

**Kombinatorische Festphasensynthese von Analoga
des Farnesyltransferase-Inhibitors Pepticcinnamin E
und deren biologische Evaluierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Michael Thutewohl
aus Kassel

Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat
1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. H. Waldmann am Institut für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe in der Zeit von November 1998 bis April 2000 und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Zeit von Mai 2000 bis Juni 2002 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1 Apoptose und Krebs	3
2.2 Inhibition der Farnesyltransferase	4
2.3 Entwicklung von Farnesyltransferase-Inhibitoren	8
2.4 Kombinatorische Festphasensynthese	12
2.5 Screening von Substanzbibliotheken	13
2.6 Peptidsynthese in Lösung und an der Festphase	13
2.7 Kupplungsreagenzien	17
2.8 Linker und Schutzgruppen für die Festphasensynthese	20
2.9 Synthese von Peptidcinnamin E	22
3. Ziel der Arbeit	24
4. Spezieller Teil	26
4.1 Grundlegende Planungen zur kombinatorischen Festphasensynthese	26
4.2 Anknüpfung des ersten Bausteins	28
4.2.1 Synthese der Aminosäurebausteine	28
4.2.2 Anknüpfung an den polymeren Träger	30
4.2.3 Abspaltung vom polymeren Träger	32
4.3 Synthese der Tripeptideinheit	33
4.3.1 Aufbau durch C-terminale Verlängerung	33
4.3.2 Aufbau durch N-terminale Verlängerung	38
4.3.3 Aufbau durch C- und N-terminale Verlängerung	40
4.4 Anknüpfung des lipophilen N-terminalen Acylrests	43
4.4.1 Synthese der Bausteine	43
4.4.2 Anknüpfung der Bausteine an festphasengebundene Tripeptide	45
4.4.3 Suzuki-Reaktion am polymeren Träger	47
4.5 Vervollständigung der Pentamerstruktur	48
4.6 Aufbau der Substanzbibliothek	52
4.7 Durchführung der biologischen Tests	63

4.7.1. Inhibition der Farnesyltransferase	63
4.7.1.1 Radioaktivität-basierter Inhibitionstest	63
4.7.1.2 Fluoreszenz-basierter Inhibitionstest	64
4.7.1.2.1 Screening von Manumycin-Analoga	65
4.7.1.2.2 Screening der Substanzbibliothek	66
4.7.1.2.3 Messung der Inhibitionskinetik	68
4.7.2 Inhibition der GeranylGeranyltransferase I	72
4.7.3 Test gegenüber transformierten MDCK-f3 Zelllinien	73
4.7.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen	75
5. Zusammenfassung	81
6. Ausblick	88
7. Experimenteller Teil	91
7.1 Messgeräte und Hilfsmittel	91
7.2 Versuche zu Kapitel 4.2	94
7.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1	94
7.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2	105
7.3 Versuche zu Kapitel 4.3	111
7.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1	111
7.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2	117
7.3.3 Versuche zu Kapitel 4.3.3	125
7.4 Versuche zu Kapitel 4.4	132
7.4.1 Versuche zu Kapitel 4.4.1	132
7.4.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2	140
7.4.3 Versuche zu Kapitel 4.4.3	146
7.5 Versuche zu Kapitel 4.5	148
7.6 Versuche zu Kapitel 4.6	154
7.7 Versuche zu Kapitel 4.7	197
8. Literaturverzeichnis	203

Abkürzungsverzeichnis

Äquiv.	Äquivalente
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
Boc	<i>N-tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	2-Chlor-1,3-dimethyl-2-imidazolium-hexafluorophosphat
Cbz	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propansulfonsäure
CSA	Camphersulfonsäure
Dansyl	5-Dimethylamino-naphtalin-1-sulfonyl
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
Drift	diffuse Reflektion
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
GDP	Guanosindiphosphat
GGPP	GeranylGeranylpyrophosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EI	Electron Impact
EMS	Ethylmethylsulfid
ESI	Elektronenspray Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
Far	Farnesyl
Fmoc	<i>N</i> -9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPP	Farnesylpyrophosphat
gem.	gemessen
GerGer	GeranylGeranyl
HAPyU	1-(1-Pyrrolidinyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-ylmethyl)pyrrolidinium hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid)

HATU	<i>N</i> -[(dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5 <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His	Histidyl
HOAc	Essigsäure
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
Lsg.	Lösung
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MTBD	7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NMA	<i>N</i> -Methylanilin
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lsg.
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
PyBroP	Bromotris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TES	Triethylsilan
TFFH	Tetramethylfluoroformamidinium-hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TOF	Time of Flight
TosOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
Tosyl	Toluolsulfonyl
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
Tyr	Tyrosyl

1. Einleitung

Nachdem während des 2. Weltkriegs ein mit großen Mengen des Kampfstoffs S-Lost (Senfgas) beladenes Schiff bombardiert worden war, stellte man bei den zahlreichen Opfern unter anderem Schädigungen der stark proliferierenden Zellen fest.^[1] Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden die strukturell verwandten N-Lost-Analoga als Zytostatika entwickelt, die noch heute zu den meist verwendeten Chemotherapeutika in der klinischen Tumorbehandlung zählen.^[1, 2] Dieses Beispiel soll die Verzweiflung widerspiegeln, mit welcher der Kampf gegen die Krankheit Krebs geführt wird, denn die Nebenwirkungen dieser und vieler anderer Zytostatika sind beträchtlich: Sie reichen von Erbrechen, Gewichtsverlust und Krämpfen bis zu schwersten Organschäden und paradoxerweise Auslösung weiterer maligner Transformationen.^[2, 3] Zwar zeigen zwischenzeitlich Medikamente neueren Typs geringere toxische Effekte, doch sind diese häufig auf spezielle Krebsarten beschränkt. Außerdem erzwingt die drohende Resistenzentwicklung vieler aggressiver Tumore eine Kombinationstherapie mehrerer Präparate mit unterschiedlichen Wirkmechanismen.^[2, 3] Trotz aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet, liegen bei den häufig auftretenden soliden Tumoren die Heilungschancen bei unter 20%, so dass Krebs zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern gehört.^[2, 4]

Zur Entwicklung von Tumortheraeutika wurden in der Vergangenheit vornehmlich Strategien verfolgt, die auf die erhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe abzielen.^[5] Damit läßt sich jedoch nur eine begrenzte Selektivität erzielen, so dass die ausgeübte Zytotoxizität zu den oben beschriebenen, gravierenden Nebenwirkungen führt. Alternative Angriffspunkte blieben oft auf Grund der ungenügenden Kenntnisse der zellulären Abläufe verschlossen. Mit den revolutionären Fortschritten auf den Gebieten der Molekularbiologie, Zellbiologie und Biochemie in den letzten 20 Jahren konnte ein wichtiger Teil der zellulären Vorgänge auf molekularer Ebene aufgeklärt werden.^[5-7] Damit verbunden war ein großer Erkenntnisgewinn in Bezug auf die Ursachen und die biochemischen Veränderungen, die in einer transformierten Zelle auftreten und schließlich zur Tumorbildung führen. Man hat festgestellt, dass zur malignen Transformation einer Zelle Mutationen in mehreren speziellen Genen, den sogenannten Onkogenen, vorliegen müssen.^[6, 7] Diese kodieren sowohl für Proteine intrazellulärer Signalkaskaden, die zellteilungs- und wachstumsregulierende Signale auslösen oder weiterleiten, als auch für Kontrollproteine, sogenannte Tumorsuppressoren^[2, 6-8], die den Zell-Cyclus steuern und genetischen Defekten entgegenwirken. Die resultierenden Gen-Produkte weisen oft Defekte auf, die zu unkontrolliertem Wachstum führen. Eine derartige Tumorzelle entzieht sich somit den

internen Regulationsmechanismen und dadurch den natürlichen Grenzen, die einer untransformierten Zelle auferlegt werden. Aktuelle rationale Ansätze basieren auf einem gezielten Eingriff in die gestörten molekularen Signalwege und -mechanismen, um dadurch die malignen Effekte zu stoppen. Somit wird nicht mehr unspezifisch auf die Tumorzelle und deren übermäßigem Proliferationscharakter abgezielt, sondern einzelne Schlüsselemente der Signalkaskaden werden anvisiert, für die das Design entsprechender Modulatoren erforderlich ist. Diese Strategie wird unter dem Begriff Signaltransduktionstherapie zusammengefaßt.^[5] Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese und der biologischen Evaluierung von Hemmern der Farnesyltransferase, einem Enzym, welches in direktem Zusammenhang mit fehlgesteuerten, krebsrelevanten Signalproteinen steht. Von Vertretern dieser Wirkstoffklasse ist bekannt, dass sie eine Tumorrückbildung bewirken, indem sie die Reaktivierung intrazellulärer Programme auslösen, welche zur Selbsterstörung defekter Zellen führen.^[9]

