)^[25, 298] bzw. das rationale Design von Peptidomimetika unter weiterer Reduktion des peptidischen Charakters zu einer neuen Leitstruktur zu führen (Abb. 4.6).^[9, 299]

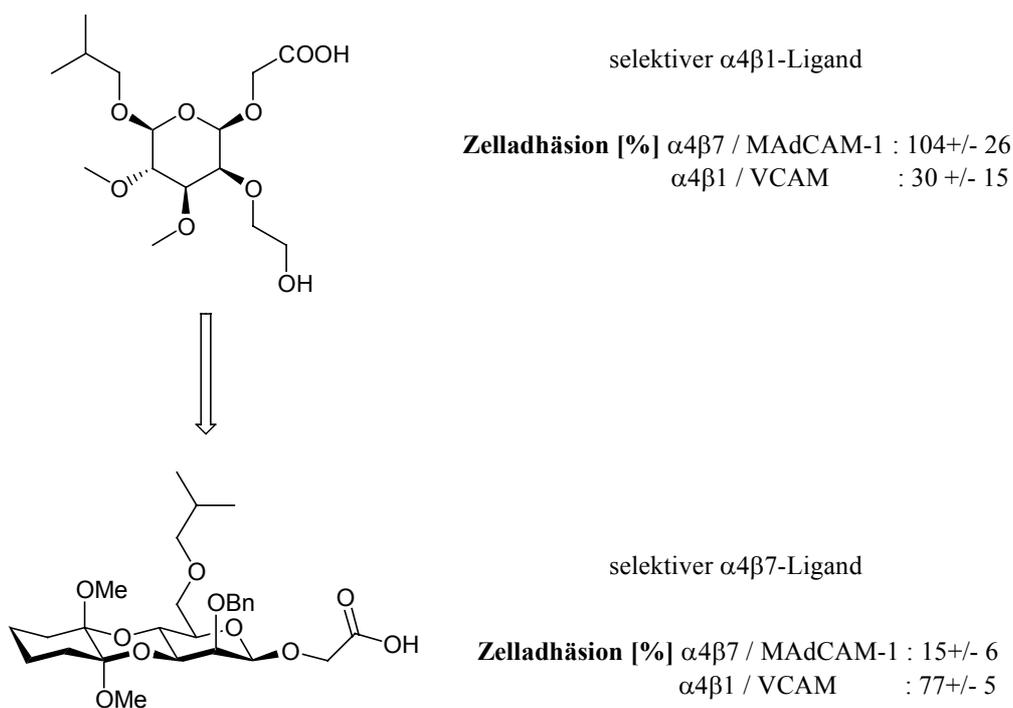


Abbildung 4.5: Übertragung der pharmakophoren Gruppen eines Cyclopeptids auf ein Zuckergerüst.

Ausgehend von dieser Leitstruktur wurde eine weitere Optimierung in Bezug auf Aktivität, Selektivität und pharmakologisches Profil angestrebt. Vorher soll auf die Charakteristika der bisherigen Leitstruktur eingegangen werden (Abb. 4.6).

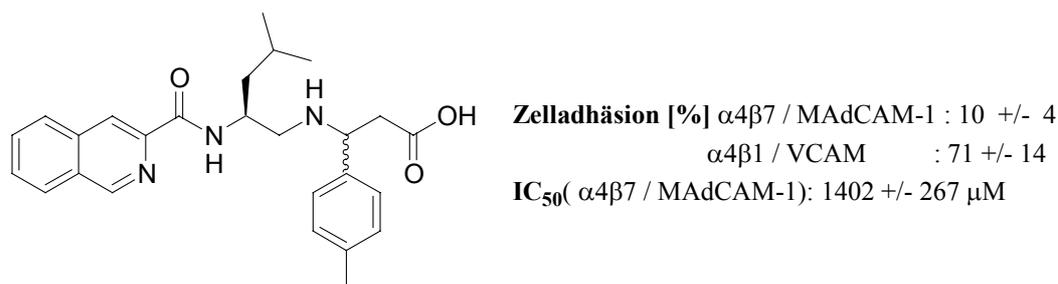


Abbildung 4.6: Leitstruktur für weitere Entwicklung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinliganden.^[299]

- Die Verbindung fällt bei der Synthese als Diastereomerenpaar an; das eine Diastereomer wird als potenter Inhibitor der $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-Wechselwirkung mit Selektivität gegenüber der $\alpha 4\beta 1$ / VCAM beschrieben, während das andere Diastereomer gleichermaßen aktiv beide Wechselwirkungen inhibiert.
- Die Amidbindung zwischen Leucin und der verwendeten 3-Amino-3-arylpropionsäure konnte ohne Aktivitätsverlust durch die reduzierte Amidbindung ersetzt werden.
- Der IC₅₀ wurde durch Titration mit 1402 +/- 267 μ M beschrieben.
- Die sog. Pfizer-Regeln sind erfüllt.^[30]
- Das Substitutionsmuster des Aromaten der 3-Amino-3-arylpropionsäure besitzt nur einen marginalen Einfluß auf die Aktivität.
- Die *N*-terminale Acylierung mit der 3-Isochinolin-carbonsäure geht auf die *Shroff et al.* zurück, welche demonstrierte, dass dieser besondere annelierte Heterocyclus nicht obligatorisch ist, sondern lediglich eine aromatische Substitution sich als wichtig erweist.^[300]
- Die Relevanz der *N*-terminalen Amidgruppe ist nicht bekannt und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

4.1.2 Prinzipien des Ansatzes der Entwicklung von Peptidmimetika als $\alpha 4\beta 7$ -Integrinliganden

Peptide sind im menschlichen Organismus als Enzymsubstrate oder als Botenstoffe für zahlreiche biologische Funktionen verantwortlich. Dementsprechend sind Peptide auch für die Therapie interessant und in der Tat sind einige wichtige Arzneimittel Peptide (z.B. Insulin,

Oxytocin oder Cyclosporin). Der Einsatz von Peptiden als Medikamente wird allerdings durch einige Faktoren wesentlich beschränkt.

- Peptide werden nach oraler Gabe meist schlecht resorbiert, im Wesentlichen bedingt durch das hohe Molekulargewicht und die hohe Polarität.
- Peptide werden durch Proteasen im Magen-Darm-Trakt und im Serum leicht gespalten und sind daher metabolisch wenig stabil.
- Der Körper ist in der Lage, Peptide über die Leber und die Nieren sehr schnell wieder auszuscheiden.

Es besteht daher ein großes Interesse daran, Wirkstoffe ohne die oben genannten negativen Eigenschaften zu finden, die aber trotzdem am gleichen Rezeptor wie das Peptid binden, bzw. das Enzym blockieren, das sonst ein peptidisches Substrat umsetzt. Ein Peptidmimetikum muss also folgende Eigenschaften aufweisen:

- wenige bzw. nicht spaltbare Amidbindungen zur Erhöhung der metabolischen Stabilität,
- geringes Molekulargewicht zur Erhöhung der oralen Verfügbarkeit,
- die gleiche räumliche Anordnung der für die Rezeptor- bzw. Enzymbindung verantwortlichen Gruppen wie im Peptid, um eine feste Bindung zu gewährleisten.

Diese Grundsätze bilden das Leitmotiv für die folgenden Ansätze der Optimierung der durch die minimale Erkennungssequenz (LDT) und die in unserem Arbeitskreis durchgeführten Vorarbeiten vorgegebenen Leitstruktur, die in Abbildung 4.7 definiert werden soll.

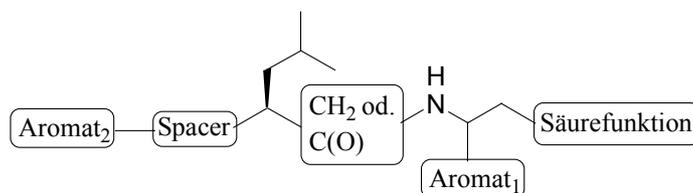


Abbildung 4.7: Schematische Leitstruktur von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten.

Da bei der Synthese von Peptidsurrogaten, insbesondere wenn nicht auf die natürlichen Aminosäuren zurückgegriffen werden kann, eine racemische Synthese von Bausteinen sich als ökonomischer erweist, werden die folgenden Synthesen in der Regel auf diese Art durchgeführt. Hierbei entstehen beide Stereoisomere in gleichen Mengen und werden als Gemisch biologisch getestet. Sollte das Gemisch aktiv sein, werden dann die Isomeren separat untersucht. Diese Vorgehensweise ist effektiver, als viel Zeit und Kosten mit enantio- bzw. diastereoselektiven Synthesen zu verlieren.^[301]

Besitzt die Prüfung der biologischen Wirksamkeit im verwendeten Assay nicht unbedingt die Notwendigkeit der Verwendung von enantiomerenreinen Verbindungen, so sei doch auf die eventuelle Bedenklichkeit der pharmakologischen Wirkung von racemischen Substanzgemischen im menschlichen Körper hingewiesen, wie z.B. im schwerwiegendsten bekannten Fall des Thalidomids. Enantiomere unterscheiden sich nämlich nicht nur in der Wirkstärke, sondern auch in ihren Wirkqualitäten. Diese Unterschiede können sich als unerwünschte Nebenwirkungen eines Antipoden manifestieren.

4.2 Modifikation der N-terminalen Amidbindung durch Ketomethylen-Isostere

4.2.1 Einführung

Der Ersatz einer Amidbindung im Rückgrad von biologisch aktiven Peptiden ist eine sehr effektive Methode, peptidmimetische Wirkstoffe mit günstigen pharmakologischen Eigenschaften darzustellen (um damit größere metabolische Stabilität oder verbesserte orale Verfügbarkeit zu erreichen). Dazu ist bekannt, dass der isostere Ersatz einer Amidbindung durch eine nicht-hydrolysierbare Ketomethylen-Bindung häufig peptidmimetische Substanzen hervorbringt, welche Inhibierungseigenschaften wie die ursprünglichen Moleküle aufweisen.^[302-304]

Unter Ketomethylen-Pseudopeptiden versteht man entweder den Einbau einer Methylen-Einheit in die Amidbindung (**A**) oder den Ersatz einer $-NH$ -Gruppe durch die Methylen-Gruppe (**B**) (Abb. 4.8). Ein möglicherweise wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Klassen von Peptidomimetika ist, dass Aminoketone (**A**) die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen über die $-NH$ - Gruppe behalten.

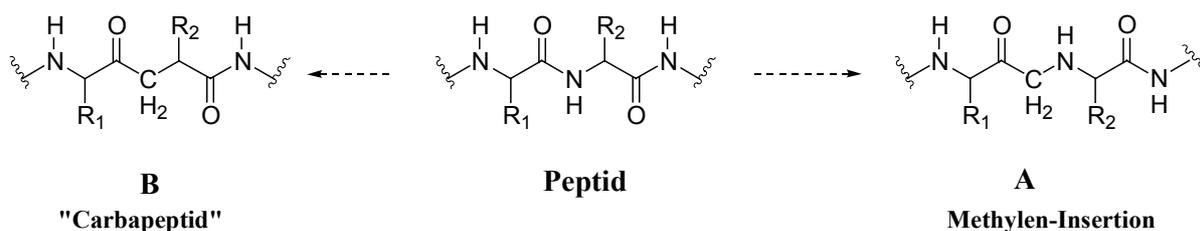


Abbildung 4.8: *Verschiedene Ketomethylen-Pseudopeptide im Vergleich zur Peptidbindung.*

4.2.2 Synthese und biologische Evaluierung von Ketomethylensurrogaten

Die Synthese von Ketomethylen-Analoga der *N*-terminalen Amidbindung der auf ein *N*-acyliertes Dipeptid reduzierten Leitstruktur fand ihren Ausgang in der Alkylierung von kommerziell erhältlichem Malonsäurediethylester unter Standardbedingungen.^[305] Der so

erhaltene Isobutylmalonsäurediethylester wurde anschließend in DMF mittels Natriumhydrid deprotoniert und mit ω -Brom-acetonaphthon (α - bzw β - Derivat) alkyliert (Abb. 4.9). Die Alkylierungsprodukte wurden nach wässriger Aufarbeitung ohne weitere Reinigung alkalisch verseift und anschließend zum gewünschten Reaktionsprodukt decarboxyliert.

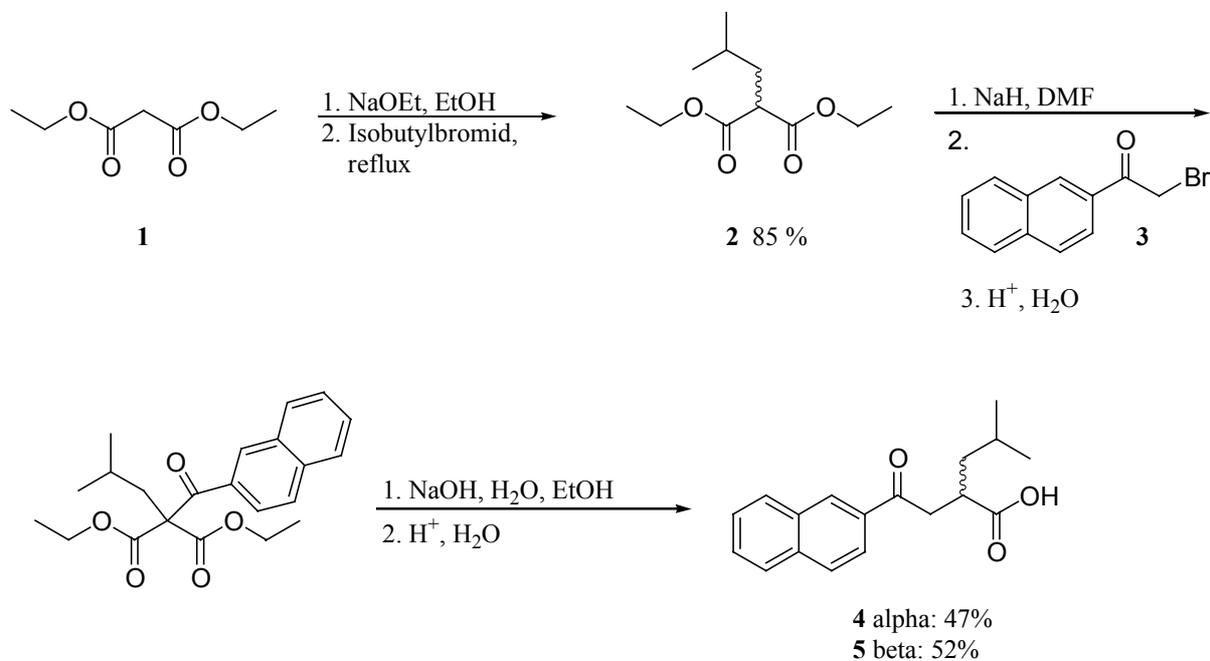


Abbildung 4.9: Synthese der Bausteine für N-terminale Ketomethylenanaloga über Malonestersynthese.

Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse der biologischen Evaluierung der Ketomethylenanaloga zusammen. Die β -Substitution des Naphthylrestes ist gegenüber dem α -Substitutionsmuster bevorzugt.

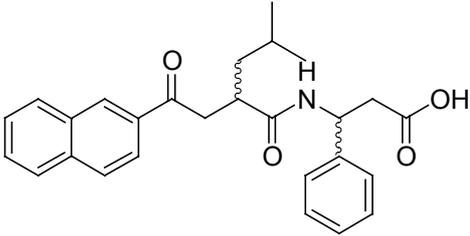
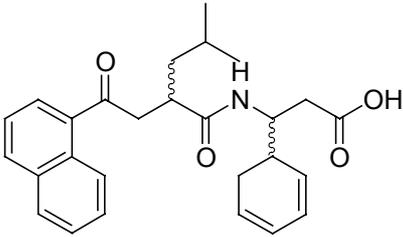
| Verbindung | Struktur | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 |
|------------|--|--|
| 6a |  | a) 20 ± 10^a |
| 6b | | b) 49 ± 12 |
| 7a |  | a) n.d. |
| 7b | | b) 54 ± 16 |

Tabelle 4.2: Biologische Evaluierung der Ketomethylensurrogate in Zelladhäsionsassays;

^{a)} Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM: 14 ± 0 .

4.2.3 Enantioselektive Synthese von 3-Amino-3-phenyl-propionsäuren

Eine enantioselektive Synthese der C-terminalen β -Aminosäure wurde aus dem Grunde wünschenswert, da die 3-Amino-3-aryl-propionsäuren bei den bisherigen Darstellungen der teils hochaktiven $\alpha 4$ -Integrinantagonisten stets in ihrer kommerziell erhältlichen racemischen bzw. der über die nicht-stereoselektive Radionov-Reaktion^[306] zugänglichen Form eingesetzt wurden (Abb. 4.10) und somit keine Aussage über die biologisch aktive Konstitution am C-3-Atom möglich war. Die Einführung eines zweiten Stereozentrums am C(α) des Leucins bzw. Leucin-nachahmender Bausteine führt jeweils zur Bildung von Diastereomeren, welche mittels präparativer HPLC nur bedingt trennbar sind. Informationen über die jeweils aktive Konfiguration der C-terminalen Aryl-Gruppe wären sehr aufschlussreich für das Verständnis der geometrischen Beschaffenheit des Rezeptors.

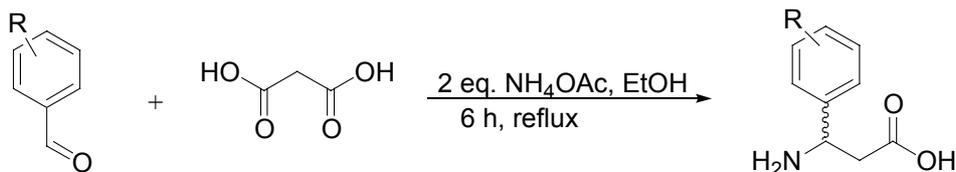


Abbildung 4.10: Radonow-Reaktion zur Synthese von β -Amino- β -aryl-propionsäuren.

In der Tat ist die Frage nach der aktiven Konfiguration am asymmetrischen Kohlenstoffatom der β -Aminosäure wichtig, da dieselbe Baueinheit auch für die in diesem Arbeitskreis synthetisierten $\alpha\beta 3$ -Integrinantagonisten verwendet wird und biologische Assays in beiden Fällen mit racemischen Mischungen durchgeführt werden, was in Bezug auf das „one compound“-Konzept bei der Zulassung von Wirkstoffen bedenkenswert ist.

Die Leitstrukturoptimierung nahm ihren Anfang in der Darstellung verschiedener *N*-acylierter Tripeptide, die sich von der minimalen Erkennungssequenz (LDT) des MAdCAM-1 ableiteten (Abb. 4.11).

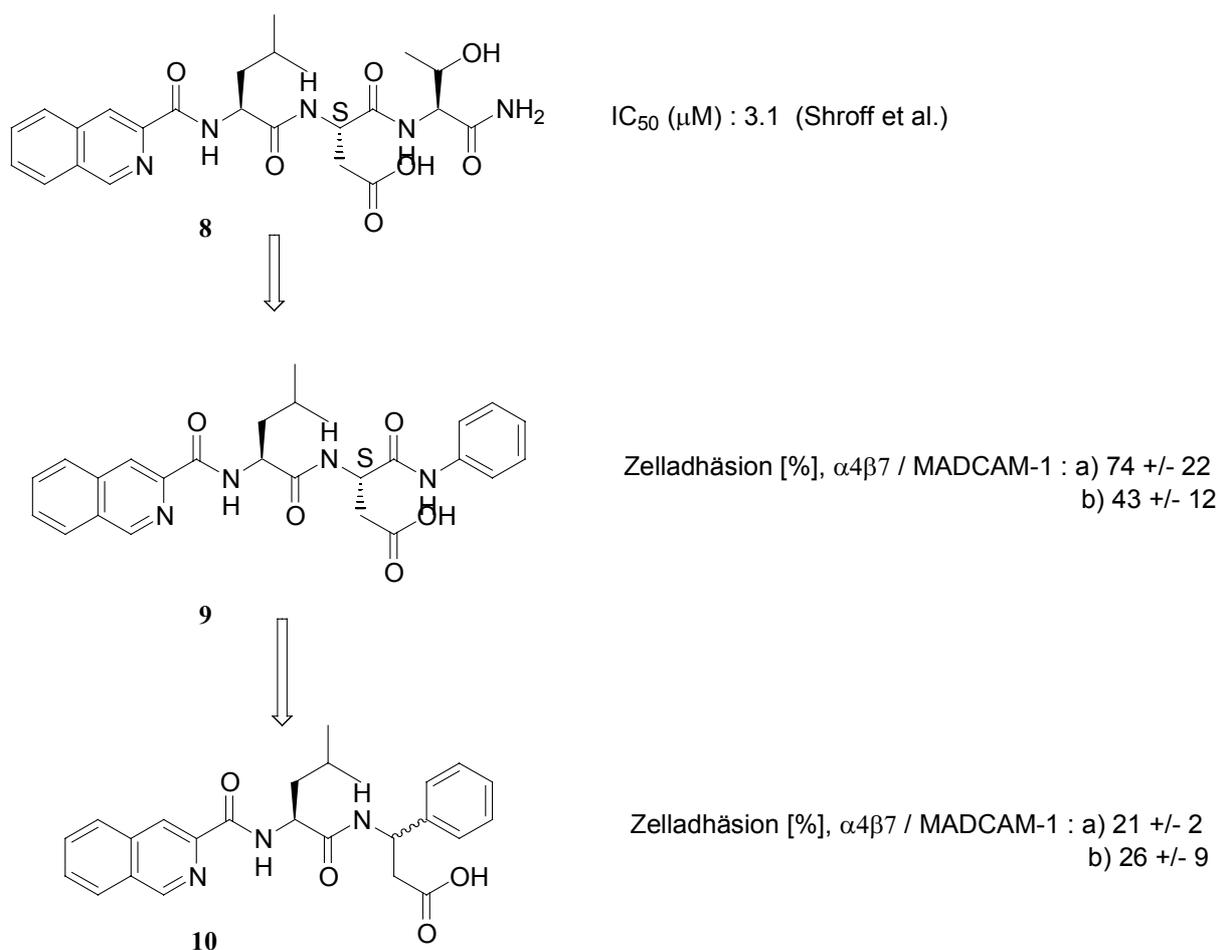


Abbildung 4.11: Rationale C-terminale Modifikation von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten.

In Folge der schrittweisen Modifikation des C-Terminus mit aromatischen Gruppen wurde schließlich das L-Threonin vollständig ersetzt und die Position der verbrückenden Amidbindung zwischen Asparaginsäure und Threonin von aromatischen Seitenketten eingenommen. Somit wäre die Schlussfolgerung naheliegend, dass die biologisch aktive Konfiguration am C-3-Kohlenstoffatom derjenigen am natürlichen Liganden MAdCAM-1 folgt und dementsprechend *S*-Konfiguration aufweisen sollte. Diese Annahme sollte sich natürlich nur im Falle von vergleichbaren Bindungsmodi der verglichenen Verbindungen bewahrheiten.

Die Synthese beruht auf der hoch-stereoselektiven Michael-Addition von den chiralen sekundären Aminen (*R*)-(-)-*N*-Benzyl-methylbenzylamin bzw. seines (*S*)-Enantiomers in Form ihrer Lithiumamide an Zimtsäure-*tert*.-butylester (Abb. 4.12).^[307] Die Verwendung von *tert*.-Butylestern in dieser Synthese wird als vorteilhaft beschrieben, da die Nebenreaktion der Carbonsäureamidbildung bei sterisch weniger gehinderten Methyl- bzw. Ethylestern zu geringeren Ausbeuten führt.

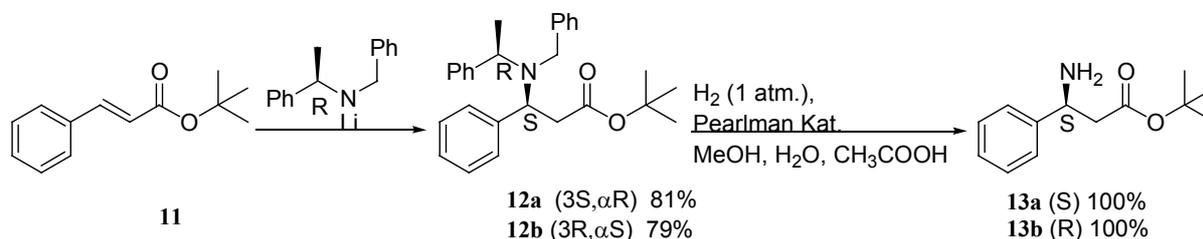


Abbildung 4.12: Enantioselective Synthese von 3-Amino-3-phenyl-propionsäure.

Die Lithiumamide der chiralen sekundären Dibenzylamine wurden in diesem Falle bei -78°C in THF mittels *n*-BuLi generiert und nach 15 min. tropfenweise mit Zimtsäure-*tert*.-butylester versetzt. Nach Quenchen mit ges. NH_4Cl -Lsg. und wässriger Aufarbeitung erhält man die tertiären Amine in guten Ausbeuten und mit hoher Diastereoselektivität.

Die Debenzylierung zu den enantiomerenreinen 3-Amino-3-phenyl-propionsäure-*tert*.-butylestern ist bei einer H_2 -Atmosphäre von 1 bar mittels des sog. Pearlman-Katalysators in einer Mischung aus Methanol / H_2O / Essigsäure (40:4:1) über 24 h quantitativ.^[308]

Das Ergebnis des biologischen Assays war jedoch ernüchternd, da alle enantiomerenreinen Epimere die gleiche Aktivität zeigten (Tab. 4.3). Dies würde sogar nahe legen, dass die Stereochemie am zweiten asymmetrischen Kohlenstoffatom vollkommen willkürlich sei und

somit die Isobutylgruppe, welche die natürliche Seitenkette des Leucins darstellt, nicht in der natürlichen *S*-Konfiguration vorzuliegen hätte und ihr somit keine Relevanz zu unterstellen wäre.

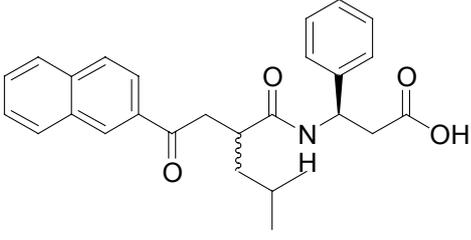
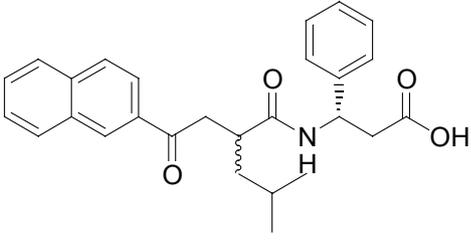
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 |
|--------------|--|--|
| 14 a 14 b |  | a) 14 +/- 3 b) 30 +/- 3 |
| 15a 15 b |  | a) 14 +/- 3 b) 14 +/- 3 |

Tabelle 4.3: Vergleich der vier möglichen enantiomerenreinen Konfigurationsisomeren der [3-[2-[2-(2-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]](4-methyl-1-oxo-pentyl)]-amino]-3-phenylpropionsäure.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die inhibierende Wirkung dieser Substanzklasse der Ketomethylenanaloga auf anderen, unspezifischen Wechselwirkungen beruht oder sogar auf eine evtl. Cytotoxizität zurückzuführen ist.

4.3 Modifikation der *N*-terminalen Amidbindung durch Harnstoff- und Sulfonamidderivate

In den bisherigen strukturellen Modifikationen wurde der Einfluss der Amid-Bindung des Leucinrestes zum *N*-terminalen aromatischen Rest nicht eingehend untersucht und bei den rationalen Abänderungen der Peptidmimetika konserviert. Um einerseits den Anteil der

Amidbindung an der biologischen Aktivität zu evaluieren, andererseits Verbindungen mit gesteigerter Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau zu generieren, wurde eine kleine Bibliothek *N*-terminal modifizierter Mimetika synthetisiert, welche das reduzierte Erkennungsmotiv über eine Amid- (-CO-NH-), Sulfonamid- (-SO₂-NH-) bzw. Harnstoffeinheit (-NH-CO-NH-) mit einem aromatischem Rest (1-Naphthyl bzw. 2-Naphthyl) verbrückt. Die Festphasensynthese dieser Verbindungen wurde am Wang-Harz nach Belegung mit Fmoc- β -Aminosäure und anschließender Kupplung von Fmoc-L-Leucin unter Standard-Kupplungsbedingungen durchgeführt. Die amid-verbrückten Verbindungen **16** und **17** wurden durch Kupplung von Naphthoesäuren mit TBTU / HOBt / DIPEA in NMP dargestellt. Die Harnstoff-Peptidomimetika **20** und **21** konnten aus der Reaktion von Naphthyl-isocyanaten mit der freien Aminosäure des Leucins erhalten werden und die entsprechenden Sulfonamide **18** und **19** entstehen bei der Behandlung mit Sulfonsäurechloriden und Hilfsbase (DIPEA).

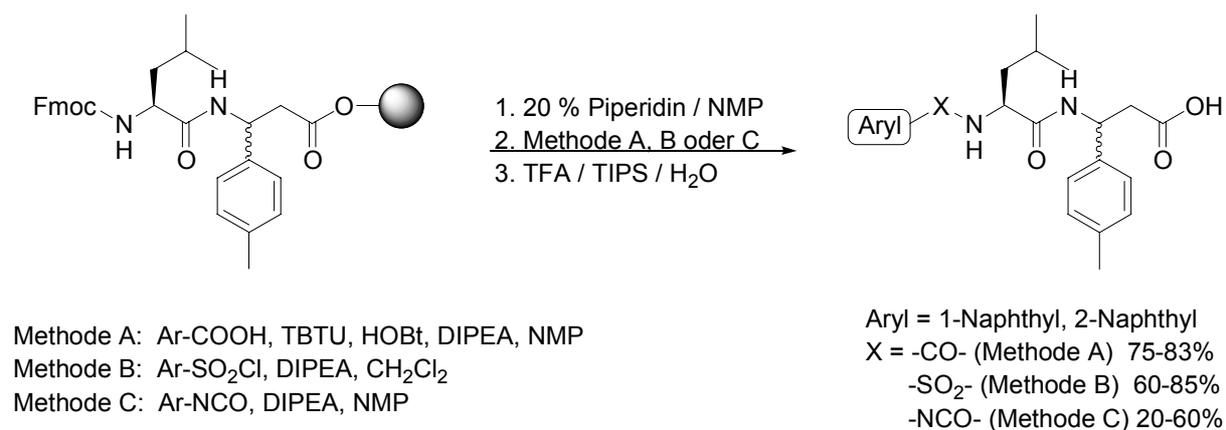


Abbildung 4.13: Festphasensynthese *N*-terminaler Amidbindungs-Surrogate.

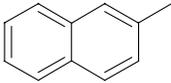
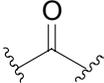
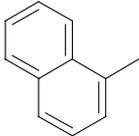
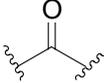
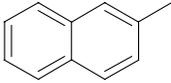
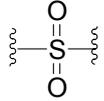
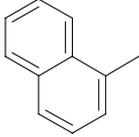
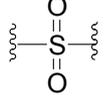
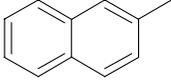
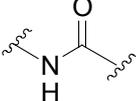
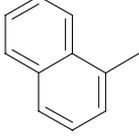
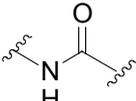
| Verbindung | Arylrest | Spacer X | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM |
|--------------|---|---|--|--|
| 16 a 16 b |  |  | a) 42 +/- 2 b) 23 +/- 8 | a) 47 +/- 18 b) 31 +/- 10 |
| 17 a 17 b |  |  | a) 49 +/- 0 b) 46 +/- 2 | a) 52 +/- 3 b) n.t. |
| 18 a 18 b |  |  | a) 45 +/- 3 b) 60 +/- 6 | a) 58 +/- 18 b) n.t. |
| 19 a 19 b |  |  | a) 64 +/- 3 b) 55 +/- 2 | a) n.t. b) 64 +/- 16 |
| 20 a 20 b |  |  | a) 25 +/- 5 b) 15 +/- 2 | a) 62 +/- 21 b) 32 +/- 8 |
| 21 a 21 b |  |  | a) 57 +/- 18 b) 19 +/- 6 | a) 63 +/- 29 b) 23 +/- 8 |

Tabelle 4.4: *Inhibierung der $\alpha 4\beta 7$ -/MAdCAM Adhäsionsinhibierung durch Amidbindungssurrogate.*

Die allgemeine Beobachtung und Lehre aus den vorliegenden Daten, läßt den Schluß zu, dass die generell höhere Aktivität der Harnstoffderivate auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass diese im Vergleich zu den Amiden bzw. Sulfonamiden eine weitere sphärische Ausdehnung des N-terminalen aromatischen Restes aufweisen. Wie schon vormals beschrieben, steigt die Aktivität generell mit der Größe des aromatischen Systems an.

4.4 Substitution der N-terminalen Amidbindung durch aromatische Surrogate

4.4.1 Einführung

Der folgende Ansatz verfolgte die Idee, die N-terminale Amidbindung der dipeptidischen Leitstruktur durch Surrogate zu ersetzen, die der planaren Struktur der Amidbindung gleichkommen. Ein Templat, das diesen strukturellen Ansprüchen genügt, sind aromatische Systeme. Es gibt Beispiele aus der Literatur, in denen bereits die Bedeutung dieses isosterischen Ersatzes eindrucksvoll demonstriert worden ist. Einerseits gelang es unserer Gruppe, auf dem Gebiet der $\alpha\beta 3$ - bzw. $\alpha 4$ -Integrinantagonisten die minimale Erkennungssequenz in beiden Fällen am C-Terminus auf eine β -Amino- β -aryl-Aminosäure zu reduzieren, indem die Amidbindung durch substituierbare Phenylringe ersetzt wurde (Abb. 4.14).

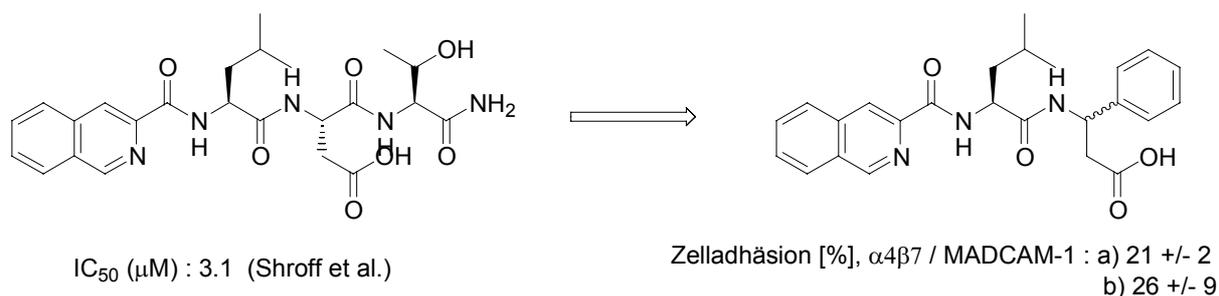


Abbildung 4.14: Substitution der Asp-Thr-Amidbindung durch Aromaten unter Erhalt der Aktivität bei $\alpha 4$ -Integrinantagonisten.

Dass diese Substitution nicht nur in der Peripherie der Erkennungssequenz, sondern auch im Peptidrückgrat von Peptidmimetika möglich ist, demonstrierten DuPont-Merck mit der Entwicklung von potenten RGD-Mimetika (Abb. 4.15), die zunächst den Argininrest durch Benzamidin ersetzten und schließlich einen 1,3-disubstituierten Phenylring als Ersatz für die Arginin-Glycin-Amidbindung einfügten. So wurde die Evolution von der ursprünglichen Leitstruktur (DMP 728) zum potenten Analogon beschrieben. Der Spacer zwischen der Guanidin- und Säuregruppe im cyclischen Peptid beträgt 11 Atome, während das Benzamidin

und die Säurefunktion durch 13 Atome getrennt sind. *Molecular Modeling* zeigte, dass dieser *Spacer* ein guter Ersatz für das originale Peptidrückgrat darstellte.

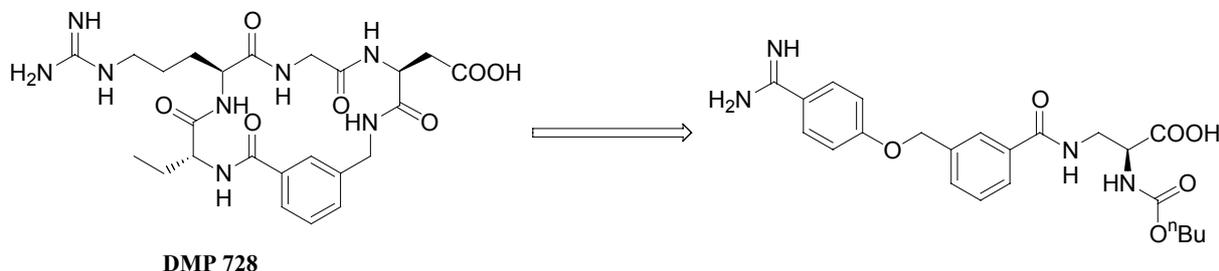


Abbildung 4.15: Rationales Design von Glycoprotein IIB/IIIa Antagonisten.

4.4.2 Amino-phenyllessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika

Die Verwendung von Phenyllessigsäuren bietet sich an, da die die Leucin-Seitenkette repräsentierende Isobutylgruppe synthetisch einfach durch die α -Alkylierung des entsprechenden Esters einzuführen ist. Der Phenylrest sollte so substituiert sein, dass eine weitere Modifikation möglich ist, da bisherige Untersuchungen zeigten, dass biologische Aktivität mit der Beschaffenheit – insbesondere mit der räumlichen Ausdehnung des aromatischen Systems am N-Terminus – korreliert. Der verschieden-substituierte Phenylring imitiert die *N*-terminale Amidbindung des acylierten Leucins (Abb. 4.16).

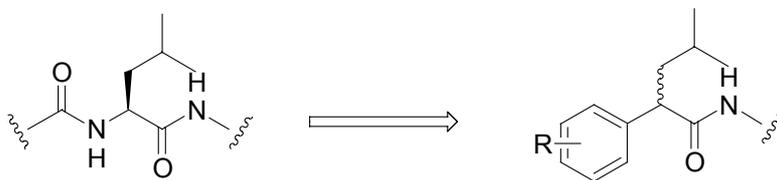


Abbildung 4.16: Phenylring imitiert die *N*-terminale Amidbindung.

Nitrophenyllessigsäuren sind in allen Substitutionsmustern kommerziell erhältlich und bieten die Möglichkeit der kovalenten Modifikation nach Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe. Der zuerst dargestellte Methylester wird nach der Alkylierung mit

Isobutylbromid in α -Position im Anschluß an die Deprotonierung mit Natriumhydrid wiederum alkalisch verseift (Abb.4.17). Die freie Nitrophenylelessigsäure wird daraufhin zur Aminophenylelessigsäure hydriert und nach dem Schutz mit Fmoc-OSu als Baustein für die Festphasensynthese zugänglich gemacht. Das entsprechende ortho-Derivat war auf diesem Wege nicht zugänglich, worauf später noch eingegangen werden soll.(Kap.4.13)

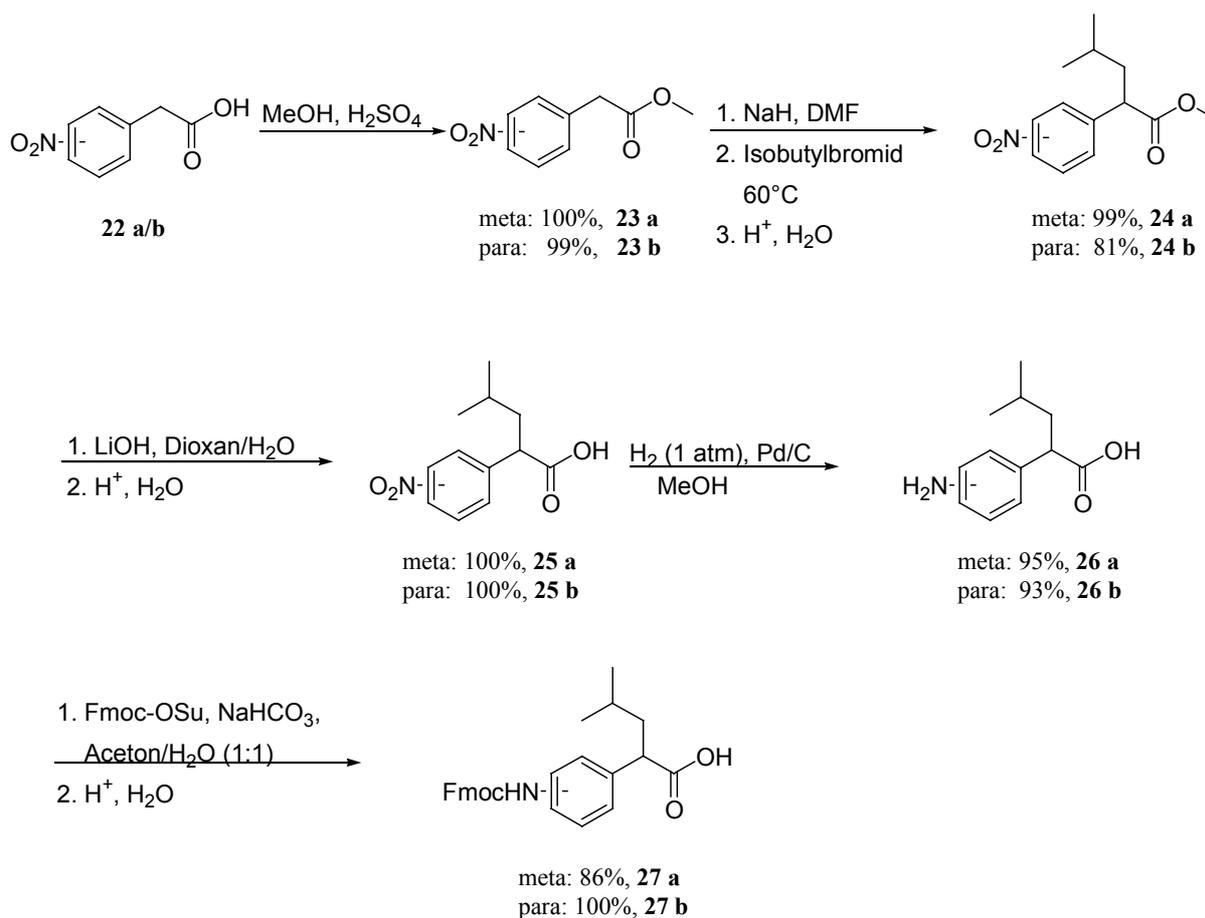


Abbildung 4.17: Synthese der *N*-Fmoc-(aminophenyl)-essigsäure-Bausteine für die Festphasensynthese.

Die Festphasensynthese wurde an mit *N*-Fmoc- β -phenylalanin belegtem TCP-Harz nach der Fmoc-Strategie durchgeführt. Nach der Kupplung der beschriebenen Bausteine **27 a/b** wurden Bibliotheken über die Acylierung der Amino-Phenylgruppen mit einer Auswahl von verschiedenen aromatischen Carbonsäuren synthetisiert (Abb. 4.17).

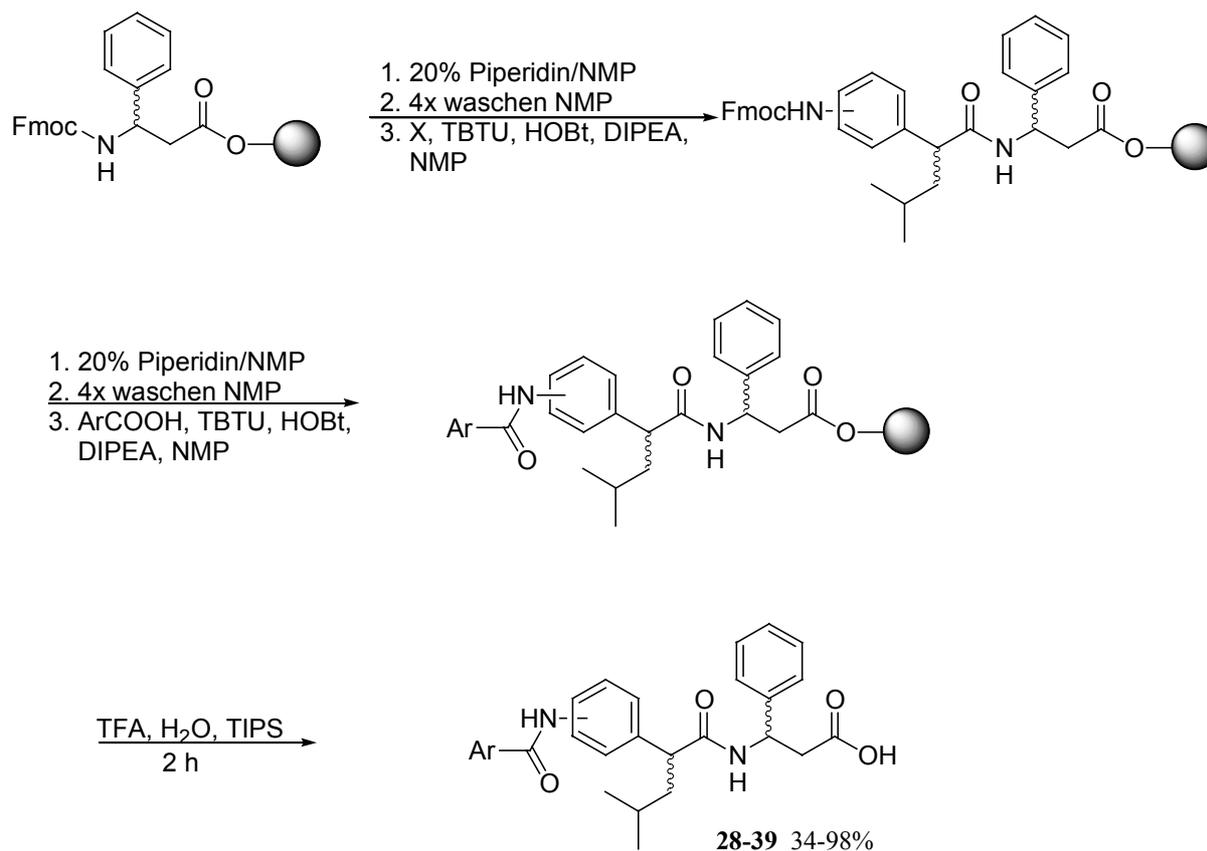


Abbildung 4.18: Festphasensynthese der N-terminal-modifizierten Integrinantagonisten.

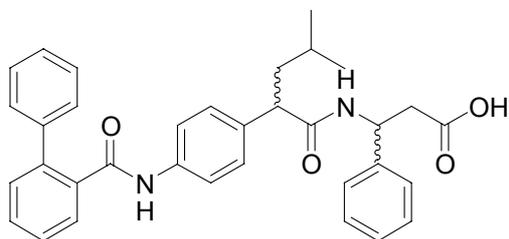
Das Ergebnis der biologischen Evaluierung ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Die synthetisierten Verbindungen fallen als Diastereomerenpaare an und wurden – soweit möglich – getrennt isoliert und getestet. Aufgrund der unterschiedlichen relativen Konfiguration an beiden Stereozentren der racemisch eingesetzten Bausteine sollte erwartet werden, dass die Aktivität jeweils eines Diastereomeren die des anderen übertreffen sollte, nämlich diejenige welche den einzelnen Konfigurationen im natürlichen Liganden entsprechen. Jedoch ist eine Voraussage schwierig, da diese Aussage wohl nur erfüllt wäre, wenn es sich um identische Bindungsmodi verglichen mit dem nativen peptidischen Liganden handeln würde und diese Annahme sich nicht immer als richtig erweist.

| Verbindung | Arylrest (Ar) | Substitutionsmuster | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM- 1 |
|------------|------------------|---------------------|--|
| 28 | Phenyl | para | a) 27+/- 11 b) 15 +/- 2 |
| 29 | 3-Isochinolyl | para | a) 46 +/- 13 b) 33 +/- 11 |
| 30 | 1-Naphthyl | para | a) 44 +/- 6 b) 22 +/- 9 |
| 31 | 4-Phenyl-phenyl | para | a) 41 +/- 15 b) 28 +/- 2 |
| 32 | 2-Phenyl-phenyl | para | a) 14 +/- 3 b) 30 +/- 11 |
| 33 | 4-Benzoyl-phenyl | para | a) 30+/- 6 b) 33 +/- 3 |
| 34 | 4-Fluor-phenyl | meta | a) 30 +/- 11 b) 51 +/- 7 |
| 35 | 3-Isochinolyl | meta | a) 23 +/- 3 b) 31 +/- 11 |
| 36 | 1-Naphthyl | meta | a) 30 +/- 11 b) 33 +/- 13 |
| 37 | 4-Phenyl-phenyl | meta | a) 34 +/- 9 b) 50 +/- 7 |
| 38 | 2-Phenyl-phenyl | meta | a) 24 +/- 7 b) 19 +/- 7 |
| 39 | 4-Benzoyl-phenyl | meta | a) 39 +/- 13 b) 26 +/- 13 |

Tabelle 4.5: *Inhibierung der $\alpha 4\beta 7$ -/ MAdCAM Adhäsion durch Phenyllessigsäurederivate.*

Die biologische Evaluierung ergab, dass eine Reihe von diesen Verbindungen im Stande waren, die Adhäsion von $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden Zellen an MAdCAM-1 zu unterbinden. Häufig war ein Diastereomer aktiver als das andere, was gegen eine unspezifische Inhibierung spricht.

Unter diesen Verbindungen wurde die aktivste ausgesucht **32 a** und titrimetrisch der IC_{50} -Wert bestimmt.



IC_{50} : 187 μ M

Abbildung 4.19: Potentielle Leitstruktur **32 a** aus der Phenyllessigsäure-Bibliothek.

Es ist also möglich, unter Erhalt der Aktivität, die *N*-terminale Amidbindung durch aromatische Gerüstmimetika zu ersetzen. Diese Beobachtung lässt zudem die Vermutung zu, dass weder die Carbonylgruppe noch die Aminogruppe der Amidbindung über Wasserstoffbrückenbindungen am rezeptorgebundenen Zustand beteiligt sind.

Im Folgenden wird die Synthese von zwei Bibliotheken beschrieben, welche nach dem Gesichtspunkt besserer Bioverfügbarkeit entwickelt wurden. Die Verbindungen der in Kap. 4.4.2 beschriebenen Bibliothek weisen zwei Amidbindungen auf, was nicht zwangsläufig zu *a priori* ungeeigneten Verbindungen führt, jedoch unter dem Aspekt der wünschenswerten proteolytischen Stabilität bei oraler Applikation Beachtung finden sollte.

4.4.3 Amino-phenyllessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika mit reduzierten Amidbindungen

Im ersten Ansatzpunkt wird die Amidbindung zwischen dem racemischen Leucin-Mimetikum und der C-terminal verwendeten β -Aminosäure durch eine reduzierte Amidbindung ersetzt. Die Synthese der verwendeten Bausteine ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

Wiederum ausgehend von den kommerziell erhältlichen Nitrophenyllessigsäuren, wurden diese nach der säurekatalytischen Veresterung mit dem die Leucin-Seitenkette repräsentierenden Isobutylseitenkette alkyliert. Um aus den erhaltenen Carbonsäureestern die korrespondierenden Alkohole zu erhalten, wurden diese in THF mit $LiAlH_4$ selektiv in

Gegenwart der Nitrogruppe reduziert. Die Reaktionsbedingungen müssen so gewählt werden, dass die Reaktionsmischung nach 1 h bei -78°C innerhalb von 20 min. auf -40°C erwärmt und anschließend gequenchet wird. Unterhalb dieser Temperatur ist die Reduktion nicht vollständig, während oberhalb die Nitrogruppe zu gewissem Maße zur Aminogruppe reduziert wird. Diese vollständige Reduktion ist zwar beabsichtigt und wird im nächsten Reaktionsschritt auch durch die Hydrierung durchgeführt, jedoch wäre die Nitrogruppen-Reduktion mit LiAlH_4 mit einer problematischen Aufarbeitung aus einem stark basischem wässrigen Medium verbunden. Die anschließende Protektion der Aminogruppe gelingt mit Fmoc-OSu unter Standardreaktionsbedingungen.

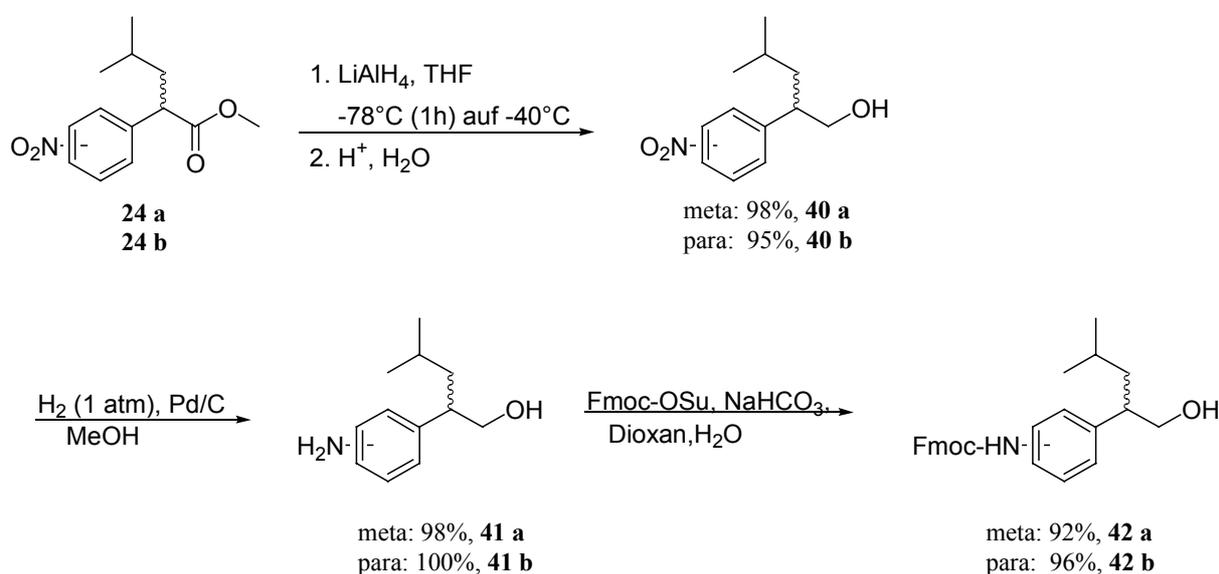


Abbildung 4.20 Synthese von Bausteine der Phenyllessigsäuregerüstmimetika mit reduzierter Amidbindung.

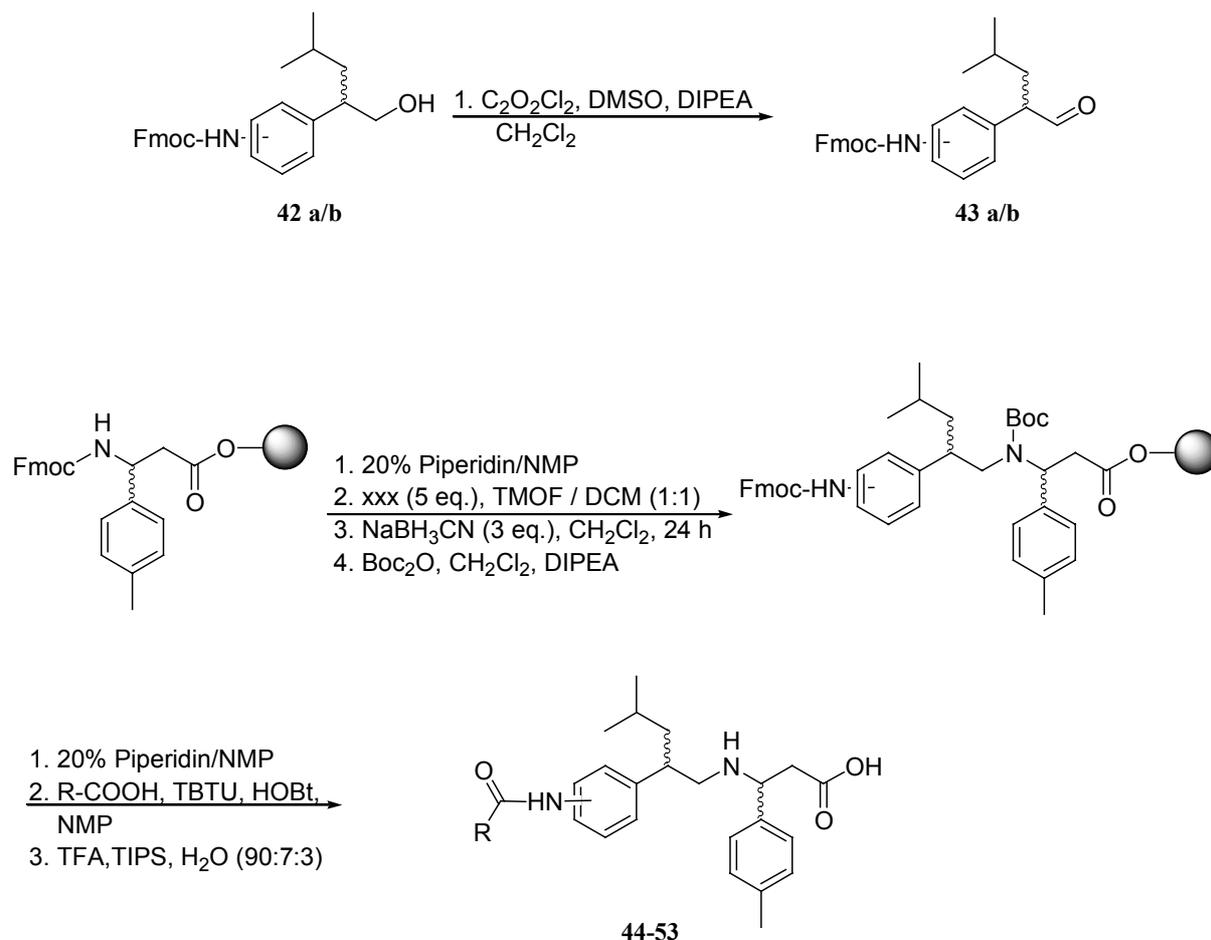


Abbildung 4.21: Festphasensynthese von Phenylacessäureerüstmimetika 44-53 mit reduzierter Amidbindung.

Die in Abbildung 4.20 beschriebenen geschützten Aminoalkohole werden in einer Swern-Reaktion vor der reduktiven Aminierung an der Festphase zu den entsprechenden Aldehyden oxidiert und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Es erwies sich als vorteilhaft, die so entstehende sekundäre Aminogruppe vor der abschließenden Acylierung mit der Boc-Schutzgruppe zu versehen, da unter den Reaktionsbedingungen der Acylierung (Überschuß an aromatischer Säurekomponente und Kupplungsreagenz) als Nebenprodukt auch das doppelte Acylierungsprodukt zu beobachten ist, was sich negativ auf die Ausbeute auswirkt.

| Verbindung | Rest (R) | Substitution | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM |
|------------|-----------------|--------------|--|--|
| 44 | 4-Fluor-phenyl | meta | 9 +/- 1 | 15 +/- 0 |
| 45 | 3-Isoquinolyl | meta | 9 +/- 2 | 10 +/- 2 |
| 46 | 1-Naphthyl | meta | 9 +/- 2 | 10 +/- 2 |
| 47 | 4-Phenyl-phenyl | meta | 9 +/- 2 | 12 +/- 8 |
| 48 | 2-Phenyl-phenyl | meta | 9 +/- 3 | 15 +/- 8 |
| 49 | 4-Fluor-phenyl | para | 13 +/- 3 | n.t. |
| 50 | 3-Isoquinolyl | para | 18 +/- 4 | n.t. |
| 51 | 1-Naphthyl | para | 16 +/- 2 | n.t. |
| 52 | 4-Phenyl-phenyl | para | 21 +/- 3 | n.t. |
| 53 | 2-Phenyl-phenyl | para | 9 +/- 2 | n.t. |

Tabelle 4.6: *Inhibierung der Zelladhäsion durch Phenylessigsäurederivate mit reduzierter Amidbindung.*

Die Evaluierung der obigen Verbindungen in Zell-Adhäsionsassays (Tab. 4.6) ergab eine starke inhibitorische Wirkung aller Verbindungen mit reduzierter Amid-Bindung. Jedoch sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu genießen, da die ausführende Person die Verbindungen bei der Inkubation in der Zelllösung als „optisch verdächtig“ beschrieb, d.h. dass die Verbindungen z.T. unlöslich zu sein scheinen, bzw. die Zellen auf andere Weise beeinflussen und ein im Mikroskop nicht eindeutiges Aggregationsverhalten der Zellen hervorrufen. Eine verringerte Löslichkeit scheint aufgrund der Tatsache, dass die Verbindungen statt der Amid-Bindung eine sekundäre Aminofunktion und damit polarere funktionelle Gruppe aufweisen, ungewöhnlich. Jedoch ist wohl die Bildung von Zwitterionen für die Schwerlöslichkeit verantwortlich. Um eine abschließende Bewertung dieser Substanzklasse abzugeben, sollte über die Synthese von löslicheren Vertretern, z.B. durch die Verwendung von Pyridinen als aromatische Gruppen nachgedacht werden.

4.4.4 *N*-terminale Modifizierung mittels Mitsunobu-Reaktion

4.4.4.1 Zielsetzung der isosterischen Substitution der Amidbindung durch Benzylether

Die vielversprechenden Ergebnisse der beschriebenen Phenyllessigsäurederivate als Ersatz für die *N*-terminale Amidbindung ließ den Wunsch aufkommen, die zweite zu knüpfende Amidbindung am Anilinbaustein aus Gründen der Bioverfügbarkeit aus dem Zielmolekül zu entfernen. Da sich das ausgedehnte aromatische System am *N*-Terminus essentiell für die Aktivität der zu untersuchenden Verbindungen erwiesen hatte, wurde nach einem Weg gesucht, den Phenyllessigsäurebaustein - möglichst vereinbar mit Festphasenchemie - mit aromatischen Resten zu modifizieren.

Weil der Einfluß der als Linker benutzten Amidbindung zwischen den beiden aromatischen Systemen bisher nicht bekannt ist, wäre ein isosterer Ersatz derselben aus zweierlei Hinsicht interessant, da die planare Geometrie der Amidbindung evtl. einen strukturellen Einfluss besitzt, wenn auch in der Peripherie des Moleküls (Abb. 4.22). Einen flexiblen Linker von gleicher Bindungslänge stellt die Oxymethyleneinheit (-CH₂-O-) dar, welche das Amidbindungssurrogat von Phenyl-Benzylethern darstellt. Die Methode der Wahl zur Generierung von Benzylethern an der festen Phase, ist die Mitsunobureaktion zwischen Phenolen und Benzylalkoholen

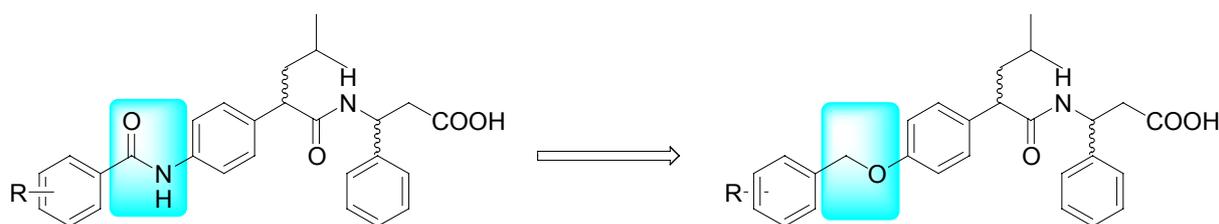


Abbildung 4.22: *Isosterische Substitution von Amidbindungen durch Benzylether.*

Aus pharmakologischer Sicht wäre das Vermeiden der aromatischen Aminogruppe ebenfalls wünschenswert, da die Toxizität von Anilinen im Metabolismus eine nicht zu vernachlässigende negative Begleiterscheinung wäre. Die Mitsunobureaktion ist eine sehr effektive unter milden Bedingungen ablaufende Reaktion und auch in der Festphasensynthese

vielfältig einsetzbar. So wurden schon eine Vielzahl von Naturstoffen, z.B. Kohlenhydrate und Alkaloide, unter Mitsunobu-Bedingungen synthetisiert oder derivatisiert.

4.4.4.2 Festphasensynthese von alkoxy-substituierten 2-Isobutylphenylelessigsäure-derivaten

Um die hydroxysubstituierten Phenylelessigsäuren der Festphasensynthese zugänglich zu machen, musste gleichermaßen eine Hydroxyschutzgruppe gewählt werden, welche den stark basischen Reaktionsbedingungen der Alkylierung Stand hält und sich als kompatibel für eine Entschützung an fester Phase erweist. Die kommerziell erhältlichen Hydroxyphenylelessigsäuren wurden zuerst in den Methylester umgewandelt, dessen phenolische OH-Gruppe geschützt werden musste, um bei der anschließenden Alkylierung die Isobutyletherbildung zu vermeiden. Der Einsatz der *p*-Tosyl-Gruppe erwies sich als unbrauchbar, da bei der Alkylierung eine Vielzahl von verschiedenen Produkten erhalten wurde. Die Verwendung der säurelabilen THP-Schutzgruppe schien vorteilhaft, da eine Entschützung in Gegenwart des säureresistenteren Wang-Linkers möglich ist. Allerdings gestaltete sich die Bildung des THP-Acetals etwas schwieriger, da die literaturbeschriebene Reaktion mit 2,3-Dihydro-2H-pyran und katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure in Dichlormethan in diesem Fall lediglich zur langsamen Polymerisation des Pyrans unter Schwarzfärbung führte, ohne nennenswerte Reaktion mit dem Phenol zu beobachten. Wurde jedoch das weniger saure Pyridinium-(*p*-toluolsulfonat) (PPTS) als Katalysator verwendet, so gelang die Umsetzung sehr sauber bei Raumtemperatur über Nacht (Abb. 4.23). Die so geschützten Verbindungen konnten nach Deprotonierung mit Natriumhydrid in DMF mit Isobutylbromid in guten Ausbeuten alkyliert werden. Bei der anschließenden wässrigen Aufarbeitung muß schließlich darauf geachtet werden, daß der pH-Wert $\text{pH} = 5$ nicht unterschreitet, da sonst die THP-Gruppe sehr leicht abgespalten wird. Die Entschützung des Methylesters erreicht man durch die basische Hydrolyse. Um die freigesetzte Carbonsäure nach der Hydrolyse vom wässrigen Medium extrahieren zu können, muß beim Ansäuern wieder strengstens darauf geachtet werden, daß der pH-Wert nicht zu niedrig wird.

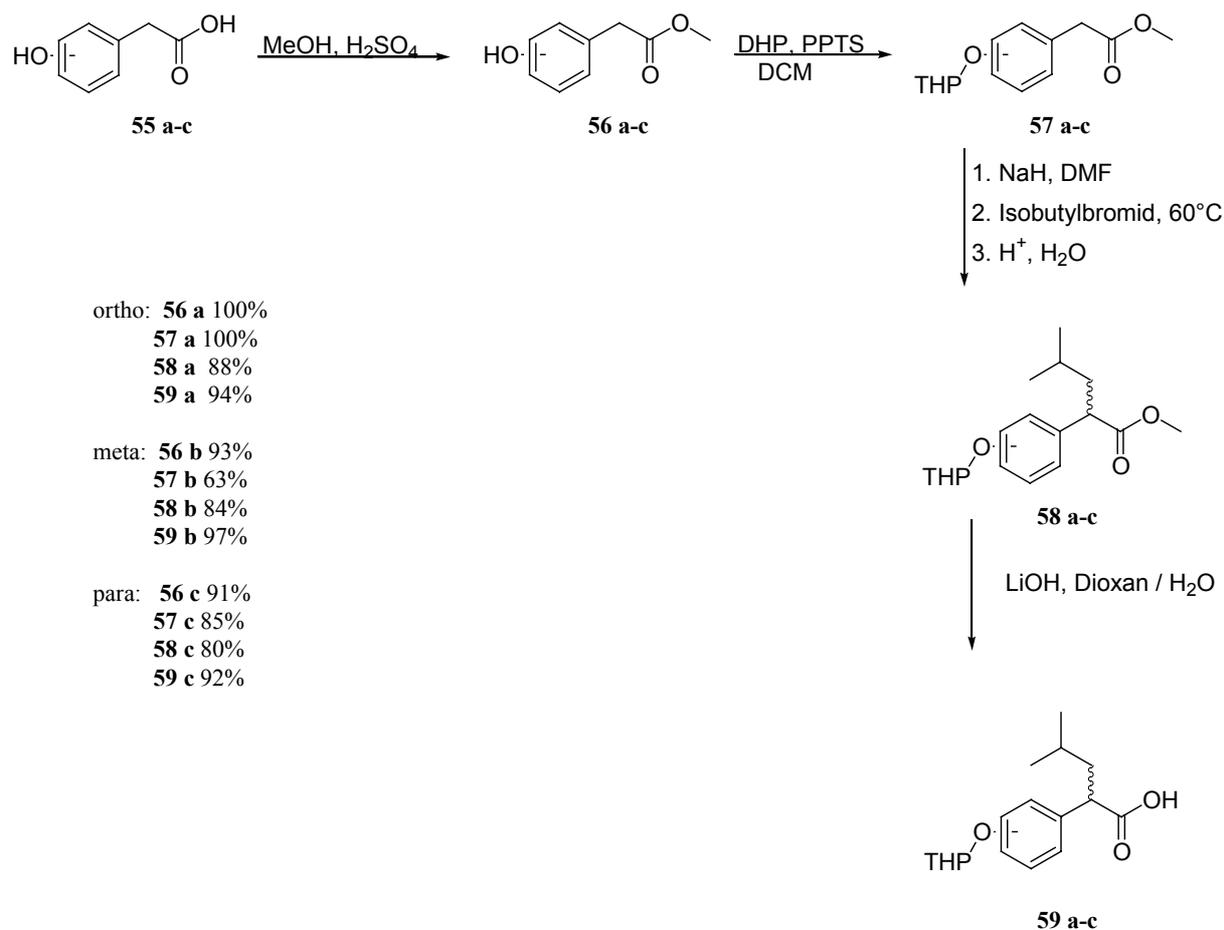
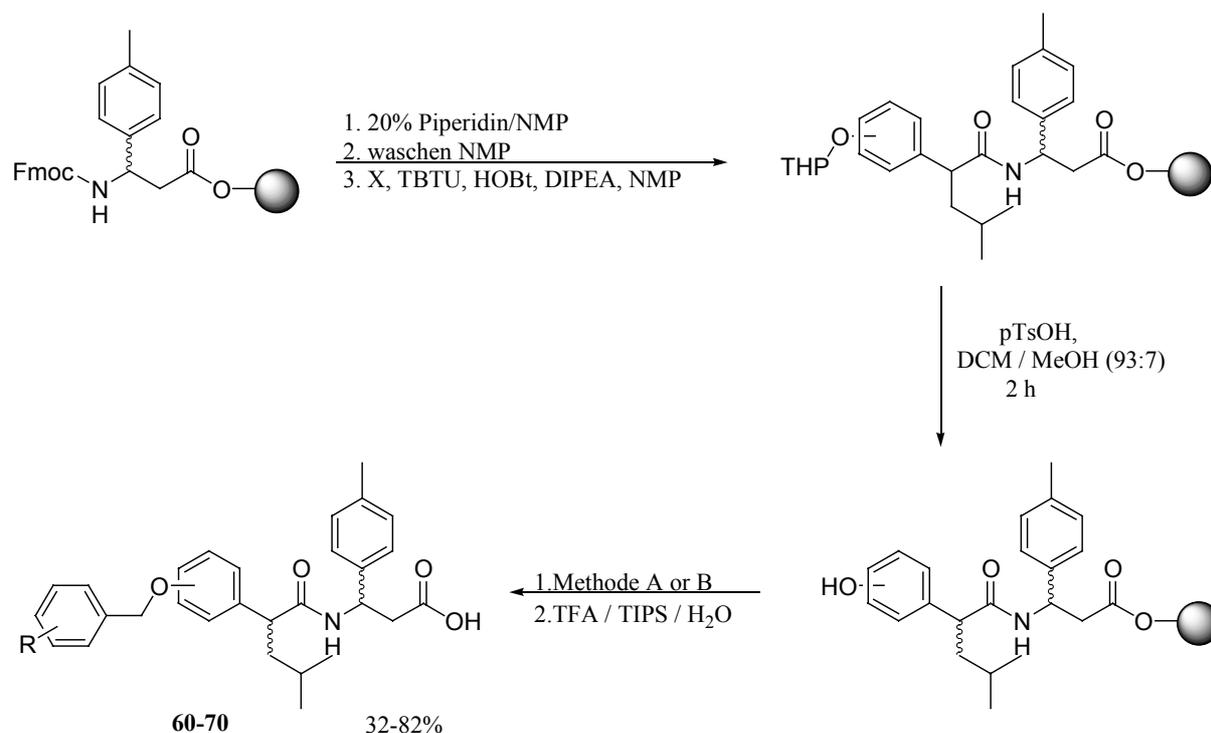


Abbildung 4.23: Bausteine für die Benzyl-phenyl-ether Bibliotheken.

