

Max-Planck-Institut für Biochemie

**Synthese von TMC-95A-verwandten
Strukturklassen als Proteasominhibitoren**

Markus Kaiser

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. L. Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Bach
3. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 22. 01. 2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13. 03. 2003 ange-
nommen.

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Januar 2003 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Prof. Dr. Luis Moroder angefertigt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Luis Moroder, der mir diese sehr vielfältige und abwechslungsreiche Aufgabe gestellt hat und bei der Durchführung immer hilfsbereit zur Seite stand. Durch sein fortwährendes Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft an meiner Arbeit gab er mir wichtige Impulse, liess mir jedoch auch immer den nötigen Freiraum zur selbstständigen Umsetzung meiner Ideen.

Mein weiterer Dank gilt:

Dr. Michael Groll und Prof. Dr. Robert Huber danke ich für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit und das stete Interesse an meiner Arbeit. Ihrer Einsatzbereitschaft und Enthusiasmus verdanke ich viele wichtige Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

Eva Zauner, Dr. Irmgard Assfalg-Machleidt und Prof. Dr. Werner Machleidt danke ich für die Etablierung und Durchführung des Proteasomassays und ihrer Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Aus der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie danke ich Dr. Christian Renner und Alexander G. Milbradt für die Aufnahme der NMR-Spektren und dem Modeling der Strukturen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie für die freundliche Aufnahme und angenehme Atmosphäre in den letzten drei Jahren.

Meinem Laborpartner Hans-Jürgen Musiol für die stete Hilfsbereitschaft und seinem ausgeglichenen, humorvollen Wesen. Er liess mich an seinem immensen Wissen – das nicht nur auf die Chemie beschränkt ist – teilhaben. Seine Fähigkeit, zu jeder noch so absurden Idee innerhalb von 10 Minuten eine geeignete Publikation zu finden, ist legendär.

Dirk Barth danke ich für unsere gemeinsame Zeit nicht nur in München, sondern auch in Tübingen und Frankfurt. Die abendlichen Feiern in unserer WG bleiben unerreicht und unvergessen.

Des weiteren danke ich Mr. Ironie Markus M. Müller für seinen bisweilen tiefschwarzen Humor und Markus Schütt für die Erfindung meines Spitznamens und die tägliche Reportage über das Fernsehprogramm von RTL2. Dr. Norbert Schaschke für seine kollegiale Art, seiner Hilfsbereitschaft nicht nur in Fragen der Chemie und der entspannenden Kaffeerunde. José Pfizer und Dr. Alina Ariosa-Alvarez danke ich für die Einführung in die spanische bzw. kubanische Kultur und Lebensweise; demgegenüber bedanke ich mich auch bei dem italienischen „Block“ um Dr. Stella Fiori, Dr. Carlo Siciliano, Marina Rubini und im besonderen Dr. Ferdinando Fiorino, dem Mann aus dem „southern part of Italy“, die versucht haben, einen guten Italiener aus mir zu machen. Dr. Cyril Boulegue für die Vorbereitung auf das Leben in Frankreich und Frank Freudenmann für die Nachbearbeitung meines Lebens im Ländle. Weiterhin danke ich in unserem Multi-Kulti-Labor Silva Andric für die jugoslawische, Tabby Pal für die indische, Dr. Christian Renner für die physikalische und Alexander G. Milbradt für die Einführung in die exotische, sächsische Sicht des Lebens.

Lissy Weyher-Stingl für die Aufnahme der Massenspektren und der herzlichen Aufnahme in ihrem Labor.

Barbara Saccà danke ich für ihre bezaubernde Art und ihre Fähigkeit, in jeder Situation die richtigen Worte zu finden.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir immer helfend zur Seite standen und mich in jeder Situation des Lebens unterstützen.

Publikationsliste:

- 1) **M. Kaiser**, M. Groll, C. Renner, R. Huber, L. Moroder: *The Core Structure of TMC-95A is a Promising Lead for Reversible Proteasome Inhibition* (2002) *Angew. Chem.* 114, 817-820; *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 780-783.
- 2) A. E. Ashcroft, A. Brinker, J. E. Coyle, F. Weber, **M. Kaiser**, L. Moroder, M. R. Parsons, J. Jager, U. F. Hartl, M. Hayer-Hartl, S. E. Radford: *Structural Plasticity and Non-Covalent Substrate Binding in the GroEL Apical Domain: A Study using Electrospray Ionisation Mass Spectrometry and Fluorescence Binding Studies* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 33115-33126.
- 3) J.-S. Kim, M. Groll, H.-J. Musiol, R. Behrendt, **M. Kaiser**, L. Moroder, R. Huber, H. Brandstetter: *Navigation Inside a Protease: Substrate Selection and Product Exit in the Tricorn Protease from Thermoplasma acidophilum* (2003) *J. Mol. Biol.*, im Druck.
- 4) **M. Kaiser**, A. G. Milbradt, L. Moroder: *Synthesis of TMC-95A Analogues. Structure-based prediction of cyclization propensities of linear precursors* (2003) *Lett. Pept. Sci.*, im Druck.

Patente:

- 1) M. Groll, **M. Kaiser**, R. Huber, L. Moroder, C. Renner, J. Kohno: *Crystals of a Proteasome-Inhibitor Complex* (2002) WO02081501.

Preise:

- 1) Bert L. Schram Award (2002) 27th European Peptide Symposium, Sorrento, Italien.

Abkürzungen

AA	Aminosäure
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AIBN	α,α' -Azo-isobutyronitril
amu	atomic mass unit
aq.	wässrig
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CL	Chymotrypsin-like
DCM	Dichlormethan
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
dppf	1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen
EDCI	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
FDPP	Pentafluorophenylphosphinat
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
NBS	N-Bromsuccinimid
NMP	N-Methylpyrrolidin
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect

OTf	Triflat
PGPH	Peptidyl-glutamyl-Peptidhydrolase
PLP	Pyridoxalphosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilyl
TIS	Triisopropylsilan
TL	Trypsin-like
Ts	Tosyl
Z	Benzyloxycarbonyl
Z-OSu	N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS PROTEASOM	3
1.1.1	<i>Das Ubiquitin-Proteasom-System</i>	3
1.1.2	<i>Das 26S-Proteasom</i>	7
1.1.3	<i>Das 20S-Proteasom</i>	9
1.2	INHIBITOREN DES PROTEASOMS	16
1.2.1	<i>Peptidaldehyde, α-Ketoaldehyde und α-Ketoamide</i>	16
1.2.2	<i>Vinylsulfone</i>	17
1.2.3	<i>Peptidboronsäuren</i>	18
1.2.4	<i>Peptide mit 5-Methoxy-1-indanon-Kopfgruppe</i>	19
1.2.6	<i>α', β'-Epoxyketone</i>	20
1.2.7	<i>Bifunktionelle und bivalente Inhibitoren</i>	22
1.2.8	<i>Neue Naturstoffinhibitoren</i>	23
1.2.9	<i>Das Proteasom als Sekundärtarget bekannter Wirkstoffe</i>	24
1.2.10	<i>Die Familie der TMC-95-Inhibitoren</i>	25
1.3	TMC-95A ALS REVERSIBLER, NICHT-KOVALENTER INHIBITOR	26
1.3.1	<i>Ansätze zur Synthese von TMC-95A</i>	28
2	AUFGABENSTELLUNG	30
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	32
3.1	ENTWURF EINER AUF TMC-95A BASIERENDEN, NEUEN LEITSTRUKTUR	32
3.2	SYNTHESEPLAN ZUR DARSTELLUNG VON TMC-95A ANALOGA	36
3.2.1	<i>Synthese von strukturell verwandten Peptidwirkstoffen</i>	36
3.2.2	<i>Synthesepläne zur Darstellung vom MK258</i>	38
3.3	SYNTHESE VON MK258	42
3.3.1	<i>Synthese des L-Tyrosinborsäureesters</i>	42
3.3.3	<i>Synthese des L-7-Bromotryptophanderivates</i>	44
3.3.4	<i>Cyclisierung durch Makrolactamisierung mit anschliessender Ringverengung</i>	46

3.3.5	<i>Synthese von MK258 durch „direkte“ Cyclisierung</i>	49
3.3.6	<i>Energieberechnungen zur Erklärung der unterschiedlichen Reaktivität bei der Cyclisierung</i>	51
3.4	STRUKTUR UND HEMMWIRKUNG VON MK258	54
3.4.1	<i>Strukturanalyse von MK258</i>	54
3.4.2	<i>Hemmwirkung von MK258 und Folgen für das Inhibitor-design</i>	55
3.5	SYNTHESE VON MK258-ANALOGA	57
3.5.1	<i>Designkonzept</i>	57
3.5.2	<i>Synthese von MK416</i>	58
3.5.3	<i>NMR-Struktur von MK416</i>	60
3.5.4	<i>Hemmwirkung von MK416</i>	61
3.6	SYNTHESE VON KETOMETHYLEN-ISOSTEREN VON MK416	64
3.6.1	<i>Synthese des Norleucin-Ketomethylen-Bausteins</i>	65
3.6.2	<i>Synthese des Ketomethylenderivates von MK416</i>	66
3.6.3	<i>Neu-Design eines Ketomethylenanalogons von MK416</i>	68
3.6.4	<i>Synthese von MK499 durch „direkte“ Makrolactamisierung</i>	69
3.6.5	<i>Synthese von MK499 durch Seitenkettencyclisierung</i>	70
3.6.6	<i>Inhibitorwirkung von MK499</i>	72
3.7	BIARYLEETHER ALS ERSATZ FÜR DIE PHENYL-OXINDOLBRÜCKE	74
3.7.1	<i>Modeling einer Biaryletherverbindung zur Inhibition des Proteasoms</i>	74
3.7.2	<i>Design eines MK258 analogen Biarylethers</i>	76
3.7.3	<i>Synthese von MK600</i>	77
3.7.4	<i>NMR-Struktur und Hemmwirkung von MK600</i>	80
3.7.5	<i>Festphasensynthese von „site-directed“ Biaryletherinhibitoren</i>	82
3.7.6	<i>NMR-Struktur von MK610 und Hemmwirkung der „site-directed“ Inhibitoren</i>	85
3.7.7	<i>Synthese eines Ketomethylenderivates von MK610</i>	87
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	90
5	EXPERIMENTELLER TEIL	92
5.1	MATERIAL UND METHODEN	92
5.2	SYNTHESEVORSCHRIFTEN	97

5.3	PROTEASOMASSAY	132
5.3.1	<i>Aktivitätstest</i>	132
5.3.2	<i>Bestimmung der K_i-Hemmwerte</i>	132
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	134
7	SPEKTRENANHANG	145

1 Einleitung

Am Anfang des Entwicklungszykluses eines Agonisten, Antagonisten oder Inhibitors eines medizinischen Targets steht die Suche nach einer geeigneten Leitstruktur.

Glaubte man zu Beginn der Neunziger-Jahre noch, dass durch die konsequente Anwendung ligandabgeleiteter Mimetika der schwierige Prozess der Leitstrukturfindung erheblich verkürzt werden könnte, so ruht die Suche nach einer geeigneten Leitstruktur heute im wesentlichen auf drei verschiedenen Säulen.

Durch die rasante Entwicklung im Rahmen des High-Throughput-Screenings (HTS) bzw. des mittlerweile etablierten ultra-High-Throughput-Screenings (uHTS) wird die Suche nach einer pharmazeutisch wirksamen Leitstruktur durch Screening von synthetischen, häufig kombinatorisch hergestellten Substanzbibliotheken durchgeführt. Das Screening von Naturstoffen, insbesondere aus den pharmakologisch interessanten Pilzstämmen und Meeresmikroorganismen repräsentiert eine weitere Möglichkeit der Wirkstofffindung. Die Natur stellt weiterhin eine wichtige Quelle zur Identifizierung von biologisch-aktiven Naturstoffen dar, insbesondere da durch die mannigfache Vielfalt der Natur immer wieder strukturell neue, bisher nicht bekannte Substanzklassen gefunden werden konnten.

Der Nachteil beider Verfahren liegt an den hohen Kosten und Ineffizienz des Screenings. Die Bestände, insbesondere an Naturstoffisolaten, sind limitiert und ein blindes Testen in verschiedenen Targetassays sehr teuer. Hierbei soll der Einsatz des virtuellen oder auch *in silico* genannten Screenings abhelfen. Bei diesem Verfahren wird mit Hilfe von Docking-Algorithmen oder durch *de novo*-Modeling-Methoden versucht, einen Teil des kostenintensiven *in vitro*-Screenings durch den Einsatz von Computern zu ersetzen und nur die computergenerierten Hits einem Screening zuzuführen. Ein Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit einer dreidimensionalen - mittels Kristallstrukturanalyse oder NMR bestimmten - Struktur des Targets und der immer noch geringen Trefferquote computergestützter Methoden.

Bei allen drei Methoden folgt im Anschluss an einen positiven Hit im Screening die Identifizierung des eigentlichen Pharmakophors mittels strukturbasierter oder SAR-Methoden. Dies ist notwendig, da - besonders bei Naturstoffen - die Verbindungen

häufig für einen direkten Einsatz aufgrund geringer Bioverfügbarkeit, geringer Selektivität oder auch durch synthetisch schwierige Zugänglichkeit nicht geeignet sind.

Im Rahmen dieser Dissertation soll ein Weg gegangen werden, der bei der Entwicklung von Inhibitoren für das medizinisch sehr interessante Target Proteasom diese drei Möglichkeiten ausschöpft und versucht, die Stärken dieser miteinander zu verbinden.

1.1 Das Proteasom

Für das Überleben einer Zelle ist der kontrollierte Auf- und Abbau von Proteinen essentiell (Alberts *et al.*, 2002). Dementsprechend werden je nach Bedarf zelluläre Proteine auf- und auch wieder abgebaut, so dass diese unterschiedliche Halbwertszeiten zwischen wenigen Minuten und mehreren Monaten haben. Der gesteuerte Proteinabbau ermöglicht der Zelle, innerhalb kürzester Zeit die Konzentration wichtiger Regulatorproteine zu senken oder fehlgefaltete bzw. mutierte Proteine zu entfernen und die dabei freiwerdenden Aminosäuren zum Aufbau neuer Proteine zur Verfügung zu stellen. Um zum richtigen Zeitpunkt aus der Vielzahl der in einer Zelle vorhandenen Proteine das richtige abzubauen, bedarf es einer strikten Kontrolle und eines hochpräzisen Mechanismus.

Prinzipiell unterscheidet man beim Proteinabbau in eukaryotischen Zellen zwei unterschiedliche Pfade (Alberts *et al.*, 2002; Zühl & Zirrgiebel, 1998). Der lysosomale Proteinabbau erfolgt in spezialisierten Zellorganellen, den Lysosomen, die hauptsächlich extrazelluläre Proteine, aber auch Pathogene, die in die Zelle eingedrungen sind, abbauen. Der Abbau erfolgt dabei weitestgehend über Cathepsine genannte Proteasen (McGrath, 1999), die alle in die Lysosomen eindringende Proteine prozessieren und somit als unspezifisch anzusehen sind. Lange Zeit nahm man an, dass das Lysosom allein für den Proteinturnover verantwortlich ist, bis erkannt wurde, dass der Großteil der Proteine in der Tat über ein anderes, hochspezifisches System, das unter dem Namen Ubiquitin-Proteasom-System bekannt ist, abgebaut wird.

1.1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Schon vor über zwanzig Jahren war ein ATP-abhängiger Proteinabbaupfad entdeckt worden (Ciechanover, 1994; Hershko & Ciechanover, 1998), dessen Kernstück, das 26S-Proteasom mit einer Masse von 2,4 MDa, allerdings erst Ende der Achtziger-Jahre identifiziert wurde (Matthews *et al.*, 1989). Als Erkennungssignal für den selektiven Proteinabbau dient ein 75-Aminosäuren langes Protein, das aufgrund seines

ubiquitären Vorkommens in allen eukaryotischen Zellen Ubiquitin genannt wurde und im Laufe der Evolution hochkonserviert blieb (Marx, 2002; Ciechanover, 1994). Dabei wird das abzubauen Substrat durch kovalentes Anknüpfen mehrerer Ubiquitineinheiten für den Abbau markiert (DeMartino & Slaughter, 1999). Das Ubiquitin wird an eine freie Aminogruppe des Substrats, normalerweise eines Lysins, addiert. Anschliessend werden nacheinander weitere Ubiquitineinheiten an die Lys48 Aminosäure des vorherigen Ubiquitins addiert (Breitschopf *et al.*, 1998). Diese Aufgabe wird von drei Enzymfamilien, die mit E1, E2 und E3 bezeichnet werden, durchgeführt. E1 aktiviert das Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Prozess und transferiert es zu einem von mindestens 15 verschiedenen E2-Proteinen. Das Ubiquitin wird anschliessend auf das Substrat mittels E3, einer Ubiquitin-Protein-Ligase, übertragen. Man nimmt an, dass es vielleicht Hunderte verschiedener E3-Proteine gibt, die für die Spezifität des gesamten Ubiquitin-Proteasom-Systems verantwortlich sind, indem diese dazu in der Lage sind, die unterschiedlichen Abbausignale der Substrate zu erkennen (Hershko & Ciechanover, 1998). Anschliessend wird das mit Ubiquitin-konjugierte Protein spezifisch vom 26S-Proteasom erkannt und prozessiert (Voges *et al.*, 1999) (Abb 1.1).

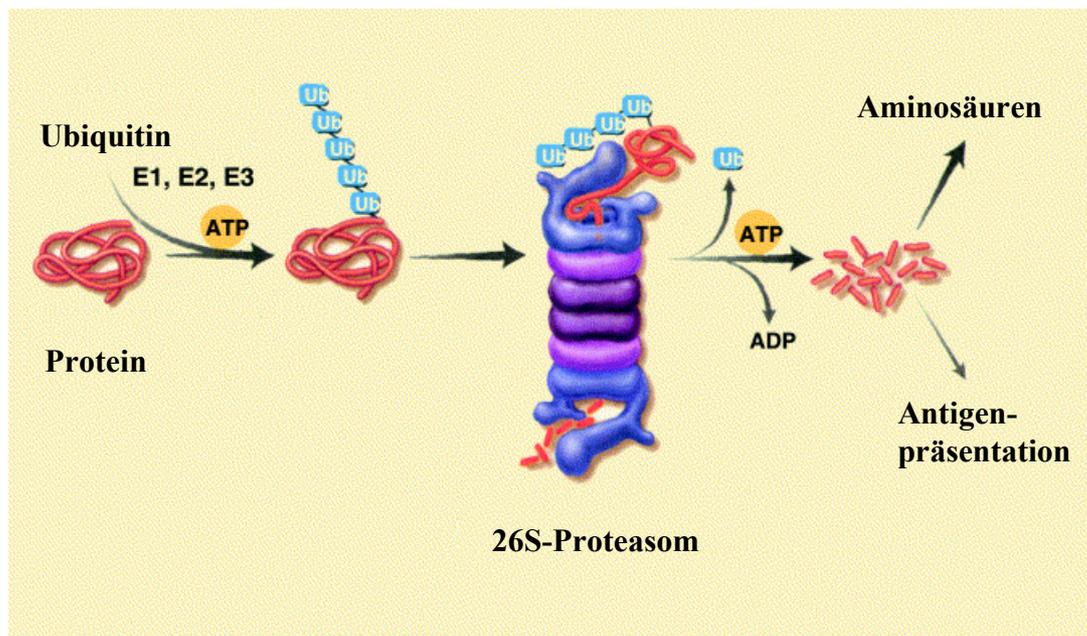


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Kisselev & Goldberg, 2001).

Die in einer durchschnittlichen Länge von 7-9 Aminosäuren gespaltenen Peptide können entweder einer weiteren Prozessierung zu den freien Aminosäuren unterworfen werden oder zu einer zellulären Immunantwort *via* MHC-Klasse-I-Proteinen führen.

Es gibt Vermutungen, dass die weitere Prozessierung im Rahmen eines effektiven Aminosäurerecyclings durch einen weiteren oligomeren Proteasekomplex, der als Tricorn-Protease bezeichnet wird, durchgeführt wird (Tamura *et al.*, 1998; Brandstetter *et al.*, 2001).

Der Mechanismus zur Einleitung der Immunreaktion ist jedoch genauer aufgeklärt. Man unterscheidet in Eukaryoten zwei verschiedene Routen zur Generierung einer Immunantwort. In beiden Fällen werden einige der abgebauten kurze Peptidfragmente im Komplex mit speziellen Oberflächenproteinen, den major histocompatibility complex-Proteinen (MHC), an der Zelloberfläche Antigen-generierender Zellen präsentiert, wodurch eine spezifische Immunantwort auf dieses Epitop eingeleitet wird.

Einerseits werden durch Endocytose aufgenommene, extrazelluläre Antigene in den Lysosomen hydrolysiert und von MHC-Klasse-II-Proteinen an der Zelloberfläche für T-Helfer-Zellen präsentiert. Erkennen die auf der Oberfläche der T-Helfer-Zellen vorhandenen T-Zell-Rezeptoren das Peptid als fremd, so wird die Antikörperproduktion gestartet (Germain & Margulies, 1993).

Die zweite Form der Immunantwort ist die cytotoxische. Diese wird vom Ubiquitin-Proteasom-System eingeleitet. Wie bereits beschrieben, spaltet dieses System hauptsächlich körpereigene, aber auch durch Pathogene eingeschleuste Proteine in Peptidfragmente, von welchen anschliessend einige in das endoplasmatische Reticulum transportiert werden. Dort werden sie von MHC-Klasse-I-Proteinen erkannt und wiederum an der Zelloberfläche den cytotoxischen T-Lymphocyten präsentiert (Wolf & Ploegh, 1995; Groettrup & Schmidtke, 1999). Dabei haben die zur Präsentation ausgewählten Peptide einer Länge von 8-11 Aminosäuren und weisen am C-Terminus sogenannte Ankerreste neben anderen, variablen Positionen, die je nach MHC-Klasse-I-Protein unterschiedlich sind, vor (Rammensee *et al.*, 1993).

Das große Interesse an Inhibitoren für das Proteasom liegt in der Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Dieses moduliert viele physiologische Funktionen durch Abbau regulativer Faktoren (Tab. 1.1). Dementsprechend ist dieses System auch in zahlreichen pathophysiologischen Prozessen und somit schweren Krankheiten involviert (Kisselev & Goldberg, 2001).

<i>Funktion</i>	<i>Substrate</i>
Zellzyklus	p27 ^{Kip1} , p21, Cycline
Onkogenese	p53, p27 ^{Kip1} , bax, IκB
Apoptose	Bcl-2, cIAP, XIAP
Regulation der Genexpression	c-Jun, E2F1, IκB, β-Catenin
Entzündungsreaktionen	IκB, p105 Vorläufer von NF-κB
Langzeitgedächtnis	Protein Kinase A
Regulation des Metabolismus	Ornithindecaboxylase, HMG-CoA Reduktase
Immunabwehr	die meisten im Cytosol oder Kern vorkommenden Proteine
Proteinqualitätskontrolle	CFTRΔF508, α ₁ -Antitrypsin (Z-Variante), gealtertes Calmodulin

Tabelle 1.1: *Physiologische Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.*

Durch selektive Inhibition des Proteasoms, welches das Kernstück des Ubiquitin-Proteasom-Systems darstellt, erhofft man sich einen spezifischen Eingriff in die medizinisch relevanten Zellregulationsprozesse und somit neue Therapiechancen in der Humanmedizin.

1.1.2 Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom ist ein multifunktionaler Proteasekomplex mit im Vergleich zu anderen Proteasen einzigartigen Eigenschaften (Voges *et al.*, 1999; Coux *et al.*, 1996). Mit 2,4 MDa ist es ein sehr großer Proteinkomplex, der aus mindestens 44 Untereinheiten besteht. Es prozessiert die Substrate in einem ATP-abhängigen Mechanismus, wobei nur Ubiquitin-markierte globuläre Proteine entfaltet und prozessiv abgebaut werden. Der eigentliche proteolytische Prozess erfolgt nach einem neuartigen Mechanismus, in welchem ein N-terminaler Threoninrest in einem nach außen verschlossenen Kompartiment involviert ist.

Betrachtet man mittels Elektronen-Tomographie (Abb. 1.2) die Struktur des 26S-Proteasoms genauer, so kann man erkennen, dass das Kernstück dieser molekularen Maschine ein fassartiges Molekülensemble darstellt, welches als 20S-Proteasom bezeichnet wird, eine Masse von 720 kDa aufweist und die eigentlichen proteolytischen Prozesse durchführt. Die genaue Struktur des 20S-Proteasoms wurde durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt und wird später noch detailliert beschrieben.

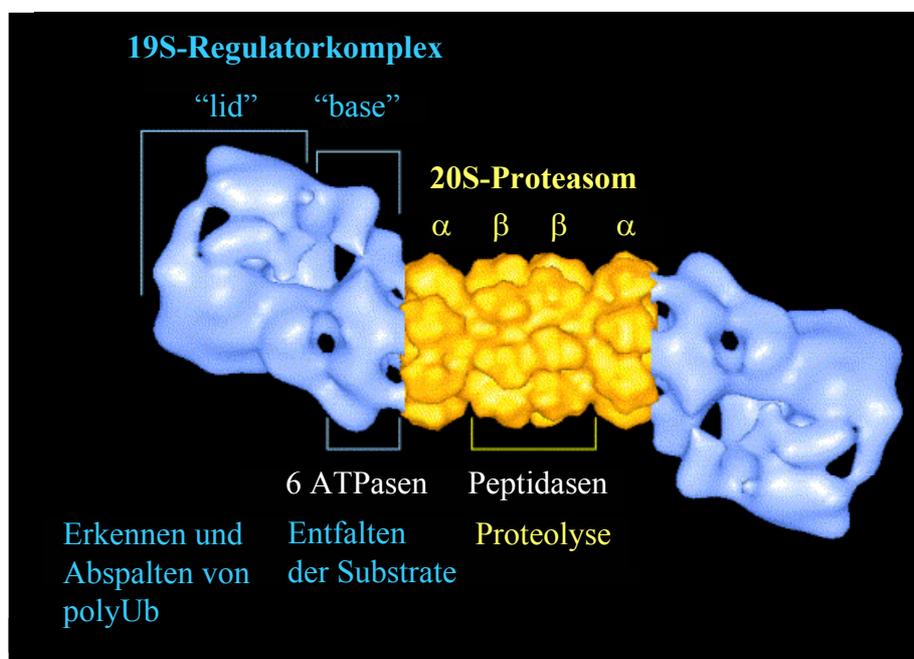


Abbildung 1.2: Elektronen-Tomographieaufnahme des 26S-Proteasoms und Zuordnung der Untereinheiten (Kisselev & Goldberg, 2001).

Flankiert wird dieses 20S-Proteasom von zwei 19S-„cap“-Regulatorproteinen genannten Komplexen, die das 20S-Proteasom wie ein „Sandwich“ in die Mitte nehmen (Holzl *et al.*, 2000). Diese 19S-caps, die auch unter dem Namen PA700 bekannt sind, haben eine Masse von 890 kDa und assoziieren in einem ATP-abhängigen Prozess. Neben 19S-20S-19S-Komplexen sind auch die einfacher aufgebauten 19S-20S-Komplexe bekannt (Yang *et al.*, 1995). Diese können unter Einwirkung von Interferon- γ mit dem heptameren PA28-Komplex, auch als 11S-Komplex bekannt, ein neues „Sandwich“ in Form eines 19S-20S-PA28-Komplexes aufbauen (Tanahashi *et al.*, 2000). Man vermutet, dass der PA28-Komplex die Produktion von antigenen Peptiden zur Induktion der cytotoxischen Immunantwort durch einen unbekanntem Mechanismus stimuliert (Rechsteiner *et al.*, 2000). Neben diesen beiden verschiedenen Formen des 26S-Proteasoms sind auch noch PA28-20S-PA28-Komplexe gefunden worden. Da diese aber nicht dazu in der Lage sind, ubiquitinierte Substrate abzubauen oder angebotenes ATP zu verwerten, scheinen diese *in vivo* keine bedeutsame Rolle bei intrazellulären Abbauprozessen zu spielen (Yang *et al.*, 1995; Tanahashi *et al.*, 2000).

Das 19S-Regulatorprotein kontrolliert den Zugang zum 20S-Proteasom. Wie mittels der Kristallstrukturanalyse des 20S-Proteasoms gezeigt werden konnte, ist der Zugang zur Reaktionskammer beim freien 20S-Proteasom versperrt (Groll *et al.*, 1997). Dieser Zugang muss mittels eines noch unbekanntem Prozesses durch die 19S-caps geschaffen werden. Man vermutet, dass das N-terminale Ende der α 3-Kette des 20S-Proteasoms durch das 19S-cap in einem noch nicht bestimmten Mechanismus zur Seite geschoben wird und somit den Zugang zur proteolytischen Kammer des 20S-Proteasoms freimacht. Diese Vermutung wird durch kristallographische Untersuchungen an 20S-Mutanten untermauert (Groll *et al.*, 2000a). Die Funktion des Einschleusens wird von einer als *base* bezeichneten Molekülregion der 19S-cap erledigt (Voges *et al.*, 1999). Diese Komponente des Komplexes besteht aus acht Polypeptidketten, von welchen sechs homologe ATPasen der AAA-Familie darstellen. Durch Mutation konnte gezeigt werden, dass die involvierten ATPasen im direkten Kontakt mit den α -Ringen des 20S-Proteasoms stehen und unter Einsatz von ATP den Zugang zum reaktiven

Zentrum öffnen können (Köhler *et al.*, 2001). Des Weiteren nimmt man an, dass diese ATPasen das Entfalten der Substrate übernehmen.

Die als *lid* bezeichnete Region der 19S-cap übernimmt die Aufgabe des Erkennens und Abspaltens des Ubiquitins vom Substrat im Sinne eines Recyclings (Voges *et al.*, 1999). Das „lid“ scheint aus mindestens neun verschiedenen Untereinheiten zu bestehen und ist dazu in der Lage, Ubiquitin mit sehr hoher Affinität zu binden.

1.1.3 Das 20S-Proteasom

Obwohl das 26S-Proteasom bisher nur in Eukaryoten gefunden wurde, ist sein Kernstück - das 20S-Proteasom - in allen drei Reichen der Natur nachgewiesen worden. Dabei nimmt die Komplexität des Proteasoms, ausgehend von dem strukturell einfachsten System, der HSIV-Protease des prokaryotischen *E. coli*, über das 20S Proteasom des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* zum komplexesten Vertreter, das eukaryotische 20S-Proteasom, dessen Struktur an der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) aufgeklärt wurde, zu (Bochtler *et al.*, 1999).

Das eukaryotische 20S-Proteasom aus Hefe (Saccharomyces cerevisiae)

Das 20S-Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* repräsentiert den strukturellen Archetyp für das eukaryotische Proteasom. Das Proteasom ist aus 14 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die ein fassartiges Molekülensemble ergeben, welches aus vier gestapelten heptameren Ringen in einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Anordnung mit C_2 -Symmetrie besteht (Groll *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). Das eukaryotische 20S-Proteasom hat eine Masse von 700 kDa und zeigt die Abmessungen von $148 \text{ \AA} \times 113 \text{ \AA}$. Dabei sind die Untereinheiten so angeordnet, dass drei Kavitäten entstehen. Die zentrale Kavität, die durch die beiden benachbarten β -Ringen gebildet wird, stellt die Proteolysekammer des 20S-Proteasoms dar (Abb. 1.3). Die β -Unter-

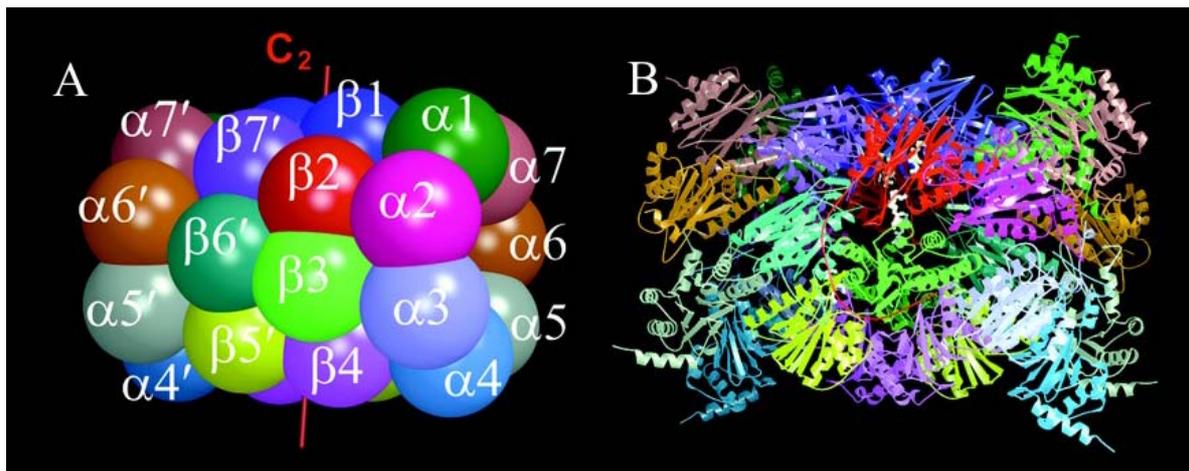


Abbildung 1.3: Topologie der 28 Untereinheiten im 20S-Hefeproteasom; A) Kugelmodell; B) Ribbonplot.

einheiten werden als Proteinvorläufer mit N-terminalen Propeptiden exprimiert, die während der Assemblierung des 20S-Proteasoms teilweise proteolytisch autoprozessiert werden (Chen *et al.*, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997). Durch Abspaltung von drei der sieben verschiedenen Propeptide werden N-terminale Threoninreste freigesetzt, die im enzymatischen Aktivzentrum eine entscheidende Rolle spielen. Im Proteolysemechanismus (Abb. 1.4) wirkt die N-terminale Aminogruppe des Threonins als Protonakzeptor, wodurch die Nukleophilie des angreifenden Seitenketten-O^γ erhöht wird; zudem wird dieser nukleophile Charakter noch durch das benachbarte Lys33 verstärkt. Innerhalb der aktiven Untereinheiten sind des weiteren noch die Aminosäuren Asp17, Ser129, Asp166 und Ser169 invariant, so dass diesen eine weitergehende Funktion zugeschrieben werden muss. Der O^γ-Sauerstoff greift die Carbonylgruppe der Peptidbindung nukleophil unter Ausbildung eines sp³-Kohlenstoff-Intermediates an, welches in ein Acyl-Enzym-Intermediat übergeht. Dieses Zwischenprodukt wird anschliessend durch ein Wassermolekül hydrolysiert (Groll *et al.*, 1997; Seemüller *et al.*, 1995; Kisselev *et al.*, 2000).

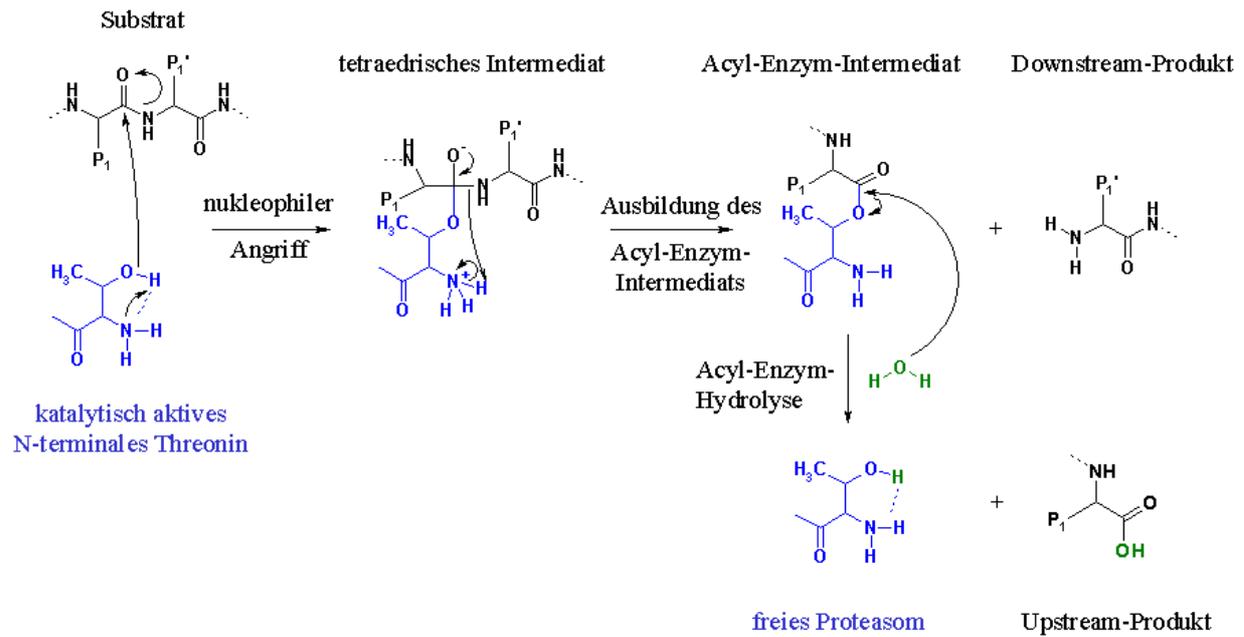


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des ungewöhnlichen Hydrolysemechanismus des Proteasoms; in blau das katalytisch aktive N-terminale Threonin, schwarz das Substrat und grün das zur Hydrolyse benötigte Wassermolekül.

Das Proteasom gehört somit zur Familie der N-terminalen-Nukleophil (Ntn)-Hydrolasen (Brannigan *et al.*, 1995), einer relativ neuen Proteaseklasse, zu denen z. B. auch Penicillinacylase, Aspartylglucosaminidase oder Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase gehört.

Die drei bei der Prozessierung freiwerdenden N-terminalen Threoninreste befinden sich in den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ und, da jede Untereinheit im Proteasom in doppelter Ausführung vorhanden ist, entsprechend auch in den $\beta 1'$, $\beta 2'$ und $\beta 5'$ Untereinheiten an der Innenseite der zentralen Proteolysekammer. Diese proteolytischen Zentren sind in einem Nanokompartiment von der Umgebung abgeschirmt und befinden sich in unterschiedlichen, chemischen Umgebungen. Spaltet eine Protease nach einer sauren Seitenkette, so spricht man von post-Glutamyl-Peptid-hydrolytischer (PGPH)-Aktivität, nach basischen Resten wie Arginin oder Lysin von tryptischer und nach großen, hydrophoben Resten wie Tyrosin, Norleucin oder Phenylalanin von chymotryptischer Aktivität. Mittels fluorogener Substrate unterschiedlicher Aminosäuresequenz sind diese proteolytischen Aktivitäten für das Proteasom bestimmt worden, und es zeigte sich, dass hauptsächlich die S1-Tasche die Spezifität

der Spaltung steuert. Der Untereinheit $\beta 1$ bzw $\beta 1'$ wurde die PGPH-Aktivität, der Untereinheit $\beta 2$ bzw $\beta 2'$ die tryptische und $\beta 5$ bzw $\beta 5'$ die chymotryptische Aktivität zugeordnet (Nussbaum *et al.*, 1998; Dick *et al.*, 1998). Allerdings lässt sich diese definierte Substratspezifität nicht ohne Probleme auf den Verdau ganzer Proteine übertragen, da gezeigt werden konnte, dass diese praktisch an jeder Stelle innerhalb der Sequenz gespalten werden können (Kisselev *et al.*, 1999). Die Substratbindungstaschen werden sowohl von der betrachteten Untereinheit (z. B. $\beta 1$, $\beta 2$ oder $\beta 5$) als auch von benachbarten β -Untereinheiten gebildet. Deshalb ist eine exprimierte, proteolytisch aktive β -Untereinheit alleine nicht funktionsfähig, ein Beweis dafür, dass das Proteasom nur als ganze, molekulare Maschine funktionsfähig ist.

Betrachtet man die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms, so fällt auf, dass der Zugang zu den innerhalb des Proteasoms liegenden und somit von der Aussenwelt abgeschirmten proteolytischen Aktivzentren verschlossen ist. Wie mittels einer $\alpha 3$ -Mutante gezeigt werden konnte, wird bei Deletion einer 13 Aminosäuren langen Sequenz des N-terminalen Endes der $\alpha 3$ -Untereinheit eine Pore geöffnet, durch welche die entfaltenen Substrate in das Innere des Proteasoms gelangen können. Durch Hinzufügen eines Peptides dieser Sequenz zur Mutante konnte in einem *in vitro*-Test die proteolytische Aktivität wieder gehemmt werden. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass *in vivo* die 19S-cap das N-terminale Ende der $\alpha 3$ -Untereinheit „zur Seite biegt“ und somit das Substrat in das Proteasom einschleust (Groll *et al.*, 2000a).

Das 20S-Proteasom in höheren Eukaryoten

Im Gegensatz zum statischen 20S-Proteasom aus Hefe, zeigt das Proteasom in höheren Eukaryoten die Fähigkeit, Untereinheiten variabel auszutauschen. So induziert das Cytokin Interferon- γ in humanen Zellen einen Austausch der proteolytisch aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ durch die Untereinheiten LMP2, MECL1 und LMP7 (Brown *et al.*, 1993). Das dabei entstehende, auch *Immunoproteasom* genannte System, zeigt eine veränderte katalytische Aktivität, die vermutlich einen höheren

Anteil an Peptiden generiert, die sich zur Immunopräsentation eignen (Gaczynska *et al.*, 1994). Interessant ist auch, dass die Zusammensetzung der Untereinheiten in höheren Eukaryoten scheinbar von der Gewebeart und dem Entwicklungsstadium abhängt (Yu *et al.*, 1993). Mittels fluorogener Substrate und Inhibitoren konnten beim Säugetierproteasom weitere proteolytische Aktivitäten, nämlich SNAAP- (small neutral amino acids) und BrAAP- (branched-chain amino acids) Selektivitäten gefunden werden (Cardozo *et al.*, 1992; Orłowski *et al.*, 1993). Wie jedoch durch Kristallstrukturanalyse (Groll *et al.*, 1997), aufwendigen kinetischen Untersuchungen (Cardozo *et al.*, 1999; McCormack *et al.*, 1998) und Mutationsstudien (Dick *et al.*, 1998) gezeigt werden konnte, werden diese neu auftretenden Aktivitäten von den drei bekannten Aktivitäten hervorgerufen. So konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse nach verzweigten Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin oder Valin hauptsächlich durch die PGPH-Aktivität (Dick *et al.*, 1998; Cardozo *et al.*, 1996, Cardozo *et al.*, 1999) und zu einem geringeren Anteil durch die chymotryptische Aktivität (McCormack *et al.*, 1998) vermittelt wird.

*Das archaebakterielle 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum**

Das archaebakterielle 20S-Proteasom war das erste, dessen Kristallstruktur (Abb. 1.5) gelöst wurde (Löwe *et al.*, 1995) und an dem ausgiebige, strukturelle Untersuchungen durchgeführt wurden. Es zeigt ein Temperaturoptimum von etwa 90 °C bei einem pH-Wert von 8-9. Die räumlichen Abmessungen entsprechen denen des Hefeproteasoms, 148 Å × 113 Å. Die Struktur erinnert wiederum an ein Fass aus vier heptameren Ringen in einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Anordnung. Im Gegensatz zum eukaryotischen Hefeproteasom sind sowohl die α - als auch die β -Ringe aus sieben gleichen

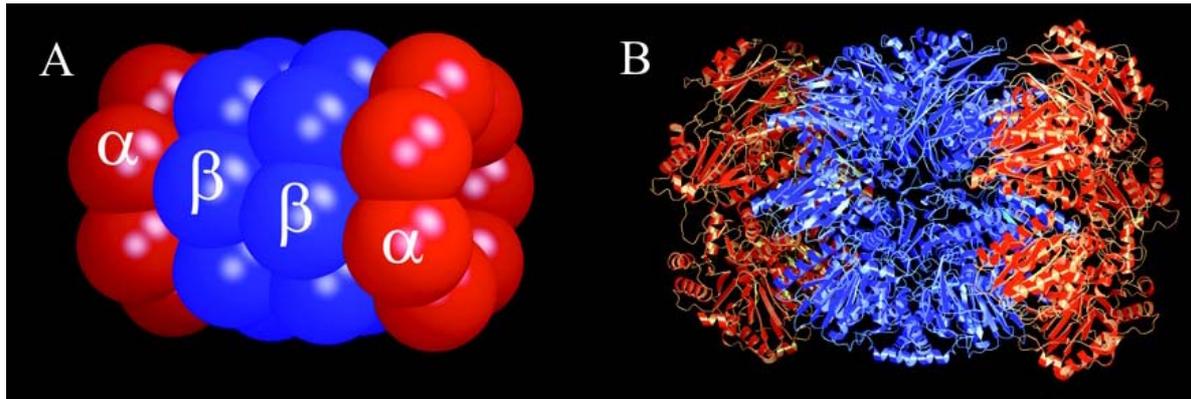


Abbildung 1.5: A) Schematische Darstellung des $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Aufbaus des archaebakteriellen 20S-Proteasoms; B) Ribbonplot des archaebakteriellen 20S-Proteasoms.

Untereinheiten aufgebaut. Somit ist jede der beiden Untereinheiten in dieser Proteasomspezies 14 mal vorhanden, währenddessen im Hefeproteasom die 14 verschiedenen Untereinheiten paarweise auftreten. Dabei sind wiederum die N-terminalen Threoninreste der β -Untereinheiten die katalytisch aktiven Aminosäuren. Das archaebakterielle 20S-Proteasom verfügt über 14 aktive Zentren, die, wie mittels fluorogener Substrate ermittelt wurde, nach chymotryptischen P1-Resten spalten. Aus dieser definierten Substratspezifität lässt sich jedoch wie auch beim Hefeproteasom keine generelle Spaltpräferenz in großen, natürlichen Substraten herleiten. So wird die Insulin-B-Kette bei einem Verdau praktisch nach jeder möglichen Aminosäure gespalten (Wenzel *et al.*, 1994, Akopian *et al.*, 1997).

Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die Größe der Eintrittspore in das Proteasom. Mittels Kristallstruktur konnte dieser auf 13 Å bestimmt werden, groß genug, damit ein entfaltetes Protein durch die Pore in das Proteasom eindringen und an die in der zentralen Kavität befindlichen Proteolysezentren gelangen kann. Dies deckt sich mit der Annahme, dass zur Aktivierung des verschlossenen Hefeproteasoms das regulierende 19S-cap-Protein *in vivo* vorhanden sein muss, währenddessen dieses Protein bei Archaeobakterien nicht gefunden werden konnte.