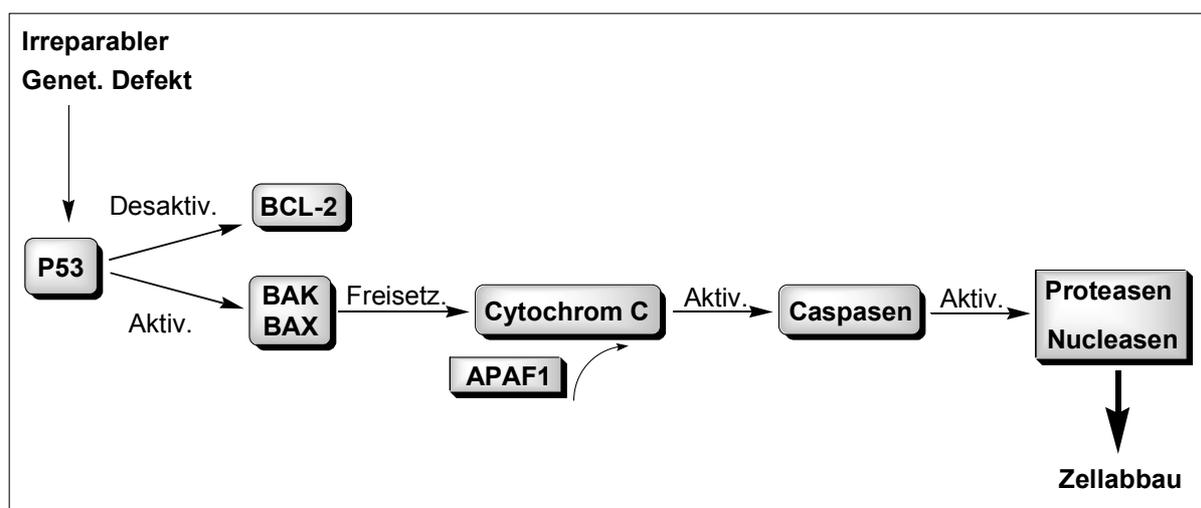
2. Allgemeiner Teil

2.1 Apoptose und Krebs

Der Begriff Apoptose beschreibt einen natürlich ablaufenden Vorgang, bei dem sich eine Zelle nach einem genau festgelegten Programm selbst zerstört, so dass dieser Prozess als programmierter Zelltod bezeichnet wird.^[10] Der Ablauf ist von charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie begleitet, durch die er sich deutlich vom nekrotischen Zelltod unterscheiden läßt.^[11] Die Apoptose läuft in mehreren Phasen ab.^[7, 11] Nach Empfang des apoptotischen Signals rundet sich die Zelle ab, gefolgt von Kondensation der DNA mit anschließender Kern-Fragmentierung. Schließlich zerfällt die Zelle in mehrere Vesikel, sogenannte apoptotische Körperchen, welche von benachbarten Zellen phagozytiert werden.

Bei diesem Vorgang handelt es sich einerseits um einen regulativen Prozess des Organismus, der zum Ziel hat, überschüssige oder unerwünschte Zellen zu eliminieren, andererseits kommt der Apoptose eine essentielle Abwehrfunktion gegenüber mutierten oder von Krankheitserregern befallenen Zellen zu, die auf diese Weise unschädlich gemacht werden.^[12]

Im Zusammenhang mit der Krebs-Abwehr spielt unter anderem das Tumorsuppressorprotein p53 eine entscheidende Rolle.^[13, 14] Treten in einer Zelle irreparable Genmutationen auf, so initiiert p53 ein spezifisches Signal, welches das apoptotische Programm startet^[15] (Schema 1).



Schema 1: Auslösung von Apoptose durch die p53-BAK/BAX-Kaskade

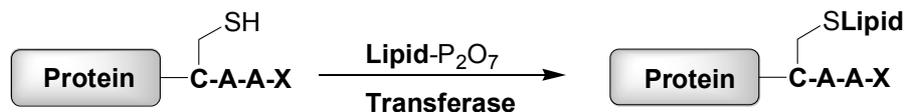
Hierdurch werden Proteine der BCL-2-Familie aktiviert, wie BAK und BAX,^[16] die die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirken.^[17, 18] Das eigentliche BCL-2-Protein besitzt anti-apoptotische Eigenschaften durch Bildung eines Dimers mit BAX,^[19, 20] gibt aber im Rahmen der Apoptose-Kaskade BAX frei. Cytochrom C löst im Zusammenwirken mit APAF1 (Apoptotische Proteolyse-aktivierender Faktor 1) die Aktivierung von Caspasen^[21, 22], hochkonservierten Asparaginsäure-spezifischen Cysteinyl-Proteasen, aus, die in einer komplexen Proteolyse-Kaskade weitere Proteasen und Nucleasen freisetzen.^[23, 24] Diese führen den koordiniert ablaufenden Abbau der DNA, der Organellen und Zell-Kompartimente durch, was zur Auflösung der Zell-Einheit führt. Hierbei ist anzumerken, dass die p53-BAK/BAX-Kaskade nur eine von mehreren Mechanismen ist, Caspasen zu aktivieren und damit Apoptose hervorzurufen.^[7]

Bei der Cancerogenese sind durch Genmutation wichtige Schaltstellen der Apoptose-Signalkette betroffen, die ihre vorgesehene Funktion nicht mehr erfüllen, so dass als Konsequenz die notwendige Zelleliminierung nicht mehr ausgeführt werden kann und die Zelle diese Eigenkontrolle verliert. Damit sind - gepaart mit weiteren Gen-Defekten, die Zellcyclus oder Wachstumskontrolle aufheben und zu unkontrollierter Zellproliferation führen – grundlegende Voraussetzungen für die Tumorbildung gegeben. In diesem Zusammenhang ist in erster Linie der Tumorsuppressor p53 zu nennen,^[6, 7, 25] welcher aufgrund von Mutation nicht mehr in der Lage ist, den Apoptose-Prozess zu initiieren. Tatsächlich werden in ca. 50% aller menschlicher Tumore p53-Mutationen vorgefunden.^[2] Da p53 wiederum von sogenannten Mdm2-Proteinen kontrolliert wird, kann eine Mutation in dem zugehörigen Gen zu einer Überexpression dieser Proteine führen und trotz intaktem p53 die Apoptosekaskade lahmgelegt werden.^[6] Weiterhin können Gen-Defekte zu einer vermehrten Expression von BCL-2 führen, wodurch eine verstärkte Apoptosehemmung die Folge ist.^[6] Gewisse Verbindungen, darunter Farnesyltransferase-Inhibitoren, lösen in transformierten Zellen Effekte aus, die den Apoptosemechanismus starten können.^[9]

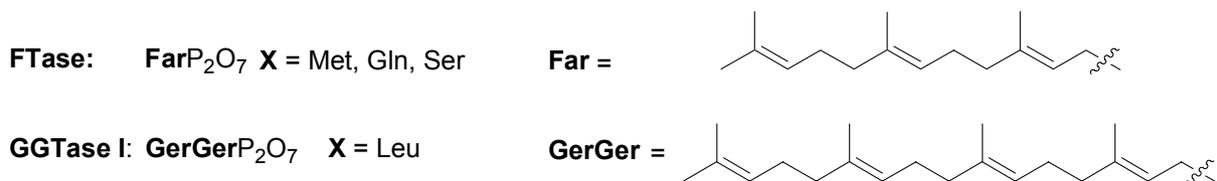
2.2 Inhibition der Farnesyltransferase

Bei der intrazellulären Signalübertragung spielen eine Reihe von membrangebundenen Proteinen eine entscheidende Rolle, denen zentrale Schlüsselfunktionen bei der Regulation von Zellwachstum, -teilung und -proliferation zugewiesen werden.^[26] Bei einigen der Wichtigsten dieser molekularen Schalter handelt es sich um Proteine der Ras-Superfamilie.