Diese so erhaltenen Bausteine **59 a-c** konnten nun in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Die Kupplung erfolgte mit Standard-Methoden an immobilisierte 3-Amino-3-arylpropionsäuren. Die Verwendung von Wang-Linkern ist obligatorisch, da der säurelabilere TCP-Linker unter den für die Abspaltung der THP-Schutzgruppe benötigten Bedingungen nicht stabil wäre. Für die Abspaltung erwies sich eine Lösung von p-Toluolsulfonsäure (2.5 mg/mL) in Dichlormethan / Methanol (93:7) am vorteilhaftesten. Da ein *Monitoring* der Abspaltungsgeschwindigkeit an der festen Phase nicht möglich war, weil die THP-Gruppe unter den stark sauren Abspaltungsbedingungen vom Wang-Linker (90% TFA) gleichsam vollständig entfernt wird, wurde bei der Behandlung des Bausteines **59** unter denselben Bedingungen in Lösung gezeigt, daß die THP-Gruppe nach spätestens 2h vollständig entfernt war. So wurde das Harz nach der Kupplung der Bausteine **59 a-c** jeweils zweimal 1 h mit der beschriebenen Abspatlösung behandelt und danach mehrmals mit Dichlormethan gewaschen. Für die anschließenden Mitsunobu-Reaktionen wurde das Harz in Glasreaktoren überführt,

um das Arbeiten unter Inertatmosphäre zu gewährleisten. Das Harz wurde dazu in 2 mL THF vorgequollen und bei 0°C mit jeweils 3 eq. des jeweiligen Benzylalkohols, Triphenylphosphin und DIAD versetzt. Unter leichtem Rühren wurden die Reaktionsansätze 3-4 h bei 0°C belassen, und anschließend sorgfältig mit Dichlormethan gewaschen. (Abb. 4.24)

Diese milden Reaktionsbedingungen haben sich als vorteilhafter erwiesen als die ursprünglich gewählte Route der nucleophilen Substitution mit Benzylbromiden in DMF unter Zusatz von Kaliumcarbonat als Base. Diese Reaktion lieferte bei niedrigeren Reaktionstemperaturen keinen Umsatz und ergab bei höheren Temperaturen (90-110°C) und längeren Reaktionszeiten Gemische von Nebenprodukten neben schlechten Ausbeuten des Substitutionsproduktes.



Methode A: Benzylalkohol, PPh₃, DIAD, THF, 0°C, 4 h

Methode B: Benzylbromid, K₂CO₃, DMF, 90°C, 12 h

Abbildung 4.24: Festphasensynthese von Benzyl-phenyl-ethern als $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-antagonisten.

| Verbindung | Rest (R) | Substitutionsmuster | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 |
|------------|--------------------|---------------------|--|
| 60 | 2-Pyridyl- | ortho | a) n.d. b) 44 +/- 2 |
| 61 | 4-Chlorphenyl- | ortho | a) 53 +/- 21 b) n.d. |
| 62 | 3-Methoxyphenyl- | ortho | a) 58 +/- 0 b) 23 +/- 2 |
| 63 | 2-Pyridyl- | meta | a) 41 +/- 7 b) 16 +/- 4 |
| 64 | 4-Methoxyphenyl- | meta | a) 32 +/- 5 b) 27 +/- 9 |
| 65 | 4-Chlorphenyl- | meta | a) 14 +/- 3 b) 9 +/- 2 |
| 66 | 2,6-Dichlorphenyl- | meta | a) 6 +/- 2 b) 7 +/- 2 |
| 67 | 2-Pyridyl- | para | a) 42 +/- 5 b) 33 +/- 5 |
| 68 | 4-Chlorphenyl- | para | a) 8 +/- 2 b) 11 +/- 2 |
| 69 | 2,6-Dichlorphenyl- | para | a) 6 +/- 0 b) 21 +/- 15 |
| 70 | 3-Methoxyphenyl- | para | a) 15 +/- 0 b) 18 +/- 0 |

Tabelle 4.7: *Biologische Evaluation der Benzyl-phenyl-ether.*

Tabelle 4.7 demonstriert, daß die *ortho*-substituierten Peptidmimetika eine generell niedrigere Aktivität aufweisen. Die Verbindungen **63 b**, **65 b**, **66**, **68 a** und **69 a** stellen hier sehr vielversprechende Vertreter für eine weitere Optimierung dar.

Zuletzt sollte erwähnt werden, dass kürzlich eine elegante asymmetrische Synthese von Alkyl-Arylessigsäuren veröffentlicht worden ist, die auf einer chiralen Protonierung des *in-situ* generierten Alkyl-Aryl-Ketens mit (*R*)-Pantolacton beruht (Abb. 4.25).^[309]

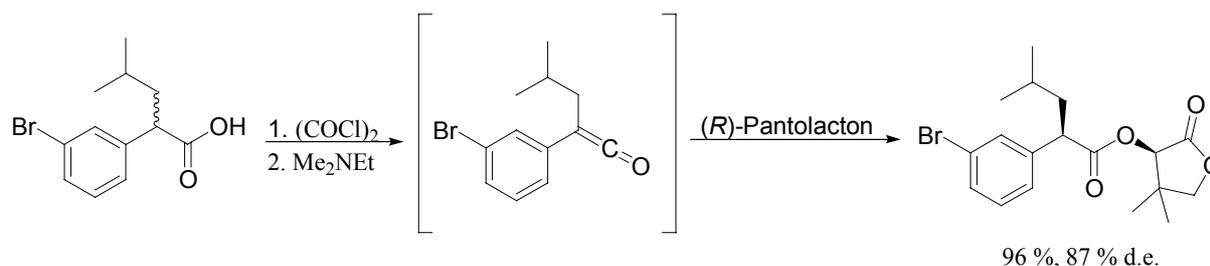


Abbildung 4.25: *Enantioselektive Synthese von Alkyl-aryl-essigsäuren.*

Dies kann bei einer weiteren Konzentration auf diese in dieser Arbeit präsentierten neuartigen Peptidmimetika genutzt werden, um eine Resolution der beiden bisher als Racemat getesteten Verbindungen zu erreichen.

4.5 Synthese von Sulfid-, Sulfoxid- und Sulfon-analoga

Die Verwendung von Sulfid-, Sulfon- bzw. Sulfoxid-Surrogaten der *N*-terminalen Amidbindung erschien interessant, da die Verbindung **6a** mit der beschriebenen Ketomethylen-Einheit (-CO-CH₂-) zu den aktivsten der bisher untersuchten Verbindungen zählt. Der isosterische Ersatz durch Sulfide, Sulfoxide oder Sulfone könnte Einblick in die Fragestellung gewährleisten, ob und in welchem Maße die Ketomethylengruppe für die Aktivität verantwortlich ist. Im Gegensatz zu jener, welche eine planare Geometrie aufweist, nehmen alle Schwefelanaloga unabhängig vom Oxidationsgrad eine tetraedrale Anordnung an und der Einfluss des Sauerstoffs ist untereinander in Abhängigkeit des Oxidationszustandes direkt zu vergleichen.

Die Synthese des benötigten *N*-terminalen Bausteins bereitete allerdings einige Probleme. Die zunächst angestrebte Synthese über die Mitsunobu-Reaktion des 2-(Hydroxymethyl)-4-methyl-pentansäureesters mit 2-Thionaphthol benötigte eine Synthese des ersteren. Es schien sinnvoll die Isobutylgruppe über eine α -Alkylierung des entsprechend geschützten 3-Hydroxy-propionsäureesters **71** einzuführen (Abb. 4.26). Diese Voraussetzung wurde mit der basenkatalysierten konjugierten Addition von Benzylalkohol an Acrylsäuremethylester geschaffen.

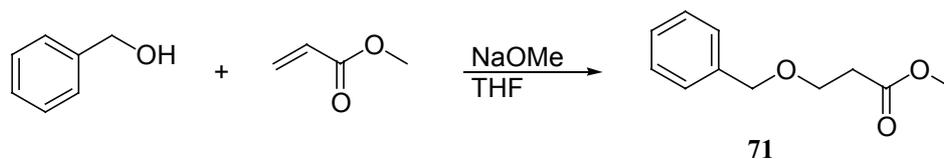


Abbildung 4.26: Basenkatalytische Michael-Addition von Benzylalkohol an Acrylsäuremethylester.

Jedoch ist das einzige nachweisbare Produkt der Alkylierungsreaktion nach Deprotonierung mit Lithiumdiisopropylamid bei -78°C das Eliminierungsprodukt. In dieser in diesem Ausmaß nicht erwarteten E2cb-Eliminierung fungiert das Benzylalkoholat als Abgangsgruppe (Abb. 4.27).

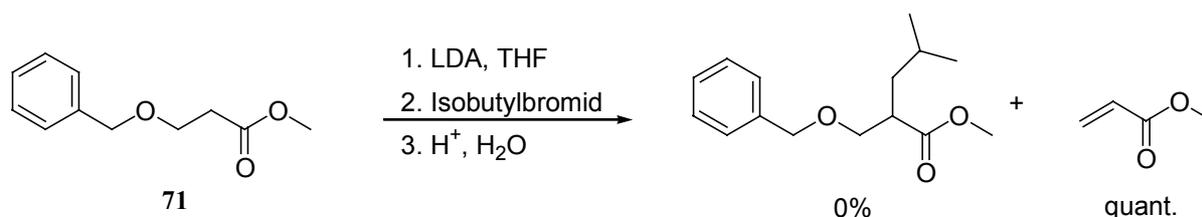


Abbildung 4.27: Unerwartete Eliminierungsreaktion bei Deprotonierung von **71**.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde das gewünschte Zielmolekül über die Alkylierung des 4-Methyl-pentansäuremethylesters **72** mit Benzylchlorid erreicht. Bei dieser Reaktionsführung vermeidet man das Vorhandensein einer Abgangsgruppe und somit die unerwünschte Bildung des Acrylsäureesters. Die hydrogenolytische Entfernung der Benzylschutzgruppe gelingt mit Wasserstoff unter Pd-C-Katalyse (Abb. 4.28).

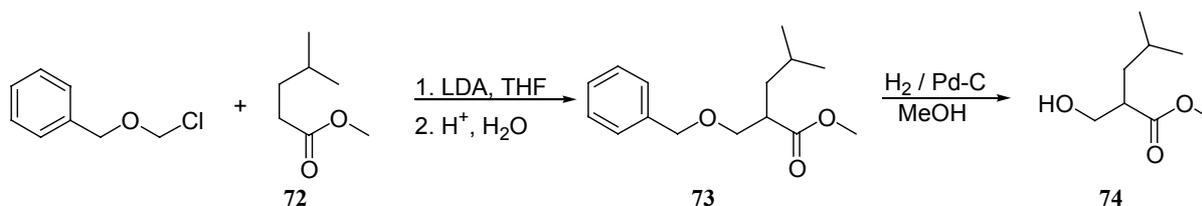


Abbildung 4.28: Synthese von 2-(Hydroxymethyl)-4-methyl-pentansäuremethylester.

Die Mitsunobu-Reaktion des 3-Hydroxy-propionsäureesters **74** mit 2-Thionaphthol wurde unter den von *Park* und *Kim*^[310] beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt, ohne jedoch das Kupplungsprodukt zu erhalten, da bei dieser Reaktionsführung die Eliminierungsreaktion zum dominanten Reaktionskanal wird. Zwar wurde in der literaturbeschriebenen Reaktion die acidere Thioessigsäure als Elektrophil eingesetzt, jedoch scheint die angegebene Literaturlausbeute von 70% fragwürdig (Abb. 4.29).

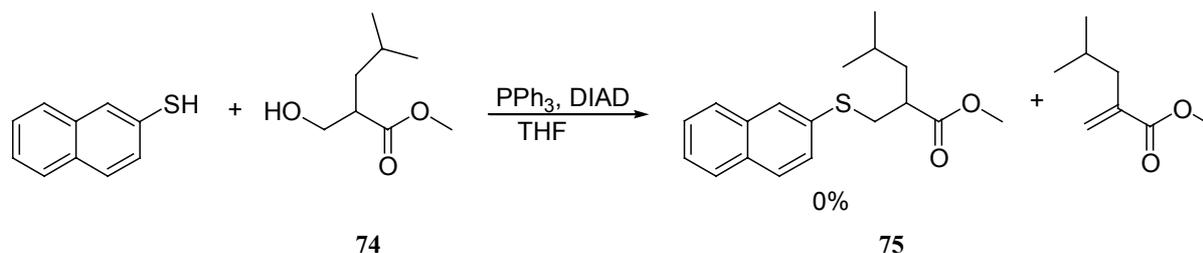


Abbildung 4.29: Eliminierungsreaktion des 2-(Hydroxymethyl)-4-methyl-pentansäureesters **74** unter Mitsunobu-Bedingungen.

So wurde diese Syntheseroute verworfen und im Anschluss versucht, die 3-Thionaphthyl-substituierte Carbonsäure direkt über eine Michael-Addition an den 2-Isobutylacrylsäureethylester zu erhalten. (Abb. 4.31) Der zunächst aus einer Malonsäureester-Synthese zugängliche Isobutylmalonsäurediethylester **76** wird hierbei zunächst mittels 1 eq. KOH in Ethanol zum Halbesters **77** verseift. Dieser kann in einer Eintopf-Reaktion unter Piperidin-Basen-Katalyse mit Paraformaldehyd in Pyridin zum Acrylsäureester umgesetzt werden. Der Reaktionsverlauf entspricht einer Hydroxymethylierung des Halbesters, welche unter Rückfluß von der Kondensation und Decarboxylierung zur α , β - ungesättigten Verbindung **78** gefolgt wird (Abb. 4.30).

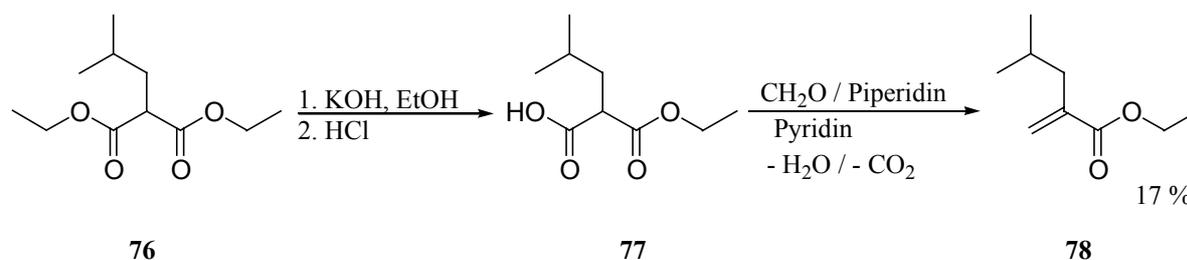


Abbildung 4.30: Eintopfsynthese von Isobutylacrylsäureester **78**.

Die Literaturrecherche für die konjugierte Addition von Thiophenolen an Acrylsäuren lieferte eine Reihe von Reaktionen die sämtlich bei Raumtemperatur unter Basenkatalyse mit Triethylamin bzw. Natriummethanolat in THF oder Methanol ablaufen sollten. Nur erhielt man in diesem Fall selbst bei vielfältiger Variation der genannten Reaktionsbedingungen und unter Inertatmosphäre (!) bei längeren Reaktionszeiten letztlich nur das Oxidationsprodukt des 2-Thionaphthols als Dimeres, welches schon zu geringem Anteil in kommerziell erhältlichen Chargen des Thiols enthalten ist.

In moderaten Ausbeuten kann das Michael-Additionsprodukt unter Rückfluß in Toluol mit katalytischen Mengen Piperidin erhalten werden (Abb. 4.31). Jedoch ist eine säulenchromatographische Trennung des erhaltenen Esters von dem immanenten Nebenprodukt **80** nicht möglich, da beide aufgrund ihres hydrophoben Verhaltens sehr ähnliche R_f -Werte aufweisen. So muß der Ethylester des gewünschten Reaktionsproduktes erst alkalisch hydrolysiert werden, bevor eine Trennung möglich ist.

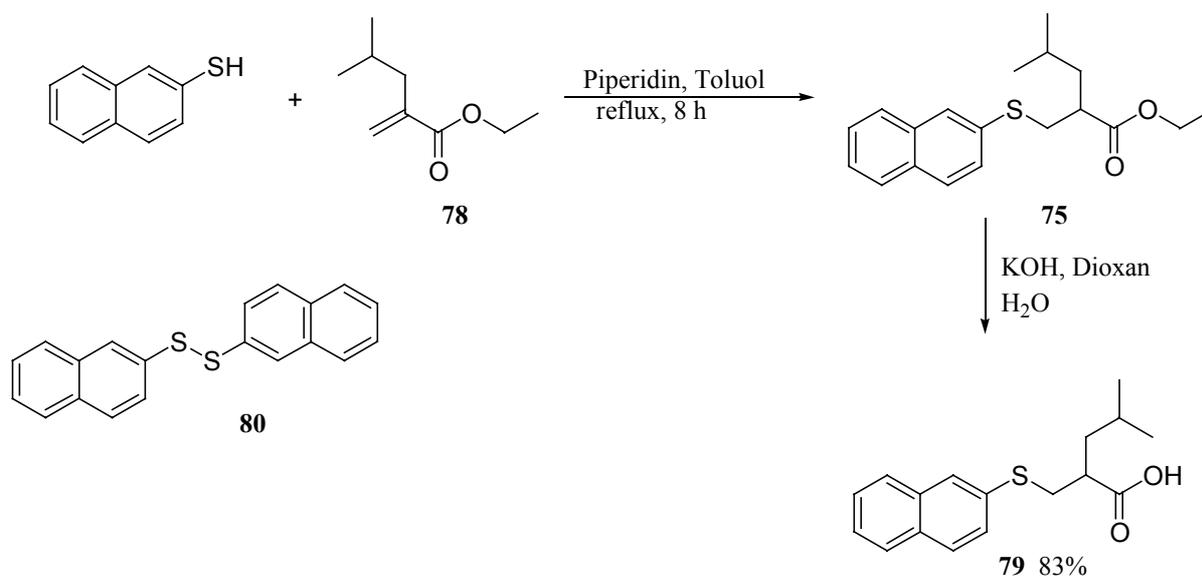


Abbildung 4.31: Michaeladdition und anschließende Hydrolyse.

Die freie Säure **79** wurde in Lösung mit dem Methylester der 3-Amino-3-phenyl-propionsäure **81** gekuppelt, nach wässriger Aufarbeitung in Dichlormethan gelöst und über Nacht mit 1eq. *meta*-Chlorperbenzoesäure oxidiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. wurde der Rückstand mit 1 N LiOH in Wasser / Dioxan (1:1) bei Raumtemp. mehrere Stunden gerührt

und somit der Methylester verseift. Bei der HPLC-Reinigung des Rückstandes erhielt man 3 Diastereomere des Mono-Oxidations-Produktes **83**, jedoch nur einen Peak für das Sulfons **84**, was jedoch auch bedeuten kann, dass jene möglichen Diastereomere nicht aufgetrennt werden konnten.

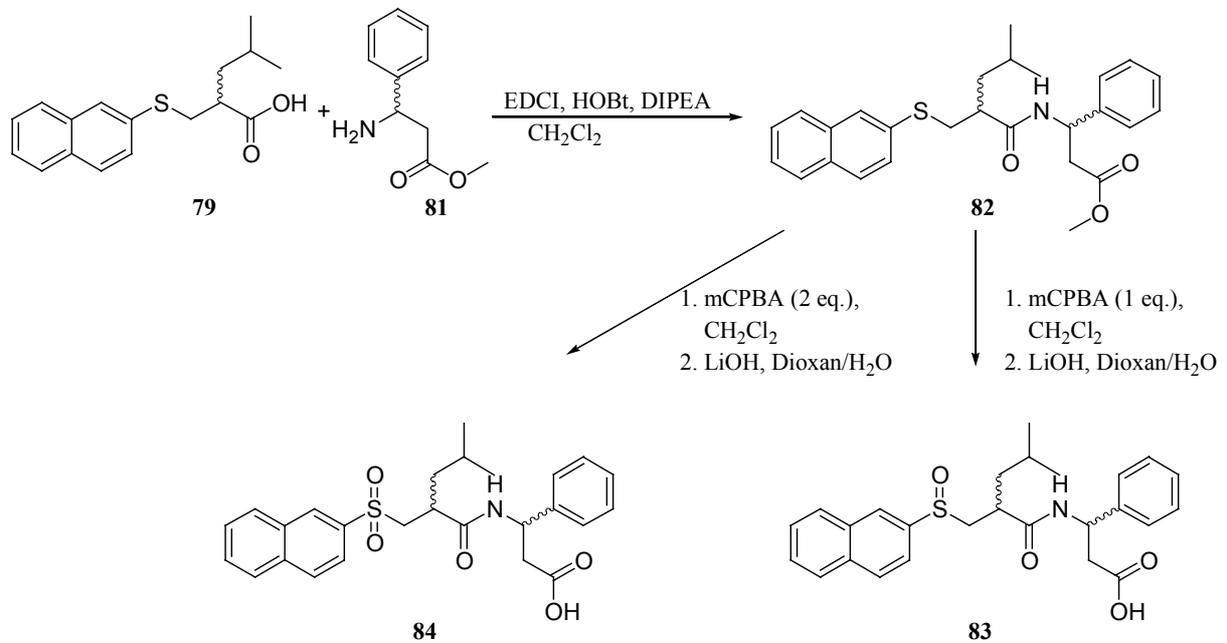


Abbildung 4.32 : Synthese von Thio-, Sulfoxid- bzw. Sulfon-Surrogaten.

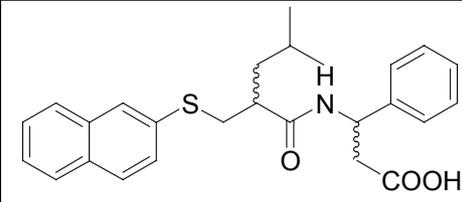
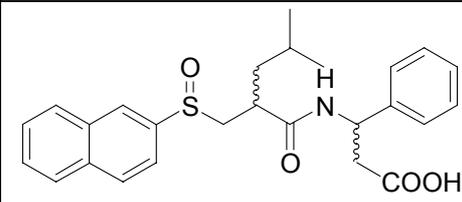
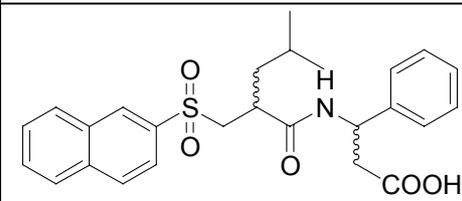
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 |
|------------|--|--|--|
| 85 |  | 38 +/- 6 ^{a)} | n.t. |
| 83 |  | a) 94 +/- 20 b) 59 +/- 6 c) 48 +/- 2 | n.t. |
| 84 |  | 76 +/- 12 | n.t. |

Tabelle 4.8 : *Biologische Evaluierung der Sulfid-, Sulfoxid- und Sulfonanaloga.*

^{a)} *getestet als Diastereomeregemisch.*

Auffälligerweise besitzt das Sulfid **85** die größte inhibitorische Wirkung. Die durch die Generierung eines neuen Stereozentrums am Schwefelatom der Sulfoxide isolierten drei Diastereomere weisen jeweils unterschiedliche, aber geringe Aktivität auf. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Sulfongruppe als Amidsurrogat wiederum mit einer Aktivitätsminderung einhergeht. Zusammenfassend bleibt zu vermerken, daß diese Substanzklasse eine sehr interessante in Hinblick auf weitere Untersuchungen darstellt.

4.6 C-Terminale Modifikation der Leitstruktur

Die Synthese von α -Alkylphosphonsäuren wurde in den letzten Jahrzehnten viel untersucht. Von besonderem Interesse war und ist die Suche nach biologisch aktivem Ersatz für die entsprechenden Carbonsäurefunktionen. Aminoalkyl-Phosphonsäuren wurden ausführlich in

Bezug auf ihre enge Verwandtschaft zu Aminosäuren und biologisch aktiven Peptiden untersucht.

Der isosterische Ersatz der Carboxylatgruppe durch die Phosphonat-Einheit geht einher mit beträchtlichen Änderungen der chemischen Eigenschaften der Aminosäure. Der bedeutendste Unterschied zwischen den beiden Gruppen liegt in ihren pK_a -Werten. Während eine gewöhnliche Carboxylat-Funktion einer Aminosäure in biologischen Peptiden einen pK_a -Wert von ungefähr 4 besitzt, hat ein Ersatz durch eine Phosphonsäure zur Folge, dass eine Gruppe entsteht, welche bei jedem physiologischem pH-Wert anionisch ist. Außerdem existiert neben der ersten starken Protolyse-Stufe noch eine zweite schwächere Säurefunktion mit einem pK_{a2} -Wert ~ 8 .

Phosphono- bzw. Phosphino-Peptide repräsentieren eine Gruppe von Peptidmimetika, deren biologische Eigenschaften in den letzten Jahren mit steigendem Interesse untersucht worden sind. Als strukturelle Analoga von Peptiden fungieren sie als deren Antagonisten und konkurrieren mit ihren Carboxylat-Gegenstück um aktive Bindungsstellen von Enzymen als Übergangszustand-Analoge für das tetraedrische Intermediat bei Serin-Proteasen und bzw. den natürlichen Liganden von Zell-Rezeptoren.^[311] Dies ist trotz der vielseitigen Unterschiede zwischen Phosphonsäure- und Carbonsäure-Gruppen möglich. Sie unterscheiden sich in folgenden Punkten:

- in Bezug auf die Größe ist die Phosphonsäuregruppe beträchtlich raumfüllender
- die Gestalt betreffend ist die Carboxylat-Funktion planar im Gegensatz zur tetrahedralen Phosphonsäure
- in der Acidität unterscheiden sich beide Funktionalitäten um mindestens 3 pK_a -Einheiten.

Bezüglich der biologischen Aktivität von Phosphono- bzw. Phosphino-Peptiden zeigt sich ihre Nützlichkeit bevorzugt in natürlichen und synthetischen antibakteriellen Wirkstoffen^[312-320] und Protease-Inhibitoren.^[311, 321-332] Auch herbizide und neuroregulatorische Wirksamkeit wurde für diese Substanzen nachgewiesen.

Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass zahlreiche Phosphonsäure-Analoga des Dihydrofolsäure-Reduktase Antagonisten Methotrexat (Abb. 4.33) welches cytostatische Aktivität (Einsatz z.B. bei Lymphomen) besitzt und besonders bei entzündlichen rheumatologischen Erkrankungen (z.B. RA und Psoriasis) eine Standard-Basistherapie darstellt, synthetisiert worden sind. Keines dieser Derivate erreicht annähernd die Aktivität von Methotrexat.^[333-335]

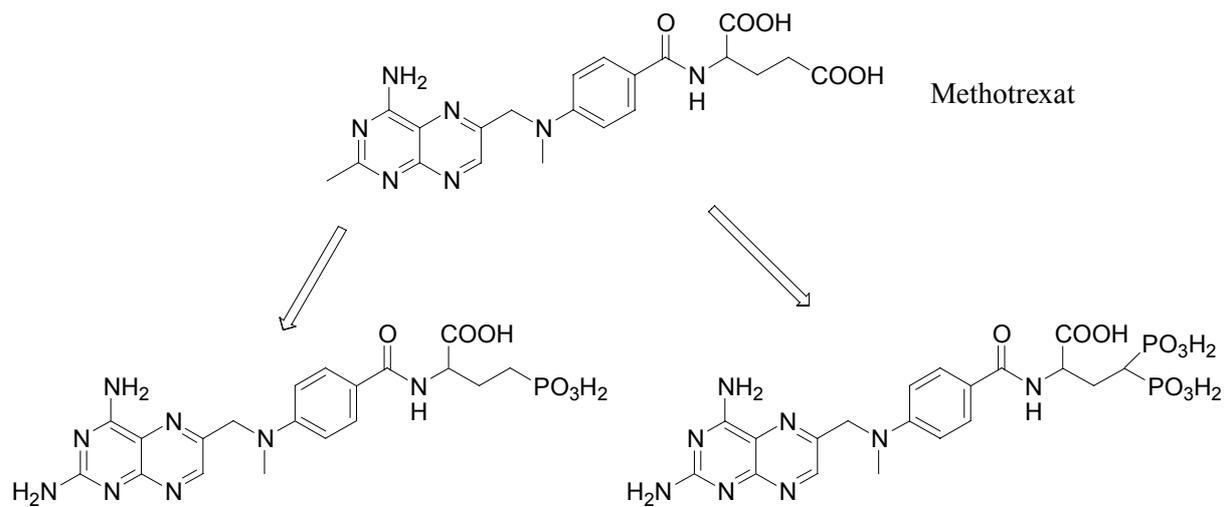


Abbildung 4.33: *Methotrexat und inaktive Phosphonsäurederivate.*

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung von Phospho-Peptiden bzw. Phosphinat- oder Phosphonat-modifizierten Peptidmimetika als therapeutische Agentien ist ihre vernachlässigbare Toxizität erwähnenswert.

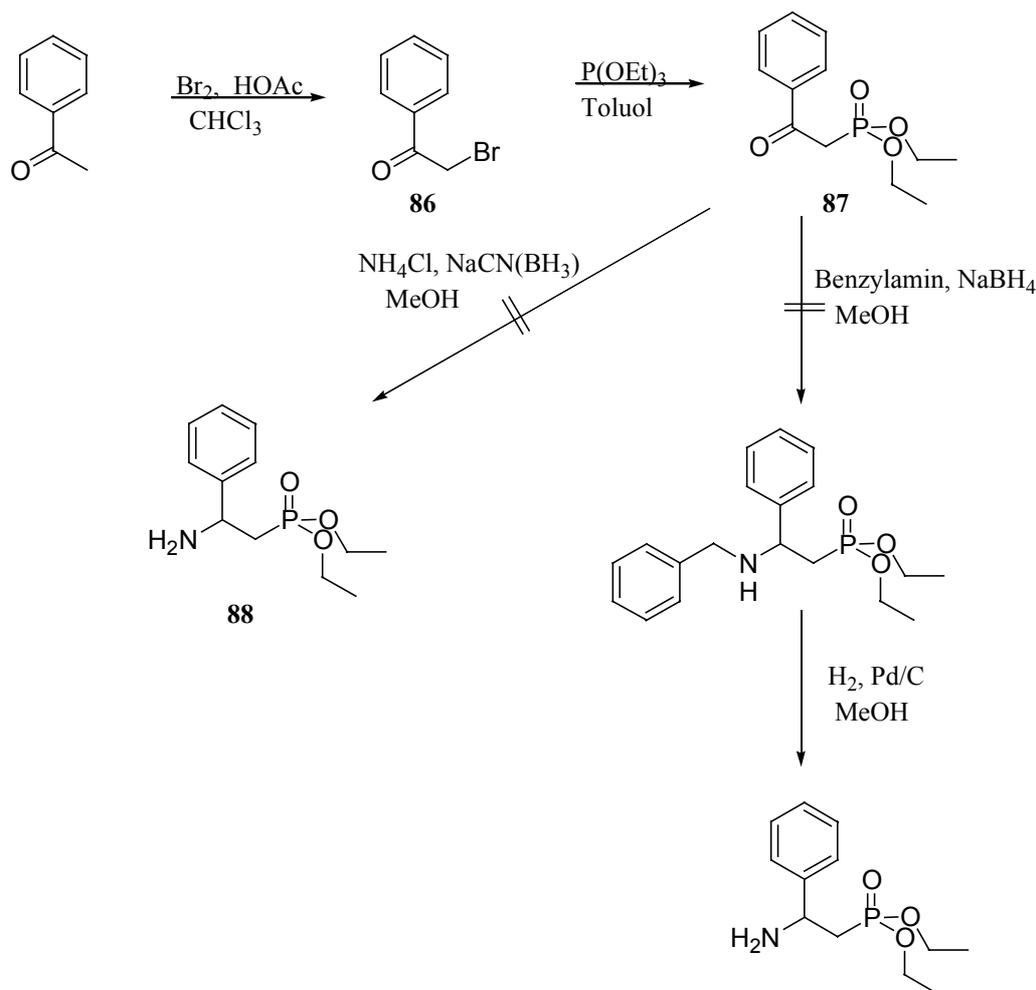


Abbildung 4.34: Ursprüngliche Versuche zur Synthese von Diethyl-2-amino-2-phenylethylphosphonat.

Die ursprünglich geplante Synthese dieses C-terminalen Bausteins begann mit der α -Bromierung von Acetophenon unter Säurekatalyse. Dieses aktivierte Bromid ergab in der anschließenden Abuzov-Reaktion den 2-Keto-phosphonsäureester. Die literaturbeschriebene reduktive Alkylierung mit Ammoniumchlorid und Natriumcyanoborhydrid lieferte das gewünschte Reaktionsprodukt nicht (Abb. 4.34).^[336] Ein alternativer Reaktionsweg, der die Birch-Reduktion mit Benzylamin und anschließende reduktive Entfernung der Benzylgruppe beinhaltete, wurde ebenfalls verworfen, da als Reduktionsprodukt der ersten Stufe lediglich die 2-Hydroxy-Verbindung isoliert werden konnte.

Schließlich gelang die Synthese in einer dreistufigen Reaktionsfolge ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Diethyl-2-phenyl-ethyl-phosphonat (Abb 4.35). Das benzyliche Bromderivat erhält man aus der radikalischen Bromierung mit *N*-Brom-succinimid in Tetrachlorkohlenstoff in guten Ausbeuten. Die anschließende nucleophile Substitution mit

Natriumazid liefert das Eliminierungsprodukt als Nebenprodukt, welches nach der Hydrierung des Rohproduktes der Substitutionsreaktion säulenchromatographisch vom gebildeten Amin abgetrennt werden kann.

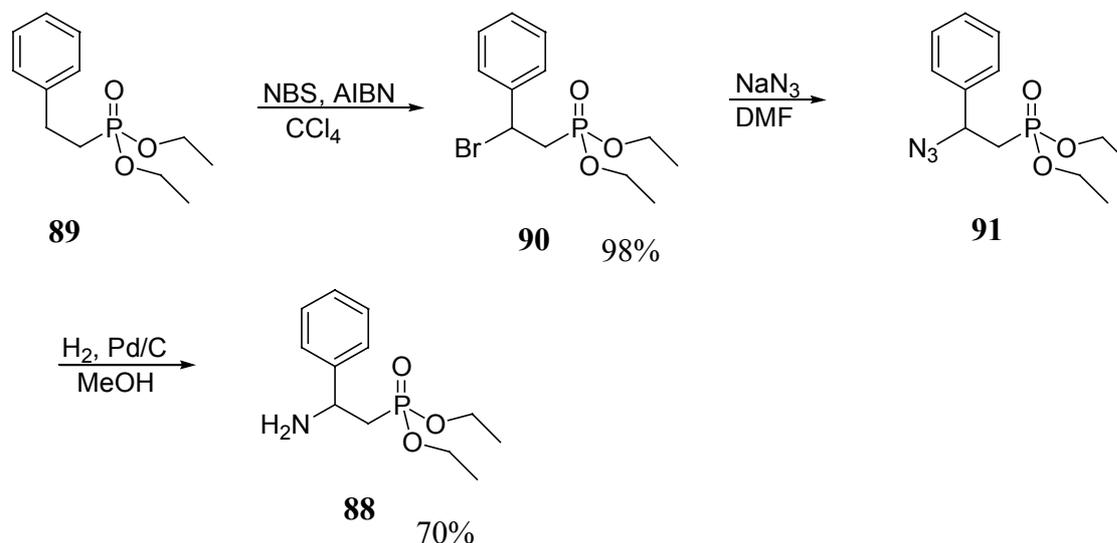


Abbildung 4.35: Synthese des Phospho-mimetikums der 3-Amino-3-phenyl-propionsäure.

Der so synthetisierte Baustein wird in der Lösungssynthese in Standard-Kupplungs-Protokollen eingesetzt. Als *N*-terminaler Baustein wurde die 3-Keto-carbonsäure **5** gewählt, welche mit der 3-Amino-3-phenyl-propionsäure als C-terminalen Baustein zur bisher aktivsten Verbindung geführt hat. Somit würde eine direkte Bewertung des Eisflusses der Phosphonsäure möglich. Bei der Kupplung in Dichlormethan mit EDCI war die Verwendung von HOBT obligat, da ohne den Zusatz, die Nebenreaktion lediglich zu Addukten mit dem Kupplungsreagenz führt. Dieses Reaktionsprodukt wurde bei mehreren entsprechenden Reaktionsansätzen in der Abwesenheit von HOBT bei der massenspektroskopischen Analyse anhand des Signals [Säurekomponente+EDCI+H]⁺ im ESI-MS beobachtet. Bezüglich der Bildung dieses Säurekomponente-EDCI-Adduktes wurde angenommen, dass es sich über den Isoharnstoff nach intramolekularem Acylshift bildet (Abb. 4.36). Dabei bildet sich ein *N*-acylierter Harnstoff, der nicht mehr in der Lage ist den Acylrest auf Aminkomponenten zu übertragen. Diese Beobachtung ist in der Peptidchemie lange bekannt.^[337]

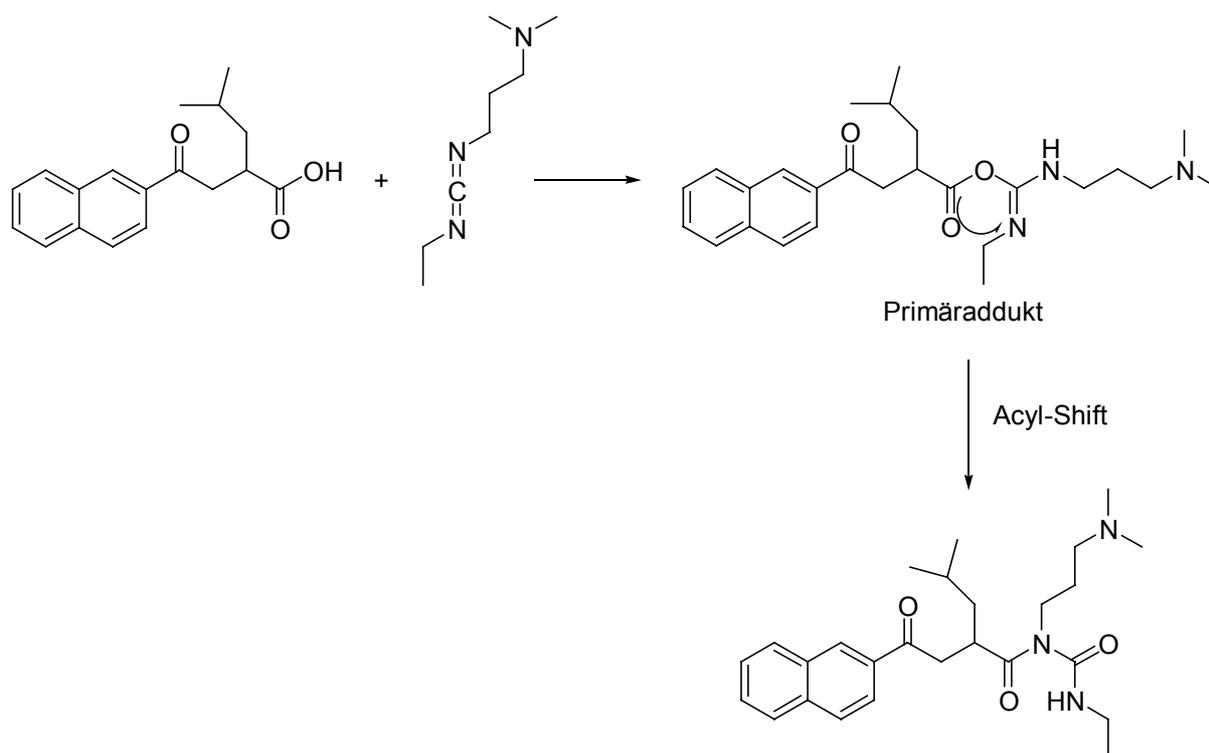


Abbildung 4.36: Mechanismus der Bildung des Säurekomponente-EDCI-Adduktes in Abwesenheit von HOBt.

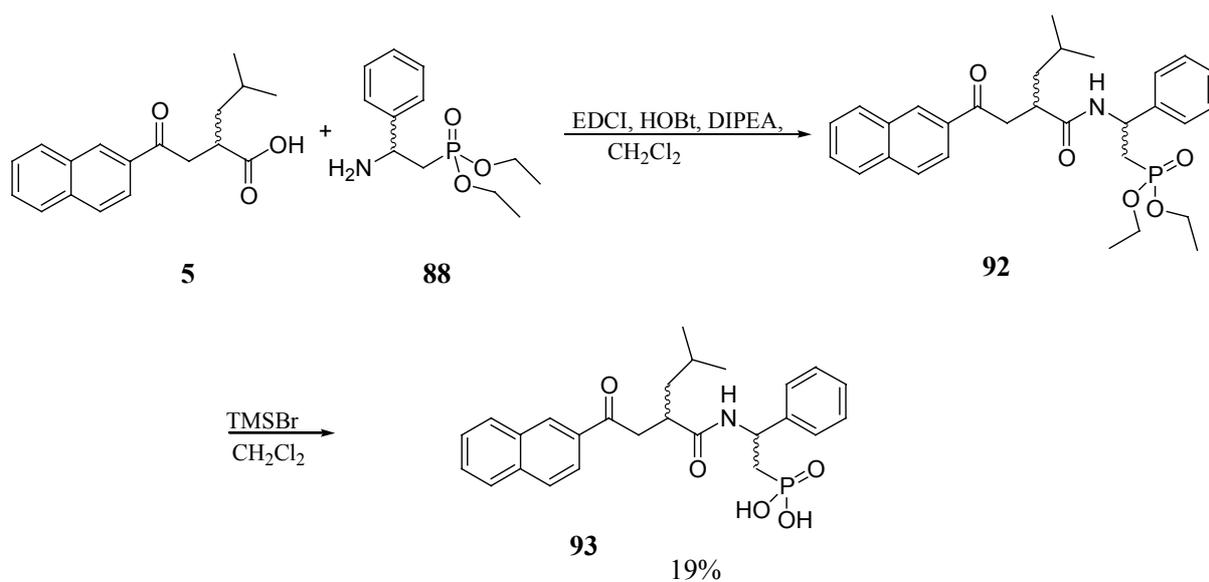


Abbildung 4.37: Phosphonsäure-Derivat **93** des Mimetikums **6a**.

Es wurden verschiedene Entschützungsverfahren für den Phosphorsäureester evaluiert, von denen alle als Hauptprodukt eine Verbindung mit einer um 18 Masseneinheiten geringeren Masse als der gewünschten freien Phosphorsäure bildeten (Abb. 4.37). Dieses Eliminierungsprodukt besitzt eine geringere Polarität als die als Diastereomerenpaar anfallenden Phosphorsäuren. Dieses Eliminierungsprodukt wurde nicht weiter untersucht. Von den erprobten Entschützungsverfahren: a) reines Trimethylsilyliodid, b) 10% Trimethylsilyliodid in DCM, c) reines Trimethylsilylbromid oder 5 eq. Trimethylsilylbromid in Dichlormethan erwies sich die letzte als effektivste. Der Phosphorsäurediethylester war in der Regel nach Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur vollständig umgesetzt.

| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 |
|---------------------------------------|----------------|--|
| <p>93 a</p> <p>93 b</p> | | <p>a) 18 +/- 3</p> <p>b) 16 +/- 6</p> |

Tabelle 4.9: *Biologische Evaluierung von Phosphorsäurederivaten.*

Beim Vergleich der beiden erhaltenen Diastereomeren nach der Entschützung wurde nur ein marginaler Unterschied in den Aktivitäten beobachtet (Tab. 4.9). Zudem wurden die Verbindungen im Zelladhäsionsassay wieder als „optisch auffällig“ beschrieben, was die Vermutung nahe legt, dass die inhibierende Wirkung nicht unbedingt auf eine Konkurrenz um den Rezeptor zurückzuführen ist.

4.7 Thiazol-Gerüstmimetika

Der isostere Einbau von heterocyclischen Einheiten in Peptidmimetika ist ein vielseitig bearbeitetes Gebiet. Es wurden in diesem Fall thiazolheterocyclische Verbindungen mit gleichzeitiger konformationeller Einschränkung der Leucin-Seitenkette synthetisiert und untersucht (Abb. 4.38).

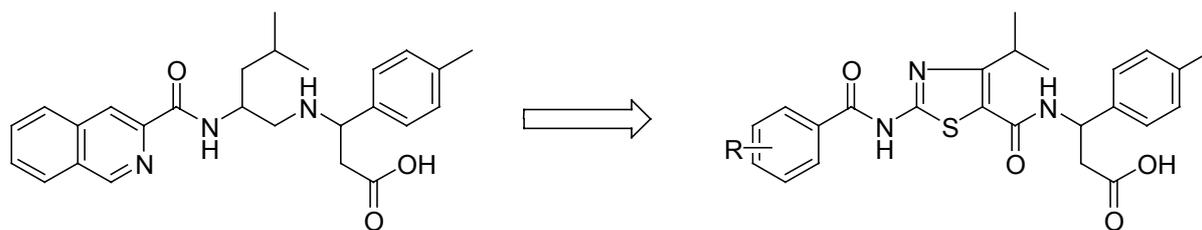


Abbildung 4.38: Thiazolgerüst-Analoga mit eingeschränkter Flexibilität der Leucin-Seitenkette.

Ausgehend vom 4-Methyl-3-oxo-pentansäuremethylester wurde diese 1,3-Dicarbonylverbindung in der 2-Position in wässrigem Medium bromiert und das Substitutionsprodukt nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ohne weitere Aufreinigung mit Thioharnstoff in Methanol zum Thiazolheterocyclus kondensiert (Abb. 4.39).

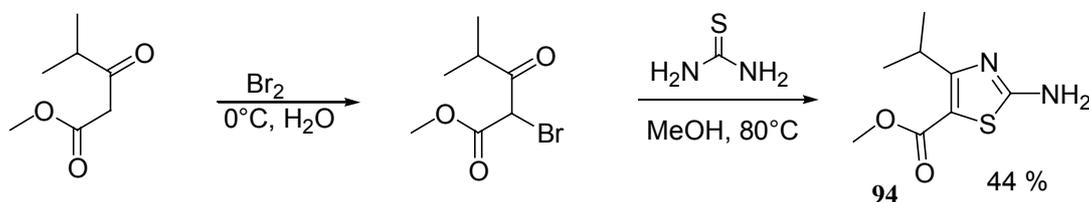


Abbildung 4.39: Synthese von 2-Amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäuremethylester.

Der Versuch diese Verbindung nach Esterhydrolyse und anschließender Protektion der Aminogruppe mit der Fmoc-Gruppe für die Festphasensynthese zugänglich zu machen, scheiterte, da sich der Heterocyclus mit der unacylierten, freien Aminogruppe als basenlabil herausstellte und unter Zersetzung abreagierte.

Deshalb wurde die Aminogruppe zuerst in Lösung mittels EDCI mit einer Auswahl aromatischer Carbonsäuren acyliert, anschließend der Methylester mit LiOH in Dioxan / Wasser verseift und die freie Säure an die 3-Amino-3-aryl-propionsäure gekuppelt (Abb. 4.40).

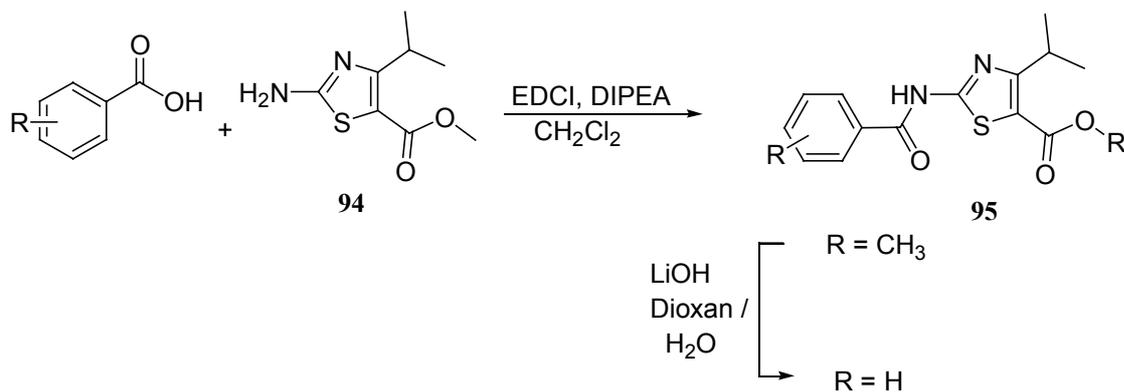


Abbildung 4.40: Synthese *N*-acetylierter Aminothiazole als Bausteine für die Darstellung konformationell eingeschränkter $\alpha 4\beta 7$ -Integrin antagonisten.

Die biologisch getesteten Verbindungen mit Thiazolgerüst weisen die in Abbildung 4.41 gezeigte allgemeine Strukturformel **96** auf. In Tabelle 4.10 sind die Ergebnisse der Zelladhäsionsassays dargestellt.

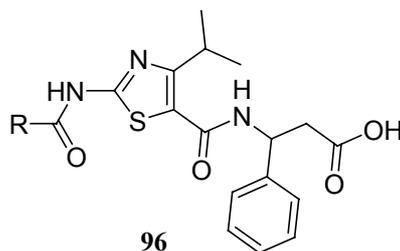


Abbildung 4.41: Allgemeine Struktur der Thiazolgerüstmimetika.

| Verbindung | Rest (R) | Zelladhäsion [%] | |
|------------|-----------------|------------------------------|----------------------------|
| | | $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 |
| 96 a | Phenyl | 25 +/- 5 | 16 +/- 10 |
| 96 b | 2-Naphthyl | 6 +/- 0 | n.d. |
| 96 c | 1-Naphthyl | 30 +/- 3 | 55 +/- 21 |
| 96 d | 2-Phenyl-phenyl | 12 +/- 3 | n.d. |

Tabelle 4.10: Biologische Evaluierung der Thiazolbibliothek.

Diese Ergebnisse sind ermutigend in Hinblick auf eine zukünftige Verwendung von heterocyclischen Gerüstmimetika. Der *hit 96 b* sollte jedoch durch eine größere Vielfalt von strukturanalogen Verbindungen validiert werden.

4.8 Phenolether als Gerüstmimetikum

4.8.1 3-[[2(S)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren

Da die bisherigen Untersuchungsergebnisse bestätigten, daß die *N*-terminale Amidbindung über die Leucineinheit durch aromatische Substitution ersetzbar ist, und somit wohl nicht über Wasserstoffbrücken am Bindungsmodus des Liganden partizipiert, konnte jetzt nach weiteren Strukturen gesucht werden, die lediglich das Motiv: Leucin-Seitenkette / 3-Aryl- β -Aminosäure als konserviertes Strukturelement enthielten. Hierbei wurde nach einem Weg gesucht, das Stereozentrum des Leucins enantiomerenrein, d.h. in der dem natürlichen Liganden eigenen L-Konfiguration einzusetzen. So wird die mit dem Vorhandensein des zweiten Stereozentrums der racemisch eingesetzten 3-Amino-3-aryl-propionsäure zwangsläufige Bildung von nicht-trennbaren Enantiomeren vermieden.

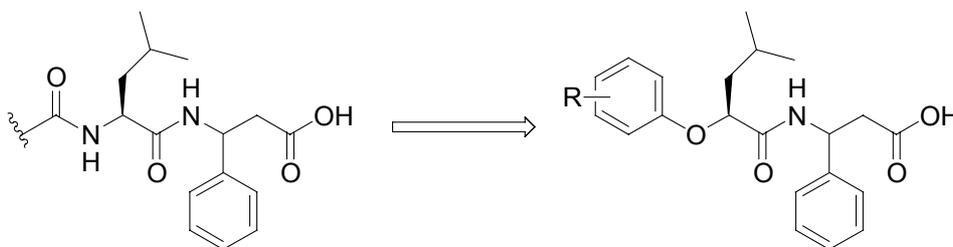


Abbildung 4.42: Phenolether als Amidbindungssurrogate.

Unter den vielen bekannten Methoden der enantioselektiven Synthese bietet der Zugriff auf enantiomerenreine Ausgangsstoffe und deren stereochemisch eindeutig verlaufende Modifizierung einen einfachen Zugang zu enantiomerenreinen Reaktionsprodukten. Als Reaktion dieses Typs bietet sich wiederum die vielseitig einsetzbare Mitsunobu-Reaktion zu Phenolethern an (Abb. 4.42), welche aufgrund des ihnen eigenen S_N2 – Mechanismus sekundäre Alkohole unter Inversion mit H-aciden Komponenten zu den entsprechenden Kupplungsprodukten umsetzen.

In diesem Fall wurde das kommerziell erhältliche D-Leucin verwendet, welches in der in Eisessig unter Retention verlaufenden Desaminierungsreaktion zur *D*-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure reagiert (Abb. 4.48). Der anschließende Kupplungsschritt mit dem 3-Amino-3-phenyl-propionsäureester liefert die beiden säulenchromatographisch trennbaren Diastereomeren. Nach der selektiven Entschützung der Hydroxygruppe zum sekundären Alkohol entsteht bei der Mitsunobureaktion mit verschiedenen H-aciden Komponenten unter Inversion der Konfiguration die Leucin-Seitenkette wieder in der natürlichen *L*-Konfiguration (Abb. 4.43). Als Reaktionspartner und H-acide Komponente bieten sich Phenole an, die kommerziell in großer Variation zugänglich sind und sich so ausgezeichnet im Einsatz zur kombinatorischen Chemie eignen. Die biologische Bewertung der so erhaltenen Bibliothek von 3-[[2(*S*)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren ist in Tabelle 4.11 zusammengefaßt.

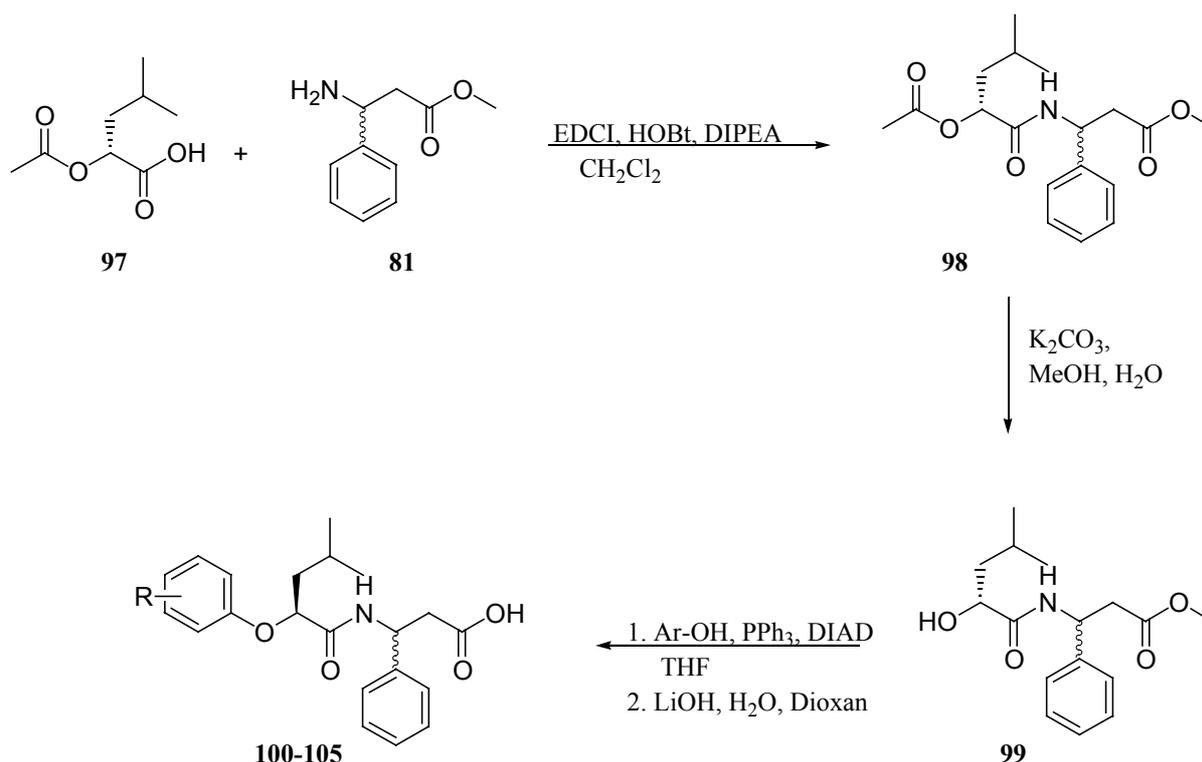


Abbildung 4.43: Synthese von 3-[[2(*S*)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren in Lösung.

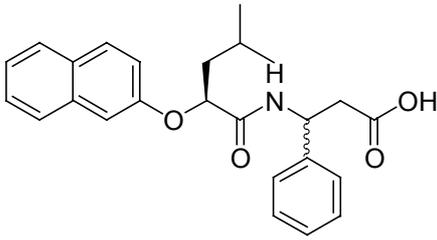
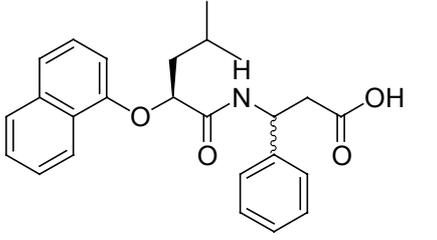
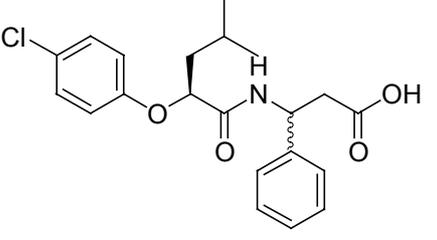
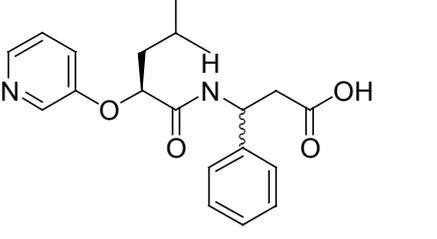
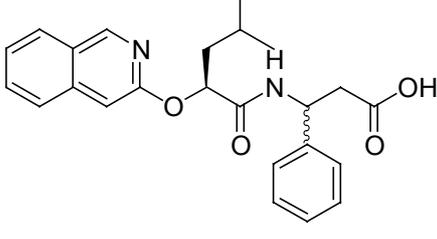
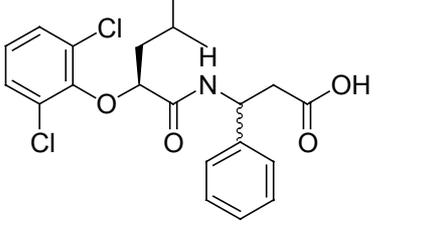
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 |
|------------|---|--|--|
| 100 |  | 46 +/- 12 | n.t. |
| 101 |  | 31 +/- 2 | n.t. |
| 102 |  | 35 +/- 2 | 42 ^{a)} |
| 103 |  | | n.t. |
| 104 |  | | n.t. |
| 105 |  | 15 +/- 2 | n.t. |

Tabelle 4.11: Biologische Evaluierung der 3-[[2(S)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren **100-105.** ^{a)} aus Einfachbestimmung.

4.8.2 Festphasensynthese von 3-[[2(S)-Aryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren

Angesichts der Möglichkeit einer weiteren Modifizierung des *N*-Terminus dieser neuen Klasse von Arylethern ist über eine Festphasenstrategie der Synthese nachgedacht worden. Dafür muss eine festphasenkompatible Hydroxyl-Schutzgruppen-Strategie entwickelt werden. Für den Schutz der Hydroxygruppe wurde bereits in Kap. 4.4.4.2 die THP-Schutzgruppe als äußerst zweckmäßig beschrieben.

Ein selektiver Schutz der Hydroxygruppe in Gegenwart der Carbonsäurefunktion ist nicht möglich und führt stattdessen zu einer Mischung aus THP-Ethern, THP-Estern und nicht umgesetzten Ausgangsstoff (Abb. 4.44).

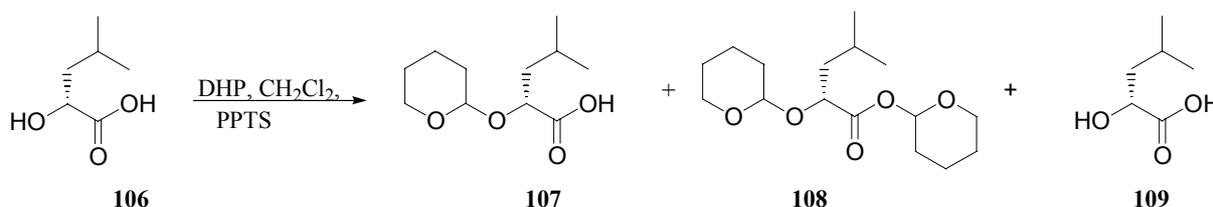


Abbildung 4.44: Unselektive THP-Schutzgruppeneinführung.

Die Synthese von **107** gelang wie in Abbildung 4.45 beschrieben nach Umschüttung der Acetoxy-4-methyl-pentansäure, Schutz der α -Hydroxygruppe und anschließende alkalische Verseifung. Der Baustein **107** war so der Festphasensynthese zugänglich. Zur anschließenden Entschüttung wurden dieselben Reaktionsbedingungen, wie für die Entschüttung von Phenolen angewendet (s. Kap. 4.4.4.2) und die Mitsunobu-Reaktion ebenfalls nach dem bisher etablierten Protokoll durchgeführt. Jedoch konnte kein Kupplungsprodukt nach der Abspaltung von Harz detektiert werden. Falls die Reaktion aufgrund sterischer Barrieren am sekundären Alkohol nicht möglich sein sollte, wäre eventuell an eine Optimierung mit sterisch weniger anspruchsvollen Phosphinderivaten zu denken, jedoch wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

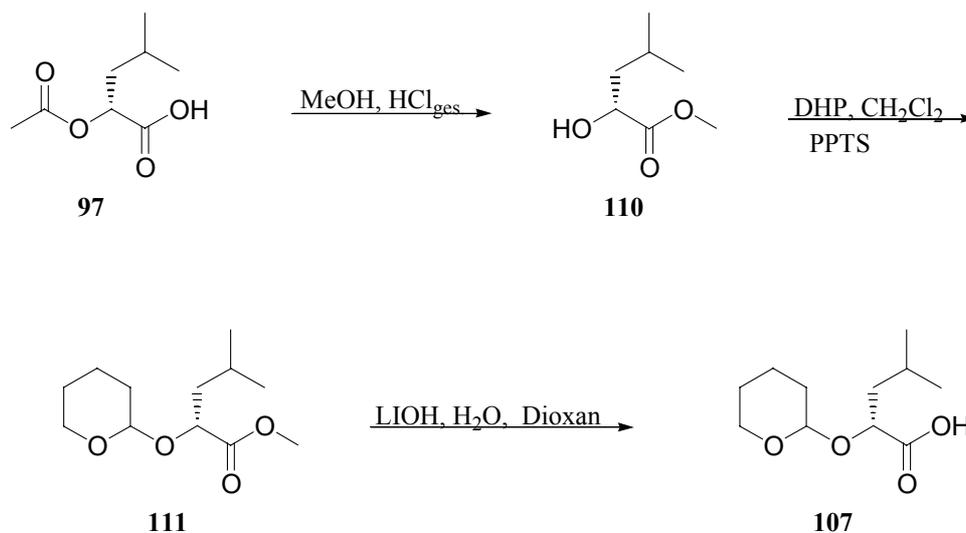


Abbildung 4.45: THP-geschützte D-Leucin-Mimetika für die Festphasensynthese.

4.8.3 Biaryle als Gerüstmetika

Die Synthese von Biaryl-funktionalitäten in Peptidmimetika ist von besonderem Interesse, da angesichts der Evaluierung von Wirksamkeitseigenschaften, die Biphenylgruppe und Biaryle im allgemeinen eine besondere Häufung in proteinbindenden Substanzen aufweisen. Diese Baueinheiten werden unter diesen Gesichtspunkten als „privilegierte Strukturen“ angesehen und besitzen eine hohe Wahrscheinlichkeit als Template für die Entdeckung und das Design von Therapeutika mit hoher Affinität und Spezifität zu dienen.^[338]

Im Folgenden ist die Festphasensynthese von Biaryl-funktionalisierten LDT-Mimetika beschrieben, die nach Kupplung von in Lösung synthetisierten Iodaromatenhaltigen Bausteinen über die Suzuki-Biaryl-Kupplung an Wang-Harz zugänglich wurden.

4.8.3.1 Die Suzuki-Reaktion

Der relativ kleine Elektronegativitätsunterschied zwischen Kohlenstoff (2.55) und Bor (2.04), im Vergleich mit Lithium, Magnesium und den Übergangsmetallen, bedeutet, dass Organobor-Verbindungen normalerweise nicht mit Elektrophilen wie organischen

Halogenverbindungen reagieren. Suzuki und Miyaura beschrieben 1979 die Kupplung von Alkenylboranen in der Gegenwart von Pd(0)-Katalysator mit Alkenyl- und Alkynyl-, Aryl- und Benzyl-Halogeniden.^[339-341]

Es war ihre Entdeckung, dass stabile, leicht zu handhabende Arylboronsäuren in der Gegenwart von Basen eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung mit Arylhalogeniden eingehen (Abb. 4.46). Dies führte zu einem großen Interesse an dieser Reaktion und eine Vielzahl von Reaktionen wurden in der Folge entwickelt, um unsymmetrische Biaryle und verwandte Verbindungen zu synthetisieren.

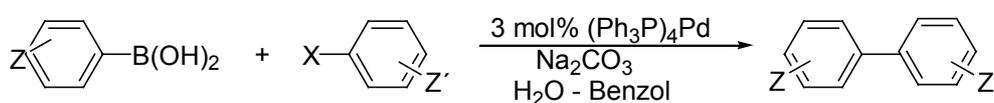


Abbildung 4.46: Biaryl-Kreuzkupplung.

Früher wurden für solche Synthesen die Kupplung von hochreaktiven organometallischen Reagentien (Grignard, Organolithium, Organozinn etc.) mit Arylhalogeniden, häufig in der Gegenwart von verschiedenen Katalysatoren benutzt, die normalerweise streng wasserfreie Bedingungen und inerte Atmosphäre benötigen. Außerdem kommt als limitierender Faktor dazu, dass die Anwesenheit von funktionellen Gruppen nicht toleriert wird. Im Gegensatz dazu wird die Suzuki-Kupplung von Boronsäuren normalerweise in der Gegenwart von Wasser durchgeführt und eine Vielzahl von funktionellen Gruppen wird toleriert (Abb. 4.46 und Abb. 4.47). Die sehr vielseitige Stille-Kreuzkupplung verwendet toxische und umweltgefährdende Organozinn-Verbindungen. Unter den Standard Suzuki-Reaktionsbedingungen werden meist Arylbromide als Elektrophile benutzt, jedoch sind Iodide reaktiver. Die erfolgreiche Kupplung von leichter erhältlichen, jedoch normalerweise unreaktiven Arylchloriden wird unter modifizierten Bedingungen entweder mit Palladium-^[342-345] oder Nickel-Katalysator erreicht.^[346-348] Wegen ihrer Vielseitigkeit und den milden Reaktionsbedingungen findet die Suzuki-Reaktion breite Anwendung in der Festphasensynthese.^[349-352]

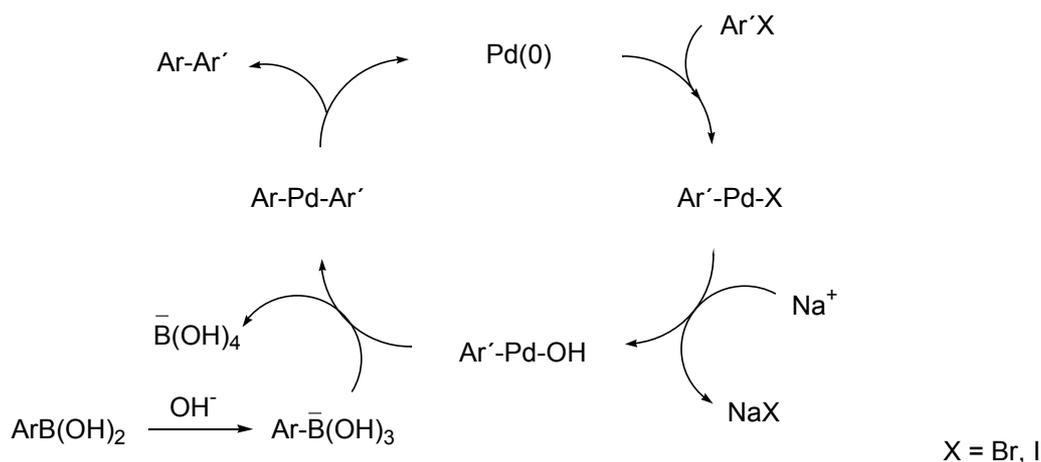


Abbildung 4.47: Katalytischer Kreislauf der Suzuki-Biaryl-Kupplung.^[353-355]

4.8.3.2 Festphasensynthese von [[2-(S)-Biaryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren

Im Folgenden ist die Festphasensynthese von Biaryl-funktionalisierten LDT-Mimetika beschrieben, die nach Kupplung von in Lösung synthetisierten iodaromaten-enthaltenden Bausteinen über die Suzuki-Biaryl-Kupplung an Wang-Harz zugänglich wurden.