Die HSIV-Protease aus E. coli

Die HSIVU-Protease aus *E. coli* ist ein aus der proteolytischen Komponente HSIV und einer ATPase-Komponente HSIU bestehender Komplex. Zwar besitzt HSIVU keine, den α -Untereinheiten homologen Strukturen, jedoch zeigt HSIV starke Homologie gegenüber den β -Untereinheiten (Lupas *et al.*, 1994; Rohrwild *et al.*, 1996). Der HSIVU-Komplex gehört zur Familie der Hitzeschock-Proteine (heat-shock-proteins HSP) und wird bei einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine exprimiert (Chuang *et al.*, 1993). Er hat eine Masse von fast 700 kDa und spaltet Peptidketten nach chymotryptischen Aminosäuren unter ATP-Verbrauch. Die Kristallstruktur von HSIV (Bochtler *et al.*, 1997) zeigt eine Anordnung zweier hexamerer Ringe, welche im räumlichen Aufbau den β -Untereinheiten im archaebakteriellen oder eukaryotischen Proteasom sehr ähnlich (Abb. 1.6) ist. Leider war eine Kristallstrukturbestimmung des HSIVU-Komplexes bisher nicht möglich.

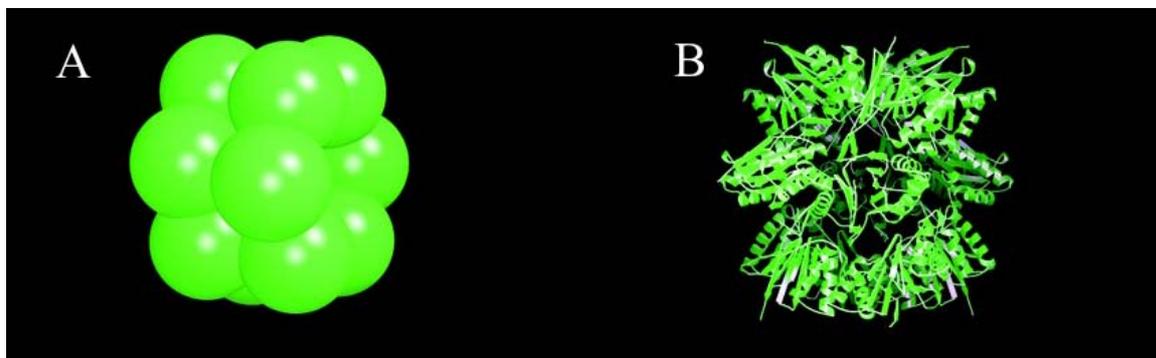


Abbildung 1.6: *HSIV-Protease; A) schematischer Aufbau; B) Ribbonplot.*

1.2 Inhibitoren des Proteasoms

Enzyminhibitoren dienen in der medizinischen Chemie nicht nur zur Wirkstofffindung, sondern auch als Hilfsmittel zur Aufklärung von Enzymmechanismen und Zellprozessen. So ist die intensive Forschung auf dem Gebiet der Proteasominhibitoren durch die medizinische Relevanz des Proteasoms begründet, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Tumorthherapie.

1.2.1 Peptidaldehyde, α -Ketoaldehyde und α -Ketoamide

Peptidaldehyde sind die am längsten bekannten Proteasominhibitoren (Vinitzky *et al.*, 1992; Wilk & Figueiredo-Pereira, 1993). Dabei bildet die elektrophile Carbonylgruppe des Aldehyds mit der nukleophilen Hydroxylgruppe ein kovalentes Hemiacetal. Durch die räumliche Nähe des freien N-Terminus des Threoninrestes kann sich auch das stabilere Oxazolidonprodukt bilden (Bogyo *et al.*, 1997a). Da es sich dabei um reversible Reaktionen handelt, gehören die Peptidaldehyde zur Klasse der reversiblen, kovalenten Inhibitoren (Rock *et al.*, 1994). Nach den anfänglichen Erfolgen, die sich durch Verwendung von ursprünglich für andere Proteasen konzipierter Peptidaldehyde ergaben, z. B. den Calpain-Inhibitoren Ac-Leu-Leu-Nle-H und Ac-Leu-Leu-Met-H, wurden zunehmend auch andere, selektivere Peptidaldehyde synthetisiert und getestet. Als Beispiel dient Verbindung **1** (Abb. 1.7), ein potenter Inhibitor der chymotryptischen Aktivität ($IC_{50} = 2 \text{ nM}$), der die tryptische Aktivität bis zu einer Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{M}$ nicht hemmt und Apoptose in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat T-Zellen hervorruft (Harding *et al.*, 1995). Neben diesem Ergebnis wurden noch weitere Untersuchungen zur medizinischen Anwendung von Peptidaldehyden publiziert bzw. patentiert, so z. B. zur Behandlung von Krebserkrankungen, Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, neurologischen Erkrankungen oder Osteoporose (Dou & Nam, 2000).

Weitere strukturelle Modifikationen an der Carbonylkopfgruppe führen zur Klasse der α -Ketoaldehyde und α -Ketoamide. Aufgrund der großen Ähnlichkeit sollen hier nur

einige Beispiele angegeben werden. Di- und tripeptidische α -Ketoaldehyde wurden hauptsächlich zur Inhibition der chymotryptischen Aktivität synthetisiert, so z. B. die nanomolar inhibierenden Verbindungen *Z*-Leu-Leu-Tyr-CHO ($K_i = 3,1$ nM) und Bz-Leu-Leu-Leu-CHO ($K_i = 3,7$ nM) (Lynas *et al.*, 1998). In die gleiche Richtung stößt die Entwicklung von α -Ketoamiden, die den Vorteil haben, in die S' -Seite des Enzyms hineinzureichen.

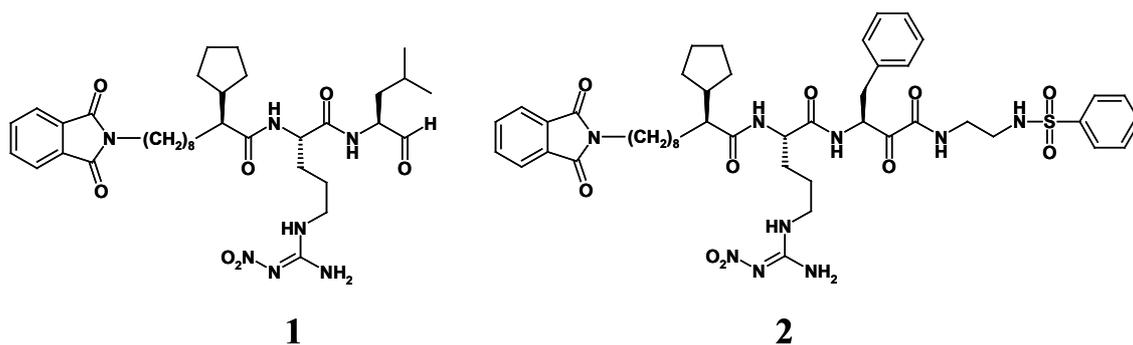


Abbildung 1.7: Strukturen des Peptidylaldehyds **1** und α -Ketoamids **2**.

Als Beispiel soll hier Verbindung **2** dienen, ein α -Ketoamid mit chymotryptischer Spezifität ($K_i = 1,1$ nM), das bis zu 150fach weniger aktiv gegen Calpain-I und der tryptischen Aktivität des 20S-Proteasoms (Chatterjee *et al.*, 1999) ist.

1.2.2 Vinylsulfone

Vinylsulfone wurden ursprünglich zur Inhibition von Cysteinproteasen entwickelt (Palmer *et al.*, 1995). Sie gehören zur Klasse der kovalent-bindenden irreversiblen Inhibitoren und reagieren mit allen drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms *in vitro* und *in vivo* (Bogyo *et al.*, 1997b). Der genaue Hemmmechanismus am Proteasom wurde durch Kristallstrukturanalyse bestimmt (Groll *et al.*, 2002). Durch die Synthese einer Serie von Tri- und Tetrapeptid-vinylsulfonen konnte die P4-Position als wichtige Erkennungsposition der verschiedenen katalytischen Aktivitäten bestimmt werden (Bogyo *et al.*, 1998). Als Beispiel für die Klasse der Vinylsulfone dient NLVS (NIP-

Leu₃-Vinylsulfon, **3**, Abb 1.8), das die chymotryptische Aktivität ($K_i = 13400$ nM), tryptische Aktivität ($K_i = 422$ nM) und PGPH-Aktivität ($K_i = 100$ nM) sehr unterschiedlich hemmt.

1.2.3 Peptidboronsäuren

Peptidboronsäuren leiten sich von den natürlichen Enzymsubstraten ab, bei denen die zu spaltenden Amidfunktionen durch einen Boronsäurerest ersetzt werden, um mit der nukleophilen Hydroxylgruppe ein nahezu tetraedrisches Addukt zu bilden. Ursprünglich wurden Peptidboronsäuren zur Inhibition von Serinproteasen entwickelt und aufgrund ihrer Inaktivität gegenüber Cysteinproteasen wurden sie als „slow“, „tight“-binding Inhibitoren der chymotryptischen Aktivität charakterisiert. Als Beispiel dient PS-341 (**4**, Abb 1.8) (Adams *et al.*, 1998), welches zur Zeit in verschiedenen Phase I-Untersuchungen zur Behandlung von Patienten im fortgeschrittenen Krebsstadium und in einer Phase II-Untersuchung zur

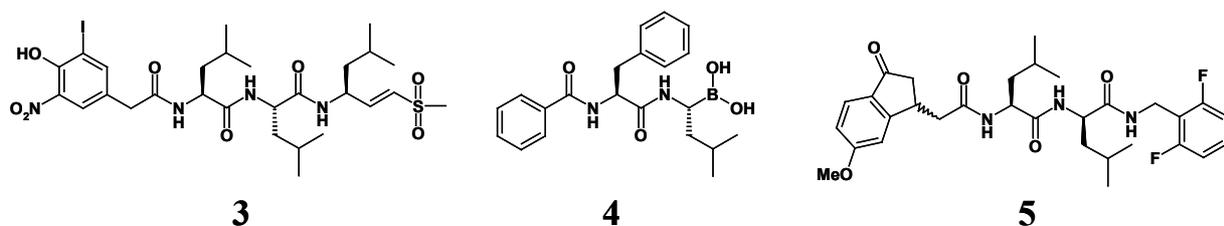


Abbildung 1.8: Strukturen der Proteasominhibitoren NLVS (**3**), PS341 (**4**) und 5-Methoxyindan-Inhibitor **5**.

Behandlung von multiplen Myolema eingesetzt wird (Adams *et al.*, 1999; Adams & Elliot, 2000).

1.2.4 Peptide mit 5-Methoxy-1-indanon-Kopfgruppe

Die 5-Methoxy-1-indanon-Kopfgruppe ist im Vergleich zu Peptidaldehyden weniger reaktiv. Dementsprechend wurde eine Serie von Verbindungen zur Inhibition der chymotryptischen Aktivität synthetisiert, von denen Verbindung **5** (Abb. 1.8) sowohl *in vitro* ($IC_{50} = 0,14 \mu\text{M}$) als auch in einem *in vivo* Antiproliferationsassay ($IC_{50} = 8 \mu\text{M}$) biologische Wirkung zeigt (Lum *et al.*, 1998).

1.2.5 Lactacystin und analoge Hemmstoffe

Lactacystin, ein von Omura (Omura *et al.*, 1991) zuerst isolierter, nicht-peptidischer *Streptomyces*-Metabolit, gehört zur Klasse der irreversiblen, kovalent bindenden Proteasominhibitoren (Abb. 1.9). Dabei reagiert Lactacystin (**6**) nicht unmittelbar mit dem Proteasom, sondern lagert sich in einer Lactonisierungsreaktion zum reaktiven *clasto*-Lactacystin β -Lacton (**7**) um, welches das 20S-Proteasom durch Acylierung der nukleophilen Hydroxylfunktion des Threonins desaktiviert (Dick *et al.*, 1996). Gibt man das β -Lacton zu einer Zellkultur, so durchdringt dieses die Zellmembran und wird anschliessend vom Glutathion-Scavenger-System der Zelle zu einem Thioester umgewandelt, der strukturell und funktionell analog zu Lactacystin ist. Dieses Lactathion genannte Addukt reagiert nicht mit dem Proteasom, kann sich allerdings unter einer analogen Lactonisierung erneut zum β -Lacton umwandeln und somit erneut als Proteasominhibitor wirken. Die zwischenzeitliche Umwandlung zum Lactathion erlaubt eine höhere Konzentration des Inhibitors innerhalb der Zelle und eine über einen längeren Zeitraum konstante Abgabe an aktivem *clasto*-Lactacystin β -Lacton (Dick *et al.*, 1997).

Lactacystin ist ein potenter, irreversibler Inhibitor der chymotryptischen ($IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$) und tryptischen Aktivität ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$) und ein schwacher, reversibler Inhibitor der PGPH-Aktivität ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Der Mechanismus der Inaktivierung durch Acylierung konnte mittels Kristallstrukturanalyse bestätigt werden (Groll *et al.*, 1997). Lactacystin hat sich als inaktiv gegenüber Serin- und Cysteinproteasen erwiesen.

Darüberhinaus haben *in vitro* Studien mit radioaktiv-markiertem Lactacystin gezeigt, dass sich annähernd die gesamte Radioaktivität am Proteasom anreichert (Fenteany *et al.*, 1995). Allerdings berichten neuere Studien von einer teilweisen Hemmung des Cathepsins A (Ostrowska *et al.*, 1997).

Aufgrund der hervorragenden inhibitorischen Eigenschaften von Lactacystin sind synthetische Versuche unternommen worden, den Naturstoff und entsprechende analoge Verbindungen herzustellen (Corey *et al.*, 1999; Masse *et al.*, 2000). Darauf basierende SAR-Studien haben gezeigt, dass die Originalgruppen am C5 bzw. C9-Kohlenstoffatom optimal zur Proteasomhemmung sind, lediglich ein Austausch der 7-Methylseitenkette durch Ethyl, *n*-Butyl oder *i*-Propyl erhöhte die Inhibitionskonstante

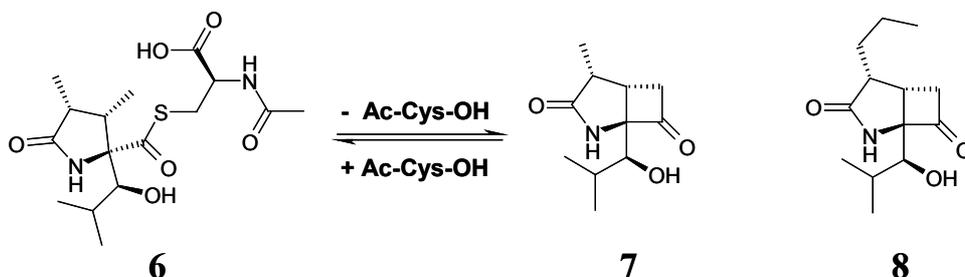


Abbildung 1.9: Strukturen von Lactacystin (**6**), clasto-Lactacystin β -Lacton (**7**), PS-519 (**8**).

für die chymotryptische Aktivität um den Faktor 2 bis 2,8. Ein mit diesen Inhibitoren verwandtes 7-*n*-Propyl-substituiertes β -Lacton PS-519 (**8**, Abb. 1.9) der Firma ProScript befindet sich zur Zeit in der präklinischen Phase. Des weiteren zeigt eine Auswertung der Patentschriften ein ungebrochenes Interesse an den pharmakologischen Eigenschaften des Naturstoffes Lactacystin.

1.2.6 α' , β' -Epoxyketone

Diese Naturstoffklasse, z. B. die Verbindungen Epoxomicin (**9**) und Eponemycin (**10**) (Abb. 1.10), wurde aufgrund ihrer Antitumoraktivität in einem Mausmodell-Assay entdeckt (Sugawara *et al.*, 1990; Hanada *et al.*, 1992). Später wurde festgestellt, dass

diese selektiv als Inhibitoren des Proteasoms wirken (Meng *et al.*, 1999a; Meng *et al.*, 1999b). Epoxomicin inhibiert dabei weitgehend selektiv die chymotryptische Aktivität, das weniger potente Eponemycin und das synthetische Analogon Dihydroeponemycin (**11**, Abb. 1.10) hemmt sowohl die PGPH- als auch die chymotryptische Aktivität mit etwa gleicher Inhibitionskonstante. Hervorzuheben sind diese Naturstoffe aufgrund ihrer einzigartigen Selektivität, die im Inhibitionsmechanismus begründet ist. Diese Naturstoffe, die in der (2*R*)-Konfiguration am Epoxid vorliegen, reagieren mit dem

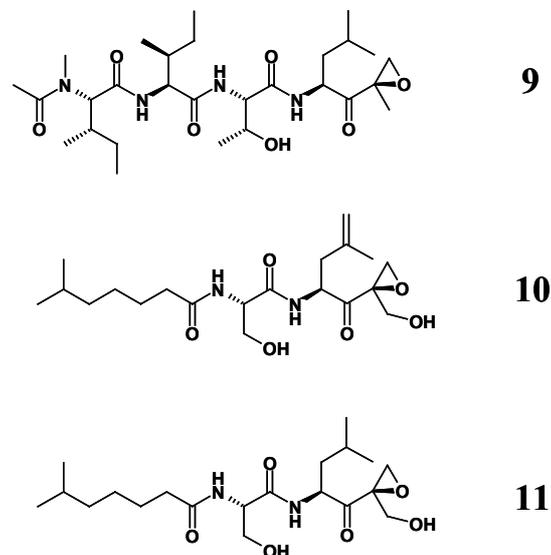


Abbildung 1.10: Strukturen von Epoxomicin (**9**), Eponemycin (**10**) und Dihydroeponemycin (**11**).

N-terminalen Threoninrest unter Ausbildung eines Morpholinringes. Dieses Morpholinderivat kann mit anderen Proteasen nicht entstehen, da nur das Proteasom neben der nukleophil angreifenden Hydroxylfunktion eine freie α -Aminofunktion besitzt. Der genaue Mechanismus konnte mittels kristallographischer Studien (Groll *et al.*, 2000b) aufgeklärt werden. Man geht davon aus, dass zuerst ein Angriff der Hydroxylfunktion des Threonins auf das Carbonylkohlenstoffatom des Epoxyketons erfolgt, anschliessend greift die noch freie Aminofunktion die Epoxidfunktion unter Ringöffnung an, so dass das kristallographisch beobachtbare Morpholinoaddukt entsteht. Eine Inversion der (2*R*)-Konfiguration in eine (2*S*)-Konfiguration erniedrigt dramatisch die Inhibitionseigenschaften der Epoxyketone, vielleicht aufgrund einer

sterischen Hinderung bei der Ausbildung des Morpholinoadduktes. Weitere Vertreter dieser Naturstoffklasse konnten durch Isolierung aus Streptomyces-Stämmen (Kogushi *et al.*, 1999; Kogushi *et al.*, 2000a) gewonnen werden.

1.2.7 Bifunktionelle und bivalente Inhibitoren

Bei den neuen, durch strukturbasiertes Design erhaltenen Inhibitorclassen wurde ein altbekanntes Prinzip der Chemie, der Chelateffekt, zur Entwicklung selektiver Proteasominhibitoren benutzt.

Zum Design der bifunktionellen Inhibitoren wurde die räumliche Anordnung der konservierten Aminosäure Cys118 ausgenutzt, um, neben einer kovalenten Bindung einer Aldehydfunktion an das aktive Zentrum, eine weitere kovalente Bindung auszubilden. Dabei ragt der Cysteinrest mit seiner Seitenkette in die S3-Tasche der tryptischen Kavität des Proteasoms. Der zweite kovalente Anker wurde mittels nukleophilen Angriffes der Thiolfunktion des Cysteins auf eine Maleimidofunktion ausgebildet. Durch Vereinigung dieser beiden Ankergruppen konnte der Inhibitor **12** (Abb. 1.11) gewonnen werden, der eine beachtliche Selektivität für die tryptische Aktivität ($IC_{50} = 0,5 \mu M$) gegenüber den beiden anderen Aktivitäten ($IC_{50} > 100 \mu M$) zeigt (Loidl *et al.*, 1999a; Loidl, 1999c). Von Nachteil für eine pharmakologische Anwendung ist aber sicherlich die hohe Reaktivität der Maleimidofunktion gegenüber Thiolen im allgemeinen.

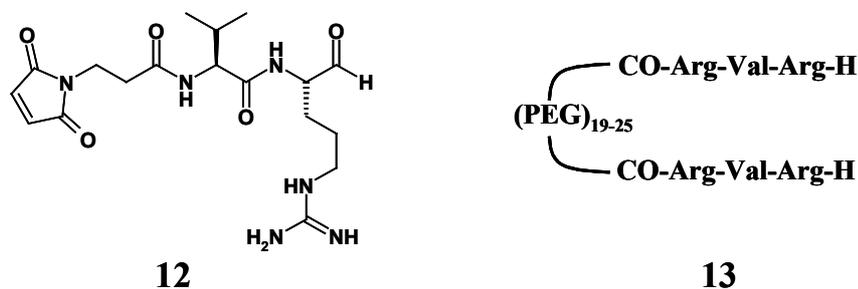


Abbildung 1.11: Strukturen des bifunktionellen Inhibitors **12** und eines bivalenten Proteasominhibitors **13**.

Ein zweites Beispiel nach dem Prinzip der Multivalenz von Inhibitoren sind homo- und heterobivalente Inhibitoren, bei denen zwei Peptidaldehyde über ihren N-Terminus mit einer Polyethylenglycolkette verbunden wurden, so dass, je nach Auswahl der beiden Peptidaldehydsequenzen, eine selektive Inhibition erreicht werden konnte. So inhibiert die homobivalente Verbindung **13** (Abb. 1.11) die tryptische Aktivität ($IC_{50} = 0,071 \mu\text{M}$) etwa um den Faktor 100 höher als der entsprechende monovalente Peptidaldehyd Ac-Arg-Val-Arg-H ($IC_{50} = 6,4 \mu\text{M}$) (Loidl *et al.*, 1999b; Loidl, 1999c).

1.2.8 Neue Naturstoffinhibitoren

Gliotoxin (**14**, Abb. 1.12), ein aus Pilzen isolierter Metabolit, hemmt die chymotryptische Aktivität des Proteasom nach einem ungewöhnlichen Wirkmechanismus. Dabei bindet Gliotoxin, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Inhibitoren nicht im Bereich der „active site“, sondern in einem unbekanntem, nicht proteolytisch aktiven Bereich. Da zur Aktivität des Gliotoxins die Disulfidbrücke essentiell ist, nimmt man an, dass diese Bindung unter Ausbildung eines gemischten Disulfids zwischen dem Naturstoff und dem Proteasom entsteht (Kroll *et al.*, 1999).

Ein weiterer Naturstoff, der die Fähigkeit zur Proteasomhemmung zeigt, ist

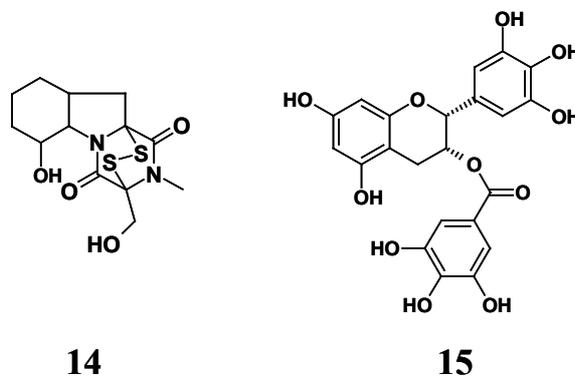


Abbildung 1.12: Struktur der Proteasominhibitoren Gliotoxin (**14**) und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (**15**).

(-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG, **15**, Abb. 1.12), ein aus grünem Tee isoliertes Polyphenol, das neben anderen isolierten Polyphenolen die grösste Inhibitions-eigenschaft zeigt. Durch SAR-Studien, Atomorbitalenergie-Analyse und Analyse der aus EGCG entstehenden Produkte vermutet man, dass das Proteasom die Esterbindung des Naturstoffes nukleophil angreift und somit, ähnlich wie bei der Reaktion mit Lactacystin, das Threonin acyliert wird. Genauso wie bei Lactacystin wird dieses Proteasom-Gallat-Addukt durch Wasser langsam wieder hydrolysiert, welches zu einer Wiederaktivität des Proteasoms führt (Nam *et al.*, 2001).

1.2.9 Das Proteasom als Sekundärtarget bekannter Wirkstoffe

Wie sich in pharmakologischen Studien zeigte, kann die chymotryptische Aktivität auch durch bekannte, für andere Enzyme entwickelte Pharmaka inhibiert werden. Bekanntester Vertreter dabei ist sicherlich Ritonavir (**16**, Abb. 1.13), einem HIV-I-Proteaseinhibitor (Schmidtke *et al.*, 1999) oder Lovastatin (**17**, Abb. 1.13) in seiner β -Lacton-Produgform (Rao *et al.*, 1999). Des weiteren konnte Aclacinomicin A (**18**, Abb. 1.13), einem als Antikrebsmittel eingesetzten DNA-Intercalator (Figueiredo-Pereira *et al.*, 1996) und das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Meyer *et al.*, 1997)

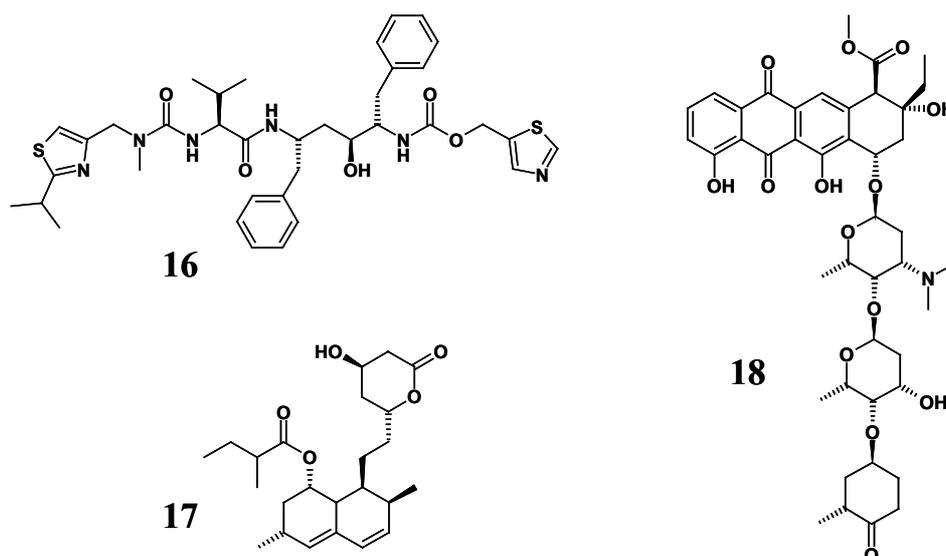


Abbildung 1.13: Strukturen von Ritonavir (**16**), Lovastatin (**17**) und Aclacinomicin A (**18**).

identifiziert werden. Es ist zwar nicht bekannt, inwieweit diese Verbindungen einen *in vivo* Einfluss auf den Proteinabbau in ihren therapeutisch verabreichten Konzentrationen haben, aber es zeigt sich an diesen Beispielen sehr deutlich, wie schwierig es ist, die Bedeutung von *in vitro* und *in vivo* Studien auf die spätere Pharmakodynamik und -kinetik abzuschätzen.

1.2.10 Die Familie der TMC-95-Inhibitoren

Um eine vollständige Einführung der Proteasominhibitoren gewähren zu können, soll hier nur kurz auf Inhibitoren der TMC-95-Familie eingegangen werden, da ihnen das folgende Kapitel komplett gewidmet ist. Bei Inhibitoren dieses Types handelt es sich um vier Naturstoffe analoger Natur, von denen die Verbindung TMC-95A (**19a**, Abb. 1.14) den potentesten Proteasominhibitor darstellt. Aufgrund der reversiblen und durch nicht-kovalente Wechselwirkungen vermittelte Hemmung des Proteasoms ist diese Strukturfamilie einzigartig. TMC-95A hemmt in Gegenwart von SDS die chymotryptische Aktivität des Proteasoms ($IC_{50} = 5,4$ nM), die tryptische ($IC_{50} = 200$ nM) und die PGPH-Aktivität ($IC_{50} = 60$ nM) hingegen etwas schwächer (Koguchi *et al.*, 2000b; Kohno *et al.*, 2000).

1.3 TMC-95A als reversibler, nicht-kovalenter Inhibitor

Die Strukturfamilie der TMC-95 Naturstoffe (Abb. 1.14) besteht aus vier analogen

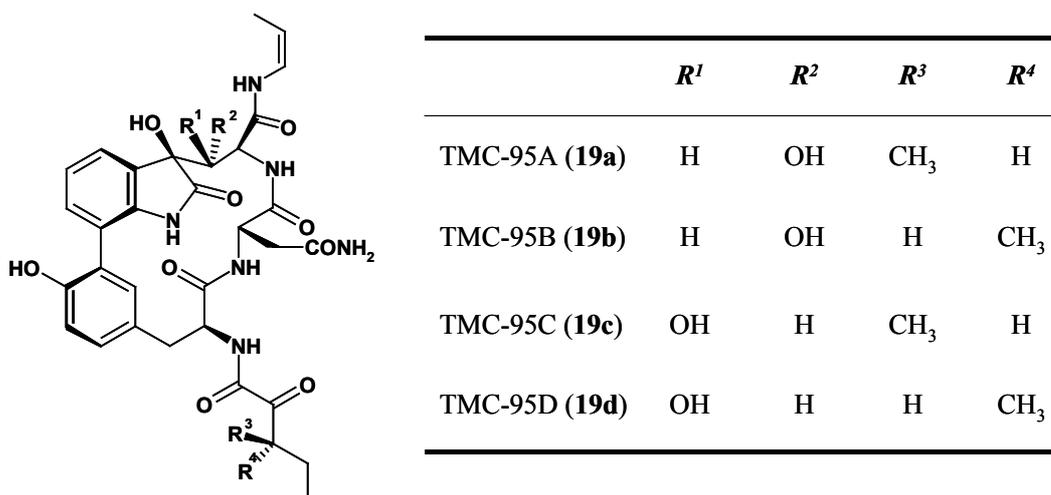


Abbildung 1.14: Strukturfamilie der TMC-95 Naturstoffe: TMC-95A (**19a**), TMC-95B (**19b**), TMC-95C (**19c**) und TMC-95D (**19d**).

Verbindungen, die sich in vier unterschiedlichen Resten unterscheiden. Unter diesen erweist sich TMC-95A als potentester Inhibitor. TMC-95A (**19a**) inhibiert die chymotryptische Aktivität mit einem $IC_{50} = 5,4$ nM, die tryptische Aktivität mit einem $IC_{50} = 200$ nM und die PGPH-Aktivität mit einem $IC_{50} = 60$ nM. Ähnliche Inhibitionswerte erreicht der Naturstoff TMC-95B (**19b**), hingegen sind die Hemmungen der Naturstoffe TMC-95C und D um den Faktor 20 bis 150 schwächer als TMC-95A (Koguchi *et al.*, 2000b; Kohno *et al.*, 2000).

Diese Naturstoffe wurden durch einen Aktivitätsassay in *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093 identifiziert und dann in ihrer Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Sie gehören zur Familie der Cyclopeptid-Metaboliten und sind aus den Aminosäuren L-Tyrosin, L-Asparagin, einem stark oxidierten L-Tryptophan und den Bausteinen (Z)-1-Propenylamin und 3-Methyloxopentansäure aufgebaut und über die Phenyl- und Oxindolseitenkette unter Bildung eines Biarylsystems cyclisiert. Ein ähnliches Strukturmotiv in Form einer Phenol/Indol-Verknüpfung findet sich auch bei

Chlorozeptin (Matsuzaki *et al.*, 1994), Complestatin (Kaneko *et al.*, 1989), Diazonamid (Lindquist *et al.*, 1991) und den Kistamicinen (Naruse *et al.*, 1993a; Naruse *et al.*, 1993b).

Der genaue Bindungsmechanismus wurde durch Kristallstrukturanalyse eines 20S-Hefeproteasom/TMC-95A-Komplexes untersucht. Die Röntgenstrukturanalyse (Abb. 1.15; Abb. 3.1) zeigt, dass der Inhibitor durch ein dichtes Netz von Wasserstoffbrücken mit dem Proteasom-Backbone in Form einer antiparallelen β -Faltblattstruktur wechselwirkt (Groll *et al.*, 2001). Erstaunlich ist, dass

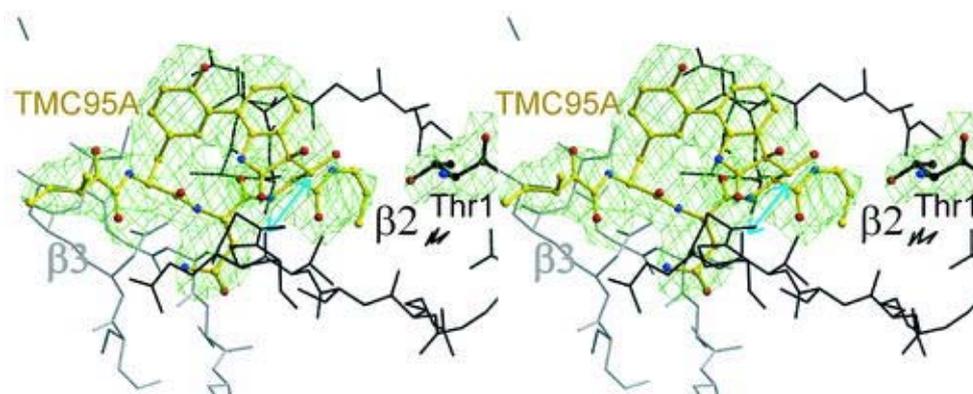


Abbildung 1.15: Stereodarstellung der Elektronendichteverteilung von TMC-95A (gelb) in der β 2-Untereinheit des Proteasoms (schwarz).

offensichtlich keinerlei Wechselwirkungen zwischen der α -Ketogruppe der Ketoamidreste und dem Proteasom bestehen. α -Ketogruppierungen sind aufgrund ihrer Elektrophilie und Hydrolysestabilität als Serinprotease-Inhibitoren bekannt und spielen z. B. in den natürlich vorkommenden Serinprotease-Inhibitoren Eurystatin A und B und Poststatin die entscheidende Rolle im Hemmmechanismus. Durch Überlagerung der erhaltenen Kristallstruktur mit der bereits bekannten Epoxomicin/20S-Proteasom-Struktur konnte zudem gezeigt werden, dass die (Z)-Propenylamin-Seitenkette in die S1-Enzymtasche und die Seitenkette der Aminosäure Asparagin in die S3-Tasche des Proteasoms zeigt und sich somit durch geschickten Austausch der in die Enzymtaschen ragenden Seitenketten eine höhere Affinität und auch höhere Selektivität zwischen den drei im Proteasom vorkommenden Proteolyseaktivitäten erreicht werden sollte (Abb. 3.3). Insbesondere die Entwicklung

von selektiven Inhibitoren der tryptischen Aktivität des Proteasoms sollte hierdurch möglich sein, da sich in der S3-Tasche der tryptischen Aktivität ein „ungesättigter“ Asparaginsäurerest zur Ausbildung einer Salzbrücke mit einem in P3 sitzenden Argininrest anbietet.

1.3.1 Ansätze zur Synthese von TMC-95A

Aufgrund der beschriebenen, bisher einzigartigen Eigenschaften der TMC-95 Naturstoffe und dem großen Interesse an der Entwicklung von Proteasominhibitoren haben parallel zu der hier vorliegenden Arbeit mehrere Synthesegruppen nach Erscheinen der NMR-Struktur mit Arbeiten zur Totalsynthese dieser Naturstoffe begonnen.

Eine Totalsynthese von TMC-95A wurde aus der Arbeitsgruppe von Danishefsky (Lin & Danishefsky, 2001; Lin & Danishefsky, 2002) berichtet. Dabei wurde zuerst ein geeignet geschützter Makrocyclus aufgebaut, an welchem anschliessend die C- und N-terminalen Reste angeknüpft wurden (Abb. 1.16). Im ersten Syntheseschritt wurde die Biarylbrücke zwischen dem Oxindol- und dem Tyrosinderivat etabliert. Die diastereofaciale Dihydroxylierung konnte durch Einsatz des chiralen Garner-Aldheyds (Garner & Park, 1987) erreicht werden. Der Ring wurde durch Makrolactamisierung mit EDCI/HOAt als Kupplungsreagenz geschlossen. Es folgte die stereoselektive Oxidation des C-terminalen Silylether-geschützten Alkohols zur freien Säure mit anschliessender stereoselektiver Synthese des *cis*-Propenylamids. Schliesslich erfolgte die N-terminale „Modifikation“ durch Kondensation von (\pm)-3-Methyl-2-Oxopentansäure mit der entschützten α -Aminofunktion des Tyrosins.

Demgegenüber berichteten andere Gruppen bisher nur über Synthesebausteine, die später zur Totalsynthese eingesetzt werden sollten. Aus der Arbeitsgruppe um Williams (Albrecht & Williams, 2001) wurde die Biarylverknüpfung zwischen einem Tyrosinderivat und 7-Iodoisatin als Oxindolylalaninbaustein mittels Stille-Kupplung berichtet. Ma und Wu haben die stereoselektive Synthese eines Tryptophanbausteines,

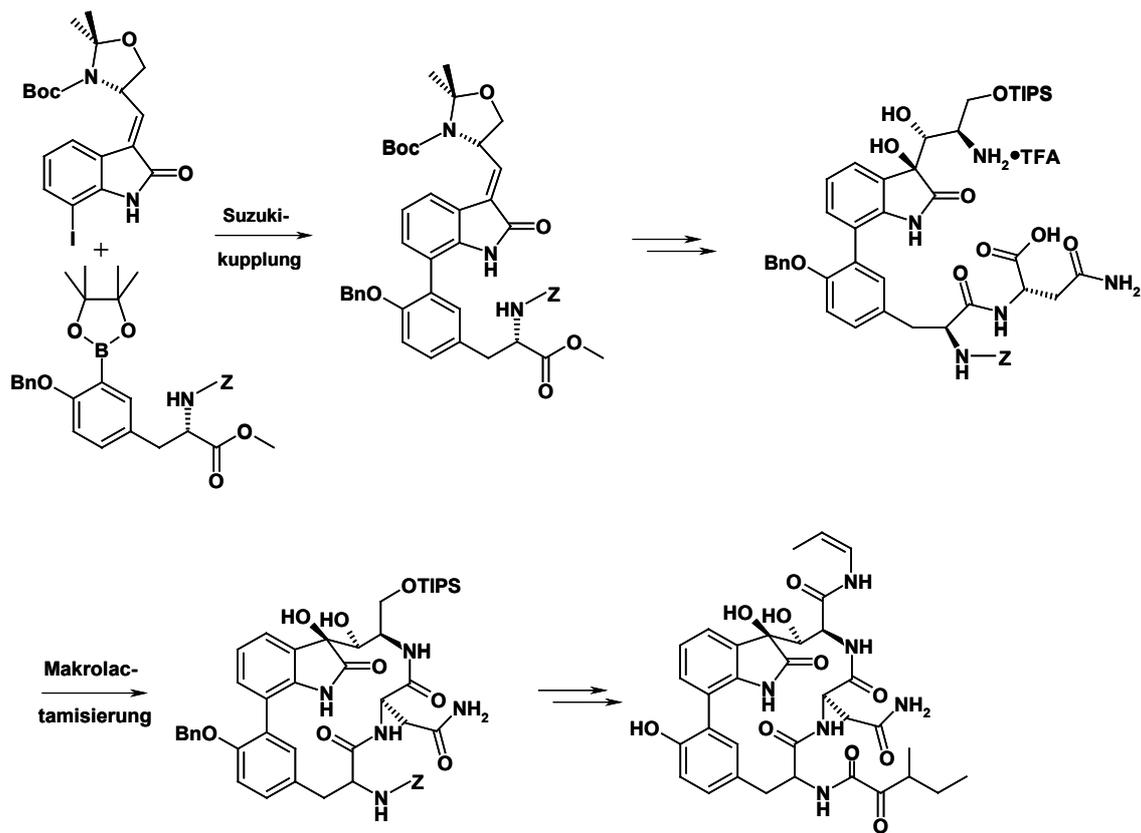


Abbildung 1.16: Schema der Totalsynthese von TMC-95A und TMC-95B (Lin & Danishefsky, 2001; Lin & Danishefsky, 2002).

der bereits das benötigte Oxidationsmuster zeigt, veröffentlicht (Ma & Wu, 2000). Die Suzuki-Kupplung dieses Bausteines mit Tyrosin und die dabei auftretenden Komplikationen werden in einer weiteren Arbeit beschrieben (Ma & Wu, 2001). Ebenso ist die stereoselektive Synthese eines oxidierten Tryptophanbausteines, der bereits die C-terminale *cis*-Propenylamidgruppe trägt, bekannt (Inoue *et al.*, 2001). Dieser sollte über eine Suzuki-Kupplung mit einem Tyrosinborsäureester die Etablierung der Biarylbrücke ermöglichen.

In der Arbeitsgruppe von Rich hingegen wurde versucht, anhand von Modellverbindungen, eine Synthese analog einer etablierten Darstellung des strukturell ähnlichen Chloropeptins zu entwickeln. Wie jedoch berichtet wurde (Estiarte *et al.*, 2001), schlugen bisher alle Syntheserversuche auf diesem neuen Wege fehl und statt des gewünschten Produktes wurde nur entsprechende Dimere erhalten.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten neue Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren des 20S-Proteasoms untersucht werden. Ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse des Hefeproteasom/TMC-95A-Komplexes (Groll *et al.*, 2001) sollte untersucht werden, ob die daraus ableitbare Minimalstruktur bereits genügt, um eine dem Naturstoff vergleichbare Hemmung zu erhalten. Ein positives Resultat würde bedeuten, dass eine neue Leitstruktur gefunden werden konnte, die im Gegensatz zu den bekannten Proteasominhibitoren, neue erwünschte Eigenschaften zeigt. Besonders hervorzuheben ist dabei der nicht-kovalente Inhibitionsmechanismus von TMC-95A.

Die zu etablierende Synthese sollte so gestaltet sein, dass sie die zu SAR-Studien benötigten Derivate zugänglich machen kann; d. h., es sollte eine Synthese entwickelt werden, deren einzelne Schritte eine möglichst grosse Kompatibilität zu funktionellen Gruppen besitzen und somit eine große Diversität an unterschiedlichen Derivaten ermöglichen. Im Gegensatz zur Naturstoffsynthese, in welcher die Optimierung auf das zu synthetisierende Produkt im Vordergrund steht und somit auch speziell für das entsprechende Problem entwickelte Synthesemethoden eingesetzt werden, sollte dieser Syntheseweg durch *high-fidelity* Reaktionsschritte charakterisiert sein.

Neben der Überprüfung des Designkonzeptes der Minimalstruktur sollte auch untersucht werden, ob - basierend auf der neuen Leitstruktur - eine selektive Adressierung der drei unterschiedlichen Proteasomaktivitäten möglich ist. „Site“-selektive Proteasominhibitoren spielen für die biochemische und medizinische Forschung eine große Rolle, da der genaue molekulare Mechanismus der Proteolyse von Proteinen und die Rolle der unterschiedlichen Proteasomaktivitäten in diesem Prozess noch nicht bekannt sind. Des weiteren sollte ein auf TMC-95A basierender Inhibitor entwickelt werden, der eine kristallographische Untersuchung der S'-Region des Proteasoms erlaubt. Hierzu sollte ein Ketomethylenanalogon der neuen Leitstruktur synthetisiert werden.

Die Phenyl-Oxindolbrücke der TMC-basierenden Inhibitoren stellt aufgrund der benötigten vielstufigen Synthese der Ausgangsedukte ein limitierender Faktor bei der Entwicklung von neuen Inhibitoren dar. Wie in der Kristallstruktur des

Proteasom/Inhibitorkomplexes zu erkennen ist, bindet der Inhibitor mit dem Proteinrückgrat des Proteasoms in Form eines antiparallelen β -Faltblattes. Es sollte deshalb auch untersucht werden, ob eine ausreichende Inhibition durch die Verwendung von β -Faltblatt-stabilisierenden Strukturelementen erreicht werden kann. Hierzu sollten verschiedene Analoga der cyclischen Biarylether-Substanzklasse synthetisiert und enzymkinetisch und strukturell charakterisiert werden. Die cyclischen Biarylether wurden aufgrund von Modeling-Experimenten und der vorhandenen, von anderen Arbeitsgruppen entwickelten Synthesemethoden als neue mögliche Leitstrukturen ausgewählt.

Sollte sich die Arbeitshypothese bestätigen, wäre der Einstieg in gänzlich neue, auf rationalen Modeling-Methoden basierenden Inhibitoren gelungen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwurf einer auf TMC-95A basierenden, neuen Leitstruktur

Eine Auswertung der Kristallstruktur des Hefe/TMC-95A-Komplexes (Groll *et al.*, 2001) (Abb. 3.1) liefert Hinweise darauf, dass zur Inhibition des Proteasoms nicht sämtliche funktionelle Reste des komplexen Naturstoffes notwendig sind.

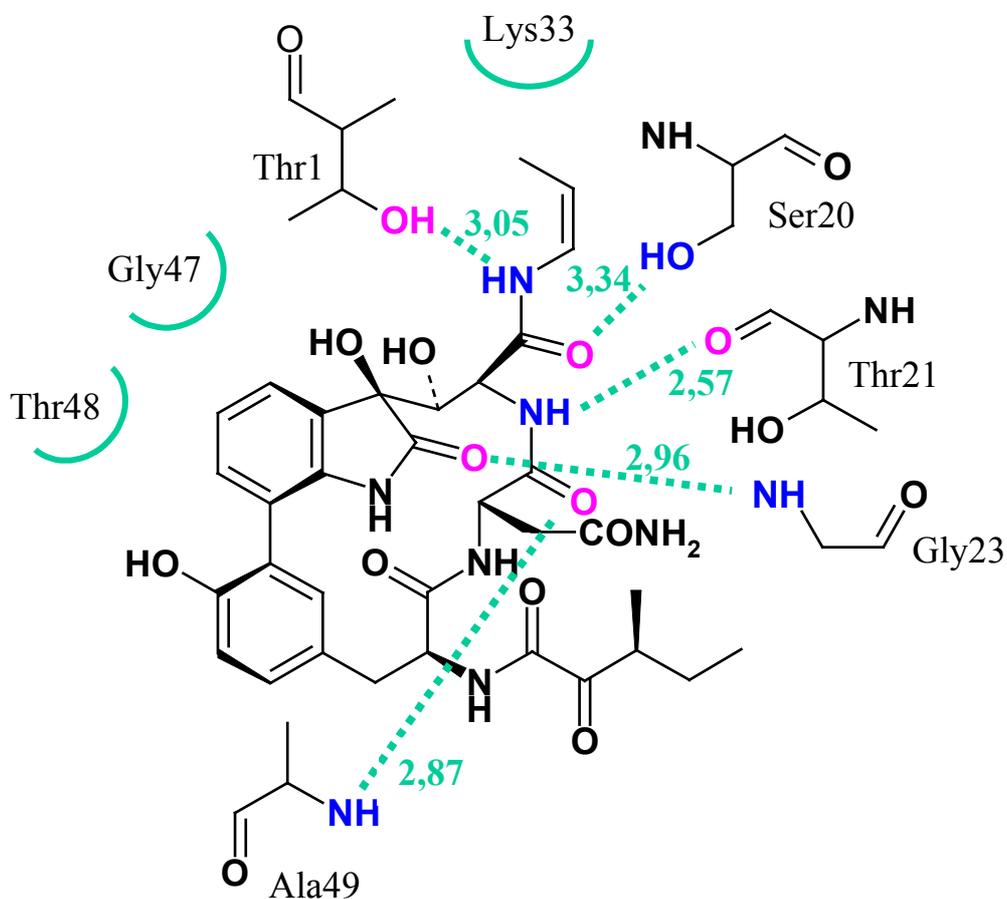


Abbildung 3.1: Schematischer Überblick über die Wechselwirkung von TMC-95A und dem „active site“ der Proteasomuntereinheit $\beta 2$. Die Wasserstoffbrücken sind als grün gepunktete Linien mit ihrer Länge in Å angegeben, nicht-polare Wechselwirkungen als grüne Halbkreise. Wasserstoffdonoren sind blau markiert und -akzeptoren magenta.