Von dem Hauptvertreter Ras sind die vier Varianten H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B bekannt.^[27] Mutationen in den zugehörigen Genen, ausgewiesenen Onkogenen, können zu irreversiblen Ras-Fehlfunktionen führen, wodurch permanent Wachstumssignale generiert werden und damit unkontrolliertes Zell-Wachstum und Tumorbildung die Folge sein können. Dementsprechend findet man in ca. 30% aller menschlichen Tumore Ras-Mutationen. Bei den Hauptkrebsarten wie Darm-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs liegt die Mutationsrate sogar bei bis zu 80%, wobei hier K-Ras4B-Defekte vorherrschend sind.^[27] Aufgrund der Tatsache, dass erst eine posttranslationale Lipidmodifizierung die Membranverankerung und damit die volle biologische Aktivität von Ras ermöglicht,^[5, 28, 29] wird die Verhinderung der Ras-Prenylierung als neue Strategie in der Tumorthherapie angesehen.^[5, 30-32] Diese Lipidierung wird katalysiert durch das heterodimere Enzym Farnesyltransferase (FTase), ein aus zwei Untereinheiten bestehendes 94 kDa großes Protein, welches Zink und Magnesium für seine Aktivität benötigt.^[33] Mittels der FTase wird der Farnesylrest eines Farnesylpyrophosphats (FPP) auf das Cystein einer endständigen CAAX-Erkennungs-Sequenz des Proteins übertragen. (Schema 2)



C = Cys **A** = aliph. Aminosäure **Transferase**: FTase oder GGTase I **Lipid**: Far oder GerGer



Schema 2: Farnesylierung und GeranylGeranylierung von Signalproteinen durch Farnesyltransferase (FTase) und Geranylgeranyltransferase I (GGTase I)

C steht für Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für Methionin, Serin oder Glutamin. Hierbei erkennt das Enzym sowohl Farnesylrest und Phosphatgruppe des FPP-Substrats, als auch die CAAX-Endsequenz von Ras oder anderer Signalproteine. Nach diesem Prinzip fungieren auch mit FTase verwandte Enzyme wie die GeranylGeranyltransferase I (GGTase I),^[34] die den Transfer eines GeranylGeranyl-Rests auf Proteine, wie z.B. diejenigen der Rho-Familie,^[35] katalysiert. Auch in diesem Fall kommt als Selektivitätsmerkmal eine

CAAX-Sequenz des jeweiligen Proteins zum Tragen, wobei im Gegensatz zur FTase an der Position X die Aminosäure Leucin^[36] eingebaut ist (Schema 2).

Der Bindungsmodus der Substrate im aktiven Zentrum der FTase konnte durch Kristallstrukturen von kristallisierten Komplexen aus FTase, FPP- und einem CAAX-Mimetikum, ermittelt werden (Abbildung 1).^[37, 38] Der lipophile Farnesylrest (schwarz) kleidet eine hydrophobe Tasche, gebildet aus aromatischen Resten, aus, während das Pyrophosphat (unten, im Vordergrund) mit einem polaren Bereich (unten, im Vordergrund) wechselwirkt. Demgegenüber bindet das C-terminale Carboxylat von CVFM an basischen Aminosäureresten eines hydrophilen FTase-Kompartiments (rechts oben) und der aromatische Rest von Aminosäure A² in eine hydrophobe Tasche. Durch Bindung des Cystein-Thiols (links, mittig), als Thiolat,^[39] an das zentrale Zink-Ion (kugelförmig, teilweise verdeckt) wird diese Funktionalität aktiviert und in unmittelbare Nähe zum Pyrophosphat gebracht. Im Verlauf der Farnesylierungsreaktion substituiert das Thiolat-Nucleophil die Pyrophosphatgruppe und bildet die C-S-Bindung aus, wobei ein Übergangszustand durchlaufen wird, an welchem das Zink-Ion direkt beteiligt ist.^[40] Die Freisetzung des Produktes gilt als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.^[41]

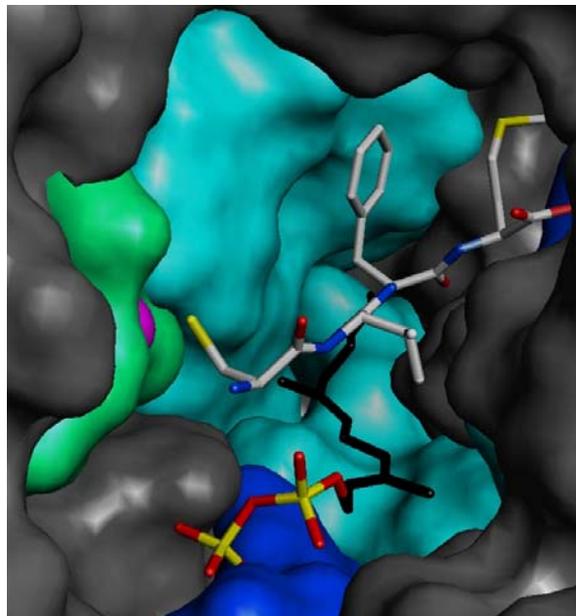


Abbildung 1: Bindung von Farnesylpyrophosphat und CAAX-Mimetikum (CVFM-Peptid) im aktiven Zentrum der Farnesyltransferase

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden sowohl von akademischer als auch von industrieller Seite intensive Forschungsaktivitäten unternommen, wirksame FTase-Inhibitoren

zu entwickeln und deren Effekte *in vitro* und *in vivo* aufzuklären.^[9] ^[30, 42] Diese Arbeiten führten zu einer Reihe von hocheffizienten Inhibitoren der FTase mit Aktivitäten im einstelligen nanomolaren bis teilweise sub-nanomolaren Bereich. Ferner konnte hohe Selektivität gegenüber anderen Prenyltransferasen wie der GGTase I erzielt werden. Nach kurzer Zeit wurden die ersten Kandidaten präklinischen und darauffolgend klinischen Studien unterzogen. Tatsächlich zeigen diese Substanzen im Tierversuch ausgeprägte Anti-Tumor-Wirkung: Tumorstatische Effekte oder Tumorregression. Überraschenderweise wurden keine nennenswerten Nebenwirkungen festgestellt, was einen immensen Fortschritt im Bereich der Krebstherapeutika bedeutet. Zurzeit befinden sich mindestens sechs verschiedene Kandidaten in fortgeschrittenen klinischen Phasen.^[43] Gewisse Resultate erscheinen vielversprechend^[9, 42]: vor allem in Kombination mit bereits etablierten Tumorthapeutika ist die Anwendung von FTase-Inhibitoren äußerst erfolgreich,^[32] endgültige Ergebnisse bleiben jedoch noch abzuwarten.

Parallel zu den klinischen Studien wurden die möglichen Wirkungswege der FTase-Inhibitoren untersucht. Die insgesamt beobachteten Effekte sind nicht einheitlich und hängen von dem jeweiligen Wirkstoff, der betrachteten Tumorzelllinie und dem Charakter der entsprechenden Mutation ab.^[9] Die Hemmung des Tumorwachstums wird auf den Stopp des Zellcyclus in der G0/G1 oder G2/M-Phase zurückgeführt, kann aber auch ohne Beeinflussung des Zell-Cyclus ablaufen.^[44] Die festgestellte Tumorregression soll eine Folge von ausgelöster Apoptose sein.^[9] Als Erklärung wird die mögliche Beeinflussung des Phosphoinositid-3/AKT2-Signalwegs angesehen,^[45, 46] worauf zwar einige Befunde hindeuten, endgültige Klarheit besteht jedoch nicht. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass Inhibitoren der GGTase I ebenfalls Tumorwachstum hemmen und Apoptose auslösen können, aber analog zu den FTase-Inhibitoren die Wirkungsweise unverstanden ist.^[47-49] Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zu den ursprünglichen Annahmen, die beobachteten Effekte nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Ras-Lipidierung stehen.^[31, 50, 51] Es gibt Hinweise, dass die festgestellten Wirkungen durch die Hemmung der Farnesylierung des Proteins Rho B ausgelöst werden, einem Signalprotein, welches u. a. Zelleigenschaften wie Adhäsion, Transkription und Überleben der Zelle regelt.^[50] Andere Erkenntnisse sprechen jedoch gegen diese Theorie.^[52]

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist trotz des wahrscheinlichen Erfolgs der FTase-Inhibitoren als faktisch nebenwirkungsfreie Tumorthapeutika unklar, welche Zielproteine von ihrer Wirkung betroffen sind und welche Mechanismen schließlich zu den Effekten Cellcyclus-Blockade und Apoptose führen.