Das über die Desaminierung von D-Leucin in Eisessig zugängliche Acetoxyderivat wird über die Kupplung mit *tert.*-Butanol an der Säurefunktion geschützt und anschließend die Acetylgruppe unter schwach basischen Bedingungen entfernt (Abb. 4.48).

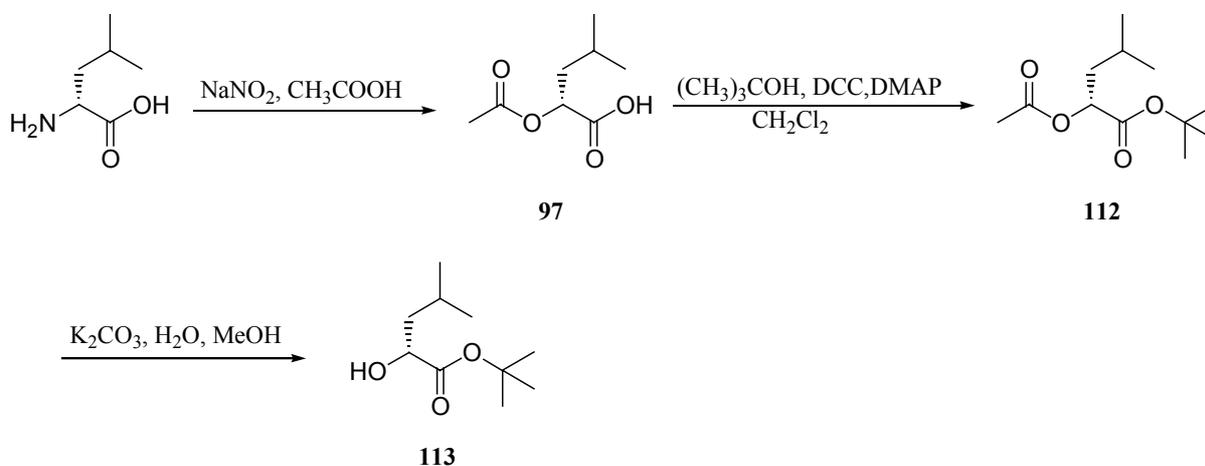


Abbildung 4.48: Darstellung des (R)-2-Hydroxy-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylesters.

Die so erhaltenen α -Hydroxy-derivate des D-Leucins werden nun unter Konfigurationsumkehr in einer Mitsunobu-Reaktion mit drei stereoisomeren Iodphenolen zu den verschiedenen (*S*)-2-Iodphenoxy-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylestern umgesetzt, die nach Entschützung der *tert*-Butylgruppe als Bausteine in der Kupplungsreaktion mit immobilisierten β -Amino- β -arylpropionsäuren eingesetzt werden können (Abb 4.49).

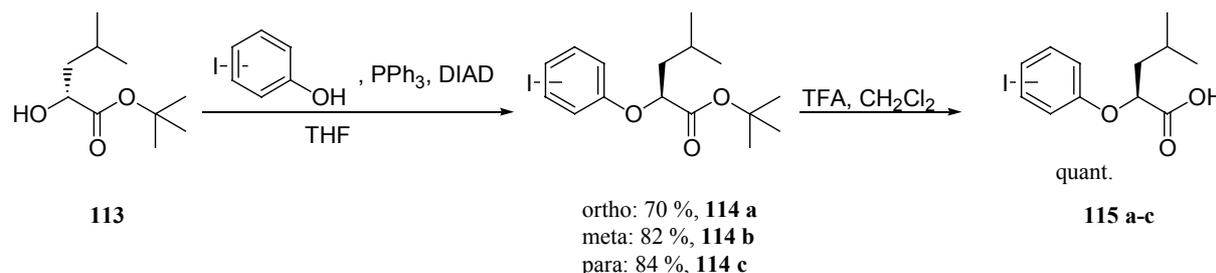


Abbildung 4.49: Stereoselektive Synthese (*S*)-Iodphenoxy-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylestern **115 a-c**.

Vor der parallelen kombinatorischen Synthese mit verschiedenen Arylboronsäuren wurden die optimalen Reaktionsbedingungen evaluiert, indem systematisch verschiedene Lösungsmittelsysteme (DMF bzw. DMF/ H_2O), Basen (NEt_3 bzw. K_2CO_3) und Palladiumkatalysatoren (Palladium-tetrakis-(triphenylphosphin) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), Tris-(dibenzylidenaceton)-dipalladium ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) bzw. Palladium(diphenylphosphinoferrocen)-(II)-chlorid ($\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$)) getestet wurden. Die Verwendung von 2-Thienylboronsäure als Modellkupplungskomponente erbrachte jedoch niemals das gewünschte Produkt. Stattdessen konnten in verschiedenen Ansätzen stabile Insertionsprodukte des Pd-Katalysators in die Kohlenstoff-Iod-Bindung massenspektroskopisch nachgewiesen werden (Abb.4.50).

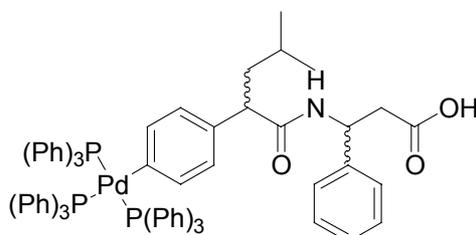


Abbildung 4.50: Detektiertes Nebenprodukt bei der Suzuki-Biaryl-Kreuzkupplung.

Die Verwendung von $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ (20 mol%) in DMF unter Zuhilfenahme von Triethylamin erwiesen sich als beste Reaktionsbedingungen. Alle Reaktionen wurden im Folgenden unter diesen Bedingungen mit 5 eq. Arylboronsäure durchgeführt (Abb. 4.51).

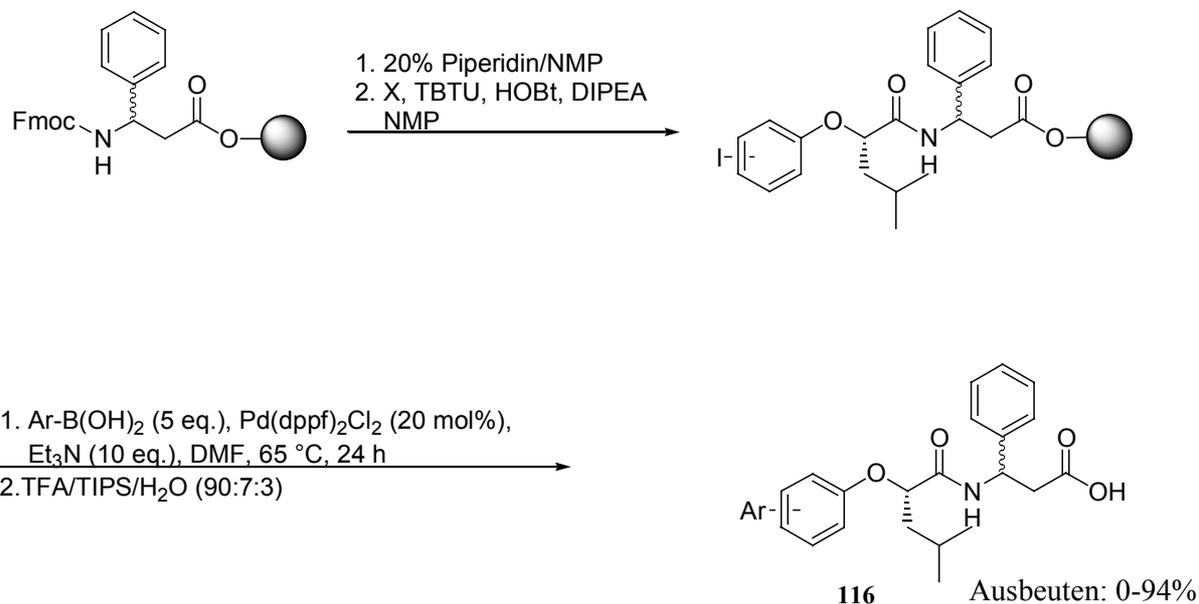


Abbildung 4.51: Suzuki-Reaktion an der festen Phase.

Die Abb. 4.52 demonstriert die strukturelle Diversität der auf diese Weise synthetisierten Bibliothek.

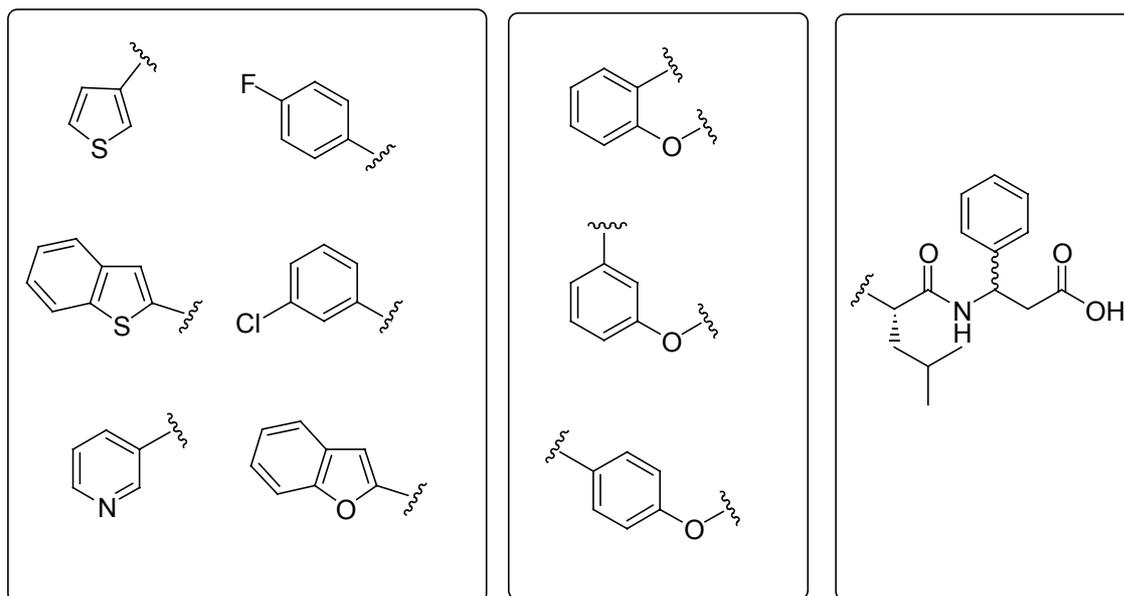


Abbildung 4.52: Bibliothek und strukturelle Diversität der [[2-(S)-Biaryloxy-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuren.

4.9 Reduzierte Amidbindung

Szelke *et al.* zeigten anhand den von ihnen synthetisierten angiotensinogen-analogen Peptiden, dass der Ersatz einer proteolytisch spaltbaren Amidbindung durch die reduzierte Amidbindung (-CH₂-NH-) zu hochaktiven Renin-Inhibitoren führen kann und demonstrierten so zum ersten Mal die Möglichkeit des isosteren Austausches von Peptidbindungen durch nicht-hydrolysierbare Analoge des tetrahedralen Übergangszustandes während der proteolytischen Spaltung.^[356]

Im Rahmen der systematischen Optimierung der tripeptidischen Leitstruktur von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin antagonistischen konnte gezeigt werden, daß die Amidbindung zwischen den beiden Aminosäuren Leucin und Asparaginsäure nicht essentiell ist und ohne Aktivitätsverlust durch die reduzierte Amidbindung [CH₂-NH] ersetzt werden kann.^[299] Die Untersuchung beschränkte sich jedoch auf die C-terminale Amidbindung der auf ein Dipeptid reduzierbaren Leitstruktur. Eine entsprechende Modifikation der N-terminalen Amidbindung würde weiteren Aufschluss über die essentiellen pharmakophoren funktionellen Gruppen geben und gleichzeitig die Entwicklung zu einem vollständig nicht-peptidischem Mimetikum voranbringen.

Als Synthesevorschrift eignet sich die reduktive Aminierung an der festen Phase. An das mit einer 3-Aryl-3-amino-propionsäure belegte Wang-Harz wird unter Standard-Kupplungsbedingungen Fmoc-L-Leucin gekuppelt an dessen freier Aminofunktion die Iminbildung mit aromatischen Aldehyden unter wasserentziehenden Bedingungen (TMOF/CH₂Cl₂) möglich ist. Das an der festen Phase immobilisierte Imin wird im Anschluß mit Natriumtriacetoxyborhydrid in Dichlormethan reduziert und die Zielverbindung schließlich mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten (Abb 4.53).

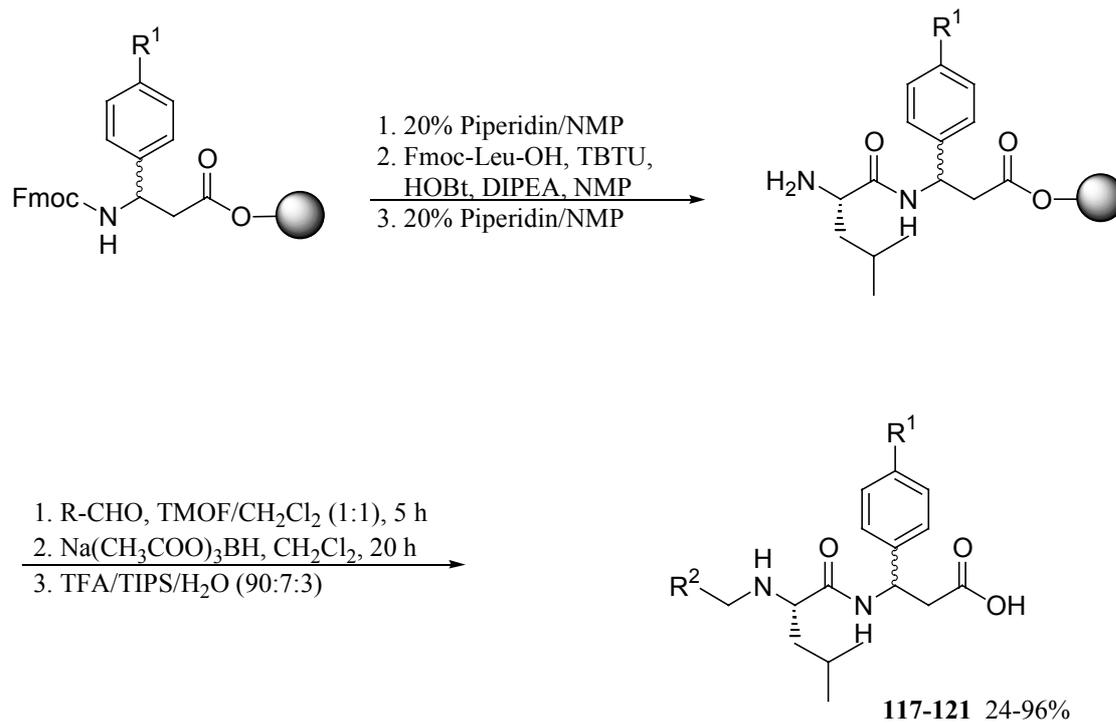


Abbildung 4.53: Synthese von ψ [CH₂-NH]-Isosteren der N-terminalen Amidbindung.

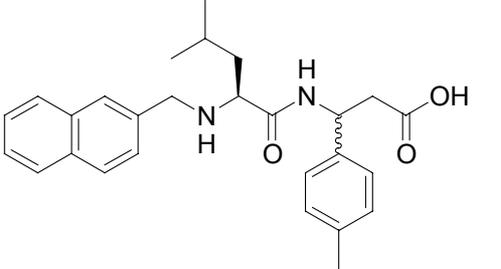
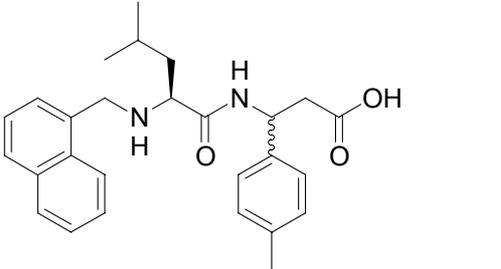
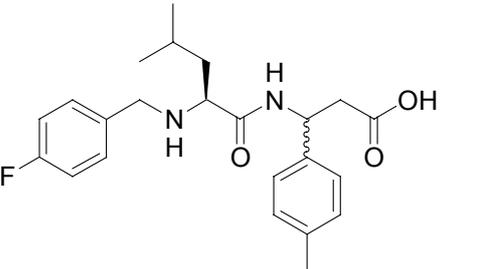
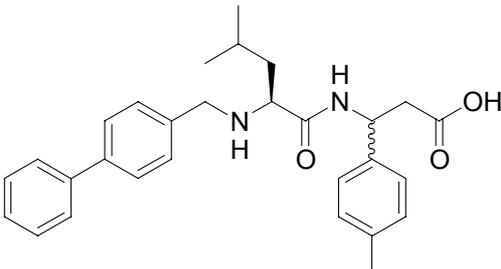
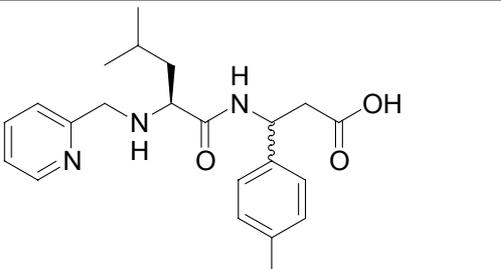
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM- 1 |
|------------|---|--|---|
| 117 |  | 27 +/- 9 | n.t. |
| 118 |  | 44 +/- 2 | n.t. |
| 119 |  | a) 73 +/- 8 b) 73 +/- 12 | n.t. |
| 120 |  | 7 +/- 2 | n.t. |
| 121 |  | n.t. | n.t. |

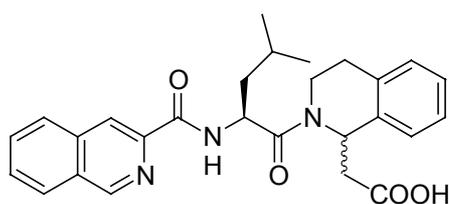
Tabelle 4.12: Biologische Evaluierung der ψ [CH_2-NH]-Isosteren 117-121.

Die hier (Tab. 4.12) beschriebenen Verbindungen mit reduzierter Amidbindung belegen wiederum, dass die Aktivität direkt mit der Ausdehnung des aromatischen Systems korreliert, so dass das Biphenylderivat **120** sich als aktiver als die Naphthyl- bzw Fluorphenylderivate **117**, **118** und **119** erwies.

4.10 Synthese *N*-alkylierter Peptidmimetika

Die Alkylierung der sekundären Aminofunktion der Leitverbindung liefert Informationen über die strukturelle Relevanz der Aminogruppe. Das von D. Gottschling beschriebene *N*-verbrückte Isochinolinderivat (Abb. 4.54) zeigt in Adhäsionsassays keine Inhibierung der Zelladhäsion von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimierenden Zellen an MAdCAM-1.^[299] Dies kann mehrere Gründe haben, z.B. kann das Fehlen des Amid-Protons und das dadurch bedingte Fehlen der Fähigkeit, Wasserstoffbrücken ausbilden zu können. Andererseits und sicher schwerwiegender ist die eingeschränkte Drehbarkeit und fixierte Konformation des 3-Arylrestes der β -Aminosäure im Tetrahydroisochinolin-Gerüst. Zudem hat die Ethylenverbrückung der Amidgruppe mit dem aromatischen Rest einen gewissen Raumbedarf.

Der Einfluss der direkten räumlichen Umgebung der Aminogruppe wurde durch verschiedene Alkylierungsmuster untersucht.



Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM : 106 +/- 11

Abbildung 4.54: *C*-terminales Isochinolin-Derivat besitzt keine Aktivität.

Die Festphasensynthese der sekundären Amine geht von der an Wang-Harz immobilisierten Fmoc- β -Aminosäure aus, die nach Entschützung für 5 h unter wasserentziehenden Bedingungen mit dem Fmoc-geschützten Aminosäurealdehyd des Leucins umgesetzt wird. Das so gebildete Imin wird anschließend mit einer Suspension von Natriumtriacetoxyborhydrid in Dichlormethan über 20 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach

dem Waschen des Harzes kann das Amin am Harz mit Methyljodid bzw. Propargylbromid in DMF bei unterschiedlichen Temperaturen alkyliert werden (Abb. 4.55).

Zur Synthese des unalkylierten sekundären Amins hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Amin intermediär durch die Behandlung mit Boc-Anhydrid zu schützen, bevor der N-Terminus acyliert wird, da unter den Acylierungsbedingungen mit einem Überschuß der Säurekomponente als Nebenprodukt sonst jeweils auch das doppelte Acylierungsprodukt erhalten wird, was sich negativ auf die Ausbeute auswirkt.

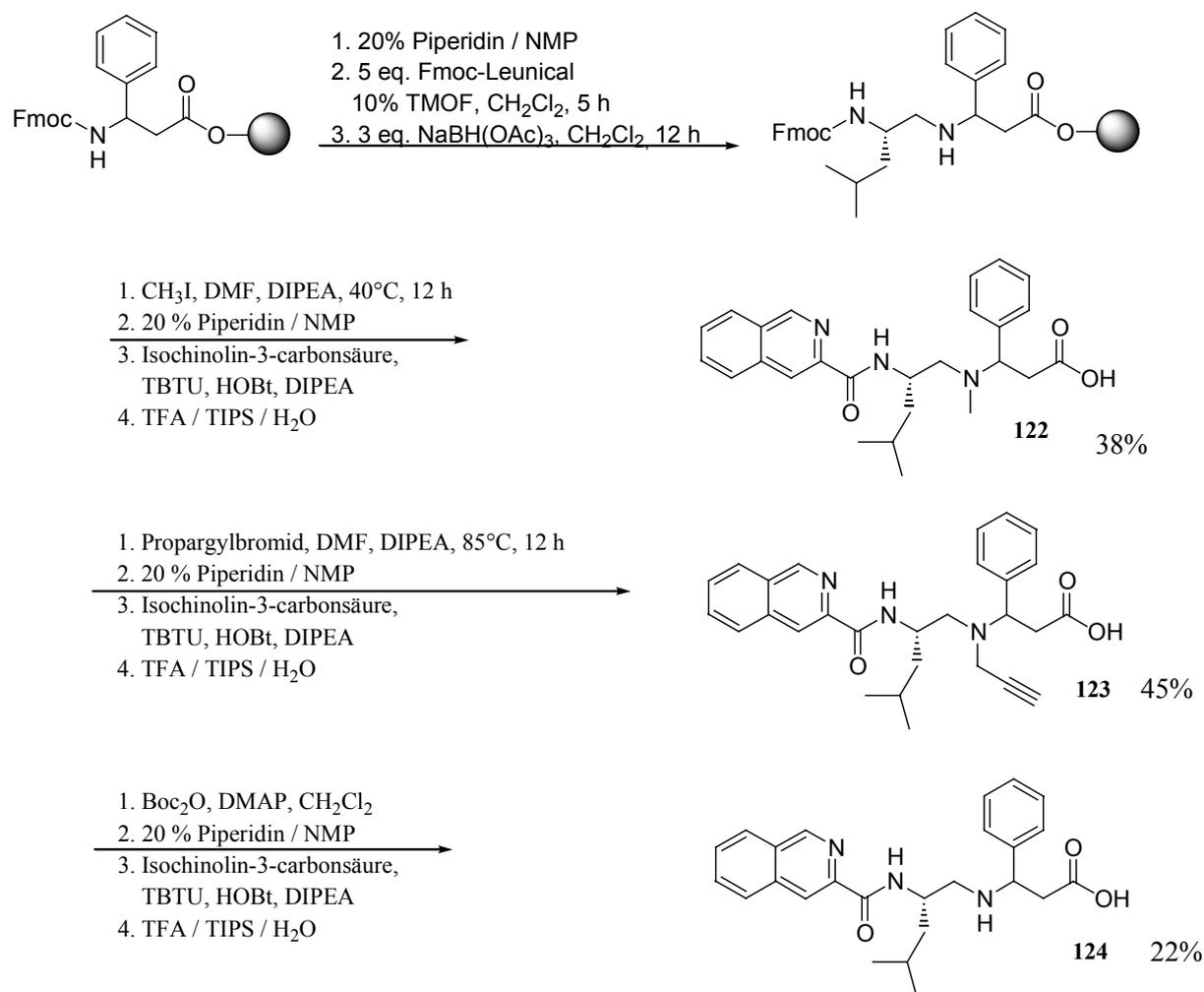


Abbildung 4.55: Alkylierung sekundärer Amine an der Festphase.

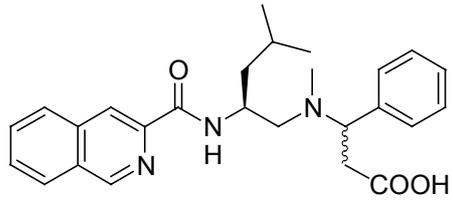
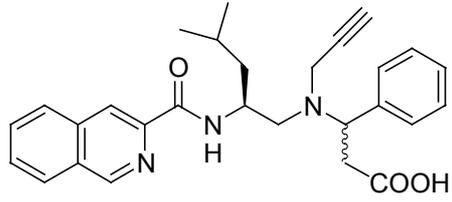
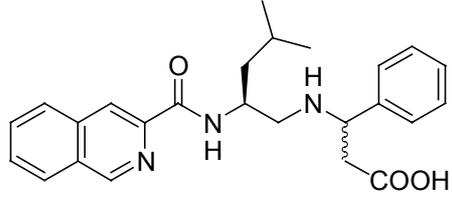
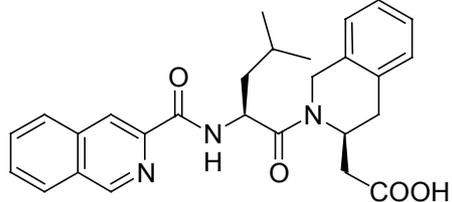
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 |
|------------|---|---|--|
| 122 |  | 25 +/- 3 % | 63 +/- 26 % |
| 123 |  | 38 +/- 2 % | 60 +/- 23 % |
| 124 |  | 30 +/- 3 % | 45 +/- 13 % |
| 125 |  | 80 +/- 24 % | n.t. |

Tabelle 4.13: *Biologische Evaluierung von N-alkylierten Peptidmimetika.*

Auffällig an den in Tabelle 4.13 beschriebenen Aktivitäten ist, das vollständige Fehlen der biologischen Aktivität des überbrückten Derivates **125**, was – angesichts des schon von *D. Gottschling* beschriebenen Verbindung (Abb. 4.54) - letztlich die Vermutung bestätigt, dass jegliche Tetrahydroisochinolinderivate als β -Aminosäuresurrogate ungeeignet sind. Die N-methylierte Verbindung **122** offenbart eine gewisse Differenzierung zwischen den beiden konkurrierenden Rezeptoren und sollte durch Variation des Alkylierungsmusters weiter untersucht werden.

4.11 Untersuchung des Einflusses des 3-Isochinolylcarbonylrestes

Im Zuge der Optimierung der in unserem Arbeitskreis erhaltenen neuen Leitstruktur (s. Kap. 4.1.1), wurde der Versuch unternommen, den Einfluss der den *N*-Terminus acylierenden 3-Isochinolylcarbonsäure bzw. jeweils anderer diese Position einnehmender aromatischen Gerüste zu bewerten. Neben der ein gänzlich planares aromatisches System darstellenden genannten Carbonsäure, wurden in Festphasensynthese ebenfalls die L- bzw. D- 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäuren (L- und D- Tic) als reduzierte Strukturanaloga für die Isochinolin-3-carbonsäure eingesetzt (Abb. 4.56).

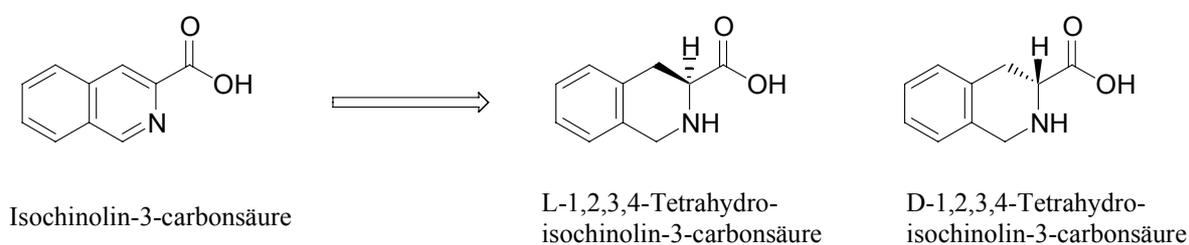


Abbildung 4.56: L- bzw. D- 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäuren als Strukturanaloga der Isochinolin-3-carbonsäure.

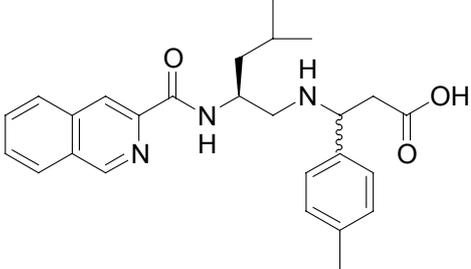
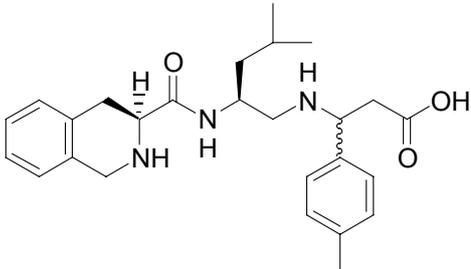
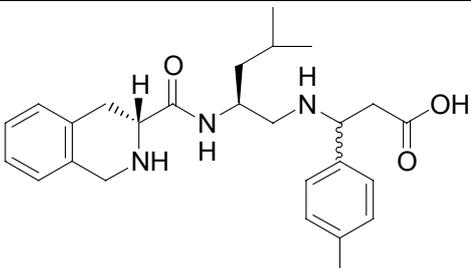
| Verbindung | Strukturformel | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 7$ / MAdCAM-1 | Zelladhäsion [%] $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 |
|------------|---|--|--|
| 126 |  | a) 29 +/- 3 b) 40 +/- 6 | a) n.t. b) 44 +/- 4 |
| 127 |  | 70 +/- 3 | n.t. |
| 128 |  | 35 +/- 3 | 53 ^{a)} |

Tabelle 4.14: Evaluierung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten mit unterschiedlichen Acylierungsmustern des N-Terminus. (^{a)}Einfachbestimmung)

Die bedeutendste Auffälligkeit der vorliegenden Untersuchung (Tab. 4,14) liegt sicherlich in der Beobachtung, dass die strukturanaloge Verbindung mit dem Tic-Baustein in der L-Konfiguration **127** eine weitaus niedrigere Inhibierung verursacht als die sonst gleiche Verbindung mit der D-Tic-Acylierung **128**. Das Vorhandensein eines neuen stereogenen Zentrums bedingt zwei strukturelle Konsequenzen, von denen sich mindestens eine auf die Aktivitätssteigerung auszuwirken scheint:

- a) die sekundäre Aminogruppe des Tic-Bausteins befindet sich je nach Konfiguration des benachbarten Stereozentrums entweder links oder rechts von der Ebene des Moleküls und nimmt somit einen vollständig andere relative Lage im Rezeptor gebundenen Zustand ein, so dass auch verschiedene Wechselwirkungen zu erwarten sind.
- b) der aromatische Rest der Tic-Bausteine weist je nach Konfiguration am C-3 eine unterschiedliche Verdrehung gegenüber der Molekülebene auf (gegen bzw. mit dem Uhrzeigersinn). Zum Vergleich liegt der Aromat bei Verwendung des ungesättigten Isochinolin-3-carbonsäurerests in der Molekülebene.

Nicht zu unterschlagen ist die Tatsache, dass die in den Tic-Bausteinen repräsentierte sekundäre Aminofunktion eine größere Basizität als das Isochinolin-surrogat besitzt, und so zumindest zur verbesserten Löslichkeit beiträgt.

4.12 Beiträge zur Synthese von Alken-Dipeptid-Isosteren

Die Alken-Dipeptid-Isosteren sind Peptidmimetika mit eingeschränkter Rotation um die die Amidbindung, wodurch das gleichzeitige Vorhandensein von *cis-trans* Konformeren auszuschließen ist. Die *trans*-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung erscheint das naheliegendste Mimetikum zu sein, da sie sehr ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Bindungsgeometrie und -länge besitzt. So nimmt die Amidbindung in Peptiden eine planare Konformation ein und besitzt wie die C-C-Doppelbindung eine Bindungslänge von ungefähr 3.8 Å. Im Gegensatz zur Amidbindung, die eine gewisse Flexibilität und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzt, ist die C-C-Doppelbindung in einer Konformation fixiert und verliert die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken (Abb. 4.57). Deshalb können *trans*-Doppelbindungsisostere von Peptiden wertvolle Informationen über die Rolle der Amidbindung an einer bestimmten Stelle des Peptids liefern, da im Falle des Aktivitätserhalts erkannt wäre, dass die Amidbindung nicht direkt an der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur beteiligt ist.

Sie werden weitverbreitet benutzt, um die Bedeutung der Amid-Bindungs-Polarität zu untersuchen,^[357-359] als Baustein für β -*turn* Substrukturen^[357, 358, 360] und um die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptid-Bindungen zu unterdrücken.^[361-366]

Es wurden mehrere erfolgreiche Beispiele bei der Synthese von Analogen des Enkephalins,^[367, 368] ACE-Inhibitoren^[369] und Proteinkinase-Inhibitoren beschrieben.^[370, 371]

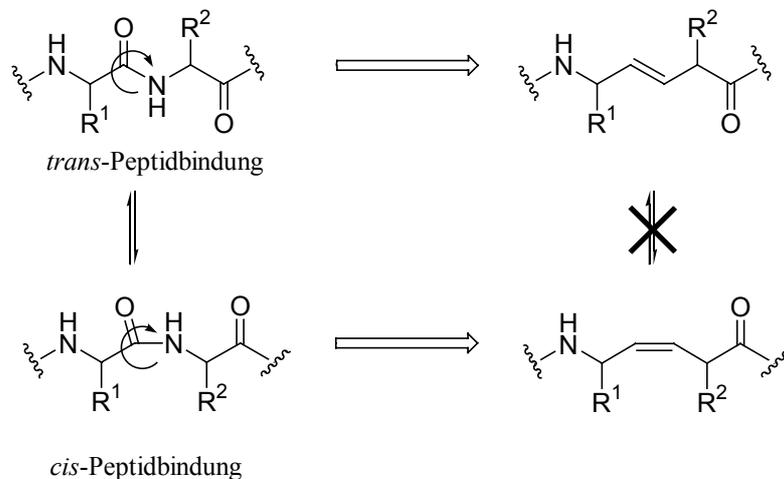


Abbildung 4.57: Eingeschränkte *cis/trans*-Konformationsänderung bei Alken-Dipeptidisosteren.

Der Synthesevorschlag folgt in diesem Fall nicht den vielfältig literaturbeschriebenen Vorschriften, da im Gegensatz zu jenen die C-terminale Aminosäure in diesem Fall im Verlauf der rationalen Optimierung schon auf eine β -Aminosäure reduziert worden ist. Das Schema zeigt die geplante Synthesestrategie über eine Wittig-Horner-Emmons-Reaktion im Schlüsselschritt, durch welche das Alken-Surrogat der Amidbindung zwischen Leucin und dem β -Phenylalanin gebildet werden sollte (Abb. 4.58).

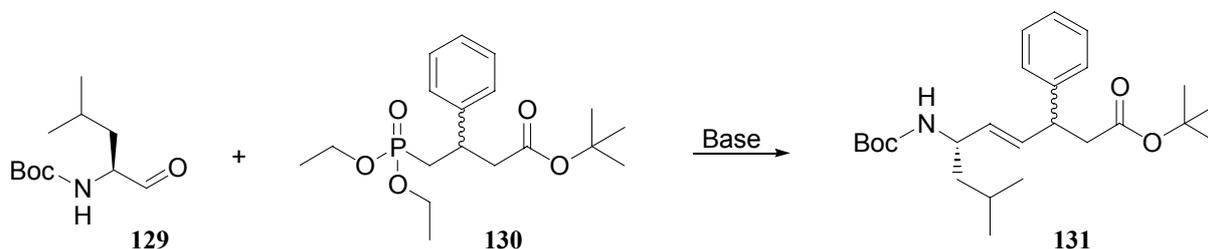


Abbildung 4.58: Synthesevorschlag für Alken-Isostere zwischen α - und β -Aminosäuren.

Das Boc-geschützte Leucinal ist wie andere Aminoaldehyde leicht aus dem entsprechenden enantiomerenreinem Aminoalkohol über eine Swern-Oxidation zugänglich. Die größere synthetische Herausforderung sollte die Synthese des Phosphonsäureesters werden, dessen

Synthese im Folgenden beschrieben wird. Eine Standardprozedur zu Phosphonsäureestern ist die Abuzov-Reaktion von Alkylhalogeniden mit Trialkylphosphit bei erhöhter Temperatur. Das Schema zeigt die bequeme Synthese der entsprechenden Bromalkylverbindung ausgehend vom Phenacylaldehyd und Glyoxalsäure, die unter leicht saurer Katalyse zu einem ungesättigten γ -Hydroxy γ -Lacton kondensieren. In zwei aufeinanderfolgenden Reduktionsschritten wird das dehydroxylierte γ -Lacton erhalten, welches unter Ringöffnung mit 37 % HBr in Eisessig zur γ -Brom-Buttersäure umgesetzt werden kann. Der Schutz der Carbonsäurefunktion gelingt mit ^tBu-2,2,2-trichloracetimidat in Dichlormethan (Abb. 4.59).

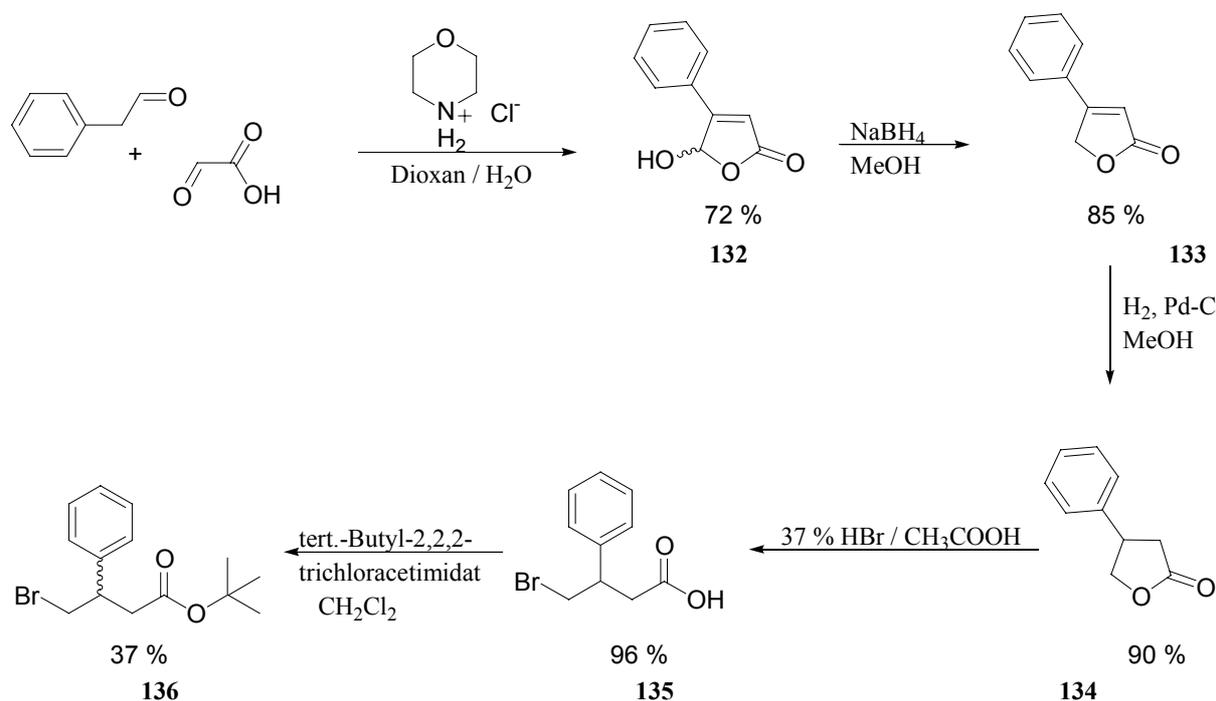


Abbildung 4.59: Synthese von 4-Brom-3-phenyl-buttersäure-tert.-butylester.

Leider war die angestrebte Abuzov-Reaktion des folgenden Schrittes unter keinen Reaktionsbedingungen möglich. Selbst das Erhitzen unter Rückfluß in Triethylphosphit als Lösungsmittel führte zu keinem Umsatz der Ausgangsverbindung (Abb. 4.60).

Der Versuch, die Reaktion unter „Finkelstein-artigen“ Bedingungen in Aceton unter Verwendung von Natriumiodid zu führen, ergab den gewünschten Phosphonsäureester in nicht isolierbaren Spuren neben der quantitativen Umsetzung zum entsprechenden Alkyljodid.

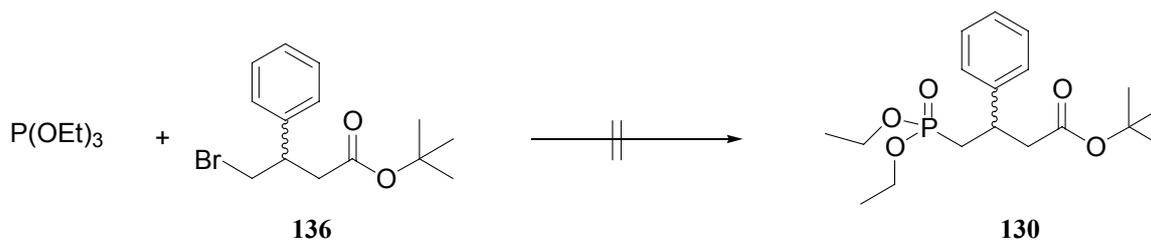


Abbildung 4.60: Abuzov-Reaktion zum Phosphonsäureester.

Dieses Ergebnis könnte durch die fehlende Reaktivität des Alkylbromids erklärt werden. Anzunehmen ist eine sterische Hinderung durch den Phenylring in benachbarter Position der das Reaktionszentrum für den nucleophilen Angriff abschirmt.

Die bekannte Reaktivitätssteigerung von Allylbromiden im Vergleich zu Alkylbromiden, ließ es als praktisch erscheinen, die Abuzov-Reaktion mit dem strukturanalogen Allylbromid durchzuführen, um die gesättigte Verbindung im Anschluss durch die Hydrierung der Doppelbindung zu erhalten (Abb. 4.61).

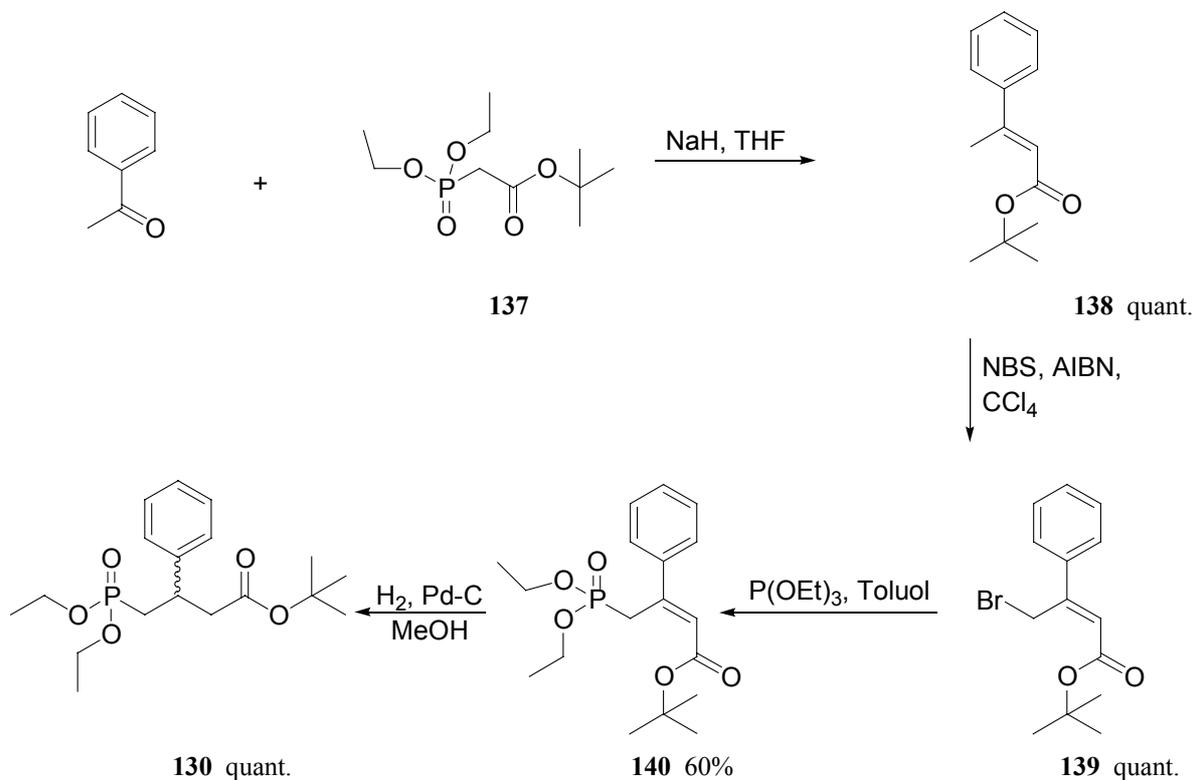


Abbildung 4.61: Synthese des Phosphonsäureesters **130**.

Das Ergebnis der anschließend durchgeführten Reaktion des Phosphonsäureesters **130** nach LDA-Deprotonierung mit Boc-Leucinal lieferte jedoch statt des gewünschten Wittigreaktionsproduktes lediglich das Additionsprodukt einer aldolartigen Reaktion über das C^α -H-Atom des Carbonsäureesters (Abb. 4.62).

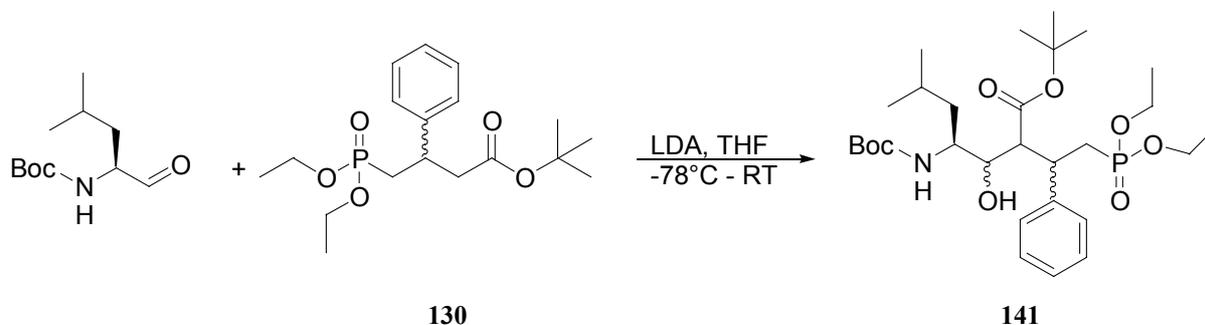
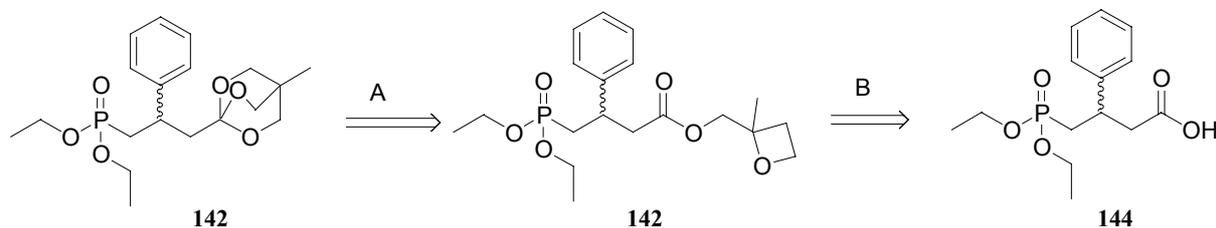


Abbildung 4.62: Fehlgeschlagene Synthese von C-C-Doppelbindungsisosteren.

Da die Bevorzugung dieses Reaktionskanals auf die Acidität der α -H-Atome zum Carboxylat zurückzuführen ist, wäre die folgerichtige Lösung eine Verminderung der Acidität. Es wurden zwei Wege in Betracht gezogen, von denen der erste unter Verwendung des Orthoesters die Keto-Enol-Tautomerie des Enolats nach Deprotonierung verhindern sollte (Abb. 4.63 A). Der zweite Ansatz beruhte auf der Reduktion der Carboxylatgruppe zum korrespondierendem Alkohol und Schutz desselben durch säurelabile Schutzgruppen. Nach erfolgter Wittigreaktion würde dieser zurück zur Carbonsäure oxidiert werden können (Abb. 4.63 B)

A:



A: $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2

B: C1(C)OC2OC1C2, DCC, CH_2Cl_2

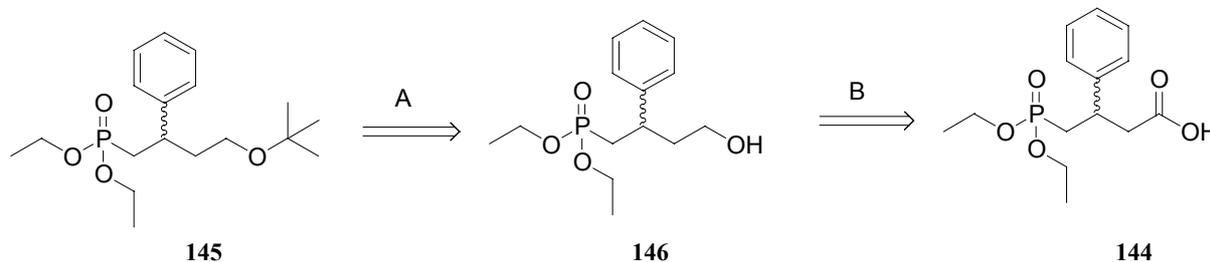
B:A: Isobuten, H₂SO₄, CH₂Cl₂B: 1. Isobutylchlorformiat, NMM, THF, 2. NaBH₄, MeOH

Abbildung 4.63: *Zukünftig realisierbare Strategien zur Synthese von Alken-Isosteren zwischen α - und β - Aminosäuren.*

Aus Zeitgründen konnten diese Umsetzungen im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt werden.

4.13 Biologische Evaluierung von $\alpha 4$ -Intergrinantagonisten

Die Synthese der LDT-Mimetika diente zur Identifizierung der pharmakophoren Gruppen. Die daraus gewonnenen Informationen sollten für die Entwicklung neuartiger $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten verwendet werden.

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.

4.13.1 Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen

Die Testung der Verbindungen auf ihre biologische Aktivität erfolgte mit Zelladhäsionsassays. Dazu wurden 96-iger Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden natürlichen Liganden MAdCAM-1 und VCAM 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 adhärenzte Zellen durch inverse Zentrifugation entfernt. Adhärenzte 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 nicht-aktive 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 Empfindlichkeit des Testsystems steigt, wenn die Ligandkonzentration verringert wird. 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.

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-exprimierende 38C13 $\beta 7$ -Zellen (B Lymphoma-Zelllinie) und um $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-exprimierende Jurkat-Zellen.

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 und Jurkat-Zellen/VCAM-1. Sowohl VCAM-1 als auch MAdCAM-1 gehören zu den endogenen Liganden der $\alpha 4\beta 7$ -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.^[372] Die Selektivitätstests stellen auch

einen internen Kontrollversuch dar. 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 Integrinliganden 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 weniger als 10% der VLA4-Integrine in einem aktivierten Zustand vor.^[373] Viele $\alpha 4$ -Integrinantagonisten, die selektiv für aktivierte Integrine sind, binden um Größenordnungen schlechter an nicht-aktivierte Integrine.^[184] Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zelluläre Testsysteme verwendet, die auf eine Aktivierung der Integrine verzichteten. Allerdings sei noch angemerkt, daß auch den $\alpha 4$ -Integrinliganden, die selektiv nur an aktivierte Integrine binden, eine Rolle bei der Behandlung von Krankheiten zukommen kann.^[374]

4.13.2 In-vivo Migrationsassays

Im Rahmen der *in-vivo*-Migrationsassays wurden intravenös in C57/Bl6-Mäuse $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden 38C13- $\beta 7$ Zellen mit der Verbindung **6a** injiziert und nach 2 h die Milz, Peyer'schen Plaques und Lymphknoten entnommen. Bei einer erwarteten $\beta 7$ -Selektivität wäre im Vergleich zu der inaktiven Kontrollverbindung eine geringere Anzahl Zellen in den Peyer'schen Plaques nachweisbar, während die Konzentration der Zellen in den Lymphknoten keine Aberration aufweisen sollte. Normalerweise wird in einem solchen Fall der selektiven Inhibierung eine erhöhte Konzentration von Lymphomzellen in der Milz nachgewiesen. Die Beobachtung war jedoch, dass die Verbindung **6a** eine Anreicherung der Zellen in jedem der drei Gewebe inhibierte. (Abb. 4.64) Dies lässt folgende Schlussfolgerungen zu: a) die Verbindung inhibiert nicht selektiv die $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-Wechselwirkung, b) die Verbindung wirkt toxisch auf die verwendeten Zellen oder c) die Verbindung verursacht eine Clusterung der Zellen (wie in manchen Fällen des *in-vitro* Adhäsionsassays beschrieben) und verursacht so eine *clearance* der Zellen über die Leber.

So wurde das Schicksal von Wirkstoff-Kandidaten in der klinischen Evaluierung in einem frühen Stadium demonstriert, da die *in-vivo* an Mausmodellen getesteten Verbindungen nicht

in der Lage waren selektive $\alpha 4$ -Ligand-Wechselwirkungen zu inhibieren, sondern bisher eher pharmakologisch bedenkliches Verhalten offenbarten.

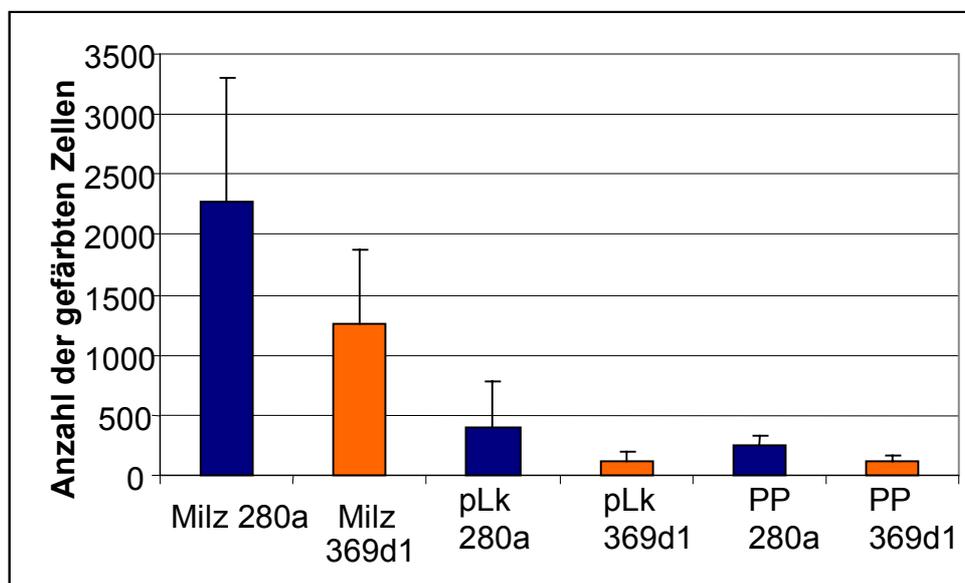


Abbildung 4.64: *In-vivo Migrationsassay mit der Verbindung 6a in C57/Bl6-Mäusen. Vergleichsverbindung 280a erwies sich in Adhäsionsassays als inaktiv.*

Die Nützlichkeit dieses Modells wurde mit dem $\beta 7$ -selektiven Antikörper (FIB27) nachgewiesen, der die erwartete Verarmung der PPs an 38C13- $\beta 7$ Zellen im selben Mausmodell aufwies (Abb. 4.65).

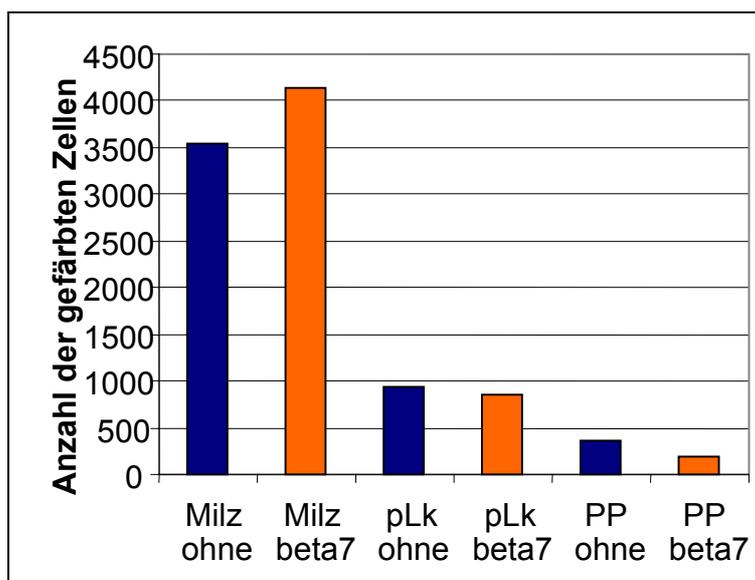


Abbildung 4.65: *In-vivo Migrationsassay in C57/Bl6-Mäusen mit $\alpha 4\beta 7$ -selektivem Antikörper (FIB27).*

4.13.3 Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays

Beim Vergleich der Wirksamkeit von Antagonisten ist es von Bedeutung zu beachten, dass die beschriebenen Affinitäten keine wahren Gleichgewichtskonstanten darstellen. Die beschriebenen IC_{50} -Werte hängen stark von der Konzentration und dem Assayformat ab, und spiegeln eventuell die wahren Affinitäten der getesteten Verbindungen für die Integrinrezeptoren nicht exakt wieder. Die verschiedensten Assay-Bedingungen, die in verschiedenen Laboratorien etabliert wurden, um Integrinliganden zu evaluieren, lässt den Vergleich der verschiedenen Verbindungen untereinander zu einer schwierigen Herausforderung werden. Zudem betrachten die meisten Bindungsassays eine kompetitive Hemmung der Antagonisten mit zwei verschiedenen Liganden – VCAM und MAdCAM – an zwei verschiedenen Integrinrezeptoren, woraufhin die Bestimmung von Selektivitäten auf $\alpha 4\beta 1$ bzw. $\alpha 4\beta 7$, die sich auf die bestimmten IC_{50} -Werte bezieht, irreführend sein kann.

Trotzdem können viele Schlüsse aus den ermittelten Daten gezogen werden. Meist liefern Zell-Adhäsionsassays höhere IC_{50} -Werte, da es an der Zelloberfläche zu multiplen Rezeptor-Wechselwirkungen kommen kann. Die IC_{50} -Werte von Verbindungen aus derselben Testreihe spiegeln gewöhnlich verlässliche relative Affinitäten wieder. Dagegen variieren die Werte aus unterschiedlichen Laboratorien teils beträchtlich und die Daten sollten mit äußerster Vorsicht interpretiert werden.

4.13.4 Selektivität

Die unterschiedlichen Expressionsprofile von $\alpha 4$ Integrinen und ihren Liganden impliziert, dass es wünschenswert wäre, in der Lage zu sein, bevorzugt den einen oder den anderen Rezeptor zu blockieren. Die Tatsache, dass MAdCAM spezifisch an $\alpha 4\beta 7$, während VCAM gleichsam an $\alpha 4\beta 1$ und an $\alpha 4\beta 7$ bindet, deutet therapeutisch relevante Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen an, was letztlich die Auswahl von klinischen Kandidaten beeinflussen wird. Zum Beispiel würden $\alpha 4\beta 1$ selektive Antagonisten die Migration von Leukocyten in VCAM exprimierendes Gewebe inhibieren, während $\alpha 4\beta 7$ selektive Antagonisten deren Wanderung in den Magen-Darm-Trakt verhindern würden, wo MAdCAM Überexpression in

Verbindung mit Koliken gebracht werden kann. Es muss darauf hingewiesen werden, dass eine unselektive Inhibierung von beiden $\alpha 4$ Integrinen den größten Nutzen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen offenbaren würde, da ein allgemeiner $\alpha 4$ Integrin Antagonist ein breiteres Anwendungsgebiet abdecken könnte. Ob die Spezifität für $\alpha 4\beta 1$ bzw. $\alpha 4\beta 7$ wünschenswert ist, ist umstritten. Diese Frage wird vermutlich dann beantwortet, wenn die entsprechenden Verbindungen nach weiteren klinischen Untersuchungen bewertet werden können.

5 Das Lungensurfactantpeptid SPC

5.1 Einführung - Physiologische Grundlagen der Surfactant-Peptide

Das „oberflächenaktive Material“ der Lunge ist eine komplexe Mischung aus Phospholipiden, primär bestehend aus 1,2 - Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC), 1,2- Dipalmitoylphosphoglycerin (DPPG) und mindestens vier verschiedenen Surfactant Polypeptiden, SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, welche im Lungenepithelium gebildet werden. Das Surfactant wird in die Alveolen abgeschieden, um dort die Oberflächenspannung an der Alveolen Luft / Flüssig-Phasengrenze zu reduzieren. Hierbei wird der Kollaps der Alveolen bei kleinen Lungenvolumina verhindert.^[375-377] Der Mangel an ausreichend Surfactant z.B. bei Frühgeborenen ist mit dem sog. Atemnotsyndrom (RDS) verbunden, welches der Hauptgrund für neonatale Mortalität ist.^[378-382] Das RDS kann sehr effektiv mit einem exogenen Lungensurfactant behandelt werden welches hauptsächlich DPPC und ca. 1-2 % SP-B und SP-C enthält.^[383-385]

Endogenes Lungen-Surfactant wird in Alveolen-Typ II Zellen gebildet und intrazellulär in dichten Multibilayer-Strukturen gelagert. Diese „Lamellar-Körper“ werden von dort in die alveolare flüssige Subphase ausgeschieden, wo sie in komplexere Doppelschicht-Strukturen („tubular myelin“) umgewandelt werden, aus denen die oberflächenaktiven Monoschichten gebildet werden können. Man nimmt an, dass SP-C eine wichtige Rolle spielt, indem es die Umwandlung der Bilayerstrukturen in die oberflächenaktiven DPPC Monolayer an der Luft / Flüssigkeit- Phasengrenze gewährleistet.^[386-391]

Die klinische Anwendung hatte ein großes Interesse an der Struktur und den molekularbiologischen Grundlagen von SP-B und SP-C zur Folge.^[392, 393] Es ist zu erwähnen, dass die heute kommerziellen therapeutischen Surfactanten, die SP-B und SP-C enthalten, wirksamer sind als jene, die nur lipidischer Natur sind.^[394] Andererseits muß beachtet werden, dass die derzeitigen Therapeutika aus Tieren erhaltene Proteine beinhalten, was Bedenken bezüglich Immunogenizität und der Übertragung von Krankheiten aufbringt. Aus diesem Grund besteht ein Interesse in der Entwicklung neuer Surfactant-Ersatzstoffe mit vorteilhafteren Eigenschaften der Proteinkomponente.^[395] Deshalb wachsen die Bemühungen, den Mechanismus der Stabilisierung der Alveolenoberfläche durch SP-B und SP-C zu verstehen. Da zudem eine Bereitstellung von SP-B und SP-C im großen Maßstab schwierig

ist, sind synthetische – wenn möglich nicht-peptidische – Analoga für therapeutische Zwecke von besonderem Interesse.^[396, 397]

Derzeit befindet sich ein gentechnisch hergestellter „*lung-surfactant-factor*“ (LSF) unter dem Namen Venticute® (r-SP-C(FFI)) in klinischen Phase-III-Studien zur Behandlung von Patienten mit Schocklunge. Jedoch entsprach diese Substanz den Erwartungen bisher nicht, und es werden derzeit mögliche therapeutische Neuansätze diskutiert.

5.2 Das Lungen-Surfactant Polypeptid SP-C

Das Surfactant Polypeptid-C (SP-C) ist ein ausgesprochen hydrophobes, kleines Protein (Abb. 5.1), das nicht nur schwierig in größeren Mengen zu synthetisieren, sondern auch während der Untersuchung problematisch zu handhaben ist. Es enthält zu > 70 % nicht-polare Seitenketten und trägt kovalent gebundene Fettsäureketten. SP-C, das aus Lungensurfactant gewonnen wird, ist kein einheitliches Molekül, sondern eine Mischung aus mehreren Isoformen, von denen es eine *in vivo* dominierende gibt. Die Zahl an bekannten Modifikationen steigt mit der steigenden Sensibilität der analytischen Methoden und es ist anzunehmen, dass noch mehrere Isoformen gefunden werden. Auch wenn die Hauptform des isolierten SP-C wahrscheinlich die biologisch aktive Form darstellt, ist die Charakterisierung der weniger verbreiteten Isoformen aufschlussreich, da sie Informationen über die proteolytische Bildung von SP-C und Alterungsprozesse in einer Phospholipid-Umgebung zulassen. Die SP-C-Polypeptidkette des Menschen, des Schweins und des Hasens enthalten jeweils 35 Aminosäuren, während Hunde- und Rinder-SP-C am N-Terminus um eine Aminosäure verkürzt sind. SP-C wird gebildet durch posttranslatorische Proteolyse und Modifikation eines 21 kDa Vorläuferproteins (proSP-C). Es wird entweder mit einem (bei Hunden und Nerzen) oder mit zwei Palmitoyl-Resten (bei allen anderen Spezies) ausgestattet, welche über Thioesterbrücken mit den Seitenketten der Cysteine Cys-4 und Cys-5 verknüpft sind.

Die Zuordnung der Aminosäuresequenz von Menschen-, Schweine-, Rinder-, Hunde-, Hasen-, Ratten- und Mäuse-SP-C offenbart vier verschiedene konservierte Regionen:^[397]

- Die „Poly-Valin“-Region entlang den Positionen 12-27, welche ausschließlich Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten enthält (hauptsächlich Valin). Leu-21 ist streng konserviert und liegt zwischen zwei Abschnitten mit sieben bzw. vier abfolgender β -verzweigter Aminosäuren.
- Das folgende C-terminale Heptapeptid, das sich direkt der „Poly-Valin“-Sequenz anschließt, ist hoch konserviert.
- Das gilt auch für das folgende Lys-Arg-Paar an den Positionen 10 und 11.
- Die schon genannte Tatsache, dass man in allen Spezies palmitoylierte Cysteine an den Positionen 4 und 5 gefunden werden (außer bei Hund und Nerz), welche ausnahmslos von Prolinen in den Positionen 3 und 6 umgeben sind.

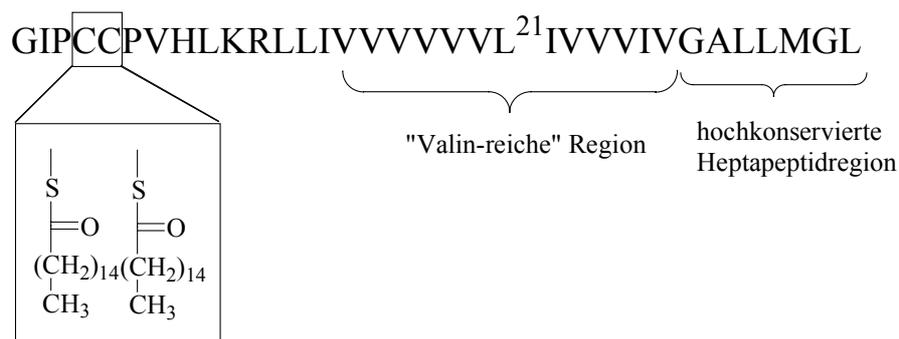


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der Sequenz des menschlichen SP-C.

Die Struktur von SP-C ist in Lösung bestimmt worden und strukturelle Untersuchungen des Proteins in verschiedenen Umgebungen wurden durchgeführt.^[398, 399] Die SP-C-Struktur enthält eine sehr geordnete α -Helix mit annähernd idealer Geometrie, die die Positionen 9-34 überspannt. (Abb. 5.2) Der N-Terminus mit den beiden palmitoylierten Cysteinen wird allerdings als flexibel und ungeordnet beschrieben.

Die nicht vorhandenen Strukturinformationen über diesen N-terminalen Abschnitt legten es nahe sich diesem einmal entkoppelt von der langen, α -helicalen und synthetisch auch nicht zugänglichen C-terminalen Domäne zu widmen.