Die nicht-kovalente Wechselwirkung wird im wesentlichen durch fünf Wasserstoffbrücken zwischen dem gestreckten Peptidrückgrat und dem Proteasom vermittelt, ähnlich einer antiparallelen β -Faltblattstruktur. Ausgehend von dieser Beobachtung lässt sich nun der komplexe Naturstoff zu einer reduzierten Struktur vereinfachen (Abb. 3.2), die aufgrund des gleichen geometrischen Aufbaus weiterhin die Fähigkeit zur korrekten Anordnung der essentiellen Wasserstoffbrücken haben sollte.

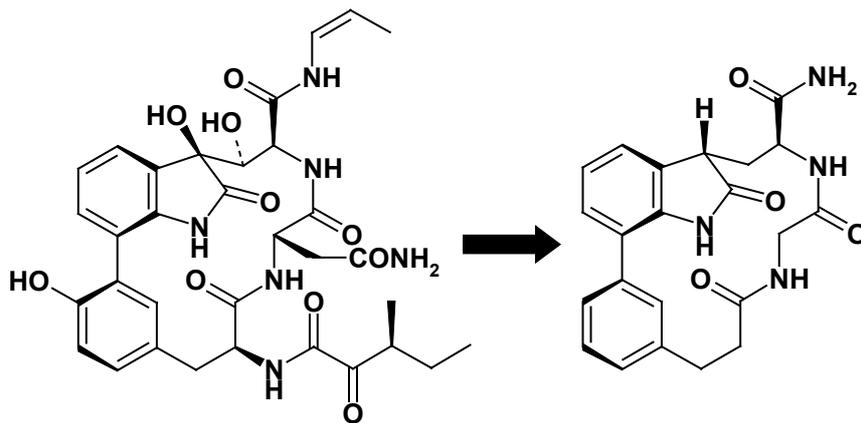


Abbildung 3.2: Reduktion des Naturstoffes TMC-95A auf die Minimalstruktur.

Neben dem einfacheren synthetischen Zugang zeigt dieser Ansatz noch weitere Vorteile. Gemäß Lipinskis „Rule of 5“ (Lipinski *et al.*, 1997) sollte das Molekulargewicht des einzusetzenden Wirkstoffes nicht mehr als fünfhundert betragen. Eine Reduktion der Masse von TMC-95A ist also geboten. Des weiteren zeigt sich, dass die stark elektrophile α -Ketoamidfunktion nicht nennenswert zur Bindung beiträgt. Dies ist insoweit von Vorteil, da die α -Ketoamidgruppe als reaktive Kopfgruppe zum Design von Inhibitoren der Serin-/Cysteinproteasen bekannt ist (Edwards & Bernstein, 1994) und somit die Gefahr von Kreuzreaktionen mit anderen, nicht zu inhibierenden Proteasen gegeben ist. Schliesslich zeigt eine Überlagerung der Hefeproteasom/TMC-95A-Struktur mit der Struktur von Hefeproteasom/Epoxomicin (Abb. 3.3), dass die Propenylgruppe in die S1-Tasche und die Asparaginseitenkette in die S3-Tasche des Proteasoms ragt.

Da beim Proteasom in allen drei Aktivitäten die Aminosäureseitenketten, welche die Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat des TMC-95A eingehen, konserviert sind, ist

anzunehmen, dass durch geschickten Austausch der Reste für S1- und S3-Tasche eine selektive Adressierung der chymotryptischen, tryptischen oder PGPH-Aktivität möglich sein sollte.

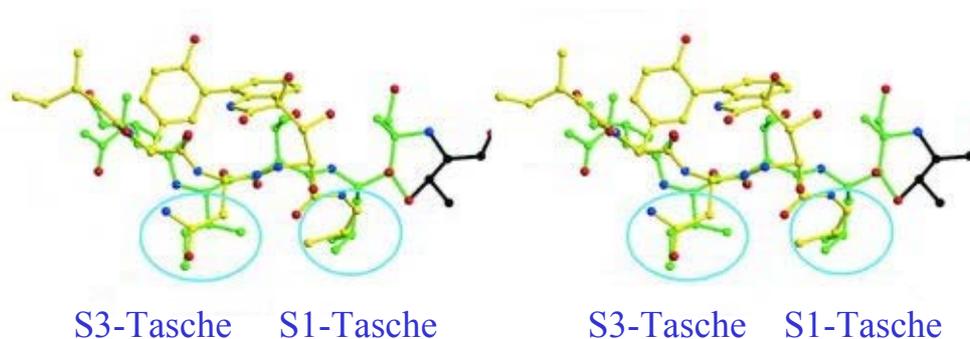


Abbildung 3.3: Stereodarstellung der Überlagerung von TMC-95A (gelb) und Epoxomicin (grün) als Morpholinoringaddukt mit dem „active site“ Threoninrest. Die blauen Kreise verdeutlichen, dass TMC-95A analog Epoxomicin in die S1- und S3-Tasche des Proteasoms bindet.

Da jedoch in einer Kristallstruktur die Einflüsse von anderen Faktoren, z. B. hydrophoben Wechselwirkungen, schwer bestimmbar sind, muss der Konzeptansatz durch Synthese nachgewiesen werden. Deshalb wurde eine Testverbindung gewählt, anhand derer die Richtigkeit des Designansatzes bewiesen werden kann. Hierzu wurde eine Verbindung gewählt (Abb. 3.4), die der abgeleiteten Minimalstruktur entspricht und im Vergleich zum Naturstoff ähnliche Reste besitzt. Dadurch sollten z. B. unterschiedlich starke Bindungen mit den Enzymtaschen des Proteasoms vermieden werden. Im Folgenden wird dieses TMC-95A Analogon als MK258 bezeichnet.

Bei MK258 wurde gegenüber TMC-95A der Propenylamidrest durch eine Propylamidgruppe ersetzt, währenddessen der Asparaginrest beibehalten wurde. Um den synthetischen Zugang zur Testverbindung zu vereinfachen, wurde der N-Terminus des Tyrosinderivates durch eine Z-Schutzgruppe blockiert und die im Naturstoff TMC-95A freie Hydroxylgruppe methyliert. Wie aus der Kristallstruktur ersichtlich ist, sollten diese Modifikationen zu keinen großen Effekten in der enzymkinetischen Aktivität führen, da diese Reste des Moleküls in den Lösungsmittelbereich des Enzyms zeigen. Des Weiteren ist aus Arbeiten mit kovalent bindenden

Peptidinhibitoren bekannt, dass der Einfluss von Seitenketten ab der Position S5 auf die Hemmeigenschaften vernachlässigbar klein ist (Bogyo *et al.*, 1998)

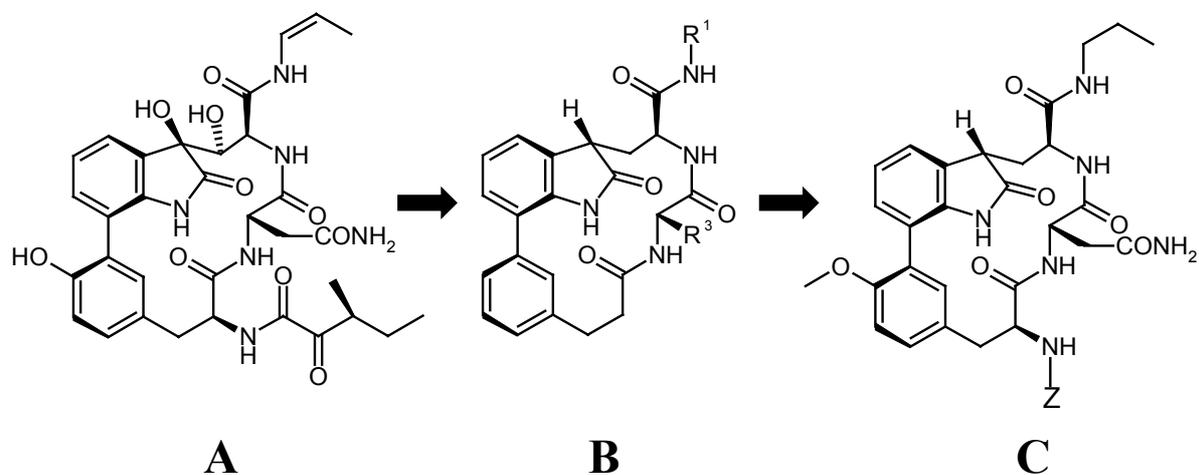


Abbildung 3.4: A) Struktur des Naturstoffes TMC-95A; B) aus der Kristallstruktur abgeleitete Minimalstruktur mit Resten R¹ und R³ als Seitenketten für die S1- und S3-Enzymtaschen; C) Testverbindung MK258 mit Propenylamid als R1-Rest und Asparagin als R3-Rest.

3.2 Synthesepfad zur Darstellung von TMC-95A Analoga

3.2.1 Synthese von strukturell verwandten Peptidwirkstoffen

Herausragendes Strukturmerkmal von TMC-95A als auch von MK258 ist die Phenyl-Oxindolbrücke. Eine ähnliche Struktur ist bei keinen anderen synthetisierten Peptidwirkstoffen bekannt. Ein ähnliches Strukturmotiv in Form einer Phenyl-Indolbrücke findet sich jedoch bei Chloropectin (**20**, Abb. 3.5) (Matsuzaki *et al.*, 1994), Complestatin (**21**, Abb. 3.5) (Kaneko *et al.*, 1989), Diazonamid (Lindquist *et al.*, 1991) und den Kistamicinen (Naruse *et al.*, 1993a; Naruse *et al.*, 1993b).

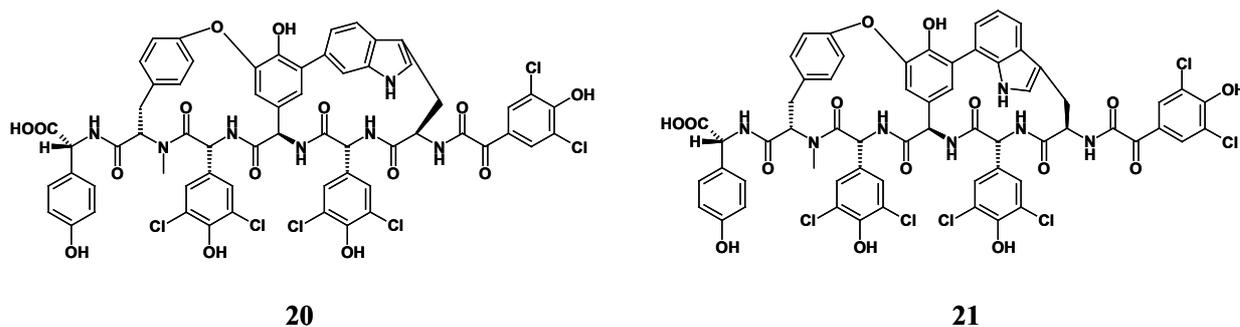


Abbildung 3.5: Struktur von Complestatin (**20**) und Chloropectin (**21**).

Erste Studien zur Synthese des 16-gliedrigen Phenyl-Indol-verbrückten Chloropectinfragmentes bzw. des entsprechenden 17-gliedrigen Complestatinfragmentes (Gurjar & Tripathy, 1997) wurden durchgeführt, wobei allerdings sämtliche Cyclisierungsstrategien fehlschlügen. Die erste erfolgreiche Makrocyclisierung wurde im Rahmen von Synthesestudien an Kistamicinen von der Arbeitsgruppe Beugelmans (Carbannelle *et al.*, 1998a; Beugelmans *et al.*, 1999) beschrieben. Zwar führten auch diese Arbeiten zu keiner erfolgreichen Cyclisierung durch Makrolactamisierung, jedoch konnte durch eine Ni^0 -katalysierte intramolekulare Cyclisierung als Schlüsselschritt der Ring geschlossen werden (Abb. 3.6). Allerdings konnte nur eine maximale Ausbeute von 17% für den 17-gliedrigen bzw. 1% für den 16-gliedrigen Ring des Modellsystems erreicht werden.

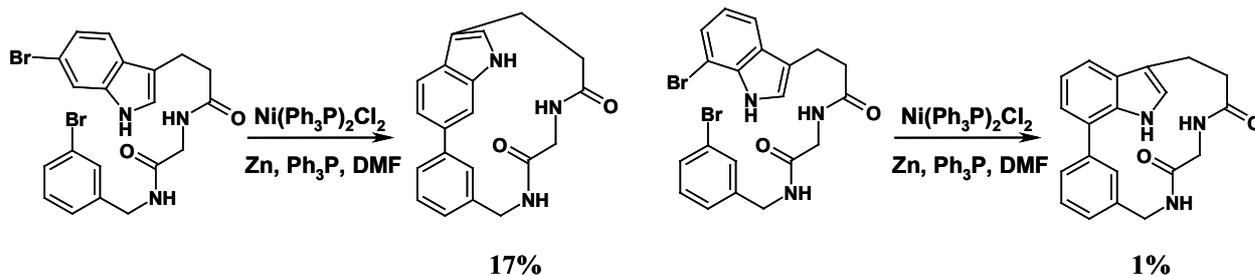


Abbildung 3.6: Synthese des 17- bzw. 16-gliedrigen Modellsystems nach Beugelmans (Carbonelle *et al.*, 1998a; Beugelmans *et al.*, 1999).

Die bisher wohl am besten ausgearbeitete Synthese von Chloropectin und Complestatin wurde in der Arbeitsgruppe Rich (Elder & Rich, 1999) entwickelt. In

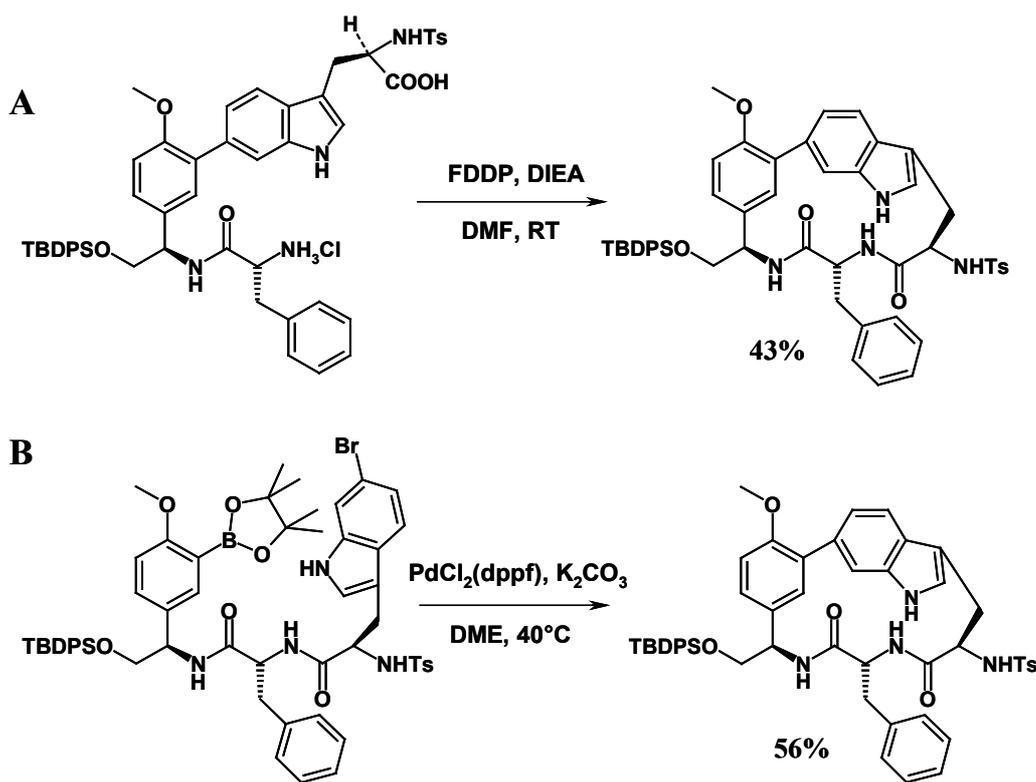


Abbildung 3.7: Synthese der 17-gliedrigen Complestatinmodellverbindung durch A) Makrolactamisierung und B) intramolekulare Suzuki-Kupplung.

diesen Synthesen gelang es sowohl durch Makrolactamisierung als auch durch eine intramolekulare Suzuki-Kupplung zwischen einer modifizierten Tyrosin- und

Tryptophanseitenkette eine Cyclisierung zu einem 17-gliedrigen Modellmakrocyclus analog der Complestatin-Struktur zu erreichen (Abb. 3.7).

Dabei berichten die Autoren, dass interessanterweise die Cyclisierung zum geschlossenen Ringsystem durch Suzuki-Kupplung bereits bei 40 °C verläuft, während die entsprechende lineare Suzuki-Kupplung zum Vorläuferprodukt für die Makrolactamisierung jedoch 80 °C als Reaktionstemperatur benötigt. Die Autoren erklären die milderen Reaktionsbedingungen durch eine Präorganisation des Moleküls, die den Ringschluss vereinfacht.

Analog zu einer von Myricanolglykosiden bekannten Umlagerung (Sakurai *et al.*, 1991) vom 13-gliedrigen Myricanon-Ringsystem zum 12-gliedrigen Isomyricanon-system durch BF_3 -Etherat gelang eine säurekatalysierte Ringverengung des Complestatinsystems zum 16-gliedrigen Chloropeptinsystem (Abb. 3.8).

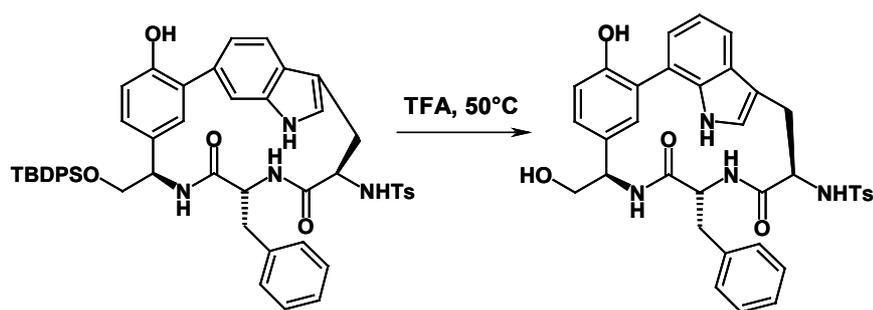


Abbildung 3.8: Säurekatalysierte Verengung des 17-gliedrigen Complestatin- zum 16-gliedrigen Chloropeptin-Ringsystem.

3.2.2 Synthesepläne zur Darstellung vom MK258

Schlüsselschritt zur Synthese von MK258 ist die Cyclisierungsreaktion zum gespannten 18-gliedrigen Ringsystem. Dabei sind, analog zur Synthese von Complestatin und Chloropeptin, zwei unterschiedliche Cyclisierungsmethoden denkbar; nämlich eine Makrolactamisierung oder eine intramolekulare Suzuki-Reaktion zwischen einem Borsäureester und einem Arylhalogenid. Aufgrund der

größeren Erfahrung in unserem Labor wurde in erster Linie eine Cyclisierung über eine ringschliessende Makrolactamisierung bevorzugt.

Wie eine Analyse der Literatur zur Synthese der verwandten Peptidwirkstoffe zeigt, scheint insbesondere eine direkte Verknüpfung der Tyrosinseitenkette mit der C-7-Position des Indols bei einer zeitgleich stattfindenden bzw. später durch Peptidkupplung erfolgenden Cyclisierung als problematisch. In der Arbeitsgruppe von Rich wurde dieses Problem elegant durch eine Suzuki-Kupplung zwischen der Tyrosinseitenkette und der C-6-Position des Indols und anschließender säurekatalysierter Ringverengung zur C-7-Position umgangen. Da bei MK258 ein dem Chloropectin vergleichbares System vorliegt, ließ sich vermuten, dass eine vorherige

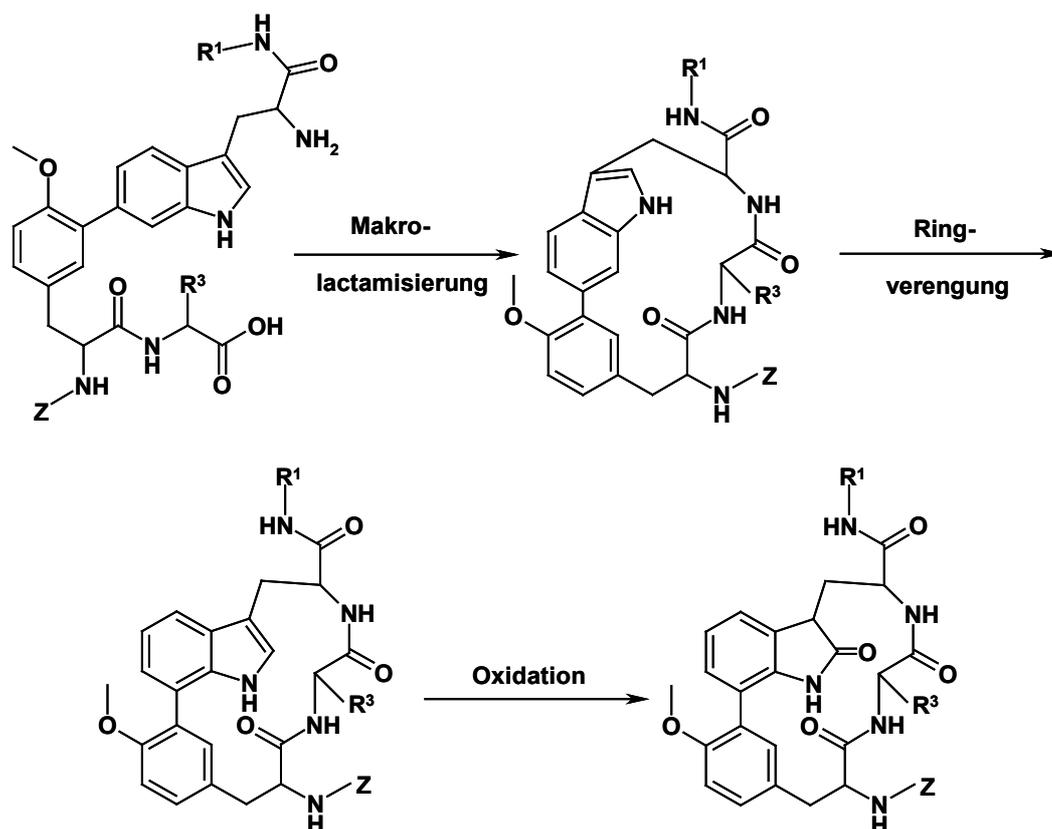


Abbildung 3.9: Synthesepfad von MK258 analog der Chloropectinsynthese von Elder & Rich (Elder & Rich, 1999).

Kupplung zwischen der Tyrosinseitenkette und der C-6-Position des Indols mit anschließender Umlagerung unter Säurekatalyse zur Tyrosin-C-7-Indol-Brücke von

Vorteil sein könnte. Nach dieser Umlagerung sollte die Oxidation der Indolseitenkette zum gewünschten Oxindolylalanin erfolgen (Abb. 3.9).

Zudem war auch ein direkter Weg zur Synthese von MK258 denkbar, bei welcher als letzter Syntheseschritt eine Makrolactamisierung durchgeführt werden sollte. Durch eine vorherige Oxidation des Indol- zum Oxindolssystem sollte der nun sp^3 -hybridisierte C-3-Kohlenstoff eine zur Cyclisierung günstigere Geometrie erlauben, wodurch der Nachteil der erhöhten Ringspannung durch die bereits bestehende Tyrosin-C-7-Oxindolyl-Brücke eventuell ausgeglichen werden könnte (Abb. 3.10).

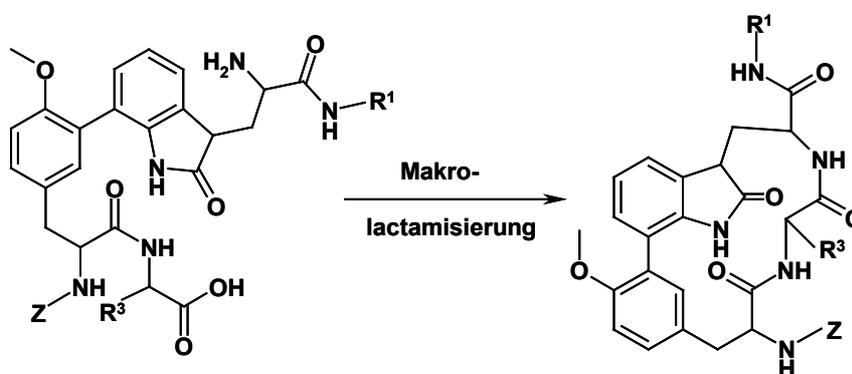


Abbildung 3.10: Synthese von MK258 durch „direkte“ Makrolactamisierung.

Da die Suzuki-Kupplung zwischen einem aromatischen Borsäureester und einem Arylhalogenid durchgeführt wird, sind prinzipiell zwei unterschiedliche Reaktionswege möglich. Entweder wird ein Tyrosinboronsäureester mit einem Halogentryptophan oder ein Tryptophanboronsäureester mit einem Halogen-substituierten Tyrosin umgesetzt. In Modellstudien (Carbonnelle *et al.*, 1998b) konnte gezeigt werden, dass eine Suzuki-Kupplung zwischen einem Tyrosinboronsäureester und einem Halogentryptophan die höheren Ausbeuten liefert. Deshalb wurde dieser Ansatz auch in den Kistamicin-, Complestatin- und Chloropeptinsynthesen verfolgt.

Bei beiden unterschiedlichen Syntheseansätzen wird als gemeinsamer Synthesebaustein ein geeignet geschützter Tyrosinborsäureester **22** (Abb. 3.11)

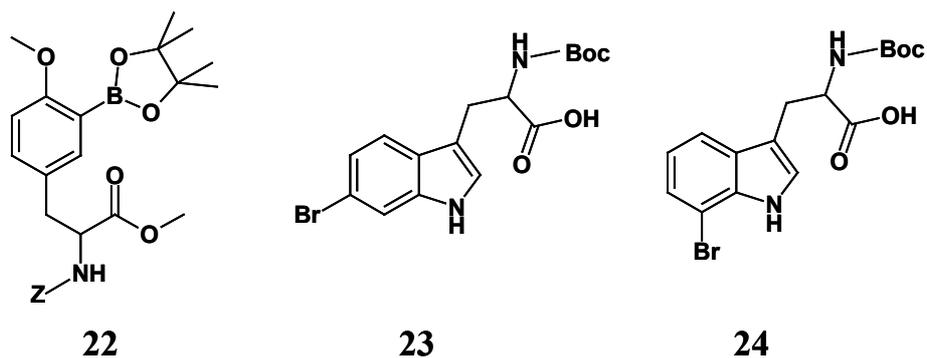


Abbildung 3.11: *Strukturen des Tyrosinboronsäureesters 22 und den unterschiedlich substituierten Halogentryptophanen 23 und 24.*

benötigt. Allerdings ist als weiterer Synthesebaustein auch ein unterschiedlich substituiertes Halogentryptophanderivat notwendig. Die Synthese über Ringverengung erfordert ein an C-6-Position substituiertes Halogenderivat **23**, währenddessen in der „direkten“ Synthese der an C-7-Position substituierte Tryptophanbaustein **24** eingesetzt werden könnte (Abb. 3.11).

3.3 Synthese von MK258

3.3.1 Synthese des L-Tyrosinborsäureesters

Ausgehend vom käuflich erwerblichen L-3-Iodotyrosin wurde zuerst ein vollgeschütztes Derivat hergestellt, welches anschliessend durch Suzuki-Miyaura-Kupplung zum Borsäureester umgesetzt wurde (Abb. 3.12).

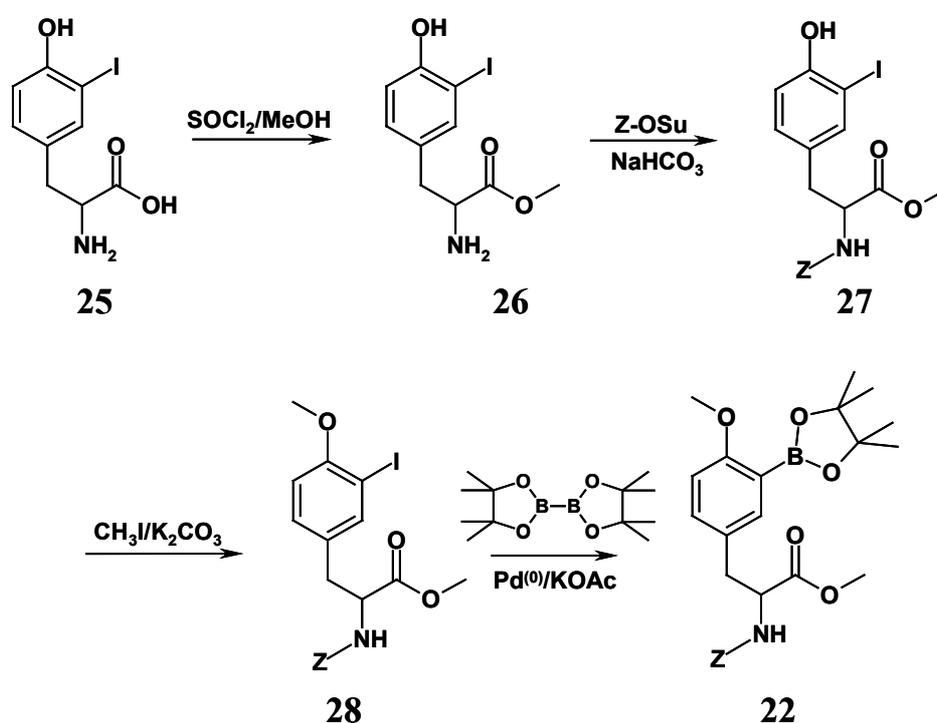


Abbildung 3.12: Schema des Reaktionsweges zum vollgeschützten Tyrosinborsäureester 22.

Die Darstellung des vollgeschützten 3-Iodotyrosinderivates erfolgte durch etablierte Reaktionen unter Standardbedingungen. Der Methylester wurde durch Thionylchlorid/Methanol-Veresterung erhalten, anschliessend bei RT in Dioxan/Wasser (1:1) über Nacht in das N^α -geschützte Z-Derivat mittels Z-OSu überführt. Methylierung der Seitenketten-Hydroxylfunktion mit Methyljodid und Kaliumcarbonat als Base erfolgte in Aceton bei 40 °C. Diese drei Reaktionsschritte verlaufen in einer Gesamtausbeute von 72%. Der so voll geschützte Baustein wurde anschliessend mittels Suzuki-Miyaura-Kupplung (Ishiyama *et al.*, 1995) zum Borsäureester umgesetzt. Dabei

wurden die beschriebenen Standardbedingungen, d. h. drei Äquivalente Kaliumacetat als Base in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel eingesetzt. Die Autoren beschreiben, das unter diesen Bedingungen das als Nebenprodukt auftretende Dimer einer Suzuki-Homokupplung unterdrückt werden kann. Allerdings entstand unter diesen Bedingungen das Dimer als Nebenprodukt in etwa 30% Ausbeute. Nur durch einen 1,5-fachen Überschuss des Diboron-Edduktes konnte dieses Nebenprodukt eliminiert und somit eine Produktausbeute von 69% erhalten werden. Das Auftreten eines Homodimers lässt sich vielleicht durch den Einfluss der *ortho*-Methoxygruppe erklären, da bekannterweise Substituenten in *ortho*-Stellung besonders wenn raumfüllend eine Homodimerisierung fördern (Suzuki & Miyaura, 1995; Suzuki, 1999).

3.3.2 Synthese des L-6-Bromotryptophanderivates

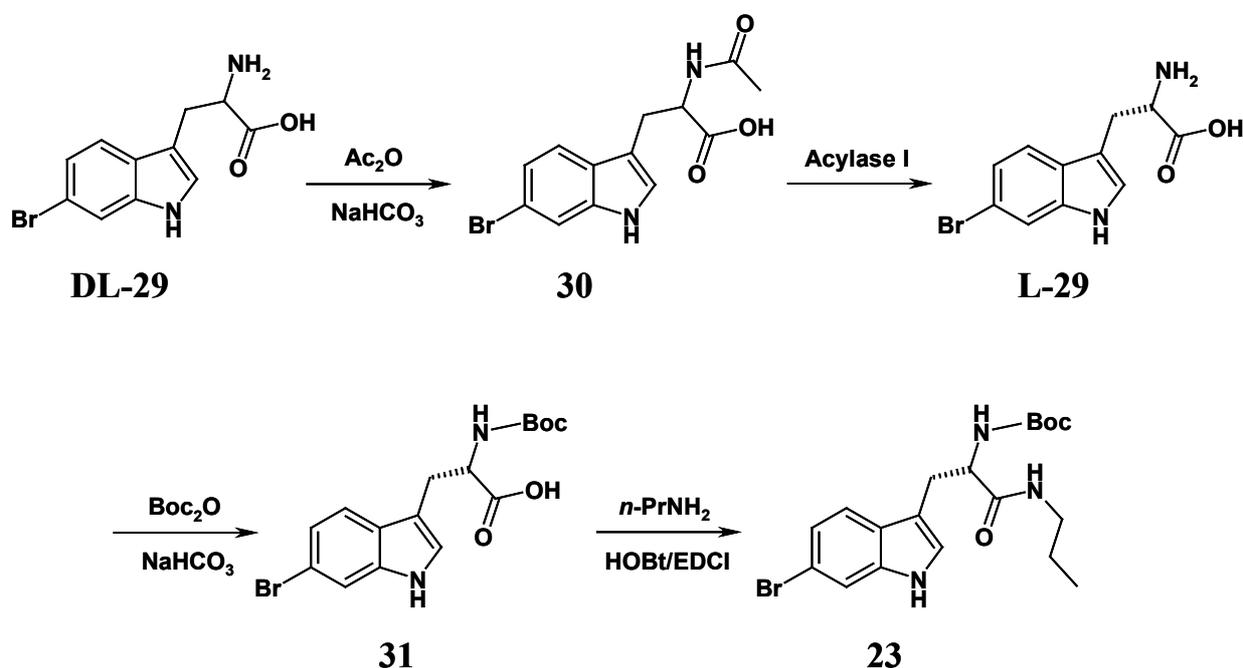


Abbildung 3.13: Schema des Reaktionsweges zum 6-Bromotryptophanderivat **23**.

Racemisches DL-6-Bromotryptophan ist käuflich erwerbbar und wurde als Edukt zur Synthese von **23** eingesetzt (Abb. 3.13). Die Racemattrennung von DL-6-

Bromotryptophan wurde auf enzymatischen Wege durchgeführt. Dazu wurde die freie Aminosäure in das *N*-acetylierte Derivat **30** überführt und durch Acylase I von *Aspergillus melleus* bei 37 °C in einem Phosphatpuffer (pH 7,5) enantioselektiv deacetyliert. Diese Acylase ist besonders zur Trennung von großen, hydrophoben Aminosäuren (Chenault *et al.*, 1989) geeignet. Dabei wird nur die L-Aminosäure hydrolysiert, während das D-Isomer als *N*-Acetylderivat zurückbleibt. L-**29** wurde anschliessend mit (Boc)₂O in Dioxan/Wasser (1:1) bei RT zu **31** umgesetzt und dann mit *n*-Propylamin und EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz in den Synthesebaustein **23** überführt.

3.3.3 Synthese des L-7-Bromotryptophanderivates

Zur Synthese von dem 7-Bromotryptophanderivat **24** wurden zwei unterschiedliche Ansätze untersucht.

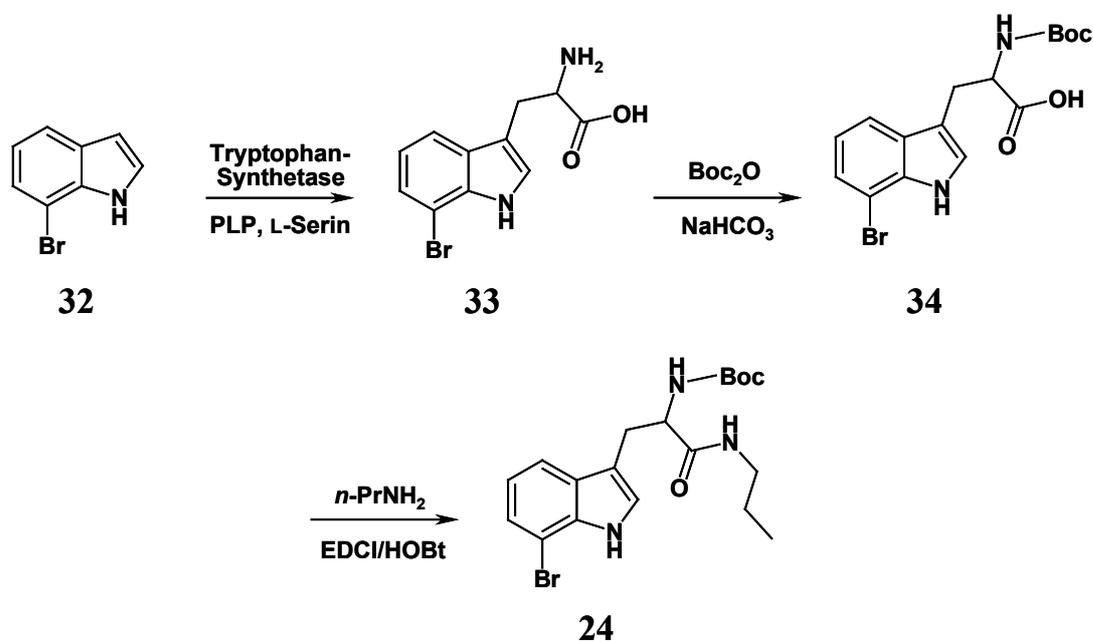


Abbildung 3.14: Schema des enzymatischen Reaktionsweges zum 7-Bromotryptophanderivat **24**.

Der erste Reaktionsweg war eine enzymatische Synthese des Tryptophans, ausgehend von 7-Bromoindol (Abb. 3.14). Aufgrund der geringen Löslichkeit von **32** in wässrigen Pufferlösungen wurde die enzymatische Synthese in einem Toluol/Puffer-Zweiphasensystem durchgeführt (Lee & Phillips, 1992). Nach Entfernen von überschüssigem **32** durch Extraktion mit Ethylacetat wurde **33** mit *n*-Butanol aus der wässrigen Phase extrahiert. Allerdings konnte nur eine Ausbeute von 9% erreicht werden. Anschliessend wurde **33** mit (Boc)₂O unter Standardbedingungen zu **34** umgesetzt. Nach Kupplung mit *n*-Propylamin und EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz wurde **24** nach chromatographischer Aufreinigung erhalten.

Der zweite Syntheseweg beinhaltet die Synthese des racemischen DL-7-Bromotryptophan mit anschliessender Racemattrennung, analog der Racemattrennung bei der Darstellung des 6-Bromotryptophanderivates (Abb. 3.15). Die dabei eingesetzte Reaktionssequenz entspricht einer in unserem Labor durchgeführten nicht-natürlichen Azulenaminosäuredarstellung (Loidl *et al.*, 2000a). Ausgehend von 7-Bromoindol **32** wurde das Graminderivat **35** durch Umsetzung mit einer Lösung von N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan, Paraformaldehyd und Eisessig erhalten. **35** wurde anschliessend in der minimal benötigten Menge Ethanol gelöst und mit Methyljodid umgesetzt. Das ausgefallene Produkt **36** wurde abgetrennt und mit Diethylacetaminomalonsäure-diethylester als achirales Glycin-Äquivalent zu **37** reagieren lassen. Nach Verseifung der Esterfunktionen mit Kaliumhydroxid in Ethanol wurde die freie Malonsäure **38** erhalten, welche anschliessend säurekatalysiert unter β -Decarboxylierung zur racemischen *N*-Acetyl-geschützten Aminosäure **39** umgesetzt wurde. Normalerweise wird zu einer solchen Decarboxylierung Salzsäure als Katalysator zugegeben; aufgrund der Empfindlichkeit der Indolseitenkette des Tryptophans gegenüber Halogenidionen wurde jedoch diese hier gegen Phosphorsäure als Katalysator ausgetauscht. Ausgehend von diesem racemischen Produkt erfolgte die Racemattrennung unter den gleichen Bedingungen wie bei 6-Bromotryptophan. Die L-Aminosäure **33-2** wurde selektiv durch Acylase I von *Aspergillus melleus* hydrolysiert, anschliessend zum N ^{α} -Boc-geschützten Derivat **34-2** umgesetzt und mit *n*-Propylamin und EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz zum fertigen Baustein **24-2** transformiert.

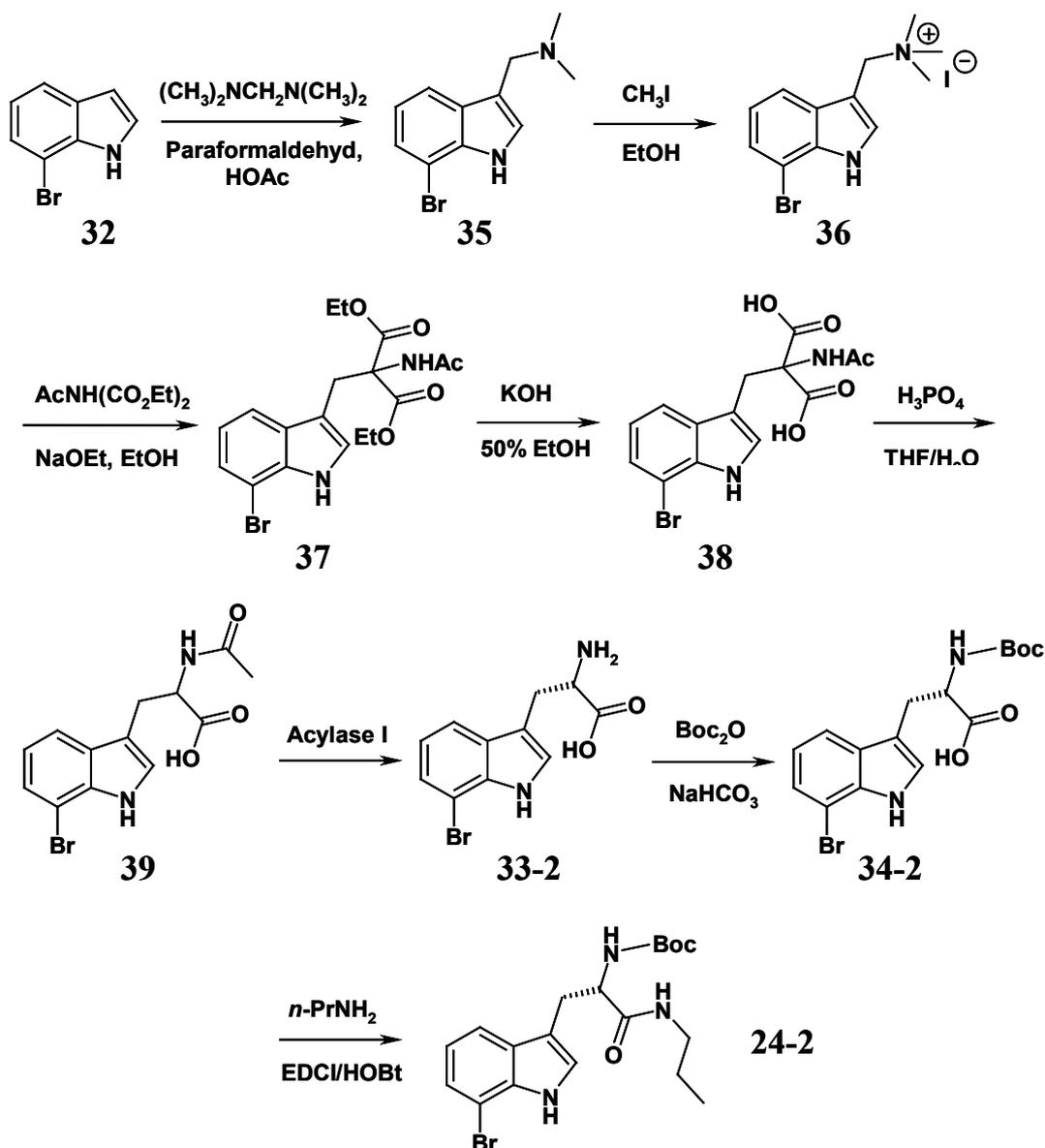


Abbildung 3.15: Reaktionsschema zur Synthese des 7-Bromotryptophanderivates **24-2** mit anschliessender enzymatischer Racemattrennung.

3.3.4 Cyclisierung durch Makrolactamisierung mit anschliessender Ringverengung

Ausgehend von den beiden zuvor synthetisierten Verbindungen Tyrosinboronsäureester **22** und 6-Bromotryptophanderivat **23** wurde versucht, eine vereinfachte Modellverbindung zu synthetisieren, um das Cyclisierungsmodell zu überprüfen (Abb. 3.16).