2.3 Entwicklung von Farnesyltransferase-Inhibitoren

Der Ausgangspunkt für die Entwicklung von FTase-Inhibitoren war die CVIM-Endsequenz von K-Ras **1** (Abbildung 2).^[53] Durch Variation der Aminosäuren fand man nach kurzer Zeit heraus, dass es sich bei den Tetrapeptid CVFM **2** um einen effizienten FTase-Inhibitor handelt, der selbst nicht farnesyliert wird.^[54] Tetrapeptide, die aromatische Reste an Position A² aufweisen wie CVYM und CVWM zeigen vergleichbare Inhibitionseigenschaften. Das Cystein ist für die Wirkung essentiell, während das endständige Methionin nicht unerlässlich ist, aber unter den getesteten Aminosäurebausteinen die besten Ergebnisse lieferte. Über das Cystein wird eine starke Bindung zum Zink-Ion der FTase erreicht,^[37] durch das Methionin eine Bindung in eine polare Tasche^[38], durch welche Selektivität gegenüber anderen Prenyltransferasen wie GGTase erzielt wird. Der aromatische Rest des Phenylalanins bewirkt eine starke hydrophobe Wechselwirkung mit aromatischen Gruppen im aktiven Zentrum^[38] (vergleiche hierzu Abbildung 1). Dementsprechend wurden in der ersten Inhibitorgeneration diese Strukturelemente konserviert, während das Peptidrückgrat durch Mimetika weitgehend ersetzt wurde (Beispielverbindungen **3-6**, **7** und **9**, Abbildung 2)^[55-58]. Die Methylester **4** und **6** zeigen im Vergleich zu den freien Säuren **3** und **5** *in vitro* geringere Inhibitionswirkung gegenüber FTase, in zellulären Testsystemen wirken die Ester aber als Prodrugs mit besser Membrangängigkeit und werden in der Zelle zu **3** und **5** hydrolysiert.^[55, 56] Da NMR-Studien^[59], obwohl umstritten^[38], dafür sprechen, dass bei der Farnesylierungsreaktion das Tetrapeptid in einer β -Turn-Konformation vorliegt, wurden gezielt Turnmimetika-Strukturen wie **5**, **6** und **7** eingesetzt.^[56, 57]

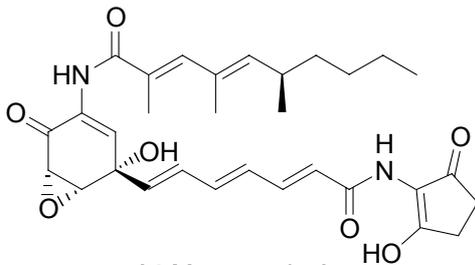
In den nachfolgenden Optimierungsschritten konnte das C-terminale Methionin erfolgreich durch aromatische Substituenten ersetzt werden (Verbindungen **9** und **10**), während die in pharmakologischer Hinsicht problematische Thiol-Funktion gegen einen ebenfalls Zink-bindenden Imidazol-Rest ausgetauscht wurde (**8**, **10**).^[57, 58]

Die in diesem Forschungsgebiet dominierenden industriellen Arbeitsgruppen nutzten neben den bereits beschriebenen rationalen Ansätzen in hohem Maße die kombinatorische Chemie und das Hoch-Durchsatz-Screening großer Substanzbibliotheken zur Suche nach leistungsfähigen FTase-Inhibitoren. Diese Vorgehensweise sorgte für einen Entwicklungsschub und brachte hocheffiziente Inhibitoren wie **11**^[60, 61], **12**^[62] und **13**^[63] hervor. Während bei Verbindung **12** noch das rationale Konzept erkennbar ist, weisen die Produkte aus Substanzbibliothek-Screening, **11** und **13**, nahezu keine strukturellen Gemeinsamkeit mit den Tetrapeptid **2** auf, was eindrucksvoll das Potential der kombinatorischen Chemie belegt. Interessant

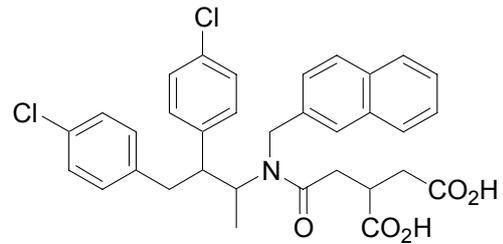
Bei den Verbindungen **11-13** handelt es sich um hochselektive FTase-Inhibitoren, die Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen und beträchtliche Anti-Tumor-Effekte aufweisen. Sie gehören zu den aussichtsreichsten Entwicklungskandidaten, die zur Zeit die klinischen Testphasen durchlaufen.^[42, 64] (siehe auch Kapitel 2.2)

Neben diesen ausschließlich kompetitiv gegenüber dem Peptid- bzw. Proteinsubstrat fungierenden Inhibitoren sind auch Verbindungen bekannt, die selektiv die Farnesyl-Bindungstasche blockieren.^[30, 42, 64] Inhibitoren auf der Basis von modifizierten Prenylketten kam keine besondere Bedeutung zu, aufgrund möglicher unselektiver Wirkung gegenüber Enzymen wie der Squalensynthetase. Einige komplexere FPP-Mimetika haben jedoch durchaus gewisses Interesse erlangt. Hierzu gehört der Naturstoff Manumycin A **14**^[65], der neben der FTase das Wachstum K-Ras-transformierter Zellen hemmt (Abbildung 3). Screening von Substanzbibliotheken lieferte das Pentapeptid **16**^[66] und die Verbindung **15**^[67]. Optimierung der jeweiligen Leitstruktur führte zu dem verkürzten Peptoid **18**^[68] und der erheblich hydrophileren Substanz **17**^[67]. Im Gegensatz zu den Ausgangssubstanzen zeigen **17** und **18** beträchtliche, selektive FTase-Inhibition in Zell-Systemen und weisen signifikante tumorstatische Effekte auf.

Neben den bisher erwähnten Inhibitoren mit kompetitiver Wirkung gegenüber einem Substrat, beschäftigen sich einige Forschungsgruppen mit Bisubstrat-Inhibitoren, Verbindungen die sowohl das Protein als auch das Farnesyl-Substrat imitieren. Derartige Verbindungen sollten besonders selektiv sein, dennoch sind hierzu nur wenige Beispiele bekannt. Bei den ersten Inhibitoren dieser Klasse wurde ein Farnesylrest über eine geeignete Brücke mit einem AAX-Tripeptid verknüpft. Neben der hohen *in vitro* Aktivität zeichnen sich die Verbindungen **19**^[69] und **21**^[70] vor allem durch hohe Selektivität gegenüber der GGTase aus, der Methylester von **21** zeigte zelluläre FTase-Inhibition und blockierte Ras-induzierte Zelltransformation. Trotz dieser vielversprechenden Resultate wurde die weitere Entwicklung wegen ungünstiger pharmakologischer Eigenschaften eingestellt. Bei den Verbindungen **20** und **22** soll es sich um weitere Bisubstratinhibitoren handeln, wofür Modelling-Studien sprechen.^[71] *p*-Benzyloxycinnamoyl- und Palmitoylrest scheinen die Lipid-Komponente und das Peptidmimetikum die CAAX-Gruppe zu repräsentieren. Ein ähnlicher Bindungsmodus dürfte bei dem Naturstoff Pepticcinnamin E **23**^[72-74] vorliegen. Bei diesem Bisubstratinhibitor sollten die drei zentralen Aminosäuren und das Diketopiperazin die CAAX-Box imitieren, während der Pentenylzimtsäurerest der Farnesylkette entspricht. Aufgrund des modularen Aufbaus der Verbindungen **20**, **22** und **23** sollten diese als interessante Ausgangspunkte für Wirkstoffoptimierung durch kombinatorische Chemie dienen können.