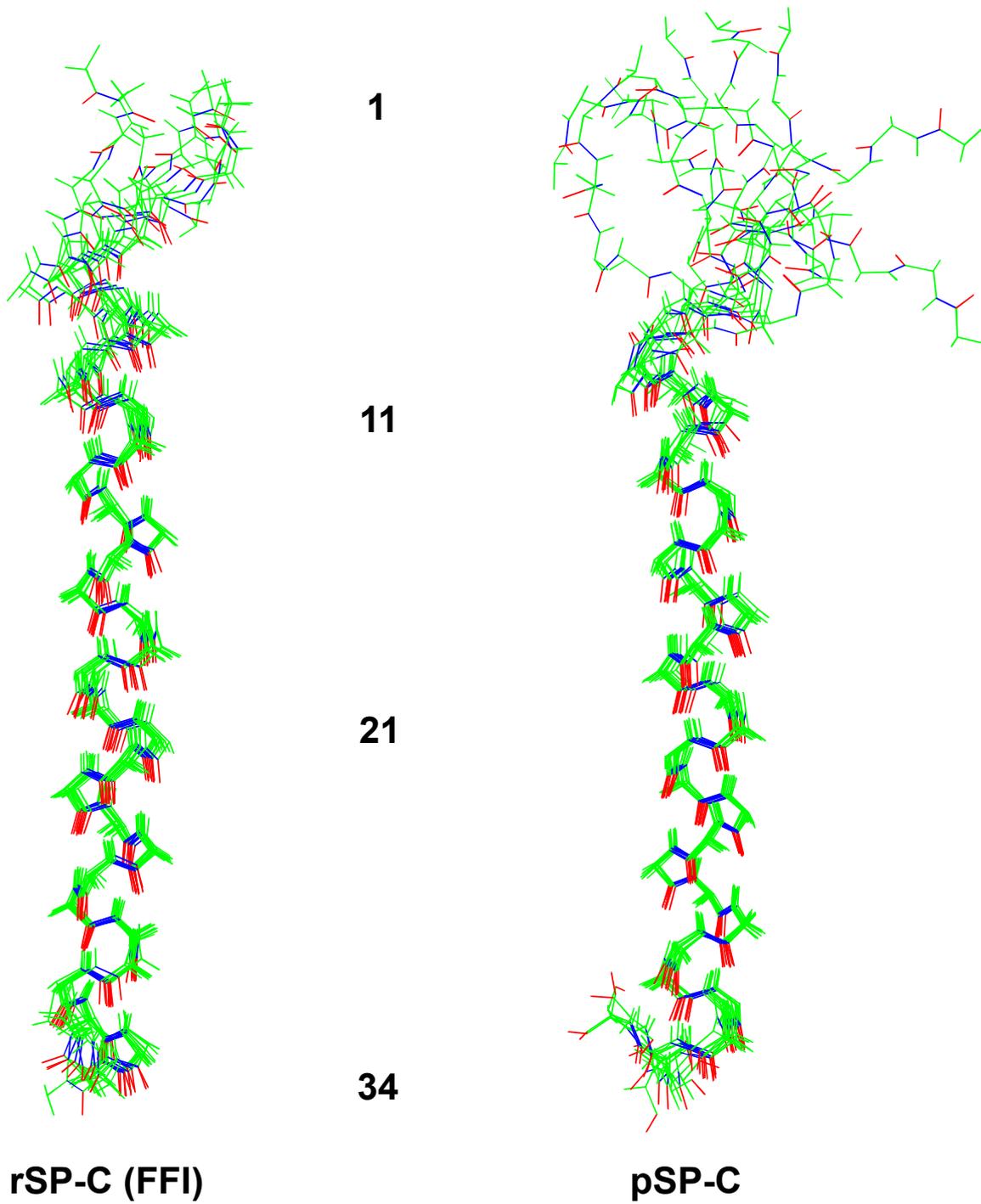


Abbildung 5.2 : Vergleich der Strukturen von Schweine-SP-C (*pSP-C*) und der FFI-Variante (*rSP-C(FFI)*) in $CDCl_3 / CD_3OH$.^[400]

5.3 Chemische Synthese von SP-C-(2-12) und Analoga

Die Synthese des SPC-(1-11)-Fragmentes folgte einer Peptidfestphasensynthese nach der Fmoc-Strategie, unter besonderer Berücksichtigung der Seitenkettenschutzgruppen und der Auswahl des Festphasenlinkers. Da die Modifizierung der Cysteine in der Seitenkette wünschenswerter Weise an der festen Phase durchzuführen war, um eine möglichst vollständige Palmitoylierung mit großem Reagentienüberschuß und anschließender Entfernung des Überschussreagenz durch Waschprozesse zu gewährleisten, wurde eine äußerst säurelabile Thiolenschutzgruppe verwendet. Die 4-Methoxytrityl (Mmt)-Schutzgruppe kann in Anwesenheit der säureresistenteren Gruppen Boc bzw. Pbf leicht selektiv bereits mit 1% Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt werden.^[401-403] Diese Behandlung des Peptids an der festen Phase verlangt außerdem die Verwendung eines weniger säurelabile Linkers, so daß statt des sonst üblichen Trityllinkers ein unter diesen Bedingungen stabiles Wang-Harz verwendet wurde (Abb. 5.3).

Die Acylierung der N-terminalen Aminofunktion wurde in Erwägung gezogen, da das Vorhandensein von freien Aminogruppen im Peptid die „Alterung“ des Peptids im Sinne einer Acyl-Übertragung von den Palmitoylgruppen der Thioester auf Aminofunktionalitäten begünstigt. Dieses Phänomen des Acyltransfers führt in den nativen SP-C-Varianten zu bis zu 4 % beobachteter Palmitoylierung am Lys-10.^[404]

Die Acylierung der freien Thiolgruppen wird durch das Anhydrid der Palmitinsäure unter basischen Reaktionsbedingungen in Dichlormethan erreicht und diese Thioester erwiesen sich auch unter der sauren Abspalt- und Entschützungsbedingungen stabil.

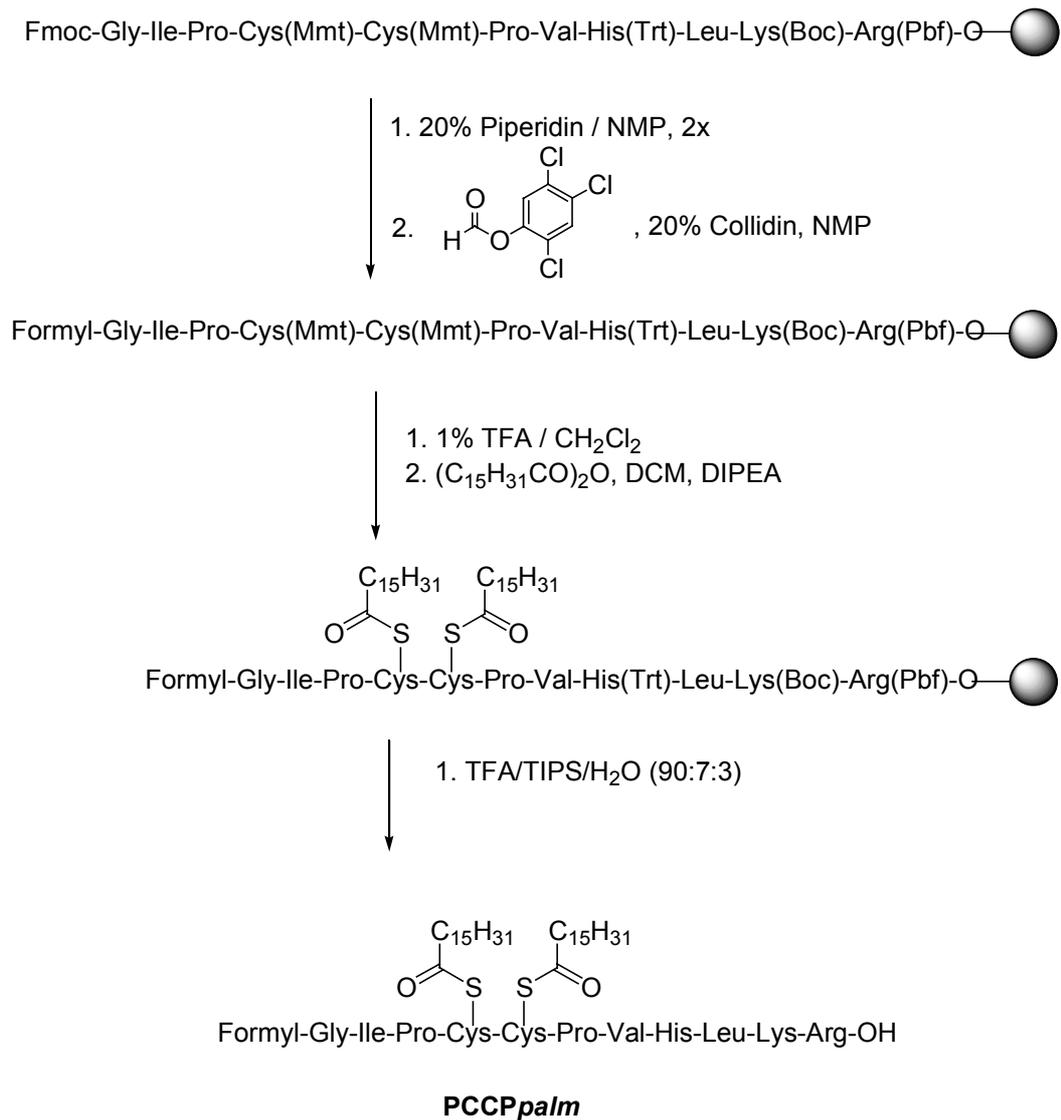


Abbildung 5.3: Festphasensynthese von SPC-(1-11).

Zum Vergleich des Einflusses der Palmitoylierung der Cysteinseitenketten wurden zudem das unpalmitoylierte Undecapeptid (**PCCP**) und das N-terminale Fragment der rekombinanten FFI-Variante des SP-C (**PFFP**) an der festen Phase nach der Fmoc-Strategie synthetisiert (Abb. 5.4).

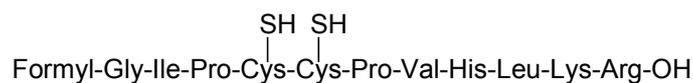
**PCCP****PFFP**

Abbildung 5.4.: Synthetisierte Varianten von SPC-(1-11)

5.4 NMR-Spektroskopische Untersuchungen der verschiedenen SP-C Varianten

Im Folgenden wurden die strukturellen Eigenheiten dieser drei Peptide in Wasser, im CDCl₃/CD₃OH 1:1-Gemisch (v/v) und in DPC-Micellen NMR-spektroskopisch untersucht.

Im Gegensatz zu früheren Strukturuntersuchungen der vollständigen SPC-Peptide, in denen eine flexible ungeordnete Konformation für den N-terminalen Teil ermittelt worden ist, waren die verkürzten synthetischen Polypeptid-Varianten von menschlichem und FFI-SPC einer NMR-Strukturuntersuchung zugänglich. Für die neun zu bestimmenden Strukturen wurde teilweise ein zweiter bzw. dritter Satz von Resonanzen ermittelt, die anderen Peptidkonformationen zugeordnet werden konnten. Trotzdem betrug der Anteil der Hauptkonformation der Peptidstrukturen in jedem Fall mindestens 70 %, was die Zuordnung erleichterte. Für alle Peptide, außer der palmitoylierten menschlichen Variante in Wasser, konnten vollständige und eindeutige sequenz-spezifische ¹H- und ¹³C-Zuordnungen vorgenommen werden. Zudem konnten eine Vielzahl von sequentiellen (i+1) und *medium-range* (i+2, i+3) Nuclear Overhauser Effekte (NOE) zwischen Ile-2 und dem PXXP-Palmitoylierungsmotiv beobachtet werden, was die Bestimmung von Strukturen hoher Qualität in dieser Region erlaubte. Auf der anderen Seite zeigte die Domäne der Reste 7-11 keinen α -Helix-Charakter, der für ein N-terminales Heptadecapeptid-Fragment in DPC Micellen und SPC₁₋₃₄ in CDCl₃/CD₃OH beobachtet werden konnte.^[399]

5.4.1 Menschliches, FFI und depalmitoyliertes menschliches SPC (1-11) in H₂O / D₂O (90:10)

Die an den Cysteinen Cys-4 und Cys-5 palmitoylierte menschliche Variante in Wasser war einer Strukturbestimmung nicht zugänglich. Das Verhalten dieses Peptids ist interessant, jedoch nicht überraschend. Wegen der Größe und der unpolaren Natur der Palmitoylgruppen löst sich das Peptid nicht in Wasser. Es gibt jedoch Hinweise, dass das Peptid in Wasser Micellen bildet, da lediglich die Seitenketten-Resonanzen von Leu-9 und den polaren Seitenketten Lys-10 und Arg-11 beobachtet werden konnten.

Während die depalmitoylierte menschliche Variante eine sehr definierte Struktur besitzt, ist die Struktur der FFI Variante nur schlecht determiniert, was sich durch das Fehlen von *medium-range* (i+2, i+3) NOE's entlang der Peptidsequenz ausdrückt.

Das Motiv der menschlichen Variante zeigt einen inversen γ -turn der die Aminosäuren Ile-2, Pro-3 und Cys-4 umfasst. Dieser inverse γ -Turn wurde durch zahlreiche *medium-range* (i+2, i+3) NOE's zwischen Ile-2 und dem PCCP-Motiv charakterisiert. Außerdem ergaben die MD-Rechnungen dass die 5 besten Strukturen eine Wasserstoffbrücke CO_{Ile2}-NH_{Phe4} aufwiesen. Zudem stimmten die berechneten Pro-3 ϕ (-65°) und ψ (55°) Dihedralwinkel gut mit den einen inversen γ -turn definierenden Winkel überein (-79° bzw. 69°).

5.4.2 Menschliches, FFI und depalmitoyliertes menschliches SPC (1-11) in CDCl₃/CD₃OH 1:1 (v:v)

Der Ergebnisse der Messung der Peptide in CDCl₃/CD₃OH 1:1 (v:v) weisen eine ähnliche Schleife innerhalb des Palmitoylierungsmotivs auf, das von einer Vielzahl *medium-range* (i+2) NOE's zwischen Ile-2, Pro-3, Cys-4 oder Phe-4 gekennzeichnet ist. Trotzdem offenbart eine sorgfältige Analyse Unterschiede und eine Abhängigkeit der Strukturen von der Aminosäure an Position 4 und 5 und dem Vorhandensein der Palmitoylgruppen. Die besten 20 Strukturen der menschlichen Variante offenbaren einen inversen γ -turn entlang den Aminosäuren Ile-2, Pro-3 und Cys-4. Dieses Merkmal konnte durch die charakteristische CO_{Ile2}-NH_{Phe4}-Wasserstoffbrücke und die Pro-3 ϕ (-88°) und ψ (55°) Dihedralwinkel bestätigt werden. Das FFI Peptid tendiert zu einer Faltung in einen β I-Turn, da die bestimmten Strukturen eine Stabilisierung durch CO_{Ile2}-NH_{Phe4} und CO_{Ile2}-NH_{Phe5}-Wasserstoffbrücken

aufzeigen. Wiederum konnte das Vorhandensein einer zweiten Konformation des FFI-Peptids in Lösung nachgewiesen werden.

Das menschliche Peptid zeigt ebenfalls eine Neigung einen β I-*turn* auszubilden. Strukturrechnungen belegen, dass die Struktur durch CO_{Ile2}-NH_{Cys4} und CO_{Ile2}-NH_{Cys5}-*backbone*-Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Es wurde ebenfalls ein NOE zwischen NH_{Ile2}-NH_{Cys5} beobachtet, was deren räumliche Nähe offenbart. Dies wurde bestätigt durch die Messung eines 5Å-Abstandes zwischen dem ersten (Ile-2) und dem vierten (Cys-5) alpha-Kohlenstoff-Atom, die den *turn* bilden, was charakteristisch für einen β -*turn* ist.

5.4.3 Menschliches, FFI und palmitoylierte menschliches SP-C Peptide in [²H₃₈]DPC-Micellen in H₂O / D₂O (90:10)

Die Strukturen der Peptide in DPC-Micellen repräsentieren die interessantesten Fälle, da sie am nächsten die *in-vivo* Bedingungen nachahmen, unter denen SPC seine Funktion entfaltet. Trotz erheblicher Linienverbreiterung waren wir in der Lage, die Signale eindeutig zuzuordnen. Die drei Peptide zeigen alle bestimmte wohl definierte Strukturen, die durch NOE's belegt wurden. Die Struktur der depalmitoylierten Varianten offenbaren einen inversen γ -*turn* entlang den Aminosäuren Ile-2, Pro-3 und Cys-4.

Die palmitoylierte menschliche Variante zeigte eine starke Tendenz in einen β -*turn* zu falten, was durch NOE's innerhalb des palmitoylierten Motivs und zwischen Ile-2 und Cys-5 charakterisiert wurde. So wie für das FFI Peptid in Wasser, so faltet dasselbe in Micellen in einem gestreckten Bogen.

Die detailliert beschriebenen Strukturen befinden sich derzeit in Bearbeitung zur Publikation.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass der N-terminale Teil von Varianten des menschlichen SPC eine starke Neigung besitzt, am PXXP-Motiv in definierte Schleifen zu falten, die am PXXP-Motiv zu finden sind. Interessanterweise fanden sich diese Schleifen bisher nicht bei vorherigen Strukturuntersuchungen an Schweine-, Menschen- bzw. FFI- SPC und menschlichem SPC in DPC-Micellen. Die Strukturen des gesamten SPC Peptids wurden in CDCl₃/CD₃OH (1:1) ausgeführt, wobei die α -Helix nicht in dem Maße ausgebildet vorlag wie in Micellen. Da hauptsächlich Seitenketten-NOE's vom und zum Ile-2 die Struktur der beobachteten Turns beschreiben, könnte ein Problem von vorherigen Studien die Überlappung

von Seitenketten-Signalen der Leucine, Isoleucine und Valine in der langen unpolaren α -helicalen Domäne gewesen sein. Es wurde vorher aufgezeigt, dass das SPC-Protein in der oberflächenaktiven Monoschicht mit den positiv geladenen Seitenketten (Lys-10 und Arg-11) zu den polaren Kopfgruppen ausgerichtet ist und die α -Helix in die lipidische Schicht zeigt. Es ist wahrscheinlich, dass die Palmitoylgruppen in die Lipidschicht ragen und als eine Art Verankerung in der Monoschicht dienen.

5.5 Vergleich der Strukturen untereinander

5.5.1 Vergleich der Strukturen des menschlichen Peptids

Abbildung 5.5 zeigt die Überlagerung der 20 besten Strukturen des palmitoylierten menschlichen SP-C-Peptids in DPC Micellen. Die Segmente 2-5 bzw. 8-11 (Abb. 5.6 A bzw. Abb. 5.6 B) weisen eine relativ starre Struktur auf, während der Abschnitt 6-8 äußerst flexibel ist. Dies wäre in Übereinstimmung mit jüngsten Studien, dass der N-terminale Part von SP-C das Peptid auf einer Seite der Phospholipidschicht verankert ist. Das palmitoylierte menschliche SP-C-Peptid weist einen engen Turn auf, der den Palmitoylgruppen erlaubt, parallel in die Phospholipid-Schicht zu zeigen. In $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OH}$ (1:1) werden die Palmitoylgruppen nicht in eine bestimmte Richtung gedrängt und ein Minimum an freier Energie würde bei einem maximalen Abstand der beiden Gruppen erhalten. Da die beschriebene Schleife in $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OH}$ nicht so ausgebildet ist, zeigen folgerichtig die Palmitoylgruppen in unterschiedliche Richtungen. In Wasser scheinen die Peptide ein micellares System von supramolekularer Größe zu bilden, was die Detektion der Rückgrat-Resonanzen nicht erlaubt.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Palmitoylketten in dieselbe Phospholipidschicht zurückfalten (Abb. 5.7), beziehungsweise umgekehrt scheinen die Palmitoylgruppen den β -turn weitgehend zu stabilisieren.

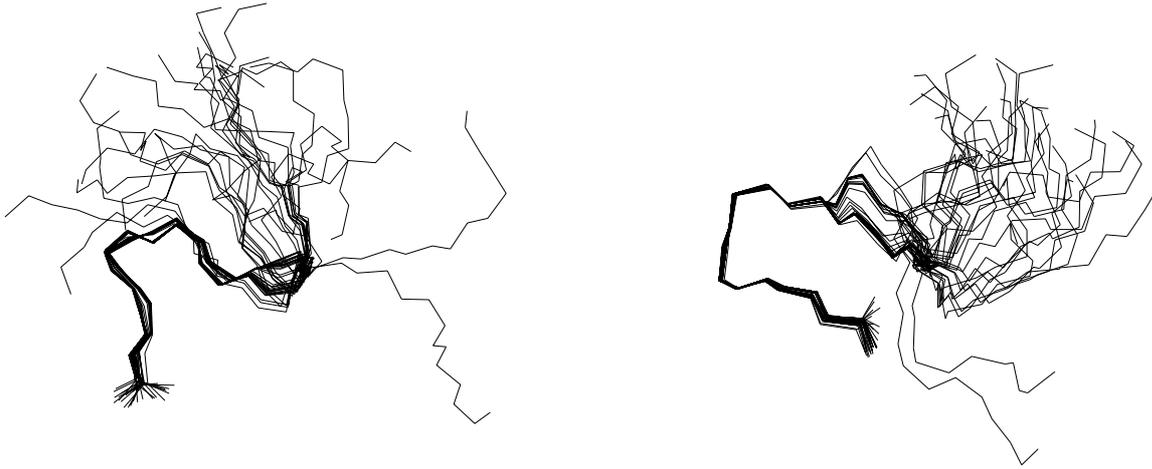
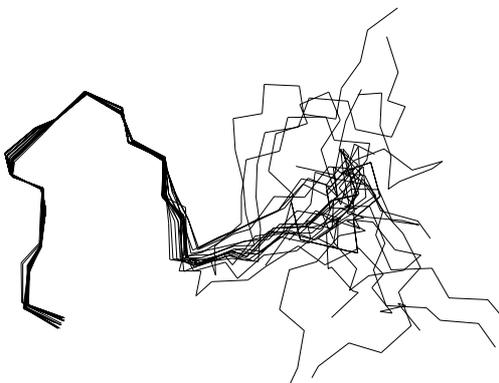


Abbildung 5.5: Palmitoyliertes menschliches SPC in Chloroform / Methanol (links) bzw. Micellen (rechts).

A



B

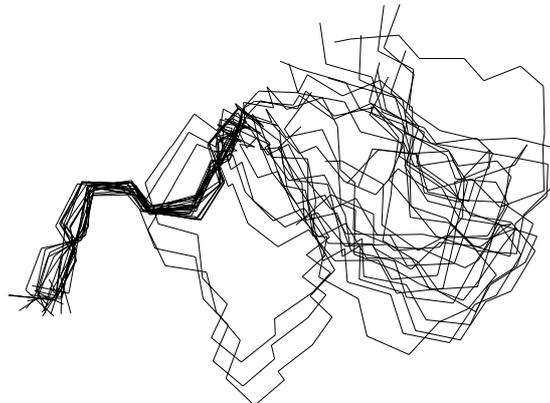


Abbildung 5.6: Teilstrukturen des menschlichen palmitoylierten SPC in Micellen, A) Segment 2-5, B) Segment 6-11.

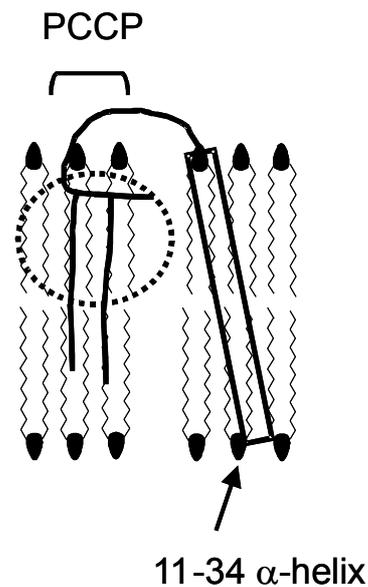


Abbildung 5.7 Angenommene Funktion der Palmitoylgruppen bei der Verankerung von SP-C in Lipidmembranen.

5.5.2 Vergleich der Strukturen der menschlichen depalmitoylierten Variante

Die menschliche depalmitoylierte Variante zeigt dieselbe Neigung zur Ausbildung eines Turns innerhalb der 2-6 Region, welcher jedoch nicht so ausgebildet ist wie jener des palmitoylierten menschlichen Peptids in DPC Micellen. (Abb. 5.8) Dies bestätigt die Annahme, dass die Ausrichtung der Palmitoylgruppen in DPC-Micellen die treibende Kraft zur Ausbildung der sehr engen Schleife ist. Außerdem bleibt zu erwähnen, dass die menschliche unpalmitoylierte Variante in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ und DPC-Micellen und das palmitoylierte menschliche Peptid in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ sehr ähnliche Strukturen aufweisen, was hauptsächlich auf hydrophobe Solvens-Effekte zurückzuführen zu sein scheint.

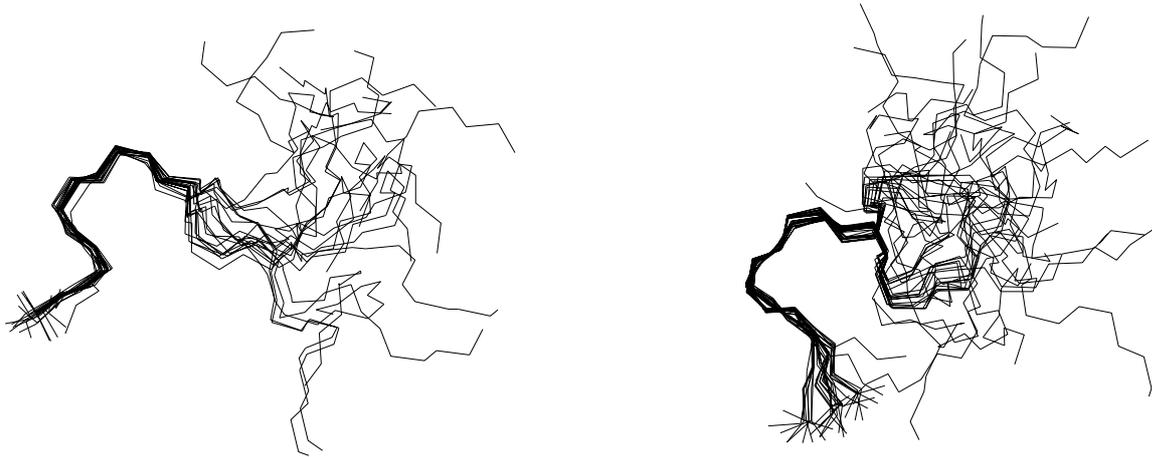


Abbildung 5.8: Depalmitoyliertes menschliches SPC in Chloroform / Methanol (links) bzw. DPPC-Micellen (rechts).

5.5.3 Vergleich der Strukturen der FFI Variante

Der Vergleich der menschlichen und der rekombinanten FFI Variante ist von besonderem Interesse, da EPR Messungen auf eine strukturelle Ähnlichkeit der beiden hinweisen. Es ist bisher sehr wenig über die molekulare Basis des Wirkmechanismus von FFI in-vivo bekannt. In Wasser zeigte sich eine nicht eindeutiger Schleife in der 2-6 Region, die auch in DPC-Micellen zugegen war. Überdies zeigt die Struktur eindeutig, dass die zwei Phenylringe (Phe-4 und Phe-5) in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Messungen in Wasser demonstrieren, dass die Phenylringe flexibel sind und ihre Ausrichtung im Vergleich zum Peptidrückgrad nicht definiert ist (Abb. 5.9).

Da der erste Teil des Peptids durch das Vorhandensein der Phenyl-Substituenten hydrophob wird, nehmen wir an, dass die ersten sechs Aminosäuren die Phospholipidschicht vollständig in die Lipidschicht penetrieren. Dieser neue Strukturvorschlag würde die biologische Aktivität der FFI-Peptide erklären. (Abb. 5.10)

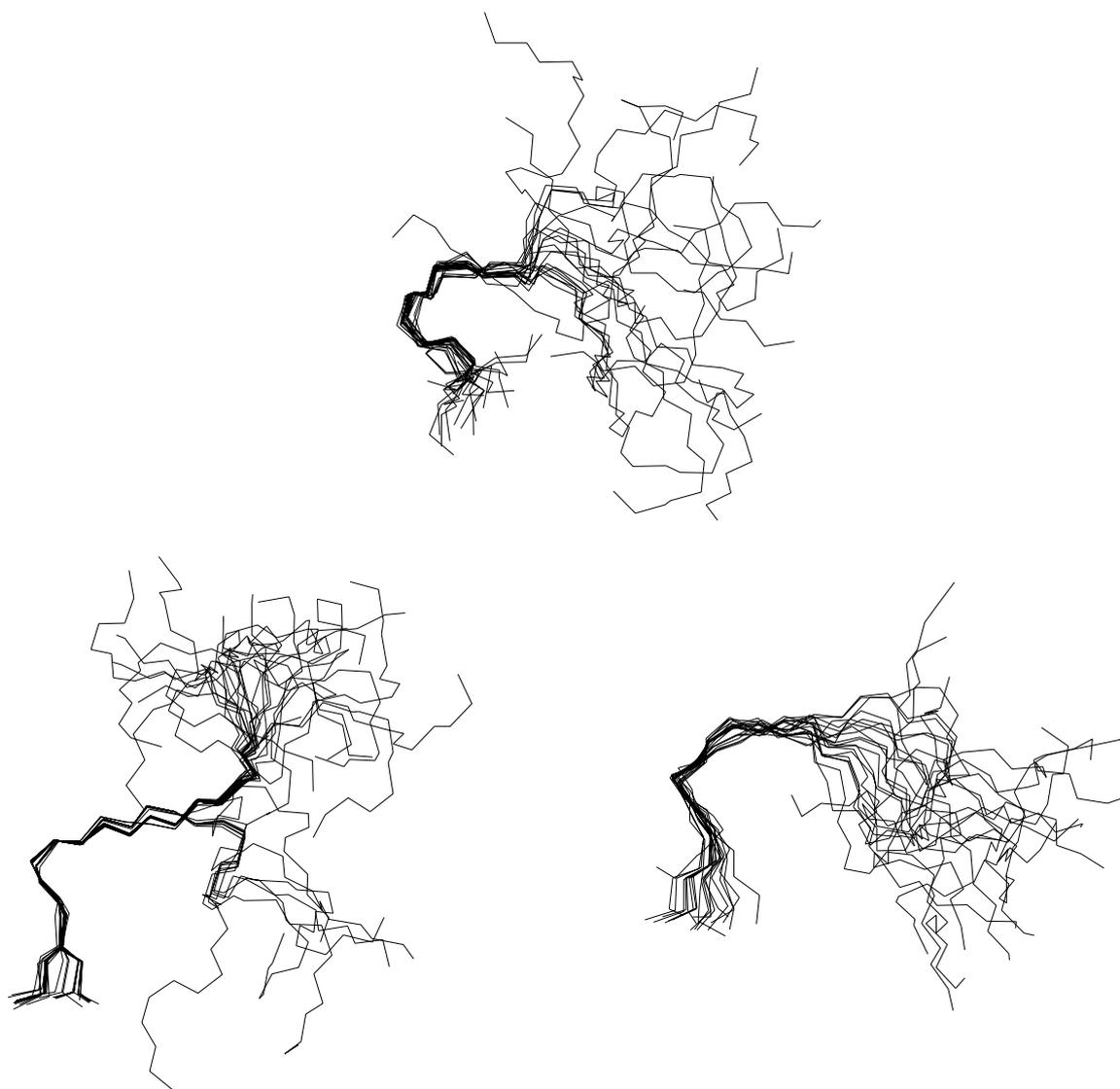


Abbildung 5.9: *SPC-FFI-Variante in Chloroform / Methanol (oben), in Micellen (unten links) und in Wasser (unten rechts).*

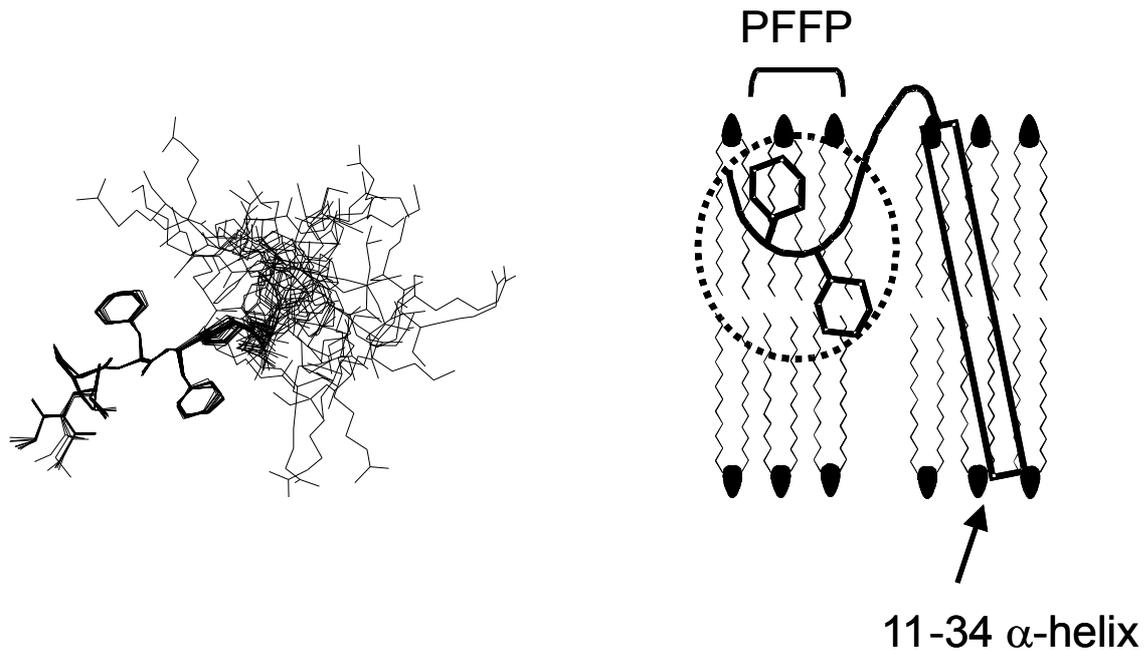


Abbildung 5.10: Schweratomdarstellung der FFI-Variante in Micellen (rechts) und hypothetische Penetration der FFI-Variante in einer Lipiddoppelschicht.

5.6 Zusammenfassung

Es wurde die Synthese des *N*-terminalen Fragments des Surfactant-Polypeptids C (SP-C) und dessen Varianten beschrieben. Mittels Festphasen-Peptidsynthese wurden drei Peptide synthetisiert und strukturell charakterisiert. Eine spezielle Schutzgruppenstrategie der Cysteinseitenketten Cys-5 und Cys-6 ermöglichte die Freisetzung der Seitenketten an der festen Phase und die Modifikation mit Palmitoylthioestern, die der posttranslatorischen Konversion des SP-C entspricht.

Es wurde deutlich, dass die Faltung des FFI Peptids der des menschlichen Peptids ähnelt. Zudem wurde gezeigt, dass das palmitoylierte Undekapeptid in Dodecylphosphocholin (DPC) Micellen – die den natürlichen physiologischen Bedingungen unter denen die Surfactanden *in vivo* wirken sehr nahe kommen – einen ausgeprägten Bogen zwischen Pro3 und Pro6 aufweist, was den Palmitoylgruppen erlaubt parallel in die Phospholipidschicht zu zeigen.

Es zeigte sich, dass die Faltung dieser drei Undekapeptide stark durch das Motiv PXXP und die Palmitoylgruppen beeinflusst wird. Diese Ergebnisse geben neuen Einblick in die

Struktur von SP-C in Phospholipidschichten und lassen Schlüsse über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu. Das Interesse an diesen Ergebnissen geht über das SPC-System hinaus, da das PXXP Motiv in einer Vielzahl von biologisch aktiven Proteinen beobachtet wird, wie z.B. in SH3 Domänen.^[405-413] In diesem Fall wird dieses Motiv in Polyprolinpeptidsequenzen gefunden wo es als Ligand für SH3 Domänen dient. Dieses Motiv faltet bei SH3-Domänen in eine Polyprolin Type II (PPII) Helix.

6. Synthese des Transmembranpeptids KdpF

6.1 Der KdpFABC-Komplex

Im Falle von Turgorschwankungen über die Zellmembran von *Escherichia coli* exprimieren die Zellen den hochaffinen K^+ -Transporter KdpFABC-Proteinkomplex, eine P-Typ Transport ATPase (P-ATPase) von besonderer Struktur, in der sich die einzelnen Untereinheiten zusammensetzen. Die Expression des kdpFABC-Operons wird reguliert über die membrangebundene Sensor-Kinase KdpD und das lösliche Antwort-Regulator Protein KdpE. Die Kommunikation zwischen diesen beiden regulatorischen Proteinen geschieht über Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs Vorgänge. Da regulatorische Proteine, welche in der Signalübertragung involviert sind, alle ähnliche strukturelle Merkmale aufweisen, wäre die Aufklärung der Struktur von KdpD bzw. KdpE von ausgesprochenem Interesse für das Verstehen von Signaltransduktions-Mechanismen auf einem molekularem Level.

Der membrangebundene KdpFABC-Komplex ist ein hochaffines K^+ -Transportsystem ($K_m \sim 2 \mu M$) welches sowohl in *Escherichia coli* als auch in anderen Bakterienstämmen gefunden worden ist. Die Rolle des KdpFABC-Komplexes als ein Reserve- oder „Stand-by“- System ist erklärt sich aus der Art seiner Regulation. Das kdpFABC-Operon wird lediglich exprimiert, wenn die anderen K^+ -Transportsysteme nicht mehr in der Lage sind, die für die Zelle nötigen K^+ -Konzentrationen aufrechtzuerhalten. Es ist etwas ungewöhnlich, dass die Regulation nicht durch K^+ -Ionen an sich bestimmt zu sein scheint, sondern eher beeinflusst zu sein von der K^+ -Ionen-Konzentration im Cytoplasma, welche für die Aufrechterhaltung des Turgors verantwortlich ist, der für das Bakterien-Wachstum benötigt wird.^[414]

Der KdpFABC-Komplex gehört zu der Klasse der P-ATPasen, zeigt jedoch eine besondere Zusammensetzung von vier Membranproteinen, welche in ihrer Größe zwischen 3 bis 72 kDa liegen. So wie es von anderen P-ATPasen bekannt ist, vermittelt der KdpFABC-Komplex eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen, die von einer Reihe von Konformationsänderungen der beteiligten Untereinheiten begleitet werden. Die größte Untereinheit KdpB stellt die katalytische dar und enthält ausgedehnte Homologie-Regionen mit der großen Untereinheit von anderen P-ATPasen. Ihre vorgeschlagene Topologie stimmt mit den Grundmerkmalen von allen P-ATPasen überein,^[415-417] und ist vereinbar mit dem „head-piece-stalk“-Modell das für diese Art von Enzymen angenommen wird.^[418, 419]

Dieses Modell wurde kürzlich durch die Kristallstruktur einer Ca^{2+} -ATPase des sarcoplasmic reticulum bestätigt.

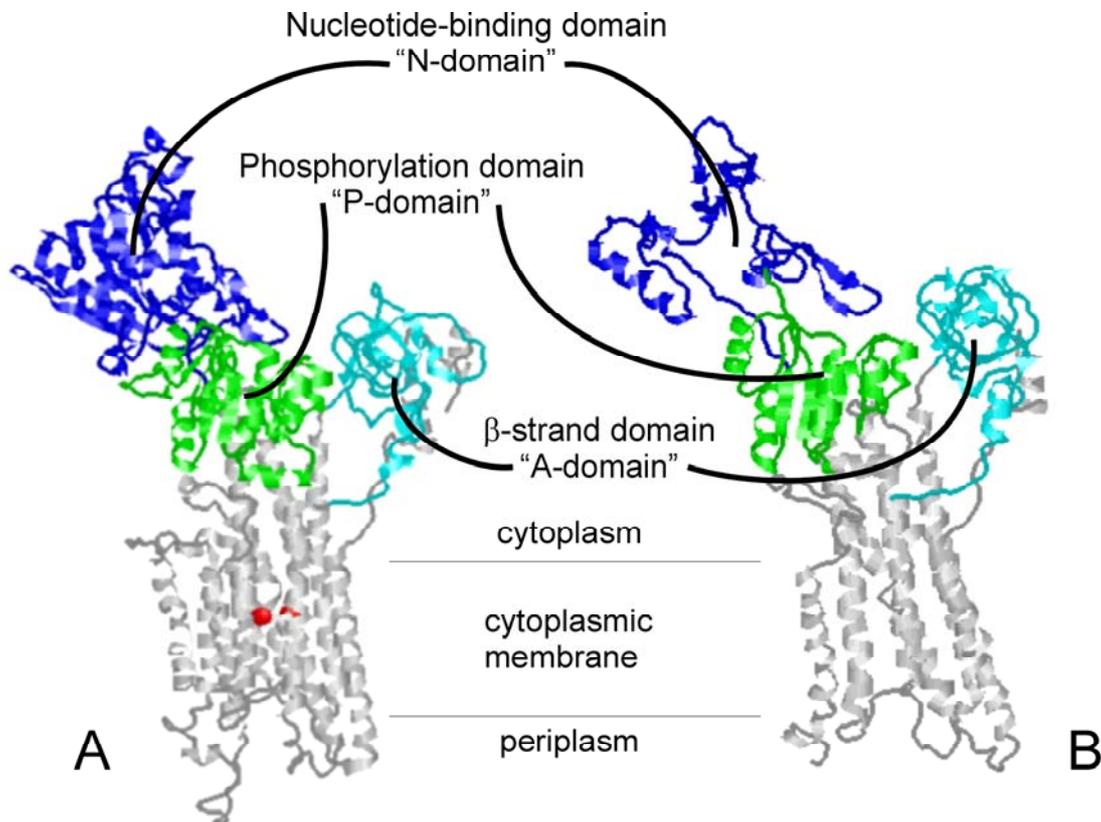


Abbildung 6.1: Die Domänen-Organisation von P-ATPasen: **A:** Struktur der Ca^{2+} -ATPase nach Toyoshima et al.,^[420] **B:** Modell von KdpB (Modelling mit den Programmen „O“ und „whatif“ nach unveröffentlichten Ergebnissen von Engelbrecht et al.

Auch wenn beide ATPasen zu der selben Klasse von Transportern mit übereinstimmenden Motiven der P-ATPasen gehören, so gehören doch beide zu verschiedenen Untergruppen dieser heterogenen Proteinfamilie, mit einer Homologie in den Kernsequenzen von weniger als 25%.^[421]

Die hydrophobe 59 kDa Untereinheit KdpA besitzt 10 die Zellmembran durchziehende Abschnitte.^[422] KdpA zeigt geringe strukturelle Ähnlichkeiten mit K^+ -Kanälen, in besonderer Weise mit dem so genannten H5-Motiv.^[423, 424]

Die Tatsache, dass diverse KdpA-Mutanten verschiedene K_m -Werte aufweisen, legt die Vermutung nahe, dass diese Untereinheit für die K^+ -Ionen-Bindung und deren Transport verantwortlich ist. Die Untereinheit KdpC (20.5 kDa) besitzt wahrscheinlich nur eine einzige transmembrane α -Helix an ihrem N-Terminus. Der Rest des Proteins befindet sich im

Cytoplasma. Es steht fest, dass KdpC essentiell für die Funktion des Gesamtkomplexes ist, jedoch ist seine Rolle immer noch Gegenstand von Diskussionen.^[425, 426] Es ist zu betonen, dass weder KdpA noch KdpC ausgedehnte Homologien mit anderen Proteinen aus der Genbank *data base* besitzen und somit ihre Einzigartigkeit dokumentieren.

Das KdpF-Peptid (3kDa) besteht aus lediglich einem hydrophoben membranständigen Abschnitt. Die Analyse von Stämmen mit *kdpF*-Deletion legt die Vermutung nahe, dass dieses Peptid *in vivo* nicht essentiell ist. Allerdings beobachtet man bei *in vitro* Studien mit dem isoliertem KdpFABC-Komplex von solchen Stämmen keine ATPase-Aktivität mehr. Jedoch ist es möglich, die ATPase Aktivität wiederzuerlangen, wenn man isoliertes KdpF dem Komplex zuführt. Dieses Phänomen nährt die Annahme, dass KdpF den KdpF-Komplex *in vitro* stabilisiert.^[427, 428]

6.2 Festphasensynthese von Peptiden

Seit der Entwicklung des Konzepts zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden und Peptiden vor fast vierzig Jahren durch *Letsinger*^[63] und *Merrifield*,^[429] ist die Optimierung von Kupplungsreagenzien, Lösungsmitteln und Schutzgruppen so weit fortgeschritten, dass die Synthese kurzer Oligopeptide in guten Ausbeuten und hervorragenden Reinheiten heute keine Herausforderung mehr in der bioorganischen Chemie darstellt. Auch die Synthesen kurzer Peptidsequenzen mit *N*-Alkylresten oder sterisch gehinderten Seitenketten (α - oder β -verzweigt) stellen nur noch geringe Anforderungen an die Optimierung der Verfahren.^[430, 431] Ein vollkommen anderes Phänomen unvollständiger oder gänzlich ausbleibender temporärer Schutzgruppenabspaltungen oder Kupplungen über mehrere Aminosäurereste hinweg beobachtet man im Fall der sogenannten '*difficult sequences*'.^[432-435] Diese sind gekennzeichnet durch:

- sehr starke Sequenzabhängigkeit
- spontanes Schrumpfen des Harzvolumens
- unvollständige oder ausbleibende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe
- unvollständige oder ausbleibende Acylierung des *N*-Terminus

Diese Schwierigkeiten in der Synthese treten frühestens ab der 5. Aminosäure einer Sequenz auf und werden ab der 15. Aminosäure statistisch wieder seltener.^[436]

Ursache dieses Verhaltens ist die Bildung von faltblattartigen Sekundärstrukturen, die entweder durch Rückfaltung der Peptidkette oder durch intermolekulare Wechselwirkung mit benachbarten Peptidketten oder dem polymeren Träger selbst erfolgen können, die unvollständige Solvatisierung des Peptidylharzes zur Folge haben und so den Zugang zu den freien Aminotermini verhindern.

Dieses führt dann weiterhin zu einem stark verminderten Quellvolumen des Peptidylharzes mit schlechter Reagenzpermeabilität. Darüber hinaus ist die Erkennung einer aggregierenden Sequenz ohne HPLC-Kontrolle schwierig, da die Ninhydrintests, die auf Vollständigkeit der Kupplung detektieren, falsch positive Ergebnisse anzeigen.

Große Anstrengungen sind unternommen worden, die oben beschriebenen synthetischen Probleme im Zusammenhang mit bestimmten Aminosäuresequenzen zu überwinden. Die bisherigen *state-of-the-art* Strategien, die zumindest das Risiko der Aggregation mindern können und routinemäßig angewendet werden sollten, sind im Folgenden zusammengestellt:

- Möglichst geringer Vernetzungsgrad der eingesetzten Polystyrolharze ($\leq 1\%$ Divinylbenzol) und niedrige Beladungsdichte der Harze (≤ 0.25 mmol/g).^[437]
- Einsatz polarer, aprotischer Lösungsmittel wie DMF, NMP oder DMSO (Oxidationsmittel!), auch Zusatz von THF oder DCM.^[438]
- Verwendung neuer Harze mit polaren Baugruppen, wie Polyamidharze oder PEG-funktionalisierte Harze.^[439-443]
- Durchführung von Doppelkupplungen.

Von den vielen weiteren beschriebenen Strategien zur Überwindung einzelner schwieriger Sequenzen sind der Einsatz von Boc- statt Fmoc-Strategie, die Kupplung bei höheren Reaktionstemperaturen^[444] und der Zusatz chaotroper Salze wie NaClO₄, LiCl oder KSCN noch am universellsten anwendbar.^[445] Die Verringerung des Anteils der Nebenprodukte ist allerdings häufig nur gering und stellt sich erst nach mehreren Optimierungscyclen ein, die für jede einzelne Fmoc-Abspaltung und folgende Kupplung erneut wiederholt werden müssen, bis die aggregierende Region überwunden ist! Ob dagegen der Einsatz von Ultraschall^[446, 447] oder solubilisierender Präsequenzen^[448-450] sich zu allgemein anwendbaren Lösungsstrategien entwickeln werden, bleibt noch abzuwarten.

Über den Einfluss der Seitenkettenschutzgruppen auf das Aggregationsverhalten gibt es ebenso unterschiedliche Befunde wie über die aus empirischen Untersuchungen abgeleiteten Versuche, das Auftreten schwieriger Sequenzen vorherzusagen.^[434, 451-454] In jedem Fall

bedarf die Synthese schwieriger Sequenzen durch *batch*-Strategie einer umfassenden Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte, wobei nicht vorhergesagt werden kann, ob die Synthese überhaupt erfolgreich durchgeführt werden kann oder ein Strategiewechsel bei der Synthese erforderlich ist. Wegen des großen Aufwands, der mit den erforderlichen Vorabsynthesen und nachfolgendem *upscaling* der Ansätze verbunden ist, sind Strategien entwickelt worden, die schneller zum gewünschten Produkt führen und beim Auftreten einer unüberwindlichen Abspaltungs- oder Kupplungsreaktion innerhalb der Sequenz alternative Routen ermöglichen.

Diese wesentlich elegantere Strategie zur Synthese großer Peptide bis hin zu Proteinen ist die konvergente Peptidsynthese, deren Prinzip in Abbildung 6.2 dargestellt ist.^[455, 456]

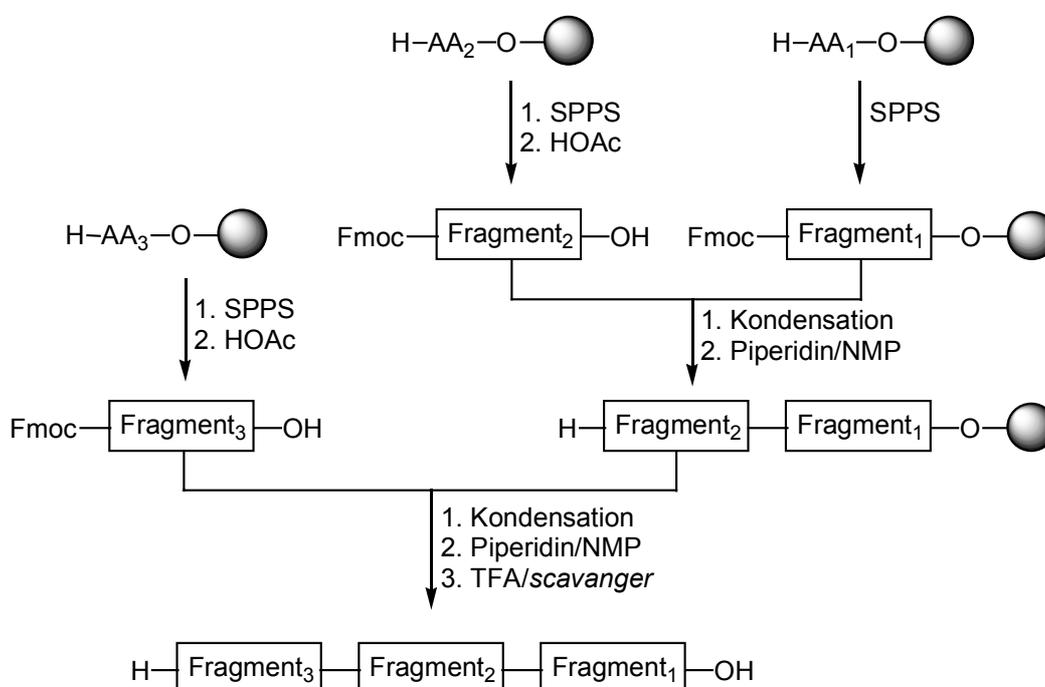


Abbildung 6.2: Prinzip der konvergenten Peptidsynthese nach Fmoc/tBu-Strategie auf TCP-Harz.

Die Synthese der geschützten Fragmente kann auch nach Boc-Strategie erfolgen, wobei die Verankerung auf dem polymeren Träger über einen orthogonalen Linker erfolgen muss (z. B. den in letzter Zeit entwickelte Fmoc-Linker).^[457, 458] Auch muss die Kondensation der geschützten Fragmente nicht in der gezeigten Reihenfolge geschehen^[459] und auch nicht zwangsläufig an fester Phase, sofern man den C-Terminus orthogonal schützt.^[458, 460, 461] Die

Kombination aus Festphasensynthese geschützter Fragmente nach Boc-Strategie mit der Phenacylgruppe (Pac) als C-terminaler Schutzgruppe und Kondensation in dem Lösungsmittelsystem TFE, HFIP oder Phenol in CHCl_3 (25%/75%, v/v)^[462, 463] hat zur Synthese des mit 238 Aminosäuren bisher größten bekannten synthetischen Proteins GFP (*green fluorescent protein*) durch *Sakakibara et al.* geführt.^[464] Die Übertragung eines analogen Lösungsmittelsystems auf die Kondensation an fester Phase ist ebenfalls beschrieben,^[452, 453] allerdings ist diese Strategie nicht mit dem TCP-Harz kompatibel (Säurelabilität des Linkers!) und die Verwendung stärker säureresistenter Linker ist aufgrund der drastisch verlängerten Abspaltzeiten für die Reaktionskontrolle bei der Syntheseentwicklung unvorteilhaft.

Durch die Synthese der geschützten Peptidfragmente ist deren Reinigung vor der Fragmentkondensation möglich, wodurch die Zahl der Nebenprodukte (hauptsächlich Deletionsmutanten) gering bleibt und entsprechende Trennprobleme bei der finalen HPLC-Reinigung des Zielmoleküls umgangen werden. Die konvergente Synthesestrategie sollte es im Prinzip ermöglichen, einen Abschnitt schwieriger Kupplungen in einer Sequenz zu 'überspringen', indem kurz vor Beginn der unvollständigen Reaktionen ein Fragment gekuppelt wird. Durch den Einfluss der dann vorgelagerten schwierigen Sequenz kann es aber erneut zu unvollständigen Reaktionen in dem eigentlich problemlosen neuen Fragmentbereich kommen, wodurch der Vorteil der Strategie wieder verloren geht.

Die Festlegung der Schnittstellen für die Fragmentkondensation erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten, die allerdings selten gleichzeitig realisierbar sind:

- Fragmente mit weniger als 12 Aminosäuren (Löslichkeit).
- C- und N-terminal möglichst keine sterisch gehinderten Aminosäuren (β -Verzweigung in Val, Ile und Thr) die die ohnehin schon geringe Reaktionsgeschwindigkeit weiter verlangsamen würde.
- N-terminal keine sekundären Amine wie Pro (langsame Acylierung) und kein Glu (Bildung der Pyroglutaminsäure).
- C-terminal möglichst Gly oder Pro (keine Racemisierung), aber keinesfalls His(Trt), Cys(Trt), Phe, Tyr(tBu), Trp(Boc), Asp(OtBu), Asn(Trt) oder Gln(Trt), da diese während der Aktivierung in Fragmentkupplungen, in der genannten Reihenfolge, sehr stark zur Racemisierung neigen.

Aufgrund der möglichen beschriebenen Schwierigkeiten in der Festphasensynthese sehr großer Peptide/Proteine sind im letzten Jahrzehnt auch Methoden entwickelt worden, die auf der chemoselektiven Kupplung freier (d.h. ungeschützter) Peptidfragmente in wässrigem Medium beruhen. Eine Beschreibung aller Methoden würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb hier auf die sehr guten, aktuellen Übersichtsartikel zu diesem Thema verwiesen wird.^[465, 466]

6.3 Reversible Schutzgruppen des Rückgrats von Peptiden

Eine Methode, die das ursächliche Problem der oben beschriebenen, schwierigen Sequenzen zu beseitigen versucht, ist die reversible Substitution des Peptidrückgrats, wodurch einerseits die Bildung einer an der Strukturbildung beteiligten Wasserstoffbrücke verhindert wird und außerdem die Bildung einer *cis*-Amidbindung ermöglicht bzw. induziert wird, was die Stabilität der Sekundärstruktur nachhaltig stört.

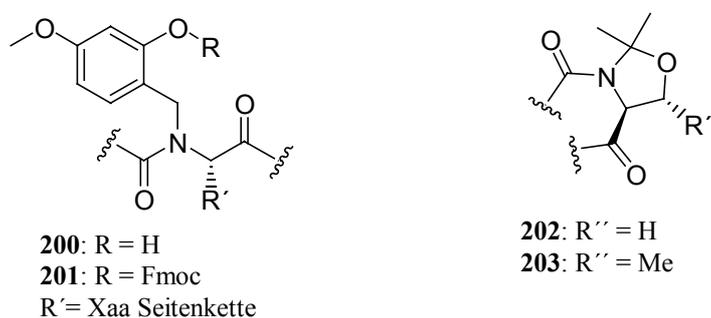


Abbildung 6.3: Strukturen der Derivate zum reversiblen Schutz des Peptidrückgrats durch 2-Hydroxy-4-methoxybenzylreste (Hmb, **200** und **201**) und von Ser und Thr abgeleitete Pseudoproline (**202**) und (**203**).

Bei den beiden vorgeschlagenen reversiblen Schutzgruppen handelt es sich um die von Sheppard *et al.*^[467, 468] eingeführten substituierten *N*-Benzylgruppen (**200**, **201**) und die aus Seitenketten-Rückgrat-Cyclisierung resultierenden Pseudoproline (**202**, **203**) von Mutter *et al.* (Abb. 6.3).^[469, 470]

6.3.1 Die *N*-2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-Schutzgruppe

Die Einführung der Hmb-Schutzgruppe erfolgt entweder als *N,O*-bis- (**200**) oder *N*-mono-Fmoc-*N*-Hmb-Aminosäuren (**201**). Ursprünglich wurde angenommen, dass die stark nukleophile, phenolische Hydroxygruppe der Hmb-Gruppe in **200** während der Kupplung zu Substitutionen am aktivierten *C*-Terminus führen würde (intra- oder intermolekular) und deshalb ebenfalls temporär geschützt werden müsste.^[471] Diese Substitution erfolgt tatsächlich, aber überwiegend unter intramolekularer Cyclisierung, wobei das gebildete Intermediat **205** eine gerade ausreichende Acylierungstendenz gegenüber dem *N*-Terminus von nicht- β -verzweigten Aminosäuren im Peptidylharz **206** zeigt.^[472, 473] Nach Fmoc-Abspaltung von **206** erfolgt die Kupplung der folgenden aktivierten Fmoc-Aminosäure erst an die phenolische Hydroxygruppe zu **208** und nach *N, O*-Acytransfer entsteht das Peptidylharz **209** (Abb. 6.4).^[474]

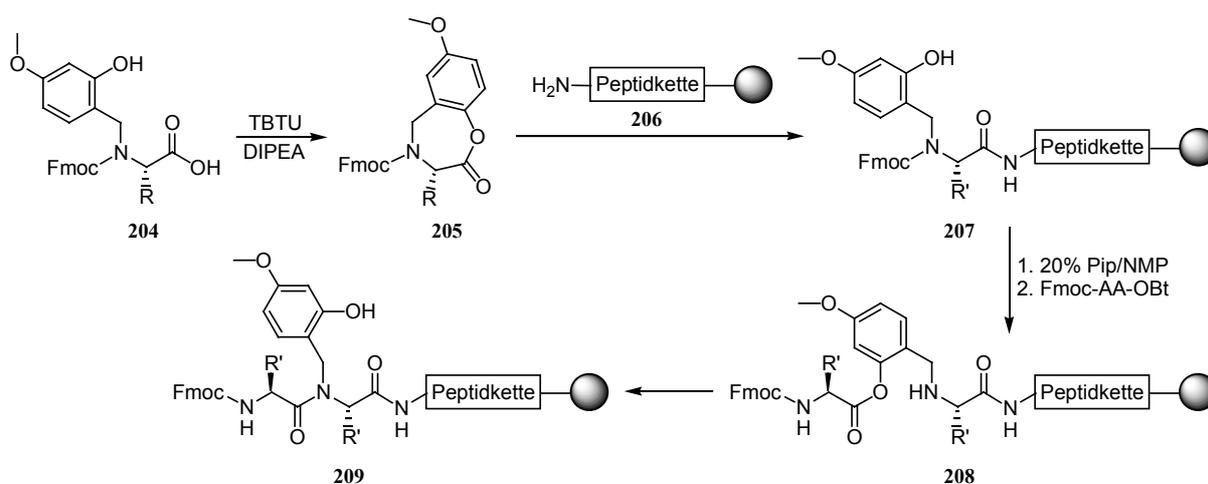


Abbildung 6.4: Aktivierung und Kupplung von *N*-Fmoc-*N*-Hmb-Aminosäuren **204** zu den *N*-Hmb-geschützten Peptidylharzen **209**.

Die Acylierung der sekundären (*N*-Hmb-)Aminogruppe ist ebenfalls vom sterischen Anspruch der Aminosäureseitenkette abhängig.^[473] Während Kupplungen zwischen sterisch wenig gehinderten Resten wie Gly und Ala (eine der beiden Aminosäuren jeweils als *N*-Hmb-geschützter *N*-Terminus des Peptidylharzes) noch unter Standardbedingungen mittels Aktivierung durch das System TBTU/HOBt/DIPEA zu vollständigem Umsatz gebracht werden können, erfordern vollständige Kupplungen von Fmoc-Val-OH an

H-Val(*N*-Hmb)-Peptidylharze den Einsatz von Aminosäurefluoriden und Temperaturen von 60 °C über einen Zeitraum von 12 h für die Kupplungsreaktion! Die Abspaltung der *N*-Hmb-Schutzgruppe erfolgt bei der sauren Abspaltung der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen mit 90% TFA, allerdings nur, wenn die Phenolfunktion des Hmb nicht acyliert ist (siehe nachfolgende Betrachtungen zur Strukturinduktion).

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es wenige Untersuchungen, die den strukturellen Einfluss der *N*-Hmb-Schutzgruppe belegen konnten. Ein Vergleich der aggregierenden β -Amyloid₁₋₄₀-Sequenz mit der entsprechenden Penta(*O*-Acetyl-Hmb)^{20,25,29,33,37}-Verbindung (erhalten durch *capping* der Phenolfunktionen mit Ac₂O und anschließende Seitenkettenentschützung mit TFA) zeigte eine Destabilisierung der helikalen Eigenschaften in TFE durch die *N*-Hmb-Modifikation. In wässrigem Medium zeigt die *N*-Hmb-modifizierte Verbindung zwar eine verstärkte Tendenz zur Faltblattbildung aber im Gegensatz zur natürlichen Verbindung keine Aggregation.^[475] Für den strukturellen Einfluss wird ein *long range* Effekt postuliert, sodass eine *N*-Hmb-Modifikation nur an jeder sechsten Aminosäure notwendig sein sollte, um die Aggregation wirkungsvoll zu inhibieren. Allerdings sind Ausnahmen von dieser Regel beschrieben worden.^[476]

Abgesehen von diesen Widersprüchlichkeiten haben zahlreiche Beispiele in den letzten Jahren den Nutzen dieses Konzepts in der Synthese schwieriger Sequenzen belegt, wobei die Entwicklung neuer, leichter in die wachsende Peptidkette einbaubarer Benzyllderivate die Anwendungsbreite in den nächsten Jahren sicher noch vergrößern werden.^[472, 473, 476-482]

6.3.2 Die *Mutter*'schen Pseudoprolin

Im Gegensatz zu den im vorigen Kapitel beschriebenen Hmb-Derivaten handelt es sich bei den von *Mutter et al.* entwickelten Pseudoprolinen um Seitenketten-Rückgrat-cyclisierte Derivate von Ser **202** und Thr **203** in Abbildung 6.3 (auch solche des Cysteins, dessen Derivate hier aber nicht besprochen werden sollen).^[469] Die Pseudoprolin werden aufgrund der sehr schlechten Tendenz zur Acylierung in Form der Fmoc-Xaa-Ser/Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH Dipeptide in die wachsende Peptidkette eingeführt, was neben der allgemeinen Beschränkung auf Serin und Threonin einen der Hauptnachteile dieser Methode bedingt, da in einer separaten Synthese immer erst der entsprechende Baustein von 40 theoretisch möglichen Dipeptiden hergestellt werden muss.^[470] Entsprechend den Betrachtungen zur konvergenten

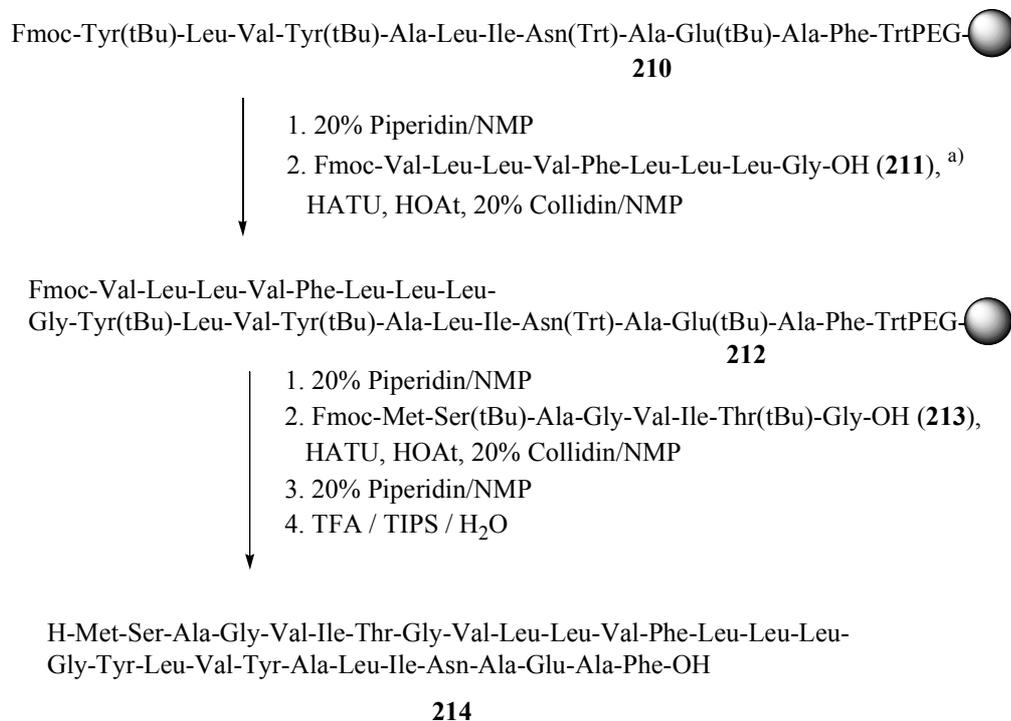
Peptidsynthese verläuft die Kupplung der Pseudoprolindipeptide an das Peptidylharz erwartungsgemäß ohne Racemisierung und mittels der im Kapitel beschriebenen Kupplungsreagenzien quantitativ. Die Spaltung der Pseudoprolinschutzgruppe erfolgt unter den Bedingungen für die Seitenkettenentschützung des Zielpeptids mit 90 % TFA innerhalb einer Stunde. Neben dem *tuning* der Säurelabilität hat die symmetrische Substitution mit den beiden Methylgruppen in Pseudoprolinen (**202**, **203**) den Vorteil, dass die Verbindungen achiral sind (im Gegensatz zu den Thiazolidin-Derivaten aus Cystein und substituierten Benzaldehyden). Die im Hinblick auf die Sekundärstruktur wichtigste Eigenschaft ist allerdings, dass in diesen Dipeptiden die Amidbindung zwischen Pseudoprolin und *N*-terminal nachfolgender Aminosäure zu 100 % in die *cis*-Konfiguration gezwungen wird, wie durch NMR-spektroskopische Untersuchungen an Modellpeptiden belegt werden konnte.^[483]

Der Einfluss auf die Inhibition der Aggregation sollte wie im Fall der *N*-Hmb-Derivate mindestens über einen Abstand von sechs Aminosäuren reichen und wurde von *Mutter et al.* für einige schwierige Sequenzen demonstriert. Dabei ist besonders der Einfluss der Modifikation auf die Löslichkeit der vollständig geschützten Fragmente bemerkenswert.^[484]

In einem unabhängigen Vergleich von *Ede et al.* haben sich die Pseudoproline gegenüber der *N*-Hmb-Schutzgruppe in der Synthese einiger schwieriger Sequenzen in Bezug auf die Reinheit der synthetisierten Peptide als überlegen erwiesen.^[480]

6.4 Aminosäuresequenz von KdpF und Synthesestrategie

Ein erster Blick auf die Aminosäuresequenz des KdpF-Peptids lässt sofort die bevorzugten Schnittstellen für eine konvergente Synthese erkennen. Die Kupplung von Peptidfragmenten, die naturgemäß nicht im großen Überschuss eingesetzt werden, erfordern an den C-terminalen Enden der zu aktivierenden Aminosäure möglichst eine Aminosäure, welche unter den Bedingungen einer starken Aktivierung für die Kupplung nicht im Stande sind zu racemisieren- namentlich Glycin bzw. Prolin. Das 29-mer lässt sich strategisch in drei nicht übermäßig lange Fragmente unterteilen an deren Ende sich die Glycine Gly-8 bzw. Gly-17 befinden.



^{a)}alternativ gleich die Kupplung mit Fmoc-Met-Ser(tBu)-Ala-Gly-Val-Ile-Thr(tBu)-Gly-Val-Leu-Leu-Val-Phe-Leu-Leu-Leu-Gly-OH (**215**)

Abbildung 6.5: Synthesestrategie zur Fragmentkondensation zum KdpF.

Diese Strategie ließ sich jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit des mittleren Valin- und Leucin-reichen Fragments **211** nicht verwirklichen. Weder in DMF noch NMP, selbst unter Zugabe von DMSO war Löslichkeit gegeben. Dies führte zu der Idee, die beiden für die Kupplung einzusetzenden Fragmente in einem Strang darzustellen, um sie gemeinsam in der Fragmentkupplung an das am Harz befindliche 12-mer zu koppeln. Dieses um neun Aminosäuren verlängerte Fragment **215** könnte unter Umständen eine gesteigerte Löslichkeit aufweisen, trotz der generellen Beobachtung, daß die Löslichkeit von vollständig in den Seitenketten geschützten Peptiden eher mit der Kettenlänge abnimmt. Mitunter wird jedoch auch beobachtet, daß Domänen von Peptiden sich gegenseitig in nicht vorhersehbarem Maße in ihrem Verhalten beeinflussen. Es wäre zu erwarten, daß die etwas polarere *N*-terminale Domäne die Hydrophobizität der mittleren, nur unpolare Seitenketten enthaltenden Aminosäure-Sequenz zumindest teilweise kompensiert. Bei dem Versuch das mittlere Fragment an der festen Phase um das *N*-terminale 9-mer zu verlängern, stellte sich jedoch

heraus, daß sich die N^{α} Fmoc-Schutzgruppe nicht mehr entfernen ließ. Selbst die ausgedehnte Behandlung mit 30 % Piperidin / NMP über Nacht ließ die Fmoc-Gruppe unberührt, womit dieser Synthesansatz ebenfalls aufzugeben war. Dieses Verhalten ist angesichts der ausgesprochen hydrophoben Natur der Peptidsequenz nicht verwunderlich und lässt sich vermutlich durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen am Harz erklären, die den N -Terminus in einer dem Abspaltreagenz nicht zugänglichen Position aufweisen. Wie sich später herausstellen sollte, war eine Entschützung an dieser Position doch möglich (s. Abschnitt 6.9).