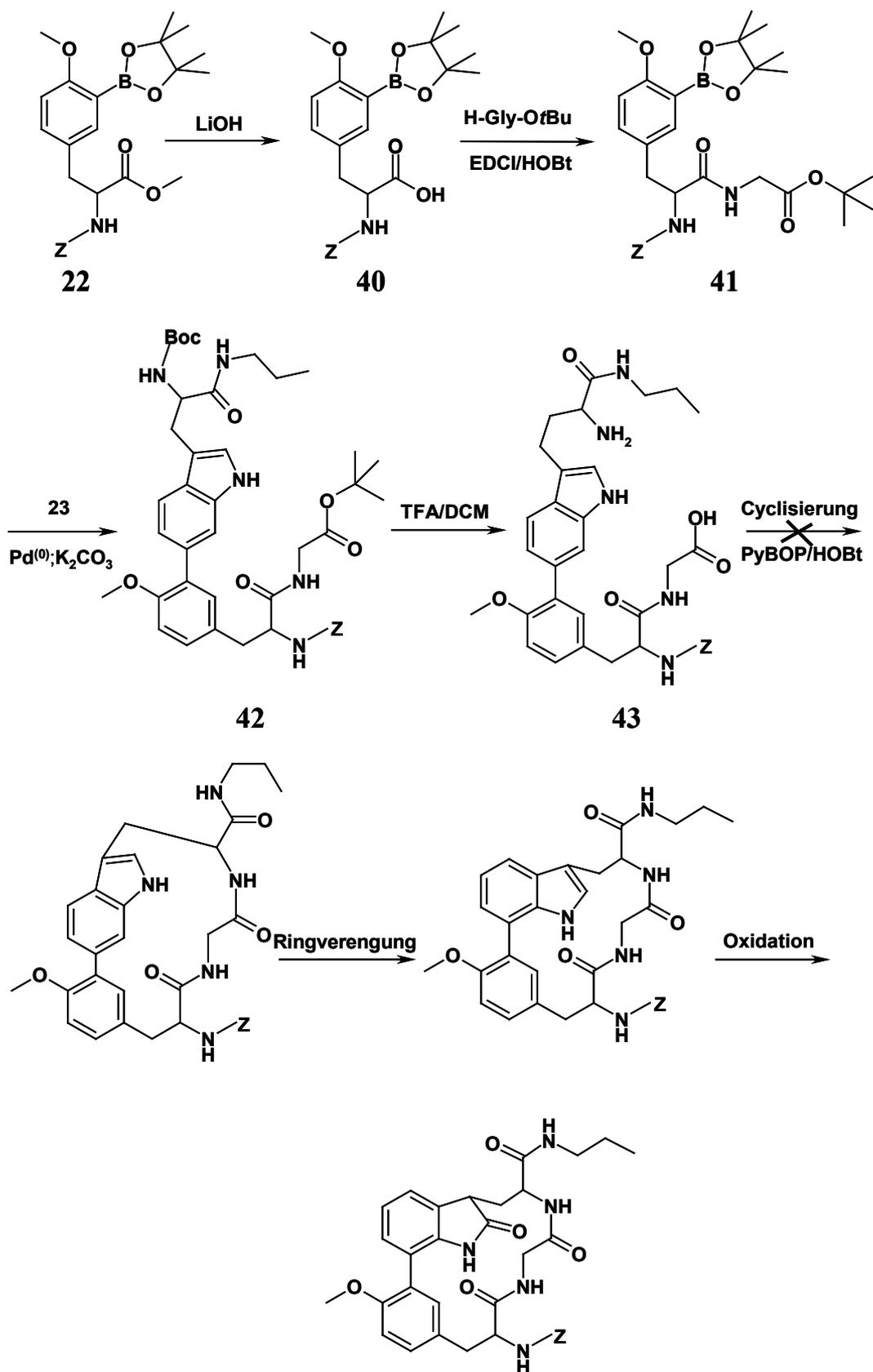


Abbildung 3.16: Schema zur Darstellung einer Modellverbindung zur Überprüfung der Cyclisierungsstrategie. Eine Cyclisierung von **43** zum gespannten Makrolactam war nicht möglich.

Zuerst wurde der Tyrosinboronsäureester **22** mit Lithiumhydroxid zur freien Säure **40** verseift und mittels EDCI/HOBt mit Glycin-*tert*-butylester zur Suzukivorstufe **41** verknüpft. Die Suzuki-Kupplung zu **42** wurde mit **23** als Halogenkomponente und **41** als Boronsäurekomponente bei 80 °C und Kaliumcarbonat als anorganische Base durchgeführt. Abspalten der Schutzgruppe mit TFA/DCM (1:1) lieferte die lineare Vorstufe **43**, deren Makrocyclisierung mit PyBOP/HOBt (Coste *et al.*, 1990; Behrendt *et al.*, 1999) in DMF bei einer Verdünnung von 5×10^{-5} M jedoch wiederholt fehl-schlug; stattdessen konnte als Nebenprodukt nur das Homodimer **44** in wechselnden Ausbeuten isoliert werden.

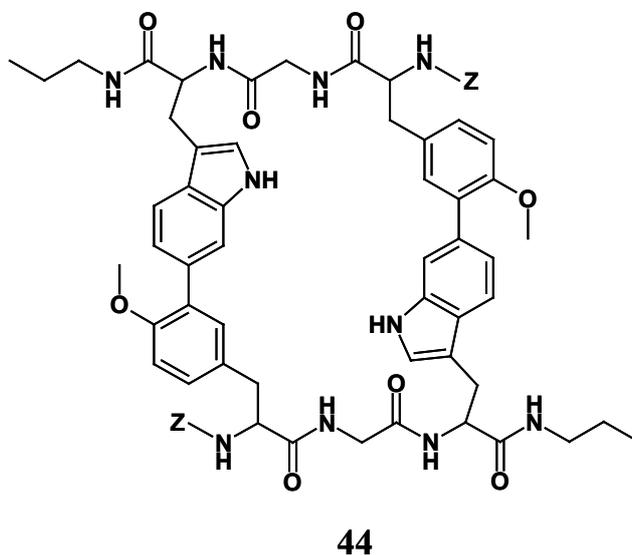


Abbildung 3.17: Struktur des bei der Cyclisierung entstehenden Dimers **44**.

Durch MS/MS-Kopplung konnte das Dimer **44** als Produkt nachgewiesen werden, weil **44** im ESI-MS-Spektrum aufgrund der geringen Massenauflösung nur die Massen $m/z = 1224,2$ und $m/z = 612,4$ zeigt. Diese können sowohl vom gewünschten Monomer stammen ($[M+H]^+ = 612$; $[2M+H]^+ = 1224$), als auch vom entstandenen Dimer **44** ($[M+H]^+ = 1224$, $[M+2H]^{2+} = 612$). Durch Tandem-MS/MS-Experimente konnte das Produkt jedoch eindeutig als Dimer **44** identifiziert werden, da neben dem Molekülpeak $[M+H]^+$ Spaltprodukte gefunden wurden, die nur von **44** stammen können ($[M+H-Gly]^+ = 1164,1$). Interessanterweise zeigt das NMR-Spektrum nur den

Signalsatz einer monomeren Verbindung, was sich durch eine C_2 -Symmetrie des Moleküls **44** erklären läßt.

Parallel zu unserer Arbeit wurden auch in der Arbeitsgruppe von Rich, welche die Chloropeptinsynthese durch Ringverengung entwickelt hatte, Versuche zur Synthese dieser Art von Modellverbindungen durchgeführt (Estiarte *et al.*, 2001). Die Autoren berichten über den Einsatz unterschiedlicher Cyclisierungsreagenzien wie DPPA/DIEA, FDPP/DIEA, HOAt/EDCI/DIEA, PyBOP/DIEA und einer versuchten Makrolactamisierung zwischen einem Pentafluorphenylester und einer freien Aminogruppe. Sämtliche Cyclisierungsversuche schlugen fehl; einzig isolierbare Komponente war das entsprechende Dimer in Ausbeuten von 10%-45%.

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse wurde dieser Syntheseansatz als nicht durchführbar gewertet und die Synthese auf dem „direkten“ Cyclisierungsweg versucht.

3.3.5 Synthese von MK258 durch „direkte“ Cyclisierung

Die Synthese von MK258 beginnt wiederum mit einer Suzuki-Kupplung (Miyaura & Suzuki, 1995, Suzuki, 1999) mit Pd(dppf)Cl₂ als Katalysator und Kaliumcarbonat als Base in DME/Wasser bei 80 °C (Abb. 3.18). Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen wurde neben der erwünschten Biarylkupplung, auch der Methylester hydrolytisch gespalten. Da für den nächsten Reaktionsschritt, das ist die Kondensation von **45** mit Asparagin-*tert*-butylester-hydrochlorid zu **46**, der freie C-Terminus benötigt wird, ist diese „Nebenreaktion“ erwünscht. Jedoch verlief die Hydrolyse nicht bei jedem Reaktionsansatz quantitativ und deshalb wurde das isolierte Rohprodukt der Suzuki-Kupplung noch einmal mit Lithiumhydroxid in Acetonitril/Wasser über Nacht verseift, aufgearbeitet und anschliessend durch Säulenchromatographie gereinigt. **46** wurde anschliessend zu **47** umgesetzt. In diesem Reaktionsschritt werden sowohl die Boc-Gruppe und der *tert*-Butylester gespalten als auch das Tryptophan zum Oxindolylalanin oxidiert (Savige & Fontana, 1980). Durch die Oxidation am C2 des Indolringes entsteht auch am C3-Kohlenstoff ein neues

Stereozentrum, dies jedoch in unselektiver Art. Aufgrund einer Ketoenol-Tautomerie wandeln sich die beiden entstehenden Diastereomere ineinander um, so dass beide im Verhältnis 1:1 vorliegen. Bei der Oxidation mit DMSO/HCl entsteht als Nebenprodukt

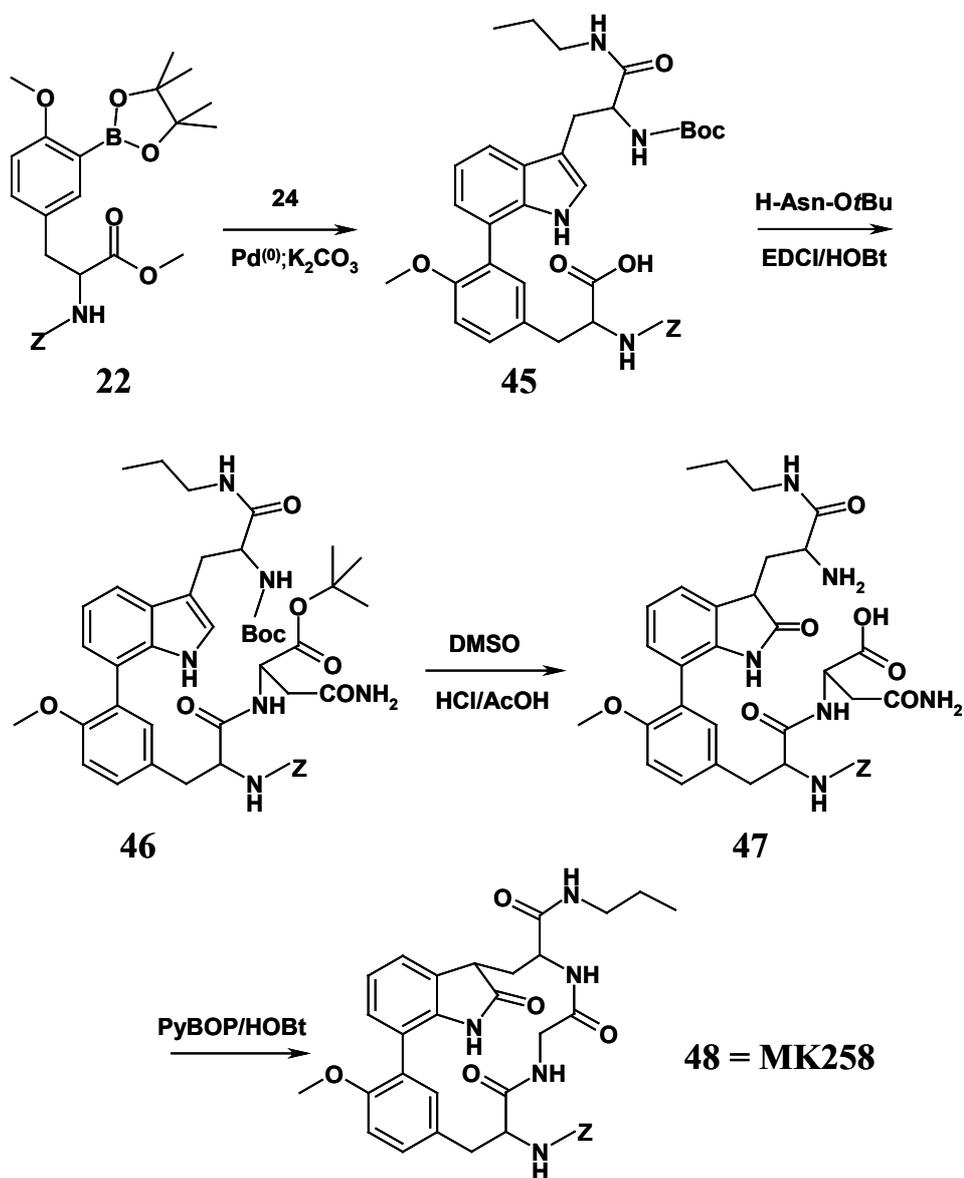


Abbildung 3.18: Reaktionsschema zur Darstellung von MK258 durch „direkte“ Makrolactamisierung.

in 15-20% Ausbeute 2-Chlorotryptophan. Die Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgte durch HPLC und die Ausbeute dieses Reaktionsschrittes betrug 40%. Die folgende Cyclisierung wurde mit PyBOP/HOBt in DMF als Cyclisierungsreagenz

durchgeführt (Coste *et al.*, 1990; Behrendt *et al.*, 1999). Nach 24 Stunden wurde das Reaktionsgemisch durch HPLC gereinigt und das gewünschte MK258 konnte in einer Ausbeute von 40% (bezogen auf die lineare Vorstufe) erhalten werden. Wie durch NMR-Analyse gezeigt werden konnte, entsteht dabei aus dem Diastereomergemisch **47** stereoselektiv nur das „richtige“ Produkt MK258. Da jedoch in der Reaktionsmischung beide Diastereomere nicht mehr nachweisbar sind, lässt sich vermuten, dass eine in der Reaktionslösung vorgeschaltete Ketoenol-Tautomerie die beiden Diastereomere ineinander umwandelt und dass nur das „richtige“ Stereoisomer zum Produkt reagiert.

3.3.6 Energieberechnungen zur Erklärung der unterschiedlichen Reaktivität bei der Cyclisierung

Um möglicherweise die unterschiedlichen Reaktivitäten bei der Cyclisierung zu erklären, wurde versucht, mittels einer Energieminimierung gemodelter Teilstrukturen der Zielmoleküle, einen kausalen Zusammenhang zwischen Reaktivität und Struktur zu finden. Ob eine Reaktion möglich ist oder nicht, hängt von der Differenz der Freien Enthalpie zwischen dem Edukt und dem Übergangszustand der Reaktion ab. Da der Übergangszustand strukturell jedoch nicht charakterisiert werden kann, wurde ein Energievergleich zwischen dem Peptidrückgrat der linearen Vorstufe und dem cyclisierten Produkt durchgeführt. Dabei wurde sowohl das Complestatinpeptid von Rich (Elder & Rich, 1999) berücksichtigt, als auch die beiden Ansätze, d. h. der „indirekte“ bzw. der „direkte“ Weg zur Synthese von MK258 (Abb. 3.19). Ein Vergleich der berechneten Cyclisierungsenergien zeigt, dass die „direkte“ Cyclisierung der C7-Oxindol-Tyrosin-verbrückten Vorstufe gegenüber der „indirekten“ Cyclisierung der C6-Indol-Tyrosin-verbrückten Vorstufe energetisch begünstigt sein sollte. Dieses Ergebnis liess sich durch die experimentellen Daten bestätigen. Dieser Energieunterschied in der Cyclisierungsreaktion kann nur mit der unterschiedlichen Hybridisierung des C3-Atoms des Oxindolrings gegenüber dem Indolring zusammenhängen. Ein durch die Oxidation entstandenes racemisches Gemisch am C3-Chiralitätszentrum reagiert nur unter Ausbildung des „richtigen“ cyclischen

Stereoisomers. Dies würde bedeuten, dass nur die „korrekte“ C3-Konfiguration eine Cyclisierung ermöglicht. Tatsächlich zeigt eine NMR-Analyse von MK258 ein

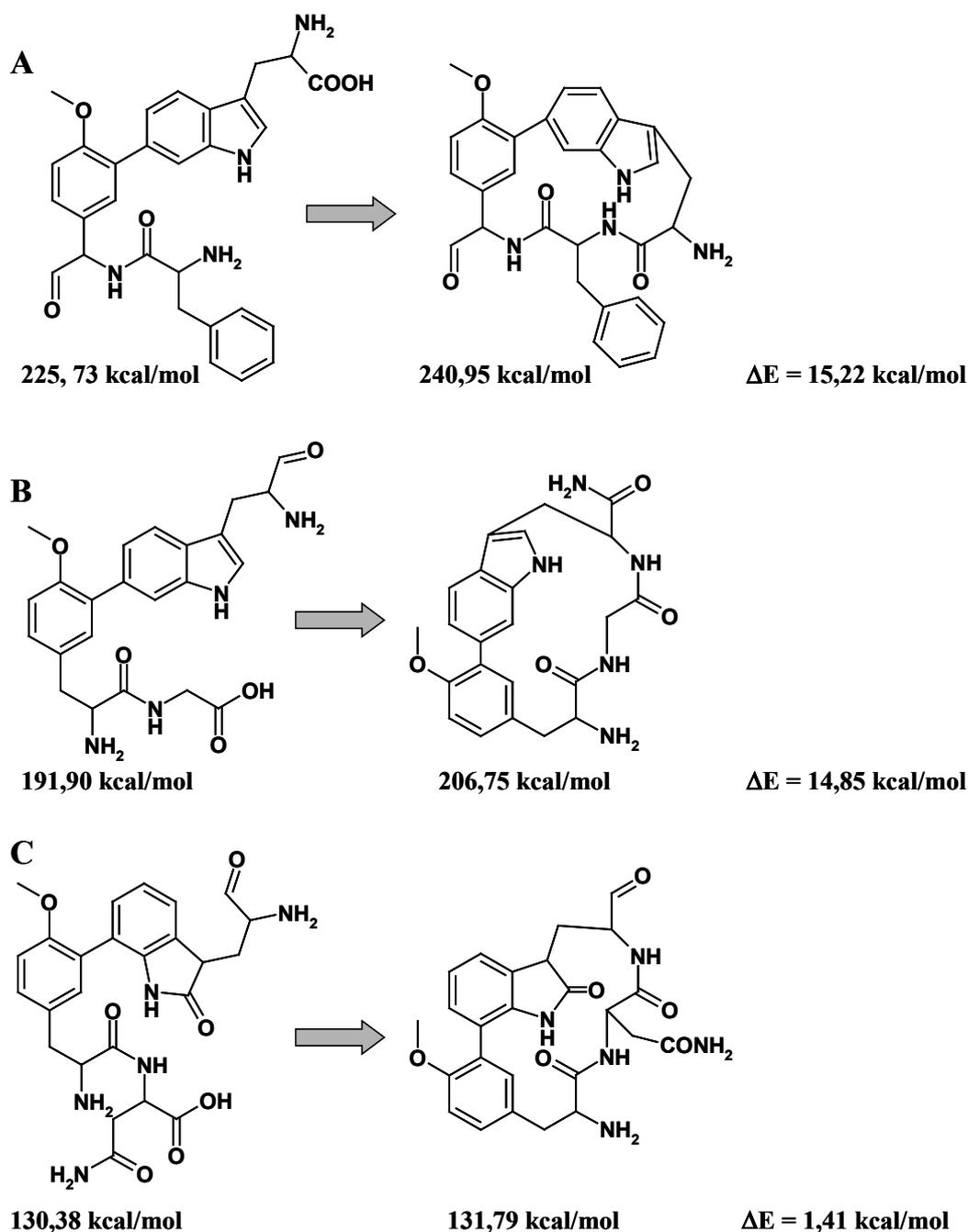


Abbildung 3.19: Struktur und berechnete Energien für die energieminierten offenen und cyclisierten Konformationen; A) Complestatinmodellpeptid nach Rich (Elder & Rich, 1999); B) dem C6-Indol-Tyrosin-verbrückten Modellpeptid; C) dem C7-Oxindol-Tyrosin-verbrückten Modellpeptid.

stark gespanntes Ringsystem, welches sich nur mit einer sp^3 -Hybridisierung am C3-Kohlenstoffatom mit der „richtigen“ Konfiguration ausbilden kann (Abb. 3.20). Demgegenüber würde eine sp^2 -Hybridisierung – wie sie in einem theoretischen 2-Hydroxyindol vorliegen würde – bei der Cyclisierung zu einer Deformation der planaren Aromaten führen. Diese Erklärung widerspricht jedoch der Complestatincyclisierung nach Rich (Rich & Elder, 1999), welches sowohl im berechneten Modell die höchste Energiebarriere zu einer erfolgreichen Cyclisierung besitzt, als auch eine sp^2 -Hybridisierung am C3-Atom des Indolsystems zeigt. Also kann die experimentell gezeigte Cyclisierung zum Complestatin nur aufgrund des Austausches des Tyrosins durch ein 4-Hydroxyphenylglycin erreicht werden, welcher die lineare Vorstufe durch Präorganisation in eine zur Cyclisierung produktive Konformation überführt.

Es zeigt sich also, dass durch thermodynamische Berechnungen eine Vorhersage der Cyclisierungswahrscheinlichkeiten äusserst schwierig ist, da der kinetische Aspekt der Cyclisierung nicht berücksichtigt wird. Wie sich am Complestatinbeispiel zeigt, ist bei Makrocyclisierungen eine eventuell vorhandene Präorganisation einer produktiven Konformation essentiell. Dies lässt sich durch Berechnungen allerdings nur schwer berücksichtigen.

3.4 Struktur und Hemmwirkung von MK258

3.4.1 Strukturanalyse von MK258

Um die Konstitution und räumliche Struktur von MK258 zu ermitteln, wurden verschiedene NMR-Experimente in $[D_6]$ DMSO als Lösungsmittel durchgeführt. Zur Verifizierung der synthetisierten Verbindung als MK258 wurden 2D- 1H DQF-COSY, TOCSY und ROESY Experimente durchgeführt. Entsprechende Zuordnungen und Abstandsparmeter aus NOESY-Spektren erlaubten die Berechnung eines Strukturensembles. Die zwanzig energieärmsten Konformationen wurden mit der aus der Kristallstrukturanalyse (Groll *et al.*, 2001) erhaltenen Struktur von TMC-95A überlagert (Abb. 3.20):

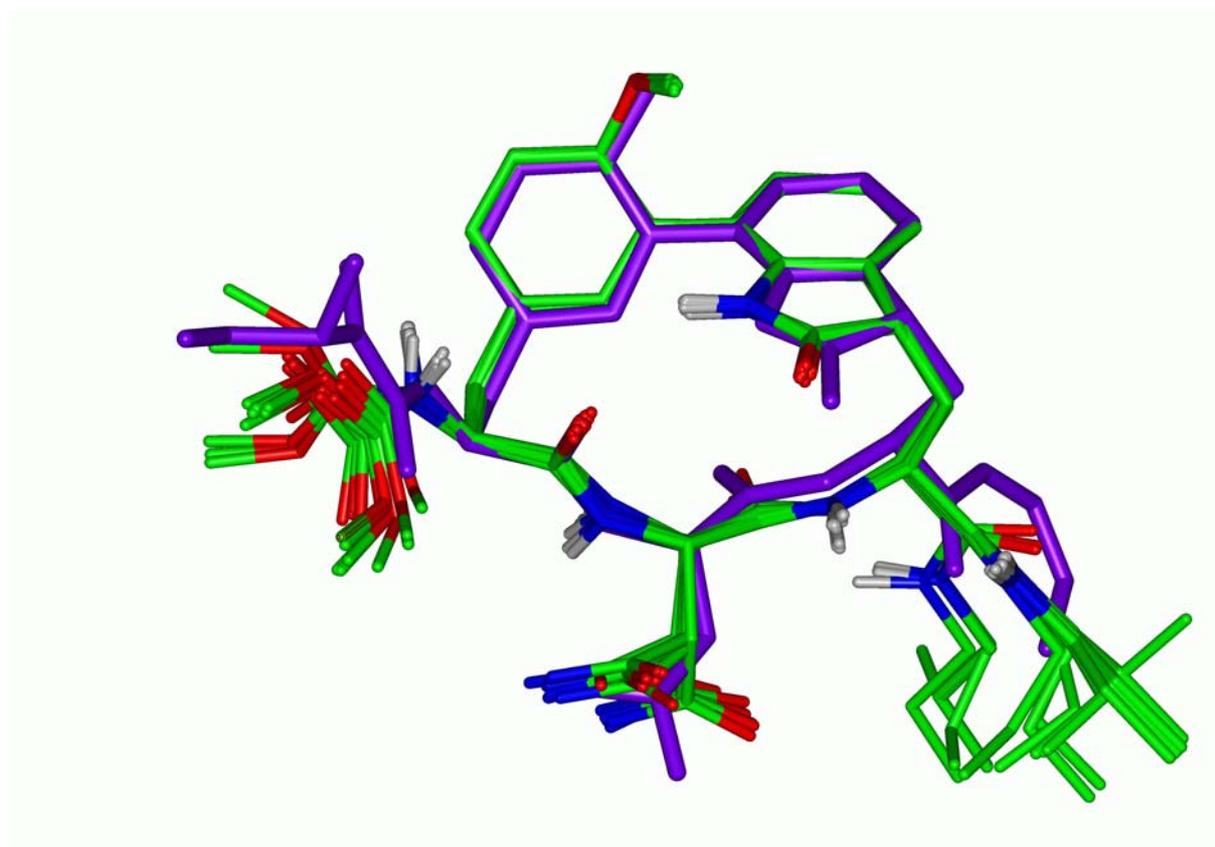


Abbildung 3.20: Überlagerung der aus der Kristallstrukturanalyse erhaltenen Struktur von TMC-95A (violett) mit den zwanzig energieärmsten Konformationen aus der NMR-Analyse (grün). Zur besseren Übersichtlichkeit wird die N-terminale Phenylgruppe nicht gezeigt.

Wie anhand Abbildung 3.20 zu sehen ist, ist die Struktur des Ringes aufgrund seiner Rigidität gut definiert. Die Übereinstimmungen zwischen TMC-95A und MK258 sind sehr gut. Die N-terminale Z-Schutzgruppe ist in der NMR-Struktur aufgrund der Beweglichkeit in Lösung ungeordnet. Die C-terminale Propylamidgruppe zeigt in Lösung zwei unterschiedliche Konformationen, die beide energiegelich sind, währenddessen im Kristall nur eine der beiden auftritt, da die andere aufgrund der Wechselwirkung mit dem Proteasom nicht möglich ist. Deshalb ist anzunehmen, dass MK258 in Wechselwirkung mit dem Proteasom auch nur eine vorherrschende Anordnung der Propylamidfunktion am C-terminalen Ende besitzt.

3.4.2 Hemmwirkung von MK258 und Folgen für das Inhibitor-Design

In einem enzymkinetischen Test (Loidl *et al.*, 2000b) wurden die IC_{50} -Werte für die drei unterschiedlichen Aktivitäten des Proteasoms bestimmt (Tab. 3.1):

	<i>CL</i> -Aktivität IC_{50} [μM]	<i>TL</i> -Aktivität IC_{50} [μM]	<i>PGPH</i> -Aktivität IC_{50} [μM]
MK258 Hefeproteasom	8,0	10,6	7,4
Ac-Leu-Leu-Nle-H Hefeproteasom	35,4	142,5	88,0
MK258 humanes Proteasom	1,9	3,7	1,8
TMC-95A humanes Proteasom (Koguchi <i>et al.</i> , 2000)	0,012	1,5	6,7

Tabelle 3.1: IC_{50} -Werte für MK258 im Vergleich mit Ac-Leu-Leu-Nle-H als Standard-Proteasominhibitor und dem Literaturwert von TMC-95A.

Da ein Vergleich von IC_{50} -Werten aufgrund der Einflüsse der Proteasompräparation und der Assay-Bedingungen sehr schwierig ist und es nicht möglich war, TMC-95A in unserem Testsystem zu evaluieren, liessen sich folgende Schlüsse ziehen. MK258

hemmt das Proteasom in allen drei Aktivitäten stärker als der Standardinhibitor Ac-Leu-Leu-Nle-H. Im Vergleich zum Naturstoff TMC-95A inhibiert MK258 das Proteasom in der TL- und PGPH-Aktivität in der gleichen Größenordnung, allerdings wird die CL-Aktivität signifikant schlechter inhibiert. Dies kann mit dem Austausch der (Z)-Propenylgruppe durch den *n*-Propylrest zusammenhängen, da dieser deutlich flexibler und somit vielleicht weniger gut in die P1-Tasche des Proteasoms bindet. Die annähernd gleiche Inhibition der TL- und PGPH-Aktivität hingegen zeigt, dass weder die Hydroxylfunktion des Tyrosins noch das N-terminale Ende einen wesentlichen Einfluss auf die Bindungseigenschaften haben. Es ist anzunehmen, dass die Biarylverknüpfung nur dazu dient, das Molekül in eine Konformation zu zwingen, die eine β -Faltblatt-Wechselwirkung mit dem Proteasom-Rückgrat ermöglicht. Zudem ist aus den Daten ersichtlich, dass das Ausmass der Oxidation des Tryptophans auf das synthetisch einfach zugängliche Level des Oxindolylalanins reduziert werden kann. Besonders wichtig im Zusammenhang mit der Entwicklung weiterer Inhibitoren war die Beobachtung, dass MK258 alle drei Aktivitäten mit etwa gleicher IC_{50} -Konzentration hemmt. Aus dieser Tatsache lässt sich schliessen, dass das Grundgerüst von MK258 eine Leitstruktur für selektive Proteasominhibitoren darstellt. Durch Ersatz der Reste R^1 und R^3 (Abb. 3.4 B) hingegen sollte sich selektiv eine Aktivität adressieren lassen. Verbunden mit der im Vergleich zum Naturstoff TMC-95A einfacheren Struktur und somit synthetischen Zugänglichkeit stellt dieses Ergebnis einen grossen Schritt in Richtung neuer selektiver Proteasominhibitoren dar.

3.5 Synthese von MK258-Analoga

3.5.1 Designkonzept

Um zu testen, ob durch Ersatz der Seitenketten der MK258-Leitstruktur eine spezifische Inhibition der drei Proteasomaktivitäten erreicht werden kann, wurde ein neues geeignetes Molekül als Syntheseziel formuliert (Abb. 3.21):

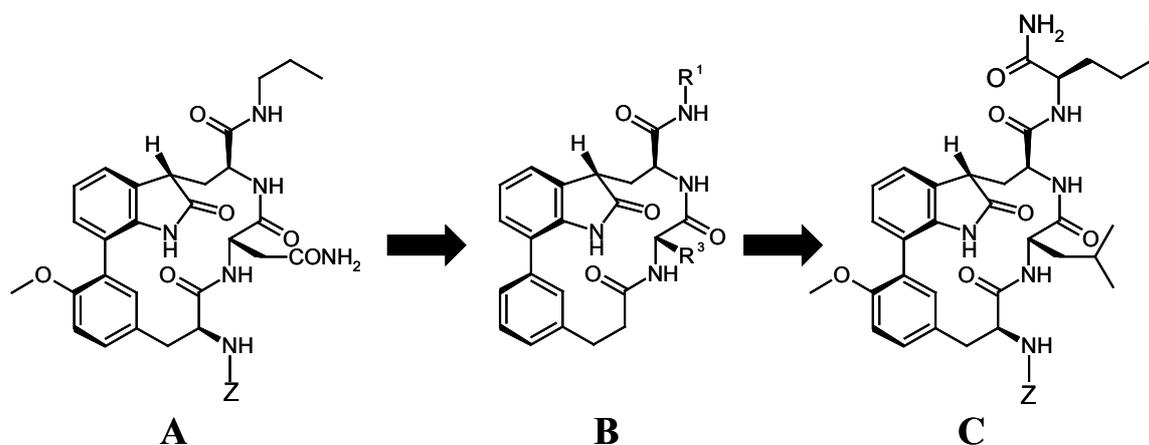


Abbildung 3.21: A) Struktur von MK258 mit *n*-Propylamin als R^1 und Asparagin als R^3 ; B) R^1 und R^3 als die Selektivität steuernden Reste der Leitstruktur; C) Norleucinamid als R^1 und Leucin als R^3 als optimale Reste zur selektiven Inhibition der chymotryptischen Aktivität.

Da die optimalen Seitenketten zur Inhibition der chymotryptischen Aktivität von Vinylsulfoninhibitoren (Bogyo *et al.*, 1998) bekannt waren, wurde Norleucinamid als R^1 und Leucin als R^3 gewählt. Dabei ist zu beachten, dass die Amidgruppe des Norleucinamids genau in die „active-site“ des Proteasoms bindet und vermutlich dort zur freien Säure analog einem Substrat gespalten werden könnte. Eine freie Säurefunktion im Vergleich zu einer Säureamidgruppe sollte an dieser Stelle jedoch keinen grossen Einfluss auf die Inhibitionskonstante des zu synthetisierenden Inhibitors ausüben. Da aber eine Säureamidgruppe den synthetischen Zugang erheblich vereinfacht, wurde diese Gruppe beibehalten und diese Verbindung

synthetisiert. Um die Nomenklatur zu vereinfachen, wird diese Verbindung im Folgenden MK416 genannt.

3.5.2 Synthese von MK416

Die Synthese von MK416 ist im wesentlichen analog der Synthese von MK258. Als Bausteine zur Synthese wurden der Tyrosinboronsäureester **22** und ein dem 7-Bromotryptophanderivat **24** ähnliches Derivat eingesetzt. Dabei wurde statt *n*-Propylamin bei der Synthese von **24** ein Norleucinamid auf die Vorstufe **34-2** gekuppelt (Abb. 3.22):

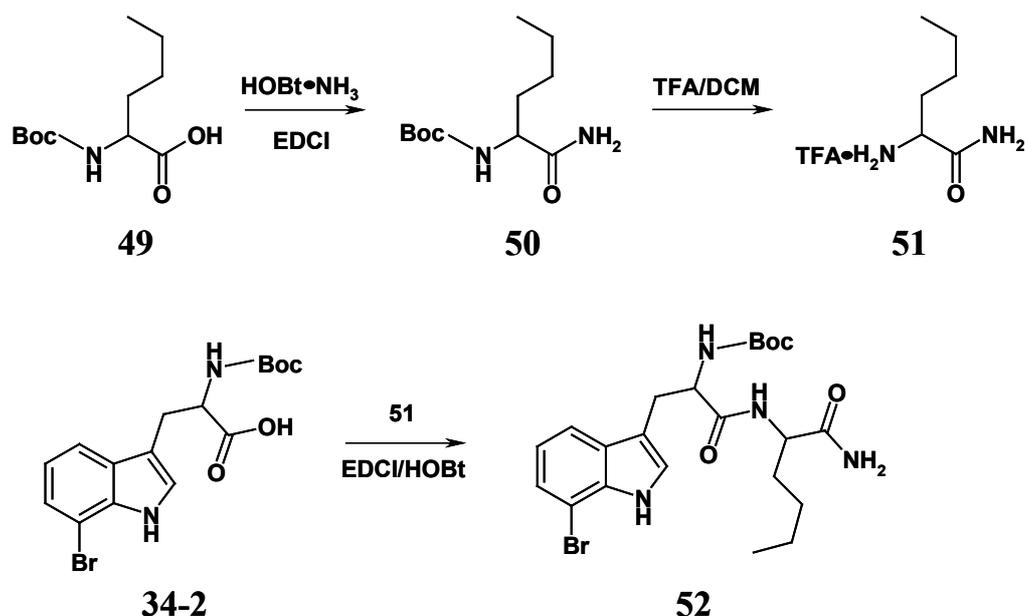


Abbildung 3.22: Syntheschema zur Darstellung des Synthesebausteins **52**.

Ausgehend von N^α-Boc-Norleucin **49** wurde zuerst das Amid **50** mittels EDCI und einem HOBt-Ammoniak-Komplex dargestellt. Danach erfolgte die Schutzgruppenabspaltung mit TFA/DCM (1:1) zu **51**, welches wiederum mit **34-2** mit EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz zum Synthesebaustein **52** umgesetzt wurde.

Anschliessend wurde MK416 analog der „direkten“ Synthese von MK258 laut Abb. 3.23 aufgebaut:

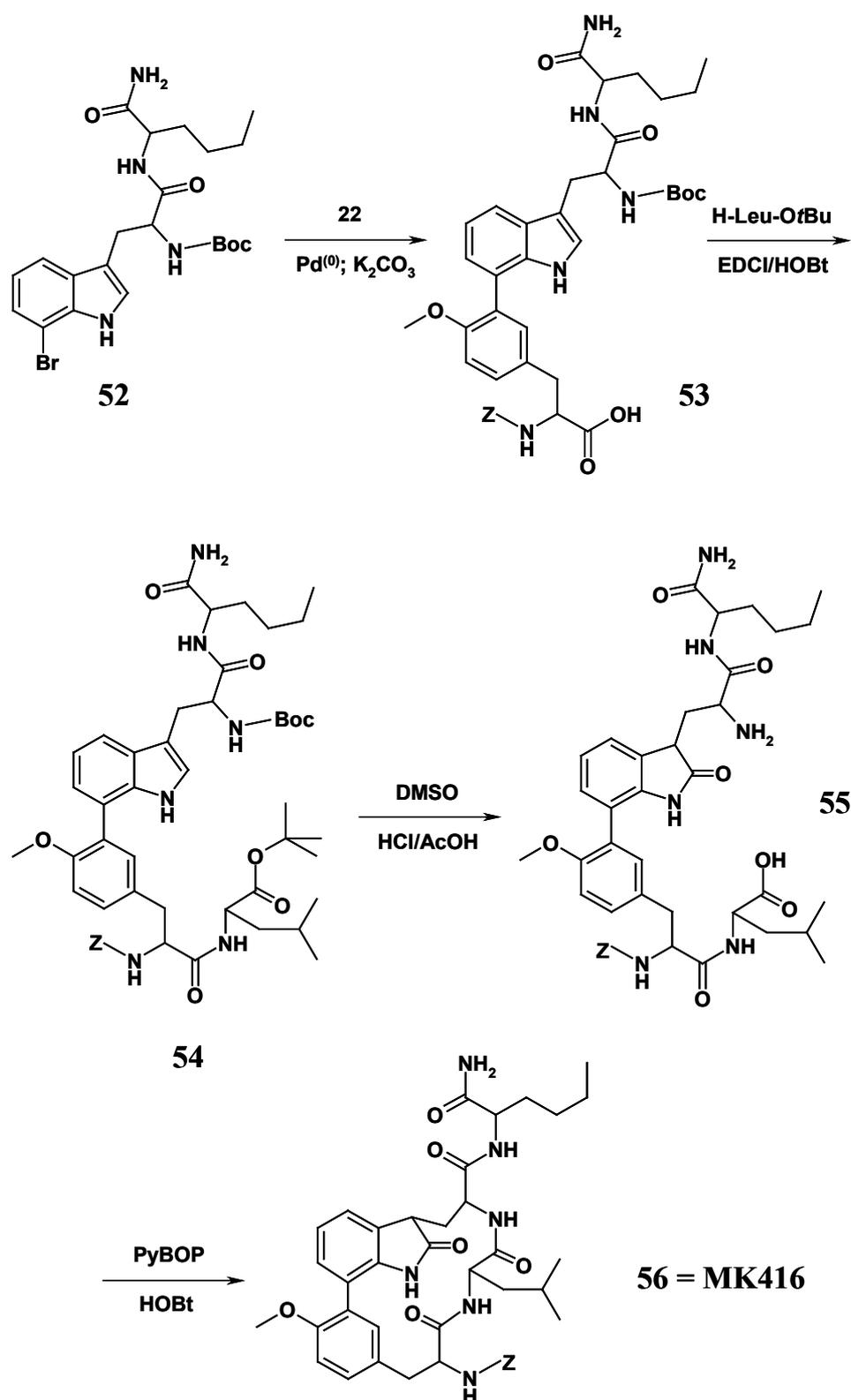


Abbildung 3.23: Schema zur Synthese von MK416.

Die Synthese beginnt mit einer Suzuki-Kupplung zwischen **22** und **52** mit Kaliumcarbonat als Base und Pd(dppf)Cl₂/DCM-Komplex als Katalysator in einer DME/Wasser (7:1)-Lösung. Dabei wurde der Methylester bereits zum großen Teil hydrolysiert. Um eine quantitative Verseifung zu erhalten, wurde nach dem Aufarbeiten der Reaktionsmischung das Rohprodukt in ACN/Wasser (1:1) mit LiOH über Nacht bei RT nachverseift. Aufarbeitung und Säulenchromatographie lieferten **53** in 44% Ausbeute. Anschliessende Verknüpfung von Leucin-*tert*-butylester und **53** mittels EDCI/HOBt ergab **54**. Oxidation unter gleichzeitiger Schutzgruppenabspaltung lieferte die Verbindung **55**, welche anschliessend zum Makrocyclus MK416 (**56**) mittels PyBOP/HOBt als Cyclisierungsreagenzien umgesetzt wurde.

3.5.3 NMR-Struktur von MK416

Analog zu MK258 wurde auch für die Verbindung MK416 die bevorzugte Struktur in Lösung mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (Abb. 3.24). Wie aus der Überlagerung ersichtlich ist, verändert erwartungsgemäss der Austausch der Aminosäuren die Konformation des Makrocyclus nur sehr wenig. In der gewählten Darstellungsweise lassen sich die beiden in die Enzymtaschen S1 und S3 bindenden Seitenketten sehr gut erkennen (zeigen in der Abb. 3.24 nach unten). Allerdings ist auch in dieser Darstellung eine leichte Verdrehung der Aminosäureseitenkette in der P1-Position gegenüber dem *Z*-Propenylrest im TMC-95A zu erkennen.

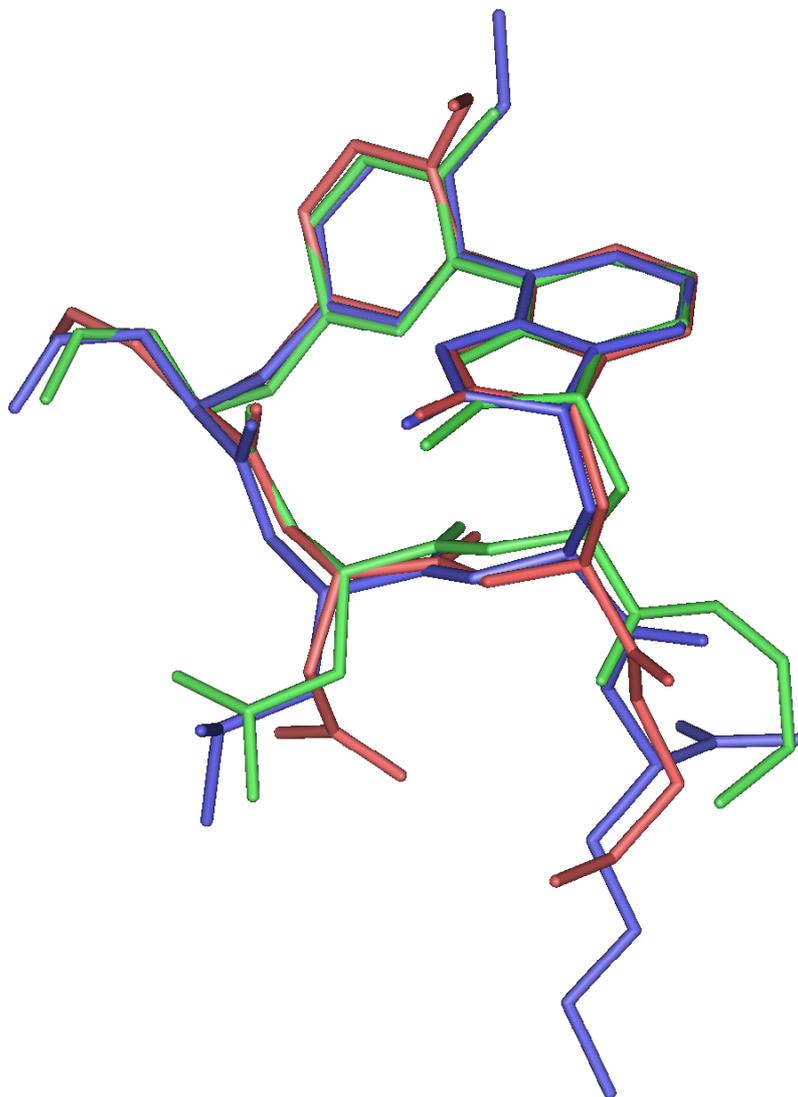


Abbildung 3.24: Überlagerung der NMR-Struktur von MK258 (rot), MK416 (blau) mit der mittels Kristallstruktur ermittelten Struktur von TMC-95A (grün). Zur besseren Übersichtlichkeit ist die N-terminale Benzyloxygruppe vernachlässigt.

3.5.4 Hemmwirkung von MK416

Um eine exaktere Analyse der Proteasomhemmung zu ermöglichen, wurden die Assaybedingungen (siehe Experimenteller Teil, Abschnitt 5.3.2) so geändert, dass eine Bestimmung der K_i -Werte möglich wurde (Tab. 3.2).

	<i>CL-Aktivität</i>	<i>TL-Aktivität</i>	<i>PGPH-Aktivität</i>
	K_i [μM]	K_i [μM]	K_i [μM]
Ac-Leu-Leu-Nle-H	1,4	364	≥ 2000
MK258	2,4	55	≥ 2000
MK416 erster K_i	2,8	144	≥ 2000

Tabelle 3.2: Bestimmung der K_i -Werte am Hefeproteasom für Ac-Leu-Leu-Nle-H, MK258 und MK416. Für MK416 ist der erste K_i -Wert angegeben.

Um einen Referenzwert zu bekommen, wurde gleichzeitig auch der K_i -Wert von Ac-Leu-Leu-Nle-H als Standardinhibitor des Proteasoms bestimmt. Es wurde auch der K_i -Wert von MK258 bestimmt, um mögliche Aussagen für das Inhibitor-Design ableiten zu können. Dabei wurden die K_i -Werte nur für das Hefeproteasom bestimmt, da von diesem die Kristallstruktur bestimmt wurde (Groll *et al.*, 1997) und sich somit Rückschlüsse zwischen Aktivität und Bindungsmodus ziehen lassen. Allerdings zeigte der vorläufige Aktivitätstest, dass MK258 das humane Proteasom besser inhibiert als das Hefeproteasom. Dies muss bei der Evaluierung der Hemmeigenschaften berücksichtigt werden. MK416 zeigte in der Hemmkinetik bei der chymotryptischen Aktivität zwei K_i -Werte, ein temporärer erster K_i von 2,8 μM und einen stabilen zweiten K_i von 13,4 μM . Bei der tryptischen und PGPH-Aktivität konnte kein zweites K_i beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der erste K_i -Wert der eingesetzten Substanz MK416 entspricht, welche dann im weiteren Verlauf zu einer weniger aktiven Substanz umgesetzt wird. Vermutlich handelt es sich dabei um die Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe. Die Bestimmung des ersten K_i -Wertes ist deshalb mit einem hohen Fehler versehen, da die zu messende Substanz sofort nach Beginn der Zugabe zur neuen Verbindung umgesetzt wird, die Bestimmung des K_i -Wertes jedoch ein Gleichgewicht erfordert, welches einige Zeit benötigt. Des Weiteren müssen mehrere Datenpunkte akkumuliert werden, um aussagekräftige Werte zu erhalten. Deshalb ist anzunehmen, dass der „wirkliche“ K_i -Wert etwas niedriger liegt, als er durch den Assay bestimmt werden konnte. Dass der zweite K_i -Wert, der vermutlich der C-terminal freien Carbonsäure entspricht, eine um den Faktor 5 niedrigere Hemmung aufweist, lässt sich mit dem Hydrolysemechanismus einer Protease

erklären. Nachdem das Substrat hydrolysiert wurde, muss es die „active site“ verlassen, damit ein weiteres Substrat prozessiert werden kann. Deshalb muss die Bindungskonstante des hydrolysierten Produktes niedriger als die des Substrates sein. Trotz der problematischen Bestimmung des ersten K_i von MK416 erstaunt der im Vergleich zu MK258 gering ausgefallene Effekt der verbesserten Hemmung. Dieser Effekt lässt sich jedoch nur durch eine kristallographische Untersuchung erklären. Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch geschickten Ersatz der Seitenketten am TMC-Gerüst die Selektivität für einzelne Aktivitäten verbessert werden kann. So zeigt MK416 gegenüber MK258 eine mehr als verdoppelte Selektivität der chymotryptischen Hemmung im Vergleich zur tryptischen Aktivität.