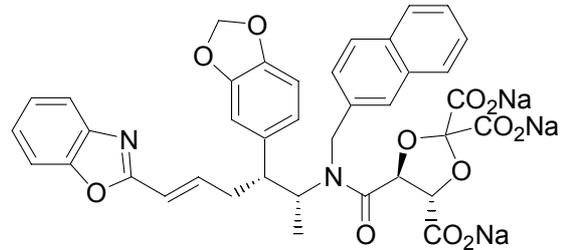
14 Manumycin A
 $IC_{50} = 5 \mu M$



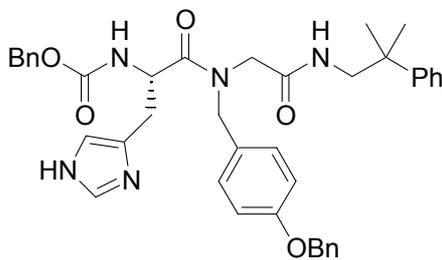
15 $IC_{50} = 3 \mu M$

Cbz-His-Tyr(OBn)-Ser(OBn)-Trp-Ala-CONH₂

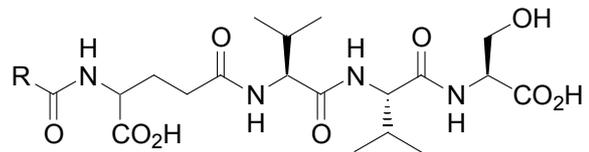
16 PD083176
 $IC_{50} = 20 \text{ nM}$



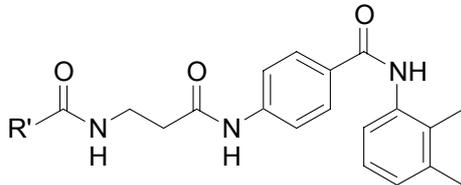
17 $IC_{50} = 5 \text{ nM}$

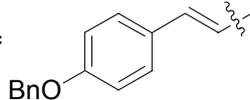


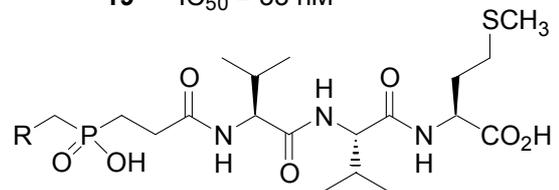
18 $IC_{50} = 4 \text{ nM}$



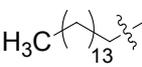
19 $IC_{50} = 33 \text{ nM}$

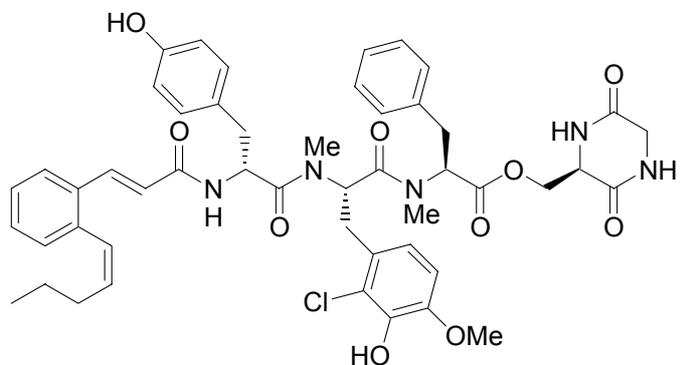
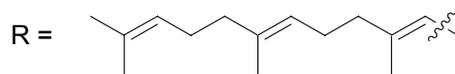


20 R' = 
 $IC_{50} = 8 \mu M$



21 $IC_{50} = 6 \text{ nM}$

22 R' = 
 $IC_{50} = 6 \mu M$



23 Pepticcinnamin E
 $IC_{50} = 42 \mu M$

Abbildung 3: Farnesyltransferase-Inhibitoren (FPP-Mimetika oder Bisubstrat-Analoga)

2.4 Kombinatorische Festphasensynthese

Seit Einführung der Festphasensynthese im Jahre 1963^[75] wurde dieses Konzept fortwährend weiterentwickelt und hat die Synthesechemie revolutioniert. Diese Technik wurde ursprünglich zum Aufbau von Peptiden geplant und hat damit der Synthese von Biopolymeren neue Möglichkeiten eröffnet^[76-80]. Eindrucksvolle Synthesebeispiele ganzer Proteine^[81] belegen das Potential der Festphasensynthese, gezielt langkettige, klar definierte Produkte aufzubauen. Erst später, in den 80er Jahren, wurde die Festphase als Methode zur Parallelsynthese einer größeren Anzahl von Verbindungen erkannt. Dieses Konzept war eng mit der Idee der kombinatorischen Chemie verbunden, die Ende der 80er Jahre begründet wurde.^[82, 83] Hierbei steht nicht mehr die Synthese einer einzelnen Verbindung im Vordergrund, sondern der parallele Aufbau einer sogenannten „Substanzbibliothek“, welche aus einigen dutzend bis zu mehreren hunderttausend Verbindungen bestehen kann.^[84, 85]

Die Anwendung der Kombinatorik liegt neben der Material- und Katalyseforschung vor allem in der Wirkstoffsuche und -optimierung, als Teil einer modernen medizinisch-chemischen Strategie, die Entwicklung von Medikamenten zu beschleunigen.^[86] In den Anfangszeiten wurden umfangreiche Bibliotheken, bestehend aus Gemischen von mehreren Millionen Verbindungen, hergestellt. Da aber der Vorteil der schnellen Synthese und Evaluierung in vielen Fällen durch zeitaufwendige Dekonvolvierung und verfälschende Misch-Effekte aufgehoben wird, geht der Trend in der Kombinatorischen Chemie in Richtung deutlich kleinerer Bibliotheken^[87] bzw. zur Parallelsynthese von reinen, definierten Verbindungen.^[88] Der grundlegende Vorteil der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung liegt in der Vermeidung arbeits- und zeitintensiver Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte, die bei jeder Lösungssynthese anfallen.^[86, 89, 90] Nach der Umsetzung am polymeren Träger lassen sich die Reagenzien leicht durch Waschen entfernen, so dass die Verwendung großer Reagenzüberschüsse möglich wird, durch welche vollständige Umsetzungen erreicht werden können. Reaktions- und Reinigungsschritte sind automatisierbar. Eine wichtige Grundvoraussetzung für diese Arbeitsweise sind aber möglichst vollständige Umsetzungen und das Ausbleiben von Nebenreaktionen, die letztendlich zu unlöslichen Reinigungsproblemen führen können. Diese Erfordernisse machen die sorgfältige Ausarbeitung und Optimierung der jeweiligen Syntheseschritte notwendig.^[91]

2.5 Screening von Substanzbibliotheken

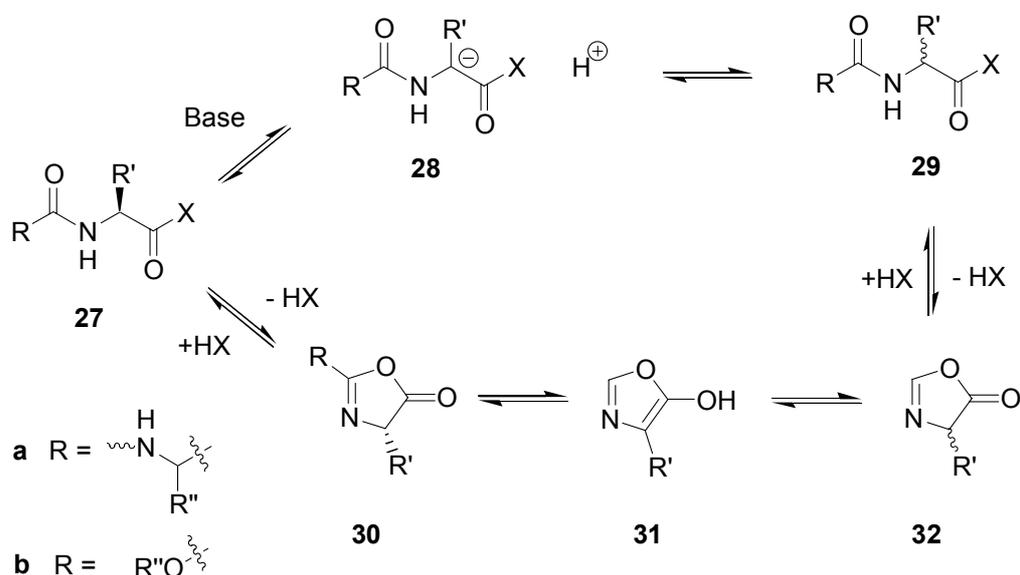
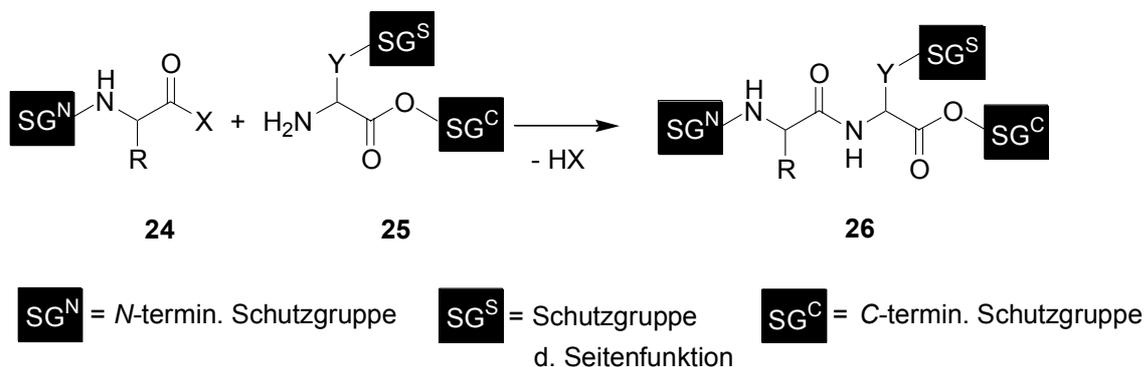
Die steigende Leistungsfähigkeit auf dem Gebiet der kombinatorischen Synthese kann jedoch nur schwer mit den Fortschritten im Bereich der Screening-Technik konkurrieren. Die Testsysteme arbeiten hier ebenfalls im Parallelverfahren, üblicherweise im 384er Mikrotiterplattenformat, wobei der Trend in Richtung Miniaturisierung auf kleinere Formate geht.^[88] Die leistungsfähigsten Hoch-Durchsatz-Assays können über 100.000 Verbindungen pro Tag testen. Eine Vielzahl von Bioassays wurde entwickelt, die auf Effekte gegenüber Rezeptoren, Enzymen oder Zellsystemen abzielen.^[88] Beim Screening sind zwei Fälle zu unterscheiden: Der Test von Mischungsbibliotheken und Bibliotheken reiner Substanzen. Die Evaluierung von Mischungsbibliotheken wird im Verlauf der Leitstruktursuche angewendet, da sie mit wenig Arbeitsaufwand durch einen einzigen Test-Ansatz Aussagen über Wirkungseigenschaften in einer größeren Gruppe von Substanzen machen kann. Neben der aufwendigen Dekonvolvierung bei positiven Ergebnissen haben die Aussagen meist nur qualitativen Charakter. Bei der Leitstrukturoptimierung sind Parallel-Assays einzelner, definierter Verbindungen wirkungsvoller.^[86] Trotz des höheren Arbeitsaufwands sind hier vergleichbare Testbedingungen erreichbar und die Möglichkeit gegeben, quantitative Aussagen einschließlich Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erhalten.^[88]