6.5 Batchsynthese

Neben anderen Ansätzen wurde natürlich auch versucht, das 29-mer in einem Stück am Harz in konsekutiven Schritten aufzubauen. Dieses gelingt ohne die mit der Synthese von langen Peptiden eigenen Problemen der unvollständigen Kupplung und Entschützung bis zur Aminosäure Val-12, was einem 18-mer entspricht.

6.6 Einsatz von Hmb-Derivaten

Es wurde ebenfalls versucht die Aggregation der wachsenden Peptidkette durch den Einbau von Fmoc-(N^{α} Hmb-Ala)-OH bzw. Fmoc-(N^{α} Hmb)-Leu-OH an verschiedenen Positionen zu unterbinden, jedoch war es ab einer gewissen Kettenlänge des wachsenden Peptids nicht mehr möglich, neben den unvollständigen Kupplungsprodukten und unvollständig entschützten Fragmenten das gewünschte Peptidfragment zu detektieren. Diese Tatsache ist sicher auch auf die unvollständige Löslichkeit der längeren entschützten Fragmente zurückzuführen, die dann mit einfachen analytischen Methoden auch nicht mehr nachweisbar sind. Jedenfalls muß der Einfluss von N -Hmb-derivatisierten Aminosäuren in diesem Fall als unbefriedigend beschrieben werden.

6.7 Zwei-Fragment-Strategien

Durch die Möglichkeit der Elongation des C -terminalen Fragmentes bis zu einem 18-mer, war es möglich, eine alternative Zwei-Fragment-Strategie zu entwickeln. Dadurch würde der

äußerst hydrophobe Zwischenteil des Peptids auf zwei Fragmente verteilt, was sich eventuell positiv auf die Löslichkeit auswirken sollte (Abb. 6.6).

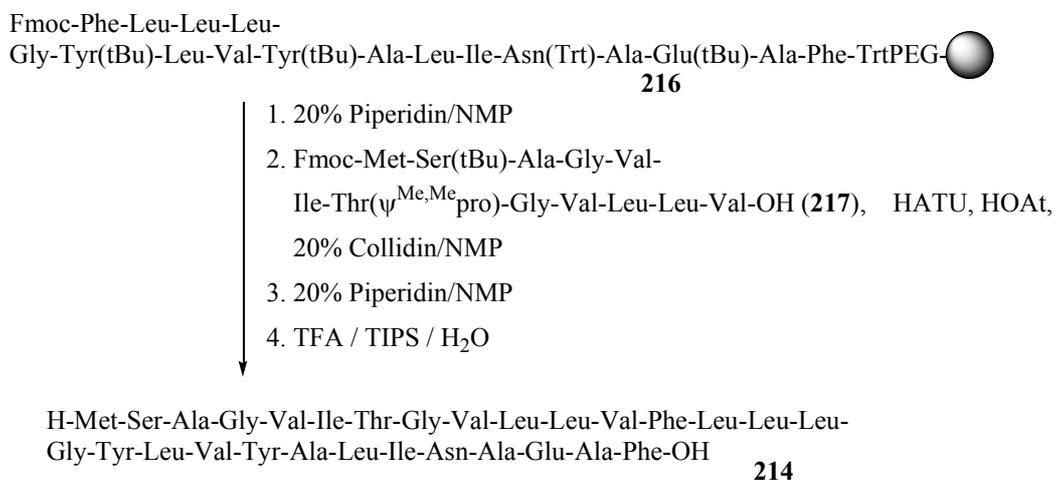


Abbildung 6.6: Zwei-Fragment-Strategie der Synthese von KdpF (**214**), Fmoc-KdpF₁₋₁₂ (**217**) + H-KdpF₁₃₋₂₉ (**216**) (immobilisiert).

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die *N*-terminale Aminosäure Phe-13 des *C*-terminalen Fragments noch vollständig entschützen ließ. Somit wurde diese Position als Schnittstelle gewählt.

Zur Löslichkeitssteigerung des zu kuppelnden Fragments wurde statt des Dipeptids Ile-Thr(^tBu) der Pseudoprolinbaustein des Fmoc-Ile-Thr-Dipeptids eingebaut (Abb. 6.7), was tatsächlich zu einer beträchtlichen Löslichkeitssteigerung des 12-mers im Vergleich zu einer konventionellen ^tBu-Schutzgruppen-Strategie führte.

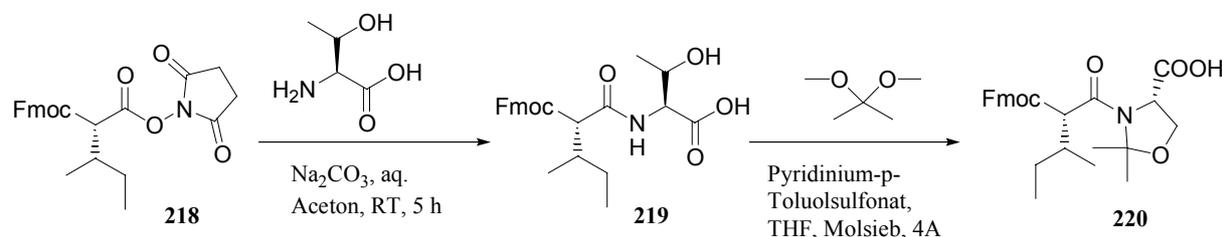


Abbildung 6.7: Synthese von Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$) nach Mutter.

Diese Strategie weist jedoch eine ungünstige Schnittstelle auf, da die *C*-terminale Aminosäure des KdpF₁₋₁₂ (**217**) ein Valin darstellt, was erstens bei starker Aktivierung eine Racemisierung

am C_α zur Folge haben könnte und zweitens aufgrund der Verzweigung in der Seitenkette eine *per se* schwierige Kupplung darstellt. Die Neigung zur Epimerisierung wurde unter verschiedenen Kupplungsbedingungen anhand von kleinen Peptiden untersucht. Ein Epimeres eines so großen Peptids mit 30 Aminosäuren dürfte kaum in Gegenwart des Hauptprodukts mit *all*-L-Konfiguration zu identifizieren, geschweige denn zu trennen sein.

Mit diesem Ansatz war es ein einziges Mal möglich, das am N-Terminus unacylierte gewünschte Peptid in Spuren in der HPLC-gekoppelten ESI-Massenspektroskopie zu beobachten. Nach der N-terminalen Formylierung konnte das Peptid nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse konnten leider nicht reproduziert werden.

Nach der vollständigen Entschützung und Abspaltung vom Harz wurden lediglich Artefakte beobachtet, welche sich nicht zuordnen ließen. Dies ist evtl. auf die vollständige Unlöslichkeit des hydrophoben Peptids zurückzuführen, da alle Proben vor der analytischen Betrachtung filtriert werden.

6.8 Der vorteilhafte Einfluss von DBU auf die Fmoc-Entschützung

Die Beobachtung der unvollständigen bzw. nicht möglichen Fmoc-Entschützung bei hydrophoben, aggregierenden Peptidsequenzen ist ein weit verbreitetes und wohlbekanntes Phänomen. Trotzdem gibt es bis heute keine generelle Lösung dieses Problems, sondern lediglich die in Kap. 6.2 dargestellten Ansätze, die je nach Sequenz nicht allgemein gültig sind und (nach dem Prinzip „Versuch und Irrtum“) auszuprobieren sind. Ein bisher nicht ausführlicher erwähnter Ansatz beruht auf der Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), welches ebenfalls als Entschützungsreagenz für die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe beschrieben wird. Beim wissenschaftlichen Austausch mit Mitarbeitern des Karolinska-Instituts in Stockholm, wurde der Gebrauch von DBU als überlegen im Vergleich zu Piperidin bei der Entschützung von Fmoc-Gruppen in schwierigen Sequenzen beschrieben. Als vorteilhaft stellt sich die größere Basizität des DBU dar. So gelang die mit Piperidin nicht mögliche Entschützung des Fragments **221** und die weitere Kettenverlängerung dieser äußerst hydrophoben Sequenz (Abb. 6.8).

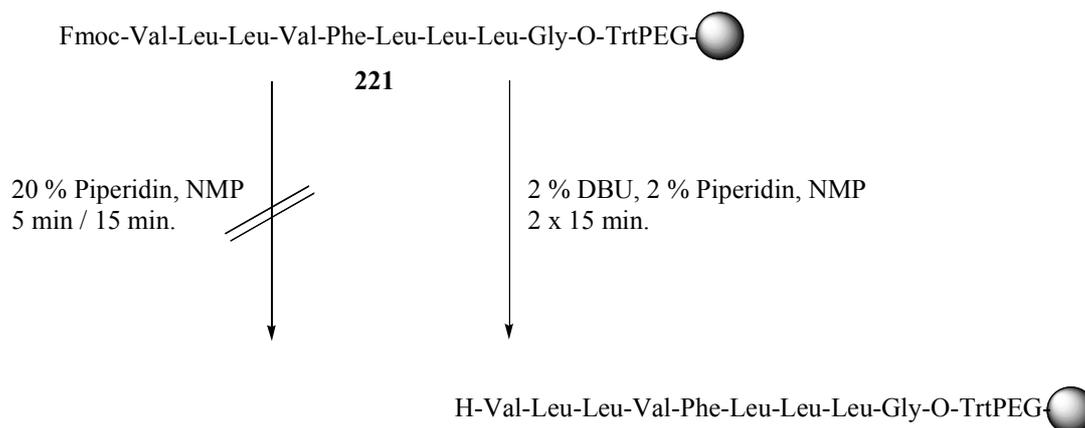


Abbildung 6.8: Erfolgreiche Entschützung in der Gegenwart von DBU.

Die Behandlung des Fmoc-geschützten Peptids an der festen Phase hat jedoch in Gegenwart von 2 % Piperidin zu erfolgen, um das aus der β -Eliminierung entstehende Dibenzofulven abzufangen, damit eine irreversible Alkylierung der peptidischen Aminosäure unterbunden werden kann (Abb.6.9).

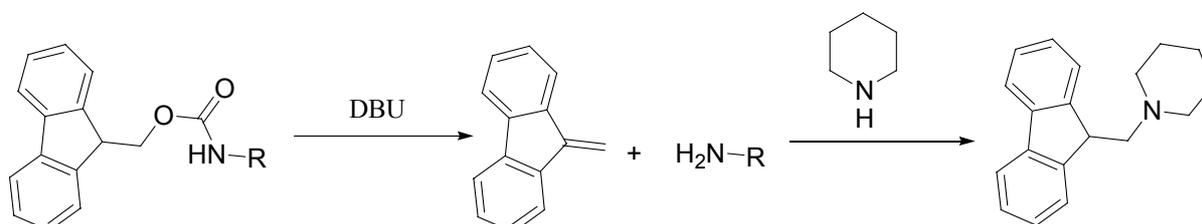


Abbildung 6.9: Entschützung mit DBU und anschließendes Scavenging des entstehenden Dibenzofulvens durch Piperidin.

Die Überlegenheit dieser Methode konnte ebenfalls während der Syntheseveruche der C-terminalen α -helicalen hydrophoben Domäne des SPC-Peptids demonstriert werden. Dort ist die C-terminale Poly-Valin-Sequenz für das Auftreten von unvollständigen Entschützung und Kupplungen verantwortlich und eine chemische Synthese dieser Domäne ist bis heute nicht möglich.

Da man nun in der Lage war, die schwierige Position am Val-9 im Fragment **221** zu überwinden, konnte nun über die Synthese längerer Fragmente verfügt werden. Es bot sich aus Gründen der Löslichkeitssteigerung an, das bereits vormals eingebaute Pseudo-Prolin-Derivat Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (**220**) zu verwenden, um (über einen *long-range*-Effekt) die mögliche Aggregation in einem späteren Kupplungsschritt zu verhindern. So gelang die Synthese der Fragmente Fmoc-KdpF₁₋₁₇-OH (**222**), Fmoc-KdpF₅₋₁₇-OH (**223**) bzw. Boc-KdpF₁₋₁₇-OH (**224**). Der Versuch diese an das immobilisierte Fragment H-KdpF₁₈₋₂₉-TrtPEG zu koppeln, scheiterte jedoch jeweils aus Gründen der Unlöslichkeit und Tendenz zur Gelbildung der N-terminalen Fragmente (Abb. 6.10).

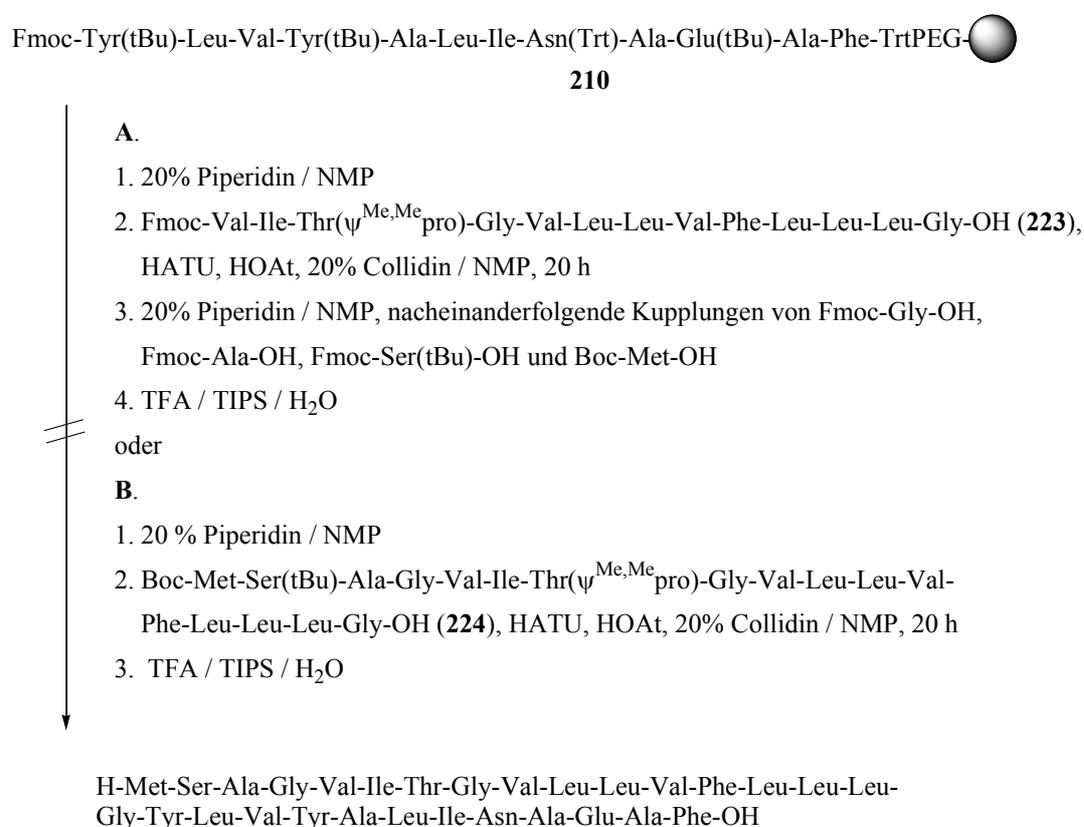


Abbildung 6.10: Synthesestrategie [*KdpF*₁₋₁₇ + *KdpF*₁₈₋₂₉] bzw. [(*KdpF*₅₋₁₇ + *KdpF*₁₈₋₂₉) + *KdpF*₁₋₄].

Somit wurden die Versuche zur Synthese von KdpF aufgegeben.

6.9 Beiträge zur Synthese und Reinigung von hydrophoben Peptiden

6.9.1 „Solubilising Tail“ Methode zur Reinigung von hydrophoben Peptiden

Die in Kap. 6.1 und 6.2 besprochenen Methoden zur Überwindung der Schwierigkeiten, die mit der Synthese von sog. „difficult sequences“ bei extrem hydrophoben Peptiden verbunden sind, sind eine große Bereicherung für die heutige Festphasen-Synthese von solchen Verbindungen. Jedoch entfallen die lösungsvermittelnden Eigenschaften eingesetzter Pseudoprolin bzw. *N*-Hmb-Derivate nach der Total-Entschützung der Peptide im Abschluß an die erfolgte Synthese, so dass eine konventionelle Reinigung mittels RP-HPLC nicht möglich wird, da diese Peptide den in gewöhnlich für HPLC-Trennungen genutzten Lösungsmitteln leidlich löslich sind und somit – wie vielfach beschrieben – einfach auf der Chromatographie-Säule „verschwinden“.

Die Gruppe um D.R. Englebredsen beschrieb eine Methode bei welcher hydrophoben, schwerlöslichen Modellpeptiden am C-Terminus mit einem löslichkeitsvermittelnden, hydrophilen Peptid, das sich wiederholende [Arg-Gly]- bzw. [Lys-Gly]-Sequenzen enthält, modifiziert wurden (Abb 6.11). Sowohl in einer Festphasen-Boc-Strategie, bei der ein Glycolamid-Ester-Linker benutzt wurde, als auch bei der später erarbeiteten Fmoc-kompatiblen Synthese, bei der ein 4-Hydroxymethylbenzamid-Ester als Linker zum Einsatz kam, wurden lösliche Peptid-Konstrukte erhalten, welche ohne weiteres mittels HPLC zu reinigen waren.^[448, 449]

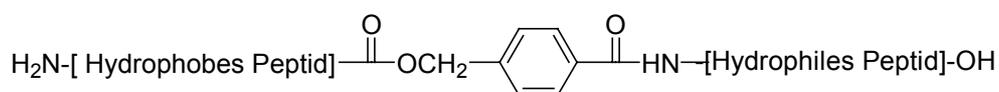


Abbildung 6.11: Prinzip der „Solubilising Tail“ Methode.

Bei Anwendung der Fmoc-*t*Bu-Strategie (Abb. 6.12) wird hierbei zuerst mittels Standard Kupplungs- und Entschützung-Protokollen (Kupplungen mit Fmoc-Aminosäuren, TBTU, HOBT, DIPEA in NMP, Entschützung mit 20% Piperidin in NMP) das hydrophile Peptid an einem säurelabilem Linker aufgebaut. Die Zahl der Wiederholungseinheiten wurden hierbei erfolgreich zwischen 4 und 6 variiert. Nach Kupplung der 4-Hydroxymethyl-benzoesäure (4-

HMB) (A) wird die erste Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids mittels der Anhydrid-Methode über das jeweilige symmetrische Anhydrid an die Hydroxygruppe des 4-HMB-Linkers gebunden (B). Die folgende Festphasensynthese des hydrophoben Peptids folgt dem oben erwähnten Standard-Protokoll (C). Es besteht nun die Möglichkeit das seitenkettenentschützte Peptidkonstrukt nach der Abspaltung vom Harz mittels HPLC zu reinigen und das Peptid nach alkalischer Hydrolyse des 4-Hmb-Linkers mit verdünnter Natronlauge im wässrigen Medium auszufällen. Das wasserlösliche Peptidfragment bleibt dabei in Lösung (D).

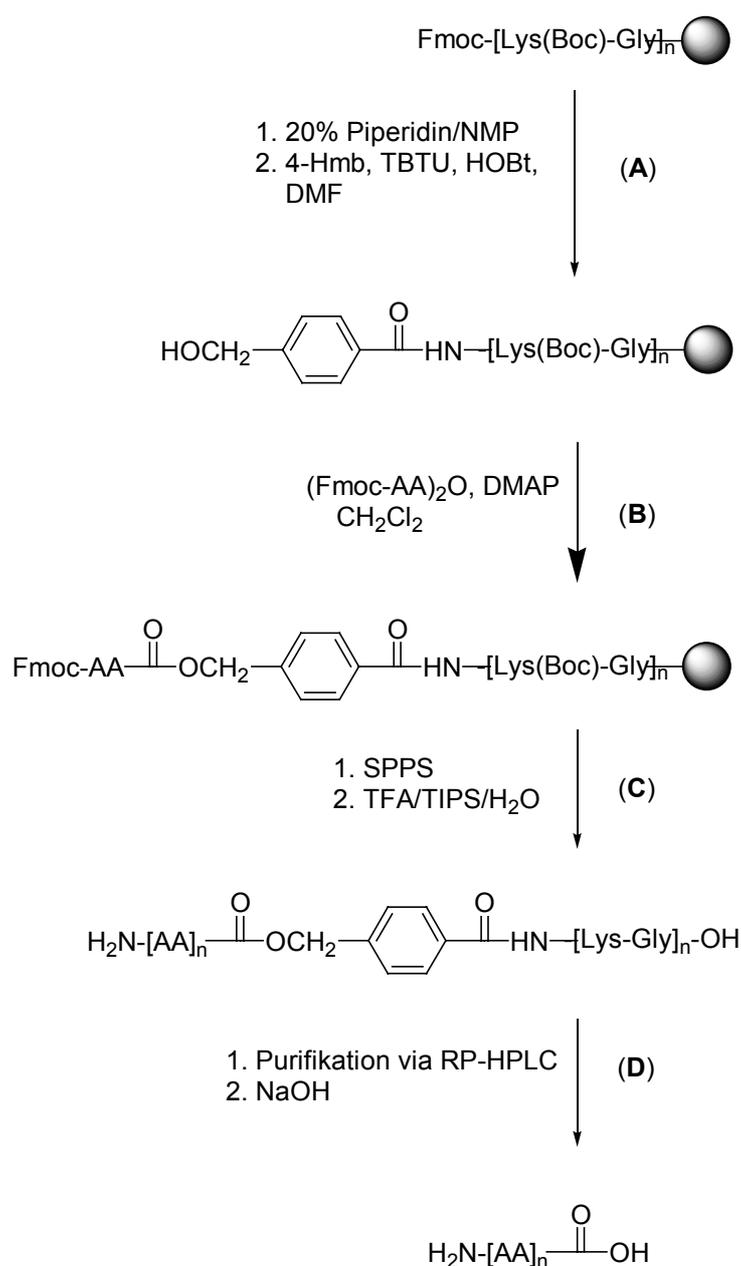


Abbildung 6.12: Allgemeines Schema der Fmoc „Solubilising Tail“ Methode nach Englebredsen.

Mit dieser Methode wurde zwar ein wertvoller Beitrag zur Reinigung von hydrophoben Peptiden geleistet, jedoch bestehen weiterhin dieselben Probleme bei der Synthese an der festen Phase, die mit der Selbstaggregation wachsender hydrophober Peptidsequenzen^[434, 452, 453] und/oder deren geringerer Löslichkeit^[485] verbunden sind und sich in unvollständiger Kupplung^[436, 486] bzw. in Problemen bei der N^α -Fmoc-Entschützung äußern. Tatsächlich ist die sich auf dem Harz befindliche Peptidsequenz sogar um 8 bis 12 Aminosäuren länger als das native Peptid und der löslichkeitserhöhende Einfluß kann so noch nicht zum Tragen kommen, da die permanente Schutzgruppen-Strategie verlangt, dass die Arginin- bzw. Lysin-Seitenketten während der Ketten-Elongation geschützt vorliegen. So ist anzunehmen, dass beim Vorhandensein einer sog. „schwierigen Sequenz“ die beschriebenen Probleme bei der Englebredsens-Variante eher bei einem früheren Kupplungsschritt auftreten als später in der Sequenz.

6.9.2 Entwicklung eines neuen bifunktionalen 4-Hmb-DMPA-acetal -Linkers

Um die Vorteile der „solubilising tail“-Methode für die Reinigung des hydrophoben KdpF-Peptides zu nutzen, jedoch die Probleme, die mit der Synthese des um 8-12 Aminosäuren verlängerten Peptides an der festen Phase verbunden sind, zu umgehen, wurde folgende Strategie entwickelt, welche auch allgemein anwendbar sein sollte.

Hierbei bietet sich die vielfach beschriebene und zuverlässige Methode der „chemoselektiven Ligation“ an. Wäre es möglich, das hydrophobe Peptid mit einer Aldehyd-Gruppe zu funktionalisieren, so besteht die Möglichkeit, über ein Oxim mit einem Hydroxylamin-funktionalisiertem, hydrophilen „Schwanzpeptid“ ein lösliches Ligationsprodukt zu erhalten (Abb. 6.13).

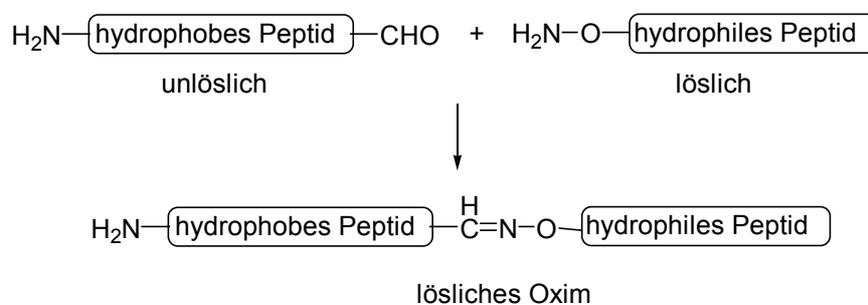
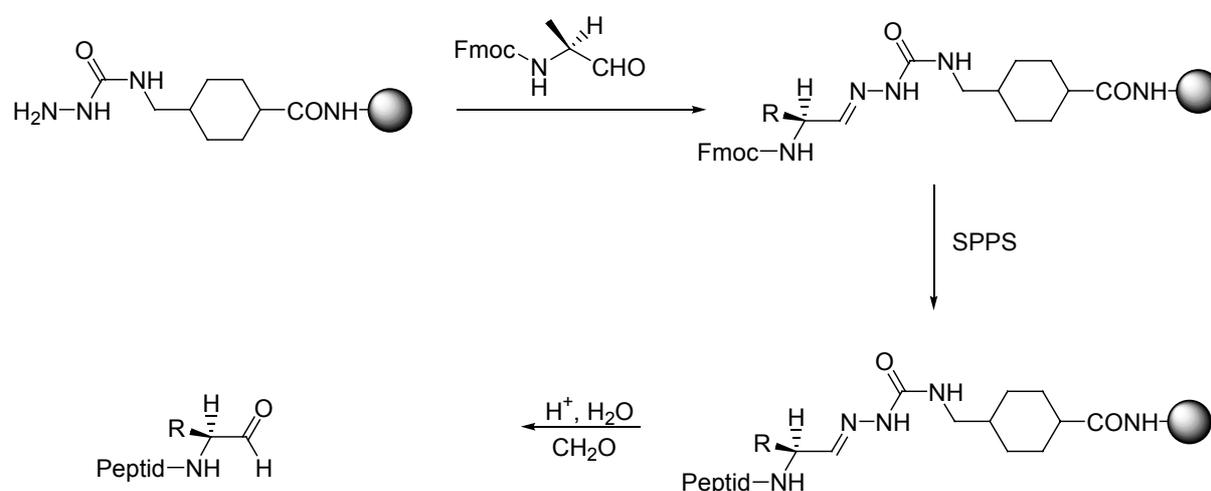


Abbildung 6.13: Strategie zur Reinigung von hydrophoben Peptiden.

In der Literatur mangelt es nicht an der Beschreibung von zahlreichen Methoden zur Synthese und/oder Verankerung von Peptidyl-Aldehyden an die feste Phase, wie zum Beispiel die Immobilisierung C-terminaler Aldehyde über Semicarbazone (Abb. 6.14, **A**).^[487] Eine alternative Methode zur Festphasensynthese von C-terminalen Peptid-aldehyden^[488, 489] oder Aldehyden von kleineren Molekülen^[490] verwendet die reduktive Abspaltung mit LiAlH_4 von Weinreb-Amid-Linkern (Abb. 6.14, **B**).^[491] Zusätzliche Methoden bemühen weiterhin intermediäre Oxazolidine (Abb. 6.14, **C**)^[492] oder photoabspaltbare Acetale.^[493]

A:



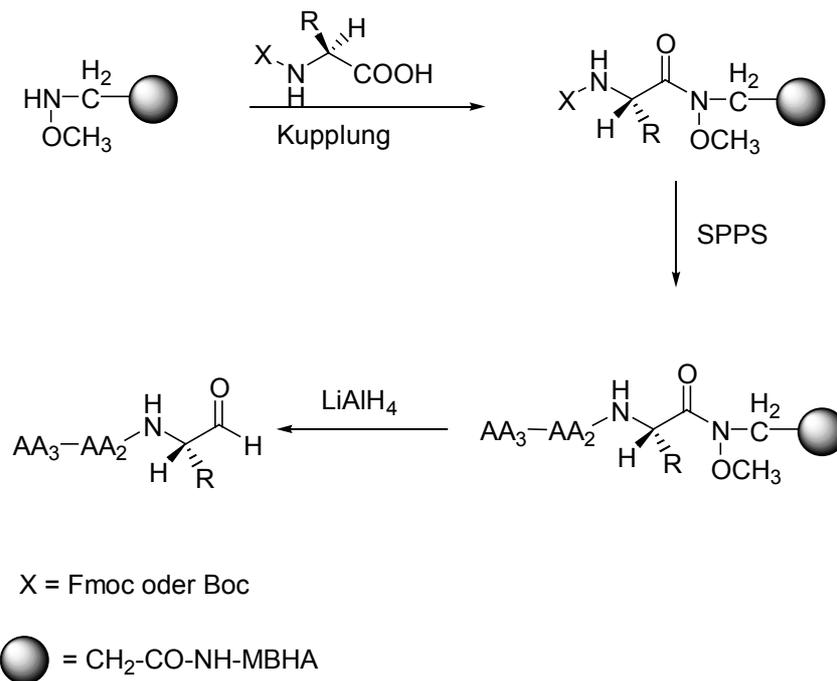
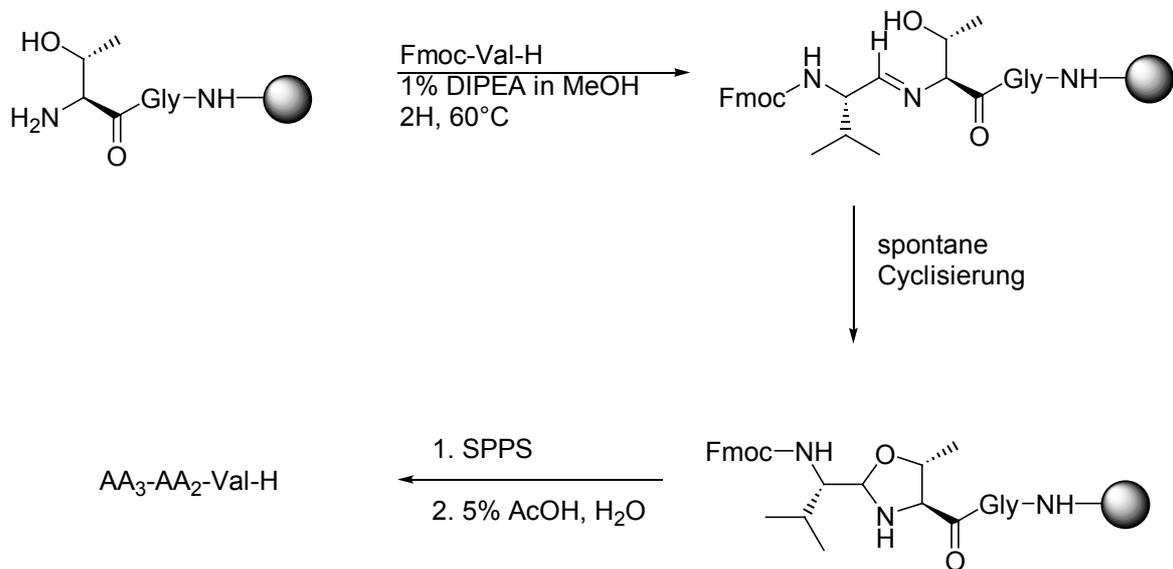
B:**C:**

Abbildung 6.14: Immobilisierung bzw. Generierung von Peptidylaldehyden an fester Phase.

In der Tat ist die Wirksamkeit der chemoselektiven Ligation über eine Oxim-Bindung in mehreren Fällen für die Bildung von Peptid-Konjugaten beschrieben.^[494, 495] Bei den Bemühungen, transmembrane Peptide auf diese Art und Weise - also durch eine Kombination

der Englebredsens-Methode mit dem Prinzip der chemoselektiven Oxim-Ligation – löslich und einer konventionellen Aufreinigung zugänglich zu machen, bestünden so folgende Nachteile:

- die Überschreitung der Kettenlänge des zu synthetisierenden Peptids um die Zahl der Aminosäuren des hydrophilen „Schwanzpeptids“ und die mit wachsender Kettenlänge verbundenen synthetischen Schwierigkeiten bei der Synthese (Aggregation und/oder Unlöslichkeit). Das ist als grundsätzliches Problem der Englebredsens-Methode bereits oben ausgeführt.
- die irreversible Oxim-Bildung und damit ein möglicher Einfluß der hydrophilen Domäne auf die zu untersuchende Struktur des hydrophoben Peptids.

Der hier verfolgte Ansatz versucht diese Probleme durch den Einsatz eines neuen bifunktionellen Linkers für die Festphasensynthese zu überwinden, der sowohl die konventionelle Peptidfestphasensynthese von C-terminalen Aldehyden erlaubt, als auch eine selektive Abspaltung des freien hydrophoben Peptids von Oxim-Konjugat.

Als Linker fungiert hier ein 4-Hydroxymethyl-benzaldehyd **226**, dessen Synthese in Abbildung 6.15 dargestellt ist. Die partielle Reduktion von Terephthalaldehyd gäbe ein schwer zu trennendes Gemisch an Reaktionsprodukten, so dass dieser Ansatz verworfen wurde. Den gewünschte para-Hydroxymethyl-benzaldehyd (**225**) erhält man jedoch in guten Ausbeuten aus der Reduktion von Terephthalaldehyd-mono-diethylacetal mit Natriumborhydrid in Methanol (2 h, 0°C). Bei der anschließenden sauren, wässrigen Aufarbeitung bildet sich spontan der freigesetzte Aldehyd und es wird kein Acetal mehr isoliert.

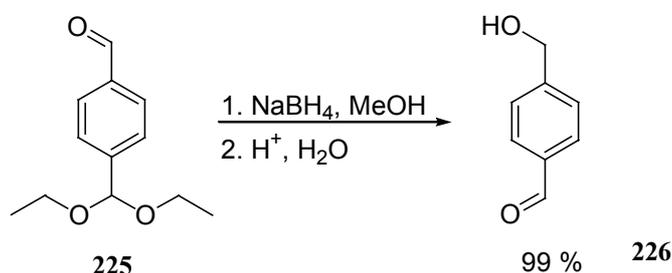


Abbildung 6.15: Synthese von *p*-Hydroxymethyl-benzaldehyd.

Dieser Benzylalkohol wird zunächst über eine Esterbindung mit der C-terminalen *N*^εFmoc-geschützten Aminosäure verknüpft (Abb. 6.16). Anschließend kann mit der 2,2-

Bis(hydroxymethyl)propionsäure (DMPA[®]) unter Säurekatalyse und azeotropen Destillationsbedingungen in Toluol das entsprechende Sechsring-Acetal (**228**) erhalten werden.

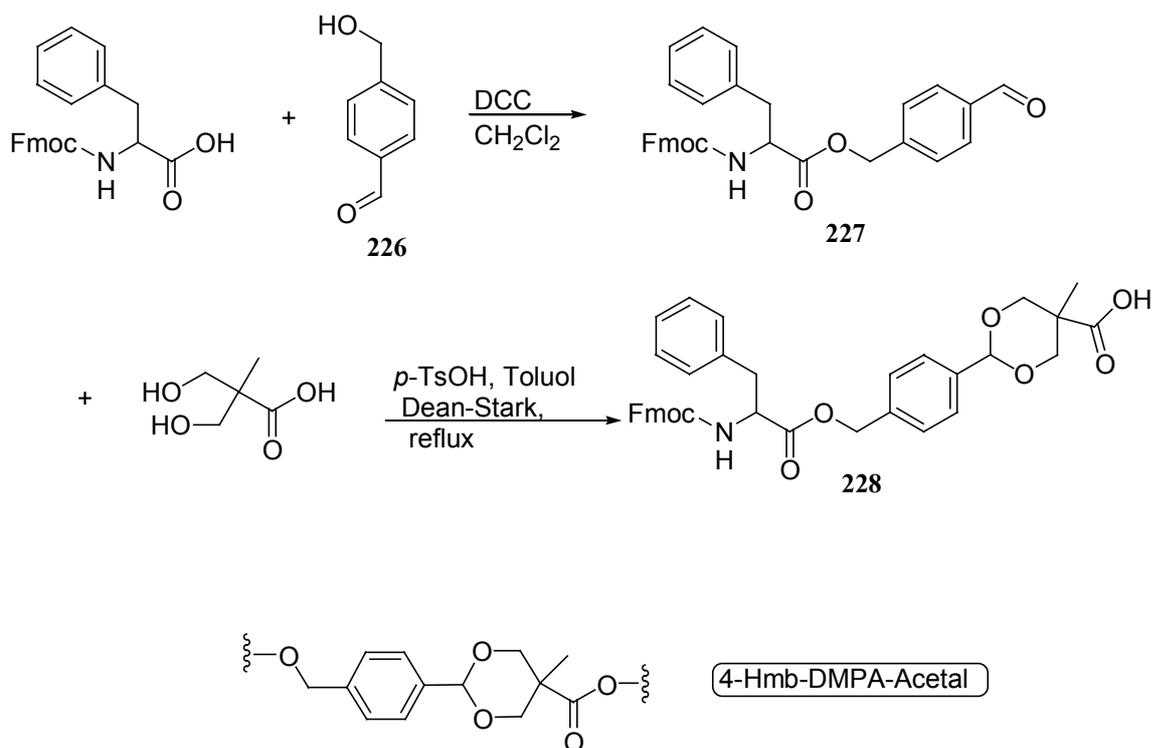


Abbildung 6.16: Synthese des bifunktionalen Linkers **228**.

Über die freie Carbonsäure ist nun die Immobilisierung dieser Aminosäure auf dafür geeigneten Harzen möglich. Im Falle der Verwendung von Wang-Harz ist man in der Lage nach Behandlung mit *p*-Toluolsulfonsäure in CH_2Cl_2 / MeOH unter Öffnung des Acetals einen C-terminalen Aldehyd unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen zu generieren. (Abb. 6.17, **A**) Im Falle der Verwendung von Sieber-Amid-Linkern kann nach der Abspaltung mit 1% TFA in CH_2Cl_2 das C-terminale Carbonsäureamid unter Erhalt des Acetals erhalten werden, und so das Fragment einer Kupplung in Lösung zugänglich gemacht werden. (Abb. 6.17, **B**)

chromatographischer Methoden, wobei die gängigen Lösungsmittel für schwer lösliche Peptide für diesen Zweck nicht geeignet scheinen

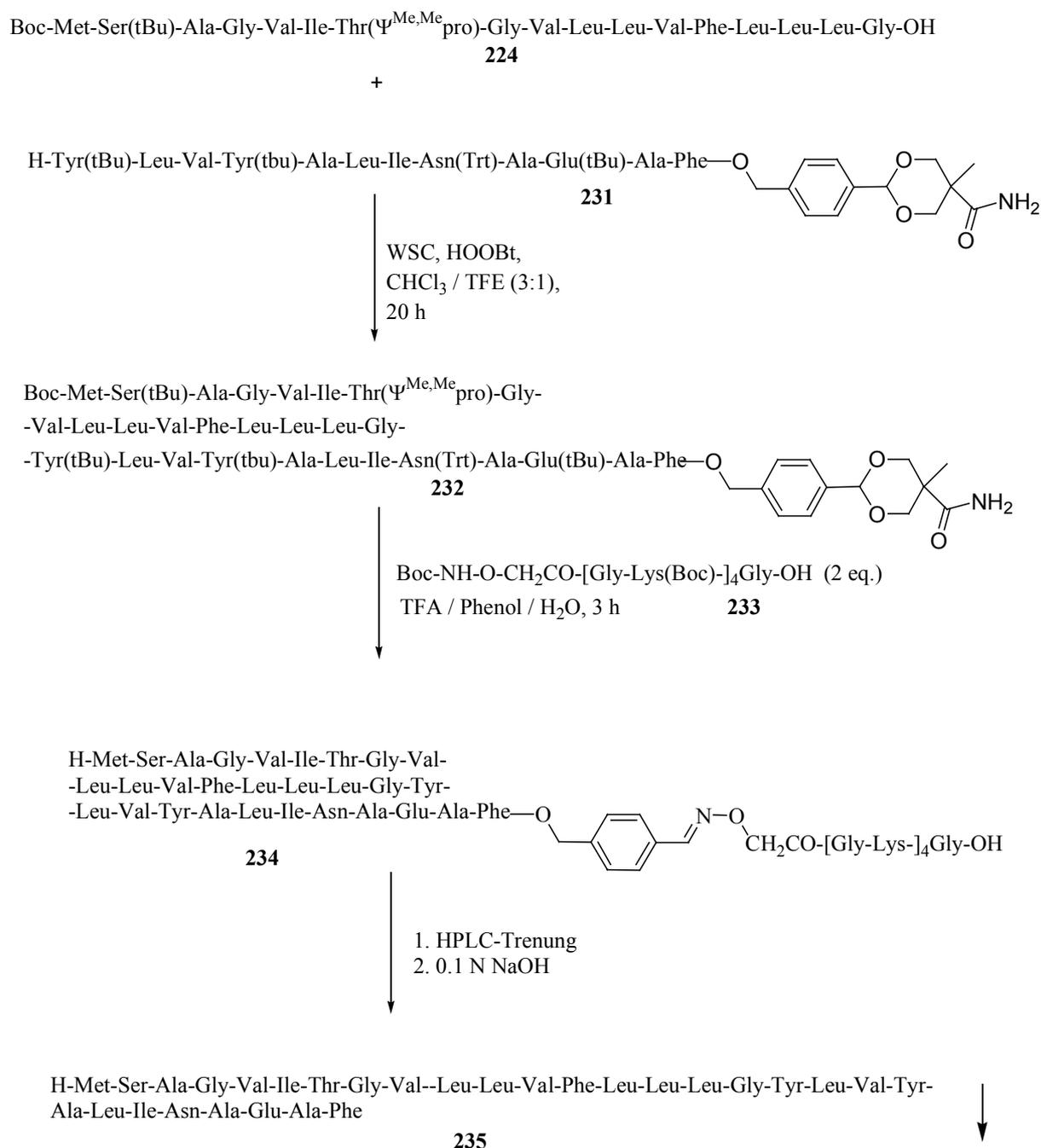


Abbildung 6.18: Strategie der Solubilising-Tail-Methode anhand der Synthese des hydrophoben Transmembranpeptides KdpF.

Auch wenn die Wirksamkeit dieser Methode leider noch nicht zu demonstrieren ist, so liegt doch ein größeres Potential darin, da man nach der chromatischen Reinigung via HPLC im

Stunde wäre, durch einfache Behandlung des löslichen Peptids mit verdünnten Basen, das Peptid von seinem basenlabilen Linker zu trennen und nach Präzipitation als natürliches Peptid zu erhalten, während der lösliche „Schwanz-Teil“ in wässriger Lösung verbliebe.

6.10 Neuartige Ansätze in der Peptidchemie

6.10.1 *in-situ backbone*-Benzylierung

Zuletzt sollen noch zwei experimentelle neue Ansätze diskutiert werden, welche neue Ansätze in der Peptidchemie repräsentieren. Da die Verwendung von *N*-Hmb-Schutzgruppen wie beschrieben neben den Vorteilen der Aggregationsunterbindung von hydrophoben Peptiden während der Festphasensynthese auch mit den Nachteilen unvollständiger Kupplung an sekundäre Amine einhergeht, offenbart der Kupplungsschritt von Hmb-derivatisierten Aminosäurebausteinen häufig das nächste Problem. Der aggregationsinhibierende Einfluss bleibt unbestritten. Wäre man nun in der Lage die donorsubstituierte Benzylgruppe in die schon bestehende Peptidkette einzubauen, würde das Problem der Kupplung von sterisch anspruchsvollen Derivaten entfallen. Durch den statistischen Einbau mehrerer Benzylgruppen würde so die zur Aggregation neigende Peptidkette gestreckt und wäre so der weiteren Kupplung zugänglich. Umgangssprachig würde man dieses Phänomen als „bügeln“ bezeichnen (Abb. 6.19).

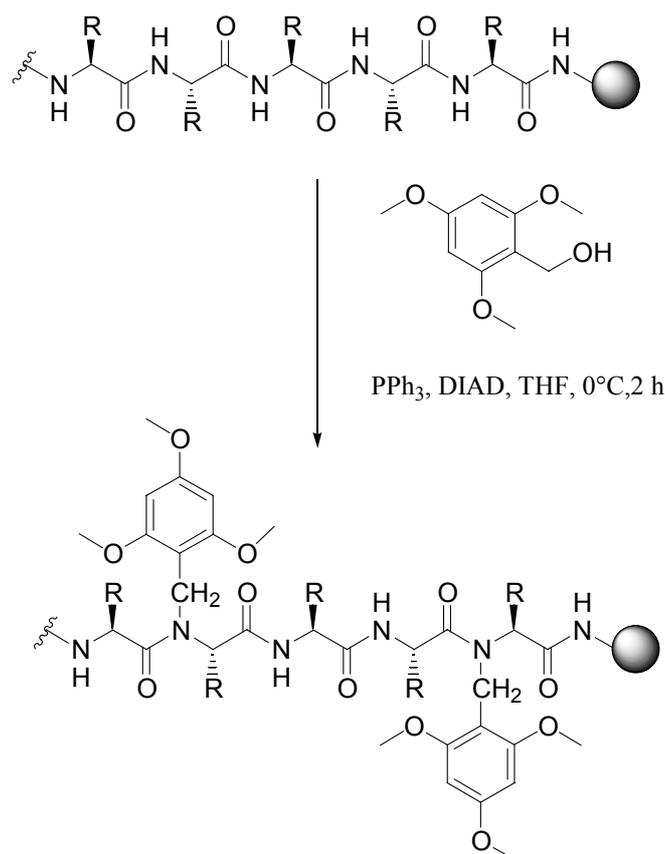


Abbildung 6.19: *Trimethoxybenzyl(Tmb)-backbone-Modifikation an der festen Phase.*

Das allgemeine Prinzip sah vor, nach einer bestimmte Zahl von Aminosäurekupplungen, einen *Backbone*-Benzilyierungsschritt durchzuführen *bevor* die betrachtete Sequenz Aggregation zeigt. Als Benzylderivat sollte statt des 2-Hydroxy-4-methoxy-benzylrestes (Hmb) der ebenso säurelabile 2,4,6-Trimethoxybenzylrest (Tmb) in Form des Benzylalkohols über eine Mitsunobureaktion an der festen Phase eingeführt werden. Der entsprechende Hmb-Alkohol eignet sich für diese Strategie nicht, da es aufgrund der phenolischen OH-Gruppe unter den Reaktionsbedingungen zur Bildung intermolekularer Etherbindungen führen würde. Es ist nicht zu erwarten, dass eine Reaktion dieser Art stöchiometrisch bzw. regioselektiv ablaufen wird, abgesehen von einer Bevorzugung sterisch weniger anspruchsvoller Reaktionszentren. Dieses ist auch nicht erforderlich, da ein statistischer Einbau von Benzylgruppen in das Rückgrat durch die bekannte Weitbereich-Wirkung der Aggregationsinhibierung mindestens an jeder sechsten bis siebten Position ausreichend für den gewünschten Effekt wäre. So ist letztlich der *N*-Alkylierungsgrad unerheblich, dabei der abschließenden Abspaltung und Seitenschutzgruppenentschützung die Tmb-Gruppen ebenfalls abgespalten würden.

Als Modellpeptid wurde das mittlere hydrophobe KdpF-Fragment (Fmoc-Leu-Leu-Val-Phe-Leu-Leu-Leu-Gly-OH) an der Festphase 2 h bei 0°C mit je 40 eq. 2,4,6-Trimethoxybenzylalkohol, PPh₃ und DIAD in THF behandelt. Jedoch konnte neben Spuren von niedermolekularen Verunreinigungen nach der Reaktion nur das ursprünglich eingesetzte Peptid ohne *N*-Alkylierung nachgewiesen werden.

Ob über eine Neubetrachtung dieser Strategie nachgedacht werden sollte ist fraglich. Um eine Reaktion der Amidbindungen unter Mitsunobubedingungen zu erreichen, könnte eine Reaktionstemperaturerhöhung in Betracht gezogen werden, was gleichzeitig jedoch Nebenreaktionen die Tür öffnen würde. Inwieweit dies mit dem Anspruch von mindestens 99.5 %iger Kupplungsausbeute bei jedem Reaktionsschritt der Peptidsynthese vereinbar ist bleibt zu beantworten.

6.10.2 Bifunktionaler Pac-Linker

Die Phenacyl (Pac)-Schutzgruppe ist die in der Sakakibara-Strategie^[496] etablierte Carboxylatschutzgruppe für den Schutz der C-terminalen Carbonsäurefunktion in der konvergenten Lösungssynthese von Peptiden (Abb. 6.20). In einer temporären Boc-Schutzgruppenstrategie für die Aminofunktion ist die Pac-Gruppe gegenüber TFA-Behandlung stabil und lässt sich unter milden Bedingungen (Reduktion mit Zink in Essigsäure bei 40°C) entfernen. Die bisherige Strategie geht von der Lösungssynthese C-terminal-Pac-geschützter Peptidfragmente aus. Ein so hergestelltes Boc-Peptid-OPac-Fragment kann nach der Entfernung der Boc-Schutzgruppe als Aminokomponente bzw. nach Entfernung der Pac-Gruppe als Carbonsäurekomponente in einer Lösungssynthese eingesetzt werden.

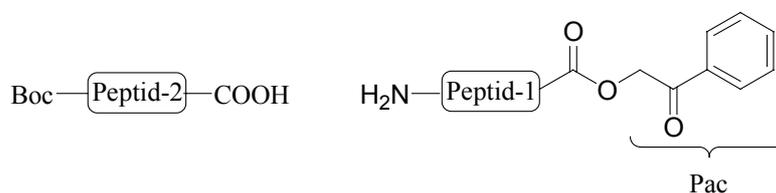


Abbildung 6.20: Schutzgruppenstrategie nach Sakakibara.

Die Synthese von Peptiden in Lösung mit zwangsläufigen Reinigungsschritten nach jeder einzelnen Kupplung ist ein sehr zeitaufwendiges Verfahren. So wurde versucht über die Synthese eines bifunktionalen Pac-Linkers, eine Methode zu entwickeln das C-terminal Pac-

geschützte Peptidfragment an der Festphase nach der Fmoc-Strategie aufzubauen und unter Erhalt der C-terminalen Schutzgruppe abzuspalten.

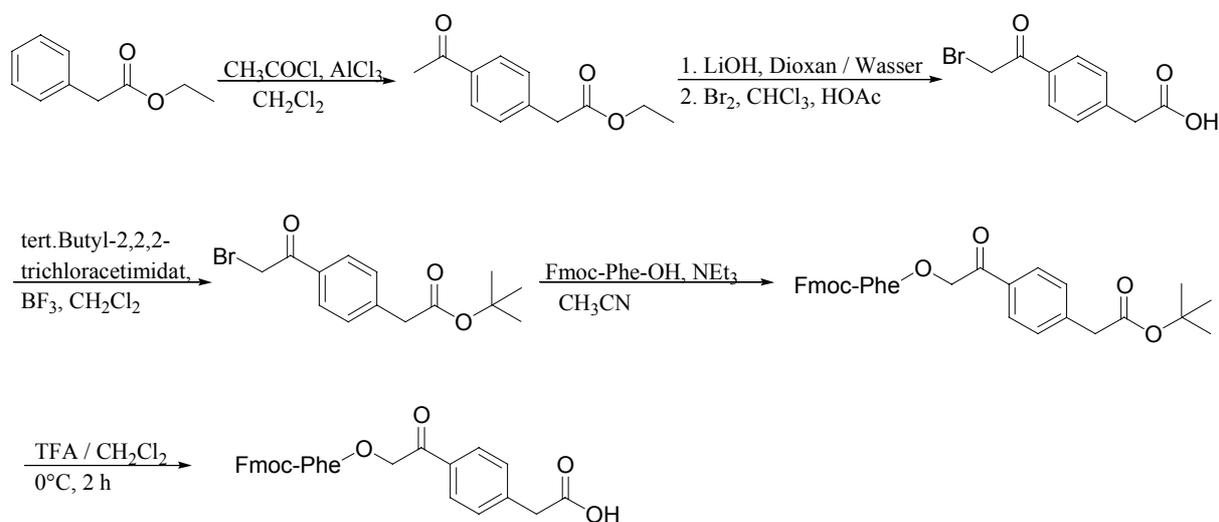


Abbildung 6.21: Entwicklung des bifunktionellen Pac-Linkers.

Die Synthese ist in Abbildung 6.21 dargestellt. Durch die Friedel-Crafts-Acylierung des Phenylessigsäureethylesters wird das *para*-Acetyl-substituierte Derivat erhalten, welches nach Verseifung des Carbonsäureesters an der Acetylgruppe bromiert werden kann. Die Carbonsäurefunktion wird anschließend als *tert.*-Butylester geschützt und schließlich gelang die nucleophile Substitution mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure an der Bromacetylgruppe unter Standardreaktionsbedingungen. Nach der Entschützung des *tert.*-Butylesters erhält man eine C-OPac-geschützte Fmoc-Aminosäure, die über die *para*-Funktionalisierung der Pac-Schutzgruppe an der festen Phase immobilisiert werden kann. Die Verwendung von SieberAmid-Harzen würde die Möglichkeit eröffnen, C-terminal geschützte Fragmente zu synthetisieren (Abb. 6.22).

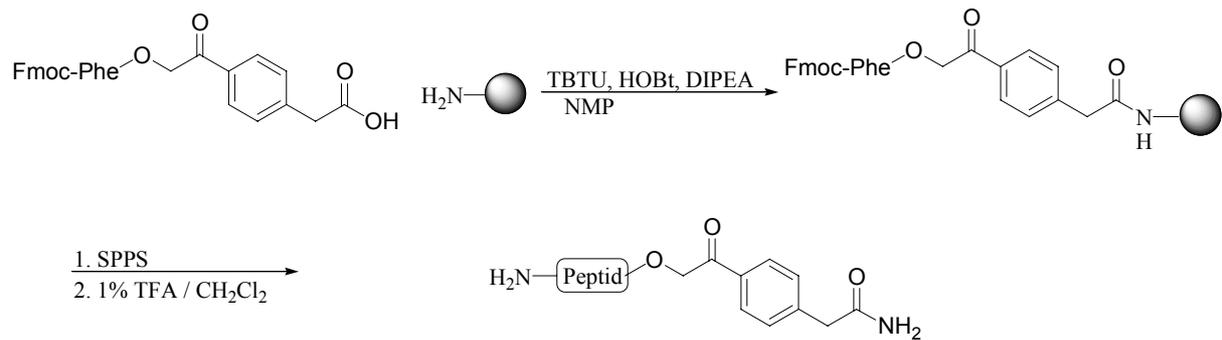


Abbildung 6.22: *Synthese C-terminal Pac-geschützter Peptidfragmente über einen neuartigen bifunktionalen Linker.*

Leider stellte sich heraus, dass der Pac-Ester-Linker zu basenlabil ist, um der Behandlung mit Piperidin bei der Fmoc-Entschützung standzuhalten, so dass schon bei der ersten Entschützung die verknüpfte Aminosäure als Piperazid vom Linker gelöst wird. Damit ist diese Strategie zumindest für einen Fmoc-Schutzgruppenstrategie ungeeignet.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der parallelen Festphasensynthese von niedermolekularen $\alpha 4$ -Integrinantagonisten. $\alpha 4\beta 7$ - und $\alpha 4\beta 1$ -Integrinantagonisten spielen bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Im Mittelpunkt der Arbeit stand 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 der in unserem Arbeitskreis bereits auf ein minimales dipeptidisches Leitmotiv reduzierten Verbindung konnten strukturell vielseitige niedermolekulare Verbindungen unter dem Gesichtspunkt eines verbesserten pharmakologischen Profils synthetisiert werden. Einen Überblick über die durchgeführten strukturellen Abberationen findet sich in Abbildung 7.2. Nachdem wir erkannt haben, dass die C-terminale Amidbindung isoster durch die reduzierte Amidbindung (-CH₂-NH-) ersetzt werden konnte, wurde ein Hauptaugenmerk auf die N-terminale Amidbindung gelegt (Abb. 7.2, gelb). Jene wurde unter Konservierung von aromatischen Restgruppen durch Harnstoff-, Sulfonamid-, Ketomethylen-, Thiomethylen-, Sulfoxido- und Sulfonomethylen-Surrogate und reduzierte Amidbindungen ersetzt. Ferner konnte die Amidbindung nach dem Prinzip des isosteren Einbaus von Aromaten durch Phenylessigsäurederivate bzw. Phenoether ersetzt werden, die hochaktive $\alpha 4$ -Integrinantagonisten darstellten (Abb. 7.1).

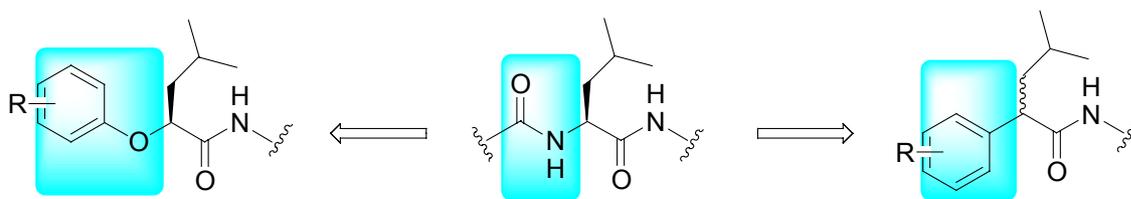
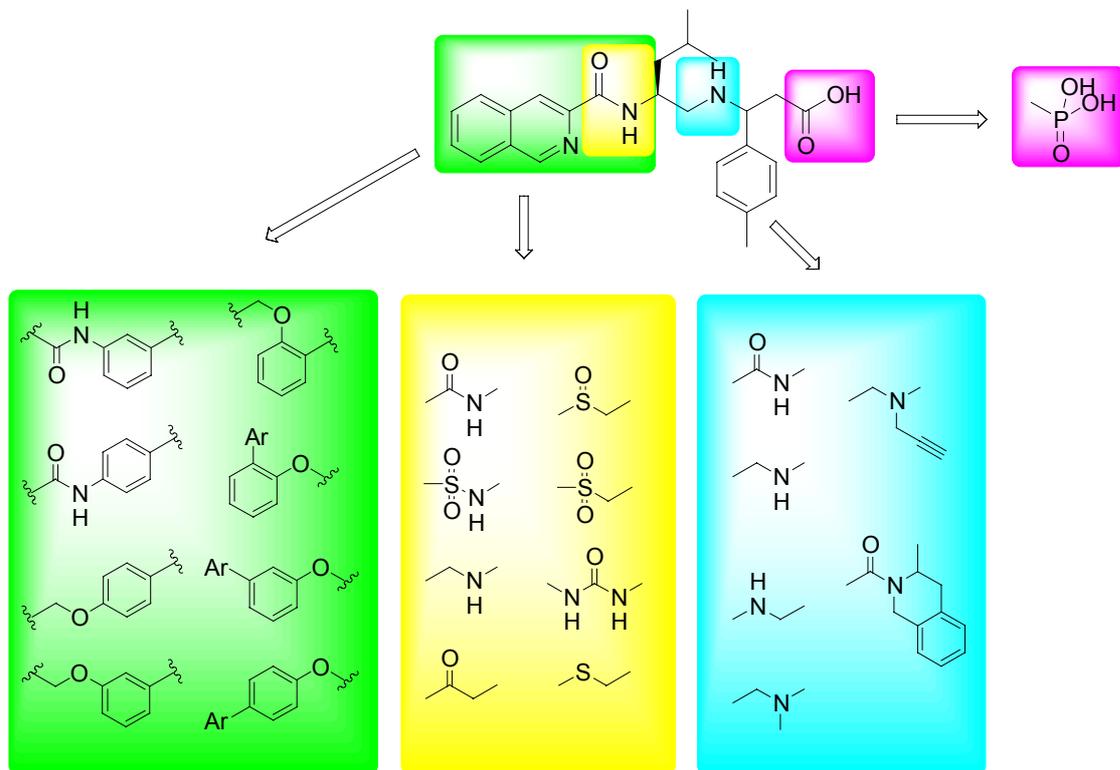
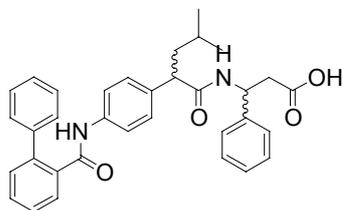


Abbildung 7.1: Isostere Substitution von Amidbindungen durch Aromaten.

Ferner wurde gezeigt, dass die Alkylierung des N-Atoms der C-terminalen β -Aminosäure lediglich marginalen Einfluss auf die Aktivität besitzt, während jegliche Überbrückung, wie in Isochinolin bzw. Chinolin-Gerüstmimetika, mit einem Verlust der Aktivität einhergeht. Auffällige Struktur-Aktivitätsbeziehungen wurden beim Vergleich des Isochinolin-3-carbonsäurerestes mit dem L-Tic- bzw. D-Tic-Baustein beobachtet, die jeweils zwar eine niedrigere Aktivität aufwiesen, jedoch untereinander abhängig von der Stereochemie bedeutende Aktivitätsunterschiede zeigten.



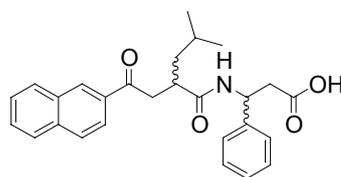
prominente *hits* aus dem kombinatorisch-rationalen Ansatz zur Wirkstoffoptimierung:



IC₅₀: 187 μM

Adhäsion [%] α4β7 / MAdCAM-1:
14 +/-3

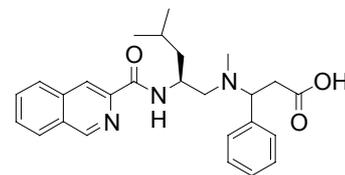
keine Selektivität



IC₅₀: 160 μM

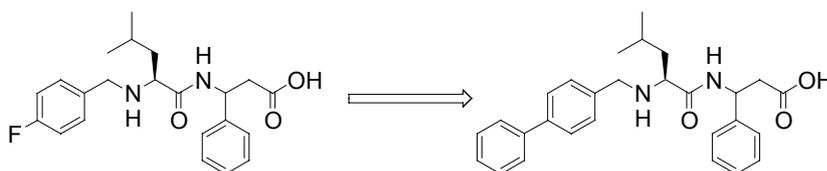
Adhäsion [%] α4β7 / MAdCAM-1:
20 +/-10

keine Selektivität



Adhäsion [%] α4β7 / MAdCAM-1: 25 +/-3
α4β1 / VCAM: 63 +/-26

Selektivität durch N-Alkylierung



Adhäsion [%] α4β7 / MAdCAM-1:
73 +/-8

Adhäsion [%] α4β7 / MAdCAM-1:
7 +/-2

Steigerung der Aktivität durch Ausdehnung des aromatischen Systems.

Abbildung 7.2: Zusammenfassung der Entwicklung von niedermolekularen α4β7-Integrinantagonisten.

Aufgrund der Metallion-komplexierenden Eigenschaften des essentiellen Asparaginsäurerestes, wurde eine Synthese von Phosphonsäurederivaten der 3-Amino-3-arylpropionsäuren entwickelt, deren Nützlichkeit sich in Zukunft auch an anderen Integrinantagonistklassen erweisen sollte.

Schließlich wurden enantioselektive Reaktionen demonstriert, mit denen man nun in der Lage ist, die zwei auftretenden Stereozentren der Peptidomimetika in enantiomerenreiner Form darzustellen und getrennt zu testen.

Die chemische Synthese des transmembranen KdpF-Peptids bleibt ein ungelöstes Problem. Unter Aufwendung unterschiedlichster Strategien stellte sich bisher keine als nützlich heraus, um die mit der Synthese und Reinigung von hydrophoben Peptiden verbundenen Probleme zu überwinden. Als nützliche Erkenntnis aus unzähligen Syntheseansätzen bleibt der überlegene Einsatz von DBU gegenüber Piperidin zur Entschützung von temporären Fmoc-Schutzgruppen bei aggregierenden Peptidsequenzen zu erwähnen. Dieses Verfahren wurde in unserer Gruppe als Standard-Methode etabliert. Ein neuentwickelter bifunktionaler Linker ermöglicht die Festphasensynthese von reversibel C-terminal-aldehydfunktionalisierten Peptiden.

Weiterhin gelang die Synthese des palmitoylierten N-terminalen Fragments des Lungen-Surfactant-Peptids SP-C in einer vollständig an der festen Phase durchgeführten Reaktionsfolge, welche die selektive Entfernung von säurelabilen Cys-Seitenketten-Schutzgruppen und anschließende selektive S-Palmitoylierung nach einem neuen Protokoll beinhaltete. Damit konnte das erste Mal eine Struktur dieses lipophilen Peptids und gleichzeitig Einblick in die molekularen Grundlagen der biologischen Wirkung des Lungen-Surfactant Faktors (LSF) gewonnen werden.

8 Experimenteller Teil:

8.1 Material und allgemeine Arbeitstechniken

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 5C₁₈) 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⁺.

Bereits bekannte Verbindungen wurden mit der CAS-Nr. hinter der jeweiligen Molekularmasse versehen.

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_f-Wert-Bestimmungen wurden mit Merck DC Kieselgel 60 F-254 Aluminium-Folien 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 μm bzw. 40-63 μm) der Firma Merck und 1.0-1.4 bar Überdruck durchgeführt. Die Rohsubstanzen wurden für gewöhnlich auf Kieselgel 60 (63-200 μm) 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 Trockenschanks 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.^[497] Alternativ wurde der **log P**-Wert nach Broto bestimmt.^[498] Dies wird im Text gesondert aufgeführt. Diese Funktionen sind in dem Computerprogramm CS ChemDraw Pro der Firma *CambridgeSoft* enthalten.

Alle **¹H-NMR** und **¹³C-NMR** Spektren wurden mit den Geräten AC250, DMX500 und DMX600 der Firma Bruker aufgenommen. Das Prozessieren der NMR-Daten erfolgte an Bruker Aspect 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*₅: 2.49 ppm (¹H-NMR) und 39.5 ppm (¹³C-NMR); CHCl₃: 7.24 ppm (¹H-NMR) und 77.0 ppm (¹³C-NMR).

Sämtliche Experimente zur Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffresonanzen sowie zur Strukturbestimmung wurden an den Hochfeldgeräten DMX 500 und DMX 600 durchgeführt.

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/10 μ L und wurden bei -20 °C aufbewahrt.

8.2 Synthese von Bausteinen

8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Modifizierte Darstellung von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren nach Chang *et al.*^[499]

Zu einer eisgekühlten Lösung aus Aminosäure (5.0 mmol), Dioxan (5 mL) und 10 %iger Na₂CO₃-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_4 wird das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Gradient von Methanol in Chloroform mit 0.1 % Essigsäure) aufgereinigt.

AAV 2: Synthese von 3-Amino-3-aryl-propionsäure-Derivaten modifiziert nach Cardillo *et al.*:[500]

Ein aromatischer Aldehyd (20 mmol), Malonsäure (2.08 g, 20 mmol) und Ammonium-acetat (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 3: Synthese von *N*-Fmoc-geschützten Aminoaldehyden nach Blaskovich *et al.*:[501]

Oxalylchlorid (70 μL , 0.8 mmol, 1.6 Äquiv.) wird unter Schutzgas in trockenem CH_2Cl_2 (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_2Cl_2 (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_2Cl_2 (50 mL) hinzu. Die Lösung wird mit eiskalter, wäßriger NH_4Cl -Lösung (3%, 2 x 75 mL) und gesättigter, wäßriger NaCl-Lösung (1 x 75 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit MgSO_4 wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Aldehyd wird ohne weitere Reinigung eingesetzt, da eine säulenchromatographische Trennung zur Zersetzung führt.

AAV 4: Entschützung von *tert.*-Butyl-estern

Der zu entschützenswertende *tert.*-Butyl-ester wird in 2,2,2-Trifluoressigsäure / Dichlormethan (50:50) bei 0°C 2 h gerührt. Die Entschützungslösung wird anschließend i.Vak. entfernt und der Rückstand nach Zugabe von Toluol zweimal zur Trockene einrotiert.

AAV 5: Synthese von Sulfonsäurechloriden

Es wurden 1.00 g der Sulfonsäure in 10 mL Thionylchlorid bei 0°C mit wenigen Tropfen DMF versetzt. Nachdem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Mischung 1 h unter Rückfluß erhitzt und das Thionylchlorid anschließend i.Vak. entfernt. Die Sulfonsäurechloride wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

AAV 6: Darstellung von symmetrischen Carbonsäureanhydriden

Es wurden 1.00 mol Carbonsäure in Dichlormethan bei 0°C mit 0.50 mol DCC versetzt und die resultierende Suspension 2 h bei 0°C gerührt. Der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

AAV 7: Verseifung von Carbonsäuremethylestern

Der Carbonsäureester wurde mit 3-5 eq. 1N Lithiumhydroxidlösung in Wasser / Dioxan bei Raumtemp. gerührt und der Umsatz via DC verfolgt.

AAV 8: Kupplungen mit EDCI-HCl

Die zu kuppelnde Carbonsäure wurde mit 1 eq. Amin, 1.1 eq. EDCI-HCl und 1 eq. HOBt unter Zugabe von 2.6 eq. DIPEA in Dichlormethan gelöst. Die Reaktionslösung wurde erst unter Eiskühlung, dann bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Nach Versetzen mit Wasser wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit verd. HCl und ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

8.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

Isobutylmalonsäurediethylester (2)

In einem 1-l Dreihalskolben mit Rührer, Rückflusskühler und Calciumchloridrohr wurden aus 11.5 g (500 mmol) Natrium und 300 mL abs. Ethanol eine Natriumethanolatlösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 80.1 g (500 mmol) Malonsäurediethylester (1) und anschließend 75.4 g (550 mmol) Isobutylbromid tropfenweise unter Rühren zugegeben. Es wurde anschließend 10 h unter Rückfluß erhitzt und nachfolgend die Lösung durch Destillation des Lösungsmittels eingeengt. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde mit 200 g Eis versetzt und viermal mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 91.9 g (85%) farbloses Öl

C₁₁H₂₀O₄; 216.14 g/mol, (10203-58-4)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 0.94 (d, J = 6.6 Hz, 6 H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6 H), 1.49-1.67 (m, 1H), 1.79 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 3.43 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.22 (q, J = 7.1 Hz, 4 H).