3.6 Synthese von Ketomethylen-Isosteren von MK416

Um den Einfluss der C-terminalen Amidgruppe von MK416 in bezug auf die Hydrolyseempfindlichkeit zu studieren, wurde versucht, diese durch eine Ketomethylengruppe zu ersetzen (Abb. 3.25). Ketomethylenverbindungen (Thaisrivong *et al.*, 1986) besitzen nicht nur den Vorteil der Hydrolysebeständigkeit, sondern sollten auch unter Beibehaltung des kanonischen Rasters ein Vordringen des Inhibitors in die S'-Bindungstaschen des Enzyms und somit eine Charakterisierung des Bindungsmodus von Substraten in den S'-Taschen des Enzyms ermöglichen.

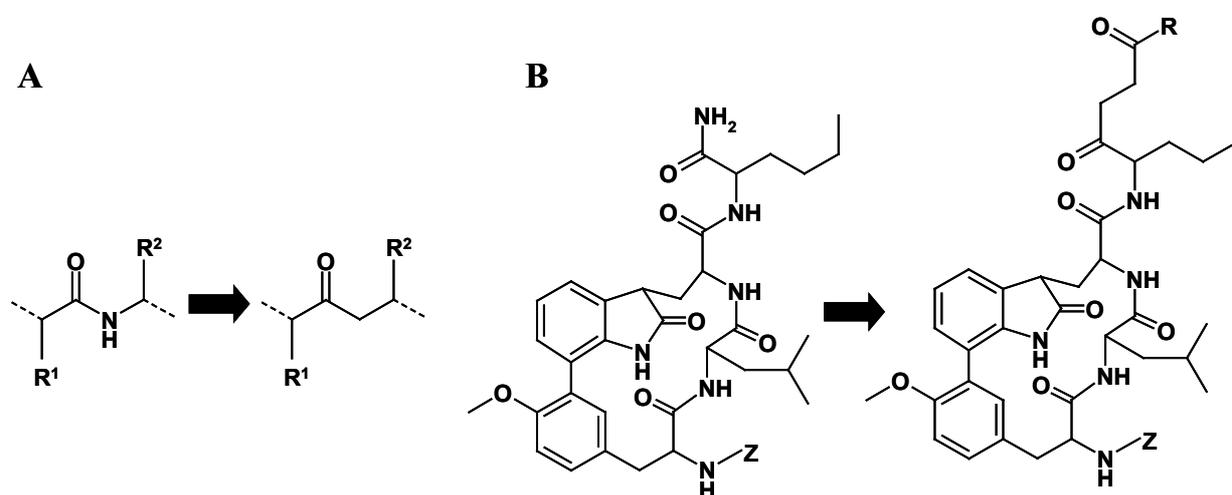


Abbildung 3.25: A) Ersatz einer Peptidamidgruppe durch eine Ketomethylengruppe als Pseudoamidbindung; B) Ersatz der C-terminalen Amidgruppe durch eine Ketomethylenfunktion ergibt die zu synthetisierende Zielverbindung, die am C-Terminus mit R-Resten beliebig modifiziert werden kann.

Synthetisch am einfachsten zugänglich sind Ketomethylene, die eine Pseudobindung zwischen einer Aminosäure und einem Glycin nachahmen (DiMaio *et al.*, 1992; Loidl, 1999c). Neben der erleichterten Synthese gibt es einen weiteren Vorteil. Für das Proteasom sind bislang die bevorzugten Seitenketten für P1' sowie die Wechselwirkungen des Substratrückgrats in diesem Enzyrbereich nicht bekannt. Die Aminosäure Glycin besitzt keine Seitenkette und deshalb sollten sich die Interaktionen des Peptidbackbones im S'-Bereich mit solchen Inhibitoren bestimmen lassen. Zudem

werden eventuelle ungünstige sterische Wechselwirkungen der Seitenketten mit der S1'-Enzymtasche vermieden. Aufgrund dieser Überlegungen wurde zunächst die Hydrolyse-empfindliche Amidbindung durch eine Ketomethylenfunktion ersetzt, wobei Glycin als Pseudo-P1'-Aminosäurerest fungieren sollte. Der C-Terminus wurde ähnlich wie bei MK416 amidiert (Abb. 3.26).

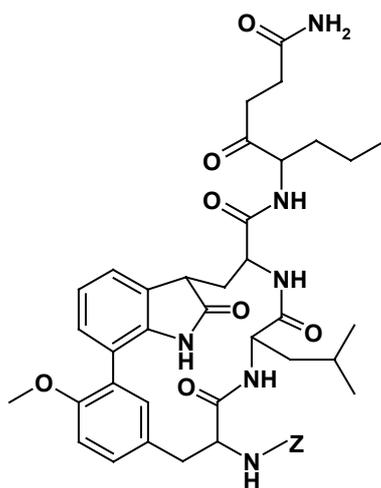


Abbildung 3.26: Struktur des Ketomethylen-TMC-95A Analogons.

3.6.1 Synthese des Norleucin-Ketomethylen-Bausteins

Zur Synthese der Testverbindung auf dem Wege der „direkten“ Makrocyclisierung war die Synthese eines entsprechend geschützten NleΨ[CO-CH₂]Gly-Bausteines nötig (Abb. 3.27). Zur Synthese des Derivats **59** (Loidl, 1999c) wurde zunächst Boc-Nle-OH (**49**) mittels HBTU/HOBt in das Weinrebamid **57** überführt, dass nach chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 82% erhalten wurde; dieses wurde anschliessend mit einem Butenylgrignardreagenz zu **58** umgesetzt. Dabei wurde das Grignardreagenz in 10-fachem Überschuss eingesetzt, da das Weinrebamid (Nahm & Weinreb, 1981) eine Überalkylierung zum tertiären Hydroxid verhindert. Anschliessende Corey-Oxidation lieferte durch oxidative Spaltung der

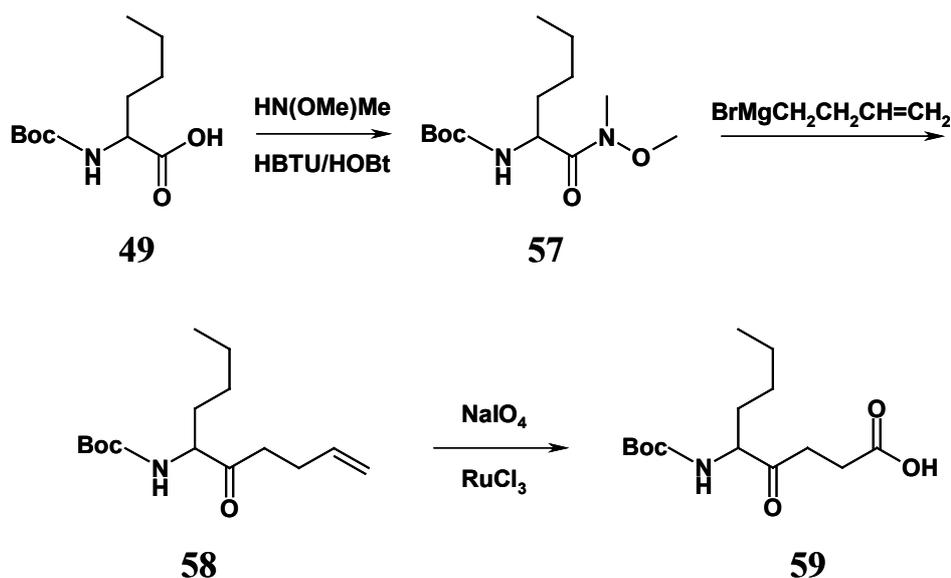


Abbildung 3.27: Syntheschema zur Darstellung des *Nle* Ψ [CO-CH₂]Gly-Derivats **59**.

Doppelbindung die freie Säure **59**. Der Vorteil dieses Synthesewegs ist, dass das Stereozentrum des L-Norleucins von den Transformationen nicht beeinflusst wird und somit das Produkt **59** stereoselektiv als L-Isomer erhalten werden konnte.

3.6.2 Synthese des Ketomethylenderivates von MK416

Analog zur Synthese von MK416 wurde aus dem Zwischenprodukt **59** die Zielverbindung aufgebaut (Abb. 3.28). Zur Synthese über die „direkte“ Makrolactamisierung wurde **59** zunächst mittels HOBt/Ammoniak/EDCI in das C-terminale Amid umgewandelt. Nach Abspaltung der N^α-Boc-Schutzgruppe durch TFA/DCM (1:1) wurde das erhaltene **60** anschliessend mit **34-2** und EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz zum Dipeptid **61** verknüpft, welches durch Suzuki-Kupplung mit **22** zu **62** umgesetzt wurde. Da die Hydrolyse des Methylresters auch in diesem Falle nicht quantitativ verlief, wurde das Rohprodukt über Nacht mit LiOH verseift. Die Kondensation von **62** mit H-Leu-OtBu und EDCI/HOBt als Kupplungsreagenz lieferte **63**, welches durch Oxidation der Indolseitenkette zum Oxindol unter gleichzeitiger

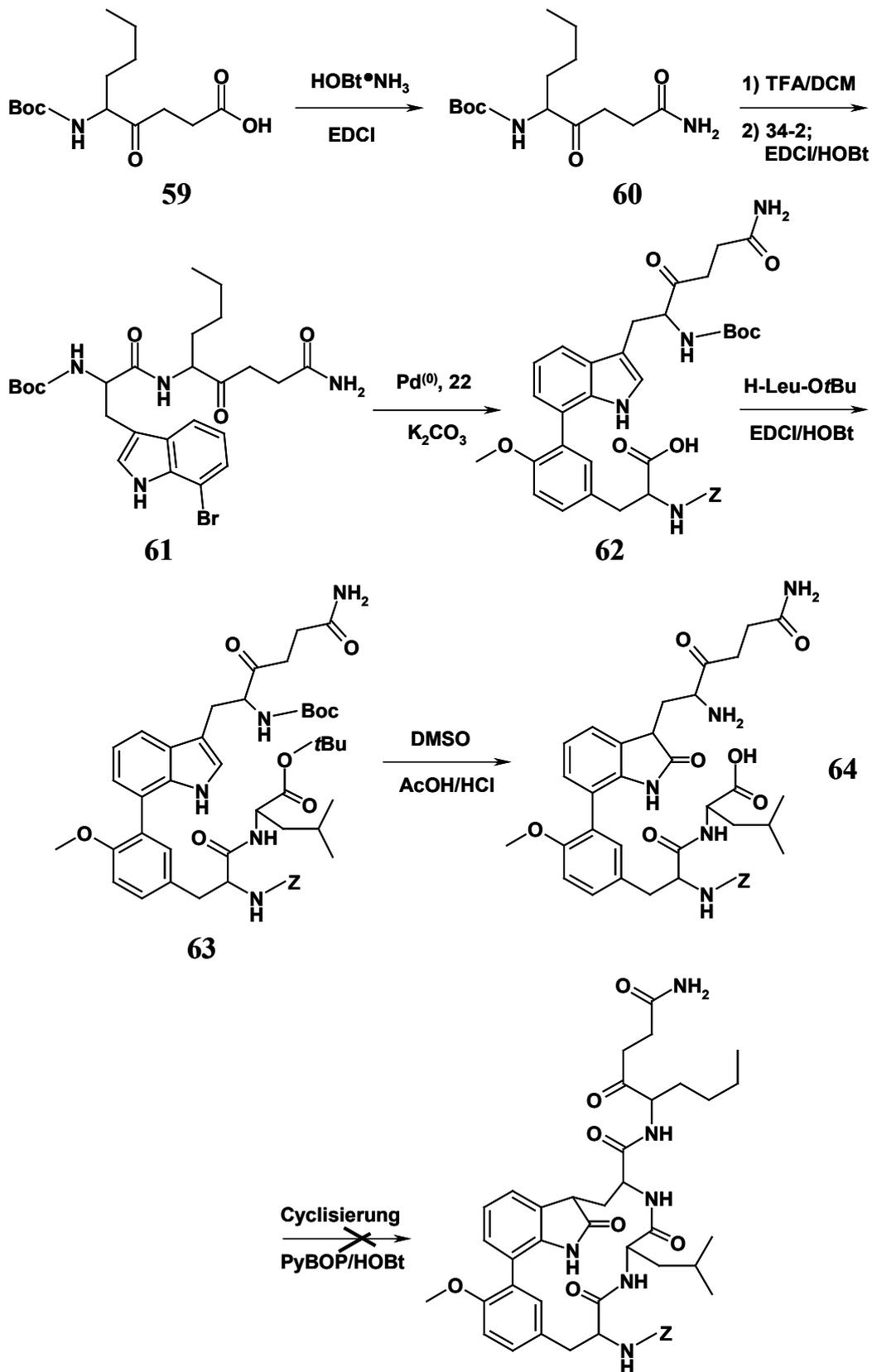


Abbildung 3.28: Syntheschema zur Darstellung des Ketomethylenderivates von MK416.

Abspaltung der Boc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen zu **64** umgesetzt wurde. Die anschließende Cyclisierung zum Makrocyclus nach der Standardmethode mit PyBOP/HOBt schlug leider fehl. In der Tat konnte auch mittels LC-MS keinerlei Hinweise auf ein Entstehen des Produktes gefunden werden.

3.6.3 Neu-Design eines Ketomethylenanalogons von MK416

Da bei der Synthese des oben beschriebenen Ketomethylenanalogons von MK416 bereits in den ersten Stufen unerwartete Nebenprodukte auftraten, die nur

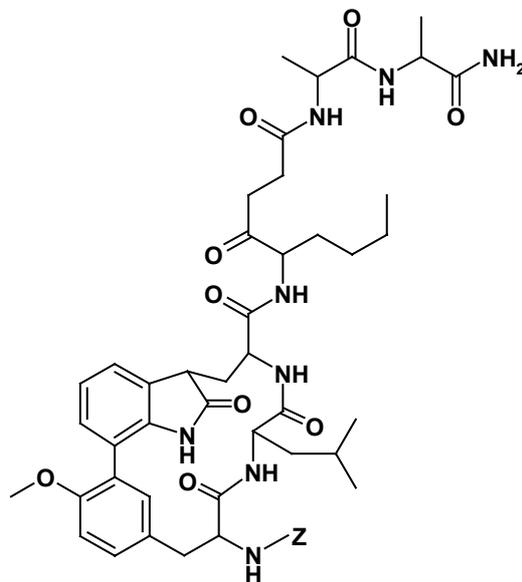


Abbildung 3.29: Struktur der zu synthetisierenden Zielverbindung MK499.

chromatographisch abgetrennt werden konnten, und zusätzlich von anderen Synthesen bekannt ist, dass Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Derivate bei Reaktionen unter Basenkatalyse zu Nebenprodukten führt, wurde versucht, einen am C-Terminus verlängerten Ketomethylen-Rest zu synthetisieren. Dazu wurde Nle Ψ [CO-CH₂]Gly am C-Terminus um Ala-Ala-NH₂ verlängert (Abb. 3.29). Im Folgenden wird dieses neue TMC-95A Analogon als MK499 bezeichnet.

3.6.4 Synthese von MK499 durch „direkte“ Makrolactamisierung

Die Synthese von MK499 verlief analog der MK416-Synthese (Abb. 3.30).

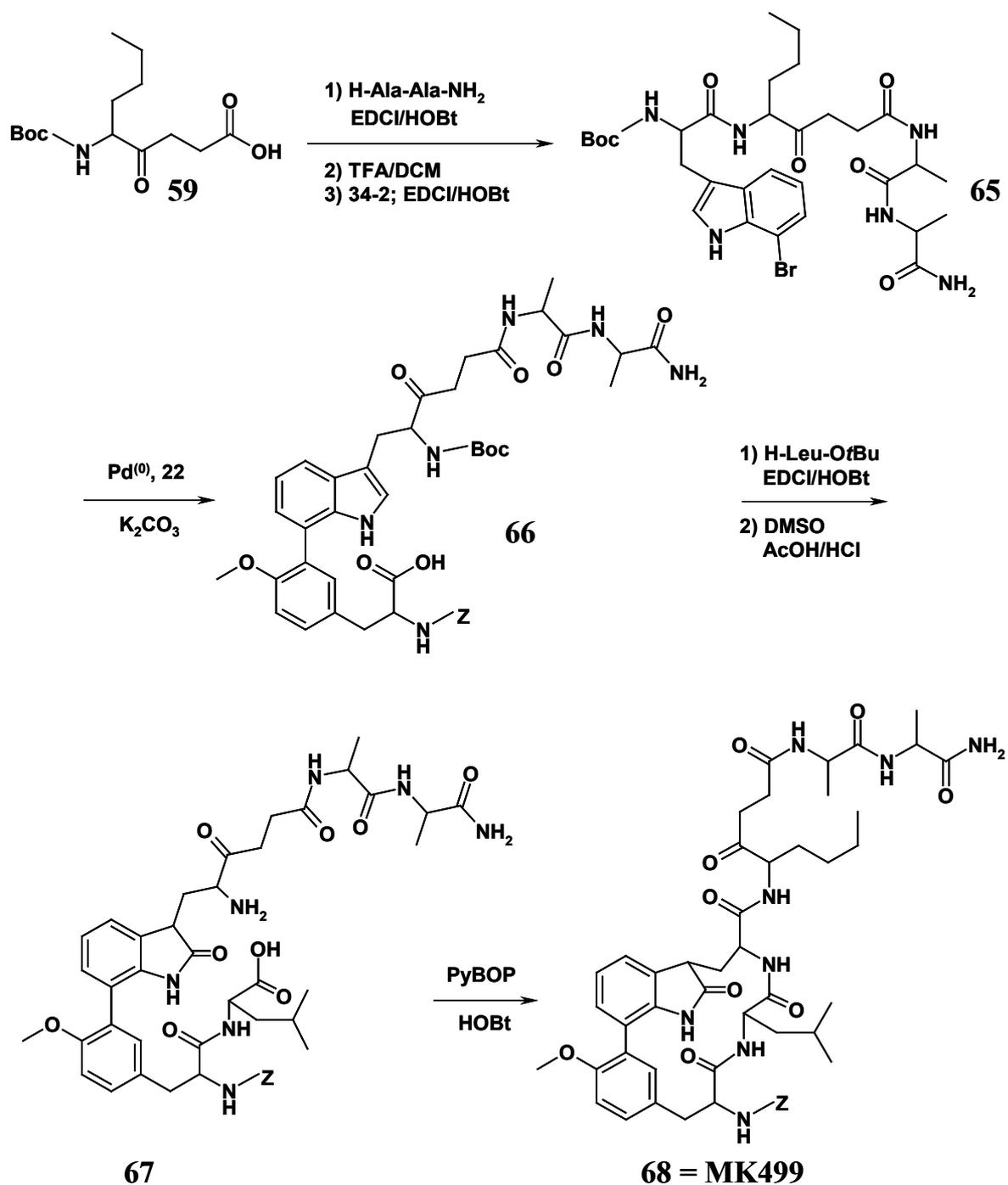


Abbildung 3.30: Reaktionsschema zur Synthese von MK499.

Ausgehend vom Synthesebaustein **59** wurde zunächst das Tripeptid **65** aufgebaut. Anschliessend wurde das Biarylsystem **66** durch Suzuki-Kupplung erstellt und mittels EDCI/HOBt mit H-Leu-O t Bu zu **67** verknüpft. Nach Abspalten der Schutzgruppen und Oxidation der Indolseitenkette zum Oxindolsystem **67** mittels DMSO/AcOH/HCl wurde die Cyclisierung zu MK499 (**68**) mit PyBOP/HOBt durchgeführt. Diese verlief sehr schlecht und lieferte das Produkt nach zweifacher chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von <1%. Dabei entstand **68** als Gemisch zweier Diastereomere, welche vermutlich auf eine Racemisierung des Norleucinrestes unter den basischen Cyclisierungsbedingungen zurückzuführen sind. Zudem scheint die Ketofunktion eine effiziente Cyclisierung analog den Reaktionsbedingungen zur Synthese von MK258 und MK416 zu verhindern.

3.6.5 Synthese von MK499 durch Seitenkettencyclisierung

Da die Synthese von MK499 durch „direkte“ Makrolactamisierung eine für weitergehende Untersuchungen zu geringe Produktmenge lieferte, wurde ein neuer Syntheseweg versucht (Abb. 3.31). Zuerst wurde untersucht, ob der Boronsäureester stabil gegenüber den Reaktionsbedingungen der Indolseitenkettenoxidation mit DMSO/AcOH/HCl ist. Dazu wurde **22** mit der Reaktionslösung versetzt und mittels HPLC der Reaktionsverlauf überprüft. Es zeigte sich, dass der Boronsäureester nur langsam zersetzt wurde und somit eine Oxidation des Tryptophanrestes in Gegenwart des Tyrosinboronsäureesters möglich sein sollte.

Zum Aufbau der Peptidkette wurde der C-terminal geschützte Synthesebaustein **22** mit Lithiumhydroxid in ACN/H₂O zu **69** verseift. Dann wurde ausgehend vom Tripeptid **65**, ein Zwischenprodukt der Synthese von MK499 durch „direkte“ Makrolactamisierung, das N ^{α} -Z-geschützte Pentapeptid **70** aufgebaut. Dazu wurde im Wechsel die N ^{α} -Boc-Schutzgruppe mit TFA/DCM abgespalten und anschliessend mit PyBOP als Kupplungsreagenz zuerst Boc-Leu-OH, dann **70** auf die wachsende Peptidkette gekuppelt. **70** wurde mit DMSO/AcOH/HCl zu **71** oxidiert und

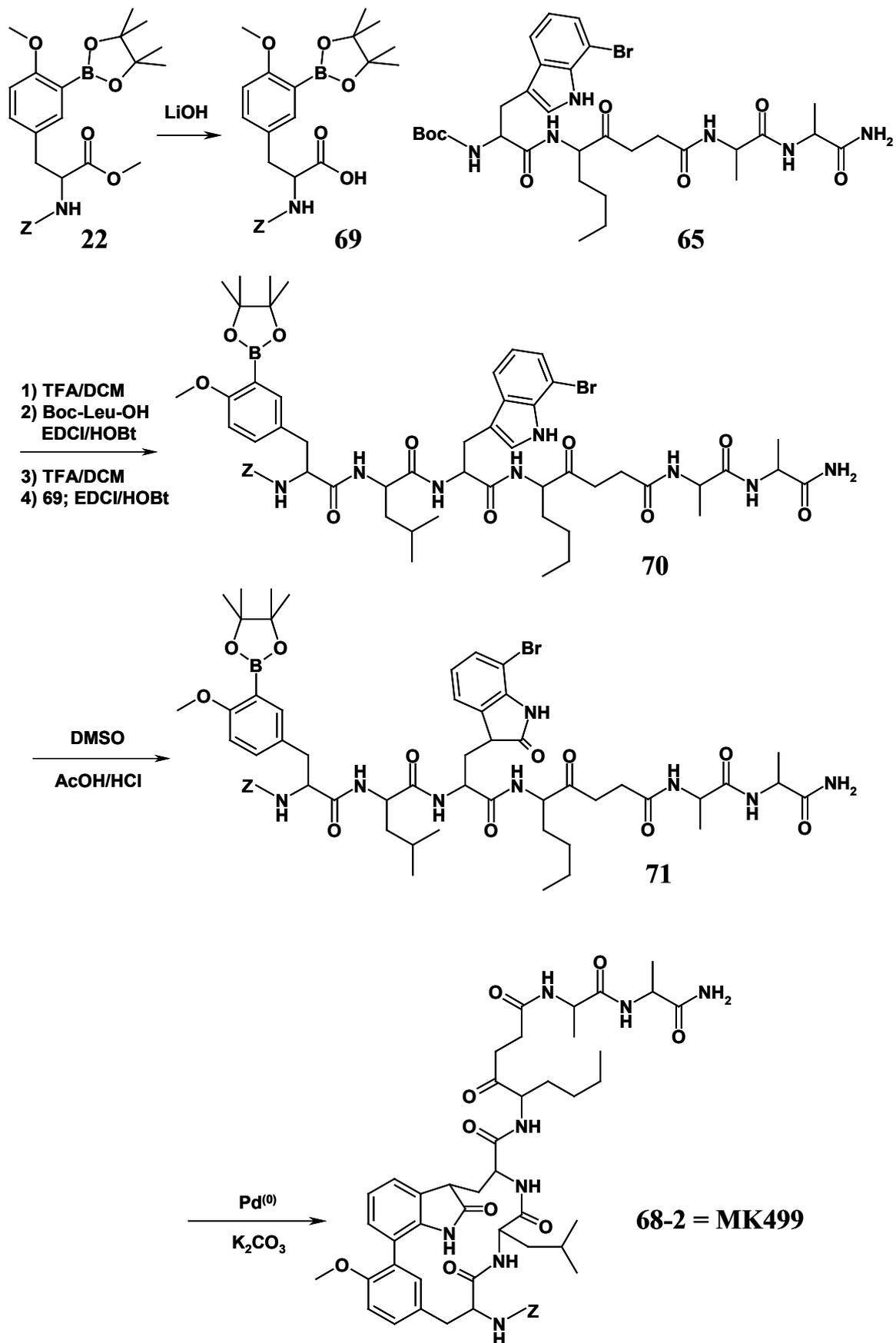


Abbildung 3.31: Synthese von MK499 durch Seitenkettencyclisierung via intramolekularer Suzuki-Kupplung.

anschliessend unter Standard-Suzuki-Bedingungen zum cyclisierten Produkt MK499 **68-2** umgesetzt. Dabei fällt **68-2** analog der Synthese durch „direkte“ Makrolactamisierung als Gemisch zweier Diastereomere an, die durch Racemisierung des Norleucinrestes entstehen. Analog MK258 und MK416 wurde die Struktur von MK499 in Lösung bestimmt, um zweifelsfrei zu beweisen, dass der Makrocyclus gebildet wurde.

3.6.6 Inhibitorwirkung von MK499

Zur Charakterisierung der Proteasomhemmung wurden enzymkinetisch die K_i -Werte für die Inhibition der chymotryptischen, tryptischen und PGPH-Aktivität bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden auch in Tabelle 3.3 noch die Inhibitionswerte für MK258, MK416 und Ac-Leu-Leu-Nle-H für die drei Aktivitäten angegeben (Tab. 3.3):

	<i>CL-Aktivität</i> K_i [μM]	<i>TL-Aktivität</i> K_i [μM]	<i>PGPH-Aktivität</i> K_i [μM]
Ac-Leu-Leu-Nle-H	1,4	364	≥ 2000
MK258	2,4	55	≥ 2000
MK416 erster K_i	2,8	144	≥ 2000
MK499	9,1	60	≥ 2000

Tabelle 3.3: K_i -Werte von MK499 im Vergleich mit Ac-Leu-Leu-Nle-H, MK258 und MK416.

Der K_i -Wert der chymotryptischen Hemmung von MK499 ist um den Faktor 3 schlechter als der K_i -Wert von MK258 und dem ersten K_i von MK416. Offensichtlich bewirkt eine Verlängerung des Inhibitors in die S'-Enzymtaschen eine Erniedrigung der Hemmung, die vielleicht auf ungünstige sterische Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Dieser negative Effekt der „S'-Verlängerung“ wurde auch bei den bifunktionellen Proteasominhibitoren beobachtet (Loidl, 1999c). Jedoch zeigt die

Kristallstrukturanalyse des Proteasom/TMC-95A-Komplexes (Groll *et al.*, 2001), dass die S'-Seite genügend Raum zur Bindung haben sollte. Zudem bindet bei der Proteolyse das zu spaltende Substrat auch in diesem Bereich. Die Hemmung von MK499 sollte jedoch noch stark genug sein, um eine kristallographische Untersuchung des Hemmmechanismus zu ermöglichen, die dann vermutlich auch die geringere Selektivität der chymotryptischen im Vergleich zur tryptischen Hemmung von MK499 gegenüber MK258 und MK416 erklären könnte.

3.7 Biarylether als Ersatz für die Phenyl-Oxindolbrücke

Die Darstellung der TMC-Analoga erfordert einen großen Arbeitsaufwand und wird durch teure Ausgangsmaterialien weiterhin erschwert. Deshalb wäre eine neue Leitstruktur, welche ein ökonomisch effektiveres Austesten der Wechselwirkungen in den Proteasombindungstaschen ermöglicht, von großem Interesse. Aufgrund der Hemmwirkung von TMC-95A und entsprechender Analoga ist anzunehmen, dass diese Inhibitoren alle über das Peptidrückgrat in Form eines antiparallelen β -Faltblattes an das Proteasom binden. Einzige Ausnahme ist eine in der Kristallstruktur sichtbare Wasserstoffbindung zwischen dem Sauerstoff der Oxindolseitenkette und dem Proteasom (Abb. 3.1). Die Stärke dieser Wechselwirkung ist jedoch nicht quantifizierbar, da die geometrische Anordnung der Bindungspartner nicht optimal ist. Deshalb war es interessant zu prüfen, ob eine Inhibition des Proteasoms nicht auch durch Verbindungen erreicht werden kann, die die β -Faltblatt-Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor stabilisieren. β -Faltblatt-stabilisierende Verbindungen sind bekannt (Glenn *et al.*, 2002; Tyndall *et al.*, 2000) und werden besonders zur Inhibition von Proteasen, im besonderen der HIV-Protease, aufgrund der Ähnlichkeit zur Substratbindung eingesetzt. Besonders Biarylether wurden, da sie wichtiger Bestandteil des Antibiotikum Vancomycin (Nicolaou *et al.*, 1999) und anderer Naturstoffe wie z. B. Piperazinomycin und Bouvardin (Beugelmans *et al.* 1996) sind, synthetisch intensiv bearbeitet und in ihrer bevorzugten Konformation untersucht (Müller & Giera, 1998).

3.7.1 Modeling einer Biaryletherverbindung zur Inhibition des Proteasoms

Wie bereits beschrieben, erfolgt die Wechselwirkung zwischen dem Proteasom und dem TMC-95A-Inhibitor über das Peptidrückgrat in Form einer β -Faltblatt-Wechselwirkung. Bei den Biarylethern gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Ver-

knüpfungsmöglichkeiten (Abb. 3.32), eine *meta*, *para*- beziehungsweise *para*, *meta*-Anordnung.

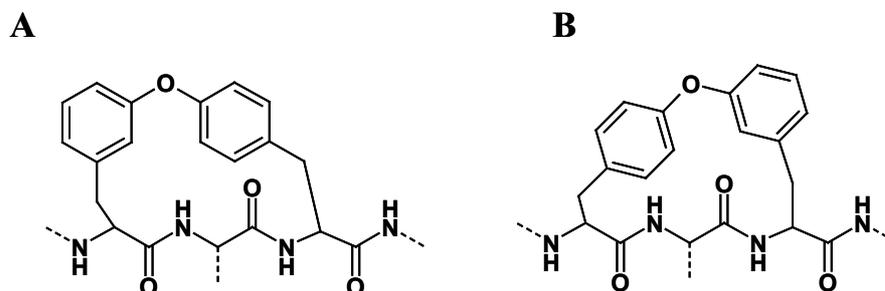


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der beiden unterschiedlichen Verknüpfungen; A) *meta*, *para*; B) *para*, *meta*.

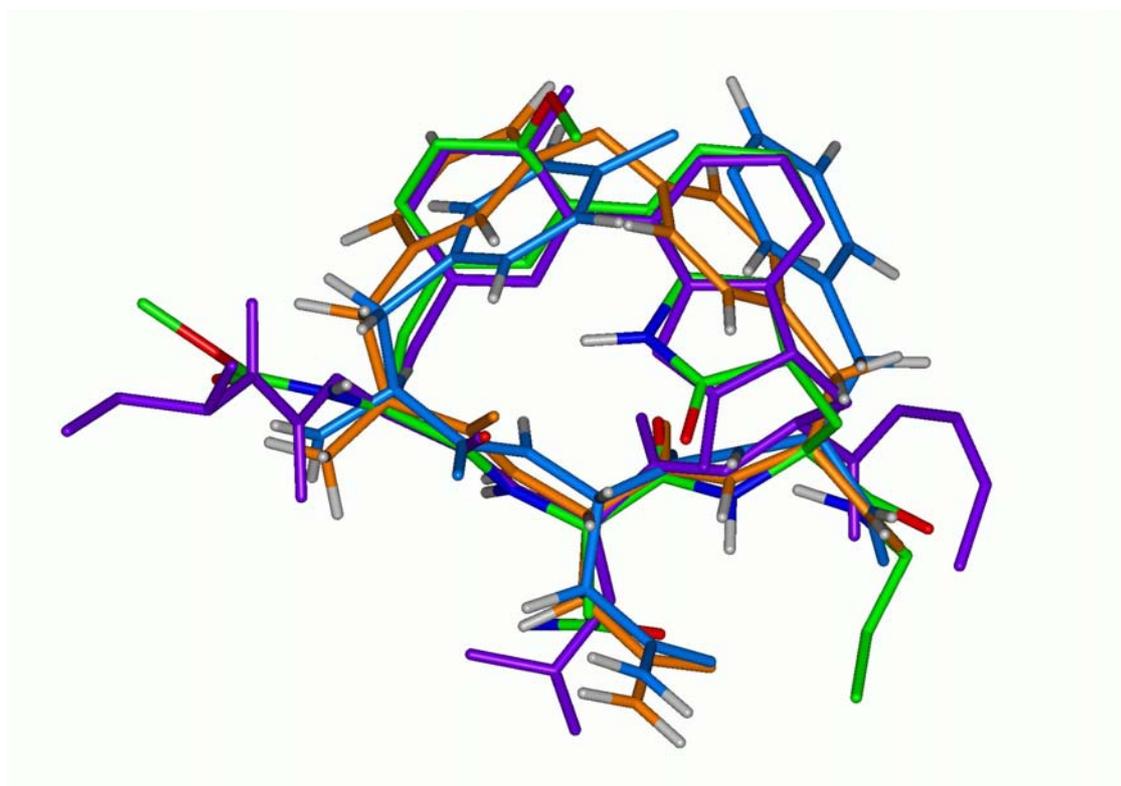


Abbildung 3.33: Überlagerung der Energie-minimierten Konformationen der beiden unterschiedlichen *para*, *meta*-verknüpften- (blau) beziehungsweise *meta*, *para*-verknüpften- (orange) Biarylethern mit TMC-95A (violett) und MK258 (grün).

Für beide unterschiedliche Verknüpfungen wurde eine Energieminimierung durchgeführt und die resultierende Konformation mit der TMC-95A Struktur verglichen (Abb. 3.33). Wie man in der graphischen Darstellung der Überlagerung erkennen kann, zeigt der *meta, para*-verknüpfte Biarylether eine hohe Übereinstimmung mit dem Peptidrückgrat der TMC-Inhibitoren. Demgegenüber zeigt die *para, meta*-Verknüpfung weniger Übereinstimmung, wobei die Seitenketten im Vergleich zu den TMC-Inhibitoren leicht verdreht sind. Ein Beweis, dass β -Faltblattstabilisierende Verbindungen zur Inhibition des Proteasoms genügen, konnte jedoch nur durch Synthese der entsprechenden Verbindungen erreicht werden. Aufgrund der Ergebnisse der Konformationsanalyse wurde deshalb das *meta, para*-verbrückte Biarylsystem ausgewählt.

3.7.2 Design eines MK258 analogen Biarylethers

Zum Überprüfen des Designansatzes wurde ein Biarylether gewählt, der die gleichen Seitenketten wie MK258 trägt, um einen Vergleich der Inhibitionskinetiken abzusichern. Zur Konstruktion der Biaryletherbrücke gibt es verschiedene Ansätze. So entwickelte die Arbeitsgruppe von Boger (Boger *et al.*, 1993) einen auf der Ullmann-Ether-Synthese basierenden Ansatz zur Herstellung dieser Substanzklasse, die Arbeitsgruppe von Rich (Janetka & Rich, 1997) und unabhängig davon von Pearson (Pearson *et al.*, 1996) fokussierten ihr Interesse hingegen auf eine nukleophile Substitution am Aromaten, bei welcher der Aromat durch Komplexierung mit Metallocenen aktiviert wurde. Demgegenüber entwickelte die Arbeitsgruppen von Evans (Evans *et al.*, 1997) und Nicolaou (Nicolaou *et al.*, 1999; Nicolaou *et al.*, 1997) Ansätze, bei denen einer der Aromaten durch Zugabe von Metallsalzen wie Tl^{3+} oder V^{5+} für eine nukleophile Substitution aktiviert wurde. Des Weiteren entwickelte die Arbeitsgruppe von Chan (Chan *et al.*, 1998) eine Methode der Kupplung von Boronsäuren mit Phenolen unter Verwendung von Kupfersalzen, die später auch von Evans (Decicco *et al.*, 2001) zur Synthese von Biarylethern eingesetzt wurden. Die wohl am häufigsten angewandte Methode entstammt der Arbeitsgruppe von Zhu

(Beugelmans *et al.*, 1996), bei welcher ein Tyrosinderivat den anderen Aromaten nukleophil angreift. Um dies zu ermöglichen, wird der Aromat durch eine zur Fluorid-Abgangsgruppe *ortho*-stehende Nitrogruppe aktiviert, welche im weiteren Verlauf der Synthese entfernt oder in andere funktionelle Gruppen umgewandelt werden kann. Dieses Verfahren wurde auch in einer Festphasensynthese (Burgess *et al.*, 1997) angewandt und später auch von der Arbeitsgruppe Boger (Krenitsky & Boger, 2002) übernommen.

Zur Biarylverknüpfung auf diesem Wege ist also eine Aktivierung des Aromaten durch eine *ortho*-ständige Nitrogruppe notwendig. Da diese Nitrogruppe jedoch am Tyrosin analog dem Bindungsmodus der TMC-Inhibitoren in den Lösungsmittelraum des Proteasoms zeigen sollte, ist eine Entfernung dieser Hilfsgruppe nicht essentiell. Somit wurde als Zielstruktur zur Überprüfung des Designkonzepts eine MK258 analoge Verbindung gewählt, die zur Vereinfachung der Nomenklatur im Folgenden mit MK600 bezeichnet wird (Abb. 3.34).

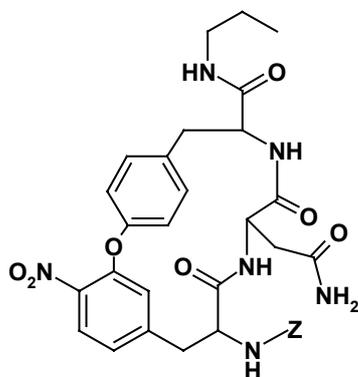


Abbildung 3.34: Struktur der Biarylether-Zielverbindung MK600.

3.7.3 Synthese von MK600

Da ein Ringschluss zum Makrocyclus über die nukleophile Substitution am Aromaten geplant war, musste zur Aktivierung des Aromaten neben einer Fluorid-

Abgangsgruppe eine *ortho*-ständige Nitrogruppe im Phenylalanin als Synthesebaustein (Beugelmans *et al.*, 1996) eingebaut werden (Abb. 3.35).

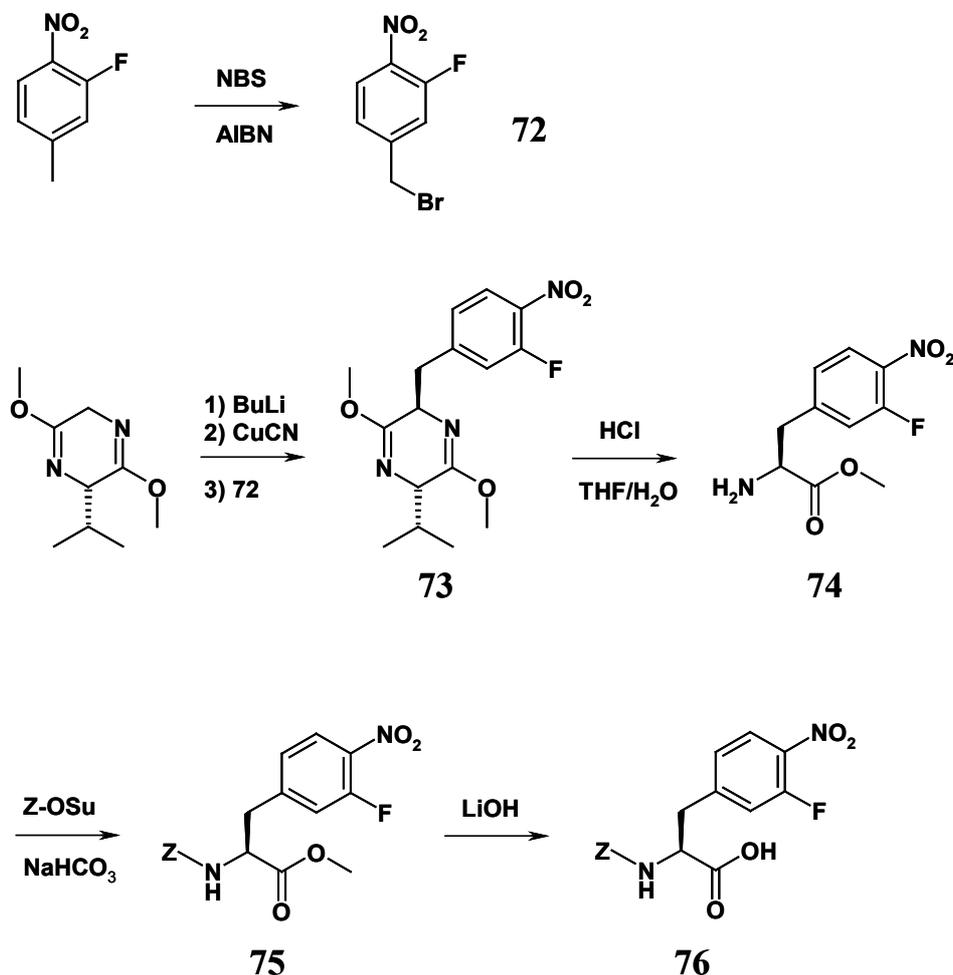


Abbildung 3.35: Syntheschema zur Darstellung des 3-Fluoro-4-nitrophenylalanin-Derivates 76.

Ausgehend von 3-Fluoro-4-nitrotoluol wurde **72** durch radikalische Substitution mit NBS und AIBN als Radikalstarter erhalten. Diese Zwischenstufe wurde anschliessend mit dem Schöllkopf-Reagenz (Schöllkopf *et al.*, 1981) zu **73** umgesetzt. Allerdings ließ sich die normale Reaktionsroute zur Synthese von Aminosäuren nach Schöllkopf aufgrund der hohen Acidität des substituierten Benzylbromids nicht einsetzen. Deswegen musste das Lithiumsalz des Schöllkopf-Reagenzes zunächst mittels CuCN zu einem Cuprat höherer Ordnung umgesetzt werden, dessen Basizität niedrig genug ist, um mit dem Benzylbromid in der erwünschten Weise zu reagieren. Vorsichtige

Hydrolyse von **73** zu **74** mittels verdünnter Salzsäure in einem THF/H₂O-Gemisch führte zum freien Amin **74**, das mittels Z-OSu zum N^α-geschützten Z-Derivat **75** umgesetzt wurde; dieses wurde dann mit Lithiumhydroxid zu **76** verseift.

Die Synthese von MK600 (Abb. 3.36) beginnt mit der Amidierung des N^α-Boc-

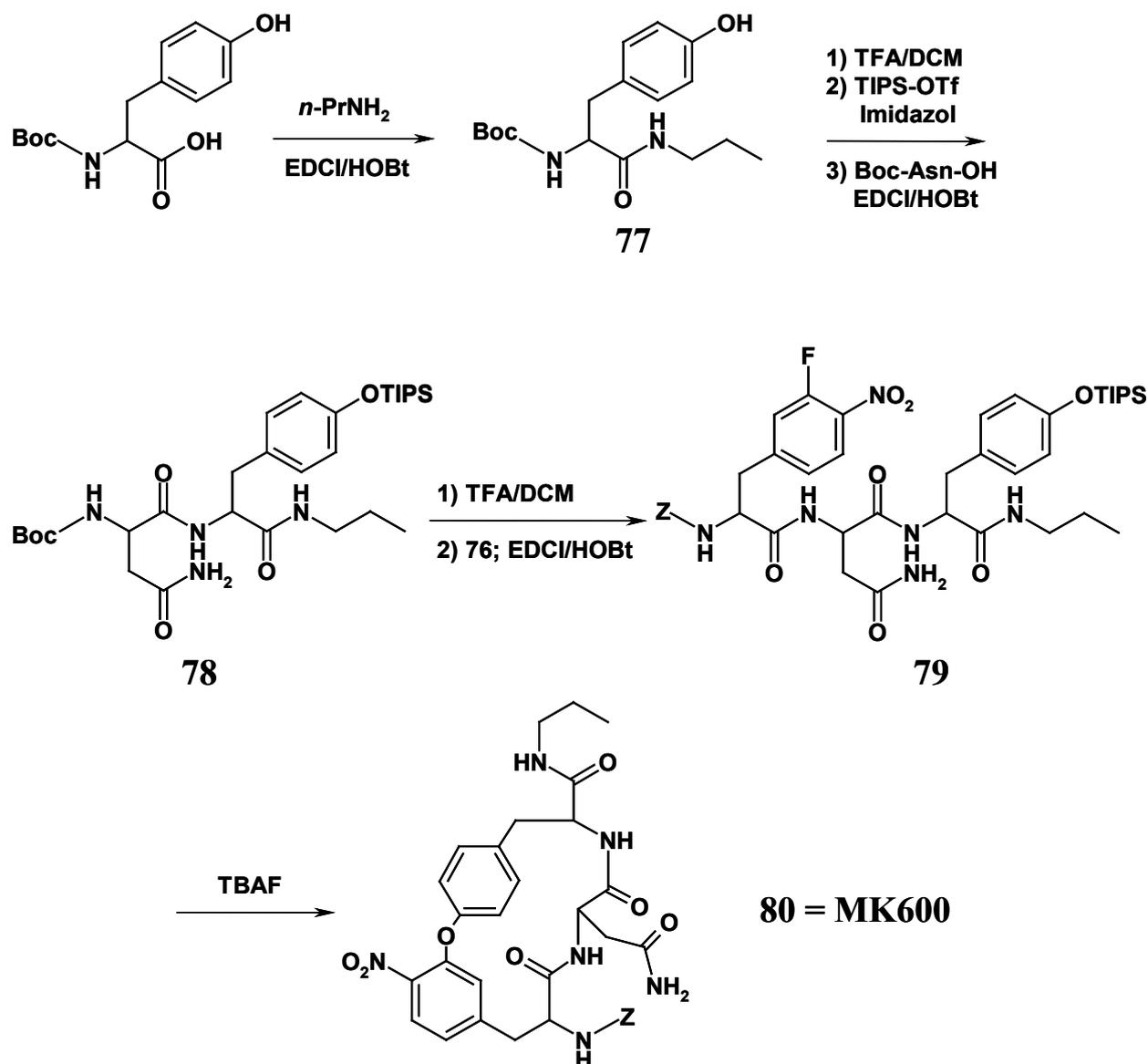


Abbildung 3.36: Syntheschema zur Darstellung von MK600.

geschützten Tyrosins mittels EDCI/HOBt und *n*-Propylamin. Abspaltung der Schutzgruppe lieferte das TFA-Salz **77**, das mit TIPS-OTf und Imidazol als Base an der Hydroxylgruppe silyliert wurde. Neben der zu schützenden Hydroxylgruppe erfolgt auch eine Silylierung der freien Aminogruppe, die zu einer Aktivierung bei der

Verknüpfung mit Boc-Asn-OH mittels EDCI/HOBt führt. Erneute Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA/DCM und Kupplung von **76** auf **78** mit EDCI/HOBt lieferte **79**, welches anschliessend durch TBAF zum Biarylether-Makrocyclus MK600 **80** cyclisiert wurde.