2.6 Peptidsynthese in Lösung und an der Festphase^[79, 92, 93]

Die Synthese von Peptiden und somit die Amidknüpfung allgemein gilt als eine der am höchsten entwickelten Reaktionen in Lösung und an der festen Phase.^[94] Hierbei erfolgt die Kupplung einer an der Carboxyl-Funktion aktivierten Aminosäure **24** mit der Aminofunktion der Komponente **25** zum Peptid **26**, wobei die nicht an der Reaktion beteiligten Funktionen, im allgemeinen auch die Aminosäureseitengruppen, blockiert vorliegen müssen (Schema 3). Dennoch werden nicht in allen Fällen optimale Ergebnisse erzielt: Neben unvollständig verlaufenden Kupplungen und spezifischen Nebenreaktionen bestimmter Aminosäuren^[79, 95] gilt die Racemisierung der aktivierten Komponente als das Hauptproblem der Peptidsynthese.^[93] Diese unerwünschten Effekte sind in erheblichem Maße abhängig von dem jeweiligen Aminosäurebaustein und der entsprechenden Sequenzabfolge.^[79]

Racemisierung der aktivierten Aminosäure **27** (Schema 3) erfolgt zum einen durch direkte basenkatalysierte De- und Reprotonierung an der α -Carbonyl-Funktion, welche zu D/L-

Gemischen **29** führt und besonders häufig bei Histidin und Cystein auftritt.^[95] Diesem Problem kann durch Verwendung sterisch anspruchsvoller Basen begegnet werden.^[96]



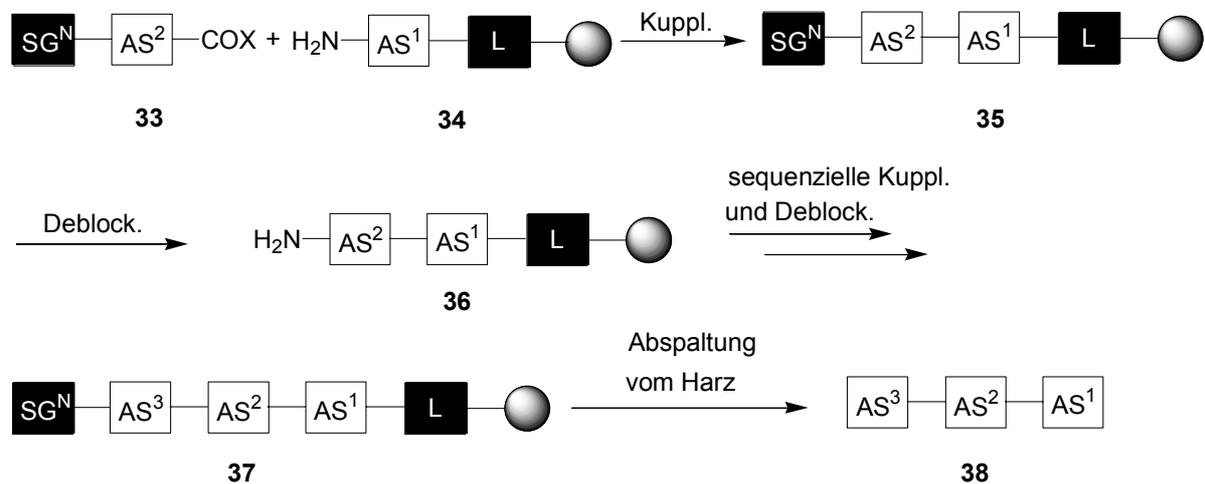
Schema 3: Peptidkupplung und Mechanismen der Racemisierung

Als Hauptmechanismus der Racemisierung wird die Cyclisierung der aktivierten Aminosäure **27** zu einem Oxazolone **30** angenommen, welches zum Aromaten **31** tautomerisieren kann. Re-protonierung führt schließlich zum D/L-Gemisch **32**, das sich zu **29** öffnen lässt. Diese Reaktion tritt verstärkt bei acyliertem Stickstoffatom auf (**27a**), demgegenüber wird bei Urethangeschützten Verbindungen (**27b**) die Oxazolonebildung bzw. deren Enolisierung unterdrückt.

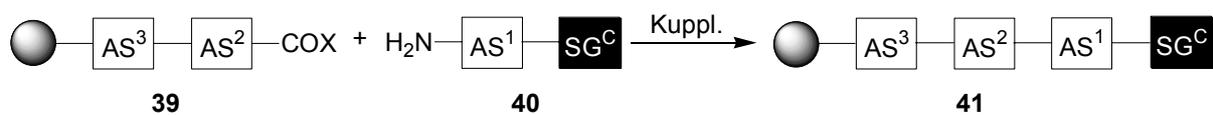
Dementsprechend wird als Strategie zum Aufbau von Peptiden an der festen Phase bevorzugt die N-terminale Verlängerung gewählt (Schema 4): Die erste Aminosäure (AS^1) ist über den C-Terminus via einer Linkergruppe an den polymeren Träger geknüpft. Der nächste Baustein

33 wird nun an am *N*-terminus von **34** angehängt. Hierbei kann die aktivierte Komponente **33** stets durch eine geeignete Urethanschutzgruppe SG^N vor der Racemisierung und anderen Nebenreaktionen geschützt werden.

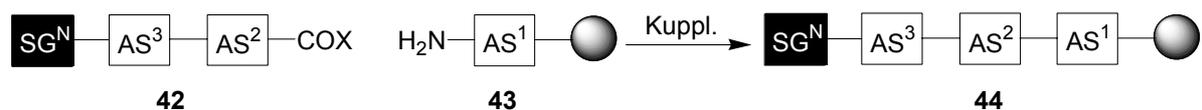
N-terminale schrittweise Verknüpfung



C-terminale schrittweise Verknüpfung



N-terminale Segmentverknüpfung:



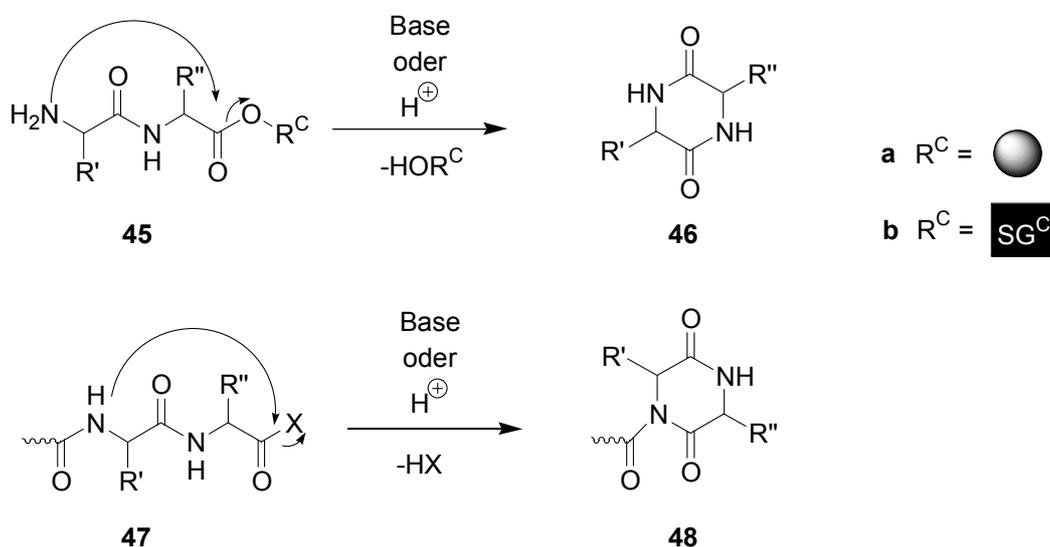
Schema 4: Strategien zur Festphasenpeptidsynthese

Nach Deblockierung wird an die freie Aminofunktion von **36** der nächste Baustein gekuppelt. Dem Kettenaufbau durch sequenzielle Kupplungs- und Entschützungsstufen zum gewünschten, festphasengebundenem Zielpeptid **37** folgt dann in der Regel die simultane Abspaltung vom Linker und der Schutzgruppen (*N*-terminal und gegebenenfalls Seitengruppen) zum Zielpeptid **38** (Schema 4).