MS-EI (70 eV): 217.1 (1)[M⁺+1], 215.1 (1)[M⁺-1], 171.1 (46)[M⁺-C₂H₅O], 160 (100), 133 (49), 73 (38) [C₂H₅CO₂⁺]

2-Brom-1-(1-naphthalenyl)-ethanon (3a)

Zu 15.0 g (88.0 mmol) 2-Acetyl-naphthalein und 0.50 mL Essigsäure in 200 mL Chloroform wurden unter Eiskühlung 14.1 g (1 eq.) Brom über einen Zeitraum von 30 min. zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde die Lösung noch 1 h bei Raumtemp. gerührt. Es wurde anschließend mit 100 g Eis versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Chloroform extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 20.6 g (95%) gelbes Öl

$C_{12}H_9BrO$; 247.89 g/mol, (13686-51-6)

HPLC(5-100 % in 30 min.): $R_t = 23.34$ min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 4.60 (s, 2H), 7.53-7.69 (m, 2H), 7.85-8.04 (m, 4H), 8.53 (s, 1H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): 33.8, 124.2, 125.7, 126.8, 128.4, 128.5, 130.6, 132.2, 133.0, 133.9, 134.1, 194.3.

2-Brom-1-(2-naphthalenyl)-ethanon (3b)

Die Durchführung der Bromierung wurde analog der für das 2-Brom-1-(1-naphthalenyl)-ethanon (s.o.) durchgeführt.

Ausbeute: 21.5 g (98%) gelber Feststoff

$C_{12}H_9BrO$; 247.89 g/mol, (613-54-7)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 4.58 (s, 2H), 7.47-7.68 (m, 3H), 7.86-7.97 (m, 2H), 8.05 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 8.64 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): 31.1, 124.1, 127.1, 127.9, 128.8, 129.1, 129.7, 130.9, 131.2, 132.4, 135.8, 191.3.

2[[2-Oxo-(2-naphthyl)-ethyl]]-4-methyl-pentansäure (5)

8.00 g (36.9 mmol) Isobutylmalonsäurediethylester in 50 mL abs. THF wurden bei 0°C tropfenweise zu 1.62 g (1 eq.) 60% NaH-Suspension in Mineralöl, die vorher zweimal mit Pentan gewaschen worden war, gegeben. Bis zur vollständigen Auflösung des Natriumhydrids wurde anschließend noch 30 min. bei Raumtemp. gerührt. Schließlich wurden 9.20 g (1 eq.) ω -Brom-2-acetonaphthon in 20 mL abs. THF unter Eiskühlung tropfenweise zugegeben und die resultierende Lösung über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 50 g Eis versetzt und mit 2N HCl angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinten

organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Das Rohprodukt (14.1 g oranges Öl) wurde ohne Aufreinigung 4h in 180 mL 0.7 M KOH-Lösung in Ethanol/Wasser (2:1) unter Rückfluß erhitzt. Die Hauptmenge des Lösungsmittels wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand mit 200 g Eis versetzt und mit konz. HCl auf pH = 0 angesäuert. Es wurde fünfmal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand 1 h auf 100°C erwärmt bis keine CO₂-Entwicklung mehr zu beobachten war. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 5.43 g (52%) gelber Feststoff, R_f: 0.27 (EE/Hex 20:80, 0.5% Essigsäure)

C₂₀H₁₈O₃; 284.14 g/mol

HPLC (10-90% in 30 min.): 24.32 min.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 0.87 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 0.92 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 1.35-1.43 (m, 1H), 1.50-1.58 (m, 1H), 1.65-1.73 (m, 1H), 2.86-2.95 (m, 1H), 3.24 (dd, 1H, J = 17.9 Hz und 4.3 Hz), 3.5 (dd, 1H, J = 17.9 Hz und 9.4 Hz), 7.58-7.67 (m, 2H), 7.95-8.03 (m, 3H), 8.12 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 8.61 (s, 1H), 12.1 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): 23.2, 23.3, 26.2, 39.1, 41.2, 41.8, 124.3, 127.8, 128.5, 129.1, 129.5, 130.5, 130.8, 133.1, 134.7, 135.9, 177.5, 199.3.

EI-MS (70eV): *m/z* 284 (16)[M⁺]

HRMS (70 eV): 284.14118 calc. 284.14124

2[[2-Oxo-(1-naphthyl)-ethyl]]-4-methyl-pentansäure (4)

8.00 g (36.9 mmol) Isobutylmalonsäurediethylester in 50 mL abs. THF wurden bei 0°C tropfenweise zu 1.62 g (1 eq.) 60% NaH-Suspension in Mineralöl, die vorher zweimal mit Pentan gewaschen worden war, gegeben. Bis zur vollständigen Auflösung des Natriumhydrids wurde anschließend noch 30 min. bei Raumtemp. gerührt. Schließlich wurden 9.20 g (1 eq.) ω-Brom-1-acetonaphthon in 20 mL abs. THF unter Eiskühlung tropfenweise zugegeben und die resultierende Lösung über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 50 g Eis versetzt und mit 2N HCl angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinten

organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Das Rohprodukt (14.1 g oranges Öl) wurde ohne Aufreinigung 4h in 180 mL 0.7 M KOH-Lösung in Ethanol/Wasser (2:1) unter Rückfluß erhitzt. Die Hauptmenge des Lösungsmittels wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand mit 200 g Eis versetzt und mit konz. HCl auf pH = 0 angesäuert. Es wurde fünfmal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand 1 h auf 100°C erwärmt bis keine CO₂-Entwicklung mehr zu beobachten war. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 4.98 g (47%) gelber Feststoff, R_f: 0.43 (EE/Hex 20:80, 0.5% Essigsäure)

C₂₀H₁₈O₃; 284.14 g/mol

HPLC (10-90% in 30 min.): 23.85 min.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.87 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 0.91 (d, 3H, J = 6.6 Hz), 1.32-1.40 (m, 1H), 1.50-1.57 (m, 1H), 1.62-1.70 (m, 1H), 2.91-2.98 (m, 1H), 3.20 (dd, 1H, J = 17.7 Hz und 4.5 Hz), 3.35 (dd, 1H, J = 17.7 Hz und 9.6 Hz), 7.58-7.61 (m, 3H), 7.99 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.07 (dd, 1H, J = 7.2 Hz und 1.0 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 8.40 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 12.2 (bs, 1H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.22, 23.32, 39.5, 41.6, 44.6, 125.7, 126.2, 127.2, 128.5, 128.7, 130.2, 133.2, 134.3, 136.5, 177.5, 203.8.

EI-MS (70eV): *m/z* 284 (13)[M⁺]

HRMS (70eV): 284.14118 calc. 284.14124

Zimtsäure-*tert.*-butylester (11)

Es wurden 8.00 g (53.9 mmol) Zimtsäure mit 4.00 g (1eq.) *tert.*-Butanol, 11.1 g (1 eq.) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 100 mg DMAP in 100 mL trockenem Dichlormethan bei 0°C unter Inertgas über Nacht gerührt. Der ausgefallene Niederschlag von *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 8.80 g (80 %) farbloses Öl, R_f : 0.82 (Eluent EE/Hex: 20:80)

$C_{13}H_{16}O_2$; 204.12 g/mol, (7042-36-6)

HPLC (5-100% in 30 min.): 22.98 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.52 (s, 9H), 6.37 (d, 1H, J = 16.0 Hz), 7.34-7.39 (m, 3H), 7.48-7.54 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, J = 16.0 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 28.2, 80.7, 120.2, 127.9, 128.8, 129.9, 134.7, 143.5, 166.3

EI-MS (70eV): m/z 204.1 (20)[M^+], 148.1 (100), 131.1 (23), 103.0 (68), 57.1 (37).

***tert*-Butyl (3*R*, α *S*)-3-(*N*-benzyl-*N*- α -methyl-benzylamino)-3-phenylpropionat (12b)**

46.0 mL (73.6 mmol) *n*-Butyllithium (1.6 M Lsg. in Hexan) wurden tropfenweise bei $-78^\circ C$ zu einer Lösung von 15.6 g (1 eq.) (S)-(-)-*N*-Benzyl-methylbenzylamin in abs. THF gegeben und die tiefrote Lösung anschließend 30 min. unter Inertgas bei $-78^\circ C$ gerührt. 3.00 g (0.2 eq.) Zimtsäure-*tert*-butylester in 20 mL abs. THF wurden anschließend tropfenweise bei $-78^\circ C$ zugegeben und die Reaktionslösung 1h bei $-78^\circ C$ gerührt. Die Mischung wurde auf 50 mL ges. NH_4Cl -Lsg. gegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 60 mL Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen jeweils dreimal mit je 10 mL 1N HCl, 1N NaOH und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 4.76 g (78%) farbl Öl, R_f : 0.80 (EE/Hex: 30:70)

$C_{28}H_{33}NO_2$; 415.25 g/mol, (265669-72-5)

HPLC (55-65% in 30 min.): 11.02 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.22 (s, 9H), 1.26 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 2.45-2.55 (m, 2H), 3.68 (s, 2H), 4.00 (q, 1H, J = 7.1 Hz), 4.41 (dd, 1H, J = 9.2 Hz und 5.9 Hz), 7.15-7.46 (m, 15 H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$). δ = 16.7, 28.3, 38.9, 51.3, 57.5, 60.2, 80.6, 126.9, 127.2, 127.5, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 142.1, 142.3, 144.6, 171.5.

EI-MS (70eV): m/z 415.0 (3)[M^+], 399.9 (4), 300.0 (30), 205 (62), 189.0 (33), 146.0 (88), 105.0 (63), 91.0 (100), 57.0 (76).

***tert*-Butyl (3*S*, α *R*)-3-(*N*-benzyl-*N*- α -methyl-benzylamino)-3-phenylpropionat (12a)**

61.7 mL (97.3 mmol) *n*-Butyllithium (1.6 M Lsg. in Hexan) wurden tropfenweise bei -78°C zu einer Lösung von 20.5 g (1 eq.) (*R*)-(-)-*N*-Benzyl-methylbenzylamin in 150 mL abs. THF gegeben und die tiefrote Lösung anschließend 30 min. unter Inertgas bei -78°C gerührt. 4.00 g (0.2 eq.) Zimtsäure-*tert*-butylester in 40 ml abs. THF wurden anschließend tropfenweise bei -78°C zugegeben und die Reaktionslösung 1h bei -78°C gerührt. Die Mischung wurde auf 50 mL ges. NH_4Cl -Lsg. gegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 60 mL Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen jeweils dreimal mit je 10 mL 1N HCl, 1N NaOH und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 6.55 g (81%) farbl.Öl, $R_f = 0.75$ (EE/Hex 20:80)

$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_2$; 415.25 g/mol, (151133-00-5)

HPLC (55-65% in 30 min.): 11.07 min.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.25$ (s, 9H), 1.29 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.51-2.57 (m, 2H), 3.71 (s, 2H), 4.02 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 9.3$ Hz und 5.9 Hz), 7.18-7.47 (m, 15 H).

EI-MS (70 eV): m/z 415.0 (3)[M^+], 399.9 (4), 300.0 (30), 205 (62), 189.0 (33), 146.0 (88), 105.0 (63), 91.0 (100), 57.0 (76).

HRMS (70 eV): 415.25082 calc. 415.2511

***tert*-Butyl (*S*)-3-amino-3-phenylpropionat (13a)**

1.40 g (3.37 mmol) *tert*-Butyl (3*S*, α *R*)-3-(*N*-benzyl-*N*- α -methyl-benzylamino)-3-phenylpropionat in 80 mL MeOH, 8 mL H_2O und 2 mL Essigsäure wurden mit 150 mg Pearlman-Katalysator 24 h unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Nach Versetzen des Rückstandes mit ges. NaHCO_3 -Lsg. wurde viermal mit Essigester extrahiert

und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 0.75 g (100%) farbloses Öl

C₁₃H₁₉NO₂; 221.14 g/mol, (120686-18-2)

HPLC (5-100 in 30 min.): 14.24 min.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 1.41 (s, 9H), 2.50 (bs, 2H), 2.61 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 4.37 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 7.21-7.39 (m, 5H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ = 28.0, 45.3, 52.8, 80.7, 126.3, 127.3, 128.3, 144.7, 171.2.

EI-MS (70 eV): *m/z* 211.0 (1)

***tert*-Butyl (R)-3-amino-3-phenylpropionat (13b)**

1.40 g (3.37 mmol) *tert*-Butyl (3*R*, α*S*)-3-(*N*-benzyl-*N*-α-methyl-benzylamino)-3-phenylpropionat in 80 mL MeOH, 8 mL H₂O und 2 mL Essigsäure wurden mit 150 mg Pearlman-Katalysator 24 h unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Nach Versetzen des Rückstandes mit ges. NaHCO₃-Lsg. wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 0.75 g (100%) farbloses Öl

C₁₃H₁₉NO₂; 221.14 g/mol, (161671-34-7)

HPLC(5-100% in 30 min.): 14.24 min.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H), 2.83 (dd, 1H, J = 17.5 Hz und 4.1 Hz), 3.11 (dd, 1H, J = 17.5 Hz und 9.6 Hz), 4.52-4.62 (m, 1H), 7.33-7.37 (m, 5H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ = 28.0, 45.3, 52.8, 80.7, 126.3, 127.3, 128.3, 144.7, 171.2.

EI-MS (70 eV): *m/z* 211.0(1)

2-(4-Nitrophenyl)-essigsäure-methylester (23b)

15.0 g (82.8 mmol) 4-Nitrophenylessigsäure wurden in 150 mL abs. Methanol mit 1 mL konz. H₂SO₄ über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde anschließend i.Vak. eingengt und mit 200 g Eis versetzt. Es wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 16.1 g (99%) gelbe Kristalle

C₉H₉NO₄; 195.05 g/mol, (2945-08-6)

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 18.64 min.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.71 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 7.49 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.7, 52.3, 123.7, 128.4, 130.3, 141.3, 147.2, 170.6.

EI-MS (70 eV): *m/z* 194.9 [M⁺]

HRMS (70 eV): 195.05316 calc. 195.0532

2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure-methylester (24b)

8.00 g (41.0 mmol) *p*-Nitrophenylessigsäure-methylester in 80 mL abs. DMF wurden topfenweise bei 0°C zu 1.64 g (1 eq.) Natriumhydrid (60%-ige Suspension in Mineralöl) gegeben. Nach Zugabe wurde noch 30 min. bei 0°C und 15 min. bei Raumtemp. gerührt und darauf tropfenweise 5.80 mL (1.3 eq.) Isobutylbromid unter Rühren zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 10 h bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen mit 200 g Eis versetzt. Nach dem Ansäuern mit 2N HCl wurde viermal mit Essigester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 8.30 g (81%) gelbes Öl, R_f : 0.45 (EE/Hex: 20/80)

$C_{13}H_{17}NO_4$; 251.12 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 25.15 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (d, 6 H, J = 6.6 Hz), 1.25-1.46 (m, 1H), 1.54-1.74 (m, 1H), 1.85-2.06 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.79 (dd, 1H, J = 7.8 Hz und 7.8 Hz), 7.49 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 8.13 (d, 2H, J = 8.6 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 22.1, 22.5, 25.9, 42.8, 49.4, 52.3, 123.8, 128.9, 146.6, 147.2, 173.5.

MS-EI (70eV): 250.9 (1)[M^+], 235.9 (1), 194.9 (100), 162.9 (9), 150.0 (17), 39.9 (20).

2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure (25b)

6.00 g (23.9 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure-methylester wurden bei Raumtemp. mit 30 mL 1N LiOH-Lsg. in 40 mL Dioxan 1.5 h hydrolysiert. Die Reaktionslösung wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und mit 6 N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 6.10 g (100%) gelbl. Feststoff

$C_{12}H_{15}NO_4$; 237.10 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 21.54 min.

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.88 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.27-1.48 (m, 1H), 1.53-1.71 (m, 1H), 1.82-1.98 (m, 1H), 3.80 (dd, 1H, J = 7.8 Hz), 7.63 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.20 Hz (d, 2H, J = 8.7 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 22.3, 22.9, 25.9, 42.2, 49.2, 123.9, 129.8, 146.9, 148.1, 166.2, 174.4.

MS-EI (70eV): 236.9 [M^+]

HRMS (70eV): 237.09998 calc. 237.10011

2-(4-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure (26b)

5.30 g (22.2 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure wurden mit 150 mg Pd/C-Katalysator (5%) über Nacht in 150 mL Methanol unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 4.28 g (93%) farbloser Feststoff

C₁₂H₁₇NO₂; 207.13 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 12.46 min.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.83 (d, 6H, J = 6.5 Hz), 1.31-1.39 (m, 1H), 1.39-1.49 (m, 1H), 1.68-1.78 (m, 1H), 3.33 (dd, 1H, J = 7.8 Hz), 6.48 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 6.91 (d, 2H, J = 8.3 Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.0, 23.3, 25.3, 43.0, 48.9, 114.7, 127.6, 129.0, 148.3, 176.5.

N-Fmoc-2-(4-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure (27b)

Zu einer Lösung von 2.00 g (9.65 mmol) (4-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure und 1.05 g (1.3 eq.) Natriumhydrogencarbonat in 100 ml Wasser/Aceton (1:1) wurden 3.58 g (1.1 eq.) Fmoc-OSu gegeben und 6h bei Raumtemp. gerührt. Es wurde mit Eis und 60 mL Essigester versetzt und mit 2N Salzsäure angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde aus *tert*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 5.47 g (quant.) farbl. Feststoff

C₂₇H₂₇NO₄; 429.19 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 26.53 min.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.91 (d, 3H, J = 6.7 Hz), 0.92 (d, 3H, J = 6.7 Hz), 1.42-1.53 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 1H), 1.86-1.97 (m, 1H), 3.55-3.64 (m, 1H), 4.22-4.30 (m, 1H), 4.37-4.56 (bs, 2H), 7.10-7.44 (m, 8H), 7.61-7.81 (m, 4H).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH): δ = 21.6, 22.0, 26.1, 30.1, 42.7, 49.3, 66.8, 119.2, 119.9, 125.1, 127.2, 127.8, 128.4, 134.7, 138.2, 141.6, 144.3, 155.0, 177.0.

ESI-MS: m/z 897.2 (100) [2M+K⁺], 881.2 (27) [2M+Na⁺], 859.1 (27) [2M+H⁺], 468.3 (22) [M+K⁺], 452.4 (19) [M+Na⁺], 430.0 (67) [M+H⁺].

2-(3-Nitrophenyl)-essigsäure-methylester (23a)

5.00 g (27.6 mmol) 3-Nitrophenylessigsäure wurden in 80 mL abs. Methanol mit 1 mL konz. H₂SO₄ über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde anschließend i.Vak. eingengt und mit 200 g Eis versetzt. Es wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 5.54 g (100 %) farblose Kristalle

C₉H₉NO₄; 195.05 g/mol, (10268-12-9)

HPLC (10-90% in 30 min.): R_t = 18.70 min.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.72 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 7.46-7.57 (m, 1H), 7.30 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.11-8.19 (m, 2H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.44, 52.3, 122.3, 124.4, 129.5, 135.6, 135.8, 148.8, 170.8.

MS-EI (70eV): 194.9 [M⁺]

HRMS (70eV): 195.05308 calc. 195.05316

2-(3-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure-methylester (24a)

5.50 g (28.2 mmol) 3-Nitrophenylessigsäure-methylester in 80 mL abs. DMF wurden tropfenweise bei 0°C zu 1.13 g (1 eq.) Natriumhydrid (60%-ige Suspension in Mineralöl) gegeben. Nach Zugabe wurde noch 30 min. bei 0°C und 15 min. bei Raumtemp. gerührt und

darauf tropfenweise 5.02 g (1.3 eq.) Isobutylbromid unter Rühren zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 10 h bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen mit 200 g Eis versetzt. Nach dem Ansäuern mit 2N HCl wurde viermal mit Essigester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Aubeute : 7.00 g (99%) farbloses Öl, R_f 0.20 (EE/Hex 10:90)

$C_{13}H_{17}NO_4$; 251.12 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): R_t = 25.15 min.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.92 (d, 6H, J = 6.2 Hz), 1.42-1.47 (m, 1H), 1.67-1.72 (m, 1H), 1.99-2.06 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.78 (t, 1H), 7.51 (t, 1H), 7.67 (d, 1H), 8.13 (d, 1H), 8.20 (s, 1H).

^{13}C -NMR(125 MHz, $CDCl_3$): δ = 22.5, 22.9, 26.3, 42.8, 44.9, 49.6, 52.7, 122.7, 123.5, 129.9, 134.6, 141.7, 148.8, 174.0.

MS-EI (70eV): 251.0 (<1), 235.9 (1), 233.9 (2), 196.0 (100), 162.9 (10), 150.0 (30), 136.0 (14).

2-(3-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure (25a)

6.00 g (23.9 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure-methylester wurden bei Raumtemp. mit 30 mL 1N LiOH-Lsg. in 40 mL Dioxan 1.5 h hydrolysiert. Die Reaktionslösung wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und mit 6 N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 6.10 g (100%) gelbl. Feststoff

$C_{12}H_{15}NO_4$; 237.10 g/mol

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 0.75-0.88 (2d, 6H, J = 6.5 Hz), 1.32-1.42 (m, 1H), 1.58-1.67 (m, 1H), 1.84-1.94 (m, 1H), 3.33 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 7.64 (dd, 1H, J = 7.9 Hz und J = 7.9 Hz), 7.80 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 8.18 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO): 22.8, 23.3, 26.4, 42.8, 49.2, 123.8, 123.4, 130.8, 135.7, 142.9, 148.7, 175.2.

MS-EI (70eV): 236.9 (1), 219.9 (9), 180.9 (100), 163.9 (20), 150.0 (38), 136.0 (27), 57.0 (94), 41.0 (37).

2-(3-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure (26a)

5.30 g (22.2 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure wurden mit 150 mg Pd/C-Katalysator (5%) über Nacht in 150 mL Methanol unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 4.36 g (95%) gelbl. Feststoff

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$; 207.13 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.86 u. 0.87 (2d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.32-1.41 (m, 1H), 1.58-1.65 (m, 1H), 1.84-1.91 (m, 1H), 3.83 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 8.2 Hz u. 2.0 Hz, 1H), 8.16-8.18 (m, 1H).

N-Fmoc-2-(3-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure (27a)

Zu einer Lösung von 1.31 g (6.30 mmol) (3-Aminophenyl)-4-methyl-pentansäure und 750 mg (1.4 eq.) Natriumhydrogencarbonat in 80 mL Wasser/Aceton (1:1) wurden 2.34 g (1.1 eq.) Fmoc-OSu gegeben und 6h bei Raumtemp. gerührt. Es wurde mit Eis und 60 mL Essigester versetzt und mit 2N Salzsäure angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde aus *tert*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 2.32 g (86%) farbloser Feststoff

$\text{C}_{27}\text{C}_{27}\text{NO}_4$; 429.19 g/mol

HPLC(5-100% in 30 min.) 26.54 min.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.91 (d, 6H, J = 6.7 Hz), 1.45-1.52 (m, 1H), 1.58-1.66 (m, 1H), 1.86-1.95 (m, 1H), 3.60 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 4.25 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 4.44 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 4.85 (bs, 2H), 7.00 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.15-7.45 (m, 6H), 7.68 (d, 2H, J = 7.06 Hz), 7.78 (d, 2H, J = 7.5 Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 21.7, 22.0, 26.1, 30.1, 42.6, 49.9, 66.8, 117.7, 118.6, 119.9, 122.8, 125.2, 127.2, 127.8, 128.9, 139.1, 140.9, 141.6, 144.3, 155.0, 176.7.

ESI-MS: *m/z* 897.2 (100) [2M+K⁺], 881.2 (27) [2M+Na⁺], 859.1 (27) [2M+H⁺], 468.3 (22) [M+K⁺], 452.4 (19) [M+Na⁺], 430.0 (67) [M+H⁺].

2-(2-Hydroxy-phenyl)-essigsäuremethylester (56a)

10.0 g (65.7 mmol) 2-Hydroxy-phenylessigsäure wurden über Nacht in 200 mL Methanol mit 2 mL konz. Schwefelsäure unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde i. Vak. eingengt und mit 200 g Eis versetzt. Es wurde fünfmal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 12.3 g (100%) farbl. Feststoff

C₉H₉O₃; 166.03 g/mol, (22446-37-3)

HPLC (5-100% in 30 min.): 14.81 min.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.69 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 6.85-6.97 (m, 2H), 7.07-7.24 (m, 2H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 37.5, 52.6, 117.5, 120.6, 120.9, 129.2, 130.9, 155.1, 177.3.

MS-EI (70eV): 166.0 (64)[M⁺], 134.0 (100), 106.0 (87), 78.0 (40).

2-[2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-essigsäuremethylester (57a)

Zu 10.9 g (65.6 mmol) 2-(2-Hydroxy-phenyl)-essigsäuremethylester in 200 mL abs. Dichlormethan wurden unter Eiskühlung 6.59 mL (1.1 eq.) 3,4-Dihydro-2H-pyran und 0.5 g PPTA gegeben und 24h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlsg. versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige

Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesätt. Natriumchloridlsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 17.2 g (100%) gelbes Öl

$C_{14}H_{18}O_4$; 250.12 g/mol, (153623-45-1)

HPLC (5-100% in 30 min.): 21.81 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.53-2.08 (m, 6H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.80-3.92 (m, 1H), 5.45 (dd, 1H, J = 2.9 Hz und 2.9 Hz), 6.95 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 7.10-7.25 (m, 3H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.3, 25.1, 30.2, 36.3, 51.7, 61.5, 95.7, 113.9, 121.2, 123.4, 128.5, 130.7, 154.8, 172.2.

MS-EI (70eV): 250.1 [M^+]

2-(4-Hydroxy-phenyl)-essigsäuremethylester (56c)

Die Durchführung wurde analog der Arbeitsvorschrift für 2-(2-Hydroxy-phenyl)-essigsäuremethylester ausgeführt; Ansatzgröße: 98.6 mmol; das Rohreaktionsprodukt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 16.3 g (91%) gelbes Öl

$C_9H_9O_3$; 166.03 g/mol, (14199-15-6)

HPLC (5-100% in 30 min.): 13.64 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.55 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 6.43 (bs, 1H), 6.71 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.08 (d, 2H, J = 8.5 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 40.1, 52.2, 115.5, 125.1, 130.2, 155.0, 173.5.

MS-EI (70eV): 165.9 (51) [M^+], 107.0 (100), 77.0 (14)

2-[4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-essigsäuremethylester (57c)

Die Durchführung wurde analog der für 2-[2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-essigsäuremethylester ausgeführt; Ansatzgröße: 99.5 mol; das Reaktionsprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 20.9 g (85%) farbl. Öl, R_f : 0.66 (EE/Hex : 40:60)

$C_{14}H_{18}O_4$; 250.12 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 21.88 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.52-2.09 (m, 6H), 3.53-3.64 (m, 1H), 3.56 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.91 (dd, 1H, J = 9.2 Hz und 3.2 Hz), 5.39 (dd, 1H, J = 3.0 Hz und 3.0 Hz), 7.01 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.19 (d, 2H, J = 8.7 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.8, 25.2, 30.4, 40.3, 51.9, 61.9, 96.4, 116.6, 127.0, 130.2, 156.2, 172.2.

MS-EI (70eV): 250.1 [M^+]

2-(3-Hydroxy-phenyl)-essigsäuremethylester (56b)

Die Durchführung ist analog der für **56a**, Ansatzgröße: 32.9 mmol.

Ausbeute: 5.10 g (93%) farbl. Öl

$C_9H_9O_3$; 166.03 g/mol, (42058-59-3)

HPLC (5-100% in 30 min.): 14.28 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.59 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 6.70-6.84 (m, 3H), 7.16 (t, 1H, J = 7.8 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 40.9, 52.3, 114.3, 116.2, 121.2, 129.7, 135.1, 156.0, 172.8.

MS-EI (70eV): 166.0 [M^+]

2-[3-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-essigsäuremethylester (57b)

Die Durchführung wurde analog der für **57 a** ausgeführt; Ansatzgröße: 48.2 mmol; das Reaktionsprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 7.81 g (65%) farbl. Öl, R_f 0.30 (EE/Hex 15:85)

$C_{14}H_{18}O_4$; 250.12 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 21.83 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.52-2.11 (m, 6H), 3.55-3.66 (m, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.85-3.97 (m, 1H), 5.41 (dd, 1H, J = 3.2 Hz und 3.2 Hz), 6.87-7.01 (m, 3H), 7.19-7.25 (m, 1H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 19.5, 25.3, 30.6, 41.1, 52.0, 62.9, 94.7, 114.3, 116.3, 121.0, 129.7, 135.2, 156.4, 172.3

MS-EI (70eV): 250.1 [M^+]

2-[2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure-methylester (58a)

15.0 g (59.9 mmol) 2-[2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-essigsäuremethylester in 200 mL abs. DMF wurden unter Eiskühlung tropfenweise zu 2.40 g (1 eq.) Natriumhydrid (60%ige Suspension in Mineralöl) gegeben und 1.5 h bei Raumtemp. gerührt. Zu dieser Lösung wurden dann 10.7 g (1.3 eq.) Isobutylbromid gegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei 60°C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde mit 200 g Eis und 5.80 g (1.5 eq.) versetzt und sechsmal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 16.2 g (88%) farbl. Öl R_f : 0.46 (EE/Hex 15:85)

$C_{18}H_{26}O_4$, 306.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 27.50 u. 27.62 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.94 (d, J = 6.5 Hz, 6H), 1.41-1.44 (m, 9H), 3.50-4.19 (m, 6H), 4.93-5.02 (m, 0.5 H), 5.43-5.23 (m, 0.5 H), 6.85-7.33 (m, 4H).

MS-EI (70eV): 306.0 [M^+]

2-[2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure (59a)

Nach AAV 7 und Neutralisation mit NH_4Cl , wurde mit Essigester mehrmals extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 94%

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$; 292.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 23.52 u. 23.82 min.

MS-EI (70eV): 292.0 (<1), 208 (12), 189.9 (24), 146.9 (22), 134.0 (23), 107.0 (24), 85.0 (100), 57.0 (15), 41.0 (21).

2-[4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure-methylester (58c)

Die Durchführung wurde analog zu der von **58 a** ausgeführt, Ansatzgröße 71.9 mmol

Ausbeute: 17.5 g (80 %) farbl. Feststoff, R_f : 0.23 (EE/Hex 15:85)

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$, 306.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 27.69 min.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.37-2.00 (m, 9H), 3.48-3.65 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.85-3.98 (m, 1H), 5.35-5.41 (m, 1H), 6.98 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.20 (d, 2H, J = 8.5 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3): δ = 18.8, 22.2, 22.6, 24.4, 25.2, 25.7, 30.4, 42.5, 48.7, 51.8, 62.0, 96.4, 116.5, 128.8, 132.3, 156.3, 174.9.

MS-EI (70eV): 306.1 [M^+]

HRMS (70eV): 306.18313 calc. 306.18311

2-[4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure (59c)

Nach AAV 7 und Neutralisation mit NH_4Cl , wurde mit Essigester mehrmals extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

$C_{17}H_{24}O_4$; 292.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 23.79 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.89 (d, 6H, J = 6.5 Hz), 1.41-2.08 (m, 9H), 3.55-3.64 (m, 2H), 3.84- 3.96 (m, 1H), 5.39 (dd, 1H, J = 3 Hz), 6.99 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.22 (d, 2H, J = 8.6 Hz).

MS-EI (70eV): 292.0 [M^+]

HRMS (70eV): 292.16763 calc. 292.16746

2-[3-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure-methylester (58b)

Die Durchführung wurde analog zu der von **58 a** ausgeführt, Ansatzgröße 31.2 mmol

Ausbeute: 8.00 g (84%) farbl. Öl, R_f 0.46 (EE/Hex 15:85)

$C_{18}H_{26}O_4$, 306.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 27.66 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.90 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.39-2.06 (m, 9H), 3.55-3.67 (m 2H), 3.65 (s, 3H), 3.86-3.99 (m 1H), 5.41 (dd, 1H, J = 3.1 Hz), 6.89-7.03 (m, 3H), 7.22 (dd, 1H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.8, 22.2, 22.5, 25.2, 25.8, 30.4, 42.5, 49.5, 51.7, 61.8, 96.3, 114.8, 116.4, 121.1, 129.3, 140.7, 157.3, 174.4.

MS-EI (70eV): 306.1 [M^+]

HRMS (70eV): 306.18301 calc. 306.18311

2-[3-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl]-4-methyl-pentansäure (59b)

Nach AAV 7 und Neutralisation mit NH_4Cl , wurde mit Essigester mehrmals extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 97%

$C_{17}H_{24}O_4$; 292.18 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 23.65 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.90 (d, 6H, J = 6.4 Hz), 1.40-2.11 (m, 9H), 3.52-3.67 (m, 2H), 3.84-3.98 (m, 1H), 5.38-5.43 (m, 1H), 6.91-7.05 (m, 3H), 7.17-7.26 (m, 1H).

MS-EI (70eV): 292.0 [M^+]

HRMS (70eV): 292.16780 calc. 292.16746

2-Amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester (44)

25.0 g (174 mmol) Methylisobutyrcetat wurden in 75 mL Wasser suspendiert und die ölige Mischung bei 0°C innerhalb von 30 min. tropfenweise mit 27.8 g (1 eq.) Brom unter Rühren versetzt. Nach weiteren 30 min. bei 0°C wurde mit 50 mL Diethylether versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit 5%-iger Natriumhydrogensulfid-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Dieser gelbe, ölige Rückstand wurde ohne weitere Reinigung mit 13.0 g (171 mmol) Thioharnstoff in 80 mL Methanol 1h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 200 mL Eiswasser gegeben und mit 25%-iger Ammoniaklsg. neutralisiert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 14.9 g (45%) farblose Kristalle

$C_8H_{12}N_2O_2S$; 200.06 g/mol

HPLC (5-50 in 30 min.): 16.59 min.

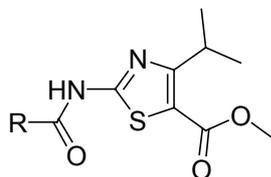
1H -NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 1.5 (d, 6H, J = 7.0 Hz), 4.08 (s, 3H), 4.08-4.28 (m, 1H), 8.18 (bs, 2H).

MS-EI (70eV): 199.9 [M^+]

HRMS (70eV): 200.06175 calc. 200.06195

N-acylierte 2-Amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester

Folgende Verbindungen wurden nach AVV 8 aus 2-Amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester (44) und den entsprechenden aromatischen Carbonsäuren dargestellt.

**N-(4-Fluorbenzoyl)-2-amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester**

Ausbeute: 86%

C₁₅H₁₅FN₂O₃S; 322.08 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 1.39 (d, 6H, J = 6.8 Hz), 3.64 (s, 3H), 4.10-4.16 (m, 1H), 7.14 (dd, 2H, J = 8.5 Hz und 8.5 Hz), 7.91 (dd, 2H, J = 8.7 Hz und 5.2 Hz).

EI-MS (70 eV): 321.8 (10), 290.0 (26), 261.9 (13), 123.0 (100), 95 (25), 40 (16).

N-(2-Naphthoyl)-2-amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester

Ausbeute: 86%

C₁₉H₁₈N₂O₃S; 354.10 g/mol

EI-MS (70 eV): 354.1 (23), 322.0 (25), 294.0 (8), 155.1 (100), 127.1 (70), 40.0 (12).

N-(1-Naphthoyl)-2-amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester

Ausbeute: 79%

C₁₉H₁₈N₂O₃S; 354.10 g/mol

EI-MS (70 eV): 354.1 (4), 327.1 (13), 155.1 (40), 127.1 (22), 58.1 (100), 40.0 (21).

***N*-(4-Phenyl-benzoyl)-2-amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester**

Ausbeute: 88%

$C_{21}H_{20}N_2O_3S$; 380.12 g/mol

EI-MS (70 eV): 379.0 (14), 352.1 (15), 200.0 (13), 181.0 (100), 168.0 (30), 153.0 (59), 58.1 (72), 40.0 (27).

***N*-(2-Phenyl-benzoyl)-2-amino-4-isopropylthiazol-5-carbonsäureester**

Ausbeute: 64%

$C_{21}H_{20}N_2O_3S$; 380.12 g/mol

EI-MS (70 eV): 380.0 (16), 348.0 (11), 181.0 (100), 152.1 (26), 58.1 (46), 40.0 (20).

4-Methyl-2-methylen-pentansäuremethylester (78)

Es wurden zu einer Lösung von 80.4 g (370 mmol) Isobutylmalonsäurediethylester in 250 mL Ethanol bei Raumtemp. eine Lösung von 20.7 g (370 mmol) Kaliumhydroxid in 250 mL Ethanol tropfenweise über einen Zeitraum von 1 h zugegeben. Anschließend wurden 12h bei Raumtemp. gerührt und die Reaktionslösung i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wurde in 40 ml Wasser aufgenommen und unter Eiskühlung mit 33 mL konz. Salzsäure angesäuert. Es wurde viermal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung mit 65.7 g (0.83 mol) Pyridin, 3.18 g (0.04 mol) Piperidin und 9.25 g (0.30 mol) Paraformaldehyd 1.5 h unter Rückfluß erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde mit 1.2 L Wasser versetzt und dreimal mit je 110 mL Pentan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit Wasser, verd. Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonatlsg. und verd. Natriumchloridlsg. gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Trockenmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde durch Abdestillation bei Normaldruck entfernt und der Rückstand anschließend im Wasserstrahlpumpenvakuum destilliert.

Ausbeute: 9.71 g (17%) farblose Flüssigkeit Sdp.: 65°C (15 mbar)

C₉H₁₆O₂; 156.12 g/mol, (87438-94-6)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.70-1.91 (m, 1 H), 2.18 (d, 2H, J = 7.0 Hz), 4.19 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 5.48 (s, 1H), 6.15 (s, 1H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 14.5, 22.5, 27.5, 41.6, 60.8, 125.6, 140.3, 167.7.

MS-EI (70eV): 156.0 (33)[M⁺], 114.0 (94), 86 (100), 69 (34), 55 (24), 41.0 (40).

tert.-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat (137)

20.0 mL (136 mmol) tert.-Butylbromacetat und 29.0 ml (1.8 eq.) Trimethylphosphit wurden 15 h auf 80°C erhitzt und anschließend im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 27.5 g (90%) farbloses Öl, Sdp.: 120°C (Hochvakuum)

C₈H₁₇O₅P; 224.08 g/mol, (62327-21-3)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.48 (s, 9H), 2.90 (d, 2H, J = 21.4Hz), 3.81 (d, 6H, J = 11.2 Hz).

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 27.9, 33.6, 35.7, 55.0, 82.3, 164.7.

3-Phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester (138)

4.24 g (106 mmol) Natriumhydrid (60%ige Suspension) wurden dreimal mit Pentan gewaschen und anschließend mit 26.9 g (120 mmol) tert.-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat in 190 mL abs. THF bei 0°C tropfenweise versetzt. Nachdem die Reaktionslösung 1 h bei Raumtemp. gerührt worden war wurden 12.0 g (120 mmol) Acetophenon in 100 mL THF tropfenweise bei 0°C über einen Zeitraum von 1.5 h tropfenweise zugegeben und anschließend 3 d bei Raumtemp. gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Eis versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 24.8 g (quant.) farbl. Öl

C₁₄H₁₈O₂; 218.13 g/mol, (75814-56-1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (s, 9H), 2.53 (s, 3H), 6.05 (s, 1H), 7.21-7.46 (m, 5H).

4-Brom-3-Phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester (139)

15.0 g (68.7 mmol) 3-Phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester und 13.5 g (1.1 eq.) *N*-Brom-Succinimid wurden in 200 mL Tetrachlorkohlenstoff mit 100 mg AIBN über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt war wurde das Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 20.1 g (quant.) gelbl. Öl

$C_{14}H_{17}BrO_2$; 296.04 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.54 (s, 9H), 4.93 (s, 2H), 6.13 (s, 1H), 7.38-7.53 (m, 5H).

4-Diethylphosphono-3-phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester (140)

10.0 g (33.6 mmol) 4-Brom-3-Phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester wurden mit 8 mL Triethylphosphit 1.5 h auf 110°C unter Rühren erhitzt. Die leichtflüchtigen Komponenten wurden i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

Ausbeute: 6.5 g (60 %) gelbl. Öl, R_f = 0.13 Eluent (EE/Hex 50:50)

$C_{16}H_{23}O_5P$; 326.13 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.52 (s, 9H), 3.56 (d, J = 11 Hz, 6H), 3.92 (d, J = 24.4 Hz, 2H), 6.12 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.32-7.52 (m, 5H).

ESI-MS: m/z 675.0 (15) [$2M+Na^+$], 349.2 (100) [$M+Na^+$], 327.1 (16) [$M+H^+$].

4-Diethylphosphono-3-phenyl-butansäure-*tert.*-butylester (130)

Es wurden 6.00 g (18.3 mmol) 4-Diethylphosphono-3-phenyl-but-2-ensäure-*tert.*-butylester in 100 mL Methanol mit 300 mg Pd-C unter H_2 -Atmosphäre über Nacht hydriert. Der katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 6.02 g (100%) farbl. Feststoff

$C_{16}H_{25}O_5P$; 328.14 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.27 (s, 9H), 2.10-2.21 (m, 2H), 2.51-2.83 (m, 3H), 3.50-3.59 (m, 6H), 7.17-7.35 (m, 5H).

ESI-MS: m/z 679.1 (19) $[2M+Na^+]$, 351.1 (100) $[M+Na^+]$, 329.1 (9) $[M+H^+]$.

2-(4-Nitro-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (40b)

2.00 g (7.96 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-pentansäure-methylester in 25 mL abs. THF wurden bei $-78^\circ C$ tropfenweise zu 1.12 g (3.7 eq.) Lithiumaluminiumhydrid in 150 mL abs. THF gegeben und anschließend 1h bei $-78^\circ C$ gerührt. Über einen Zeitraum von 15 min. wurde auf $-40^\circ C$ erwärmt und die Reaktionslösung nacheinander mit Essigsäureethylester feuchtem Diethylether, Wasser und 2N Salzsäure versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 2.1 g rotes Öl

$C_{12}H_{17}NO_3$; 223.12 g/mol

HPLC (5-100 in 30 min.) R_t : 22.93 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.87 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 0.88 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 1.24-1.67 (m, 4H), 2.98-3.10 (m, 1H), 3.70-3.85 (m, 2H), 7.40 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.19 (d, 2H, J = 8.7 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.7, 23.4, 25.3, 40.9, 46.4, 67.4, 123.8, 128.9, 146.7, 151.0.

MS-EI (70eV): 223.1 (9) $[M^+]$, 193.0 (39), 150.0 (55), 137.0 (100), 91 (34), 43.1 (32).

HRMS (70eV): 223.12104 calc.223.12085

2-(4-Amino-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (41b)

1.90 g (8.51 mmol) 2-(4-Nitro-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol wurden mit 100 mg Pd/C (10%) in 100 mL Methanol unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) 9h bei Raumtemp. gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 1.64 g (99%) rotes Öl

HPLC (5-100 in 30 min.) R_f : 12.29 min.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ = 0.78 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 0.79 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 1.15-1.34 (m, 1H), 1.35-1.54 (m, 2H), 2.63-2.78 (m, 1H), 3.42 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 7.09 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.21 (d, 2H, J = 8.2 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, DMSO): = 22.0, 24.0, 25.4, 41.4, 45.9, 66.8, 121.4, 129.5, 133.5, 141.8.

MS-EI (70eV): 193.1 (21) [M^+], 162.1 (56), 106.1 (100), 69 (9), 45 (13).

HRMS (70eV): 193.14665 calc. 193.14667

***N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-2-(4-amino-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (42b)**

1.64 g (8.48 mmol) 2-(4-Amino-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol wurden in 80 mL Wasser/Aceton (1:1) mit 936 mg (1.4 eq.) Natriumhydrogencarbonat und 2.95 g (1.1 eq.) Fmoc-OSu versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 2N Salzsäure angesäuert. Die organischen Phasen wurden viermal mit Essigester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt und aus *tert*-BuOH lyophilisiert.

Ausbeute: 3.13 g (89%) farbloser Feststoff R_f : 0.21 (EE/Hex 30:70)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_3$; 415.21 g/mol

HPLC: (5-100 in 30 min.) R_f : 26.45 min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.79 (d, 3H, J = 6.0 Hz), 0.81 (d, 3H, J = 6.0 Hz), 1.20-1.34 (m, 1H), 1.40-1.57 (m, 2H), 2.63-2.72 (m 1H), 3.42 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 4.28-4.32 (m, 1H), 4.47 (d, 2H, J = 6.3 Hz), 7.08 (d, 2H, J = 7.61 Hz), 7.29-7.45 (m, 6H), 7.74 (d, 2H, J = 7.27 Hz), 7.90 (d, 2H, J = 7.35 Hz), 9.59 (bs, 1H).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.78-0.82 (m, 6H), 1.22-1.31 (m, 1H), 1.39-1.50 (m, 2H), 2.62-2.66 (m, 1H), 4.27-4.31 (m, 1H), 4.40-4.46 (m, 2H), 7.06 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.31-7.44 (m, 6H), 7.73 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 9.57 (bs, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 22.4, 24.6, 25.8, 41.9, 46.3, 47.5, 66.3, 67.4, 119.3, 121.0, 126.0, 127.9, 128.5, 128.9, 137.7, 138.7, 141.7, 144.7, 154.3.

ESI-MS: m/z 853.2 (21) [$2\text{M}+\text{Na}^+$], 831.2 (23) [$2\text{M}+\text{H}^+$], 643.1 (100) [$(3\text{M}+\text{H}+\text{K})^{2+}/2$], 438.4 (24) [$\text{M}+\text{Na}^+$], 416.3 (41) [$\text{M}+\text{H}^+$].

2-(3-Nitro-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (40a)

Durchführung wurde analog **40 b** ausgeführt.

Ausbeute: 98%

$C_{12}H_{17}NO_3$; 223.12 g/mol

HPLC (5-100% in 30 min.): 21.51 min.

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.82 (ψ t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.25-1.34 (m, 1H), 1.49-1.55 (m, 2H), 2.90-2.97 (m, 1H), 3.50-3.58 (m, 2H), 4.62 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.56-7.59 (m, 1H), 7.69 (d, 7.2 Hz, 1H), 8.04-8.06 (m, 2H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.7, 23.3, 25.2, 40.8, 45.9, 67.2, 121.6, 122.7, 129.5, 134.5, 145.3, 148.3.

MS-EI (70eV): 223.1 (23)[M^+], 193.1 (44), 176.1 (62), 150.1 (100), 137.1 (53), 43.1 (41).

HRMS (EI, 70 eV): 223.12077 calc. 223.12085

2-(3-Amino-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (41a)

Durchführung wurde analog **41b** ausgeführt

Ausbeute: 98%

$C_{12}H_{19}NO$; 193.14 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) 12.27 min.

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.78-0.81 (m, 6H), 1.24-1.31 (m, 1H), 1.38-1.51 (m, 2H), 2.61-2.67 (m, 1H), 6.70-6.81 (m, 3H), 7.13 (s, 1H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.5, 23.7, 24.8, 41.1, 46.2, 66.6, 111.7, 113.5, 115.4, 128.5, 144.1, 148.3.

GCMS (EI, 70 eV): 193.1 (52)[M^+], 137.1 (44), 119.1 (80), 106.1 (100), 59.0 (45).

HRMS (EI, 70 eV): 193.14646 calc. 193.14667

***N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)- 2-(3-amino-phenyl)-4-methyl-pentan-1-ol (42a)**

Durchführung wurde analog **42b** ausgeführt.

$C_{27}H_{29}NO_3$; 415.21 g/mol

HPLC: (5-100 in 30 min.) R_t : 26.92 min.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.78-0.82 (m, 6H), 1.26-1.36 (m, 1H), 1.40-1.53 (m, 2H), 2.62-2.66 (m, 1H), 3.40-3.45 (m, 2H), 4.27-4.30 (m, 1H), 4.44 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.53 (bs, 1H), 6.81 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.13-7.18 (m, 1H), 7.25-7.36 (m, 4H), 7.42 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 9.60 (bs, 1H).

ESI-MS: m/z 853.2 (54) [$2M+Na^+$], 831.2 (38) [$2M+H^+$], 643.1 (100) [$(3M+H+K)^{2+}/2$], 438.4 (60) [$M+Na^+$], 416.3 (67) [$M+H^+$].

(R)-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure (97)

Zu einer Lösung von 14 g (107 mmol) D-Leucin wurden in 300 mL Eisessig gelöst und bei 0°C unter Rühren portionsweise mit 16.8 g (2.3 eq.) Natriumnitrit versetzt. Es wurde 1h bei 0°C und anschließend 2h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde i. Vak. eingengt und mit 200 g Eis versetzt. Es wurde sechsmal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen.

Ausbeute: 17.0 g (91%) farbloses Öl

$C_8H_{14}O_4$, 174.08 g/mol, (19892-90-1)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.95 (ψ t, 6H, J = 6.7 Hz), 1.60-1.89 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 5.05 (dd, 1H, J = 9.4 Hz und 4.0 Hz).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.5, 21.5, 22.9, 24.6, 39.6, 70.6, 170.8, 176.8.

EI-MS (70 eV) : 174.1 (3) [M^+], 129.1 (38) [$M-CHO_2$], 43.0 (100) [$CH_2O_3^+$].

(R)-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylester (112)

7.57 g (43.4 mmol) (R)-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure und 9.08 mL (2.2 eq.) *tert.*-Butanol wurden in 100 mL trockenem Dichlormethan bei 0°C mit 11.7 g (1.3 eq.) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 650 mg *N,N*-Dimethyl-4-aminopyridin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 7.37 g (74%) farbloses Öl, R_f : 0.66 (Eluent: Essigester/Hexan 20:80)

$C_{12}H_{22}O_4$; 230.15 g/mol, (19892-91-2)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (2d, 6 H, J = 6.4 Hz), 1.44 (s, 9H), 1.51-1.82 (m, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.86 (dd, 1H, J = 9.3 Hz und 4.3 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3): δ = 20.6, 21.6, 22.9, 24.6, 27.9, 39.7, 71.6, 81.8, 169.9, 170.6.

EI-MS (70 eV) : 157.0 (29) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}]$, 129.1 (40) $[\text{M}-\text{COOC}_4\text{H}_9]$, 57.0 (96) $[\text{C}_4\text{H}_9^+]$, 43.0 (100) $[\text{CH}_2\text{O}_3^+]$.

(R)-2-Hydroxy-4-methyl-pentansäure-tert.-butylester (113)

6.50 g (28.2 mmol) (*R*)-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure-tert.-butylester wurden bei Raumtemperatur mit 11.7 g (3 eq.) Kaliumcarbonat in einer Mischung aus 30 mL Wasser und 43 mL Methanol kräftig über Nacht gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und des Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 4.79 g (91%) farbloses Öl, R_f : 0.54 (Eluent: Essigester/Hexan 20:80)

$C_{10}H_{20}O_3$; 188.14 g/mol, (19892-92-3)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (2d, 6 H, J = 6.6 Hz), 1.46 (s, 9H), 1.43-1.53 (m, 2H), 1.78-1.94 (m, 1H), 4.03 (dd, 1H, J = 8.1 Hz und 5.5 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3): δ = 21.6, 23.3, 24.5, 27.8, 43.6, 69.3, 82.1, 175.2.

EI-MS (70 eV) : 189.1 (1) $[\text{M}+\text{H}]$, 131.1 (2) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}]$, 57.0 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9^+]$.

(S)-2-(2-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-tert.-butylester (114a)

Zu einer Lösung von 1.00 g (5.31 mmol) *D*-tert-Butyl-2-Hydroxy-4-methylpentanoat, 1.17 g (1 eq.) 2-Iod-phenol und 1.39 g (1 eq.) Triphenylphosphin in 60 mL trockenem THF wurde unter Inertgas bei 0°C mit 1.13 g (1.1 eq.) Diisopropylazodicarboxylat tropfenweise versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 und Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde über

Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

$C_{16}H_{23}IO_3$: 390.07 g/mol

Ausbeute: 1.45 g (70%) farbl. Öl

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.96 u. 1.03 (2d, J = 6.7 Hz, 6 H), 1.42 (s, 9H), 1.68-1.73 (m, 1H), 1.98-2.07 (m, 2H), 4.55-4.57 (m, 1H), 6.65 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.71 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 1H).

^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 22.3, 23.6, 25.1, 28.2, 41.7, 76.9, 82.4, 87.0, 112.6, 123.2, 129.5, 140.1, 157.1, 171.2.

MS-EI (70 eV): 390.0 [M^+](38), 288.9 (48), 219.9 (38), 162.1 (61), 57 (100).

HRMS (EI, 70 eV): 390.06897 calc. 390.06918

(S)-2-(3-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylester (114b)

Zu einer Lösung von 1.00 g (5.31 mmol) *D-tert*-Butyl-2-hydroxy-4-methylpentanoat, 1.17 g (1 eq.) 2-Iod-phenol und 1.39 g (1 eq.) Triphenylphosphin in 60 ml trockenem THF wurde unter Inertgas bei 0°C mit 1.13 g (1.1 eq.) Diisopropylazodicarboxylat tropfenweise versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 und Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

$C_{16}H_{23}IO_3$: 390.07 g/mol

Ausbeute: 1.70 g (82%) farbl. Öl

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 0.94 u. 1.00 (2d, J = 6.2 Hz, 6 H), 1.45 (s, 9H), 1.63-1.67 (m, 1H), 1.86-1.90 (m, 2H), 4.46-4.49 (m, 1H), 6.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.98 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.27-7.29 (m, 1H).

^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 22.2, 23.4, 25.0, 28.2, 41.8, 76.0, 82.6, 94.6, 114.9, 124.6, 130.8, 131.1, 158.9, 171.3.

MS-EI (70 eV): 390.1 [M^+](32), 289.1 (57), 262.1 (22), 162.1 (58), 57 (100).

HRMS (EI, 70 eV): 390.06909, calc. 390.06918

(S)-2-(4-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-tert.-butylester (114c)

Zu einer Lösung von 1.00 g (5.31 mmol) *D-tert*-Butyl-2-Hydroxy-4-methylpentanoat, 1.17 g (1 eq.) 2-Iod-phenol und 1.39 g (1 eq.) Triphenylphosphin in 60 mL trockenem THF wurde unter Inertgas bei 0°C mit 1.13 g (1.1 eq.) Diisopropylazodicarboxylat tropfenweise versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ und Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

C₁₆H₂₃IO₃: 390.07 g/mol

Ausbeute: 1.74 g (84%) farbl. Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.93 u. 1.00 (2d, J = 6.5 Hz, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.63-1.66 (m, 1H), 1.86-1.92 (m, 2H), 4.45-4.47 (m, 1H), 6.65 (d, J = 8.71 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.71 Hz, 2H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 22.1, 23.4, 25.0, 28.2, 41.8, 76.0, 82.5, 83.8, 117.7, 138.6, 158.6, 171.3.

MS-EI (70 eV): 390.1 [M⁺](50), 289.1 (41), 262.1 (62) 162.1 (51), 57 (100).

HRMS (EI, 70 eV): 390.06877, calc. 390.06918

(S)-2-(2-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure (115a)

1.00 g (2.56 mmol) (S)-2-(2-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-tert.-butylester wurden in TFA / CH₂Cl₂ (50:50) bei 0°C 2 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol coevaporiert.

C₁₂H₁₅IO₃: 334.01 g/mol

Ausbeute: 853 mg (100 %) farbl. Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 0.89 u. 0.96 (2d, J = 6.6 Hz, 6 H), 1.66-1.71 (m, 1H), 1.85-1.99 (m, 2H), 4.70-4.73 (m, 1H), 6.71-6.77 (m, 2H), 7.06 (t, J = , 1H), 7.30 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 6.6 Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): 22.5, 23.9, 25.3, 41.7, 75.8, 87.3, 113.2, 123.7, 132.3, 140.0, 157.1, 173.3.

MS-EI (70 eV): 333.9 [M^+](48), 219.9 (100), 207.0 (10) 69.0 (16), 41 (15).

HRMS (EI, 70 eV): 334.00640, calc. 334.00659

(S)-2-(3-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure (115b)

1.00 g (2.56 mmol) (S)-2-(3-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylester wurden in TFA / CH_2Cl_2 (50:50) bei 0°C 2 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol coevaporiert.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{IO}_3$: 334.01 g/mol

Ausbeute: 855 mg (100 %) farbl. Öl

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): 0.89 u. 0.93 (2d, $J = 6.4$ Hz, 6 H), 1.62-1.67 (m, 1H), 1.75-1.81 (m, 2H), 4.70-4.73 (m, 1H), 6.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): 22.2, 23.4, 25.0, 28.2, 41.8, 76.0, 82.6, 94.6, 114.9, 124.6, 130.8, 131.1, 158.9, 171.3.

MS-EI (70 eV): 333.8 [M^+](86), 261.9 (46), 219.9 (100), 182.9 (29), 43.0 (25).

HRMS (EI, 70 eV): 334.00638, calc. 334.00659

(S)-2-(4-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure (115c)

1.00 g (2.56 mmol) (S)-2-(4-Iodphenoxy)-4-methyl-pentansäure-*tert.*-butylester wurden in TFA / CH_2Cl_2 (50:50) bei 0°C 2 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol coevaporiert.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{IO}_3$: 334.01 g/mol

Ausbeute: 849 mg (100 %) farbl. Öl

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): 0.88 u. 0.93 (2d, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.62-1.67 (m, 1H), 1.76-1.82 (m, 2H), 4.65-4.67 (m, 1H), 6.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): 22.5, 23.7, 25.2, 41.6, 75.0, 84.5, 118.4, 138.9, 158.5, 173.5.

MS-EI (70 eV): 333.8 [M^+](60), 261.9 (74), 219.8 (100), 182.9 (48), 43.0 (21).

HRMS (EI, 70 eV): 334.00652, calc. 334.00659

Diethyl-2-brom-2-phenyl-ethylphosphonat (90)

6.50 g (26.8 mmol) Diethyl-2-phenyl-ethylphosphonat wurden mit 5.25 g (1.1 eq.) N-Bromsuccinimid und 100 mg AIBN in 100 mL Tetrachlorkohlenstoff 2 h unter Rückfluß erhitzt. Aus der abgekühlten Reaktionslösung wurde das Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 8.40 g (98%) farbloses Öl

$C_{12}H_{18}BrO_3P$: 320.02 g/mol

HPLC (5-100 in 30 min.) R_t : 20.75 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.11 (t, 3H, J = 7 Hz), 1.19 (t, 3H, J = 7 Hz), 2.82-2.96 (m, 2H), 3.68-3.07 (m, 4H), 7.22-7.48 (m, 5H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.1, 37.6 (d), 46.3, 62.0, 127.3, 128.6, 141.3, 141.4.

EI-MS (70 eV): 320.8 (2) [M^+], 240.9 (100), 197.0 (42), 169.0 (35), 131.0 (29), 108.9 (52), 104.0 (34).

Diethyl-2-amino-2-phenyl-ethylphosphonat (88)

Es wurden 6.40 g (19.9 mmol) Diethyl-2-brom-2-phenyl-ethylphosphonat mit 3.30 g (2.5 eq.) Natriumazid in 80 mL DMF über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde mit 100 g Eis versetzt und viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt.

Es wurden 4.17 g eines gelbes Öl erhalten, welches neben dem gewünschten Azid [HPLC (5-100 in 30 min) R_t = 20.37 min.] das Eliminierungsprodukt enthielt [HPLC (5-100 in 30 min) R_t = 19.46 min.]. Da sich dieses Gemisch als säulenchromatographisch nicht trennbar erwies, wurde dieses ohne Aufreinigung weiterverarbeitet.

3.67 g des obigen Rohproduktes wurden in 80 mL MeOH gelöst und mit 400 mg Pd-C-Katalysator versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht unter H_2 -Atmosphäre (1 atm)

gerührt und am nächsten Tag über Celite filtriert. Der Rückstand, der neben dem Amin [HPLC (10-100) in 30 min) $R_t = 9.96$ min.] auch das Hydrierungsprodukt des α,β -ungesättigten Phosphonsäureesters enthält [HPLC (10-100) in 30 min) $R_t = 18.62$ min.] wurde säulenchromatographisch an Kieselgel getrennt. Zunächst wurde das Nebenprodukt mit 100% Essigester eluiert und anschließend das polarere Amin mit Chloroform/Methanol (9:1) von der Säule gelöst.

Ausbeute: 3.13 g (70%) gelbes Öl

$C_{12}H_{20}NO_3P$; 257.12 g/mol, (67264-28-2)

HPLC (10-100 in 30 min) $R_t = 9.96$ min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 1.30 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz), 2.08-2.25 (m, 2H), 2.43 (bs, 2H), 4.08 (dq, 4H, $J = 7.2$ Hz und 7.3 Hz), 4.37-4.47 (m, 1H), 7.23-7.38 (m, 5H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, DMSO- d_6): 16.6, 35.9 (d), 51.4, 61.3, 126.8, 127.2, 128.5, 146.7.

ESI-MS: m/z 537.0 (8) [$2M+Na^+$], 280.6 (5) [$M+Na^+$], 258.1 (100) [$M+H^+$].

***rac.*-3-Amino-3-phenyl-propionsäuremethylester (81)**

2.00 g (12.1 mmol) *rac.*-3-Amino-3-phenyl-propionsäure wurden in 5 ml trockenem Dichlormethan gelöst und zu dieser Suspension bei Raumtemperatur tropfenweise 3.43 mL (3.8 eq.) Thionylchlorid zugegeben. Die Mischung wurde 1h bei Raumtemp. gerührt und einrotiert. Der Rückstand wurde bei Raumtemp. tropfenweise mit Methanol versetzt, anschließend 1h bei gerührt und schließlich mit Eis versetzt. Die Lösung wurde mit Natriumcarbonat versetzt (pH = 9) und die wässrige Phase viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 2.39 g (91%) farbl.Öl

$C_{10}H_{13}NO_2$: 179.09 g/mol, (14898-52-3)

HPLC (5-100% in 30 min) $R_t = 9.76$ min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.38$ (bs, 2H), 2.72 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.65 (s, 3H), 4.45 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.26-7.40 (m, 5H).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 43.9, 51.7, 52.6, 126.2, 127.5, 128.7, 144.6, 172.5$.

EI-MS (70 eV): 179.0 (20)[M^+], 106.1 (100), 104.0 (23), 79.0 (34).

2[(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-pentansäure (79)

Es werden 1.03 g (6.40 mmol) 2-Thionaphthol und 1.00 g (1eq.) 2-Isobutylacrylsäureethylester in 20 mL Toluol mit wenigen Tropfen Piperidin 5 h unter Rückfluß und Inertatmosphäre erhitzt und anschließend 3 d bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand in 4N KOH in Dioxan / Wasser über Nacht verseift, nachdem sich das Reaktionsprodukt als untrennbar von dem Oxidationsprodukt des 2-Thionaphthols erwiesen hat.

Die alkalische Lösung wurde mit 100 g Eis und anschließend tropfenweise mit konz. Salzsäure versetzt, bis ein pH-Wert von 0-1 erreicht war. Die wässrige Lösung wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

Ausbeute: 1.54 g (83%) farbl.Feststoff, $R_f = 0.19$, Eluent: Essigester/Hexan 80:20 (0.5 % Essigsäure)

$C_{26}H_{29}NO_3S$; 288.12 g/mol

HPLC (10-100 in 30 min) $R_t = 24.65$ min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.94$ (d, 6H, $J = 7.8$ Hz), 1.45-1.76 (m, 3H), 2.70-2.82 (m, 1H), 3.09 (dd, 1H, $J = 13.3$ Hz und 5.8 Hz), 3.29 (dd, 1H, $J = 13.3$ Hz und 8.3 Hz), 7.41-7.51 (m, 3 H), 7.74-7.84 (m, 4H).

^{13}C -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 22.0, 22.8, 26.0, 36.2, 40.9, 43.6, 125.9, 126.6, 127.2, 127.7, 128.0, 128.4, 128.6, 132.1, 133.0, 133.7, 180.6.

EI-MS (70 eV): 287.9 (92)[M^+], 172.9 (68), 159.9 (100), 115.0 (34).

3-[(2-(*R*)-Acetoxy-4-methyl-1-oxo-pentyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure-methylester (98)

1.50 g (8.37 mmol) (*R*)-2-Acetoxy-4-methyl-pentansäure und 1.46 g (1 eq.) 3-Amino-3-phenyl-propionsäuremethylester wurden mit 1.13 g (1 eq.) HOBt und 1.60 g (1 eq.) EDCI-HCl und 5.13 mL (4.2 eq.) DIPEA in 50 mL CH_2Cl_2 über Nacht gerührt. Nach Versetzen der Reaktionslösung mit Wasser wurde die organische Phase abgetrennt und

anschließend mit verd. HCl-Lsg., ges. NaCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 2.80 g (95%) farbloser Feststoff

$C_{18}H_{25}NO_5$; 335.17 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 20.30$ min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 0.80-0.90 (m, 6H), 1.67-1.82 (m, 3H), 2.22 (s, 1H), 2.82-3.02 (m, 2H), 3.64 und 3.65 (2s, 3H), 5.22-5.30 (m, 1H), 5.38-5.49 (m, 1H), 7.22-7.45 (m, 6H).

ESI-MS: m/z 358.3 (40) $[M+Na^+]$, 355.6 (100) $[(2M+Ca)^{2+}/2]$, 336.3 (49) $[M+H^+]$.

3-[(2-(*R*)-Hydroxy-4-methyl-1-oxo-pentyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure-methylester (99)

Es wurden 1.20 g (3.58 mmol) 3-[(2-(*R*)-Acetoxy-4-methyl-1-oxo-pentyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure-methylester in einer Mischung aus 6 mL Wasser und 4 mL Methanol mit 1.48 g (3 eq.) Kaliumcarbonat versetzt und bei Raumtemp. 8 h kräftig gerührt. Nach dem Ansäuern der Reaktionslösung mit verd. HCl-Lösung wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 730 mg (70 %) farbloser Feststoff, R_f : 0.27 (Eluent: Essigester/Hexan 1:1)

$C_{16}H_{23}NO_4$; 293.36 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 17.58$ und 17.91 min.

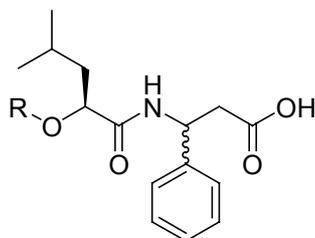
1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 0.92-1.10 (m, 6H), 1.50-1.75 (m, 2H), 1.79-1.95 (m, 1H), 2.82-3.02 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 4.15-4.24 (m, 1H), 5.41-5.52 (m, 1H), 7.23-7.41 (m, 5H), 7.42-4.53 (m, 1H).

ESI-MS: m/z 459.9 (100) $[(3M+H+K)^{2+}/2]$, 316.3 (24) $[M+Na^+]$, 294.3 (17) $[M+H^+]$.

8.3 Synthese von α 4-Antagonisten in Lösung

8.3.1 Phenolether über Mitsunobureaktion

Zu jeweils 60.0 mg (0.20 mmol) 3-[(2-(*R*)-Hydroxy-4-methyl-1-oxo-pentyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure-methylester wurden in 2 mL trockenem THF jeweils 1 eq. Phenol und 54 mg (1 eq.) Triphenylphosphin gegeben. Bei 0°C wurden 40 μ L (1 eq.) DIAD zu der Reaktionslösung gegeben und die über Nacht unter Inertgas gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand 12 h in 1 N LiOH / Dioxan gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt und der Rückstand mittels HPLC gereinigt.



3-[[2(S)-[3,5-Dichlor-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (105)

Ausbeute: 65 %

$C_{21}H_{23}Cl_2NO_4$: 423.10 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 24.87$ min.; **ESI-MS**: m/z 885.2 (41) $[2M+K^+]$, 869.2 (13) $[2M+Na^+]$, 424.1 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.87$ (ν t, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.92 (ν t, $J = 5.5$ Hz, 3H), 1.52-1.58 (m, 1H), 1.68-1.78 (m, 2H), 2.60-2.76 (m, 2H), 4.63-4.66 (m, 0.5H), 4.71-4.74 (m, 0.5 H), 5.11-5.21 (m, 1H), 6.93-6.96 (m, 2H), 7.10-7.13 (m, 1H), 7.16-7.22 (m, 3H), 7.28-7.30 (m, 2H), 8.66 (d, $J = 6.2$ Hz, 0.5H), 8.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.5H), 12.3 (bs, 1H).

3-[[2(S)-[4-Chlor-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (102)

Ausbeute: 54 %

$C_{21}H_{24}ClNO_4$, 389.14 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 23.26$ min.; **ESI-MS**: m/z 817.2 (39) $[2M+K^+]$, 801.2 (21) $[2M+Na^+]$, 390.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.86$ (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.91 (ψ t, $J = 5.2$ Hz, 3H), 1.48-1.57 (m, 1H), 1.69-1.81 (m, 2H), 2.61-2.77 (m, 2H), 4.50-4.56 (m, 1H), 5.11-5.23 (m, 1H), 6.84-6.89 (m, 2H), 7.10-7.32 (m, 7H), 8.67 u. 8.72 (2d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 12.3 (bs, 1H).

3-[[2(S)-[1-Naphthoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (101)

Ausbeute: 33 %

$C_{25}H_{27}NO_4$, 405.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 24.12$ min.; **ESI-MS**: m/z 849.3 (41) $[2M+K^+]$, 833.3 (26) $[2M+Na^+]$, 428.2 (14) $[M+Na^+]$, 406.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.85$ (d, $J = 5.7$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.58-1.67 (m, 1H), 1.82-1.96 (m, 2H), 2.62-2.74 (m, 2H), 4.62-4.76 (m, 1H), 5.11-5.23 (m, 1H), 6.69 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.09-7.31 (m, 6H), 7.39-7.51 (m, 3H), 7.78-7.88 (m, 1H), 8.12-8.24 (m, 1H), 8.66 u. 8.76 (2d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 12.3 (bs, 1H).