3.7.4 NMR-Struktur und Hemmwirkung von MK600

Zur Konstitutionsanalyse von MK600 wurde dessen Struktur in Lösung mittels NMR-Spektroskopie bestimmt und mit der Struktur von MK258 überlagert (Abb. 3.37). Diese zeigt große Übereinstimmungen im Bereich des Peptidrückgrates zwischen der Biaryletherverbindung MK600 und den beiden TMC-Inhibitoren TMC-95A und MK258. Lediglich die Propylaminseitenkette ist in ihrer räumlichen Ausrichtung leicht verändert. Da jedoch gerade diese Seitenkette in die S1-Tasche bindet, könnte dies die unterschiedliche Aktivität der Proteasomhemmung erklären (Tab. 3.4).

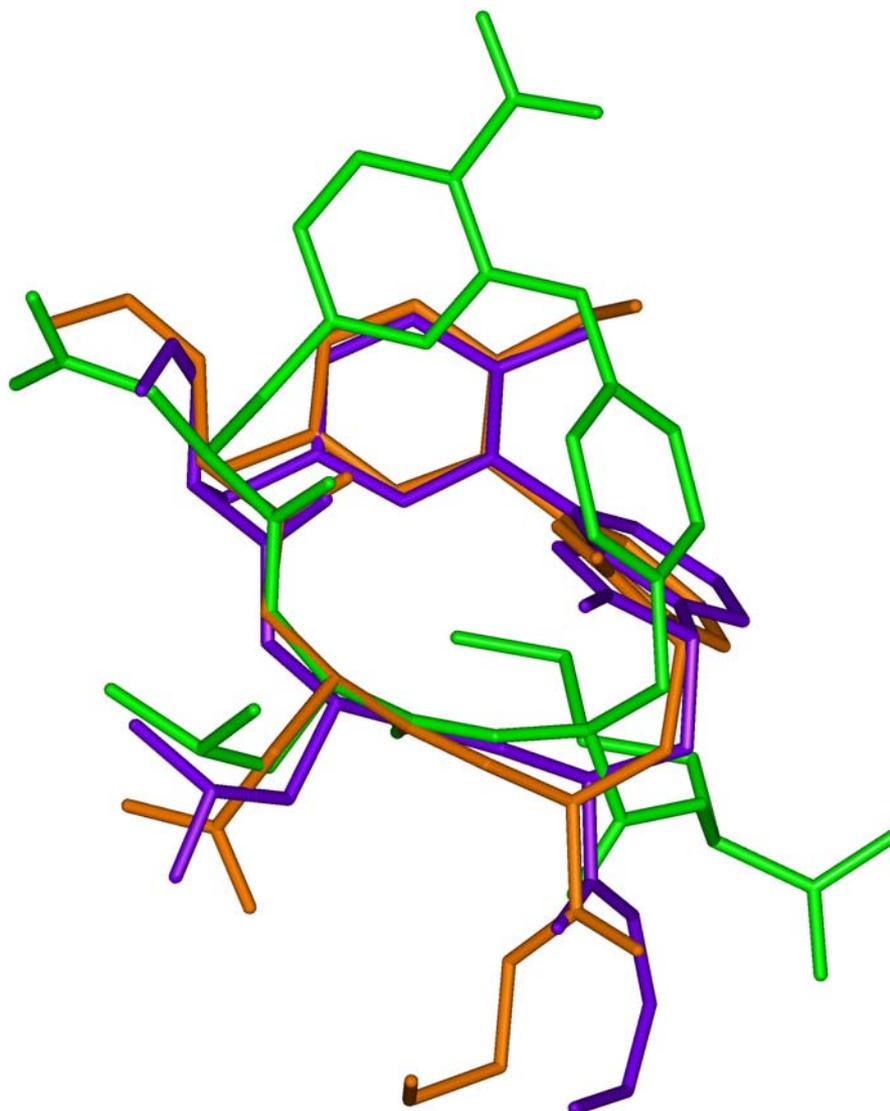


Abbildung 3.37: NMR-Struktur von MK600 (grün) in Überlagerung mit MK258 (orange) und TMC-95A (violett).

	CL-Aktivität K_i [μM]	TL-Aktivität K_i [μM]	PGPH-Aktivität K_i [μM]
Ac-Leu-Leu-Nle-H	1,4	364	≥ 2000
MK258	2,4	55	≥ 2000
MK600	5,5	74	≥ 2000

Tabelle 3.4: Vergleich der K_i -Werte am Hefeproteasom zwischen dem Standardinhibitor Ac-Leu-Leu-Nle-H, MK258 und dem Biaryletherinhibitor MK600.

Eine weitere Erklärung für die um den Faktor 2 schlechtere Inhibition der chymotryptischen Aktivität könnte die fehlende Wasserstoffbindung zwischen der Oxindolseitenkette von TMC-95A und dem Proteasom sein. Die geringeren Inhibitionseigenschaften werden jedoch durch die einfachere Synthese aufgewogen. Durch diesen synthetisch einfacheren Zugang zu entsprechenden Diversomeren sollte ein Austesten verschiedener Seitenketten für die S1- und S3-Taschen des Proteasoms leichter möglich sein. Die Ergebnisse sollten sich daher leicht auf die TMC-basierenden Inhibitoren übertragen lassen, so dass ein effizienteres Inhibitorendesign möglich werden könnte.

3.7.5 Festphasensynthese von „site-directed“ Biaryletherinhibitoren

Zum Austesten verschiedener Seitenketten für eine selektive Inhibition der drei verschiedenen Aktivitäten des Proteasoms wurde eine Festphasensynthese, basierend auf der Biarylethergrundstruktur, ausgearbeitet. Durch Analyse der Röntgenstruktur des Hefeproteasom/TMC-95A-Komplexes (Groll *et al.*, 2001) wurden für die drei Aktivitäten unterschiedliche Seitenketten ermittelt, welche eine Selektivität für die Inhibition vermitteln könnten (Tab. 3.5).

Die Festphasensynthese der Biarylinhibitoren basiert dabei auf den Arbeiten der Gruppe um Zhu (Burgess *et al.*, 1997), die ähnliche Verbindungen an fester Phase synthetisiert haben. Obwohl aus dem Vergleich der Inhibitionskinetik von MK258 und MK416 bekannt war, dass die C-terminal geschützten Säureamide schlechtere Inhibitoren darstellen, wurden dennoch Säureamide synthetisiert, da eine C-terminale Säureamidgruppe den Einsatz von Aminosäuren als Synthesebausteinen erlaubt, die über die Carboxylfunktion am Harz verankert werden.

Grundstruktur	Seitenkette	Aminosäure	Nomenklatur & „site-directed“ Target
		R¹ Nle	CL = MK610
		R³ Leu	
		R¹ Arg	TL = MK620
		R³ Arg	
		R¹ Glu	PGPH = MK630
		R³ Asn	

Tabelle 3.5: Schematische Darstellung der Strukturen von MK610 als Inhibitor für CL-, MK620 für TL- und MK630 für PGPH-Aktivität.

Die Synthese dieser drei Biaryl-inhibitoren erfolgte nach dem Schema der Abb. 3.38.

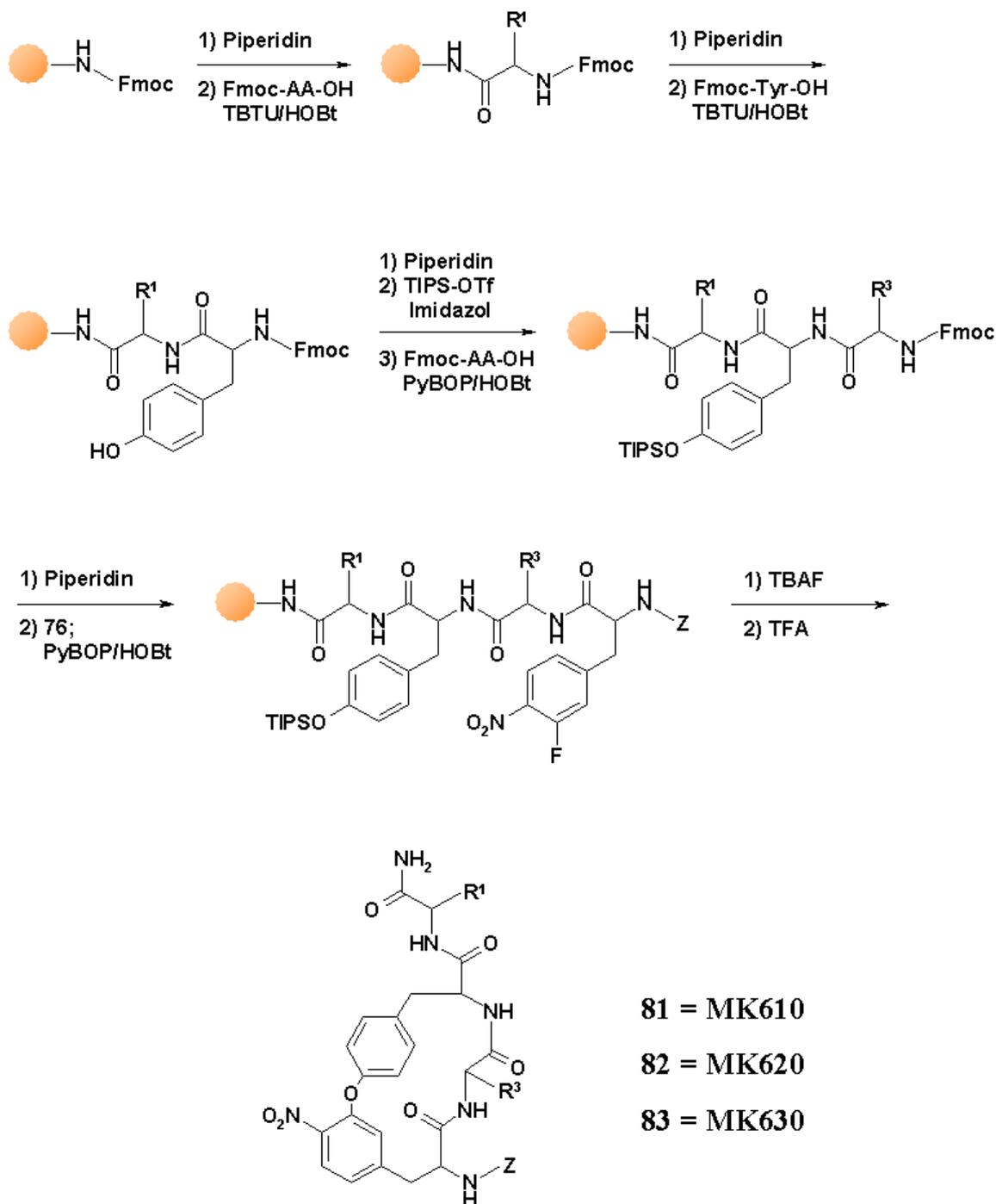


Abbildung 3.38: Schema zur Festphasensynthese der drei Biarylinhibitoren MK610, MK620 und MK630.

Ausgehend von einem Fmoc-geschützten Rink-Amid-Tentagelharz wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in NMP abgespalten und die für die S1-Tasche des Proteasoms ausgewählte Aminosäure (Rest R¹) als Fmoc-Derivat mit TBTU/HOBt an das Harz gekuppelt. Erneute Fmoc-Abspaltung gefolgt von der Kupplung von

Fmoc-Tyr-OH mit TBTU/HOBt und erneuter Fmoc-Abspaltung lieferte die Vorstufe zur Silylierung. Die Silylierung der Hydroxylfunktion des Tyrosins wurde mit TIPS-OTf und Imidazol als Base durchgeführt. Dabei kommt es auch zu einer Silylierung der freien Aminofunktion, was jedoch sogar zu einer Aktivierung bei der nachfolgenden Acylierung führt. Anschliessend wurde die zweite, aktivitätsselektive Fmoc-Aminosäure mit PyBOP/HOBt gekuppelt. Erneute Fmoc-Abspaltung und Acylierung der Peptidkette mit **76** mittels PyBOP/HOBt lieferte die lineare Vorstufe zur Cyclisierung. Nach Abspaltung der Silylschutzgruppe mit TBAF von der nukleophil-angreifenden Hydroxylgruppe, wurde unter gleichzeitiger TBAF-Basenkatalyse der Makrocyclus geschlossen. Abspaltung vom Harz mit 95% TFA unter gleichzeitiger Schutzgruppenabspaltung lieferte die drei Inhibitoren MK610, MK620 und MK630 als Rohprodukte, welche nach Fällung und Reinigung durch HPLC in den Ausbeuten von 9%, 2% und 2% über alle Stufen erhalten wurden.

3.7.6 NMR-Struktur von MK610 und Hemmwirkung der „site-directed“ Inhibitoren

Exemplarisch für die drei unterschiedlichen Inhibitoren wurde die Struktur von MK610 in Lösung durch NMR-Spektroskopie bestimmt (Abb. 3.39). Deutlich ist wiederum zu erkennen, dass der Winkel, unter welchem die Seitenkette für die S1-Tasche in Lösung vorliegt, gegenüber dem Naturstoff TMC-95A leicht verdreht ist. Ansonsten zeigt die Struktur im Bereich des Peptidrückgrates, über welches im wesentlichen die Wasserstoffbindungen gemäss einer antiparallelen β -Faltblattstruktur vermittelt werden, eine sehr gute Überlappung mit dem Naturstoff. Die Hemmwerte der drei Inhibitoren (Tab. 3.6) waren jedoch unerwartet, da durch den Aminosäureaustausch keine „site-selective“-Inhibitoren erhalten werden konnten. Zwar inhibiert MK610 nur die chymotryptische Aktivität und ist somit selektiv, allerdings nur mit einem K_i von 65 μM und somit um den Faktor 12 schlechter als MK600. Demgegenüber verschlechterte sich die Hemmung von MK416 gegenüber MK258 kaum. MK620 wurde als Inhibitor für die tryptische Aktivität entworfen, inhibiert diese jedoch nur mit einem K_i von 173 μM und damit schwächer als MK600,

dessen Reste für die S1 und S3-Taschen des Proteasoms relativ ungeeignet sein

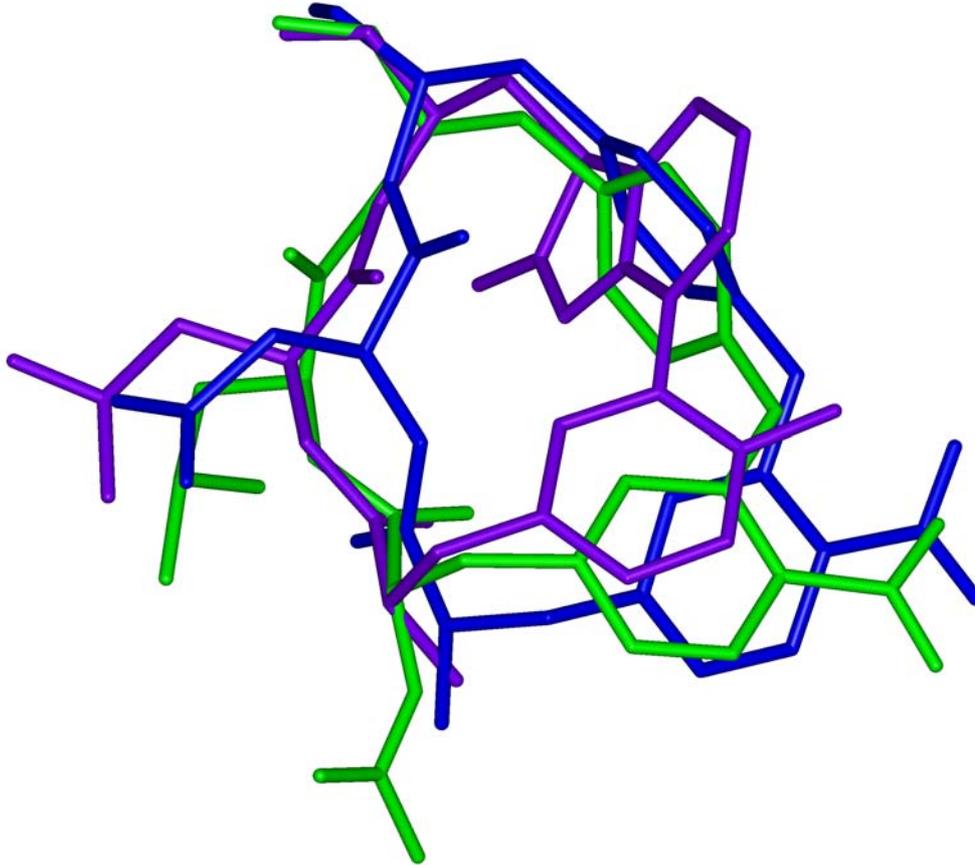


Abbildung 3.39: Überlagerung der Struktur von MK610 (grün) mit MK600 (blau) und TMC-95A (violett).

sollten. Während MK620 die chymotryptische Aktivität mit einem K_i von 2,2 μM hemmt und somit den besten Inhibitor der chymotryptischen Aktivität darstellt, zeigt MK630 keinerlei Hemmung der tryptischen und PGPH-Aktivität und nur eine geringe Hemmung der chymotryptischen mit einem K_i von 244 μM . Um diese unerwarteten Effekte zu erklären, ist eine Kristallstrukturanalyse des entsprechenden Proteasom/Inhibitorkomplexes notwendig (entsprechende Untersuchungen sind angestrebt).

	<i>CL-Aktivität</i> K_i [μM]	<i>TL-Aktivität</i> K_i [μM]	<i>PGPH-Aktivität</i> K_i [μM]
Ac-Leu-Leu-Nle-H	1,4	364	≥ 2000
MK258	2,4	55	≥ 2000
MK416, erster K_i	2,8	144	≥ 2000
MK600	5,5	74	≥ 2000
MK610	65	≥ 2000	≥ 2000
MK620	2,2	173	≥ 2000
MK630	244	≥ 2000	≥ 2000

Tabelle 3.6: Vergleich der K_i -Werte am Hefeproteasom von Ac-Leu-Leu-Nle-H mit den auf der Grundstruktur von TMC basierenden Inhibitoren und den Biarylinhibitoren.

3.7.7 Synthese eines Ketomethylenderivates von MK610

Es wurde versucht, ein Ketomethylenderivat von MK610, das die Bezeichnung MK640 trägt, in Lösung (Abb. 3.40) zu synthetisieren. Dabei wurde ausgehend von dem bereits vorhandenen Synthesebaustein **60** zuerst die Boc-Schutzgruppe mit TFA/DCM abgespalten und anschliessend mit Boc-Tyr-OH mittels EDCI/HOBt zu **84** verknüpft. Erneute Boc-Abspaltung und anschliessende Kupplung mit Boc-Leu-OH und EDCI/HOBt führte nach chromatographischer Reinigung zu **85**, welches anschliessend nach Schutzgruppenabspaltung und Acylierung mit **76** mittels EDCI/HOBt zur linearen Vorstufe **86** umgesetzt wurde. Die anschliessende Cyclisierung wurde mit Kaliumcarbonat als Base in einer Konzentration von 10^{-3} M in DMF durchgeführt. Allerdings konnte kein MK640 isoliert werden, sondern stattdessen jeweils zwei Diastereomere zweier Produkte mit einer Massendifferenz

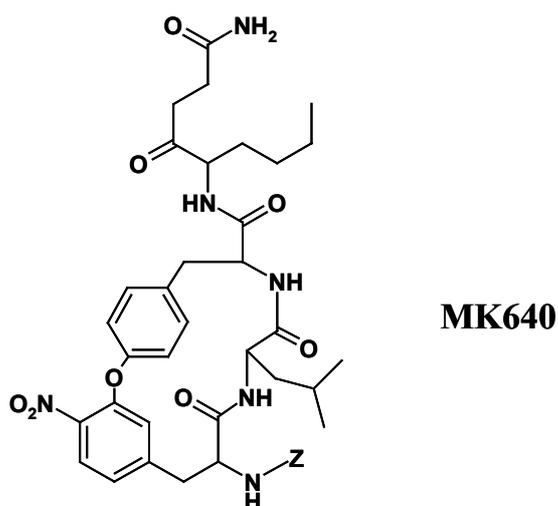
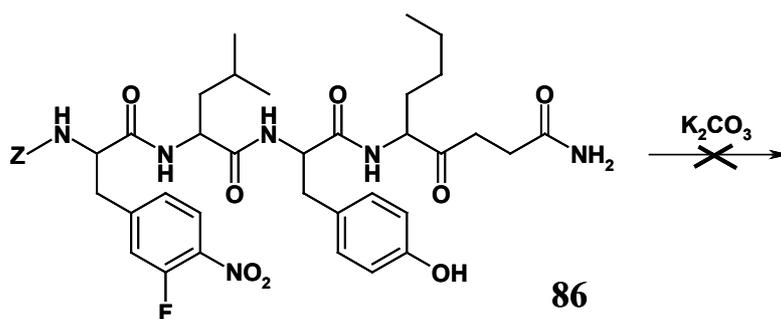
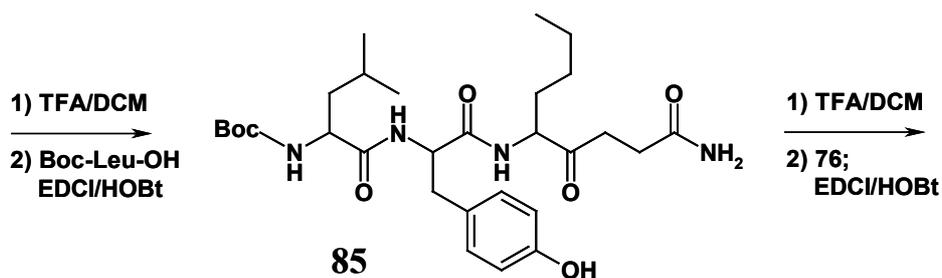
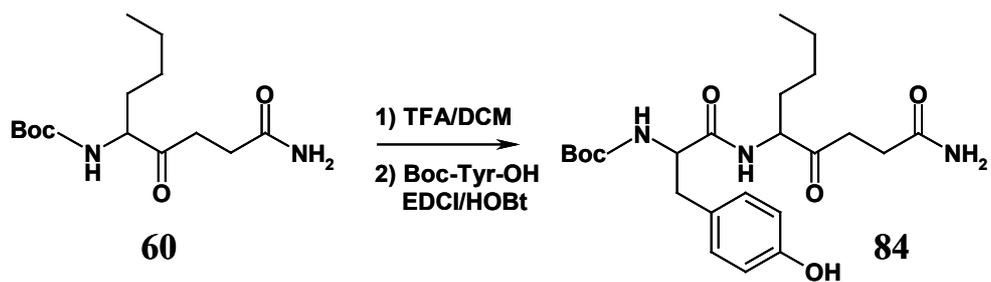


Abbildung 3.40: Syntheschema zur Darstellung von Ketomethylenbiarylether MK640.

von 18 amu bzw. 20 amu. Da beide Produkte das für die cyclischen Biarylether-typische UV-Spektrum zeigen und ähnliche Nebenprodukte bei den anderen Synthesen bisher nicht beobachtet wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Ketomethylen-„Seitenkette“ dafür verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung für die Massendifferenz von 18 amu wäre eine, durch die Base katalysierte, nukleophile Attacke des Amid-Stickstoffes auf die elektrophile Ketogruppe, was unter Wasserabspaltung zu einem 6-Ringsystem führen würde. Eine weitere Eliminierung von formal Wasserstoff von diesem Produkt – vielleicht ermöglicht durch Konjugation der entstehenden Doppelbindung mit der Säureamidgruppe – könnte zu einem Produkt mit der Differenz von 20 amu führen. Eine genaue Analyse der Nebenprodukte durch NMR war jedoch aufgrund der geringen Substanzmengen nicht möglich. Eine Cyclisierung mit dem weniger basischen Reagenz TBAF, analog den Synthesen von MK600 und den Harzsynthesen, hätte die auftretende Nebenreaktion vielleicht verhindert, wurde aber bisher nicht weiter untersucht.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aus der Kristallstruktur des Hefeproteasom/TMC-95A-Komplexes abgeleitete Minimalstruktur zur Inhibition des Proteasoms bereits genügt und somit den Zugang zu einer neuen Leitstruktur zur Entwicklung von hochwirksamen Proteasominhibitoren schafft.

Die Synthese von weiteren, auf dieser Struktur basierenden Inhibitoren, die einerseits zeigen sollten, dass diese Struktur sowohl spezifisch eine Aktivität des Proteasoms hemmen kann, als auch andererseits Zugang zur S'-Seite des Proteasoms ermöglichen können, haben zu neuen, interessanten Beobachtungen geführt. Allerdings ist ein genaues, molekulares Verständnis des Bindungsmodus dieser neuartigen Inhibition nur durch Kristallstrukturanalyse möglich, die im Anschluss an diese Arbeit mit den synthetisierten Verbindungen durchgeführt werden soll.

Aufgrund der Bandbreite der synthetisierten Verbindungen konnten die Möglichkeiten, aber auch die Limitierungen des gewählten Makrocyclisierungsansatzes aufgezeigt werden. Es wurde jedoch klar aufgezeigt, dass auch die Seitenkettencyclisierung einen effizienten Zugang zu diesen Verbindungen ermöglicht. Dieser Befund erlaubt andererseits einen einfachen Ansatz zur Etablierung der Festphasensynthese dieser neuen Substanzklasse von Proteasominhibitoren. Dabei kann mit geeignet geschützten Fmoc-Aminosäuren der Peptidstrang analog der Festphasenpeptidsynthese aufgebaut werden. Dieser wird anschliessend am Harz durch intramolekulare Suzuki-Kupplung cyclisiert und dann abgespalten, wodurch der Zugang zur kombinatorischen Chemie, nämlich der Synthese kleiner Bibliotheken in Parallelansätzen mit minimierten Arbeitsaufwand, möglich wird.

Das Prinzip der Inhibition über β -Faltblatt-stabilisierende Inhibitoren konnte voll bestätigt werden, auch wenn die genaue Ursachen der unterschiedlichen Hemmungen bislang ohne Kristallstrukturen nicht verstanden werden konnte. Deshalb ist auch hier eine Röntgenstrukturanalyse der synthetisierten Inhibitoren im Komplex mit dem Proteasom notwendig, um genaue Informationen zum Bindungsmodus zu gewinnen. Zeigt die Kristallstruktur, dass der niedrigere Hemmwert auf den Winkel der S1-Seitenkette zumindestens teilweise zurückzuführen ist, so sollte in anschliessenden

Arbeiten versucht werden, durch Synthese von anderen, ebenfalls β -Faltblattstabilisierenden Inhibitorsubstanzklassen, wie z. B. die weniger rigiden cyclischen Aryl-Alkylether, das Prinzip erneut aufzugreifen und somit den genauen Einfluss der in TMC-Inhibitoren vorhandenen Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff des Oxindols und dem Proteinrückgrates des Proteasoms genauer zu bestimmen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Lösungsmittel und Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) entweder in p.a. Qualität bezogen oder nach den üblichen Standardverfahren gereinigt. Für analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril von Merck der Qualität LiChrosolv verwendet. Weitere gängige Chemikalien stammen von den Firmen Aldrich, Fluka, Lancaster (Mühlheim) und Merck und wurden ungereinigt verwendet. Nicht selbstsynthetisierte Aminosäurederivate und Kupplungsreagenzien waren noch von früheren Synthesen in der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie vorhanden oder wurden von Alexis (Grünberg), Bachem (Heidelberg), Novabiochem (Bad Soden) oder Senn Chemicals (Dielsdorf, Schweiz) käuflich erworben. Die Harze für die Festphasensynthese stammen von Applied Biosystems (Darmstadt). Als Substrate für den Proteasomassay wurden Z-Leu-Leu-Glu-βNa, Bz-Phe-Val-Arg-AMC, Z-Ala-Arg-Arg-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC von Bachem eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-60-Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck verwendet. Die eingesetzten Fließmittelsysteme werden bei den Synthesen erläutert. Zur Detektion der Substanzen wurde verwendet:

- 1) Fluoreszenz bei 254 nm
- 2) Chlor/*o*-Tolidin
- 3) zur Detektion von Aldehyden und Ketonen: 2,4-Dinitrophenylhydrazin
- 4) Oxidation mit Kaliumpermanganat (2%-Lösung in Wasser)
- 5) Iodkammer

Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma Merck verwendet.

Analytische HPLC

Zur analytischen HPLC wurden verschiedene Trennsysteme eingesetzt, welche als Laufmittel den Eluent A (5% Acetonitril in 2%iger wässriger Phosphorsäure) und den Eluent B (90% Acetonitril in 2% wässriger Phosphorsäure) verwendeten.

System I: Benutzt wurde eine HPLC-Anlage von Waters (Eschborn) bestehend aus einer Niederdruck Chromatographie-Pumpanlage Waters 515, einem Autosampler Waters 717plus, einem Photodioden Array Module Waters 996 und einem Controller Waters 600S; als Software zur Datenaufarbeitung fand Millenium 32 von Waters seine Anwendung. Als analytische Säule wurde eine X-Terra-MS C₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters bei einem Fluss von 1,5 ml/min verwendet. Es wurde ein Gradient von 100% A nach 100% B in 15 min und 2 min Spülen bei 100% B gefahren.

Grundlage für die *Systeme II-V* war ein HPLC-System von Waters, bestehend aus dem Waters 2690 Separations Module und einem Photodioden Array Module Waters 996. Als Software wurde Millenium 32 von Waters verwendet. Dabei wurden folgende unterschiedliche Säulen und Flüsse eingesetzt:

System II: X-Terra-MS C₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters mit einem Fluss von 1 ml/min; Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.

System III: Luna C₁₈ 5 µm, 150×4,6 mm von phenomenex (Aschaffenburg) mit einem Fluss von 1,5 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.

System IV: Symmetry C₁₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters mit einem Fluss von 1,5 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.

System V: Chromolith C₁₈ 5 µm, 100×4,6 mm von Merck mit einem Fluss von 3 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 6 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.

Präparative HPLC

Präparative HPLC wurde an einer integrierten HPLC-Anlage von Abimed-Gilson (Langenfeld), bestehend aus den Teilsystemen Pump 321, UV-VIS 152, Interface 506C und dem Fraction-Collector Model 202, durchgeführt. Als Software zur Systemsteuerung und Datenaufarbeitung fand UniPoint V2.10 von Gilson Anwendung. Als Säule wurde eine Nucleosil C₈ SP250/10 von Macherey & Nagel (Düren) bei einem Fluss von 3 ml/min verwendet. Dabei wurde als Eluent A 0,1%ige wässrige TFA und als Eluent B Acetonitril mit 0,1% TFA verwendet.

Massenspektrometrie

LC-ESI-Massenspektrometrie wurde an einem PE Sciex API165 (Langen) Massenspektrometer durchgeführt. Als HPLC-System wurde eingesetzt: Das Microgradient System 140C von Applied Biosystems, PE 785A UV-VIS-Detector von Perkin Elmer (Rodgau), PE Series 200 Autosampler von Perkin Elmer und PE Nelson 200 Interface von Perkin Elmer. Als Software wurde BioMultiView 1.3.1 von PE Sciex und als HPLC-Trennsäule eine Nucleosil C₈ 100/5, 125×2 mm bei einem Fluss von 250 µl/min verwendet. Dabei wurde ein Gradient von 5% Acetonitril in 0,05%iger wässriger TFA nach 90% Acetonitril in 0,05%iger wässriger TFA in 15 min gefahren.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzbestimmungen wurden an einem Spectrofluorimeter SM25 der Firma Biotek-Kontron (Neufahrn) durchgeführt, welches über einen PC mit einer selbstgeschriebenen Software gesteuert wurde und die automatische Erfassung der Datenpunkte und Auswertung der Spektren ermöglichte. Als Küvetten wurden halbmikro Küvetten PMMA (4×10 mm) der Firma Mueller Ratiolab (Dreieich) eingesetzt.

NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden bei 295K an einem Bruker AMX400 oder an einem Bruker DRX500 Spektrometer, mit jeweils 400,13 MHz und 500, 13 MHz Feldstärke, in deuterierten Lösungsmitteln gemessen. Die Konzentration der Proben betrug zwischen 1 und 3 mM. Die Resonanzsignale wurden mit Hilfe des Programms Sparky (Goddard & Kneller) nach der Methode von Wüthrich zugeordnet (Wüthrich, 1986). Die eindimensionalen ^1H -Spektren wurden ohne Lösungsmittelunterdrückung aufgenommen. 2D-TOCSY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 75 ms und einer MLEV-17 Pulssequenz zum isotropen Mischen aufgenommen (Bax & Davies, 1985a). Die experimentellen Protonenabstände wurden aus einem 2D-ROESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 200 ms ermittelt (Bax & Davies, 1985b). Die $^3J_{\text{HN-HA}}$ Kopplungskonstanten wurden aus einem 2D-DQF-COSY-Spektrum (Rance *et al.*, 1983) und aus den eindimensionalen ^1H -Spektren gewonnen. Die Datenprozessierung erfolgte mit dem XWINNMR Software Paket (Bruker Biospin, Karlsruhe) auf SGI Workstations.

Modeling-Studien

Die Strukturrechnungen und die Verfeinerung wurden mit Hilfe des INSIGHT II Software Paket Version 98 (Accelrys, San Diego, USA) auf Silicon Graphics O2

R5000 und Origin 200 durchgeführt. Die NOE-Intensitäten wurden mit Hilfe der folgenden Klassifikation in Protonenabstände umgewandelt: sehr stark 1.7 – 2.3 (Å), stark 2.2 – 2.8 (Å), mittel 2.6 – 3.4 (Å), schwach 3.0 – 4.0 (Å) und sehr schwach 3.2 – 4.8 (Å). Die Abstände der Pseudoatome wurden nach der von Wüthrich (Wüthrich, 1986) vorgeschlagenen Methode korrigiert. Die $^3J_{\text{HN-HA}}$ Kopplungskonstanten wurden unter Benutzung der Karplusgleichung in Peptidrückgratdihedralwinkel umgerechnet. Die Kraftkonstanten betragen 50 kcal mol⁻¹ Å⁻² für die Protonenabstände und 50 kcal mol⁻¹ rad⁻² für die Dihedralwinkel. Hundert 4-dimensionale Strukturen wurden durch Distanz-Geometrie-Rechnungen generiert und anschließend durch den EMDED Algorithmus (Crippen & Havel, 1988) auf 3 Dimensionen reduziert. Nachfolgend wurden die erhaltenen Strukturen mit einer Molekularen Dynamik-Simulation verfeinert: nach 200 Minimierungsschritten wurden 5 ps bei 300 K gerechnet, abschließend wurde das System während 10 ps exponentiell auf 0 K abgekühlt. Die MD-Simulationen wurden mit einem CVFF Kraftfeld und einem Zeitschritt von 1 fs gerechnet. Von den 100 erhaltenen Strukturen wurden die 20 energieärmsten für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

5.2 Synthesevorschriften

Z-(3-Boronsäurepinakolester)*Tyr*(Me)-OMe (**22**)

Eine Lösung von **28** (271 mg; 0,557 mmol) in DMSO (30 ml) wurde für 1 h entgast und anschliessend unter eine Argonatmosphäre gesetzt. Kaliumacetat (3 eq.; 1,67 mmol; 164 mg), Bis(pinakolato)diboron (1,5 eq.; 0,836 mmol; 212 mg) und Pd(dppf)Cl₂ (0,03 eq.; 0,017 mmol; 14 mg) wurden zur Reaktionsmischung gegeben und für 18 h auf 80 °C erwärmt. Nach Abkühlen der Reaktionsphase auf RT wurde EtOAc (200 ml) und Wasser (40 ml) hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige erneut mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/EtOAc (3:1) als Eluent gereinigt. Ausbeute: 180 mg (69%); HPLC (System II): t_R 8,48 min (freie Borsäure); ESI-MS: *m/z* 388,3 (M+H⁺ der freien Borsäure), monoisotopische Masse für C₁₉H₂₂BNO₇ (freie Borsäure): 387; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7,41 (d, 1H); 7,41-7,28 (m, 5H); 7,12 (dd, 1H); 6,75 (d, 1H); 5,22 (d, 1H); 5,09 (s, 2H); 4,63-4,61 (m, 1H); 3,80 (s, 3H); 3,71 (s, 3H); 1,34-1,29 (m, 12H); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 172,77; 164,31; 156,34; 138,19; 137,18; 133,74; 131,44; 129,51; 129,15; 128,72; 128,65; 127,91; 111,77; 84,18; 68,94; 67,65; 56,67; 55,90; 52,72; 38,20; 31,21; 30,34; 29,69; 25,52; 25,26; 24,61; 23,63.

Boc-(6-Br)*Trp*-NHPr (**23**)

31 (1,12 g; 2,92 mmol) wurde in DMF (40 ml) gelöst und zur Lösung wurde N-Methylmorpholin (2,2 eq.; 6,42 mmol; 708 µl), HOBt (1,6 eq.; 4,67 mmol; 715 mg) und EDCI (1,2 eq.; 3,50 mmol; 671 mg) gegeben und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde *n*-Propylamin (1,1 eq.; 3,21 mmol; 265 µl) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingeeengt, der

Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne evaporiert. Der Rückstand wurde in wenig DCM gelöst und über eine Kieselgelsäule mit einem Gradienten von DCM nach DCM/MeOH (9:1) gereinigt. Ausbeute: 843 mg (68%); HPLC (System II): t_R 9,85 min; ESI-MS: *m/z* 424,4; 426,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₉H₂₆BrN₃O₃: 423; 425.

Boc-(7-Br)Trp-NHPr (24)

Zu einer Lösung von **34** (57 mg; 0,149 mmol) in DMF (40 ml), DIEA (1,1 eq.; 0,163 mmol; 28 µl), HOBt (1,1 eq.; 0,163 mmol; 25 mg) und EDCI (1,1 eq.; 0,163 mmol; 31 mg) wurde nach 5 min Rühren bei RT *n*-Propylamin (1,2 eq.; 0,178 mmol; 15 µl) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und die organische Phase zur Trockne eingeeengt. Ausbeute: 55 mg (88%); HPLC (System III): t_R 11,00 min; ESI-MS: *m/z* 424,2, 426,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₉H₂₆BrN₃O₃: 423; 425.

Boc-(7-Br)Trp-NHPr (24-2)

34-2 (20 mg; 0,052 mmol) wurde in DMF (20 ml) gelöst und DIEA (2 eq.; 0,104 mmol; 18 µl), HOBt (1,2 eq.; 0,062 mmol; 10 mg) und EDCI (1,1 eq.; 0,057 mmol; 11 mg) hinzugegeben und für 5 min gerührt. Nach Zugabe von *n*-Propylamin (1,5 eq.; 0,078 mmol; 6 µl) wurde die resultierende Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt, zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Waschen mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Produkt. Ausbeute: 21 mg (95%); HPLC (System V): t_R 4,01 min; ESI-MS: *m/z* 424,0; 426,0 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₉H₂₆BrN₃O₃: 423; 425.

H-(3-I)Tyr-OMe·HCl (**26**)

Eine auf 0 °C gekühlte Lösung von 3-Iodotyrosin (2,01 g; 6,55 mmol) in MeOH (30 ml) wurde unter Zutropfen mit einer Lösung von Thionylchlorid (3 ml) in MeOH (20 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung liess man auf RT erwärmen und über Nacht rühren, gefolgt von Einengen zur Trockne. Ausbeute: 2,34 g (>98%); HPLC (System II): t_R 3,51 min; ESI-MS: m/z 322,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{10}H_{12}INO_3$: 321.

Z-(3-I)Tyr-OMe (**27**)

26 wurde in einer Lösung von Dioxan/Wasser (1:1, 50 ml) gelöst und $NaHCO_3$ (2 eq.; 13,09 mmol; 1,10 g) hinzugegeben und durch weitere Zugabe von $NaHCO_3$ wurde der pH auf einen Wert von 8-9 eingestellt. Danach wurde Z-OSu (1 eq.; 6,55 mmol; 1,63 g) zur Lösung gegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Ausbeute: 2,97 g (>98%); HPLC (System II): t_R 9,41 min; ESI-MS: m/z 456,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{18}H_{18}INO_5$: 455.

Z-(3-I)Tyr(Me)-OMe (**28**)

In Aceton (50 ml) wurde **27** (2,97 g; 6,55 mmol) gelöst und Kaliumcarbonat (10 eq.; 65,45 mmol; 4,52 g) und Methyljodid (10 eq.; 65,45 mmol; 4,08 ml) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 50 °C erwärmt und über Nacht gerührt. Dann wurde auf 0 °C gekühlt und Ammoniak (15 ml) langsam unter Kühlen zugegeben. Durch Zugabe von 1 M Salzsäure wurde der pH der Lösung auf 7 eingestellt und die Reaktionslösung zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in EtOAc und Wasser aufgenommen, die organische Phase mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq.

NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel und Petrolether/EtOAc (2:1) als Eluenten gereinigt. Ausbeute: 2,21 g (72%); HPLC (System II): t_R 10,52 min; ESI-MS: m/z 470,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{19}H_{20}INO_5$: 469; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 7,52 (d, 1H); 7,39-7,32 (m, 5H); 7,04 (dd, 1H); 6,71 (d, 1H); 5,23 (d, 1H); 5,14-5,11 (m, 2H); 4,61-4,59 (m, 1H); 3,85 (s, 3H); 3,73 (s, 3H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 172,43; 158,28; 156,24; 140,99; 137,10; 131,01; 130,82; 129,26; 128,87; 128,76; 111,81; 86,83; 67,80; 57,11; 55,77; 52,96; 37,82.

H-(6-Br)Trp-OH (L-29)

In einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5; 30 ml) wurde **30** (2,28 g; 7,01 mmol) suspendiert und durch Zugabe von 1 M KOH (1 eq.; 7,01 mmol; 701 μ l) aufgelöst. Anschliessend wurde zum Verdünnen 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5; 150 ml) und Acylase I von *Aspergillus melleus* (0,55 U/mg; 1,26 g) zugesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und das Enzym mit einem Amicon-Filter (cut-off >10 kDa) abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 0,1 M HCl auf pH 2-3 eingestellt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Durch Zugabe von 0,1 M NaOH wurde die wässrige Phase auf pH 7 eingestellt und am Rotationsverdampfer so stark eingeengt, bis sich der erste Niederschlag von **L-29** bildete. Die Suspension wurde für 1 Tag bei 4 °C gekühlt und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Ausbeute: 833 mg (42%); HPLC (System I): t_R 7,42 min; ESI-MS: m/z 283,0; 285,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{11}H_{11}BrN_2O_2$: 282; 284.

Ac-(6-Br)Trp-OH (30)

H-D,L-(6-Br)-Trp-OH (1,99 g; 7,04 mmol) wurde in Dioxan/Wasser (1:1, 50 ml) gelöst und zur Lösung wurde $NaHCO_3$ (2 eq.; 14,09 mmol; 1,18 g) und Acetanhydrid (3 eq.; 21,13 mmol; 2,00 ml) gegeben und bei RT über Nacht gerührt. Nach Einrotieren des Reaktionsgemisches zur Trockne wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit

5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und die EtOAc-Phase zur Trockne eingengt. Ausbeute: 2,28 g (>98%); HPLC (System I): t_R 9,66 min; ESI-MS: m/z 325,2; 327,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₃H₁₃BrN₂O₃: 324; 326; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8,14 (s, 1H); 7,53 (d, 1H); 7,44 (d, 1H); 7,23 (dd, 1H); 7,04 (d, 1H); 5,92 (d, 1H); 4,94 (m, 1H); 3,32 (m, 2H); 2,04 (s, 3H).

Boc-(6-Br)Trp-OH (31)

Zu einer Lösung von L-**29** (833 mg; 2,94 mmol) in Dioxan/Wasser (1:1, 60 ml) wurde NaHCO₃ (2 eq.; 5,88 mmol; 494 mg) und (Boc)₂O (3 eq.; 8,82 mmol; 1,92 g) gegeben und bei RT über Nacht gerührt. Einrotieren der Reaktionslösung und Aufnahme des Niederschlages in EtOAc und 5%iger aq. KHSO₄, Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen bis zur Trockne lieferte das gewünschte Produkt. Ausbeute: 1,12 g (>98%); HPLC (System I): t_R 12,42 min; ESI-MS: m/z 383,0; 385,0 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₆H₁₉BrN₂O₄: 382; 384.

H-(7-Br)Trp-OH (33)

7-Bromoindol (100 mg; 0,510 mmol) wurde in Toluol (20 ml) gelöst und mit einer wässrigen Lösung, bestehend aus α₂β₂-Tryptophan-Synthetase (2 ml; c(Stock) = 100 μM), Tris-Puffer (pH 7,8; 5 ml; c(Stock) = 1 M), NaCl (2 ml; c(Stock) = 5 M) und PLP (5 ml; c(Stock) = 0,4 mM) versetzt und für 48 h bei 37 °C geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase durch einen Amicon-Filter (cut-off > 3000 Da) filtriert. Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 10-11 eingestellt, zweimal mit Ethylacetat extrahiert und anschliessend durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 6-7 eingestellt. Die wässrige Lösung wurde eingengt und für 16 h bei 4 °C gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und

getrocknet. Ausbeute: 13 mg (9%); ESI-MS: m/z 283,0; 285,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{11}H_{11}BrN_2O_2$: 282; 284.