Zur Festphasensynthese von *C*-terminal-substituierten Verbindungen mit peptidischen Partialstrukturen ist oftmals die inverse, *C*-terminale Verlängerung durch Anknüpfung der

Amino-Komponente **40** an ein Peptidfragment **39** erforderlich, wobei der Urethanschut an der aktivierten Aminosäure (AS²) der Kette **39** ausgeschlossen ist und deshalb beträchtliche Racemisierungsgefahr gegeben ist (Schema 4). Offensichtlich sind aus diesem Grund nur wenige aktuelle Beispiele dieses Verlängerungstyps bekannt.^[97, 98] Die „urethanfreie“ Kupplung findet jedoch in der Festphasensegmentverknüpfung von aktivierten Peptiden **42** mit der polymergebundenen Kette **43** zu **44** Anwendung und dementsprechend sind geeignete Methoden ausgearbeitet worden (Schema 4).^[99, 100]

Eine unangenehme Nebenreaktion der *N*-terminalen Verlängerung ist die Cyclisierung von Dipeptiden **45** zu Diketopiperazinen **46** (Schema 5).^[79, 95, 101] Diese säure- und basenkatalysierte Reaktion kann während der Deblockierung oder im nachfolgenden Kupplungsschritt auftreten, wobei bestimmte Sequenzabfolgen deren Bildung begünstigen.^[79, 95]



Schema 5: Mechanismen der Diketopiperazin-Bildung

Sofern nicht sterisch stark abschirmende Carboxyl-Maskierungsgruppen SG^{C} bzw. Festphasenlinker L vom *tert*-Butyl oder Triphenylmethyl (Trityl)-Typ^[102] verwendet werden, sind zur Vermeidung kurze Entschützungszeiten und sorgfältig kontrollierte Reaktionsbedingungen empfohlen.^[79, 101]

Die Diketopiperazinbildung ist auch bei der Kupplung in *C*-terminaler Richtung bekannt.^[97] Hierbei fällt der Amidstickstoff der vorletzten Aminosäure von **47** in die aktivierte Carbonylfunktion, schließt den Ring zu **48** und beendet damit die Sequenz (Schema 5). Zur Unterdrückung dieser Nebenreaktion sind ebenfalls besondere Kupplungsbedingungen und Reagenzien erforderlich.^[98]

2.7 Kupplungsreagenzien^[93, 101]

Bei der Knüpfung einer Amidbindung ausgehend von Carbonsäure und Amin handelt es sich um einen Zwei-Schritt-Prozess. Zuerst ist eine geeignete Aktivierung der Carboxyl-Funktion von **49** erforderlich, dann erfolgt der eigentliche Kupplungsvorgang der aktivierten Säure **50** mit der Aminokomponente **51** zu **52**. (Schema 6)

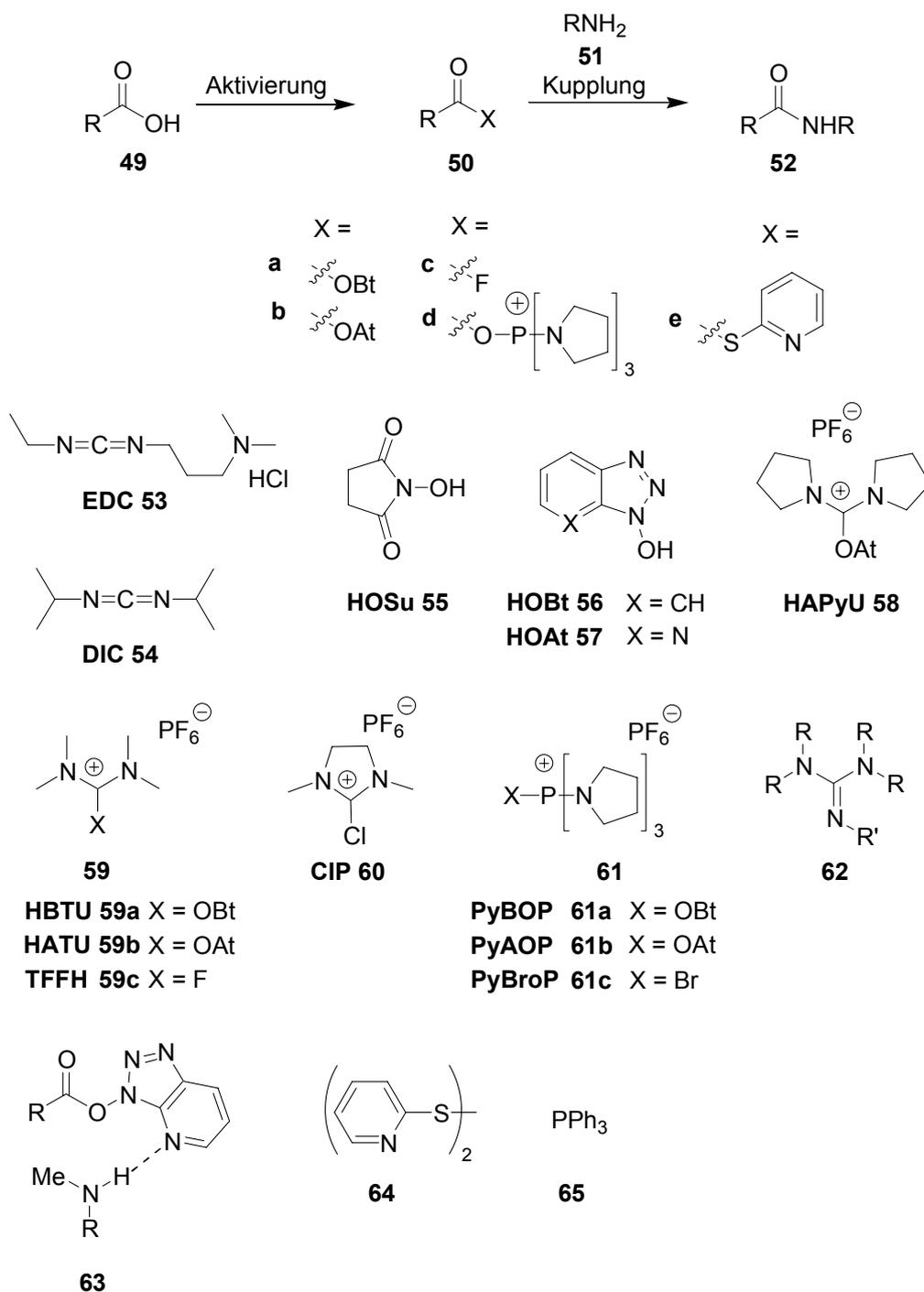
Während nach wie vor dieses klassische Umsetzungsprinzip verfolgt wird, sind in den letzten Jahren, vor allem im Rahmen der fortschreitenden Weiterentwicklung der Festphasen-peptidsynthese, eine Reihe von bewährten Methoden optimiert und neue Kupplungsreagenzien entwickelt worden, um Synthese-Effizienz zu steigern und Nebenreaktionen wie z. B. Racemisierung zu minimieren.^[101, 102]

Die Kombination von Carbodiimiden **53** und **54**^[103] mit Additiven wie HOSu^[104, 105] **55**, HOBt^[106, 107] **56**, sowie der Neuentwicklung HOAt^[108] **57**, finden häufige Anwendung, vor allem in der Lösungssynthese. Hier erweist sich EDC **53** aufgrund der Wasserlöslichkeit und damit leichten Abtrennbarkeit des gebildeten Urethan-Produkts durch Ausschütteln als vorteilhaft. Wegen der guten Löslichkeit seines Urethans in DMF eignet sich DIC **54** besonders für die Synthese am polymeren Träger.^[103] Carbodiimide weisen den Vorteil auf, dass bei der Kupplung keine Hilfsbasen verwendet werden müssen. Hinsichtlich der Festphasensynthese haben Aminium- **58**, **59**, **60** und Phosphoniumsalze **61** als Kupplungsreagenzien die größte Bedeutung erlangt und ihre höhere Effizienz im Vergleich zu Carbodiimiden belegt.^[101] Bei den Aminiumsalzen **58**, **59** und **60** ist jedoch zu beachten, dass diese irreversibel mit der Aminokomponente **51** zu Guanidinen **62** reagieren können.^[109, 110] Deshalb sind Überschüsse des Reagenzes bezüglich der Carbonsäure **49** zu vermeiden und die Säureaktivierung in Abwesenheit von **51** durchzuführen. Kupplungen mit Aminium- und Phosphonium-Salzen erfordern die Verwendung von 1-2 Äquivalenten Hilfsbasen, die in bestimmten Fällen zu Racemisierung führen können (Schema 6).^[101]

Ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Kupplungsausbeute ist neben der Qualität des Kupplungsreagenzes der Charakter der gebildeten aktiven Carbonsäure-Species **50**. Die Verwendung einer DIC/HOBt-Kombination oder HOBt-enthaltenden Reagenzien wie HBTU^[111] **59a** oder PyBOP^[112] **61a** führen zu einem Benzotriazol-Aktiv-Ester **50a**, der die Carbonsäure-Komponente hinsichtlich Racemisierung stabilisiert^[107] und im Regelfall für eine effiziente Festphasen-Kupplung sorgt.