3-[[2(S)-[2-Naphthoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (100)

Ausbeute: 49 %

$C_{25}H_{27}NO_4$, 405.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 23.67+23.78$ min.; **ESI-MS**: m/z 849.3 (70) $[2M+K^+]$, 833.3 (41) $[2M+Na^+]$, 428.3 (14) $[M+Na^+]$, 406.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.88-0.91$ (m, 3H), 0.94-0.96 (m, 3H), 1.55-1.64 (m, 1H), 1.76-1.87 (m, 2H), 2.67-2.78 (m, 2H), 4.68-4.72 (m, 0.5H), 4.72-4.79 (m, 0.5 H), 5.17-5.24 (m, 1H), 7.03-7.39 (m, 8H), 7.41-7.48 (m, 1H), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 0.5 H), 7.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 0.5 H), 7.75-7.86 (m, 2H), 8.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 0.5 H), 8.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 0.5 H), 12.3 (bs, 1H).

3-[[2(S)-[3-Pyridinyloxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (103)

Ausbeute: a) 21 %

$C_{20}H_{24}N_2O_4$, 356.17 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 14.45$ min.; **ESI-MS**: m/z 751.3 (10) $[2M+K^+]$, 735.3 (5) $[2M+Na^+]$, 379.3 (4) $[M+Na^+]$, 357.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.87$ u. 0.92 (2d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.53-1.60 (m, 1H), 1.72-1.81 (m, 2H), 2.64-2.77 (m, 2H), 4.60-4.67 (m, 1H), 5.15-5.22 (m, 1H), 7.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.16-7.23 (m, 3H), 7.26-7.30 (m, 2H), 8.18 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 12.3 (bs, 1H).

Ausbeute: b) 25 %

$C_{20}H_{24}N_2O_4$, 356.17 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 14.90$ min.; **ESI-MS**: m/z 751.3 (7) $[2M+K^+]$, 735.3 (4) $[2M+Na^+]$, 379.3 (3) $[M+Na^+]$, 357.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.87$ u. 0.92 (2d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.55-1.61 (m, 1H), 1.72-1.80 (m, 2H), 2.66 (d, 2H), 4.65-4.70 (m, 1H), 5.13-5.19 (m, 1H), 7.19-7.23 (m, 1H), 7.28-7.31 (m, 5H), 8.16-8.18 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 12.3 (bs, 1H).

3-[[2(S)-[3-Isochinolinylxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (104)

Ausbeute: b) 67 %

$C_{24}H_{26}N_2O_4$, 406.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 21.61$ min.; **ESI-MS**: m/z 851.4 (21) $[2M+K^+]$, 429.4 (8) $[M+Na^+]$, 407.2 (20) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.89$ u. 0.94 (2d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.56-1.64 (m, 1H), 1.77-1.87 (m, 2H), 2.63-2.78 (m, 2H), 5.16-5.26 (m, 2H), 7.04-7.38 (m, 6H), 7.39-7.48 (m, 1H), 7.63-7.68 (m, 1H), 7.80-7.83 (m, 1H), 8.00-8.04 (m, 1H), 8.47-8.69 (m, 1H), 8.97 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

8.3.2 S-haltige Surrogate des *hits* 6a

3-[[[2-(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester (82)

Es wurden 200 mg (0.69 mmol) 2[(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-pentansäure, 129 mg (1 eq.) 3-Amino-phenyl-propionsäuremethylester, 160 mg (1 eq.) EDCI und 93.4 mg (1 eq.) HOBt mit 458 μ L (2.69 mmol) DIPEA in 2 mL Dichlormethan über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser versetzt und die organische Phase mit verd. HCl, Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung für die folgenden Oxidationsschritte eingesetzt.

3-[[[2-(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (85)

Es wurden 50.0 mg (1.11 mmol) 3-[[[2-(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester in 3 mL 1 N LiOH und 3 mL Dioxan über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 85%

$C_{26}H_{29}NO_3S$: 435.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 24.36$ min.; **ESI-MS**: m/z 909.2 (9) $[2M+K^+]$, 893.1 (12) $[2M+Na^+]$, 870.9 (6) $[2M+H^+]$, 436.1 (100), $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.70$ - 0.86 (m, 6H), 1.28-1.58 (m, 3H), 2.50-2.69 (m, 3H), 3.02-3.17 (m, 2H), 5.19-5.24 (m, 1H), 7.20-7.52 (m, 8H), 7.72-7.87 (m, 4H), 8.47 u. 8.53 (2d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 12.2 (bs, 1H).

3-[[[2-(2-Naphthyl)sulfonyl-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (84)

80.0 mg (0.17 mmol) 3-[[[2-(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester wurden in 3 mL CH₂Cl₂ bei 0°C mit 61.4 mg (2 eq.) *m*-Chlorperbenzoesäure versetzt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Methylester mit 1N LiOH in Wasser / Dioxan verseift. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand über präparative HPLC getrennt.

C₂₆H₂₉NO₅S; 467.18 g/mol

Ausbeute: a) 32%

HPLC (10-100 in 30 min) R_t = 21.03 min.

ESI-MS: *m/z* 973.3 (37) [2M+K⁺], 975.2 (35) [2M+Na⁺], 490.4 (25) [M+Na⁺], 468.2 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.68 u. 0.79 (2d, J = 6.5 Hz, 6H), 1.22-1.18 (m, 1H), 1.35-1.42 (m, 1H), 1.43-1.49 (m, 1H), 2.57-2.67 (m, 2H), 2.78-2.83 (m, 1H), 3.31-3.37 (m, 1H), 3.55-3.60 (m, 1H), 5.07-5.13 (m, 1H), 7.21-7.24 (m, 1H), 7.27-7.30 (m, 4H), 7.66-7.78 (m, 2H), 7.85 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 8.06-8.15 (m, 3H), 8.50-8.53 (m, 2H), 12.20 (bs, 1H).

Ausbeute: b) 23%

HPLC (10-100 in 30 min) R_t = 21.30 min.

ESI-MS: *m/z* 973.3 (47) [2M+K⁺], 975.2 (53) [2M+Na⁺], 490.4 (35) [M+Na⁺], 468.2 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.60 u. 0.73 (2d, J = 5.9 Hz, 6H), 1.17-1.31 (m, 5H), 2.73-2.82 (m, 1H), 3.35 (dd, J = 14.4 Hz u. 4.0 Hz, 1H), 3.57 (dd, J = 14.4 Hz u. 8.0 Hz, 1H), 4.96-5.01 (m, 1H), 7.16-7.30 (m, 5H), 7.68-7.77 (m, 1H), 7.90 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.17-8.23 (m, 2H), 8.52-8.58 (m, 2H), 12.23 (bs, 1H).

3-[[[2-(2-Naphthyl)sulfoxyl-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (83)

80.0 mg (0.17 mmol) 3-[[[2-(2-Naphthyl)thio-methyl]-4-methyl-1-oxo-pentanyl]-amino]-3-phenyl-propionsäuremethylester wurden in 3 mL CH₂Cl₂ bei 0°C mit 31.0 mg (1 eq.) *m*-

Chlorperbenzoesäure versetzt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Methylester mit 1N LiOH in Wasser / Dioxan verseift. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand über präparative HPLC getrennt.

Ausbeute: a) 5%

$C_{26}H_{29}NO_4S$; 451.18 g/mol

HPLC (5-100 in 30 min) $R_t = 20.03$ min.

ESI-MS: m/z 941.3 (21) $[2M+K^+]$, 925.1 (15) $[2M+Na^+]$, 474.3 (22) $[M+Na^+]$, 452.1 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.79$ u. 0.86 (2d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.42-1.46 (m, 1H), 1.52-1.65 (m, 2H), 2.61 (d, 7.5 Hz, 2H), 2.66-2.72 (m, 1H), 2.87-2.98 (m, 2H), 5.12-5.17 (m, 1H), 7.18-7.21 (m, 1H), 7.26-7.29 (m, 4H), 7.61-7.66 (m, 2H), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.00-8.04 (m, 2H), 8.08 (d, 8.6 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.65 (bs, 1H), 12.23 (bs, 1H).

Ausbeute: b) 12%

HPLC (5-100 in 30 min) $R_t = 20.47$ min.

ESI-MS: m/z 941.2 (23) $[2M+K^+]$, 925.2 (25) $[2M+Na^+]$, 474.3 (22) $[M+Na^+]$, 452.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.76$ u. 0.83 (2d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.13-1.23 (m, 1H), 1.45-1.53 (m, 2H), 2.69 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.74-2.78 (m, 1H), 2.89-2.98 (m, 1H), 3.05-3.08 (m, 1H), 5.26-5.30 (m, 1H), 7.21-7.40 (m, 3H), 7.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.52-7.76 (m, 3H), 8.00-8.18 (m, 4H), 8.76 (bs, 1H), 12.23 (bs, 1H).

Ausbeute: c) 19%

HPLC (5-100 in 30 min) $R_t = 21.16$ min.

ESI-MS: m/z 941.2 (21) $[2M+K^+]$, 925.1 (37) $[2M+Na^+]$, 474.2 (20) $[M+Na^+]$, 452.1 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.68$ u. 0.79 (2d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.09-1.16 (m, 1H), 1.23-1.30 (m, 1H), 1.36-1.47 (m, 1H), 2.62-2.83 (m, 3H), 2.86-2.94 (m, 1H), 3.06-3.13 (m, 1H), 7.20-7.36 (m, 5H), 7.62-7.76 (m, 3H), 8.02-8.16 (m, 3H), 8.23 (s, 1H), 8.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 12.22 (bs, 1H).

8.3.3 Enantiomerenreine Synthese des *hits* 6a

3(*S*)-[[[2-(2-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute a) 66%

C₂₇H₂₉NO₄, 431.21 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 23.11 min.; **ESI-MS**: *m/z* 901.3 (67) [2M+K⁺], 885.2 (35) [2M+Na⁺], 454.4 (13) [M+Na⁺], 432.1 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.85 u. 0.92 (2d, J = 6.1 Hz, 6H), 1.21-1.27 (m, 1H), 1.49-1.66 (m, 2H), 2.64 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.96-3.00 (m, 1H), 3.05-3.12 (m, 1H), 3.34-3.40 (m, 1H), 5.16-5.19 (m, 1H), 7.14-7.31 (m, 5H), 7.58-7.67 (m, 2H), 7.90-7.98 (m, 3H), 8.10 (d, J = , 1H), 8.47 (bs, 1H), 8.62 (s, 1H), 12.2 (bs, 1H).

Ausbeute b) 45%

C₂₇H₂₉NO₄, 431.21 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 23.45 min.; **ESI-MS**: *m/z* 901.3 (76) [2M+K⁺], 885.2 (62) [2M+Na⁺], 454.4 (20) [M+Na⁺], 432.1 (100) [M+H⁺].

3(*R*)-[[[2-(2-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute a) 45%

C₂₇H₂₉NO₄, 431.21 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 23.16 min.; **ESI-MS**: *m/z* 901.3 (62) [2M+K⁺], 885.2 (27) [2M+Na⁺], 454.4 (14) [M+Na⁺], 432.1 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 48%

C₂₇H₂₉NO₄, 431.21 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 23.50 min.; **ESI-MS**: *m/z* 901.3 (100) [2M+K⁺], 885.3 (44) [2M+Na⁺], 454.4 (20) [M+Na⁺], 432.1 (95) [M+H⁺].

8.3.4 Phosphonsäurederivate des *hits* 6a

2-[[2-[[2-Oxo-(2-naphthyl)-ethyl]]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-ethyl-phosphon säurediethylester

Es wurden 200 mg (0.70 mmol) 2[[2-Oxo-(1-naphthyl)-ethyl]]-4-methyl-pentansäure mit 181 mg (1 eq.) Diethyl-2-amino-2-phenyl-ethylphosphonat und 135 mg (1 eq.) EDCI in Gegenwart von 95.0 mg (1 eq.) HOBt und 467 μ L (2.75 mmol) DIPEA in 2 mL Dichlormethan bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser versetzt und die organische Phase mit verd. HCl, Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 335 mg (91 %) farbloses Öl

$C_{30}H_{38}NO_5P$, 523.25 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 25.82$ min.; **ESI-MS**: m/z 1070.1 (11) $[2M+K^+]$, 1069.1 (20) $[2M+Na^+]$, 546.4 (97) $[M+Na^+]$, 524.2 (40) $[M+H^+]$, 506.3 (100) $[M-OH^+]$.

2-[[2-[[2-Oxo-(2-naphthyl)-ethyl]]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-ethyl-phosphon säure (93)

Das obige Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in 3 mL trockenem Dichlormethan mit 5 eq. Trimethylsilylbromid unter Inertatmosphäre 3d bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 5 mL Wasser wurde noch 1 h gerührt und der Reaktionsansatz anschließend i.Vak. eingeengt.

Der Rückstand wurde mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute a) 10%

$C_{26}H_{30}NO_5P$, 467.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 20.71$ min.; **ESI-MS**: m/z 973.3 (100) $[2M+K^+]$, 957.2 (52) $[2M+Na^+]$, 935.1 (36) $[2M+H^+]$, 490.4 (35) $[M+Na^+]$, 468.2 (44) $[M+H^+]$, 450.2 (81) $[M-OH^+]$.

Ausbeute b) 9%

$C_{26}H_{30}NO_5P$, 467.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 20.07$ min.; **ESI-MS**: m/z 973.3 (100) $[2M+K^+]$, 957.2 (54) $[2M+Na^+]$, 935.2 (36) $[2M+H^+]$, 490.4 (36) $[M+Na^+]$, 468.2 (49) $[M+H^+]$, 450.2 (76) $[M-OH^+]$.

Ausbeute c) n.b.

$C_{26}H_{28}NO_4P$, 449.18 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 22.53$ min.; **ESI-MS**: m/z 937.3 (62) $[2M+K^+]$, 899.1 (67) $[2M+H^+]$, 472.3 (20) $[M+Na^+]$, 450.2 (100) $[M+H^+]$.

8.4 Synthese von Bausteinen für die Synthese von Transmembranen Peptiden

Fmoc-Ile-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH

Es wurden 3.57 g (30 mmol) L-Threonin in 30 mL 10% Natriumcarbonatlösung gelöst und bei Raumtemp. zu einer Lsg. von 5.20 g (10 mmol) Fmoc-Ile-Pfp in 80 mL Aceton gegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und unter Eiskühlung mit 2N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit je 100 mL Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

Ausbeute: 5.40 g farbl Feststoff

Der Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL abs. THF gelöst und nach Zugabe von 250 mg PPTA und 5 mL 2,2-Dimethoxypropan 8 h unter Rückfluß und Molsieb 4\AA erhitzt. Die erkaltete Reaktionslösung wurde 350 μ L Triethylamin versetzt und bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde mit 250 mL Essigester aufgenommen und dreimal mit je 70 mL Wasser gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak entfernt.

Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 4.58 g farbl. Pulver (nach Lyophilisieren aus *tert.*-Butanol)

$C_{28}H_{34}N_2O_6$; 494.6 g/mol

HPLC (5-100 in 30 min.) R_t : 25.30 min.

ESI-MS: m/z 1028.4 (100) $[2M+K^+]$, 1012.2 (52) $[2M+Na^+]$, 643.1 (100), 517.6 (84) $[M+Na^+]$, 495.2 (53) $[M+H^+]$.

4-(Hydroxymethyl)-benzaldehyd

Es wurden 5 g (24.0 mmol) Terephthalaldehyd-mono-diethylacetal in 50 mL MeOH bei 0°C mit 1.37 g (1.5 eq.) Natriumborhydrid portionsweise versetzt und anschließend 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 50 g Eis versetzt und mit 2N Salzsäure angesäuert (pH = 2). Die wässrige Phase wurde viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. Natriumchloridlg. gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 3.23 g (99%) farbloses Öl

$C_8H_8O_2$; 136.05 g/mol, (52010-97-6)

HPLC (5-100 % in 30 min.): 6.88 min.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): 4.80 (s, 2H), 7.53 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.88 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 10.0 (s, 1H).

EI-MS (70 eV): 136.1 (79) $[M^+]$, 107.1 (100) $[M-CHO^+]$, 89.1 (28), 79.1 (64).

N-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-phenylalanin-(4-formylphenyl)-methylester

Bei 0°C wurden 1.01 g (7.42 mmol) 4-(Hydroxymethyl)-benzaldehyd und 2.87 g (1 eq.) Fmoc-Phenylalanin in 80 mL abs. Dichlormethan mit 1.53 g (1 eq.) DCC und einer Spatelspitze DMAP versetzt. Es wurde unter Argon über Nacht gerührt und der Rückstand abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt.

Ausbeute: 4.8 g farbloses Öl

$C_{32}H_{27}NO_5$; 505.19 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.): 27.00 min.

ESI-MS: m/z 1032.8 (46) [2M+Na⁺], 1010.9 (39) [2M+H⁺], 528.3 (23) [M+Na⁺], 506.1 (100) [M+H⁺].

***N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl)-phenylalanin-[4-[(2,6-dioxa-4-carboxy-4-methyl)-cyclohexyl]-phenyl]-methylester**

Eine Lösung aus 2.60 g (5.14 mmol) 594 und 690 mg (1eq.) DMPA mit 50 mg *p*-TsOH in 100 mL Toluol wurde über Nacht am Dean-Stark-Wasserabscheider unter Rückfluß erhitzt und nach dem Abkühlen, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 3.16 g (99%) farbl. Feststoff

C₃₇H₃₅NO₈; 621.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.): 26.0 und 26.4 min (Diastereomergemisch)

ESI-MS: m/z 1281.1 (22) [2M+K⁺], 1265.0 (21) [2M+Na⁺], 1243.0 (21) [2M+H⁺], 660.1 (25) [M+K⁺], 644.3 (100) [M+Na⁺], 622.2 (54)[M+H⁺].

8.5 Festphasensynthese

8.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 9: 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 CH₂Cl₂ (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 CH₂Cl₂ (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: CH₂Cl₂ (3 x je 3 min), DMF (3x je 3 min) und abschließend nochmals mit CH₂Cl₂ (3 x je

3 min). Das Harz wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung der Beladung konnte photometrisch gravimetrisch nach folgender Formel ermittelt werden:

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

m_1 = Masse des eingesetzten Harzes [g]

m_2 = Gesamtmasse des Harzes nach der Belegung [g]

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

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

AAV 10: Belegung von OH-funktionalisierten Harzen nach Blankemeyer-Menge *et al.*^[502]

Die Quellung des Harzes erfolgt jeweils 5 min mit trockenem DMF und anschließend mit trockenem CH₂Cl₂. 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 CH₂Cl₂ 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 CH₂Cl₂ (3 x je 3 min) und DMF (3x je 3min) 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 CH₂Cl₂ (3 x je 3 min) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet

AAV 11: 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 12 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·H₂O (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 13: 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), HOAt (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 14: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie:

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 | Entschützen | 2 | 15 |
| 3 | NMP | Waschen | 4 | 3 |
| 4 | Fmoc-AS-OH Kupplungsreagenz/Base | Kuppeln | 1 | 60 |
| 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), CH₂Cl₂ (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 15: 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_2O (10 mL) für 1 h versetzt. Das Harz wird mit einem 95:5 Gemisch TFA: H_2O gewaschen (3 x 10 mL, je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt.

AAV 16: 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 zweimal je 1 h mit einem Gemisch aus 20% Hexafluorisopropanol in Dichlormethan behandelt. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert. Abschließend lyophilisiert man das vollgeschützte Peptid aus *tert*-Butanol.

AAV 17: Reduktive Alkylierung an der Festphase nach Krchnak *et al.*:^[503]

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 18: Synthese von Sulfonamiden

Das freie, harzgebundene Amin wird mit trockenem Dichlormethan gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 3 eq. Sulfonsäurechlorid und 3.9 eq. DIPEA in Dichlormethan versetzt. Nach 3 h wurde das Harz mehrmals mit Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

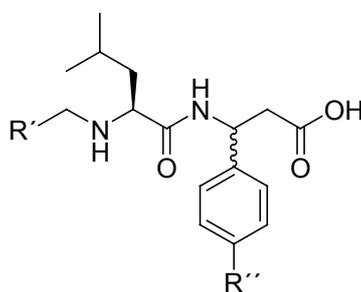
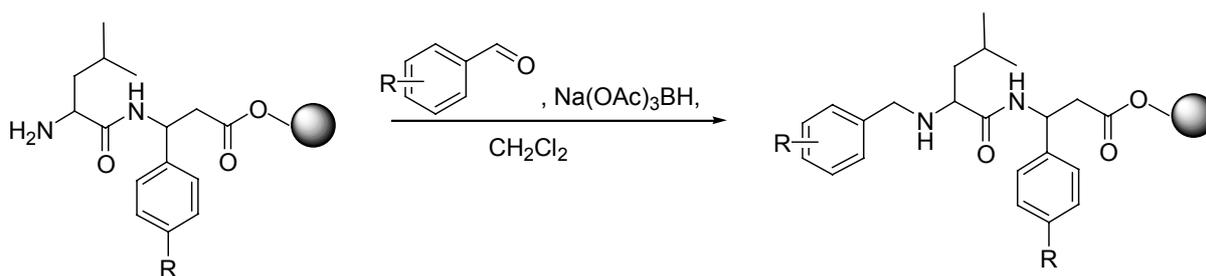
AAV 19: Synthese von Harnstoffen

Das freie, harzgebundene Amin wird mit DMF gewaschen und mit einer Lösung von 4 eq. Isocyanat und 5.2 eq. DIPEA in DMF versetzt. Nach 12 h wurde das Harz mehrmals mit DMF anschließend mit Dichlormethan gewaschen, und schließlich im Hochvakuum getrocknet.

8.5.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

8.5.2.1 Derivate mit reduzierter Amidbindung

120 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 12 mit Fmoc-L-Leu-OH, AAV 17 mit versch. aromatischen Aldehyden und AAV 15 nach HPLC-Reinigung:



3-[[2S]-2-[(2-Naphthalenylmethyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (117)

Ausbeute: 44%

C₂₇H₃₂N₂O₃: 432.55 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 18.47min.; **ESI-MS**: *m/z* 903.4 (6) [2M+K⁺], 887.2 (8) [2M+Na⁺], 433.2 (100) [M+H⁺].

3-[[2S]-2-[(1-Naphthalenylmethyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (118)

Ausbeute: 24%

C₂₇H₃₂N₂O₃: 432.55 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 18.47min.; **ESI-MS**: *m/z* 903.4 (5) [2M+K⁺], 887.4 (2) [2M+Na⁺], 433.3 (100) [M+H⁺].

3-[[2S]-2-[(4-Phenyl-phenylmethyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (120)

Ausbeute: 42%

C₂₉H₃₄N₂O₃: 458.26 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 19.60min.; **ESI-MS**: *m/z* 955.4 (5) [2M+K⁺], 939.6 (3) [2M+Na⁺], 459.3 (100) [M+H⁺].

3-[[2S]-2-[(2-Pyridinylmethyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (121)

Ausbeute: a) 27%

C₂₂H₂₉N₃O₃: 383.22 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 14.31min.; **ESI-MS**: *m/z* 805.5 (7) [2M+K⁺], 789.3 (5) [2M+Na⁺], 406.4 (7) [M+Na⁺], 384.3 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 29%

$C_{22}H_{29}N_3O_3$: 383.22 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 15.89$ min.; **ESI-MS**: m/z 805.5 (11) $[2M+K^+]$, 789.3 (5) $[2M+Na^+]$, 406.4 (6) $[M+Na^+]$, 384.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[(2S)-2-[(4-Fluorphenylmethyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (119)

Ausbeute a) 48%

$C_{23}H_{29}FN_2O_3$: 400.22 g/mol

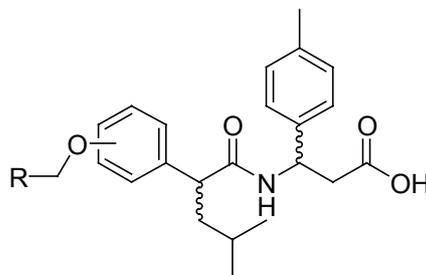
HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 16.90$ min.; **ESI-MS**: m/z 839.3 (8) $[2M+K^+]$, 823.2 (5) $[2M+Na^+]$, 401.2 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 48%

$C_{23}H_{29}FN_2O_3$: 400.22 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 17.23$ min.; **ESI-MS**: m/z 839.4 (7) $[2M+K^+]$, 823.2 (6) $[2M+Na^+]$, 401.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.2 Benzyl-Phenylether des Phenylethylsäuren-scaffolds



Es wurden je 200 mg Fmoc- β -(4-Methyl)-phenyl alanin-Wang-Harz (0.6 mmol/g) in NMP 30 min. gequollen und anschließend zweimal mit 20% Piperidin/NMP behandelt (5 und 15 min.). Nach mehrmaligem Waschen mit NMP wurden 3eq. der jeweiligen 2-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-phenyl-4-methyl-pentansäure mit 3 eq. TBTU, 3 eq. HOBt und 7.8 eq. DIPEA in möglichst geringem Volumen NMP gelöst und über Nacht zum Harz gegeben. Das Harz wurde dreimal mit NMP und anschließend achtmal mit Dichlormethan gewaschen. Schließlich wurde das Harz zweimal je 1 h mit p-TsOH (2.5 mg/ml) in Dichlormethan / MeOH (97:3) behandelt und hinterher fünfmal mit Dichlormethan gewaschen.

Das getrocknete Harz wurde in einen 5 mL Glasreaktor mit Septum überführt und 1 h mit THF vorgequollen. Zum Harz wurden bei 0°C 3 eq. des entsprechenden Benzylalkohols und 3 eq. Triphenylphosphin gegeben. Nach 10 min. vorsichtigem Rühren wurden 3 eq. DIAD dazugegeben und 4 h bei 0°C periodisch gerührt.

Das Harz wurde danach mit Dichlormethan gewaschen und in 5 ml Spritzen überführt.

Es wurde weiterverfahren nach AAV 15 und die HPLC-gereinigten Verbindungen aus Wasser/tBuOH lyophilisiert.

Ortho-substituierte Derivate:

3-[[[2-[(2-Pyridyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (60)

Ausbeute a) 23%

C₂₈H₃₂N₂O₄: 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 18.48 min.; **ESI-MS**: *m/z* 483.2 (13) [M+Na⁺], 461.2 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 24%

C₂₈H₃₂N₂O₄: 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 19.16 min.; **ESI-MS**: *m/z* 483.2 (12) [M+Na⁺], 461.2 (100) [M+H⁺].

3-[[[2-[(4-Chlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (61)

Ausbeute a) 29%

C₂₉H₃₂ClNO₄: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 26.34 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1025.5 (32) [2M+Na⁺], 1009.2 (37) [2M+Na⁺], 516.3 (53) [M+Na⁺], 494.2 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 32%

C₂₉H₃₂ClNO₄: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.88$ min.; **ESI-MS**: m/z 1025.5 (37) $[2M+Na^+]$, 1009.2 (35) $[2M+Na^+]$, 986.9 (5) $[2M+H^+]$, 516.3 (33) $[M+Na^+]$, 494.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-[(2,6-Dichlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure

Ausbeute a) 32%

$C_{29}H_{31}Cl_2NO_4$: 527.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 27.00$ min.; **ESI-MS**: m/z 1093.2 (31) $[2M+Na^+]$, 1077.2 (28) $[2M+Na^+]$, 550.3 (61) $[M+Na^+]$, 528.1 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-[(3-Methoxyphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (62)

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

Ausbeute a) n.b.

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 25.12$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.4 (100) $[2M+Na^+]$, 1001.5 (19) $[2M+Na^+]$, 528.4 (23) $[M+K^+]$, 512.5 (43) $[M+Na^+]$, 490.3 (17) $[M+H^+]$.

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

Ausbeute b) n.b.

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 25.52$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.4 (100) $[2M+Na^+]$, 1001.3 (24) $[2M+Na^+]$, 528.4 (52) $[M+K^+]$, 512.5 (82) $[M+Na^+]$, 490.4 (16) $[M+H^+]$.

Meta-substituierte Derivate:

3-[[[3-[(4-Methoxyphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (64)

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

Ausbeute a) 17 %

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 22.82$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.4 (37) $[2M+Na^+]$, 1001.5 (50) $[2M+Na^+]$, 979.1 (13) $[2M+H^+]$, 512.4 (14) $[M+Na^+]$, 490.3 (100) $[M+H^+]$.

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

Ausbeute b) 20%

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 23.79$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.4 (43) $[2M+Na^+]$, 1001.2 (43) $[2M+Na^+]$, 512.4 (14) $[M+Na^+]$, 490.4 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[3-[(2-Pyridylphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (63)

Ausbeute a) 39 %

$C_{28}H_{32}N_2O_4$, 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 17.66$ min.; **ESI-MS**: m/z 943.1 (6) $[2M+Na^+]$, 483.3 (9) $[M+Na^+]$, 461.2 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 34 %

$C_{28}H_{32}N_2O_4$, 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 18.91$ min.; **ESI-MS**: m/z 943.1 (4) $[2M+Na^+]$, 483.3 (12) $[M+Na^+]$, 461.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[3-[(2,6-Dichlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (66)

Ausbeute a) 40%

$C_{29}H_{31}Cl_2NO_4$: 527.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.47$ min.; **ESI-MS**: m/z 1093.2 (9) $[2M+Na^+]$, 1077.1 (12) $[2M+Na^+]$, 1054.9 (6) $[2M+H^+]$, 550.3 (5) $[M+Na^+]$, 528.1 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 42%

$C_{29}H_{31}Cl_2NO_4$: 527.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.47$ min.; **ESI-MS**: m/z 1093.2 (9) $[2M+Na^+]$, 1077.1 (11) $[2M+Na^+]$, 1054.9 (6) $[2M+H^+]$, 550.3 (8) $[M+Na^+]$, 528.1 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[3-[(4-Chlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (65)

Ausbeute a) 28%

C₂₉H₃₂ClNO₄: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 26.46 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1025.3 (4) [2M+Na⁺], 1009.2 (5) [2M+Na⁺], 987.0 (13) [2M+H⁺], 516.3 (3) [M+Na⁺], 494.2 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 28%

C₂₉H₃₂ClNO₄: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 26.80 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1025.3 (11) [2M+Na⁺], 1009.1 (13) [2M+Na⁺], 987.0 (15) [2M+H⁺], 516.3 (2) [M+Na⁺], 494.2 (100) [M+H⁺].

Para-substituierte Derivate:

R = 2-Pyridyl

3-[[[4-[(2-Pyridylphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (67)

Ausbeute a) 25%

C₂₈H₃₂N₂O₄: 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 17.04 min.; **ESI-MS**: *m/z* 499.3 (7) [M+K⁺], 483.2 (6) [M+Na⁺], 461.2 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 25%

C₂₈H₃₂N₂O₄: 460.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 18.58 min.; **ESI-MS**: *m/z* 499.3 (7) [M+K⁺], 483.2 (5) [M+Na⁺], 461.2 (100) [M+H⁺].

3-[[[4-[(4-Chlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (68)

Ausbeute a) 19%

C₂₉H₃₂ClNO₄: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.22$ min.; **ESI-MS**: m/z 1025.5 (3) $[2M+Na^+]$, 1009.2 (7) $[2M+Na^+]$, 986.9 (13) $[2M+H^+]$, 516.3 (2) $[M+Na^+]$, 494.2 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 4%

$C_{29}H_{32}ClNO_4$: 493.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.50$ min.; **ESI-MS**: m/z 1025.5 (5) $[2M+Na^+]$, 1009.2 (8) $[2M+Na^+]$, 986.9 (14) $[2M+H^+]$, 516.3 (2) $[M+Na^+]$, 494.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[4-[(2,6-Dichlorphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (69)

Ausbeute a) 36%

$C_{29}H_{31}Cl_2NO_4$: 527.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.36$ min.; **ESI-MS**: m/z 1093.2 (4) $[2M+Na^+]$, 1077.2 (8) $[2M+Na^+]$, 1054.9 (18) $[2M+H^+]$, 566.2 (2) $[M+K^+]$, 550.1 (3) $[M+Na^+]$, 528.1 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 44%

$C_{29}H_{31}Cl_2NO_4$: 527.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 26.75$ min.; **ESI-MS**: m/z 1093.2 (4) $[2M+Na^+]$, 1077.2 (6) $[2M+Na^+]$, 1054.9 (16) $[2M+H^+]$, 566.2 (2) $[M+K^+]$, 550.2 (3) $[M+Na^+]$, 528.1 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[4-[(3-Methoxyphenyl)methoxy]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (70)

Ausbeute a) 22%

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 24.55$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.2 (24) $[2M+Na^+]$, 1001.2 (16) $[2M+Na^+]$, 979.1 (7) $[2M+H^+]$, 528.3 (13) $[M+K^+]$, 512.4 (6) $[M+Na^+]$, 490.2 (100) $[M+H^+]$.

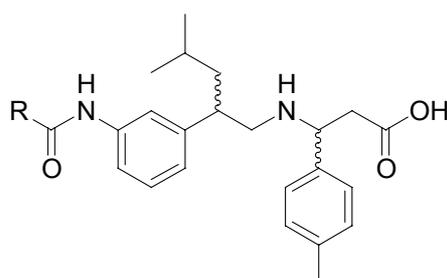
Ausbeute b) 24%

$C_{30}H_{35}NO_5$: 489.2 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 25.12$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.3 (19) $[2M+Na^+]$, 1001.4 (17) $[2M+Na^+]$, 979.1 (6) $[2M+H^+]$, 528.3 (12) $[M+K^+]$, 512.4 (10) $[M+Na^+]$, 490.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.3 Aminoessigsäurederivate mit reduzierter Amidbindung

150 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 17 mit 42a nach AAV 3 und AAV 12 mit verschiedenen aromatischen Aminosäuren, im Anschluß an AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[2-[[3-(4-Fluor-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (44)

Ausbeute: 30%

$C_{29}H_{33}FN_2O_3$: 476.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 21.80$ min.; **ESI-MS**: m/z 991.3 (8) $[2M+K^+]$, 975.2 (5) $[2M+Na^+]$, 953.1 (21) $[2M+H^+]$, 499.2 (9) $[M+Na^+]$, 477.3 (100) $[M+H^+]$.

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.74-0.82 (m, 6H), 1.10-1.20 (m, 1H), 1.38-1.46 (m, 2H), 2.27 u. 2.29 (2s, 3H), 2.68-2.75 (m, 1H), 2.80-2.97 (m, 2H), 3.00-3.11 (m, 2H), 4.44-4.52 (m, 1H), 6.89-7.40 (m, 8H), 7.61-7.65 (m, 2H), 7.99-8.03 (m, 2H), 10.2 (s, 1H).

3-[[2-[[3-(3-Isochinolyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (45)

Ausbeute: 28%

C₃₂H₃₅N₃O₃: 509.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 22.97 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1057.3 (8) [2M+K⁺], 1041.4 (3) [2M+Na⁺], 1019.1 (3) [2M+H⁺], 532.2 (5) [M+Na⁺], 510.2 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.76-0.85 (m, 6H), 1.15-1.23 (m, 1H), 1.38-1.50 (m, 2H), 2.27 u. 2.29 (2s, 3H), 2.73-2.86 (m, 2H), 2.93-3.11 (m, 3H), 4.41-4.53 (m, 1H), 6.92-7.38 (m, 6H), 7.72-7.95 (m, 4H), 8.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 9.47 (m, 1H), 10.69 u. 10.71 (2s, 1H).

3-[[2-[[3-(1-Naphthyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (46)

Ausbeute: 37 %

C₃₃H₃₆N₂O₃: 508.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 21.98 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1055.3 (5) [2M+K⁺], 1039.3 (4) [2M+Na⁺], 1017.0 (7) [2M+H⁺], 531.3 (4) [M+Na⁺], 509.3 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.75-0.85 (m, 6H), 1.14-1.22 (m, 1H), 1.36-1.48 (m, 2H), 2.27 u. 2.29 (2s, 3H), 2.70-2.76 (m, 1H), 2.78-2.85 (m, 1H), 2.91-2.98 (m, 1H), 3.00-3.09 (m, 2H), 4.41-4.52 (m, 1H), 6.90-7.38 (m, 6H), 7.56-7.76 (m, 6H), 8.00-8.21 (m, 3H), 10.6 (s, 1H).

3-[[2-[[3-(4-Phenyl-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (47)

Ausbeute: 61%

$C_{35}H_{38}N_2O_3$: 534.29 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 23.57$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (5) $[2M+K^+]$, 1091.5 (4) $[2M+Na^+]$, 1069.1(13) $[2M+H^+]$, 557.2 (5) $[M+Na^+]$, 535.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.74$ -0.84 (m, 6H), 1.13-1.23 (m, 1H), 1.39-1.49 (m, 2H), 2.27 u. 2.29 (2s, 3H), 2.69-2.75 (m, 1H), 2.79-2.88 (m, 1H), 2.91-2.98 (m, 1H), 3.01-3.12 (m, 2H), 4.45-4.53 (m, 1H), 6.88-6.97 (m, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H), 7.31-7.38 (m, 3H), 7.40-7.44 (m, 1H), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.65-7.70 (m, 2H), 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.04 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 10.27 (s, 1H).

3-[[2-[[3(2-Phenyl-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (48)

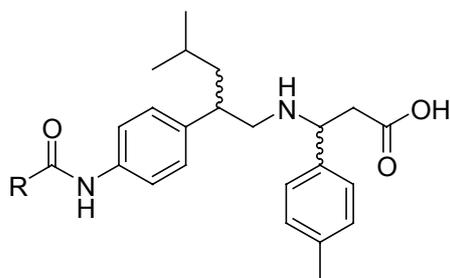
Ausbeute: 80%

$C_{35}H_{38}N_2O_3$: 534.29 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 22.28$ min.; **ESI-MS**: m/z 535.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.72$ -0.83 (m, 6H), 1.13-1.23 (m, 1H), 1.35-1.41 (m, 2H), 2.29 u. 2.30 (2s, 3H), 2.62-2.68 (m, 1H), 2.76-2.89 (m, 2H), 2.91-3.08 (m, 2H), 4.41-4.52 (m, 1H), 7.05-7.58 (m, 17H), 10.22 (s, 1H).

150 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 17 mit **42b** nach AAV 3 und AAV 12 mit verschiedenen aromatischen Aminosäuren, im Anschluß an AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[2-[[4-(4-Fluor-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (49)

Ausbeute: 60%

$C_{29}H_{33}FN_2O_3$: 476.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 21.80$ min.; **ESI-MS**: m/z 991.3 (10) $[2M+K^+]$, 975.3 (6) $[2M+Na^+]$, 953.1 (8) $[2M+H^+]$, 499.3 (9) $[M+Na^+]$, 477.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.73$ -0.80 (m, 6H), 1.08-1.13 (m, 1H), 1.21-1.23 (m, 1H), 1.32-1.47 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.72-2.28 (m, 1H), 2.83-2.96 (m, 2H), 3.02-3.12 (m, 2H), 4.48-4.56 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.20-7.26 (m, 2H), 7.32-7.39 (m, 4H), 7.69-7.72 (m, 2H), 8.00-8.02 (m, 2H), 10.25 (s, 1H).

3-[[2-[[4-(3-Isochinolyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (50)

Ausbeute: 89 %

$C_{32}H_{35}N_3O_3$: 509.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 21.97$ und 22.2 min.; **ESI-MS**: m/z 1057.4 (8) $[2M+K^+]$, 1041.4 (3) $[2M+Na^+]$, 1019.3 (10) $[2M+H^+]$, 532.3 (23) $[M+Na^+]$, 510.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.74$ -0.81 (m, 6H), 1.09-1.18 (m, 1H), 1.32-1.40 (m, 1H), 1.42-1.49 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.74-2.82 (m, 1H), 2.86-3.00 (m, 2H), 3.05-3.16 (m, 2H), 4.49-4.59 (m, 1H), 7.17-7.26 (m, 4H), 7.34-7.38 (m, 2H), 7.83-7.87 (m, 1H), 7.89-7.94 (m, 3H), 8.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 10.77 (s, 1H).

3-[[2-[[4-(1-Naphthyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (51)

Ausbeute: 84%

C₃₃H₃₆N₂O₃: 508.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 22.17 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1055.3 (8) [2M+K⁺], 1039.5 (5) (2M+Na⁺), 1017.2 (21) [2M+H⁺], 531.2 (9) [M+Na⁺], 509.3 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.75-0.83 (m, 6H), 1.12-1.19 (m, 1H), 1.21-1.24 (m, 1H), 1.33-1.40 (m, 1H), 1.42-1.49 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.68-2.76 (m, 1H), 2.77-2.84 (m, 1H), 2.85-2.94 (m, 1H), 2.97-3.08 (m, 2H), 4.42-4.51 (m, 1H), 7.15-7.25 (m, 4H), 7.32-7.36 (m, 2H), 7.57-7.62 (m, 3H), 7.70-7.76 (m, 3H), 8.00-8.03 (m, 1H), 8.07 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.13-8.16 (m, 1H), 10.56 (s, 1H).

3-[[2-[[4-(4-Phenyl-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (52)

Ausbeute: 64%

C₃₅H₃₈N₂O₃: 534.29 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) R_t = 23.58 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1107.4 (8) [2M+K⁺], 1091.4 (5) (2M+Na⁺), 1069.2 (20) [2M+H⁺], 557.3 (11) [M+Na⁺], 535.3 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.74-0.81 (m, 6H), 1.12-1.19 (m, 1H), 1.32-1.48 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.65-2.73 (m, 2H), 2.83-2.95 (m, 3H), 4.28-4.41 (m, 1H), 7.12-7.23 (m, 4H), 7.27-7.32 (m, 2H), 7.41-7.44 (m, 1H), 7.49-7.53 (m, 2H), 7.72-7.76 (m, 4H), 7.83 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 10.27 (s, 1H).

3-[[2-[[4-(2-Phenyl-phenyl)carbonyl-amino]-phenyl]-4-methyl-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (53)

Ausbeute: 69%

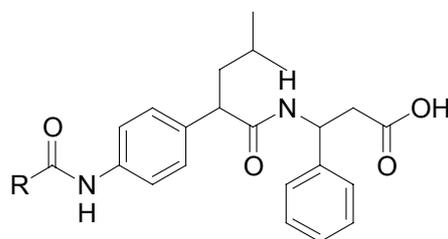
C₃₅H₃₈N₂O₃: 534.29 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 23.23 min.; **ESI-MS**: *m/z* 1107.4 (6) [2M+K⁺], 1091.4 (5) (2M+Na⁺), 1069.2 (5) [2M+H⁺], 557.3 (19) [M+Na⁺], 535.3 (100) [M+H⁺].

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.71-0.78 (m, 6H), 1.03-1.11 (m, 1H), 1.28-1.35 (m, 1H), 1.37-1.42 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.68-2.74 (m, 1H), 2.82-2.90 (m, 2H), 3.00-3.11 (m, 2H), 4.45-4.58 (m, 1H), 7.05 u. 7.09 (2d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.28-7.39 (m, 5H), 7.42-7.58 (m, 8H), 10.26 (s, 1H).

8.5.2.4 Bibliothek des Phenylelessigsäure-*scaffolds*

120 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit **27b**, AAV 11 und AAV 12 mit verschiedenen aromatischen Carbonsäuren nach AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[2-[(4-Phenylcarbonyl-amino)-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenylpropionsäure (**28**)

Ausbeute a) 33%

$C_{28}H_{30}N_2O_4$, 458.22 g/mol

HPLC (10-100 % in 30 min.) R_t = 19.74 min.; **ESI-MS**: m/z 955.2 (15) $[2M+K^+]$, 939.2 (16) $[2M+Na^+]$, 917.2 (35) $[2M+H^+]$, 497.3 (13) $[M+K^+]$, 481.4 (19) $[M+Na^+]$, 459.3 (100) $[M+H^+]$.

¹H-NMR (500 MHz): δ = 0.86 u.0.89 (2d, J = 5.8 Hz, 6H), 1.39-1.45 (m, 2H), 1.82-1.88 (m, 1H), 2.64 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 3.55-3.60 (m, 1H), 5.14-5.20 (m, 1H), 7.12-7.17 (m, 3H), 7.18-7.25 (m, 4H), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.55-7.59 (m, 1H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 8.53 (d, J = 8.3Hz, 1H), 10.12 (s, 1H), 12.25 (bs, 1H).

Ausbeute b) 30%

$C_{28}H_{30}N_2O_4$, 458.22 g/mol

HPLC (10-100 % in 30 min.) R_t = 20.46 min.; **ESI-MS**: m/z 955.2 (8) $[2M+K^+]$, 939.2 (6) $[2M+Na^+]$, 917.2 (10) $[2M+H^+]$, 497.4 (23) $[M+K^+]$, 481.5 (28) $[M+Na^+]$, 459.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[2-[4-(3-Isochinolinyl-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (29)

Ausbeute a) 40%

$C_{31}H_{31}N_3O_4$; 509.23 g/mol

HPLC (10-100 % in 30 min.) $R_t = 22.12$ min.; **ESI-MS**: m/z 1057.2 (2) $[2M+K^+]$, 1041.2 (1) $[2M+Na^+]$, 1019.1 (10) $[2M+H^+]$, 548.4 (5) $[M+K^+]$, 532.4 (5) $[M+Na^+]$, 510.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): 0.88 u.0.90 (2d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.40-1.48 (m, 2H), 1.82-1.92 (m, 1H), 2.61-2.68 (m, H), 3.57-3.63 (m, 1H), 5.14-5.20 (m, 1H), 7.12-7.23 (m, 5H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.78-7.86 (m, 3H), 7.88-7.92 (m, 1H), 8.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.6 (bs, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 10.66 (s, 1H), 12.30 (bs, 1H).

Ausbeute b) 43%

$C_{31}H_{31}N_3O_4$; 509.23 g/mol

HPLC (10-100 % in 30 min.) $R_t = 22.61$ min.; **ESI-MS**: m/z 1057.2 (2) $[2M+K^+]$, 1041.2 (2) $[2M+Na^+]$, 1019.1 (17) $[2M+H^+]$, 548.4 (7) $[M+K^+]$, 532.4 (7) $[M+Na^+]$, 510.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(4-(4-Phenyl)-phenyl-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (31)

Ausbeute a) 12%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.25$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.2 (3) $[2M+K^+]$, 1091.1 (5) $[2M+Na^+]$, 1069.2 (64) $[2M+H^+]$, 573.4 (8) $[M+K^+]$, 557.4 (12) $[M+Na^+]$, 535.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.87$ u.0.90 (2d, $J = 5.6$ Hz, 6H), 1.40-1.48 (m, 2H), 1.81-1.90 (m, 1H), 2.61-2.67 (m, 2H), 3.56-3.61 (m, 1H), 5.14-5.20 (m, 1H), 7.12-7.29 (m, 7H), 7.40-7.43 (m, 1H), 7.48-7.52 (m, 2H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.57 (bs, 1H), 10.20 (s, 1H), 12.28 (bs, 1H).

Ausbeute b) 22%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.68$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (7) $[2M+K^+]$, 1091.1 (11) $[2M+Na^+]$, 1069.2 (70) $[2M+H^+]$, 573.4 (14) $[M+K^+]$, 557.4 (19) $[M+Na^+]$, 535.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(4-(1-Naphthyl)-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (30)

Ausbeute a) 30%

$C_{32}H_{32}N_2O_4$; 508.24 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.32$ min.; **ESI-MS**: m/z 1055.3 (26) $[2M+K^+]$, 1039.2 (26) $[2M+Na^+]$, 1017.2 (73) $[2M+H^+]$, 547.4 (8) $[M+K^+]$, 531.4 (30) $[M+Na^+]$, 509.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.87$ u. 0.90 (2d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 1.41-1.48 (m, 2H), 1.83-1.88 (m, 1H), 2.65 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.57-3.61 (m, 1H), 5.13-5.21 (m, 1H), 7.13-7.27 (m, 7H), 7.55-7.60 (m, 3H), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 6.9$ Hz), 7.99-8.02 (m, 1H), 8.06 (d, $J = 8.25$ Hz, 1H), 8.14-8.16 (m, 1H), 8.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 10.47 (s, 1H), 12.27 (bs, 1H).

Ausbeute b) 30%

$C_{32}H_{32}N_2O_4$; 508.24 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.21$ min.; **ESI-MS**: m/z 1055.4 (49) $[2M+K^+]$, 1039.2 (54) $[2M+Na^+]$, 1017.1 (92) $[2M+H^+]$, 547.3 (10) $[M+K^+]$, 531.4 (45) $[M+Na^+]$, 509.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(4-(2-Phenyl)-phenyl-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (32)

Ausbeute a) 44%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.80$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (34) $[2M+K^+]$, 1091.3 (25) $[2M+Na^+]$, 1069.1 (29) $[2M+H^+]$, 573.4 (47) $[M+K^+]$, 557.4 (47) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.84$ u. 0.87 (2d, $J = 6.0$ Hz, 6H), 1.36-1.43 (m, 2H), 1.78-1.84 (m, 1H), 2.63 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.51-3.56 (m, 1H), 5.12-5.18 (m, 1H), 7.11-7.19 (m, 7H), 7.27-

7.30 (m, 1H), 7.33-7.37 (m, 4H), 7.40-7.47 (m, 4H), 7.52-7.55 (m, 2H), 8.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 10.14 (s, 1H), 12.25 (bs, 1H).

Ausbeute b) 28%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.59$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (39) $[2M+K^+]$, 1091.2 (39) $[2M+Na^+]$, 1069.1 (20) $[2M+H^+]$, 573.4 (62) $[M+K^+]$, 557.4 (83) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(4-(4-Benzoyl)-phenyl-carbonyl)- amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (33)

Ausbeute a) 60%

$C_{35}H_{34}N_2O_5$; 562.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.80$ min.; **ESI-MS**: m/z 1163.3 (14) $[2M+K^+]$, 1147.1 (18) $[2M+Na^+]$, 1125.1 (52) $[2M+H^+]$, 601.3 (16) $[M+K^+]$, 585.4 (15) $[M+Na^+]$, 563.2 (100) $[M+H^+]$.

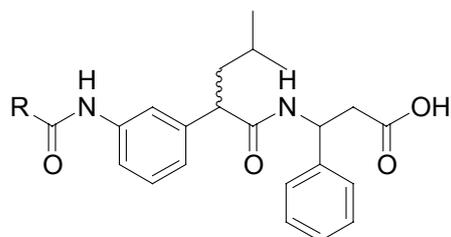
1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.87$ u. 0.89 (2d, $J = 5.8$ Hz, 6H), 1.40-1.47 (m 2H), 1.82-1.89 (m 1H), 2.65 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.57-3.62 (m, 1H), 5.13-5.21 (m, 1H), 7.12-7.28 (m, 7H), 7.57-7.61 (m, 2H), 7.64 (d, $J = 8.52$ Hz, 2H), 7.69-7.73 (m, 1H), 7.76 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 8.24$ Hz, 2H), 8.07 (d, $J = 8.25$ Hz, 2H), 8.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.27 (bs, 1H).

Ausbeute b) 30%

$C_{35}H_{34}N_2O_5$; 562.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.41$ min.; **ESI-MS**: m/z 1163.3 (13) $[2M+K^+]$, 1147.1 (15) $[2M+Na^+]$, 1125.1 (59) $[2M+H^+]$, 601.3 (11) $[M+K^+]$, 585.4 (10) $[M+Na^+]$, 563.2 (100) $[M+H^+]$.

120 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit **27a**, AAV 11 und AAV 12 mit verschiedenen aromatischen Carbonsäuren nach AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[2-[(3-(4-Fluor-phenylcarbonyl-amino)-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (34)

Ausbeute a) 35 %

$C_{28}H_{29}FN_2O_4$, 476.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.42$ min.; **ESI-MS**: m/z 991.3 (40) $[2M+K^+]$, 975.2 (36) $[2M+Na^+]$, 953.1 (41) $[2M+H^+]$, 515.3 (7) $[M+K^+]$, 499.3 (27) $[M+Na^+]$, 477.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.87$ u. 0.90 (2d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 1.40-1.48 (m, 2H), 1.85-1.92 (m, 1H), 2.63 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.58-3.63 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.11-7.22 (m, 6H), 7.34 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 8.00-8.03 (m, 2H), 8.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 10.2 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

Ausbeute b) 35%

$C_{28}H_{29}FN_2O_4$, 476.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.12$ min.; **ESI-MS**: m/z 991.3 (60) $[2M+K^+]$, 975.2 (42) $[2M+Na^+]$, 953.1 (28) $[2M+H^+]$, 515.3 (17) $[M+K^+]$, 499.4 (40) $[M+Na^+]$, 477.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[2-[3-(3-Isochinolinyl-carbonyl)-amino]-phenyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (35)

Ausbeute a) 42%

$C_{31}H_{31}N_3O_4$; 509.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.50$ min.; **ESI-MS**: m/z 1057.3 (6) $[2M+K^+]$, 1041.2 (7) $[2M+Na^+]$, 1019.1 (27) $[2M+H^+]$, 548.3 (4) $[M+K^+]$, 532.3 (10) $[M+Na^+]$, 510.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.90$ u. 0.92 (2d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 1.45-1.52 (m, 2H), 1.87-1.92 (m, 1H), 2.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.60-3.64 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.09-

7.13 (m, 1H), 7.16-7.20 (m, 4H), 7.22-7.26 (m, 1H), 7.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.82-7.93 (m, 3H), 8.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.56-8.64 (m, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 10.6 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

Ausbeute b) 45%

$C_{31}H_{31}N_3O_4$; 509.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.04$ min.; **ESI-MS**: m/z 1057.3 (11) $[2M+K^+]$, 1041.3 (9) $[2M+Na^+]$, 1019.1 (48) $[2M+H^+]$, 548.3 (4) $[M+K^+]$, 532.4 (10) $[M+Na^+]$, 510.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(3-(1-Naphthyl)-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (36)

Ausbeute a) 58%

$C_{32}H_{32}N_2O_4$; 508.24 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.69$ min.; **ESI-MS**: m/z 1055.3 (26) $[2M+K^+]$, 1039.2 (26) $[2M+Na^+]$, 1017.2 (73) $[2M+H^+]$, 547.4 (8) $[M+K^+]$, 531.4 (30) $[M+Na^+]$, 509.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.88$ u. 0.91 (2d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 1.40-1.49 (m, 2H), 1.86-1.93 (m, 1H), 2.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.60-3.65 (m, 1H), 5.16-5.21 (m, 1H), 7.06 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.13-7.25 (m, 6H), 7.55-7.64 (m, 4H), 7.71 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.98-8.02 (m, 1H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.14-8.17 (m, 1H), 8.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 10.5 (s, 1H), 12.2 (bs, 1H).

Ausbeute b) 40%

$C_{32}H_{32}N_2O_4$; 508.24 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.43$ min.; **ESI-MS**: m/z 1055.4 (49) $[2M+K^+]$, 1039.2 (54) $[2M+Na^+]$, 1017.1 (92) $[2M+H^+]$, 547.3 (10) $[M+K^+]$, 531.4 (45) $[M+Na^+]$, 509.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(3-(4-Phenyl)-phenyl-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (37)

Ausbeute a) 29%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 23.66$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (20) $[2M+K^+]$, 1091.2 (22) $[2M+Na^+]$, 1069.1 (59) $[2M+H^+]$, 573.3 (8) $[M+K^+]$, 557.4 (27) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.88$ u. 0.91 (2d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.42-1.48 (m, 2H), 1.88-1.92 (m, 1H), 2.65 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.59-3.63 (m, 1H), 5.16-5.21 (m, 1H), 7.04 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.11-7.23 (m, 6H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.73-7.77 (m, 3H), 7.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 10.2 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

Ausbeute b) 43%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.11$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.4 (29) $[2M+K^+]$, 1091.2 (38) $[2M+Na^+]$, 1069.2 (88) $[2M+H^+]$, 573.3 (10) $[M+K^+]$, 557.4 (35) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(3-(2-Phenyl)-phenyl-carbonyl)-amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (38)

Ausbeute a) 31%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.61$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (15) $[2M+K^+]$, 1091.2 (19) $[2M+Na^+]$, 1069.2 (68) $[2M+H^+]$, 573.4 (16) $[M+K^+]$, 557.4 (17) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.85$ u. 0.87 (2d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.35-1.42 (m, 2H), 1.77-1.84 (m, 1H), 2.58 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.50-3.56 (m, 1H), 5.08-5.14 (m, 1H), 7.10-7.19 (m, 5H), 7.26-7.38 (m, 5H), 7.41-7.48 (m, 4H), 7.52-7.57 (m, 2H), 8.55-8.67 (bs, 1H), 10.1 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

Ausbeute b) 24%

$C_{34}H_{34}N_2O_4$; 534.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.35$ min.; **ESI-MS**: m/z 1107.3 (23) $[2M+K^+]$, 1091.2 (26) $[2M+Na^+]$, 1069.2 (93) $[2M+H^+]$, 573.4 (16) $[M+K^+]$, 557.4 (20) $[M+Na^+]$, 535.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(3-(4-Benzoyl)-phenyl-carbonyl)- amino]-phenyl-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure (39)

Ausbeute a) 41 %

$C_{35}H_{34}N_2O_5$; 562.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.53$ min.; **ESI-MS**: m/z 1163.3 (14) $[2M+K^+]$, 1147.1 (18) $[2M+Na^+]$, 1125.1 (52) $[2M+H^+]$, 601.3 (16) $[M+K^+]$, 585.4 (15) $[M+Na^+]$, 563.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.88$ u. 0.91 (2d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.41-1.48 (m, 2H), 1.86-1.93 (m, 1H), 2.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.60-3.64 (m, 1H), 5.16-5.21 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.11-7.24 (m 6H), 7.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.69-7.78 (m, 4H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 10.4 (s, 1H), 12.3 (bs, 1H).

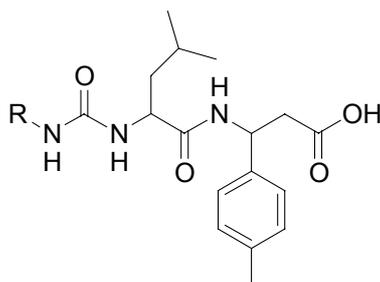
Ausbeute b) 41%

$C_{35}H_{34}N_2O_5$; 562.25 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.23$ min.; **ESI-MS**: m/z 1163.3 (13) $[2M+K^+]$, 1147.1 (15) $[2M+Na^+]$, 1125.1 (59) $[2M+H^+]$, 601.3 (11) $[M+K^+]$, 585.4 (10) $[M+Na^+]$, 563.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.5 Harnstoff-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe

100 mg Fmoc-3-(Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit Fmoc-L-Leu-OH, AAV 11 und AAV 19 mit verschiedenen Isocyanaten nach AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[2-[[[(2-Naphthyl)amino]-carbonyl]-amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (20)

Ausbeute a) 10%

C₂₇H₃₁N₂O₄; 461.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 22.87 min.; **ESI-MS**: *m/z* 961.4 (13) [2M+K⁺], 945.2 (24) [2M+Na⁺], 923.1 (72) [2M+H⁺], 484.3 (10) [M+Na⁺], 462.2 (100) [M+H⁺].

Ausbeute b) 20%

C₂₇H₃₁N₂O₄; 461.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 23.32 min.; **ESI-MS**: *m/z* 961.3 (9) [2M+K⁺], 945.2 (18) [2M+Na⁺], 923.2 (100) [2M+H⁺], 484.3 (4) [M+Na⁺], 462.2 (96) [M+H⁺].

3-[[2-[[[(1-Naphthyl)amino]-carbonyl]-amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (21)

(nicht sauber trennbar, angereicherte Fraktionen)

Ausbeute a) 30%

C₂₇H₃₁N₂O₄; 461.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 22.07 min.; **ESI-MS**: *m/z* 961.4 (41) [2M+K⁺], 945.3 (42) [2M+Na⁺], 923.2 (31) [2M+H⁺], 484.4 (14) [M+Na⁺], 462.2 (100) [M+H⁺].

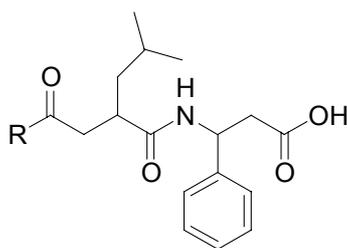
Ausbeute b) 28%

C₂₇H₃₁N₂O₄; 461.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 22.31 min.; **ESI-MS**: *m/z* 961.3 (13) [2M+K⁺], 945.2 (42) [2M+Na⁺], 923.2 (64) [2M+H⁺], 484.3 (11) [M+Na⁺], 462.2 (100) [M+H⁺].

8.5.2.6 Ketomethylen-Surrogate des Dipeptids Leu-βPhe

100 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-TCP-Harz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit **4** bzw. **5**, AAV 16 und HPLC-Reinigung:



**3-[[[2-(1-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure
(7)**

Ausbeute a) 15%

$C_{27}H_{29}NO_4$; 431.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.64$ min.; **ESI-MS**: m/z 901.3 (63) $[2M+K^+]$, 885.2 (49) $[2M+Na^+]$, 454.3 (13) $[M+Na^+]$, 432.1 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 18%

$C_{27}H_{29}NO_4$; 431.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.02$ min.; **ESI-MS**: m/z 901.3 (87) $[2M+K^+]$, 885.2 (32) $[2M+Na^+]$, 454.4 (12) $[M+Na^+]$, 432.1 (100) $[M+H^+]$.

**3-[[[2-(2-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure
(6)**

Ausbeute a) 27 %

$C_{27}H_{29}NO_4$; 431.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.54$ min.; **ESI-MS**: m/z 901.4 (41) $[2M+K^+]$, 885.3 (21) $[2M+Na^+]$, 454.4 (17) $[M+Na^+]$, 432.2 (100) $[M+H^+]$.

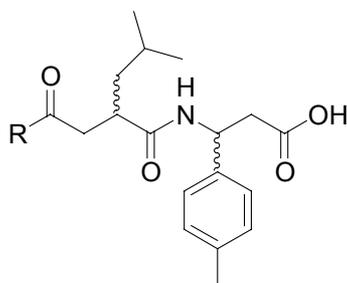
1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.85$ u. 0.92 (2d, $J = 6.1$ Hz, 6H), 1.21-1.27 (m, 1H), 1.49-1.66 (m, 2H), 2.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.96-3.00 (m, 1H), 3.05-3.12 (m, 1H), 3.34-3.40 (m, 1H), 5.16-5.19 (m, 1H), 7.14-7.31 (m, 5H), 7.58-7.67 (m, 2H), 7.90-7.98 (m, 3H), 8.10 (d, $J =$, 1H), 8.47 (bs, 1H), 8.62 (s, 1H), 12.2 (bs, 1H).

Ausbeute b) 20%

$C_{27}H_{29}NO_4$; 431.21 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.03$ min.; **ESI-MS**: m/z 901.3 (65) $[2M+K^+]$, 885.3 (40) $[2M+Na^+]$, 454.4 (32) $[M+Na^+]$, 432.3 (100) $[M+H^+]$.

200 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-TCP-Harz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit **4** bzw. **5**, AAV 16 und HPLC-Reinigung:



3-[[[2-(2-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure

Ausbeute a) 24 %

$C_{28}H_{31}NO_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.80$ min.; **ESI-MS**: m/z 929.4 (34) $[2M+K^+]$, 913.2 (34) $[2M+Na^+]$, 891.0 (4) $[2M+H^+]$, 468.3 (3) $[M+Na^+]$, 446.2 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 26 %

$C_{28}H_{31}NO_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.24$ min.; **ESI-MS**: m/z 929.4 (45) $[2M+K^+]$, 913.2 (55) $[2M+Na^+]$, 891.0 (4) $[2M+H^+]$, 468.3 (14) $[M+Na^+]$, 446.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(1-Naphthyl)-2-oxo-ethyl]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure

Ausbeute a) 18%

$C_{28}H_{31}NO_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.36$ min.; **ESI-MS**: m/z 929.4 (32) $[2M+K^+]$, 913.2 (41) $[2M+Na^+]$, 891.0 (7) $[2M+H^+]$, 468.3 (9) $[M+Na^+]$, 446.1 (100) $[M+H^+]$.

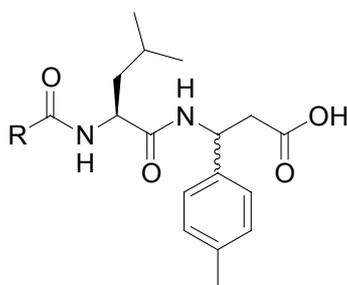
Ausbeute b) 12 %

$C_{28}H_{31}NO_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.91$ min.; **ESI-MS**: m/z 929.3 (40) $[2M+K^+]$, 913.2 (51) $[2M+Na^+]$, 891.0 (7) $[2M+H^+]$, 468.4 (10) $[M+Na^+]$, 446.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.7 *N*-Acyl-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe

200 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-TCP-Harz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit Fmoc-L-Leu-OH, AAV 11, AAV 12 mit α - bzw. β -Naphthoesäure, AAV 16 und HPLC-Reinigung:



3-[[*(2S)*-2-[(1-Naphthoyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl)-phenyl-propionsäure (17)

Ausbeute a) 37%

$C_{27}H_{30}N_2O_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.09$ min.; **ESI-MS**: m/z 931.4 (49) $[2M+K^+]$, 915.2 (96) $[2M+Na^+]$, 893.2 (68) $[2M+H^+]$, 469.4 (17) $[M+Na^+]$, 447.1 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 45%

$C_{27}H_{30}N_2O_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.60$ min.; **ESI-MS**: m/z 931.4 (49) $[2M+K^+]$, 915.2 (96) $[2M+Na^+]$, 893.2 (68) $[2M+H^+]$, 469.4 (18) $[M+Na^+]$, 447.1 (100) $[M+H^+]$.

3-[[*(2S)*-2-[(2-Naphthoyl)amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propionsäure (18)

Ausbeute a) 30%

$C_{27}H_{30}N_2O_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.70$ min.; **ESI-MS**: m/z 931.3 (39) $[2M+K^+]$, 915.1 (48) $[2M+Na^+]$, 893.1 (53) $[2M+H^+]$, 469.3 (17) $[M+Na^+]$, 447.1 (100) $[M+H^+]$.

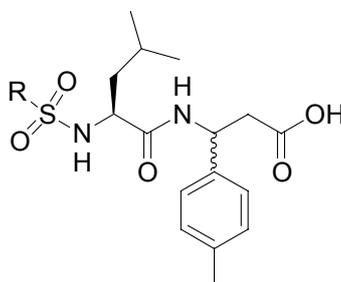
Ausbeute b) 45%

$C_{27}H_{30}N_2O_4$; 445.23 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.03$ min.; **ESI-MS**: m/z 931.4 (60) $[2M+K^+]$, 915.2 (92) $[2M+Na^+]$, 893.2 (50) $[2M+H^+]$, 469.3 (19) $[M+Na^+]$, 447.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.8 Sulfonamid-Derivate des Dipeptids Leu- β Phe

150 mg Fmoc-3-(Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit Fmoc-L-Leu-OH, AAV 11 und AAV 18 mit 1- bzw. 2-Naphthylsulfonsäurechlorid nach AAV 15 und HPLC-Reinigung:



3-[[*(2S)*-4-Methyl-[[*(1-naphthyl)sulfonyl*]amino]-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propansäure (19)

Ausbeute a) 55%

$C_{26}H_{30}N_2O_5S$; 482.19 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.53$ min.; **ESI-MS**: m/z 1003.3 (56) $[2M+K^+]$, 987.1 (82) $[2M+Na^+]$, 965.0 (48) $[2M+H^+]$, 505.3(11) $[M+Na^+]$, 483.1 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b) 30%

$C_{26}H_{30}N_2O_5S$; 482.19 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.97$ min.; **ESI-MS**: m/z 1003.3 (51) $[2M+K^+]$, 987.1 (93) $[2M+Na^+]$, 965.0 (72) $[2M+H^+]$, 505.4 (15) $[M+Na^+]$, 483.1 (100) $[M+H^+]$.

3-[[2*S*]-4-Methyl-[[2-naphthyl)sulfonyl]amino]-1-oxo-pentyl]amino]-3-(4-methyl-phenyl)-propansäure (18)

Ausbeute a) 39%

$C_{26}H_{30}N_2O_5S$; 482.19 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 21.78$ min.; **ESI-MS**: m/z 1003.2 (14) $[2M+K^+]$, 987.1 (62) $[2M+Na^+]$, 965.0 (61) $[2M+H^+]$, 505.3(10) $[M+Na^+]$, 483.1 (100) $[M+H^+]$.

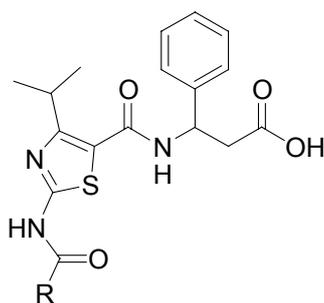
Ausbeute b) 30 %

$C_{26}H_{30}N_2O_5S$; 482.19 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 22.21$ min.; **ESI-MS**: m/z 1003.3 (15) $[2M+K^+]$, 987.1 (63) $[2M+Na^+]$, 964.9 (57) $[2M+H^+]$, 505.3 (12) $[M+Na^+]$, 483.1 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.9 Heterocyclische α -4 Antagonisten mit Thiazol-scaffold

200 mg Fmoc-3-Phenyl-3-aminopropionsäure-TCP-Harz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 12 mit **95 f-j**, AAV 16 und HPLC-Reinigung:



3-[[[2-(Benzoyl-amino)-4-[(2-methyl)-ethyl]-5-thiazolyl]carbonyl]amino]-3-phenyl-propansäure (96a)

Ausbeute: 80%

$C_{23}H_{22}FN_3O_4S$; 455.13 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.23$ min.; **ESI-MS**: m/z 949.1 (39) $[2M+K^+]$, 932.9 (27) $[2M+Na^+]$, 911.0 (21) $[2M+H^+]$, 478.2 (11) $[M+Na^+]$, 456.1(100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(2-Naphthoyl-amino)-4-[(2-methyl)-ethyl]-5-thiazolyl]carbonyl]amino]-3-phenyl-propansäure (96b)

Ausbeute: 65 %

$C_{27}H_{25}N_3O_4S$; 487.16 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.24$ min.; **ESI-MS**: m/z 1013.1 (7) $[2M+K^+]$, 997.0 (8) $[2M+Na^+]$, 975.0 (32) $[2M+H^+]$, 510.3 (10) $[M+Na^+]$, 488.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-(1-Naphthoyl-amino)-4-[(2-methyl)-ethyl]-5-thiazolyl]carbonyl]amino]-3-phenyl-propansäure (96c)

Ausbeute : 89%

$C_{27}H_{25}N_3O_4S$; 487.16 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.77$ min.; **ESI-MS**: m/z 1013.1 (12) $[2M+K^+]$, 997.0 (17) $[2M+Na^+]$, 974.9 (18) $[2M+H^+]$, 510.2 (12) $[M+Na^+]$, 488.2 (100) $[M+H^+]$.