H-(7-Br)Trp-OH (33-2)

39 (108 mg; 0,332 mmol) wurde in einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5; 10 ml) suspendiert und durch Zugabe von 0,1 M KOH (1 eq.; 0,332 mmol; 3,32 ml) gelöst und anschliessend durch erneute Zugabe von 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5; 60 ml) verdünnt. Zur Lösung wurde Acylase I von *Aspergillus melleus* (0,55 U/mg; 100 mg) gegeben und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abtrennen des Enzyms durch Amicon-Filtration (cut-off >10 kDa), wurde auf pH 2-3 durch Zugabe von 0,1 M HCl angesäuert und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Durch Zugabe von 0,1 M NaOH wurde der pH der wässrigen Phase auf pH 7 eingestellt und am Rotationsverdampfer so stark eingengt, bis sich der erste Niederschlag von **33-2** bildet. Die entstandene Suspension wurde für einen Tag bei 4 °C gelagert und der Niederschlag abzentrifugiert. Ausbeute: 38 mg (40%); HPLC (System V): t_R 1,75 min; ESI-MS: m/z 283,0; 285,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{11}H_{11}BrN_2O_2$: 282; 284; 1H -NMR ($D_2O/MeOD$): δ 7,70 (d, 1H); 7,40-7,36 (m, 2H); 7,05 (t, 1H); 3,99-3,96 (m, 1H).

Boc-(7-Br)Trp-OH (34)

Zu einer Lösung von **33** (42 mg; 0,148 mmol) in Dioxan/Wasser (1:1, 30 ml) und $NaHCO_3$ (3 eq.; 0,444 mmol; 37 mg) wurde $(Boc)_2O$ (2 eq.; 0,296 mmol; 65 mg) gegeben und bei RT über Nacht gerührt. Einengen des Gemisches zur Trockne, Aufnahme des Niederschlages in EtOAc und 5%iger aq. $KHSO_4$, Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. $KHSO_4$ und 5%iger aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen der EtOAc-Phase lieferte das Produkt. Ausbeute: 57 mg (>98%); HPLC (System III): t_R 10,33 min; ESI-MS: m/z 383,0; 385,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{16}H_{19}BrN_2O_4$: 382; 384.

Boc-(7-Br)Trp-OH (34-2)

33-2 (38 mg; 0,134 mmol) wurde in Dioxan/Wasser (1:1, 15 ml) gelöst und NaHCO₃ (3 eq.; 0,402 mmol; 34 mg) und (Boc)₂O (2 eq.; 0,268 mmol; 58 mg) wurde hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen des Gemisches zur Trockne, Aufnahme des Niederschlages in EtOAc und 5%iger aq. KHSO₄, Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. KHSO₄ und 5%iger aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen der EtOAc-Phase lieferte das Produkt. Ausbeute: 47 mg (92%); HPLC (System V): t_R 3,57; ESI-MS: m/z 383,0; 385,0 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₆H₁₉BrN₂O₄: 382; 384.

3-Dimethylamino-7-bromo-indol (35)

Eine Lösung von *para*-Formaldehyd (0,52 eq.; 4,13 mmol; 124 mg), N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan (0,6 eq.; 4,77 mmol; 651 µl) und Eisessig (8 ml) wurde solange erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Diese Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und langsam zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 7-Bromoindol (1,56 g; 7,94 mmol) in DCM (25 ml) getropft. Nach 2 h wurde Wasser (40 ml) und 5%ige aq. HCl (20 ml) zur Reaktionslösung gegeben und die wässrige Phase 4× mit DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen durch Zugabe von 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 12 eingestellt. Zweimalige Extraktion mit Diethylether, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen lieferte das Produkt. Ausbeute: 1,87 g (93%); HPLC (System IV): t_R 3,88 min; ESI-MS: m/z 253,2; 255,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₁H₁₃BrN₂: 252; 254; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8,30 (s, 1H); 7,67 (d, 1H); 7,65 (dd, 1H); 7,19 (d, 1H); 7,01 (dd, 1H); 3,61 (s, 2H); 2,27 (s, 6H).

3-(7-Bromoindolyl)trimethylammoniumiodid (36)

35 (459 mg; 1,81 mmol) wurde in Ethanol (8,5 ml) gelöst und mit Methyljodid (1,1 eq.; 2,00 mmol; 125 μ l) versetzt, für 30 min bei RT gerührt und anschliessend für 16 h bei 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 343 mg (48%); HPLC (System IV): t_R 3,78 min; ESI-MS: m/z 267,2; 269,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{12}H_{16}BrN_2$: 266; 268; 1H -NMR (MeOD): δ 7,78-7,72 (m, 2H); 7,43 (dd, 1H); 7,13 (dd, 1H); 4,72 (s, 2H); 3,12 (s, 9H).

Diethyl-acetamino-(3-(7-bromo)indolyl)malonat (37)

Unter einer Argonatmosphäre wurde eine Lösung von Diethylacetaminomalonat (3 eq.; 1,80 mmol; 391 mg) und Natriummethylat (2,9 eq.; 1,74 mmol; 94 mg) in getrocknetem Ethanol (30 ml) zubereitet. Nach 10 min wurde **36** (237 mg; 0,60 mmol) hinzugegeben und die resultierende Mischung für 2 h unter Reflux erhitzt. Nach Zugabe von Wasser (250 ml) wurde mit 5%iger aq. HCl der pH auf 7 eingestellt und 2 \times mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in EtOAc/Petrolether (1:1) aufgenommen und an einer Kieselgelsäule mit EtOAc/Petrolether (1:1) chromatographiert. Ausbeute: 230 mg (90%); DC (EtOAc/Petrolether (1:1)): R_f 0,45; HPLC (System V): t_R 3,66 min; ESI-MS: m/z 425,2; 427,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{18}H_{21}BrN_2O_5$: 424; 426; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 8,24 (s, 1H); 7,43 (d, 1H); 7,31 (d, 1H); 7,00-6,95 (m, 2H); 6,45 (s, 1H); 4,29-4,24 (m, 4H); 3,83 (s, 2H); 1,98 (s, 3H); 1,30 (t, 6H).

Acetamino-(3-(7-bromo)indolyl)-malonsäure (38)

37 (230 mg; 0,541 mmol) wurde in Ethanol (20 ml) und 20%iger aq. KOH (20 ml) gelöst und die Mischung unter Reflux für 3 h erhitzt. Danach wurde Wasser (80 ml) zur Reaktionslösung gegeben und die resultierende Lösung 2× mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 6 M HCl auf pH 2-3 eingestellt und 2× mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Ausbeute: 164 mg (82%); HPLC (System V): t_R 2,26 min; ESI-MS: m/z 369,0; 371,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{14}H_{13}BrN_2O_5$: 368; 370.

Ac-(7-Br)Trp-OH (39)

Zu einer Lösung von **38** (150 mg; 0,406 mmol) in THF/Wasser (2:1; 40 ml) wurde unter Rühren langsam konzentrierte Phosphorsäure (2 ml) zugegeben und die resultierende Lösung für 18 h refluxiert. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf RT wurde mehrmals mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Ausbeute: 108 mg (82%); HPLC (System V): t_R 2,42 min; ESI-MS: m/z 325,0; 327,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{13}H_{13}BrN_2O_3$: 324; 326; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 8,32 (s, 1H); 7,52 (d, 1H); 7,36 (d, 1H); 7,13 (d, 1H); 7,02 (t, 1H); 5,93 (d, 1H); 4,95-4,92 (m, 1H); 3,42-3,30 (m, 2H); 1,97 (s, 3H).

Z-(3-Boronsäurepinakolester)Tyr(Me)-OH (40)

22 (261 mg; 0,557 mmol) wurde in THF/Wasser (2:1; 20 ml) gelöst und Lithiumhydroxid (1 eq.; 0,557 mmol; 13 mg) zur Reaktionslösung gegeben und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 5%iger aq. $KHSO_4$ angesäuert und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne

eingengt. Ausbeute: 236 mg (93%); HPLC (System II): t_R 7,29 min (freie Borsäure); ESI-MS: m/z 374,2 ($M+H^+$ der freien Borsäure), monoisotopische Masse für $C_{18}H_{20}BNO_7$ (freie Borsäure): 373.

Z-(3-Boronsäurepinakolester)Tyr(Me)-Gly-OtBu (41)

In DMF (40 ml) wurde **40** (230 mg; 0,505 mmol) gelöst und zur Lösung wurde DIEA (2,3 eq.; 1,170 mmol; 200 μ l), HOBT (1,1 eq.; 0,557 mmol; 85 mg) und EDCI (1,1 eq.; 0,557 mmol; 111 mg) gegeben und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid (1,25 eq.; 0,635 mmol; 106 mg) zur Reaktionslösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen der Reaktionsmischung zur Trockne, Aufnahme des Niederschlages in EtOAc, gefolgt von Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Produkt. Ausbeute: 140 mg (49%); HPLC (System II): t_R 9,05 min; ESI-MS: m/z 487,2 ($M+H^+$ der freien Borsäure); monoisotopische Masse für $C_{24}H_{31}BN_2O_8$ (freie Borsäure): 486.

Boc-{6-[3'-(Z-Tyr(Me)-Gly-OtBu)]}Trp-NHPr (42)

23 (20 mg; 0,047 mmol), **41** (1,1 eq.; 0,052 mmol; 30 mg) und Kaliumcarbonat (3 eq.; 0,141 mmol; 20 mg) wurden in einer DME/Wasser (9:1; 20 ml)-Mischung gelöst, entgast und die Reaktionsmischung unter eine Argonatmosphäre versetzt. Dann wurde $Pd(dppf)Cl_2 \times DCM$ (0,03 eq.; 0,002 mmol; 2 mg) unter Argon als Schutzgas zur Reaktionsmischung gegeben und für 10 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger aq. $KHSO_4$, 5%iger aq. $NaHCO_3$ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Petrolether/EtOAc (2:1) aufgenommen und an Kieselgel mit einem Gradienten von Petrolether/EtOAc (2:1) nach Petrolether/EtOAc (1:2) chromato-

graphiert. Ausbeute: 18 mg (44%); HPLC (System II): t_R 11,24 min; ESI-MS: m/z 786,8 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{43}H_{55}N_5O_9$: 785.

H-{6-[3'-(Z-Tyr(Me)-Gly-OH)]}Trp-NHPr×TFA (43)

42 (18 mg; 0,023 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1, 15 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingengt, 2× mit Toluol (15 ml) nachrotiert und der zurückbleibende Rückstand in Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 17 mg (96%); HPLC (System II): t_R 6,41 min; ESI-MS: m/z 630,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{34}H_{39}N_5O_7$: 629.

Dimer (44)

Zu einer Lösung von PyBOP (4 eq.; 0,092 mmol; 48 mg), HOBt (4 eq.; 0,092 mmol; 14 mg) und DIEA (4 eq.; 0,092 mmol; 16 μ l) in DMF (300 ml) wurde langsam unter Rühren eine Lösung von **43** (17 mg; 0,023 mmol) und DIEA (1 eq.; 0,023 mmol; 4 μ l) in DMF (160 ml) zugetropft und die resultierende Lösung für 24 h bei RT gerührt. Nach Einengen der Lösung zur Trockne, Aufnahme des Niederschlags in EtOAc, Waschen mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. $NaCl$, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne, wurde der zurückbleibende Rückstand in DCM/Isopropanol (10:1) gelöst und durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit DCM/Isopropanol (10:1) als Eluenten gereinigt. Ausbeute: 8 mg (28%); DC (DCM/Isopropanol (10:1)): R_f 0,45; HPLC (System II): t_R 10,34 min; ESI-MS: m/z 1224,2 ($M+H^+$), 612,4 ($M+2H^+$) monoisotopische Masse für $C_{68}H_{74}N_{10}O_{12}$: 1222; MS-MS-Experimente: Fragmentierung von m/z 1223,4: m/z 1179,4; 1164,1; 1105,1; 950,5; 611,2.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-OH)]}Trp-NHPr (45)

24 (27 mg; 0,064 mmol) wurde in DME/Wasser (7:1; 30 ml) gelöst und **22** (1,5 eq.; 0,095 mmol; 45 mg) und Kaliumcarbonat (3 eq.; 0,191 mmol; 26 mg) wurden zur Reaktionslösung gegeben, welche anschliessend für 1 h entgast und unter Argon als Schutzgas gesetzt wurde. Nach Zugabe von Pd(dppf)Cl₂×DCM (0,03 eq.; 0,002 mmol; 2 mg) wurde die Reaktionslösung für 8 h auf 80 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf RT wurde 5%iger aq. KHSO₄ zum Ansäuern zu der Lösung gegeben und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (4:1; 30 ml) gelöst und Lithiumhydroxid (1 eq.; 0,064 mmol; 3 mg) hinzugegeben, für 3 h bei RT gerührt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in EtOAc und 5%iger aq. KHSO₄ gelöst und mit Wasser und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in DCM/MeOH (5:1) gelöst und an Kieselgel mit DCM/MeOH (5:1) als Eluenten chromatographiert. Ausbeute: 33 mg (77%); DC (DCM/Isopropanol (5:1)): R_f 0,60; HPLC (System III): t_R 11,28 min; ESI-MS: m/z 673,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₃₇H₄₄N₄O₈: 672.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-Asn-OtBu)]}Trp-NHPr (46)

Zu einer Lösung von **41** (21 mg; 0,031 mmol), DIEA (2,1 eq.; 0,066 mmol; 11 µl), HOBt (1,1 eq.; 0,034 mmol; 5 mg) und EDCI (1,1 eq.; 0,034 mmol; 7 mg) in DMF (30 ml) wurde nach 5 min Rühren bei RT Asparagin-*tert*-butylesterhydrochlorid (1,1 eq.; 0,034 mmol; 8 mg) zur Mischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Ausbeute: 18 mg (69%); HPLC (System III): t_R 11,46 min; ESI-MS: m/z 673,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₄₅H₅₈N₆O₁₀: 672.

H-{7-[3'-(*Z*-Tyr(*Me*)-Asn-OH)]}Oxindolylalanin-NHPr×HCl (**47**)

42 (18 mg; 0,021 mmol) wurde in Eisessig/konzentrierter Salzsäure (4:1; 5 ml) gelöst und für 10 min gerührt. Dann wurde DMSO (50 µl) hinzugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde eingeeengt, durch RP-HPLC an einer C₁₈-Säule gereinigt und aus einer *tert*-Butanol/Wasser (4:1)-Lösung lyophilisiert. Ausbeute: 8 mg (47%); HPLC (System III): t_R 6,42 min; ESI-MS: *m/z* 703,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₃₆H₄₂N₆O₉: 702.

MK258 (**48**)

Zu einer argongesättigten Lösung von PyBOP (4 eq.; 0,044 mmol; 23 mg), DIEA (4 eq.; 0,044 mmol; 8 µl) und HOBt (4 eq.; 0,044 mmol; 7 mg) in DMF (244 ml) wurde unter Rühren eine Lösung von **47** (8 mg; 0,011 mmol) und DIEA (1 eq.; 0,011 mmol; 2 µl) in DMF (50 ml) zugetropft und bei RT für 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne einrotiert und der Rückstand in Acetonitril/Wasser/MeOH (1:1:2) gelöst, durch RP-HPLC an einer C₁₈-Säule gereinigt und aus einer *tert*-Butanol/Wasser (4:1; 15 ml)-Lösung lyophilisiert. Ausbeute: 3 mg (33%); HPLC (System III): t_R 9,90 min; ESI-MS: *m/z* 685,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₃₆H₄₀N₆O₆: 684; TOCSY-Spektrum (DMSO) siehe Spektrenanhang.

Boc-Nle-NH₂ (**50**)

Boc-Norleucin (135 mg; 0,584 mmol) wurde in DMF (30 ml) gelöst und zur Lösung wurden DIEA (2 eq.; 1,168 mmol; 200 µl), HOBt×NH₃ (1,5 eq.; 0,876 mmol; 134 mg) und EDCI (1,2 eq.; 0,701 mmol; 134 mg) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig EtOAc gelöst und mit Methyl-*tert*-butylether/Hexan (2:1) gefällt.

Ausbeute: 108 mg (80%); HPLC (System V): t_R 4,80 min; ESI-MS: m/z 231,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{11}H_{22}N_2O_3$: 230.

H-Nle-NH₂×TFA (51)

50 (40 mg; 0,174 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 15 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde zur Trockne eingeeengt, 2× mit Toluol nachrotiert und der Rückstand in Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 39 mg (92%).

Boc-(7-Br)Trp-Nle-NH₂ (52)

Zu einer Lösung von **34-2** (31 mg; 0,081 mmol), DIEA (3 eq.; 0,243 mmol; 42 μ l), HOBT (1,2 eq.; 0,097 mmol; 15 mg) und EDCI (1,05 eq.; 0,085 mmol; 16 mg) wurde nach 5 min Rühren **51** (1,5 eq.; 0,123 mmol; 30 mg) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Ausbeute: 32 mg (80%); HPLC (System V): t_R 3,63 min; ESI-MS: m/z 495,2; 497,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{22}H_{31}BrN_4O_4$: 494; 496.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-OH)]}Trp-Nle-NH₂ (53)

Zu einer Lösung von **52** (30 mg; 0,061 mmol), **22** (2 eq.; 0,121 mmol; 57 mg) und Kaliumcarbonat (3 eq.; 0,183 mmol; 25 mg) in DME/Wasser (7:1, 20 ml) wurde nach Entgasen und Sättigen der Lösung mit Argon $Pd(dppf)Cl_2 \times DCM$ (0,03 eq.; 0,002 mmol; 2 mg) hinzugegeben und für 10 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf RT abkühlen lassen, durch Zugabe von 5%iger aq. $KHSO_4$ angesäuert und

mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5%iger aq. KHSO_4 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in THF/Wasser (2:1; 40 ml) gelöst und mit LiOH (1 eq.; 0,061 mmol; 3 mg) für 4 h gerührt. Nach Zugabe von 5%iger aq. KHSO_4 zum Ansäuern der wässrigen Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger aq. KHSO_4 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wurde in DCM/MeOH (9:1) aufgenommen und an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (9:1) bis DCM/MeOH (4:1) säulenchromatographisch gereinigt. Ausbeute: 20 mg (44%); HPLC (System V): t_R 3,93 min; ESI-MS: m/z 744,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{50}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{10}$: 743.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-Leu-OtBu)]}Trp-Nle-NH₂ (54)

Eine Lösung, bestehend aus **53** (20 mg; 0,027 mmol), DIEA (2,3 eq.; 0,062 mmol; 11 μl), HOBt (1,3 eq.; 0,035 mmol; 5 mg) und EDCI (1,3 eq.; 0,035 mmol; 7 mg) in DMF (20 ml) wurde für 5 min bei RT gerührt, dann wurde Leucin-*tert*-butylesterhydrochlorid (1,3 eq.; 0,035 mmol; 8 mg) zur Lösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung zur Trockne einrotiert, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO_3 , 5%iger aq. KHSO_4 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 9 mg (37%); HPLC (System V): t_R 5,05 min; ESI-MS: m/z 913,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{50}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{10}$: 912.

H-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-Leu-OH)]}Oxindolylalanin-Nle-NH₂×HCl (55)

Zu einer Eisessig/konzentrierte Salzsäure (4:1; 15 ml)-Lösung wurde **54** (7 mg; 0,008 mmol) gegeben und für 10 min bei RT gerührt. Dann wurde DMSO (50 μl) zur Reaktionslösung gegeben und für 8 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde zur Trockne

eingengt und 2× mit Toluol nachrotiert. Ausbeute: 7 mg (>98%); HPLC (System V): t_R 3,08 min.

MK416 (56)

Zu einer Lösung von PyBOP (4 eq.; 0,031 mmol; 16 mg), HOBt (4 eq.; 0,031 mmol; 5 mg) und DIEA (12 eq.; 0,092 mmol; 16 μ l) in DMF (200 ml) wurde unter Rühren eine Lösung von **55** (7 mg; 0,008 mmol) in DMF (100 ml) zugetropft und für 30 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne einrotiert und durch RP-HPLC an einer C₈-Säule aufgereinigt. Ausbeute: 2,3 mg (38%); HPLC (System V): t_R 3,74 min; ESI-MS: m/z 755,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₄₁H₅₀N₆O₈: 754; TOCSY-Spektrum (DMSO) siehe Spektrenanhang.

Boc-Nle-Weinrebamid (57)

Zu Boc-Norleucin (2 g; 8,65 mmol), TBTU (1 eq.; 8,65 mmol; 2,78 g), HOBt (1 eq.; 8,65 mmol; 1,32 g) und DIEA (1 eq.; 8,65 mmol; 1,49 ml) in DCM (100 ml) wurde bei 0 °C N,O-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid (1,1 eq.; 9,52 mmol; 0,93 g) und DIEA (1,1 eq.; 9,52 mmol; 1,63 ml) in DCM (50 ml) gegeben. Nach 15 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel abrotiert, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. KHSO₄, 5%iger aq. NaHCO₃ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde in Petrolether/EtOAc (3:1) aufgenommen und an einer Kieselgelsäule mit Petrolether/EtOAc als Eluenten chromatographiert. Ausbeute: 1,95 g (82%); ESI-MS: m/z 275,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₃H₂₆N₂O₄: 274.

Boc-Nle Ψ[CO-CH₂](CH₂)₂CHCH₂ (58)

Zu einer Lösung von **57** (2,48 g; 9,04 mmol) in trockenem THF (200 ml) wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Butenylmagnesiumbromid-Grignard-Lösung (5 eq.; 45,20 mmol; 90 ml) zugetropft. Dann wurde das Kühlbad entfernt und nach 3 h mit Diethylether (600 ml) verdünnt und gegen 5%iger aq. Ammoniumchlorid verteilt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Petrolether/EtOAc (4:1) aufgenommen und an Kieselgel mit Petrolether/EtOAc (4:1) als Eluenten chromatographiert. Ausbeute: 2,29 g (94%); DC (Petrolether/EtOAc (3:1)): R_f 0,72; HPLC (System II): t_R 10,65 min; ESI-MS: m/z 270,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{15}H_{27}NO_3$: 269.

Boc-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-OH (59)

Zu einer Mischung aus **58** (1,55 g; 5,76 mmol) in Acetonitril (100 ml) und Natriumperiodat (7 eq.; 40,31 mmol; 8,62 g) in Wasser (100 ml) wurde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ $RuCl_3 \times H_2O$ (0,09 eq.; 0,51 mmol; 106 mg) gegeben. Nach 75 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit Wasser und Diethylether verdünnt. Die wässrige Phase wurde noch je einmal mit Diethylether und EtOAc extrahiert. Dann wurden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde im Eluenten Chloroform/MeOH (5:1) der Kieselgelsäule aufgenommen und chromatographiert. Ausbeute: 1,37 g (83%); HPLC (System II): t_R 7,95 min; ESI-MS: m/z 288,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{14}H_{25}NO_5$: 287.

Boc-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-NH₂ (60)

Zu einer Lösung von **59** (75 mg; 0,261 mmol) in DMF (20 ml) wurde DIEA (2 eq.; 0,522 mmol; 89 μ l), EDCI (1,3 eq.; 0,339 mmol; 65 mg) und ein HOBt/Ammoniak-

Komplex (1,5 eq.; 0,392 mol; 60 mg) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen der Reaktionslösung zur Trockne, Aufnahme des Rückstandes in EtOAc und Waschen mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, gefolgt von Trocknen über Natriumsulfat und Einengen der organischen Phase lieferte das Rohprodukt, welches durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Eluenten von DCM/MeOH (20:1) bis DCM/MeOH (9:1) gereinigt wurde. Ausbeute: 47 mg (63%); HPLC (System V): t_R 2,74 min; ESI-MS: m/z 287,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₄H₂₆N₂O₄: 286.

Boc-(7-Br)Trp-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-NH₂ (61)

60 (47 mg; 0,164 mmol) wurde in TFA/DCM (15 ml) gelöst und für 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde zur Trockne eingengt, noch 2× mit Toluol nachrotiert, der Rückstand in Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 49 mg (>98%); ESI-MS: m/z 187,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₉H₁₈N₂O₂: 186.

Zu einer Lösung von **34-2** (25 mg; 0,066 mmol) in DMF (20 ml) wurde DIEA (3,75 eq.; 0,246 mmol; 42 μl), HOBt (1,5 eq.; 0,098 mmol; 15 mg) und EDCI (1,25 eq.; 0,082 mmol; 16 mg) gegeben und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde das soeben dargestellte TFA-Salz von **60** (2,5 eq.; 0,164 mmol; 49 mg) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in DCM/MeOH (15:1) aufgenommen und an Kieselgel säulenchromatographisch mit einem Gradienten von DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) gereinigt. Ausbeute: 17 mg (47%); HPLC (System V): t_R 3,60 min; ESI-MS: m/z 551,2; 553,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₂₅H₃₅BrN₄O₅: 550; 552.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-OH)]}Trp-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-NH₂ (62)

Zu einer Lösung von **61** (22 mg; 0,040 mmol) in DME/Wasser (9:1; 25 ml) wurde **22** (1,5 eq.; 0,060 mmol; 28 mg) und Kaliumcarbonat (3 eq.; 0,120 mmol; 17 mg) gegeben und die Reaktionsmischung entgast und mit einer Argonatmosphäre versetzt. Dann wurde unter Schutzgas Pd(dppf)Cl₂×DCM (0,03 eq.; 0,001 mmol; 1 mg) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 8 h bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde EtOAc und 5%ige aq. KHSO₄ zur Reaktionsmischung gegeben, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in THF/Wasser (3:1; 15 ml) gelöst und mit LiOH (1 eq.; 0,040 mmol; 2 mg) für 3 h gerührt. Ansäuern mit 5%iger aq. KHSO₄, gefolgt von Extraktion mit EtOAc, Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Rohprodukt, welches säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Eluenten von DCM/MeOH (9:1) bis DCM/MeOH (5:1) aufgereinigt wurde. Ausbeute: 6 mg (19%), Produkt mit Nebenprodukten verunreinigt; HPLC (System V): t_R 3,91 min; ESI-MS: m/z 800,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₄₃H₅₃N₅O₁₀: 799.

Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-Leu-OtBu)]}Trp-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-NH₂ (63)

62 (6 mg; 0,008 mmol) wurde in DMF (15 ml) gelöst und mit DIEA (2 eq.; 0,016 mmol; 3 μl), HOBt (1,5 eq.; 0,012 mmol; 2 mg) und EDCI (1,1 eq.; 0,009 mmol; 2 mg) versetzt und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde Leucin-*tert*-butylesterhydrochlorid (1,2 eq.; 0,010 mmol; 2 mg) zur Lösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen zur Trockne, Aufnahme des Rückstandes in EtOAc, Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Rohprodukt, welches anschliessend durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit

DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) als Eluenten aufgereinigt wurde. Ausbeute: 4 mg (52%), Produkt mit Nebenprodukten verunreinigt; HPLC (System V): t_R 4,79 min; ESI-MS: m/z 969,6 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{53}H_{72}N_6O_{11}$: 968.

H-{7-[3'-(*Z*-Tyr(Me)-Leu-OH)]}Oxindolylalanin-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-NH₂·HCl (**64**)

63 (4 mg; 0,004 mmol) wurde in Eisessig/konzentrierter Salzsäure (4:1; 15 ml) gelöst und nach 5 min Rühren bei RT wurde DMSO (50 μ l) zur Lösung gegeben und für weitere 4 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingengt, noch 2 \times mit Toluol (15 ml) nachrotiert, in Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 3 mg (90%), Produkt mit Nebenprodukten verunreinigt; ESI-MS: m/z 829,6 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{44}H_{56}N_6O_{10}$: 828.

Boc-(7-Br)Trp-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (**65**)

Zu einer Lösung von **59** (58 mg; 0,201 mmol), DIEA (2 eq.; 0,402 mmol; 69 μ l) und PyBOP (1 eq.; 0,201 mmol; 104 mg) in DMF (20 ml) wurde das TFA-Salz von H-Ala-Ala-NH₂ (1 eq.; 0,201 mmol; 55 mg) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) aufgereinigt. Ausbeute: 45 mg (52%); HPLC (System V): t_R 2,62 min; ESI-MS: m/z 429,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{20}H_{36}N_4O_6$: 428.

Das dargestellte Boc-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (45 mg; 0,105 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 15 ml) gelöst und für 3 h bei RT gerührt. Danach wurde Toluol (15

ml) zur Reaktionslösung gegeben, zur Trockne eingeeengt und noch 2× mit Toluol nachrotiert. Ausbeute: 45 mg (>98%).

Zu einer Lösung von **34-2** (40 mg; 0,105 mmol), HOBt (1 eq.; 0,105 mmol; 16 mg), PyBOP (1 eq.; 0,105 mmol; 55 mg) und DIEA (2 eq.; 0,210 mmol; 36 µl) in DMF (15 ml) wurde bei RT das dargestellte TFA-Salz von H-NleΨ[CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ gegeben und über Nacht gerührt. Einengen zur Trockne, Aufnahme des Rückstandes in EtOAc, Waschen mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Rohprodukt, welches durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) aufgereinigt wurde. Ausbeute: 50 mg (69%), HPLC (System V): t_R 3,38 min; ESI-MS: m/z 693,4; 695,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₃₁H₄₅BrN₆O₇: 692; 694.

*Boc-{7-[3'-(Z-Tyr(Me)-OH)]}Trp-Nle Ψ[CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (**66**)*

Eine Lösung von **65** (20 mg; 0,029 mmol), **22** (1,5 eq.; 0,043 mmol; 20 mg) und Kaliumcarbonat (3 eq.; 0,087 mmol; 12 mg) wurde in DME/Wasser (8:1; 30 ml) entgast und unter eine Argonschutzatmosphäre gesetzt. Dann wurde Pd(dppf)Cl₂×DCM (0,03 eq.; 0,001 mmol; 1 mg) hinzugesetzt und die Lösung für 6 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde EtOAc und 5%ige aq. KHSO₄ zur Lösung gegeben und die wässrige Phase erneut mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (2:1; 20 ml) gelöst und für 3 h nach Lithiumhydroxidzugabe (1 eq.; 0,029 mmol; 1 mg) gerührt. Die Lösung wurde mit EtOAc und 5%iger aq. KHSO₄ versetzt, die wässrige Phase erneut mit EtOAc extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Waschen mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne ergab das Rohprodukt. Der Rückstand wurde in DCM/MeOH (9:1) aufgenommen und an

Kieselgel säulenchromatographisch mit einem Eluenten von DCM/MeOH (9:1) bis DCM/MeOH (1:1) aufgereingt. Ausbeute: 15 mg (55%), verunreinigt mit Nebenprodukt; HPLC (System V): t_R 3,67 min; ESI-MS: m/z 942,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{49}H_{63}N_7O_{12}$: 941.

H-{7-[3'-(*Z*-Tyr(Me)-Leu-OH)]}Oxindolylalanin-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂·HCl (67)

66 (15 mg; 0,016 mmol) wurde in DMF (15 ml) gelöst und mit DIEA (2,3 eq.; 0,037 mmol; 6 μ l), HOBt (1 eq.; 0,016 mmol; 2 mg) und EDCI (1 eq.; 0,016 mmol; 3 mg) versetzt und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde Leucin-*tert*-butylesterhydrochlorid (1,3 eq.; 0,021 mmol; 5 mg) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Mischung wurde zur Trockne einrotiert, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) aufgereinigt. Ausbeute: 16 mg (90%), HPLC (System V): t_R 4,70 min; ESI-MS: m/z 1111,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{59}H_{82}N_8O_{13}$: 1110.

Das Zwischenprodukt (15 mg; 0,013 mmol) wurde in Eisessig/konzentrierter Salzsäure (4:1; 20 ml) gelöst und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde DMSO (50 μ l) zur Lösung gegeben und bei RT für 4 h gerührt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde zur Trockne eingeeengt, noch 2× mit Toluol (15 ml) nachrotiert, der Rückstand in Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 12 mg (90%), verunreinigt mit Nebenprodukt; HPLC (System V): t_R 2,92 min; ESI-MS: m/z 971,6 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{50}H_{66}N_8O_{12}$: 970.

MK499 (68)

Zu einer Lösung von PyBOP (4 eq.; 0,048 mmol; 25 mg), HOBt (4 eq.; 0,048 mmol; 7 mg) und DIEA (8 eq.; 0,096 mmol; 16 μ l) in DMF (250 ml) wurde langsam eine Lösung von **67** (12 mg; 0,012 mmol) und DIEA (1 eq.; 0,012 mmol; 2 μ l) in DMF (50 ml) zugetropft und für 32 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne einrotiert und der Rückstand durch RP-HPLC an einer C₈-Säule aufgereinigt, die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in DCM/MeOH (15:1) aufgenommen und durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Ausbeute: 0,2 mg (2%); HPLC (System V): t_R 3,47 min; ESI-MS: *m/z* 953,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₅₀H₆₄N₈O₁₁: 952.

MK499 (68-2)

Eine Lösung von **71** (7 mg; 0,006 mmol) und Kaliumcarbonat (5 eq.; 0,030 mmol; 4 mg) wurde in DME/Wasser (7:1; 30 ml) gelöst, entgast und unter Argon gesetzt. Danach wurde Pd(dppf)Cl₂×DCM (0,1 eq.; 0,001 mmol; 1 mg) hinzugegeben und die resultierende Lösung für 8 h bei 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingeeengt, in DCM/MeOH (15:1) suspendiert und durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Eluenten von DCM/MeOH (15:1) bis DCM/MeOH (9:1) aufgereinigt. Ausbeute: 2,1 mg (37%); HPLC (System V): t_R 3,45 min; ESI-MS: *m/z* 953,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₅₀H₆₄N₈O₁₁: 952.

Z-(3-I)Tyr(Me)-OH (69)

Eine THF/Wasser (2:1; 25 ml)-Lösung, bestehend aus **22** (50 mg; 0,107 mmol) und Lithiumhydroxid (1,2 eq.; 0,128 mmol; 5 mg) wurde bei RT für 5 h gerührt. Danach wurde EtOAc und 5%ige aq. KHSO₄ zur Mischung gegeben, die wässrige Phase erneut mit EtOAc extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Die EtOAc-Phase wurde mit 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat

getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 45 mg (92%), HPLC (System V): t_R 2,72 min (freie Borsäure); ESI-MS: m/z 374,2 ($M+H^+$ der freien Borsäure), monoisotopische Masse für $C_{18}H_{20}BNO_7$ (freie Borsäure): 373.

Z-(3-Boronsäurepinakolester)Tyr(Me)-Leu-(7-Br)Trp-NleΨ[CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (70)

65 (15 mg; 0,022 mmol) wurde in einer TFA/DCM/TIS (4 ml/4 ml/30 µl)-Mischung gelöst und für 3 h bei RT gerührt. Danach wurde Toluol (15 ml) zur Lösung gegeben und zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde noch 2× mit Toluol (15 ml) nachrotiert, mit Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 18 mg (>98%); HPLC (System V): t_R 2,06 min.

Zu einer Mischung, bestehend aus Boc-Leu-OH×H₂O (1,2 eq.; 0,026 mmol; 7 mg), DIEA (2,4 eq.; 0,053 mmol; 9 µl), HOBt (1,2 eq.; 0,026 mmol; 4 mg) und PyBOP (1,2 eq.; 0,026 mmol; 14 mg) in DMF (15 ml) wurde das soeben dargestellte TFA-Salz von H-(7-Br)-Trp-NleΨ[CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (18 mg; 0,022 mmol) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Mischung wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 10 mg (49%); HPLC (System V): t_R 3,70 min; ESI-MS: m/z 806,4; 808,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{34}H_{67}BrN_8O_9$: 805; 807.

Das soeben dargestellte Boc-Leu-(7-Br)Trp-NleΨ[CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (10 mg; 0,011 mmol) wurde in einer Mischung aus TFA/DCM/TIS (4 ml/4 ml/ 30 µl) für 3 h bei RT gerührt. Danach wurde Toluol (15 ml) zur Lösung gegeben und zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde noch 2× mit Toluol (15 ml) nachrotiert, mit Diethylether suspendiert und abzentrifugiert. Ausbeute: 10 mg (97%); HPLC (System V): t_R 2,32 min.

69 (2,4 eq.; 0,026 mmol; 12 mg) wurde in DMF (15 ml) gelöst und für 5 min mit DIEA (4,8 eq.; 0,053 mmol; 9 μ l), HOBt (2,4 eq.; 0,026 mmol; 4 mg) und PyBOP (2,4 eq.; 0,026 mmol; 14 mg) gerührt. Danach wurde das soeben dargestellte TFA-Salz von H-Leu-(7-Br)Trp-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (10 mg; 0,011 mmol) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne eingeeengt, in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig EtOAc aufgenommen und mit Petrolether gefällt. Ausbeute: 8 mg (58%); HPLC (System V): t_R 3,76 min (freie Borsäure); ESI-MS: m/z 1061,2; 1063,2 (M+H⁺ der freien Borsäure), monoisotopische Masse für C₅₀H₆₆BBrN₈O₁₂ (freie Borsäure): 1060; 1062.

Z-(3-Boronsäurepinakolester)Tyr(Me)-Leu-(7-Br)Oxindolylalanin-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-Ala-Ala-NH₂ (**71**)

70 (8 mg; 0,007 mmol) wurde in Eisessig/konzentrierter Essigsäure (4:1; 15 ml) gelöst und für 5 min bei RT gerührt. Danach wurde DMSO (50 μ l) hinzugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde zur Trockne einrotiert und noch 4 \times mit Toluol (15 ml) nachrotiert. Ausbeute: 7 mg (86%); HPLC (System V): 3,55 min (freie Borsäure); ESI-MS: m/z 1077,4; 1079,4 (M+H⁺ der freien Borsäure), monoisotopische Masse für C₅₀H₆₆BBrN₈O₁₃: 1076; 1078.

3-Fluoro-4-nitro-benzylbromid (**72**)

3-Fluoro-4-nitro-toluol (4268 mg; 27,512 mmol) wurde in Tetrachlorkohlenstoff (200 ml) gelöst und mit NBS (1 eq.; 27,512 mmol, 4897 mg) und AIBN (300 mg) versetzt und vorsichtig unter Rückfluss erwärmt. Nach 4 h wurde die Reaktionsmischung abgekühlt, das an der Oberfläche von Tetrachlorkohlenstoff schwimmende Succinimid abfiltriert und die Reaktionslösung zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde an

Kieselgel mit Petrolether/EtOAc (5:1) als Eluenten säulenchromatographisch gereinigt. Ausbeute: 3730 mg (58%); DC (Petrolether/EtOAc (5:1)): R_f 0,42; HPLC (System IV): t_R 9,50 min; ESI-MS: m/z 233,8; 235,8 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_7H_5BrFNO_2$: 233; 235; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 8,69 (t, 1H); 7,97 (t, 2H); 5,12 (s, 2H).

(2S,5R)-2-(3'-Fluoro-4'-nitrobenzyl)-5-isopropyl-3,6-dimethoxy-2,5-dihydropyrazin
(73)

Kupfer(I)cyanid (0,5 eq.; 1,357 mmol; 122 mg) wurde in einem getrockneten Kolben vorgelegt und der Kolben mit Argon geflutet. Dann wurde trockenes THF (20 ml) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. In einem zweiten, vorgetrockneten Kolben wurde das Schöllkopf-Reagenz (*2R*)-(-)2,5-dihydro-3,6-dimethoxy-2-isopropylpyrazin (1 eq.; 2,741 mmol; 486 μ l) in THF (6 ml) gelöst, auf -78 °C gekühlt und tropfenweise mit *n*-BuLi (1 eq.; 2,714 mmol; 1086 μ l) versetzt. Nach 10 min Rühren wurde diese Lösung mittels einer Spritze zu der Kupfer(I)cyanid-suspension gegeben. Die entstehende Reaktionsmischung wurde für weitere 5 min bei 0 °C gerührt, anschliessend erneut auf -78 °C gekühlt und dann, mittels einer Spritze, in THF (5 ml) gelöstes **72** (0,5 eq.; 1,357 mmol; 318 mg) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei -78 °C gerührt und durch Zugabe von wässriger Ammoniumchlorid/Ammoniak (9:1)-Lösung gequencht. Die wässrige Lösung wurde mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen mit Wasser, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Heptan/Ether (10:1) als Eluenten gereinigt. Ausbeute: 210 mg (23%); HPLC (System IV): t_R 11,38 min; ESI-MS: m/z 337,6 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{16}H_{20}FN_3O_4$: 337.

(S)-3-Fluoro-4-nitro-phenylalaninmethylester (74)

Zu einer Lösung von **73** (210 mg; 0,622 mmol) in THF/Acetonitril (3:1; 15 ml) wurde 0,25 N Salzsäure (3 ml) zugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Die organischen Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abgezogen, die zurückbleibende wässrige Lösung mit zusätzlicher 0,25 N Salzsäure verdünnt und die neutralen Nebenprodukte durch Extraktion mit DCM entfernt. Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von NaHCO₃ basisch gestellt und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 123 mg (82%); HPLC (System IV): t_R 3,18 min; ESI-MS: *m/z* 243,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₀H₁₁FN₂O₄: 242.

Z-*(S)*-3-Fluoro-4-nitro-phenylalaninmethylester (75)

Zu einer Lösung von **74** (120 mg; 0,495 mmol) in Dioxan/Wasser (1:1; 15 ml) wurde Z-OSu (1,1 eq.; 0,545 mmol; 136 mg) und Natriumhydrogencarbonat (1,1 eq.; 0,545 mmol; 46 mg) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Anschliessend wurde zur Reaktionsmischung N-(2-Aminoethyl)-piperazin (100 µl) hinzugegeben, für 30 min bei RT gerührt und dann die Reaktionslösung zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Ausbeute: 190 mg (>98%); HPLC (System IV): t_R 10,10 min; ESI-MS: *m/z* 377,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₁₈H₁₇FN₂O₆: 376.

Z-*(S)*-3-Fluoro-4-nitro-phenylalanin (76)

75 (190 mg; 0,505 mmol) wurde in Acetonitril/Wasser (3:1; 20 ml) gelöst und Lithiumhydroxid (1,5 eq.; 0,758 mmol; 32 mg) wurde zur Lösung gegeben und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 5%iger aq. KHSO₄ (3 ml) wurde das organische Lösungsmittel abrotiert, die zurückbleibende wässrige Phase mit zusätzlicher 5%iger

aq. KHSO_4 verdünnt und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 163 mg (89%); HPLC (System IV): t_R 8,85 min; ESI-MS: m/z 363,0 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_6$: 362; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,96 (t, 1H); 7,37-7,26 (m, 6H); 7,08 (t, 2H); 5,28-5,07 (m, 4H); 4,74-4,71 (m, 1H).

Boc-Tyr-NHPr (77)

Boc-Tyr-OH (1000 mg; 3,555 mmol) wurde in DMF (50 ml) gelöst und HOBt (1,2 eq.; 4,266 mmol; 653 mg), EDCI (1,05 eq.; 3,733 mmol; 716 mg), *n*-Propylamin (1,5 eq.; 5,333 mmol, 440 μl) und DIEA (3 eq.; 10,665 mmol; 1826 μl) wurden hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die organische Phase mit 5%iger aq. KHSO_4 , 5%iger NaHCO_3 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 1106 mg (92%), HPLC (System V): t_R 2,63 min.

Boc-Asn-Tyr(OTIPS)-NHPr (78)

77 (1106 mg; 3,282 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 15 ml) gelöst und für 2 Stunden gerührt. Dann wurde Toluol (10 ml) zugegeben und die Lösung bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde 2 \times in Toluol (10 ml) aufgenommen und das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer abgezogen. Ausbeute: 1058 mg (98%); HPLC (System V): t_R 1,00 min.

Der Rückstand wurde in DCM (40 ml) gelöst und zur Reaktionslösung wurde DIEA (1 eq. bezogen auf **77**; 3,282 mmol; 562 μl), Imidazol (3 eq.; 9,846 mmol; 670 mg) und TIPS-OTf (2 eq.; 6,564 mmol; 1764 μl) gegeben und für 3 h gerührt. Die

Reaktionslösung wurde einrotiert, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. KHSO_4 , 5%iger aq. NaHCO_3 und gesättigter NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. HPLC (System V): t_R 3,87.

In einem Kolben wurde Boc-Asn-OH (1,5 eq. bezogen auf **77**; 4,923 mmol; 1143 mg) in DMF gelöst und DIEA (3 eq.; 9,846 mmol; 1686 μl), HOBt (1,5 eq.; 4,923 mmol; 754 mg) und EDCI (1,5 eq.; 4,923 mmol; 944 mg) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO_3 , 5%iger aq. KHSO_4 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Ausbeute: 903 mg (46% bezogen auf **77**); HPLC (System V): t_R 5,32 min; ESI-MS: m/z 593,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}$: 592.

Z-(3-F, 4-NO₂)Phe-Asn-Tyr(OTIPS)-NHPr (79)

78 (100 mg; 0,169 mmol) wurde in DCM/TFA (1:1; 10 ml) gelöst und bei RT für 2 h gerührt. Nach Zugabe von Toluol (10 ml) wurde zur Trockne eingengt und noch 2× mit Toluol (10 ml) nachrotiert, in Isopropanol gelöst und mit Ether ausgefällt. Ausbeute: 82 mg (80%); HPLC (System V): t_R 3,73 min; ESI-MS: m/z 493,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$: 492.

Zu einer Lösung von **76** (20 mg; 0,055 mmol) in DMF (15 ml) wurde DIEA (4 eq.; 0,220 mmol; 38 μl), HOBt (1,2 eq.; 0,066 mmol; 10 mg) und EDCI (1,05 eq.; 0,058 mmol; 11 mg) gegeben und für 10 min bei RT gerührt. Dann wurde das soeben hergestellte Boc-abgespaltene TFA-Salz von **78** (2 eq.; 0,110 mmol; 67 mg) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockne eingengt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit 5%iger aq. NaHCO_3 , 5%iger aq. KHSO_4 und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in DCM/MeOH (20:1) gelöst und über eine Kieselgelsäule mit einem Gradienten von DCM/MeOH (20:1) bis

DCM/MeOH (9:1) gereinigt. Ausbeute: 23 mg (50%); HPLC (System V): t_R 5,61 min; ESI-MS: m/z 837,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{42}H_{57}FN_6O_9Si$: 836.

Biarylethermakrocyclus MK600 (80)

In THF (200 ml) wurde **79** (22 mg; 0,026 mmol) gelöst und bei RT gerührt. TBAF (4 eq.; 0,105 mmol; 33 mg) wurde in THF (30 ml) gelöst und langsam zur Reaktionsmischung zugetropft. Die resultierende Lösung wurde für 14 h gerührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Niederschlag in EtOAc aufgenommen. Nach Waschen der organischen Phase mit 5%iger aq. $NaHCO_3$, 5%iger aq. $KHSO_4$ und gesättigter aq. $NaCl$, wurde die EtOAc-Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Niederschlag wurde in EtOAc gelöst und mit Petrolether gefällt. Der Rückstand wurde in wenig AcOH/Wasser (2:1) gelöst und mit der HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 2,3 mg (13%); HPLC (System V): t_R 3,31 min; ESI-MS: m/z 661,2 ($M+H^+$); monoisotopische Masse für $C_{33}H_{36}N_6O_9$: 660; TOCSY-Spektrum (DMSO) siehe Spektrenanhang.