3-[[[2-((2-Phenyl-phenyl)-amino)-4-[(2-methyl)-ethyl]-5-thiazolyl]carbonyl]amino]-3-phenyl-propansäure (96d)

Ausbeute: 84%

$C_{29}H_{27}N_3O_4S$; 513.17 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 23.96$ min.; **ESI-MS**: m/z 1065.1 (10) $[2M+K^+]$, 1049.1 (8) $[2M+Na^+]$, 1026.9 (3) $[2M+H^+]$, 536.2 (10) $[M+Na^+]$, 514.2 (100) $[M+H^+]$.

8.5.2.10 Weitere α 4-Antagonisten

3-[2-[(Isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentylamino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (126)

350 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 17 mit Fmoc-L-Leu-H, AAV 11 und AAV 12 mit Isochinolin-3-carbonsäure, im Anschluß an AAV 15 und HPLC-Reinigung:

Ausbeute: 7%

$C_{26}H_{31}N_3O_3$, 433.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 19.42$ min.; **ESI-MS**: m/z 905.4 (13) $[2M+K^+]$, 889.2 (31) $(2M+Na^+)$, 456.2 (14) $[M+Na^+]$, 434.2 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute: 28%

$C_{26}H_{31}N_3O_3$, 433.24 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 19.45 + 19.61$ min (Diastereomerenmischung)

3-[2-[(*S*)-1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentylamino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (127)

150 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 17 mit Fmoc-L-Leu-H, AAV 11 und AAV 12 mit Fmoc-Tic-OH und AAV 11 im Anschluß an AAV 15 und HPLC-Reinigung:

Ausbeute: 55%

$C_{26}H_{35}N_3O_3$, 437.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 14.68$ min.; **ESI-MS**: m/z 913.4 (13) $[2M+K^+]$, 897.3 (14) $[2M+Na^+]$, 875.1 (4) $[2M+H^+]$, 460.3 (6) $[M+Na^+]$, 438.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[2-(((R)-1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolin-3-carbonyl)-amino)-4-methyl-pentylamino]-3-(4-methylphenyl)-propionsäure (128)

150 mg Fmoc-3-(4-Methyl-phenyl)-3-aminopropionsäure-Wangharz (approx. 0.6 mmol/g) ergab nach AAV 11, AAV 17 mit Fmoc-L-Leu-H, AAV 11 und AAV 12 mit Fmoc-D-Tic-OH und AAV 11 im Anschluß an AAV 15 und HPLC-Reinigung:

Ausbeute a): 26%

$C_{26}H_{35}N_3O_3$, 437.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 15.48$ min.; **ESI-MS**: m/z 913.4 (15) $[2M+K^+]$, 897.3 (13) $[2M+Na^+]$, 875.2 (4) $[2M+H^+]$, 460.3 (6) $[M+Na^+]$, 438.3 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b): 27%

$C_{26}H_{35}N_3O_3$, 437.27 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 15.62$ min.; **ESI-MS**: m/z 913.4 (17) $[2M+K^+]$, 897.3 (11) $[2M+Na^+]$, 875.2 (4) $[2M+H^+]$, 460.3 (7) $[M+Na^+]$, 438.3 (100) $[M+H^+]$.

Die folgenden Verbindungen wurden an mit *N*-Fmoc-3-amino-3-phenyl-propionsäure belegtem Wang-Harz (Belegung: 0.6 mmol/g) durchgeführt. Nach AAV 11 und der Reaktion mit Fmoc-Leu-H nach AVV 17 wurden die bei den einzelnen Verbindungen beschriebenen Reaktionsschritte durchgeführt. Anschließend wurde nach AVV 11 die Isochinolin-3-carbonsäure nach AVV 12 geekuppelt. Nach AVV 15 und HPLC-Reinigung wurden folgende Verbindungen erhalten.

3-[2-[(Isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentyl-methyl-amino]-3-phenyl-propionsäure (122)

Das Harz mit dem immobilisierten sekundären Amin wurde 1 h in DMF gequollen und anschließend mit 23.0 μ L (6 eq.) Methyljodid und 79.6 μ L (7.8 eq.) DIPEA über Nacht bei 40°C geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal gewaschen.

$C_{26}H_{31}N_3O_3$; 433.24

Ausbeute: 77%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 19.14$ min.; **ESI-MS**: m/z 905.4 (2) $[2M+K^+]$, 889.2 (3) $[2M+Na^+]$, 465.2 (4) $[M+Na^+]$, 434.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.94-0.97$ (m, 6H), 1.32-1.42 (m, 1H), 1.68-1.79 (m, 2H), 2.89-3.28 (m, 2H), 2.92 (s, 1.5H), 3.02 (s, 1.5H), 3.35-3.54 (m, 2H), 4.61-4.73 (m, 1H), 4.91-5.02 (m, 1H), 7.49-7.56 (m, 5H), 7.80-7.84 (m, 1H), 7.86-7.91 (m, 1H), 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 9.33 (s, 1H).

3-[2-[(Isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentyl-(2-propinyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure (123)

Das Harz mit dem immobilisiertem sekundären Amin wurde 1 h in DMF gequollen und anschließend mit 90.0 μL (10 eq.) einer 80%igen Lösung von Propargylbromid in Toluol und 132 μL (13 eq.) DIPEA über Nacht bei 70°C geschüttelt. Anschließend wurde das Harz dreimal gewaschen.

$C_{28}H_{31}N_3O_3$; 457.24

Ausbeute: 80%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 20.54$ min.; **ESI-MS**: m/z 953.4 (10) $[2M+K^+]$, 480.2 (10) $[M+Na^+]$, 458.2 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 0.83-0.89$ (m, 6H), 1.21-1.30 (m, 0.5 H), 1.37-1.45 (m, 0.5H), 1.52-1.60 (m, 2H), 2.68-2.92 (m, 2H), 2.95-3.11 (m, 2H), 4.23-4.51 (m, 2H), 7.23-7.39 (m, 5H), 7.78-7.83 (m, 1H), 7.86-7.90 (m, 1H), 8.17-8.21 (m, 1H), 8.24-8.28 (m, 1H), 8.28-8.33 (m, 1H), 8.56 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 8.59-8.72 (m, 1H), 9.38 u. 9.41 (2s, 1H).

3-[2-[(Isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-pentyl-amino]-3-phenyl-propionsäure (124)

Das Harz mit dem immobilisiertem sekundären Amin wurde 1 h in Dichlormethan gequollen und anschließend mit 52.3 g (4 eq.) Di-*t*-butyl-dicarbonat und 53.1 μL (5.2 eq.) DIPEA 2 h bei Raumtemp. behandelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit Dichlormethan gewaschen.

$C_{25}H_{29}N_3O_3$; 419.22 g/mol

Ausbeute: 40%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 18.66$ min.; **ESI-MS**: m/z 877.4 (7) $[2M+K^+]$, 861.2 (8) $[2M+Na^+]$, 442.3 (5) $[M+Na^+]$, 420.3 (100) $[M+H^+]$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.81$ - 0.86 (m, 6H), 1.17-1.80 (m, 1H), 1.43-1.62 (m, 2H), 2.90-3.03 (m, 2H), 3.11-3.23 (m, 2H), 4.42-4.51 (m, 1H), 4.58-4.70 (m, 1H), 7.40-7.54 (m, 5H), 7.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 8.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 9.40 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H).

2-[2-[(Isochinolin-3-carbonyl)-amino]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3-isochinolin-essigsäure (125)

Nach AAV 9 wurden 160 mg TCP-Harz mit Fmoc-(*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin-3-carbonsäure belegt. Nach AAV 11, AAV 12 mit Fmoc-L-Leu-OH, AAV 11 und AAV 12 mit Isochinolin-3-carbonsäure, erhielt man nach AAV 16 und HPLC-Reinigung:

$C_{27}H_{29}N_3O_4$; 459.22 g/mol

Ausbeute: 37%

HPLC (5-100 % in 30 min.) $R_t = 22.18$ min.; **ESI-MS**: m/z 957.4 (71) $[2M+K^+]$, 941.2 (19) $[2M+Na^+]$, 482.2 (22) $[M+Na^+]$, 460.0 (21) $[M+H^+]$, 268.9 (63) $[(M+2K^+)/2]$, 241.0 (100) $[(M+2Na^+)/2]$.

1H -NMR (500 MHz): $\delta = 0.88$ u. 0.92 (2d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.02-1.05 (m, 3H), 1.52-1.73 (m, 3H), 2.28-2.44 (m, 2H), 2.58-2.64 (m, 1H), 2.74 u. 2.86 (2d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 2.97-3.02 und 3.16-3.22 (2m, 1H), 4.20 (d, $J = 18.4$ Hz, 0.5 H), 4.58 (d, $J = 16.3$ Hz, 0.5H), 4.69-4.75 (m, 0.5 H), 4.98 (d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 5.08-5.14 u. 5.16-5.22 (2m, 1H), 5.31-5.37 (m, 0.5 H), 7.14-7.33 (m, 4H), 7.79-7.92 (m, 2H), 8.15-8.28 (m, 2H), 8.55 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 8.82 (d, $J = 8.55$ Hz, 0.5 H), 8.92 (d, $J = 8.09$ Hz, 0.5H), 9.39 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 12.4 (bs, 1H).

8.5.2.11 Biaryle als α 4-Antagonisten – Suzukireaktion an fester Phase

1.00 g Fmoc-3-Amino-3-Phenyl-propionsäure-Wangharz (0.64 mmol/g) wurden nach AAV 11 und AAV 12 mit **115a-c**, mit DMF und Dichlormethan gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Zu jeweils 200 mg Wang-Harz wurde in 5 mL Glasreaktoren 5 eq. Arylboronsäure, 20 mol% Pd(dppf)₂Cl₂, 10 eq. Triethylamin und 3 ml DMF gegeben. Durch das Lösungsmittel wurde 20 min. lang Argon geleitet und anschließend 24 h bei 65°C unter Inertgas erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Harz ausführlich mit DMF und anschließend mit CH₂Cl₂ gewaschen. Anschließend wurden nach AAV 15 und HPLC-Reinigung folgende Verbindungen erhalten:

3-[[2(S)-[4-(4-Fluorphenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 58%

C₂₇H₂₈FNO₄; 449.20 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 26.11 min.; **ESI-MS**: *m/z* 937.3 (66) [2M+K⁺], 921.3 (44) [2M+Na⁺], 899.1 (4) [2M+H⁺], 472.3 (9) [M+Na⁺], 450.2 (100) [M+H⁺].

3-[[2(S)-[3-(4-Fluorphenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 52%

C₂₇H₂₈FNO₄; 449.20 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 26.13 und 26.23 min.; **ESI-MS**: *m/z* 937.4 (45) [2M+K⁺], 921.4 (20) [2M+Na⁺], 472.4 (4) [M+Na⁺], 450.3 (100) [M+H⁺].

3-[[2(S)-[2-(4-Fluorphenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 39%

C₂₇H₂₈FNO₄; 449.20 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 26.24 min.; **ESI-MS**: *m/z* 937.3 (98) [2M+K⁺], 921.4 (32) [2M+Na⁺], 472.4 (16) [M+Na⁺], 450.3 (100) [M+H⁺].

3-[[2(S)-[4-(3-Thienyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 27%

C₂₅H₂₇NO₄S; 437.17 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min.) R_t = 23.31 min.; **ESI-MS**: *m/z* 913.4 (43) [2M+K⁺], 897.4 (24) [2M+Na⁺], 460.5 (12) [M+Na⁺], 438.3 (100) [M+H⁺].

3-[[2(S)-[2-(3-Pyridyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 85%

 $C_{26}H_{28}N_2O_4$; 432.20 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 16.10$ u. 16.29 min.; **ESI-MS**: m/z 903.3 (2) $[2M+K^+]$, 455.3 (3) $[M+Na^+]$, 433.3 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[3-(2-Benzo[b]thiophenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure**

Ausbeute: 26%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 28.48$ u. 28.57 min.; **ESI-MS**: m/z 1013.3 (13) $[2M+K^+]$, 997.2 (10) $[2M+Na^+]$, 975.0 (23) $[2M+H^+]$, 510.4 (2) $[M+Na^+]$, 488.2 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[2-(2-Benzo[b]thiophenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure**

Ausbeute: 24%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 28.50$ min.; **ESI-MS**: m/z 1013.2 (14) $[2M+K^+]$, 997.2 (10) $[2M+Na^+]$, 974.9 (5) $[2M+H^+]$, 510.4 (7) $[M+Na^+]$, 488.2 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[3-(3-Chlorphenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure**

Ausbeute: 17%

 $C_{27}H_{28}ClNO_4$; 465.17 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 27.63$ u. 27.74 min.; **ESI-MS**: m/z 969.3 (14) $[2M+K^+]$, 953.3 (15) $[2M+Na^+]$, 488.4 (3) $[M+Na^+]$, 466.3 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[3-(3-Pyridyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure**

Ausbeute a): 39%

 $C_{26}H_{28}N_2O_4$; 432.20 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 16.18$ min.; **ESI-MS**: m/z 903.4 (3) $[2M+K^+]$, 887.2 (4) $[2M+Na^+]$, 433.3 (100) $[M+H^+]$.

Ausbeute b): 42%

 $C_{26}H_{28}N_2O_4$; 432.20 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 16.98$ min.; **ESI-MS**: m/z 903.3 (3) $[2M+K^+]$, 887.2 (5) $[2M+Na^+]$, 433.3 (100) $[M+H^+]$.

3-[[2(S)-[2-(3-Thienyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute: 23%

 $C_{25}H_{27}NO_4S$; 437.17 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.54$ u. 25.65 min.; **ESI-MS**: m/z 913.2 (38) $[2M+K^+]$, 897.3 (13) $[2M+Na^+]$, 476.3 (5) $[M+K^+]$, 460.3 (13) $[M+Na^+]$, 438.2 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[3-(3-Thienyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure**

ergab nach Abspaltung vom Harz in Gegenwart von Triisopropylsilan (TIPS) nur das Reduktionsprodukt des Thiophens: Ausbeute 29%

3-[[2(S)-[3-[3-(2,3,4,5-Tetrahydrothienyl)]-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure

Ausbeute b): 29%

 $C_{25}H_{31}NO_4S$; 441.17 g/mol**HPLC** (10-90 % in 30 min.) $R_t = 24.93$ min.; **ESI-MS**: m/z 921.3 (18) $[2M+K^+]$, 905.4 (25) $[2M+Na^+]$, 442.2 (100) $[M+H^+]$.**3-[[2(S)-[4-(2-Benzo[b]thiophenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure** $C_{29}H_{29}NO_4S$; 487.18 g/mol

Ausbeute: 11%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 28.64$ min.; **ESI-MS**: m/z 1013.3 (8) $[2M+K^+]$, 997.1 (14) $[2M+Na^+]$, 975.0 (14) $[2M+H^+]$, 510.4 (5) $[M+Na^+]$, 488.3 (100) $[M+H^+]$.Neben dem Reduktionsprodukt **3-[[2(S)-[4-(2-Benzo[b]-2,3-dihydro-thiophenyl)-phenoxy]-4-methyl-1-oxo-pentyl]-amino]-3-phenyl-propionsäure** $C_{29}H_{31}NO_4S$; 489.18 g/mol

Ausbeute: 13%

HPLC (10-90 % in 30 min.) $R_t = 25.72$ min.; **ESI-MS**: m/z 1017.2 (12) $[2M+K^+]$, 1001.1 (10) $[2M+Na^+]$, 979.1 (15) $[2M+H^+]$, 528.4 (10) $[M+K^+]$, 512.2 (6) $[M+Na^+]$, 490.3 (100) $[M+H^+]$.

8.6 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit $\alpha 4$ -Integrin exprimierenden 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^{2+} -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 38C13 β 1- und 38C13 β 7- Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) werden mit FCS (35 mL), Glutamin (5 mL) und β -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.

38C13 β 7-Zellen

B Zell-Lymphom aus der C3H/He Maus, infiziert mit L β 7SN Virus und mit G418 selektiert.

38C13 β 1- und 38C13 β 7-Zellen in Kultur

Täglich wird ca. $\frac{2}{3}$ der Zelllösung 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 μ L, 0.5 μ g/ μ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.3 μ g rhVCAM in 100 μ L PBS pro well). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit MAdCAM-1

Es wird eine *donkey α human* IgG-Stammlösung (48 μ L, 1.3 μ g/ μ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.5 μ g *donkey α human* IgG in 100 μ L PBS pro well). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.. Anschließend wäscht man die Platte mit Adhäsionspuffer (1 x 100 μ L/well) und inkubiert sie 30 min bei RT mit MAdCAM-1 Überstand (je nach Konzentration des MAdCAM-1 Überstands 100-150 μ L/well).

Zellbasierter Adhäsionsassay für $\alpha 4$ -Integrin-exprimierende Zellen

Es wurden folgende Adhäsionsassays durchgeführt: 38C13 β 7-Zellen auf MAdCAM-1 beschichteten Platten, 38C13 β 7-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 μ 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 μ 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. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL).

Durchführung des Adhäsionsassays:

Die Zellsuspension (350 μ L, ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL) wurde mit der entsprechenden Substanz (3.5 μ L aus der Stammlösung, 1 mg/10 μ L DMSO) 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf die Platte aufgetragen (3 x je 100 μ 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 μ L/well) und im Fluorimeter vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel[®].

8.7 Synthese der SPC-Undecapeptid-Fragmente

8.7.1 Synthese der menschlichen und der FFI Undecapeptid-Varianten von SPC

Die Peptide wurden an Tritylchlorid-Harz, welches mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.60 nmmol/g) belegt war, nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Strategie synthetisiert. Es wurden Doppelkupplungen in jedem Kupplungsschritt mit der Fmoc-Aminosäure / 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU) / *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBT) / Diisopropylethylamin (DIPEA) im Verhältnis (3:3:3:7.8 eq.) zweimal 45 min. in *N,N*-Dimethylformamid ausgeführt. Um Racemisierung zu vermeiden, wurde Fmoc-Cys(Trt)-OH unter den folgenden Reaktionsbedingungen gekuppelt: Fmoc-Cys(Trt)-OH / TBTU / HOBT (3:3:3) in 20 % Collidin / *N*-Methylpyrrolidon (NMP). Die N-terminale Formylierung wurde mit 2,4,5-Trichlorphenylformeat (5 eq.) in 20 % Collidin / NMP über 2 h erreicht. Die Abspaltung und Seitenkettenentschützung wurde mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) / Triisopropylsilan (TIPS) / Wasser (90:7:3) in 90 min. durchgeführt, wonach das Harz noch zweimal mit der Abspalllösung gewaschen wurde. Die Filtrate wurden vereint und i. Vak. eingengt. Beide Peptide wurden aus Dioxan lyophilisiert.

Formyl-Gly-Ile-Pro-Cys-Cys-Pro-Val-His-Leu-Lys-Arg-OH (PCCP, menschliches SPC)

Ausbeute: 72%, $M_r = 1249.6$ calcd for $C_{54}H_{91}N_{17}O_{13}S_2$, ESI-MS: $m/z = 1288.5 [M+K]^+$, $1272.6 [M+Na]^+$, $1250.7 [M+H]^+$, $626.2 [M+2H]^{2+}$, $417.9 [M+3H]^{3+}$.

H-Gly-Ile-Pro-Phe-Phe-Pro-Val-His-Leu-Lys-Arg-OH (PFFP, FFI-Variante)

Ausbeute: 55%, $M_r = 1309.70$ calcd for $C_{65}H_{99}N_{17}O_{12}$, ESI-MS: $m/z = 1349.6 [M+K]^+$, $1332.7 [M+Na]^+$, $1310.7 [M+H]^+$, $656.1 [M+2H]^{2+}$, $437.9 [M+3H]^{3+}$.

8.7.2 Synthese des menschlichen palmitoylierten SPC Undecapeptids

Das Peptid wurde an mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH belegtem Wangharz (0.42 mmol/g) nach der Fmoc-Strategie aufgebaut. Es wurden Doppelkupplungen in jedem Kupplungsschritt mit der

Fmoc-Aminosäure / 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TBTU) / *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) / Diisopropylethylamin (DIPEA) im Verhältnis (3:3:3:7.8 eq.) zweimal 45 min. in *N,N*-Dimethylformamid ausgeführt. Um Racemisierung zu vermeiden, wurde Fmoc-Cys(Mmt)-OH unter den folgenden Reaktionsbedingungen gekuppelt: Fmoc-Cys(Mmt)-OH / TBTU / HOBt (3:3:3) in 20 % Collidin / *N*-Methylpyrrolidon (NMP). Die N-terminale Formylierung wurde mit 2,4,5-Trichlorphenylformeat (5 eq.) in 20 % Collidin / NMP über 2 h erreicht. Das Harz wurde danach mit CH₂Cl₂ gewaschen und mit 1% TFA in CH₂Cl₂ (3% TIPS) behandelt (3 min. und 30 min.) um die Mmt-Schutzgruppen zu entfernen. Nachdem das Harz mit CH₂Cl₂ gewaschen worden war, wurde es mit 40 eq. Palmitinsäureanhydrid und 120 eq. Collidin in CH₂Cl₂ mit katalytischen Mengen *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) über 3 h behandelt. Die Abspaltung und Seitenkettenentschützung wurde mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) / Triisopropylsilan (TIPS) / Wasser (90:7:3) in 90 min. durchgeführt, wonach das Harz noch zweimal mit der Abspaltlösung gewaschen wurde. Die Filtrate wurden vereint und i. Vak. eingengt. Beide Peptide wurden aus Dioxan lyophilisiert.

**Formyl-Gly-Ile-Pro-Cys(*S*-Palm)-Cys(*S*-Palm)-Pro-Val-His-Leu-Lys-Arg-OH
(PCCPpalm, palmitoyliertes menschliches SPC)**

Ausbeute: 62%, $M_r = 1726.10$ calcd for C₈₆H₁₅₁N₁₇O₁₅S₂, ESI-MS: $m/z = 1749.0$ [M+Na]⁺, 1727.1 [M+H]⁺, 864.4 [M+2H]²⁺, 576.8 [M+3H]³⁺.

9 Literatur

- [1] D. V. K. C. Nicolaou, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 44.
- [2] J. D. W. F. H. C. Crick, *Proc. Roy. Soc. (London)* **1954**, 80.
- [3] F. Sanger, *Science* **1959**, 1340.
- [4] K. B. Mullis, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1209.
- [5] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 36.
- [6] D. W. Talmage, *Science* **1959**, *129*, 1643.
- [7] S. Tonegawa, *Nature* **1983**, *302*, 575.
- [8] R. Hoffman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3337.
- [9] D. Gottschling, J. Boer, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3007.
- [10] M. F. Beers, A. B. Fisher, *American Journal of Physiology* **1992**, *263*, L151.
- [11] K. Solarin, W.-J. Wang, M. F. Beers, *Pediatric Pathology & Molecular Medicine* **2001**, *20*, 471.
- [12] S. Hawgood, M. Derrick, F. Poulain, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1408*, 150.
- [13] L. A. Creuwels, L. M. van Golde, H. P. Haagsman, *Lung* **1997**, *175*, 1.
- [14] J. Johansson, T. Curstedt, B. Robertson, *Pediatric Pathology & Molecular Medicine* **2001**, *20*, 471.
- [15] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und pharmazeutische Chemiker, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo* **1994**.
- [16] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign, Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford* **1996**.
- [17] D. C. Horwell, W. Howson, D. C. Rees, *Drug Design and Discovery* **1994**, *12*, 63.
- [18] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780.
- [19] D. C. Roberts, F. Vellaccio, E. in Gross, J. M. (Eds.), *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 5, Academic, New York* **1983**, 341.
- [20] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- [21] V. J. Hruby, *Life Sciences* **1982**, *31*, 189.

- [22] D. P. Fairlie, G. Abbenante, D. R. March, *Curr. Med. Chem.* **1995**, *2*, 654.
- [23] A. F. Spatola, i. B. W. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, Marcel Dekker, New York* **1983**, 267.
- [24] R. Hirschmann, *Angew. Chem.* **1991**, *30*, 1278.
- [25] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3870.
- [26] W. P. Walters, A. Murcko, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 384.
- [27] G. A. Sawada, C. L. Barshun, B. S. Lutzke, M. E. Houghten, G. W. Padbury, N. F. H. Ho, T. J. Raub, *Pharm. Exptl. Ther.* **1999**, *288*, 1317.
- [28] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature* **1962**, *194*, 178.
- [29] A. K. Ghose, V. N. Viswanadham, J. J. Wendelowski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55.
- [30] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, *23*, 3.
- [31] O. H. Chan, B. H. Stewart, *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 461.
- [32] M. A. Navia, P. R. Chaturvedi, *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 179.
- [33] G. M. Rishton, *Drug Discov. Today* **1997**, *1997*, 382.
- [34] R. S. Pearlman, K. M. Smith, *Persp. Drug Design Discov.* **1998**, *9*, 339.
- [35] G. W. Bemis, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2887.
- [36] P. J. Hajduk, M. Bures, *J. Comb. Chem.* **2000**, *43*, 3443.
- [37] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615.
- [38] A. Ajay, W. O. Walters, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3314.
- [39] J. Sadowski, H. Kubinyi, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3325.
- [40] A. Dove, *Nature Biotech.* **1999**, *17*, 859.
- [41] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dido, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487.
- [42] R. Frank, W. Heikens, G. Heisterberg-Moutsis, H. Blöcker, *Nucl. Acid. Res.* **1983**, *11*, 4365.
- [43] H. M. Geysen, R. H. Meloan, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3998.

- [44] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84.
- [45] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [46] H. An, P. D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3311.
- [47] C. M. Baldino, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 89.
- [48] R. E. Dolle, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 383.
- [49] D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 125.
- [50] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709.
- [51] M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473.
- [52] A. Ganesan, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2828.
- [53] D. P. Curran, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1174.
- [54] P. M. S. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Amer. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312.
- [55] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 5131.
- [56] R. Frank, S. Güler, S. Krause, W. Lindemaier, *Peptides 1990 (Giralt, E., Andreu, D., Hrsg.) ESCOM, Leiden* **1991**, 151.
- [57] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2000**, *23*, 3815.
- [58] T. Frenzel, W. Solodenko, A. Kirschning, *Solid-Phase Bound Catalysts - Properties and Applications, Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis, Wiley-VCH* **2003**, 201.
- [59] B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2494.
- [60] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292.
- [61] S. Senkan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 322.
- [62] R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045.
- [63] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045.
- [64] C. C. Leznoff, J. Y. Wong, *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 2892.
- [65] F. Camps, J. Castells, M. J. Ferrando, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 1713.
- [66] A. Patchornik, M. A. Kraus, *J. Amer. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 7587.

- [67] K. L. Smith, Z.-F. Tao, S. Hashimoto, C. J. Leitheiser, X. Wu, S. M. Hecht, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1079.
- [68] M. Thutewohl, L. Kissau, L. B. Borianna, I.-M. Karaguni, T. Nowak, M. Bate, J. Kuhlmann, O. Müller, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3768.
- [69] A. G. Myers, A. B. Lanman, *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12969.
- [70] A. G. Hewitt, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13434.
- [71] D. Crich, M. Smith, *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8867.
- [72] X. Wu, M. Grathwohl, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4664.
- [73] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2401.
- [74] M. Smietana, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3856.
- [75] R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature* **2002**, *418*, 658.
- [76] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411.
- [77] M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F. I. Auzanneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3314.
- [78] M. D. Cionnoly, S. B. Park, B. M. Reedy, R. F. Standaert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 951.
- [79] C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 165.
- [80] D. Gottschling, J. Boer, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2997.
- [81] M. E. Pennington, K. S. Lam, A. E. Cress, *Mol. Diversity* **1996**, *2*, 19.
- [82] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906.
- [83] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.*, *4*, 2868.
- [84] E. Rouslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491.
- [85] A. F. Williams, A. N. Barclay, *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, *6*, 381.
- [86] L. A. Lasky, *J. Cell. Biochem.* **1991**, *45*, 139.
- [87] L. A. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964.
- [88] M. Takeichi, *Science* **1991**, *251*, 1451.
- [89] B. Geiger, O. Ayalon, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1992**, *8*, 307.

- [90] 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.
- [91] C. M. Isacke, M. A. Horton, *The Adhesion Molecules Fact Book, 2nd ed.*, Academic Press, London **2000**.
- [92] J. W. Tamkun, D. W. De Simone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, R. O. Hynes, *Cell* **1986**, *46*, 271.
- [93] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549.
- [94] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11.
- [95] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Ann. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453.
- [96] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27.
- [97] T. Weller, L. Alig, M. Beresini, B. Blackburn, S. Bunting, M. H. Hadvary, D. Müller, B. Knopp, B. Levet-Trafit, M. T. Lipari, N. B. Modi, M. Müller, C. J. Refino, M. Schmitt, P. Schonholzer, S. Weiss, B. Steiner, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139.
- [98] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Joneczyk, S. L. Goodman, R. J. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47.
- [99] H. P. Hammes, M. Brownlee, A. Joneczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 529.
- [100] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209.
- [101] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475.
- [102] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050.
- [103] M. A. Horton, *Exp. Nephrol.* **1999**, *7*, 178.
- [104] G. Kilger, B. Holzmann, *J. Mol. Med.* **1995**, *73*, 347.
- [105] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301.
- [106] S. K. Akiyama, E. Hasegawa, T. Hasegawa, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13256.
- [107] E. M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Müller, J. Engel, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7395.
- [108] S. A. Wilcox-Adelman, F. Denhez, P. F. Goetinck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32970.

- [109] A. van der Flier, A. Sonnenberg, *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 285.
- [110] T. Velling, G. Collo, L. Sorokin, M. Durbeej, H. Zhang, D. Gullberg, *Dev. Dyn.* **1996**, *207*, 355.
- [111] C. Vinciguerra, L. C. Bordet, G. Beaune, C. Grenier, M. Dechavanne, C. Negrier, *Platelets* **2001**, *12*, 486.
- [112] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, *Cell* **2000**, *100*, 47.
- [113] M. J. Williams, P. E. Hughes, T. E. O'Toole, M. H. Ginsberg, *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 109.
- [114] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burrridge, *J. Cell. Biol.* **1990**, *111*, 721.
- [115] F. M. Pavalko, S. M. LaRoche, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3795.
- [116] A. F. Horwitz, K. Duggan, C. Buck, M. C. Beckerle, K. Burrridge, *Nature* **1986**, *320*, 531.
- [117] J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339.
- [118] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785.
- [119] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, 121.
- [120] A. J. Reason, A. Dell, H. R. Morris, M. E. Rogers, J. J. Calvete, J. Gonzalez-Rodriguez, *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*, 169.
- [121] T. Kawano, S. Takasaki, T. W. Tao, A. Kobata, *Int. J. Cancer* **1993**, *53*, 91.
- [122] R. K. Pretzlaff, V. W. Xue, M. E. Rowin, *Cell Adhes. Commun.* **2000**, *7*, 491.
- [123] A. C. Semel, E. C. Seales, A. Singhal, E. A. Eklung, K. J. Colley, S. L. Bellis, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32830.
- [124] L. Moss, A. Prakobphol, T. W. Wiedmann, S. J. Fisher, C. H. Damsky, *Glycobiology* **1994**, *4*, 567.
- [125] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction (Ed.: J. A. Eble)*, Springer Verlag, Heidelberg **1997**, 101.
- [126] A. P. Mould, L. A. Wheldon, A. Komoriya, E. A. Wayner, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4020.
- [127] L. Osborn, C. Vassallo, B. G. Browning, R. Tizard, D. O. Haskard, C. D. Benjamin, I. Douglas, T. Kirchhausen, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 601.

- [128] L. B. Klickstein, M. R. York, A. D. Fougerolles, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23920.
- [129] J. P. Xiong, T. Stehle, H. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *296* **2002**.
- [130] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673.
- [131] S. Liu, S. M. Thomas, D. G. Woodside, D. M. Rose, W. B. Kiosses, M. Pfaff, M. H. Ginsberg, *Nature* **1999**, *402*, 676.
- [132] P. E. Hughes, M. Pfaff, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 359.
- [133] B. S. Bochner, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106*, 817.
- [134] M. A. Schwartz, M. D. Schaller, M. H. Ginsberg, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **1995**, *11*, 549.
- [135] C. Liu, J. Takagi, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14642.
- [136] B. Leitinger, N. Hogg, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 614.
- [137] M. J. Humphries, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 29.
- [138] C. K. Miranti, J. S. Brugge, *Nat. Cell. Biol* **2002**, *4*, E83.
- [139] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, *Protein Science* **2002**, *11*, 1800.
- [140] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 470.
- [141] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell* **2002**, *110*, 599.
- [142] M. Shimaoka, J. Takagi, T. A. Springer, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 2002.
- [143] K. M. Yamada, R. Evan, S., *Nat. Cell. Biol* **2002**, *4*, E75.
- [144] A. Woods, J. R. Couchman, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2001**, *13*, 578.
- [145] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, M. P. Sheetz, *J. Cell. Biol.* **2002**, *159*, 695.
- [146] A. Rahman, Y. Tseng, D. Wirtz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 771.
- [147] B. Geiger, A. Bershadsky, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2001**, *13*, 584.
- [148] G. Schulze-Tanzil, D. de Souza, *Histol. Histopathol.* **2001**, *16*, 1081.
- [149] S. P. Palecek, C. E. Schmidt, D. A. Laufenburger, A. F. Horwitz, *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 941.
- [150] T. A. Springer, *Nature* **1990**, *346*, 425.
- [151] E. C. Butcher, L. J. Picker, *Science* **1996**, *272*, 60.

- [152] C. R. Mackay, F. S. Rosen, *New Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1020.
- [153] C. Berlin, R. F. Bargatze, J. J. Campell, U. H. von Andrian, M. C. Szabo, S. R. Hasslen, R. D. Nelson, E. L. Berg, S. L. Eriandson, E. C. Butcher, *Cell* **1995**, *80*, 413.
- [154] B. Johnston, T. B. Issekutz, P. Kubes, *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1995.
- [155] J. J. Campell, E. C. Butcher, *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 336.
- [156] C. M. Parker, C. Pojades, M. B. Brenner, M. E. Hemler, *J. Cell Biol.* **1993**, *268*, 7028.
- [157] 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.
- [158] Y. Taooka, J. Chen, T. Yednock, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1999**, *145*, 413.
- [159] M. E. Hemler, C. Huang, L. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3300.
- [160] D. A. Williams, M. Rios, C. Stephens, V. P. Patel, *Nature* **1991**, *352*, 438.
- [161] T. Papayannopoulou, B. Nakamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9374.
- [162] M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2637.
- [163] M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 1289.
- [164] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, R. Lobb, *Cell* **1989**, *59*, 1203.
- [165] M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, R. Lobb, *Cell* **1990**, *60*, 577.
- [166] M. R. Campanero, R. Pulido, M. A. Ursa, M. Rodriguez-Moya, M. O. D. Landazuri, F. Sanchez-Madrid, *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 2157.
- [167] A. Komoriya, L. J. Green, M. Mervic, S. S. Yamada, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15075.
- [168] E. A. Wayner, N. L. Kovach, *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 489.
- [169] A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, 3579.
- [170] A. P. Mould, M. J. Humphries, *EMBO J.* **1991**, 4089.
- [171] M. E. Renz, H. H. Chiu, S. Jones, J. Fox, K. J. Kim, L. G. Presta, S. Fong, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1395.

- [172] R. H. Vonderheide, T. F. Tedder, T. A. Springer, D. E. Staunton, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 215.
- [173] E. Y. Jones, K. Harlos, Bottomley. M.J., R. C. Robinson, P. C. GDriscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* **1995**, *373*, 539.
- [174] J. H. Wang, R. B. Pepinsky, T. Stehle, J. H. Liu, M. Karpusas, B. G. Browning, L. Osborn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 5714.
- [175] P. S. Aparicio, C. D. Jimenez, *J. Cell. Biol.* **1994**, *126*, 271.
- [176] R. Yabkowitz, V. M. Dixit, N. Guo, D. D. Roberts, Y. Shimizu, *J. Immunol.* **1993**, 149.
- [177] E. Ennis, R. R. Isberg, Y. Shimizu, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 207.
- [178] T. Tarui, A. P. Mazar, D. B. Cines, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3983.
- [179] M. Munoz, J. Serrador, F. Sánchez-Madrid, J. Teixido, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2696.
- [180] M. E. Hemler, C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, L. Strominger, M. L. Clabby, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11478.
- [181] P. D. Kassner, R. Alon, T. A. Springer, M. E. Hemler, **1995**, *6*, 661.
- [182] P.-Y. Chan, A. Aruffo, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24655.
- [183] A. Jakubowski, M. D. Rosa, S. Bixler, R. Lobb, L. C. Burkly, *Cell Adhes. Commun.* **1995**, *3*, 131.
- [184] R. R. Lobb, S. P. Adams, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1999**, *8*, 935.
- [185] C. Chen, J. L. Mobley, O. Dwir, F. Shimron, V. Grabovsky, R. Lobb, Y. Shimizu, R. Alon, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 1084.
- [186] A. J. Pelletier, R. G. Ohye, A. Vanbuskirk, D. D. Sedmak, P. Kincade, R. M. Ferguson, C. G. POrosz, *J. Immunol.* **1992**, *149*, 2473.
- [187] G. E. Rice, M. P. Bevilacqua, *Science* **1989**, *246*, 1303.
- [188] K. Miyake, K. Medina, K. Ishihara, M. Kimoto, R. Auerbach, P. Kincade, *J. Cell. Biol.* **1991**, *114*, 557.
- [189] D. H. Ryan, B. L. Nuccie, C. N. Abboud, J. M. Winslow, *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 995.
- [190] P. J. Simmons, B. Masinovsky, B. M. Longenecker, R. Berenson, B. Torok-Storb, W. M. Gallatin, *Blood* **1992**, *80*, 388.

- [191] G. D. Rosen, J. R. Sanes, R. LaChance, J. M. Cunningham, J. Roman, D. C. Dean, *Cell* **1992**, *69*, 1107.
- [192] D. J. Erle, M. J. Briskin, E. C. Butcher, A. Garcia-Pardo, A. L. Lazarovits, M. Tidswell, *J. Immunol.* **1994**, *153*, 517.
- [193] N. Wagner, J. Lohler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, W. Müller, *Nature* **1996**, *382*, 366.
- [194] D. T. Crowe, H. H. Chiu, S. Fong, I. L. Weissman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14411.
- [195] H. H. Chiu, D. T. Crowe, M. E. Renz, L. G. Presta, S. Jones, I. L. Weissman, S. Fong, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 5257.
- [196] B. M. C. Chan, M. J. Elices, E. Murphy, M. E. Hemler, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8366.
- [197] C. Rüegg, A. A. Postigo, E. E. Sikorski, E. C. Butcher, R. Pytela, D. J. Erle, *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 179.
- [198] G. Kilger, L. A. Needham, P. J. Nielsen, J. Clements, D. Vestweber, B. Holzmann, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 5979.
- [199] R. Lobb, G. Antognetti, R. B. Pepinsky, L. C. Burkly, D. R. Leone, A. Whitty, *Cell Adhes. Commun.* **1995**, *3*, 385.
- [200] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 33.
- [201] J. A. Eble, J. A. in Eble, Kühn, K. (Eds.), *Integrin-Ligand Interactions*, Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, 123.
- [202] A. R. Kornblihtt, K. Umezawa, K. Vibe-Pedersen, F. E. Baralle, *EMBO J.* **1985**, *4*.
- [203] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 375.
- [204] E. A. Wayner, A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald, W. G. Carter, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 1321.
- [205] M. J. Humphries, A. Komoriya, S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6886.
- [206] A. Masumoto, M. E. Hemler, *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 245.
- [207] P. Moy, R. Lobb, R. Tizard, D. Olson, C. Hession, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8835.

- [208] R. B. Pepinsky, C. Hession, L.-L. Chen, P. Moy, L. C. Burkly, A. Jakubowski, E. P. Chow, C. Benjamin, G. Chi-Rosso, S. Luhowskyj, R. Lobb, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17820.
- [209] L. Osborn, C. Vassallo, C. Benjamin, *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 99.
- [210] R. H. Vonderheide, T. A. Springer, *J. Exp. Med.* **1992**, *175*, 1433.
- [211] J. 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.
- [212] 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.
- [213] G. Kilger, J. Clements, B. Holzmann, *Int. Immunol.* **1997**, *9*, 219.
- [214] T. M. Carlos, B. R. Schwartz, N. L. Kovach, E. Yee, M. D. Rosa, L. Osborn, G. Chi-Rosso, B. Newman, R. Lobb, M. Rosso, J. M. Harlan, *Blood* **1990**, *76*, 965.
- [215] B. Masinovsky, D. Urdal, W. M. Gallatin, *J. Immunol.* **1990**, *145*, 2886.
- [216] P. R. Streeter, E. L. Berg, B. T. Rouse, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature* **1988**, *331*, 41.
- [217] M. Nakache, E. L. Berg, P. R. Streeter, E. C. Butcher, *Nature* **1989**, *337*, 179.
- [218] 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.
- [219] M. J. Briskin, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, *Nature* **1993**, *337*, 461.
- [220] S. Arihiro, H. Ohtani, M. Suzuki, M. Murata, C. Ejima, M. Oki, Y. Kinouchi, K. Fukushima, I. Sasaki, S. Nakamura, T. Matsumoto, A. Torii, Toda, G., H. Nagura, *Pathol. Int.* **2002**, *52*, 367.
- [221] C. A. Janeway, P. Travers, *Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag* **1997**.
- [222] A. M. Shyjan, M. Bertagnolli, C. J. Kenney, M. J. Briskin, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 2851.
- [223] M. J. Briskin, L. Rott, E. C. Butcher, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 719.
- [224] 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.
- [225] E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature* **1993**, *366*, 695.

- [226] K. Tan, J. M. Casasnovas, J. H. Liu, M. J. Briskin, T. A. Springer, J. H. Wang, *Structure* **1998**, *6*, 793.
- [227] M. J. Briskin, D. Winsor-Hines, A. M. Shyjan, N. Cochran, S. Bloom, L. Wilson, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, N. Kassam, C. R. Mackay, W. Newman, D. J. Ringler, *Am. J. Pathol.* **1997**, *151*, 97.
- [228] J. Dando, K. W. Wilkinson, S. Ortlepp, D. J. King, R. L. Brady, *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography* **2002**, *D58*, 233.
- [229] K. J. Bayless, G. E. Davis, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13483.
- [230] P. K. Petrow, K. M. Hummel, J. Schedel, J. K. Franz, C. L. Klein, U. Muller-ladner, J. Kriegsmann, P.-L. Chang, C. W. Prince, R. E. Gay, S. Gay, *Arthritis & Rheumatism* **2000**, *43*, 1597.
- [231] H. Ihara, D. T. Denhardt, K. Furuya, T. Yamashita, Y. Muguruma, K. Tsuji, K. A. Hruska, K. Higashio, S. Enomoto, A. Nifuji, S. R. Rittling, M. Noda, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13065.
- [232] I. Nakamura, H. Tanaka, G. A. Rodan, L. T. Doung, *Endocrinology* **1998**, *139*, 5182.
- [233] C. P. Carron, D. M. Meyer, V. W. Engleman, J. G. Rico, P. G. Ruminiski, R. L. Ornberg, W. F. Westlin, G. A. Nickols, *J. Endocrinol.* **2000**, *165*, 587.
- [234] S. Ohshima, H. Kobayashi, N. Yamaguchi, K. Nishioka, M. Umeshita-Sasai, T. Mima, S. Nomura, S. Kon, M. Inobe, T. Uede, Y. Saeki, *Arthritis & Rheumatism* **2002**, *46*, 1094.
- [235] K. Yumoto, M. Ishijima, S. R. Rittling, K. Tsuji, Y. Tsuchiya, S. Kon, A. Nifuji, T. Uede, D. T. Denhardt, M. Noda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4556.
- [236] R. P. Singh, R. Patarca, J. Schwartz, P. Singh, H. Cantor, *J. Exp. Med.* **1990**, *171*, 1931.
- [237] D. T. Denhardt, M. Noda, *J. Cell Biochem.* **1998**, *30-31*, 92.
- [238] D. T. Denhardt, C. M. Giachelli, S. R. Rittling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 723.
- [239] J. Sodek, B. Ganss, M. D. McKee, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2000**, *11*.
- [240] K. J. Bayless, G. A. Meininger, J. M. Scholtz, G. E. Davis, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1165.

- [241] B. T. Wipke, P. M. Allen, *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1601.
- [242] B. P. Leung, S. Culshaw, J. A. Gracie, D. Hunter, C. A. Canetti, C. Campbell, F. Cunha, F. Y. Liew, I. B. McInnes, *J. Immunol.*, *1167*, 2879.
- [243] S. Nakano, T. Ikata, I. Kinoshita, J. Kanematsu, S. Yasuoka, *Clin. Exp. Rheumatol.* **1999**, *17*, 161.
- [244] T. Ohba, Y. Takase, M. Ohara, R. Kasukawa, *J. Rheumatol.* **1996**, *23*, 1505.
- [245] A. Davidson, B. Diamond, *New Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 340.
- [246] D. Y. Jackson, *Curr. Pharmaceutical Design* **2002**, *8*, 1229.
- [247] T. Yednock, C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, N. Karin, *Nature* **1992**, *356*, 63.
- [248] C. N. Bernstein, *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2001**, *11*, 1081.
- [249] M. J. Elices, *Curr. Opin. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Invest. Drugs* **1999**, *1*, 14.
- [250] D. K. Podalski, *New Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 928.
- [251] S. R. Sharar, R. K. Winn, J. M. Harlan, *Springer Semin. Immunopathology* **1995**, *16*, 359.
- [252] J. M. Drazen, E. Israel, P. M. O'Byrne, *New Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 197.
- [253] J. R. Vane, Y. S. Bakhle, R. M. Botting, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 97.
- [254] M. Feldmann, P. Charles, P. Taylor, R. N. Maini, *Springer Semin. Immunopathol.* **1998**, *20*, 211.
- [255] J. R. O'Dell, *New Engl. J. Med.* **1999**, *240*, 310.
- [256] P. A. J. Hendricks, F. P. Nijkamp, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *344*, 1.
- [257] Y.-W. Huang, R. Baluna, E. S. Visetta, *Histol. Histopathol.* **1997**, *12*, 467.
- [258] G. T. Bolger, *Current Opinion in Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs* **2000**, *2*, 108.
- [259] D. M. Rose, A. Pozzi, R. Zent, *Emerging Therapeutic Targets* **2000**, *4*, 397.
- [260] I. Sircar, K. S. Gudmundsson, R. Martin, J. Liang, S. Nomura, H. Jayakumar, B. R. Teegarden, D. M. Nowlin, P. M. Cardarelli, J. R. Mah, S. Connell, R. C. Griffith, E. Lazarides, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2051.
- [261] R. S. Blumberg, L. J. Saubermann, W. Strober, *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, *11*, 648.

- [262] C. Fiocchi, *Gastroenterology* **1998**, *115B*, 182.
- [263] 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.
- [264] D. Picarella, P. Hurlbut, J. Rottman, X. Shi, E. C. Butcher, D. J. Ringler, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 2099.
- [265] B. Holzmann, U. Gosslar, M. Bittner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *231*, 125.
- [266] S. T. Pals, P. Drillenburg, B. Dragosics, A. I. Lazarovits, T. Radaszkiewicz, *Gastroenterology* **1994**, *107*, 1519.
- [267] P. Drillenburg, R. van der Voort, G. Koopman, B. Dragosics, K. van Krieken, P., J. Meenan, A. I. Lazarovits, T. Radaszkiewicz, S. T. Pals, *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 919.
- [268] R. Kellersmann, A. Lazarovits, D. Grant, B. Garcia, B. Chan, A. Kellersmann, H. Wang, A. Jevnikar, N. Wagner, W. Mueller, K. Ulrichs, A. Thiede, R. Zhong, *Transplantation* **2002**, *74*, 1327.
- [269] S. Laberge, H. Rabb, T. B. Issekutz, J. G. Martin, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *151*, 822.
- [270] F. Powrie, M. W. Leach, *Ther. Immunol.* **1995**, *2*, 115.
- [271] A. G. Arroyo, J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Immunity* **1999**, *11*, 555.
- [272] R. A. J. Oostendorp, G. Reisbach, E. Spitzer, K. Thalmeier, H. Dieneman, H. Mergenthaler, *Brit. J. Haematology* **1995**, *91*, 275.
- [273] A. G. Arroyo, J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Cell* **1996**, *85*, 997.
- [274] K.-C. -. Lin, A. C. Castro, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 453.
- [275] B. S. Bochner, F. W. Luscinskas, M. A. m. Gimbrone, B. Newman, S. A. Sterbinsky, C. P. Derse-Anthony, D. Klunk, R. P. Schleimer, *L. Exp. Med.* **1991**, *173*, 1553.
- [276] P. Vanderslice, K. Ren, J. K. Reville, D. C. Kim, D. Scott, R. J. Bjercke, E. T. Yeh, T. P. Kogan, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1710.
- [277] 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.

- [278] W. M. Abraham, A. Ahmed, M. W. Sielczak, M. Narita, T. Arrhenius, M. J. Elices, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, 156.
- [279] 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, *PCT Int. Appl.*, *WO9200995* **1997**.
- [280] D. M. Nowlin, F. Gorcsan, M. Moscinski, S. L. Chiang, T. J. Lobl, P. M. Cardarelli, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 20352.
- [281] D. 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. E. Renz, S. Jones, S. Fong, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3359.
- [282] A. J. Souers, A. A. Virgilio, S. S. Schurer, J. A. Ellman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2297.
- [283] W. K. e. a. Hagmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2709.
- [284] V. Wehner, H. Blum, M. Kurz, H. U. Stilz, *Synthesis* **2002**, 14, 2023.
- [285] J. W. Tilley, G. Kaplan, K. Rowan, V. Schwinge, B. Wolitzky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1.
- [286] A. Neurosciences, *PCT Int. Appl.*, *WO 9906391* **1999**.
- [287] G. Van Assche, P. Rutgeerts, *Inflammatory Bowel Disease* **2002**, 8, 291.
- [288] S. e. a. Ghosh, *New Engl. J. Med.*, 348, 24.
- [289] U. H. von Adrian, C. R. Mackay, *New Engl. J. Med.* **2000**, 343, 1020.
- [290] J. W. Tilley, A. Sidduri, *Drugs of the Future* **2001**, 26, 985.
- [291] D. Jackson, *Curr. Pharmaceutical Design* **2002**, 8, 1229.
- [292] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374.
- [293] C. Riemer, *Dissertation, Technische Universität München* **1999**.
- [294] M. Kurz, *Dissertation, Technische Universität München* **1991**.
- [295] H. Matter, H. Kessler, *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3347.
- [296] M. Gurrath, G. Mueller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 911.
- [297] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2586.

- [298] E. Locardi, J. Boer, A. Modlinger, M. Semmrich, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *submitted*.
- [299] D. Gottschling, J. Boer, L. Marinelli, G. Voll, M. Haupt, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 575.
- [300] 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.
- [301] P. R. Geiger.
- [302] M. W. Holladay, F. G. Salituro, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **1987**, 374.
- [303] R. G. Almquist, J. Crase, Jennings-White, R. F. Meyer, M. L. Hoefle, R. D. Smith, A. D. Essenburg, H. R. Kaplan, *J. Med. Chem.* **1982**, 1292.
- [304] R. G. Almquist, W. R. Chao, A. K. Judd, C. Mitoma, D. J. Rossi, R. E. Panasevich, R. J. Matthews, *J. Med. Chem.* **1988**, 561.
- [305] H. G. O. u. a. Becker, *Organikum - Organisch chemisches Grundpraktikum* **1996**, *20 ed.*, Heidelberg, Leipzig.
- [306] W. J. A. C. S. Radionow, *51*, 847, *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 847.
- [307] S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron Asymmetry* **1991**, *2*, 183.
- [308] A. Bianco, P. Passacantilli, G. Righi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1405.
- [309] C.-Y. Chen, P. Dagneau, E. J. J. Grabowski, R. Oballa, P. O'Shea, P. Prasit, J. Robichaud, R. Tillyer, X. Wang, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2633.
- [310] J. D. Park, D. H. Kim, *45* **2002**, *4*, 911.
- [311] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Science* **1987**, *235*, 569.
- [312] R. Kuhn, E. F. Möller, G. Wendt, H. Beinert, *Ber.* **1942**, *75*, 711.
- [313] I. M. Klotz, R. T. Morrison, *J. Amer. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 473.
- [314] J. G. Allen, F. R. Atherton, M. J. Hall, C. H. Hassall, S. W. Holmes, R. W. Lambert, L. J. Nisbet, P. S. Ringrose, *Nature* **1978**, *272*, 56.
- [315] E. K. Baylis, C. D. Campbell, J. G. Dingwall, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1984**, *1*, 2845.
- [316] B. Badet, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1333.
- [317] C. H. Hassall, *Actual Chim. Ther.* **1985**, *12*, 193.
- [318] J. V. Uri, C. M. Bendas, N. Burdash, *Acta Microbiol. Hung.* **1988**, *35*, 221.
- [319] E. W. Logusch, D. M. Walker, J. F. McDonald, J. E. Franz, C. L. Villafranca, C. L. Di Janni, J. A. Colanduoni, B. Li, J. B. Schineller, *Biochemistry* **1990**, *29*, 366.

- [320] R. Shankar, A. I. Scott, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 231.
- [321] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Biochemistry* **1983**, 22, 4618.
- [322] S. A. Berhard, L. E. Orgel, *Science* **1959**, 130, 625.
- [323] J. C. Powers, S. Otake, J. Oleksyszyn, H. Hori, T. Ueda, B. Boduszek, C.-M. Kam, *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*, Birkhäuser Verlag Basel, 3-18. **1983**, 3.
- [324] M. C. Allen, W. Fuhrer, B. Tuck, R. Wade, J. M. Wood, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1652.
- [325] J. Oleksyszyn, J. C. Powers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 161, 143.
- [326] J. Oleksyszyn, J. C. Powers, *Biochemistry* **1991**, 30, 485.
- [327] J. F. Dellaria, R. G. KMaki, H. H. Stein, J. Cohan, D. Whittern, K. Marsh, D. J. Hoffman, J. J. Plattner, T. J. Perun, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 534.
- [328] A. Peyman, K.-H. Budt, J. Spanig, D. Ruppert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 321, 1720.
- [329] B. Stowasser, K.-H. Budt, L. Jian-Qi, A. Peyman, D. Ruppert, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6625.
- [330] R. T. Wester, R. J. Chambers, M. D. Green, W. R. Murphy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 2005.
- [331] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 2588.
- [332] M. Tao, R. Bihovsky, G. J. Wells, J. P. Mallamo, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3912.
- [333] D. G. Cameron, H. R. Hudson, M. Pianka, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **1993**, 51-52, 391.
- [334] D. G. Cameron, H. R. Hudson, M. Pianka, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **1993**, 83, 21.
- [335] H. R. Hudson, M. Pianka, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **1996**, 109-110, 345.
- [336] J. M. Varlet, N. Collingnon, P. Savignac, *Tetrahedron* **1981**, 37, 3713.
- [337] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, New York **1993**.
- [338] P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3443.
- [339] N. Miyaura, K. Yamada, A. Susuki, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3437.
- [340] N. Miyaura, A. Susuki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866.

- [341] N. Miyaura, T. Yano, A. Susuki, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 2865.
- [342] W. Shen, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5575.
- [343] A. F. Littke, G. C. Fu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3387.
- [344] K. Inada, N. Miyaura, *Tetrahedron* **2000**, 56, 8657.
- [345] C. R. LeBlond, A. T. Andrews, Y. Sun, J. R. Sowa, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1555.
- [346] K. Inada, N. Miyaura, *Tetrahedron* **2000**, 56, 8661.
- [347] A. F. Indolese, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3513.
- [348] S. Saito, S. Oh-tani, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8024.
- [349] R. Frenette, R. W. Friesn, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9177.
- [350] M. Larhed, G. Lindberg, A. Hallberg, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8219.
- [351] M. E. Fraley, R. S. Rubino, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3365.
- [352] B. Ruhland, A. Bumbrun, M. A. Gallop, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7820.
- [353] N. Miyaura, K. Yamada, H. Suginome, A. Suzuki, *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, 107, 972.
- [354] A. R. Martin, Y. Yang, *Acta Chem. Scand.* **1993**, 47, 221.
- [355] G. B. Smith, G. C. Dezeny, D. L. Hughes, A. O. King, T. R. Verhoeven, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 8151.
- [356] M. Szelke, B. Leckie, A. Hallett, D. M. Jones, J. Sueiras, B. Atrash, A. F. Lever, *Nature* **1982**, 299, 555.
- [357] R. R. Gardner, G.-B. Liang, S. H. Gellman, *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3280.
- [358] P. Wipf, T. C. Henninger, S. J. Geib, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6088.
- [359] M. M. Vasbinder, E. R. Jarvo, S. J. Miller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2824.
- [360] R. R. Gardner, G.-B. Liang, S. H. Gellman, *J. Amer. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1806.
- [361] K. M. Bol, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron* **1992**, 48, 6425.
- [362] C. J. Andres, T. L. Macdonald, T. D. Ocain, D. J. Longhi, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6609.
- [363] A. C. Bohnstedt, J. V. N. V. Prasad, D. H. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5217.

- [364] L. G. Boros, B. De Conte, R. H. Gimi, J. T. Welch, Y. Wu, R. E. Handschuhmacher, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6033.
- [365] S. A. Hart, M. Sabat, F. A. Etkorn, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7580.
- [366] S. A. Hart, C. O. Trindle, F. A. Etkorn, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1789.
- [367] M. T. Cox, D. W. Heaton, J. Horbury, *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* **1980**, 799.
- [368] M. M. Hann, P. G. Sammes, *J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 307.
- [369] R. L. Johnson, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1351.
- [370] A. Spaltenstein, P. A. Carpino, F. M. Miyake, P. B. Hopkins, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 2095.
- [371] A. Spaltenstein, P. A. Carpino, F. M. Miyake, P. B. Hopkins, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3759.
- [372] 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.
- [373] C. Chen, J. L. Mobley, O. Dwir, F. Shimron, V. Grabovsky, R. R. Lobb, R. Shimizu, *J. Immunol.* **1999**, 162, 1084.
- [374] K.-C. Lin, H. S. Ateeq, 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.
- [375] M. E. Avery, J. Mead, *Am. J. Dis. Child.* **1959**, 97, 917.
- [376] B. Robertson, L. M. G. van Golde, J. J. E. Batenburg, *Pulmonary Surfactant, From Molecular Biology to Clinical Practice, Elsevier, Amsterdam* **1992**.
- [377] J. Johannson, T. Curstedt, B. Robertson, *Eur. Respir. J.* **1994**, 7, 372.
- [378] A. H. Jobe, *Biol. Neonate.* **1998**.
- [379] D. L. Shapiro, R. H. Notter, *Surfactant replacement therapie, Alan R. Liss: New York* **1989**.
- [380] B. Robertson, H. L. Halliday, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1408, 346.
- [381] S. E. Wert, S. A. Profitt, J. A. Whitsett, L. M. Noguee, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **1998**, 157, A698.
- [382] L. M. Noguee, A. E. Dunbar, S. E. Wert, F. Askin, A. Hamvas, J. A. Whitsett, *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 573.
- [383] C. E. M. S. Group, *Pediatrics* **1988**, 82, 683.

- [384] S. B. Hall, A. R. Venkitaraman, J. A. Whitsett, B. A. Holm, R. H. Notter, *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *145*, 24.
- [385] B. Robertson, H. W. Taeusch, eds., *Surfactant therapie for lung disease*, New York: Marcel Dekker **1995**.
- [386] T. Curstedt, H. Jörnvall, B. Robertson, T. Bergman, P. Berggren, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 255.
- [387] S. Hawgood, B. J. Benson, J. Schilling, D. Damm, J. A. Clements, R. T. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 66.
- [388] G. A. Simatos, K. B. Forward, M. R. Morrow, K. M. W. Keough, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5807.
- [389] M. A. Oosterlaken-Dijksterhuis, H. P. Haagsman, L. M. G. van Golde, R. A. Demel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8276.
- [390] M. A. Oosterlaken-Dijksterhuis, H. P. Haagsman, L. M. G. Van Golde, R. A. Demel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10965.
- [391] A. D. Horowitz, B. Elledge, J. A. Whitsett, J. E. Baatz, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1107*, 44.
- [392] T. E. Weaver, J. A. Whitsett, *Biochem. J.* **1991**, *273*, 249.
- [393] L. M. G. van Golde, J. J. Batenburg, B. Robertson, *News Physiol Sci.* **1994**, *9*, 13.
- [394] H. L. Halliday, *Drugs* **1996**, *51*, 226.
- [395] E. J. Veldhuizen, A. J. Waring, F. J. Walther, J. J. Batenburg, L. M. G. van Golde, H. P. Haagsman, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 377.
- [396] C. G. Cochrane, S. D. Revak, *Science* **1991**, *254*, 566.
- [397] M. L. Longo, A. M. Bisango, J. A. N. Zasadzinski, R. Bruni, A. J. Waring, *Science* **1993**, *261*, 453.
- [398] G. Vandenbussche, J. Johannson, T. Clercx, T. Curstedt, Ruyschaert, *Interface Between Chemistry and Biochemistry*, H. Jörnvall, Jolles, P. (Eds.), Birkhäuser, Basel **1995**, 27.
- [399] T. Szyperski, G. Vandenbussche, T. Curstedt, J.-M. Ruyschaert, K. Wüthrich, J. Johannson, *Protein Science* **1998**, *7*, 2533.
- [400] B. Luy, *in preparation* **2003**.

- [401] K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, N. Koch, S. Koutsogianni, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *47*, 148.
- [402] J. Eichler, A. W. Lucka, R. A. Houghten, *Pept. Res.* **1994**, *7*, 300.
- [403] C. Kellenberger, H. Hietter, B. Luu, *Pept. Res.* **1995**, *8*, 321.
- [404] M. Gustafsson, T. Curstedt, H. Jörnvall, J. Johansson, *Biochem. J.* **1997**, *326*, 799.
- [405] K. Alexandropoulos, G. Cheng, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3110.
- [406] D. Bar-Sagi, D. Rotin, A. Batzer, V. Mandiyan, J. Schlessinger, *Cell* **1993**, *74*, 83.
- [407] G. B. Cohen, R. Ren, D. Baltimore, *Cell* **1995**, *80*, 237.
- [408] P. P. DiFiore, P. G. Pelicci, A. Sorokin, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 411.
- [409] B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *FASEB J.* **2000**, *14*, 231.
- [410] C. Koch, D. Anderson, M. Moran, C. Ellis, T. Pawson, *Science* **1991**, *252*, 668.
- [411] T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997**, *278*, 2075.
- [412] G. W. Reuther, A. M. Pendergast, *Vitam. Horm.* **1996**, *52*, 149.
- [413] M. Sudol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, *65*, 113.
- [414] K. Altendorf, W. Epstein, *Biomembranes*, JAI Press Inc., London, England. **1996**, *5*, 403.
- [415] K. Altendorf, A. Siebers, W. Epstein, A. N. Y., *Acad. Sci.* **1992**, *671*, 228.
- [416] A. Siebers, K. Altendorf, *CRC-Press, Boca Raton, USA* **1993**, 225.
- [417] J. V. Møller, B. Juul, M. le Maire, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 1.
- [418] K. A. Taylor, L. Dux, A. Martonosi, J., *J. Mol. Bio* **1986**, *187*, 417.
- [419] R. Serrano, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *947*, 1.
- [420] C. Toyoshima, M. Nabasako, H. Nomura, H. Ogawa, *Nature* **2000**, *405*, 647.
- [421] K. B. Axelsen, M. G. Palmgren, *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 84.
- [422] E. T. Buurmann, K. T. Kim, W. Epstein, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6678.
- [423] L. Y. Jan, Y. N. Jan, *Nature* **1994**, *371*, 119.
- [424] S. R. Durell, E. P. Bakker, H. R. Guy, *Biophys J.* **2000**, *78*, 188.
- [425] M. Gabel, A. Siebers, W. Epstein, K. Altendorf, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1415*, 77.
- [426] M. Gabel, K. Altendorf, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1772.

- [427] K. Altendorf, M. Gabel, W. Puppe, T. Möllenkamp, A. Zeeck, C. Boddien, K. Fendler, E. Bamberg, S. Dröse, *Acta Physiol. Scand.* **1998**, *163*, 137.
- [428] M. Gabel, T. Möllenkamp, T. Puppe, K. Altendorf, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37901.
- [429] R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [430] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243.
- [431] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678.
- [432] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 125.
- [433] M. Beyermann, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3745.
- [434] V. Krchnak, Z. Flegelova, J. Vagner, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 450.
- [435] J. P. Tam, Y.-A. Lu, *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058.
- [436] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
- [437] J. H. Adams, R. M. Cook, D. Hudson, V. Jammalamadaka, M. H. Lyttle, M. F. Songster, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3706.
- [438] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1181.
- [439] M. Zeppezauer, S. Rawer, R. Hoffmann, A. Schoenberger, W. Rapp, E. Bayer, *Pept. 1990, Proc. Eur. Pept. Symp., 21st* **1991**, 847.
- [440] L. Zhang, W. Rapp, E. Bayer, *Pept. 1990 Proc. Eur. Pept. Symp., 21st* **1991**, 196.
- [441] E. Bayer, N. Clausen, C. Goldammer, R. Henkel, W. Rapp, L. Zhang, *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, ed. R. S. Hodges and J. A. Smith, ESCOM, Leiden **1994**, 40.
- [442] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077.
- [443] J. T. Varkey, V. N. R. Pillai, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 577.
- [444] L. M. Varanda, M. T. M. Miranda, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 102.
- [445] A. Thaler, D. Seebach, F. Cardinaux, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 628.
- [446] J. Vagner, P. Kocna, V. Krchnak, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 284.
- [447] A. M. Bray, L. M. Lagniton, R. M. Valerio, N. J. Maeji, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9079.
- [448] D. R. Englebretsen, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8431.

- [449] C. T. Choma, G. T. Robillard, D. R. Englebretsen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2417.
- [450] B. D. Larsen, A. Holm, *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 470.
- [451] M. Narita, N. Ohkawa, S. Nagasawa, S. Isokawa, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *24*, 129.
- [452] R. C. d. L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6039.
- [453] S. C. F. Milton, R. C. d. L. Milton, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 193.
- [454] A. Steinschneider, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 49.
- [455] K. Barlos, D. Gatos, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, *51*, 266.
- [456] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *49*, 11065.
- [457] F. Rabanal, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1449.
- [458] Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Inui, J. Bódi, T. Kimura, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 84.
- [459] D. Gatos, P. Athanassopoulos, C. Tzavara, K. Barlos, *Pept. 1998, Proc. Eur. Pept. Symp., 25th* **1999**, 146.
- [460] B. Riniker, A. Flörsheimer, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9307.
- [461] P. Athanassopoulos, K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, C. Tzavara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5645.
- [462] H. Kuroda, Y.-N. Chen, T. Kimura, S. Sakakibara, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 294.
- [463] N. Nishino, H. Mihara, Y. Makinose, T. Fujimoto, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7007.
- [464] Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Inui, J. Bodi, F. I. Tsuji, T. Kimura, S. Sakakibara, *Pept. 1998, Proc. Eur. Pept. Symp., 25th* **1999**, 36.
- [465] J. P. Tam, Q. Yu, Z. Miao, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, *51*, 311.
- [466] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 217.
- [467] T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 369.
- [468] T. Johnson, M. Quibell, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 463.
- [469] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589.
- [470] T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3847.

- [471] T. Johnson, M. Quibell, R. C. Sheppard, *J. Pept. Sci.* **1995**, *49*, 273.
- [472] E. Nicolas, M. Pujades, J. Bacardit, E. Girald, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2317.
- [473] W. Zeng, P.-O. Regamey, K. Rose, Y. Wang, E. Bayer, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 273.
- [474] C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 431.
- [475] A. B. Clippingdale, M. Macris, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 665.
- [476] R. B. Simmonds, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 36.
- [477] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1745.
- [478] M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656.
- [479] E. Olivera, L. P. Miranda, F. Albericio, D. Andreu, A. C. M. Paiva, C. R. Nakaie, M. Tominga, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 300.
- [480] W. R. Sampson, H. Patsiouras, N. J. Ede, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 403.
- [481] J. Howe, M. Quibell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3997.
- [482] L. P. Miranda, W. D. F. Meutermans, M. L. Smythe, P. F. Alewood, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5460.
- [483] P. Dumy, M. Keller, D. E. Ryan, B. Rohwedder, T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 918.
- [484] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218.
- [485] R. C. Sheppard, *Peptides 1971 (Nesvadba, H. ed.)* **1972**, 111.
- [486] S. B. H. Kent, *Peptides, Structure and Function (Deber, C.M., Hruby, V.J., Kopple, K.D. eds.)* **1985**, 407.
- [487] A. M. Murphy, J. Dagnino, R., P. L. Vallar, A. J. Trippe, S. L. Sherman, R. H. Lumpkin, S. Y. Tamura, T. R. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3156.
- [488] J. A. Fehrentz, M. Paris, A. Heitz, J. Velek, C.-F. Liu, F. Winternitz, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7871.
- [489] J. A. Fehrentz, M. Paris, A. Heitz, J. Velek, F. Winternitz, J. Martinez, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6792.
- [490] T. Q. Dinh, R. W. Armstrong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1161.

- [491] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815.
- [492] N. J. Ede, A. M. Brag, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7119.
- [493] M. J. Aurell, C. Biox, M. L. Ceita, C. Llopis, A. Tortajada, R. Mestres, *J. Chem. Res.* **1995**, 2569.
- [494] D. Lelièvre, H. Chabane, A. Delmas, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9675.
- [495] D. Lelièvre, O. Turpin, S. E. Kazzouli, A. Delmas, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5525.
- [496] S. Sakakibara, *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, 51, 279.
- [497] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, 27, 21.
- [498] P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **1984**, 19, 71.
- [499] C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. C. Haug, *J. Peptide Protein Res.* **1980**, 15, 59.
- [500] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2351.
- [501] M. A. Blaskovich, G. A. Lajoie, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5021.
- [502] B. Blankemeyer.Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1701.
- [503] V. Krchnak, A. S. Weichsel, Cabel. D., Z. Flegelova, M. Lebl, *Mol. Diversity* **1995**, 1, 149.