Festphasensynthese von MK610 (81), MK620 (82) und MK630 (83)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Waschen des Harzes: Das Reaktionsgemisch wurde vom Harz abgetrennt und das Harz 5× mit dem Lösungsmittel gewaschen, in welchem die Reaktion durchgeführt wurde. Anschliessend wurde folgende Waschprozedur durchgeführt: 5× Waschen mit Isopropanol, 3× Waschen mit DMF, 3× Waschen mit Isopropanol, 3× Waschen mit DCM, 3× Waschen mit MeOH, 3× Waschen mit Isopropanol, 3× Waschen mit Diethylether, anschliessend das Harz in dem Lösungsmittel der nächsten Reaktion vorquellen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc-Abspaltung: Zum Harz wurde eine NMP/Piperidin (4:1)-Mischung gegeben, für 5 min geschüttelt, anschliessend wurde

die Reaktionslösung abgesaugt, gefolgt von einer erneuten Zugabe von NMP/Piperidin (4:1) für 30 min. Danach wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz gewaschen.

Zur Synthese von MK610 (**81**) wurde Fmoc-Pal-PEG-PS-Harz (518 mg; Belegung: 0,18 mmol/g; 0,093 mmol) vorgelegt, die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und nach Voraktivierung von Fmoc-Nle-OH (4 eq.; 0,373 mmol; 132 mg) mit TBTU (4 eq.; 0,373 mmol; 120 mg), HOBt (4 eq.; 0,373 mmol; 57 mg) und DIEA (8 eq.; 0,746 mmol; 128 μ l) in NMP als Lösungsmittel zum Harz gegeben und für 4 h geschüttelt. Nach Waschen und Fmoc-Abspaltung wurde Fmoc-Tyr-OH (4 eq.; 0,373 mmol; 150 mg) mit TBTU (4 eq.; 0,373 mmol; 120 mg), HOBt (4 eq.; 0,373 mmol; 57 mg) und DIEA (8 eq.; 0,746 mmol; 128 μ l) in NMP als Lösungsmittel voraktiviert und für 4 h reagieren lassen. Nach Waschen, erneutes Fmoc-Abspalten wurde Imidazol (4 eq.; 0,373 mmol; 25 mg) und TIPS-OTf (4 eq.; 0,373 mmol; 100 μ l) in DCM gelöst zum Harz gegeben und für 3 h reagieren lassen, gefolgt von Waschen des Harzes. Mit TBTU (4 eq.; 0,373 mmol; 120 mg), HOBt (4 eq.; 0,373 mmol; 57 mg) und DIEA (8 eq.; 0,746 mmol; 128 μ l) voraktiviertes Fmoc-Leu-OH (4 eq.; 0,373 mmol; 132 mg) in NMP wurde für 4 h auf das Harz gekuppelt und das Harz anschliessend gewaschen. Von diesem Harz wird ein Aliquot (210 mg; 0,038 mmol) genommen, die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und durch PyBOP (2,3 eq.; 0,088 mmol; 45 mg), HOBt (2,3 eq.; 0,088 mmol; 6 mg) und DIEA (4,6 eq.; 0,174 mmol; 30 μ l) voraktiviertes **76** (2,3 eq.; 0,088 mmol; 32 mg) für 6 h auf das Harz gekuppelt. Nach Waschen des Harzes wurde TBAF (4 eq.; 0,151 mmol; 48 mg) in THF gelöst und für 2 Tage mit dem Harz reagieren lassen. Waschen des Harzes, gefolgt von Abspaltung vom Harz mit 95%iger aq. TFA in 1 h und Fällung mit Petrolether lieferte das Rohprodukt. Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte durch HPLC. Ausbeute: 2,5 mg (9%); HPLC (System IV): t_R 10,01 min; ESI-MS: m/z 731,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{38}H_{46}N_6O_8$: 730; TOCSY-Spektrum (DMSO) siehe Spektrenanhang.

Die Synthesen von MK620 (**82**) und MK630 (**83**) verliefen analog wie beschrieben, lediglich die eingesetzten Harzmengen und Aminosäuren waren verschieden, so dass als Synthesevorschrift nur diese aufgeführt werden.

MK620 (82): Harz: Fmoc-PAL-PEG-PS (810 mg; Belegung: 0,18 mmol/g; 0,146 mmol)

1. *Kupplung:* Fmoc-Arg(Boc)₂-OH (4 eq.; 0,583 mmol; 348 mg)
TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 µl)

2. *Kupplung:* Fmoc-Tyr-OH (4 eq.; 0,583 mmol; 235 mg)
TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 µl)

Silylierung: Imidazol (4 eq.; 0,583 mmol; 40 mg); TIPS-OTf (4 eq.; 0,583 mmol; 157 µl)

3. *Kupplung:* Fmoc-Arg(Boc)₂-OH (4 eq.; 0,583 mmol; 348 mg)
TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 µl)

Aliquot: gekuppeltes Harz (300 mg; 0,054 mmol)

4. *Kupplung:* **76** (2,4 eq.; 0,130 mmol; 47 mg)
PyBOP (2,4 eq.; 0,130 mmol; 68 mg), HOBt (2,4 eq.; 0,130 mmol; 20 mg), DIEA (4,8 eq.; 0,259 mmol; 44 µl)

Cyclisierung: TBAF (4 eq.; 0,216 mmol; 68 mg)

Ausbeute: 1,0 mg (2%); HPLC (System V): t_R 2,47 min; ESI-MS: m/z 817,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₃₈H₄₈N₁₂O₉: 816.

MK630 (83): Harz: Fmoc-PAL-PEG-PS (810 mg; Belegung: 0,18 mmol/g; 0,146 mmol)

1. *Kupplung:* Fmoc-Glu(OtBu)-OH×H₂O (4 eq.; 0,583 mmol; 259 mg)
TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 µl)

2. *Kupplung:* Fmoc-Tyr-OH (4 eq.; 0,583 mmol; 235 mg)

TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 μ l)

Silylierung: Imidazol (4 eq.; 0,583 mmol; 40 mg); TIPS-OTf (4 eq.; 0,583 mmol; 157 μ l)

3. *Kupplung:* Fmoc-Asn(Trt)-OH (4 eq.; 0,583 mmol; 348 mg)

TBTU (4 eq.; 0,583 mmol; 187 mg); HOBt (4 eq.; 0,583 mmol; 89 mg); DIEA (8 eq.; 1,166 mmol; 200 μ l)

Aliquot: gekuppeltes Harz (300 mg; 0,054 mmol)

4. *Kupplung:* **76** (2,4 eq.; 0,130 mmol; 47 mg)

PyBOP (2,4 eq.; 0,130 mmol; 68 mg), HOBt (2,4 eq.; 0,130 mmol; 20 mg), DIEA (4,8 eq.; 0,259 mmol; 44 μ l)

Cyclisierung: TBAF (4 eq.; 0,216 mmol; 68 mg)

Ausbeute: 1,6 mg (2%); HPLC (System V): t_R 2,47 min; ESI-MS: m/z 748,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{35}H_{37}N_7O_{12}$: 747.

Boc-Tyr-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-NH₂ (**84**)

60 (56 mg; 0,196 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 10 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung wurde Toluol (10 ml) gegeben und zur Trockne eingeeengt und anschliessend noch 2 \times mit Toluol (10 ml) nachrotiert. Ausbeute: 53 mg (91%).

Boc-Tyr-OH (50 mg; 0,178 mmol) wurde in DMF gelöst und DIEA (2 eq.; 0,356 mmol; 61 μ l), HOBt (1 eq.; 0,178 mmol; 27 mg) und EDCI (1 eq.; 0,178 mmol; 34 mg) hinzugegeben und für 5 min bei RT gerührt. Dann wurde das soeben dargestellte Boc-abgespaltene TFA-Salz von **60** (1 eq.; 0,178 mmol; 53 mg) zur Reaktionslösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockne einrotiert, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Ausbeute: 68 mg (85%); HPLC

(System V): t_R 2,75 min; ESI-MS: m/z 450,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{23}H_{35}N_3O_6$: 449.

Boc-Leu-Tyr-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-NH₂ (85)

84 (68 mg; 0,151 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 10 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung wurde Toluol (10 ml) gegeben und zur Trockne eingengt und anschliessend noch 2× mit Toluol (10 ml) nachrotiert. Ausbeute: 68 mg (97%).

Boc-Leu-OH (50 mg; 0,201 mmol) wurde in DMF (20 ml) gelöst und DIEA (2 eq.; 0,402 mmol; 69 μ l), HOBt (1 eq.; 0,201 mmol; 31 mg) und EDCI (1 eq.; 0,201 mmol; 39 mg) wurden hinzugegeben und für 5 min gerührt. Danach wurde das soeben dargestellte Boc-abgespaltene TFA-Salz von **84** (0,7 eq.; 0,147 mmol; 68 mg) zur Reaktionsmischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen zur Trockne, Aufnahme des Niederschlags in EtOAc, Waschen mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Rohprodukt. Dieses wurde in wenig DCM/MeOH (20:1) aufgenommen und an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (20:1) bis DCM/MeOH (9:1) gereinigt. Ausbeute: 27 mg (33%); HPLC (System V): t_R 3,20 min; ESI-MS: m/z 563,4 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{29}H_{46}N_4O_7$: 562.

Z-(3-F,4-NO₂)Phe-Leu-Tyr-Nle Ψ [CO-CH₂]Gly-NH₂ (86)

85 (27 mg; 0,048 mmol) wurde in TFA/DCM (1:1; 10 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung wurde Toluol (10 ml) gegeben und zur Trockne eingengt und anschliessend noch 2× mit Toluol (10 ml) und 1× mit Ether (10 ml) nachrotiert. Ausbeute: 27 mg (98%); ESI-MS: m/z 463,3 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{24}H_{38}N_4O_5$: 462.

76 (20 mg; 0,055 mmol) wurde in DMF (20 ml) gelöst und DIEA (2,5 eq.; 0,138 mmol; 24 μ l), HOBt (1 eq.; 0,055 mmol; 8 mg) und EDCI (1 eq.; 0,055 mmol; 11 mg) wurden hinzugegeben und für 5 min gerührt. Danach wurde das soeben dargestellte Boc-abgespaltene TFA-Salz von **85** (0,85 eq.; 0,047 mmol; 27 mg) zur Reaktionsmischung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Einengen zur Trockne, Aufnahme des Niederschlags in EtOAc, Waschen mit 5%iger aq. NaHCO₃, 5%iger aq. KHSO₄ und gesättigter aq. NaCl, Trocknen über Natriumsulfat und Einengen zur Trockne lieferte das Rohprodukt. Dieses wurde in wenig DCM/MeOH (20:1) aufgenommen und an Kieselgel mit einem Gradienten von DCM/MeOH (20:1) bis DCM/MeOH (9:1) gereinigt. Ausbeute: 9 mg (20%); HPLC (System V): t_R 3,79 min; ESI-MS: m/z 807,4 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₄₁H₅₁FN₆O₁₀: 806.

5.3 Proteasomassay

5.3.1 Aktivitätstest

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde standardmässig eine Lösung von 20S-Proteasom in Tris-Puffer (pH 7,5; 450 μ l; 6,67 nM für die PGPH, 5,56 nM für die tryptische und 1,11 nM für die chymotryptische Aktivität) mit den Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die fluorogenen Substrate für den PGPH (Z-Leu-Leu-Glu- β Na, 40 μ M), den tryptischen (Bz-Phe-Val-Arg-AMC, 8 μ M) und den chymotryptischen (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, 8 μ M) Assay wurden in dem gleichen Tris-Puffer mit möglichst wenig DMSO gelöst und zu Beginn der Messung zur Enzym-/Inhibitorlösung gegeben. Das finale Gesamtvolumen der Proben betrug somit 500 μ l. Als Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen der Fluoreszenz von AMC wurden 360 nm bzw. 460 nm verwendet, für β Na hingegen 355 nm bzw. 410 nm. Nach 1 h wurde die Fluoreszenz im Vergleich zu einer Negativprobe ohne Inhibitor bestimmt und die prozentuale Restaktivität zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes berechnet.

5.3.2 Bestimmung der K_i -Hemmwerte

Zur Bestimmung der K_i -Werte wurde die Proteasom-Puffer-Lösung mit Substrat vorinkubiert und on-line der Substratumsatz pro Zeiteinheit verfolgt. Nach Erreichen des Gleichgewichtes wurden der Inhibitor in DMSO gelöst zur Messlösung pipettiert und erneut bis zur Einstellung des Gleichgewichtes gewartet. Die so ermittelten Substratumsatzgeschwindigkeiten v_0 und v_i wurden zur Bestimmung der K_i -Werte durch nicht-lineare Regressionsanalyse der Datenpunkte v_i/v_0 und den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen an die klassische Gleichung von Dixon ($v_i/v_0 = 1/(1+I_i/K_i)$) gefittet. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 1-300 μ M eingesetzt. Bei Inhibitorkonzentrationen, die keine signifikante Hemmung ergaben, wurden die K_i -Werte als ≥ 2000 μ M abgeschätzt, was etwa 10 mal der höchsten eingesetzten

Konzentration entspricht. Die 3 Aktivitäten wurden $< K_M$ gemessen und mussten deshalb nicht für die Konkurrenz mit dem Substrat korrigiert werden. Dabei wurden die Messbedingungen gemäß Tab. 5.1 eingehalten.

<i>Aktivität</i>	<i>Messbedingung</i>
CL	20 mM HEPES-Puffer pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 0,025% SDS; DMSO 5%; 7,5 μ M Suc-LLVY-AMC; 380 nm Exzitation; 460 nm Emission; 0,34 nM Hefeproteasom
TL	50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,01% Triton X-100; DMSO 5%; 50 μ M Z-ARR-AMC; 380 nm Exzitation; 460 nm Emission; 5,6 nM Hefeproteasom
PGPH	50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,001% SDS; DMSO 5%; 1mM DTT; 50 μ M Z-LLE- β Na; 345 nm Exzitation; 425 nm Emission; 3,4 nM Hefeproteasom

Tabelle 5.1: *Messbedingungen zur Bestimmung der Hemmung für die einzelnen Aktivitäten.*

Alle drei Aktivitäten wurden bei 37 °C gemessen. Die Detergenzien wurden für die jeweilige Aktivität in Anlehnung an Arribas und Castano (Arribas & Castano, 1990) optimiert.

6 Literaturverzeichnis

Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y. T.; Plamondon, L.; Stein, R. L. (1998) *Biorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 333-338.

Adams, J.; Elliot, P. J. (2000) *Oncogene* **19**, 6687-6692.

Adams, J.; Palombella, V. J.; Sausville, E. A.; Johnson, J.; Destree, A.; Lazarus, D. D.; Maas, J.; Pien, C. S.; Prakash, S.; Elliot, P. J. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2615-2622.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition; Garland Science, New York, 2002.

Albrecht, B. K.; Williams, R. M. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 2755-2757.

Akopian, T. N.; Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1791-1798.

Arribas, J.; Castano, J. C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13969-13973.

Baumeister, W.; Walz, J.; Zühl, F.; Seemüller, E. (1998) *Cell* **92**, 367-380.

Bax, A.; Davies, D. G. (1985a) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.

Bax, A.; Davies, D. G. (1985b) *J. Magn. Reson.* **65**, 207-213.

Behrendt, R.; Schenk, M.; Musiol, H.-J.; Moroder, L. (1999) *J. Pept. Sci.* **5**, 519-529.

Beugelmans, R.; Bigot, A.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J. (1996) *J. Org. Chem.* **61**, 771-774.

Beugelmans, R.; Roussi, G.; Zamora, E. G.; Carbonnelle, A. (1999) *Tetrahedron* **55**, 5089-5112.

Bochtler, M.; Ditzel, L.; Groll, M.; Huber, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6070-6074.

Bochtler, M.; Ditzel, L.; Groll, M.; Hartmann, C.; Huber, R.; (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 295-317.

Boger, D. L.; Nomoto, Y.; Teegarden, B. R. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 1425-1433.

Bogyo, M.; Gaczynska, M.; Ploegh, H. L. (1997a) *Biopolymers* **43**, 269-280.

Bogyo, M.; McMaster, J. S.; Gaczynska, M.; Tortorella, D.; Goldberg, A. L.; Ploegh, H. (1997b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6629-6634.

Bogyo, M.; Shin, S.; McMaster, J. S.; Ploegh, H. L. (1998) *Chem. Biol.* **5**, 307-320.

Brandstetter, H.; Kim, J. S.; Groll, M.; Huber, R. (2001) *Nature* **414**, 466-470.

Brannigan, J. A.; Dodson, G.; Duggleby, H. J.; Moody, P. C.; Smith, J. L.; Tomchick, D. R.; Murzin, A. G. (1995) *Nature* **378**, 416-419.

Breitschopf, K.; Bengal, E.; Ziv, T.; Admon, A.; Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.* **17**, 5964-5973.

Brown, M. G.; Driscoll, J.; Monaco, J. J. (1993) *J. Immun.* **151**, 1193-1204.

Burgess, K.; Lim, D.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J. (1997) *Tetrahedron Lett.* **38**, 3345-3348.

Carbonnelle, A.; Zamora, E. G.; Beugelmans, R.; Roussi, G. (1998a) *Tetrahedron Lett.* **39**, 4471-4472.

Carbonelle, A.; Zamora, E. G.; Beugelmans, R.; Roussi, G. (1998b) *Tetrahedron Lett.* **39**, 4467-4470.

Cardozo, C.; Vinitzky, A.; Hidalgo, M. C.; Michaud, C.; Orlowski, M. (1992) *Biochemistry* **31**, 7373-7380.

Cardozo, C.; Chen, W. E.; Wilk, S. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 113-120.

- Cardozo, C.; Michaud, C.; Orłowski, M. (1999) *Biochemistry* **38**, 9768-9777.
- Ciechanover, A. (1994) *Cell* **79**, 13-21.
- Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 2933-2936.
- Chatterjee, S.; Dunn, D.; Mallya, S.; Ator, M. A. (1999) *Biorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2603-2606.
- Chen, P.; Hochstrasser, M. (1996) *Cell* **86**, 961-972.
- Chenault, H. K.; Dahmer, J.; Whitesides, G. M. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6354-6364.
- Chuang, S. E.; Burland, V.; Plunkett, G.; Daniels, D. L.; Blattner, F. R. (1993) *Gene* **134**, 1-6.
- Corey, E. J.; Li, W. D. (1999) *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1-10.
- Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 205-208.
- Coux, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 801-847.
- Crippen, G. M.; Havel, T. F.: *Distance Geometry and Molecular Conformation*; Research Studies Press, Somerset, England, and John Wiley, New York, 1988.
- DeMartino, G. N.; Slaughter, C. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22123-22126.
- Decicco, C. P.; Song, Y.; Evans, D. A. (2001) *Org. Lett.* **3**, 1029-1032.
- Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Grenier, L.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Stein, R. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7273-7276.
- Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Destree, A. T.; Grenier, L.; McCormack, T. A.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Palombella, V. J.; Parent, L. A.; Plamondon, L.; Stein, R. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 182-188.

Dick, T. P.; Nussbaum, A. K.; Deeg, M.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Schirle, M.; Keilholz, W.; Stevanovic, S.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G.; Schild, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25637-25646.

DiMaio, J.; Gibbs, B.; Lefebvre, J.; Konishi, Y.; Munn, D.; Yue, S. Y. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 3331-3341.

Dou, Q. P.; Nam, S. (2000) *Expert Opin. Ther. Pat.* **10**, 1263-1272.

Edwards, P. D.; Bernstein, P. R. (1994) *Med. Res. Rev.* **14**, 127-194.

Elder, A. M.; Rich, D. H. (1999) *Org. Lett.* **1**, 1443-1446.

Estiarte, M. A.; Elder, A. M.; Rich, D. H.; In Lebl, M. and Houghten, R. A. (Ed.): *Peptides: The Wave of the Future*; American Peptide Society, San Diego, 2001, 532-533.

Evans, D. A.; Dinsmore, C. J.; Ratz, A. M.; Evrard, D. A.; Barrow, J. C. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3417-3418.

Fenteany, G.; Standaert, R. F.; Lane, W. S.; Choi, S.; Corey, E. J.; Schreiber, S. L. (1995) *Science* **268**, 726-731.

Figueiredo-Pereira, M. E.; Chen, W. E.; Li, J.; Johdo, O. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16455-16459.

Gaczynska, M.; Rock, K. L.; Spies, T.; Goldberg, A. L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9213-9217.

Garner, P.; Park, J. M. (1987) *J. Org. Chem.* **52**, 2361-2364.

Germain, R. N.; Margulies, D. H. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 403-450.

Glenn, M. P.; Pattenden, L. K.; Reid, R. C.; Tyssen, D. P.; Tyndall, J. D. A.; Birch C. J.; Fairlie D. P. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 371-381.

Goddard, K.; Kneller, D. G.: *Sparky 3*; University of California, San Francisco.

Groettrup, M.; Schmidtke, G. (1999) *Drug Discov. Today* **4**, 63-71.

Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, D.; Huber, R. (1997) *Nature* **386**, 463-471.

Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H.; Finley, D. (2000a) *Nature Struct. Biol.* **7**, 1062-1067.

Groll, M.; Kim, K. B.; Kairies, N.; Huber, R.; Crews, C. M. (2000b) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1237-1238.

Groll, M.; Koguchi, Y.; Huber R.; Kohno J. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 543-548.

Groll, M.; Nazif, T.; Huber, R.; Bogyo, M. (2002) *Chem. Biol.* **9**, 655-662.

Gurjar, M. K.; Tripathy, N. K. (1997) *Tetrahedron Lett.* **38**, 2163-2166.

Hanada, M.; Sugawara, K.; Kaneta, K.; Toda, S.; Nishiyama, Y.; Tomita, K.; Yamamoto, H.; Konishi, M.; Oki, T. (1992) *J. Antibiot.* **45**, 1746-1752.

Harding, C. V.; France, J.; Song, R.; Farah, J. M.; Chatterjee, S.; Iqbal, M.; Siman, R. (1995) *J. Immunol.* **155**, 1767-1775.

Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U.; Wolf, D. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25200-25209.

Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.

Holz, H.; Kapelari, B.; Kellermann, J.; Seemüller, E.; Sumegi, M.; Udvardy, A.; Medalia, O.; Sperling, J.; Müller, S. A.; Engel, A.; Baumeister, W. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 119-129.

Inoue, M.; Furuyama, H.; Sakazaki, H.; Hiramata, M. (2001) *Org. Lett.* **3**, 2863-2865.

Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. (1995) *J. Org. Chem.* **60**, 7508-7510.

Janetka, J. W.; Rich, D. H. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6488-6495.

Kaneko, I.; Kamoshida, K.; Takahashi, S. (1989) *J. Antibiot.* **42**, 236-241.

Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3363-3371.

Kisselev, A. F.; Songyang, Z.; Goldberg, A. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14831-14837.

Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. (2001) *Chem. Biol.* **8**, 739-758.

Koguchi, Y.; Kohno, J.; Suzuki, S.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. (1999) *J. Antibiot.* **53**, 1069-1076.

Koguchi, Y.; Kohno, J.; Suzuki, S.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. (2000a) *J. Antibiot.* **53**, 63-65.

Koguchi, Y.; Kohno, J.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Okuda, T.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. (2000b) *J. Antibiot.* **53**, 105-109.

Köhler, A.; Cascio, P.; Leggett, D. S.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L.; Finley, D. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1143-1152.

Kohno, J.; Koguchi, Y.; Niskio, M.; Nakao, K.; Kuroda, M.; Shimizu, R.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. (2000) *J. Org. Chem.* **65**, 990-995.

Krenitsky, P. J.; Boger, D. L. (2002) *Tetrahedron Lett.* **43**, 407-410.

Kroll, M.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bachelier, F.; Thomas, D.; Friguet, B.; Conconi, M. (1999) *Chem. Biol.* **6**, 689-698.

Lee, M.; Phillips, R. S. (1992) *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 1563-1564.

Lin, S.; Danishefsky, S. L. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 1967-1970.

Lin, S.; Danishefsky, S. L. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 512-515.

Lindquist, N.; Fenical, W.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2303-2304.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (1997) *Adv. Drug Delivery Rev.* **23**, 3-25.

Loidl, G.; Groll, M.; Musiol, H.-J.; Ditzel, L.; Huber, R.; Moroder, L. (1999a) *Chem. Biol.* **6**, 197-204.

Loidl, G.; Groll, M.; Musiol, H.-J.; Huber, R.; Moroder, L. (1999b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5418-5422.

Loidl, G. (1999c) Dissertation, TU München.

Loidl, G.; Musiol, H.-J.; Budisa, N.; Huber, R.; Poirot, S.; Fourmy, D.; Moroder, L. (2000a) *J. Pept. Sci.* **6**, 139-144.

Loidl, G.; Musiol, H.-J.; Groll, M.; Huber, R.; Moroder, L. (2000b) *J. Pept. Sci.* **6**, 36-46.

Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. (1995) *Science* **268**, 533-539.

Lum, R. T.; Nelson, M. G.; Joly, A.; Horsma, A. G.; Lee, G.; Meyer, S. M.; Wick, M. M.; Schow, S. R. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 209-214.

Lupas, A.; Zwickl, P.; Baumeister, W. (1994) *Trends Biochem. Sci.* (1994) **19**, 533-534.

Lynas, J. F.; Harriot, P.; Healy, A.; McKervey, M. A.; Walker, B. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 373-378.

Ma, D.; Wu, Q. (2000) *Tetrahedron Lett.* **41**, 9089-9093.

Ma, D.; Wu, Q. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 5279-5281.

Masse, C. E.; Morgan, A. J.; Adams, J.; Panek, J. S. (2000) *Eur. J. Org. Chem.*, 2513-2528.

Marx, J. (2002) *Science* **297**, 1792-1794.

Matsuzaki, M.; Ikeda, H.; Ogino, T.; Matsumoto, A.; Woodruff, H. B.; Tanaka, H.; Omura, S. (1994) *J. Antibiot.* **47**, 1173-1174.

Matthews, W.; Driscoll, J.; Tanaka, K.; Ichihara, A.; Goldberg, A. L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 54-58.

McCormack, T. A.; Cruikshank, A. A.; Grenier, L.; Melandri, F. D.; Nunen, S. L., Plamondon, L.; Stein, R. L.; Dick, L. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 7792-7780.

McGrath, M. E. (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 181-204.

Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H. B.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M. (1999a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10403-10408.

Meng, L.; Kwok, B. H. B.; Sin, N.; Crews, C. M. (1999b) *Cancer Res.* **59**, 2798-2801.

Meyer, S.; Kohler, N. G.; Joly, A. (1997) *FEBS Lett.* **413**, 354-358.

Miyaura, N.; Suzuki, A. (1995) *Chem. Rev.* **95**, 2457-2483.

Müller, G.; Giera, H. (1998) *J. Comp.-Aided Mol. Design* **12**, 1-6.

Nahm, S.; Weinreb, M. S. (1981) *Tetrahedron Lett.* **22**, 3815-3818.

Nam, S.; Smith, D. M.; Dou, Q. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13322-13330.

Naruse, N.; Tenmyo, O.; Kobaru, S.; Hatori, M.; Tomita, K.; Hamagishi, Y.; Oki, T.; Careofokumura, J. (1993a) *J. Antibiot.* **46**, 1804-1811.

Naruse, N.; Oka, M.; Konishi, M.; Oki, T. (1993b) *J. Antibiot.* **46**, 1812-1818.

Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N. C.; Natarajan, S.; Yue, T.-J.; Li, H.; Bräse, S.; Ramanjulu, J. M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3421-3422.

Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N. C.; Bräse, S.; Winssinger, N. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2096-2152.

Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G.; Schild, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12504-12509.

Omura, S.; Fujimoto, T.; Otaguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. (1991) *J. Antibiot.* **44**, 113-116.

Orlowski, M.; Cardozo, C.; Michaud, C. (1993) *Biochemistry* **32**, 1563-1572.

Ostrowska, H.; Wojcik, C.; Omura, S.; Worowski, K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **234**, 729-732.

Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D. (1995) *J. Med. Chem.* **38**, 3193-3196.

Pearson, A. J.; Bignan, G.; Zhang, P.; Chelliah, M. (1996) *J. Org. Chem.* **61**, 3940-3941.

Rammensee, H. G.; Falk, K.; Röttschke, O. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 213-244.

Rance, M.; Sorensen, O. W.; Bodenhausen, G.; Wagner, G.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479-485.

Rao, S.; Porter, D. C.; Chen, X.; Herliczek, T.; Lowe, M.; Keyomarsi, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7797-7802.

Rechsteiner, M.; Realini, C.; Ustrell, V. (2000) *Biochem. J.* **345**, 1-15.

Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A. L. (1994) *Cell* **78**, 761-771.

Rohrwild, M.; Coux, O.; Huang, H. C.; Moerschell, R. P.; Yoo, S. J.; Seol, J. H.; Chung, C. H.; Goldberg, A. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5808-5813.

Sakurai, N.; Yaguchi, Y.; Hirakawa, T.; Nagai, M.; Inoue, T. (1991) *Phytochemistry* **30**, 3077-3079.

Savige, W. E.; Fontana, A. (1980) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **15**, 285-297.

Schmidtke, G.; Holzhutter, H. G.; Bogyo, M.; Kairies, N.; Groll, M.; de Giuli, R.; Emch, S.; Groettrup, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **276**, 13322-13330.

Schöllkopf, U.; Groth, U.; Deng, C. (1981) *Angew. Chem. Int. Ed.* **20**, 798-799.

Seemüller, E.; Lupas, A.; Stock, D.; Löwe, J.; Huber, R.; Baumeister, W. (1995) *Science* **268**, 579-582.

Sugawara, K.; Hatori, M.; Nishiyama, Y.; Tomita, K.; Kamei, K.; Konishi, M.; Oki, T. (1990) *J. Antibiot.* **43**, 8-18.

Suzuki, A. (1999) *J. Organometallic Chem.* **576**, 147-168.

Tamura, N.; Lottspeich, F.; Baumeister, W.; Tamura, T. (1998) *Cell* **95**, 637-648.

Tanahashi, N.; Murakami, Y.; Minami, Y.; Shimbara, N.; Hendil, K. B.; Tanaka, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14336-14345.

Thaisrivong, S.; Pals, D. T.; Kati, W. M.; Turner, S. R.; Thomasco, L. M.; Watt, W. (1986) *J. Med. Chem.* **29**, 2080-2087.

Tyndall, J. D. A.; Reid, R. C.; Tyssen, D. P.; Jardine, D. K.; Todd, B.; Passmore, M.; March, D. R.; Pattenden, L. K.; Bergman, D. A.; Alewood, D.; Hu, S.-H.; Alewood, P. F.; Birch, C. J.; Martin, J. L.; Fairlie, D. P. (2000) *J. Med. Chem.* **43**, 3495-3504.

Vinitsky, A.; Michaud, C.; Powers, J. C.; Orłowski, M. (1992) *Biochemistry* **31**, 9421-9428.

Voges, D.; Zwickl, P.; Baumeister, W. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068.

Wenzel, T.; Eckershorn, C.; Lottspeich, F.; Baumeister, W. (1994) *FEBS Lett.* **349**, 205-209.

Wilk, S.; Figueiredo-Pereira, M. E. (1993) *Enzyme Protein* **47**, 306.

Wolf, P. R.; Ploegh, H. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 267-306.

Wüthrich, K.: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley, New York, 1986.

Yang, Y.; Fruh, K.; Ahn, K.; Peterson, A. K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27687-27694.

Yu, B.; Pereira, M. E.; Wilk, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2029-2036.

Zühl, F.; Zirrgiebel, U. (1998) *Biologie in unserer Zeit* **28**, 64-71.

7 Spektrenanhang

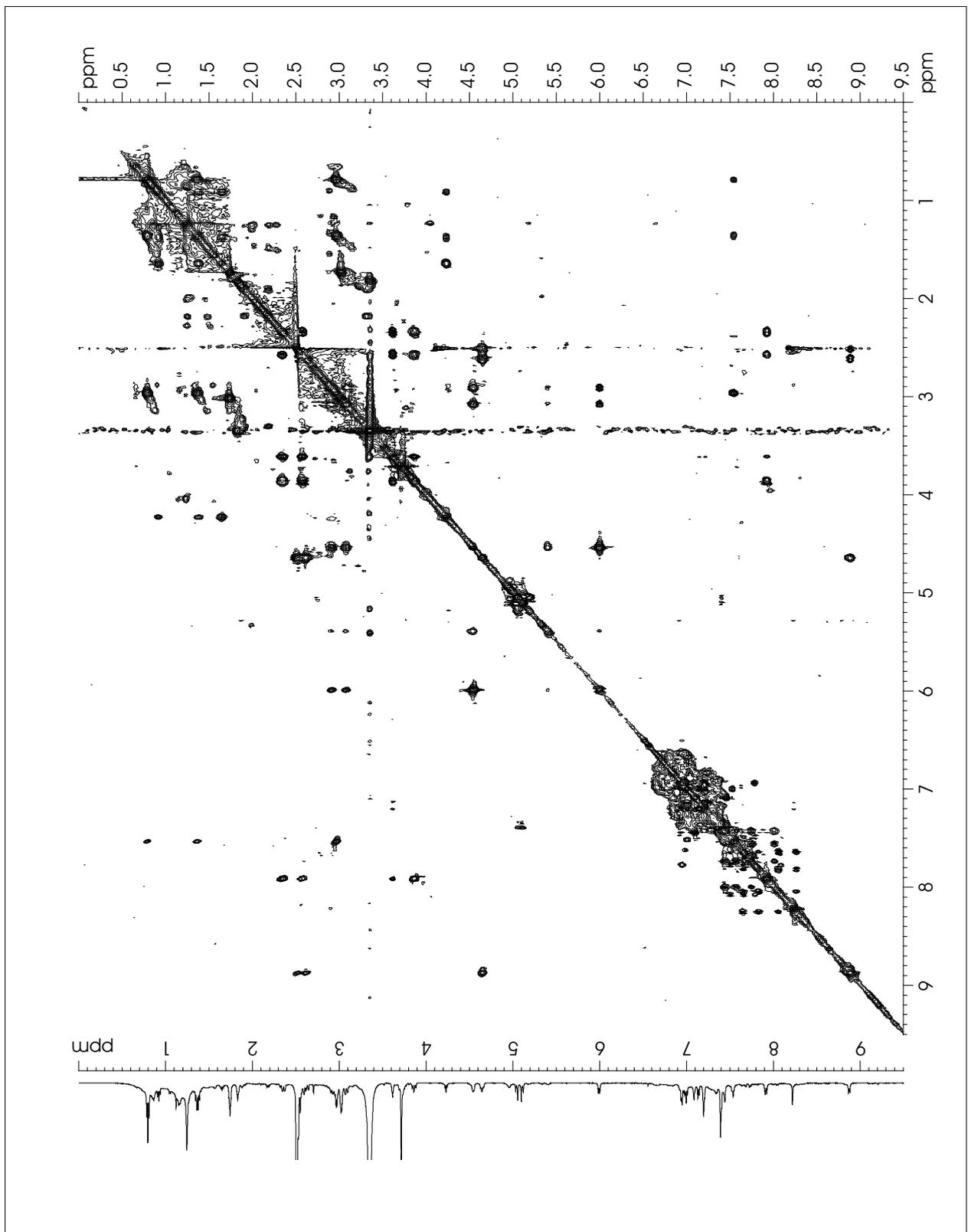


Abbildung 7.1: TOCSY-Spektrum (DMSO) von MK258.

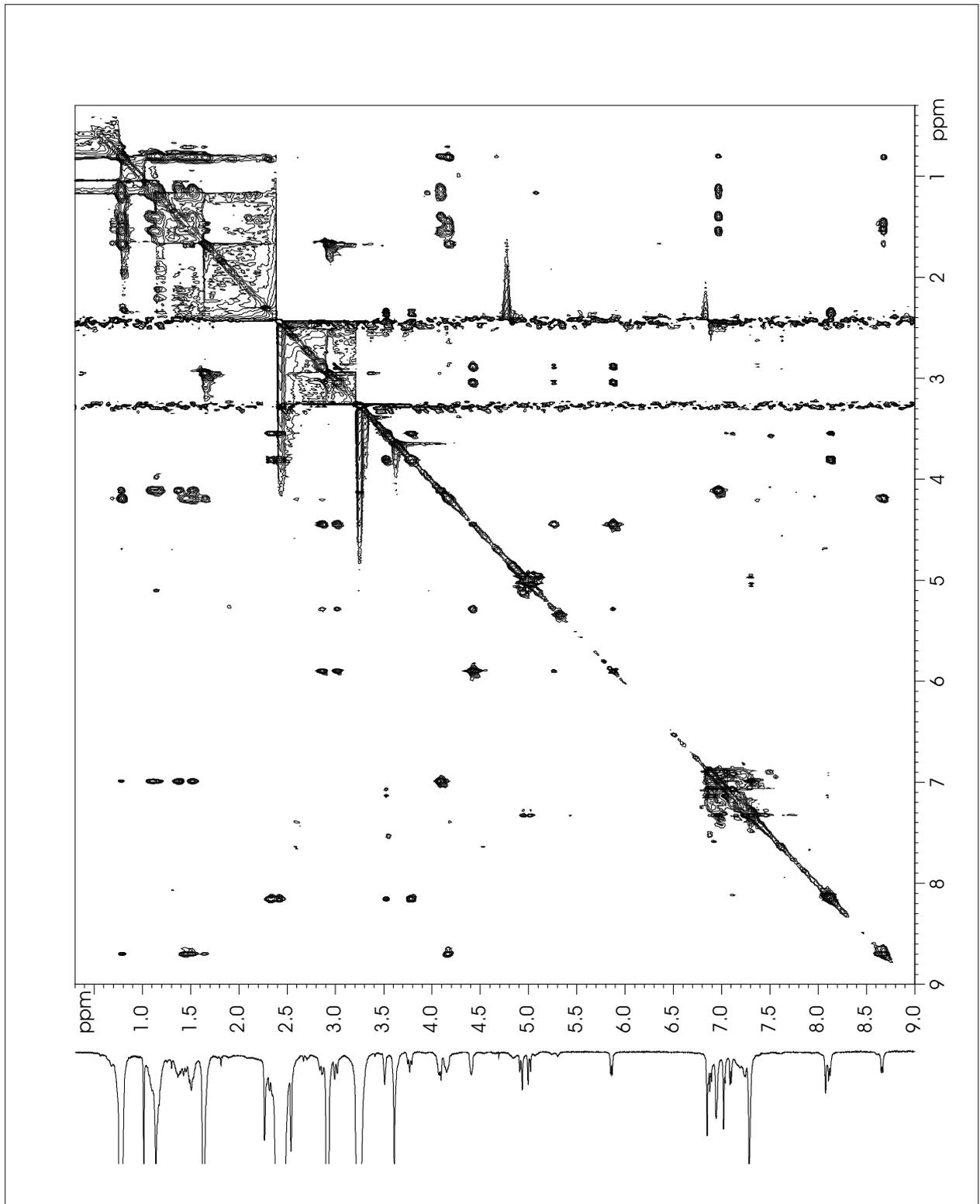


Abbildung 7.2: TOCSY-Spektrum (DMSO) von MK416.

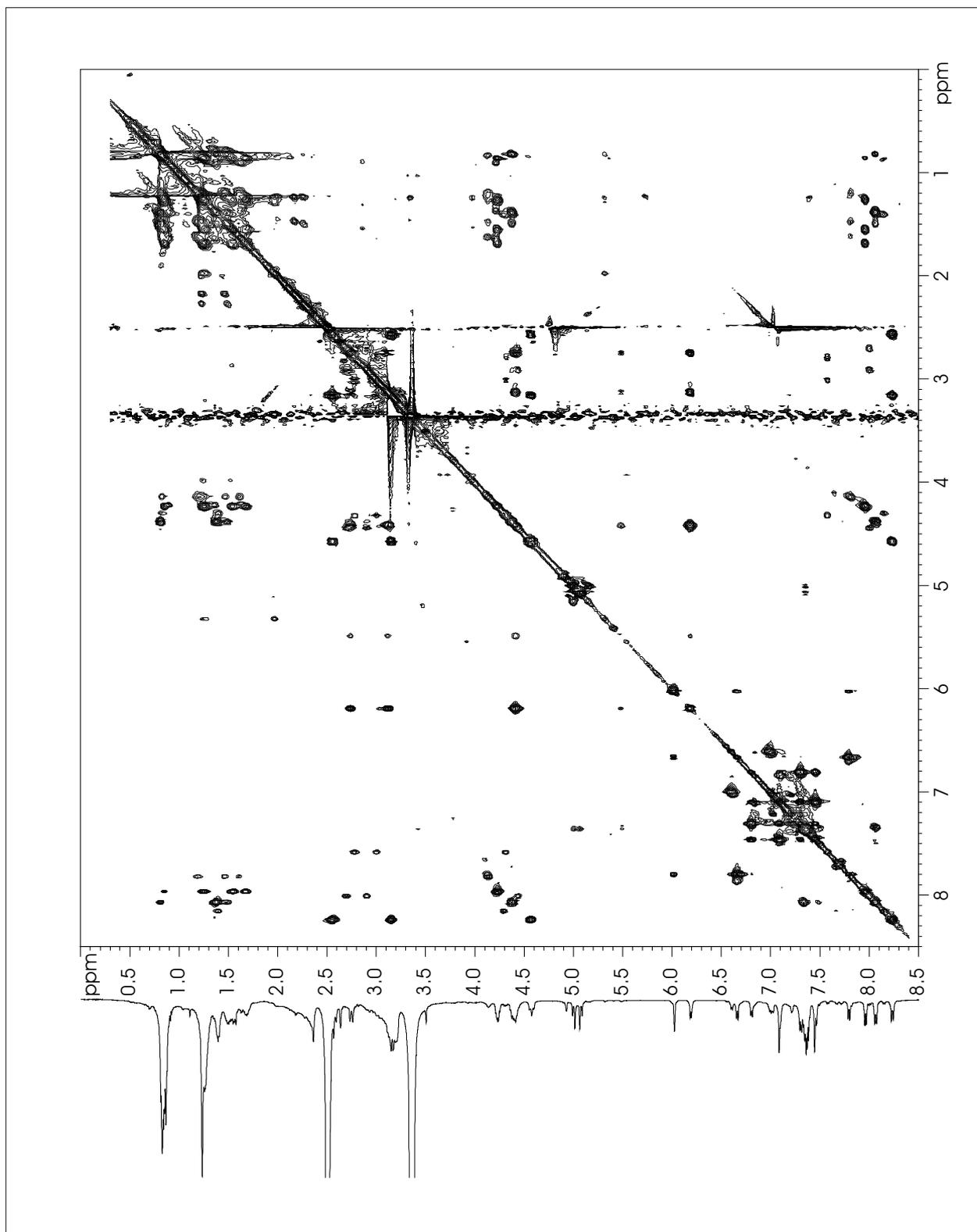


Abbildung 7.3: TOCSY-Spektrum (DMSO) von MK600.

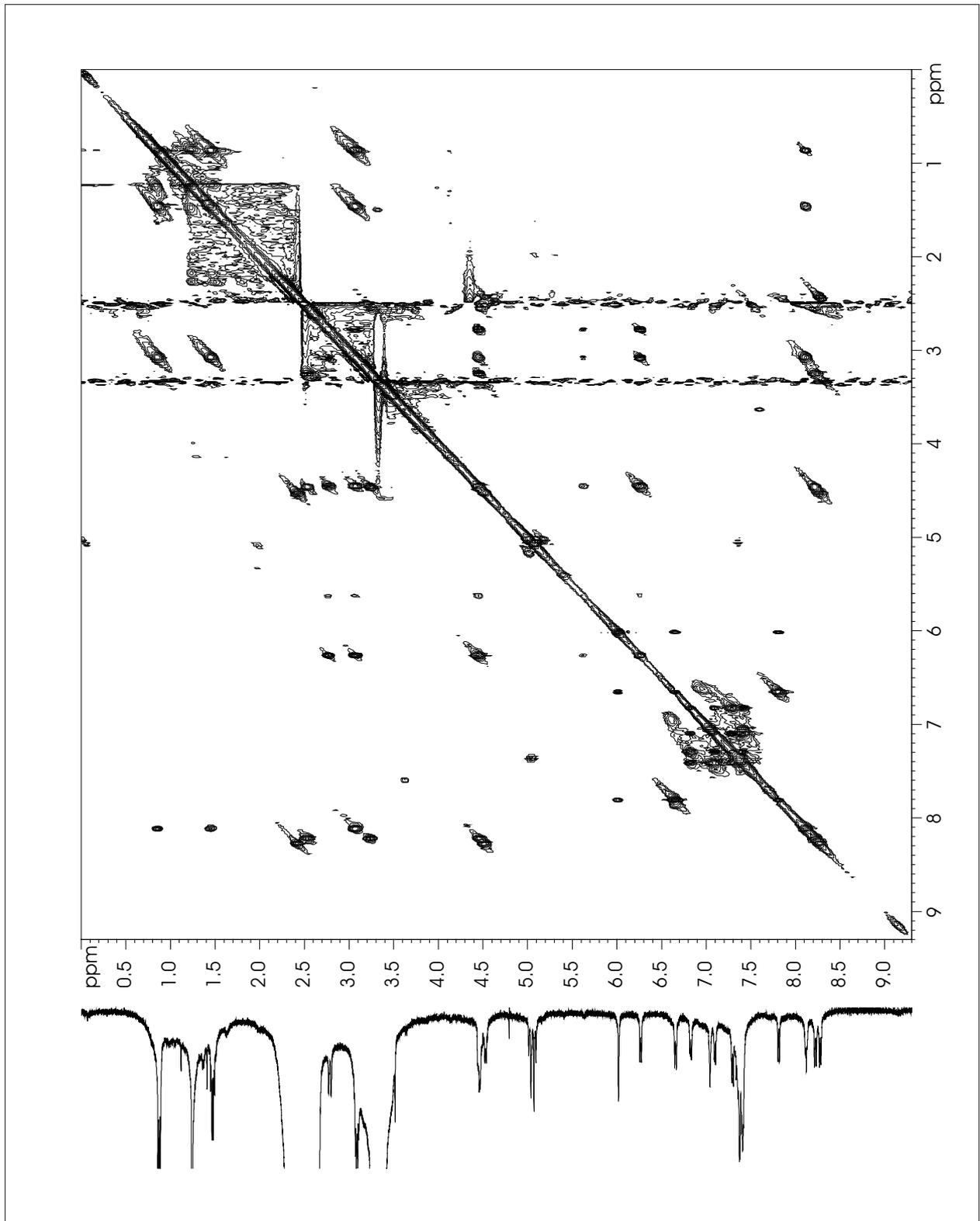


Abbildung 7.4: TOCSY-Spektrum (DMSO) von MK610.