Bei problematischen Sequenzen und sterisch anspruchsvollen Komponenten wie *N*-methylierten Aminosäuren und α,α Dialkyl-Aminosäuren versagen OBt-Ester **50a** jedoch häufig.^[101] In diesen Fällen sind OAt-Ester **50b** eine geeignete Aktiv-Komponente. Der

zusätzliche Stickstoff in 7-Position des aromatischen Systems übt einen Nachbargruppen-Effekt aus und bewirkt damit Koordination und Aktivierung des Amin-Nucleophils im Übergangszustand **63** der Kupplung. HOAt **57** läßt sich mittels DIC/HOAt oder CIP/HOAt^[113] sowie HATU^[114, 115] **59b**, HAPyU^[114, 115] **58** oder PyAOP^[116] **61b** einführen. Zusätzliches Additiv **57** zum Reagenz kann in bestimmten Fällen die Kupplungseffizienz weiter erhöhen.^[101]



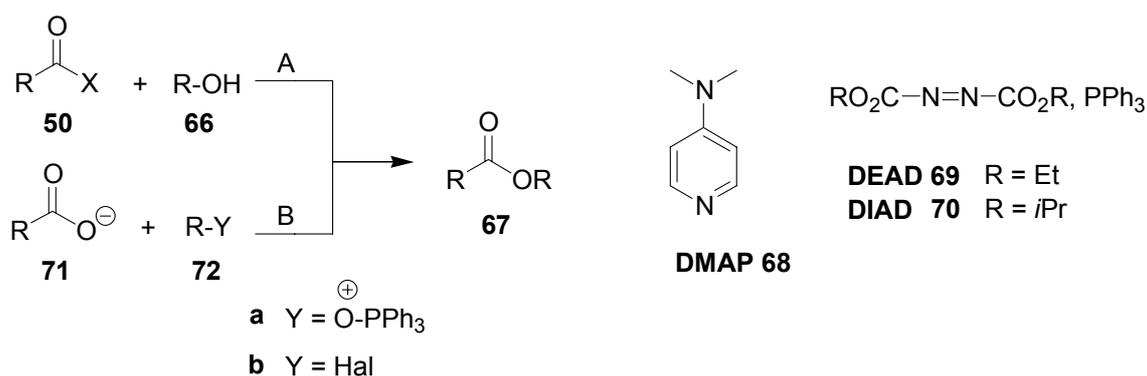
Schema 6: Klassische und moderne Peptidkupplungsreagenzien

Zur Kupplung *N*-methylierter Aminosäuren wird weiterhin PyBroP^[117] **61c** empfohlen, welches ein unsymmetrisches Anhydrid **50d** mit der Säure ausbildet, ebenso TFFH^[118, 119] **59c**, welches hochaktive Säurefluoride **50c** generiert.

Mit der Mukayama-Redox-Kondensation^[120] wird eine alternative Kupplungsmethode beschrieben, die für *C*-terminale Peptidverlängerungen geeignet sein soll. Umsetzung der Carbonsäure mit Dipyridyldisulfid **64** und Triphenylphosphin **65** führt unter Reduktion des Disulfids und Oxidation des Triphenylphosphins zum Thioaktivester **50e**.

Bei der Kupplung von Aminen mit α,β -ungesättigten Carbonsäuren zu den entsprechenden Amidien handelt es sich ebenfalls um eine mit Problemen behaftete Reaktion. Zwar entfällt hier die Racemisierungsgefahr, durch die Konjugation erweist sich die Carboxyl-Funktion als wenig reaktiv und schlechte Ausbeuten und Nebenreaktionen können die Folge sein.^[121] Bei diesem speziellen Carbonsäuretyp werden die besten Ergebnisse durch Verwendung von Reagenzien erzielt, die auf Phosphorsäureestern basieren.^[121, 122]

Die Verknüpfung von Alkoholen **66** mit Carbonsäuren zu den entsprechenden Estern **67** folgt generell dem für Amide beschriebenen Prinzip (Weg A, Schema 7), nur ist hier DMAP^[123] **68** als Katalysator notwendig. Ungünstigerweise führt die Anwendung dieser Base bei Aminosäuren häufig zu beträchtlicher Racemisierung.^[124]



Schema 7: Varianten der Veresterung

Alternativ hierzu lässt sich das Reaktionsprinzip invertieren (Weg B, Schema 7), indem man die Hydroxy-Funktion in eine Abgangsgruppe und somit den Alkohol-Rest in ein Elektrophil umwandelt. Durch Deprotonierung wird aus der Säure das Carboxylat **71** gebildet, welches als Nucleophil fungiert. Diesem Mechanismus (Weg B) folgt die Mitsunobu Reaktion^[125], bei

der die Carbonsäurefunktion von **49** durch das DEAD **66**-oder DIAD-Reagenz **67** zu **71** deprotoniert wird, während die Hydroxyfunktion des Alkoholbausteins **66** durch Reaktion mit dem Triphenylphosphin zu einer Fluchtgruppe wird und die elektrophile Species **72a** generiert wird. Zu dem gleichen Ergebnis kommt man, indem man **49** in das Cäsium-Salz von **71** umwandelt und mit einem geeigneten Halogenid **72b** alkyliert.^[126]

2.8 Linker und Schutzgruppen für die Festphasensynthese^[127, 128]

Ein kritischer Schritt bei der Planung der Festphasensynthese ist die Wahl des Linkers, d. h. der Verbrückung des ersten Bausteins zum polymeren Träger.^[127, 128] Von den Eigenschaften dieser Gruppierung hängen alle weiteren Reaktionsschritte ab. Vergleichbar mit einer permanenten Schutzgruppe, muss er gegenüber den Umsetzungsbedingungen stabil sein und nach Abschluss der Synthese die reibungslose Abspaltung der Produkte ermöglichen. Zu den bedeutendsten und vielseitig anwendbaren Linkern gehören der Wang-Linker^[129] **73**, sowie Chlortrityl- und Trityl-Linker **74**, welche für eine Vielzahl von Funktionalitäten wie Säuren, Amide, Hydroxamsäuren, Alkohole, Phenole, Thiole und im Falle von **74** auch für Amine geeignet sind. Diese Ankergruppen zeichnen sich durch Säurelabilität aus, das Abspaltungsprinzip, das am häufigsten Anwendung findet und als am weitesten ausgereift gilt (Abbildung 4).^[128] Die saure Abspaltung beruht weitgehend auf der Stabilität eines Benzyl- bzw. Trityl-Kations, welche wahlweise durch Methoxy-Gruppen erhöht und von Chlorsubstituenten gesenkt werden kann, wodurch die Säurelabilität jeweils erhöht bzw. gesenkt wird. Die Abspaltung wird durch Abfangen dieser Kationen mit Nucleophilen begünstigt (siehe weiter unten). Je nach Funktionalität sind zwischen 1-50%ige TFA-Lösungen zur Abspaltung erforderlich. Eine weitere gebräuchliche, ausschließlich für Alkohole entwickelte und an die DHP-Schutzgruppe angelehnte, Ankergruppe ist der sogenannte Ellman-Linker^[130] **75**, der sich ebenso für Phenole eignet^[131] und unter sauren Bedingungen abgespalten werden kann.

Als Permanentschutzgruppen^[132, 133] der Aminosäure-Seitengruppenfunktionen^[79, 93] bieten sich säurelabile Gruppen an, die unter leicht bis mäßig sauren Bedingungen am Ende der Festphasensynthese gleichzeitig mit einer ebenfalls säureempfindlichen Linkergruppierung abspaltbar sind.^[134] Hier hat sich für Alkohole und Phenole vor allem die *tert*-Butyl-Gruppe **76** ausgezeichnet, sowie für Amine die Trityl- **77** und *tert*-Butoxycarbonyl-(Boc) Gruppe **78**. Ein großer Vorteil dieser Maskierungsstrategie ist die Verwendungsmöglichkeit von Trifluoressigsäure (TFA) als Abspaltreagenz, welches leicht im Vakuum entfernt werden kann und deshalb keinen zusätzlichen Abtrennungsaufwand erfordert.

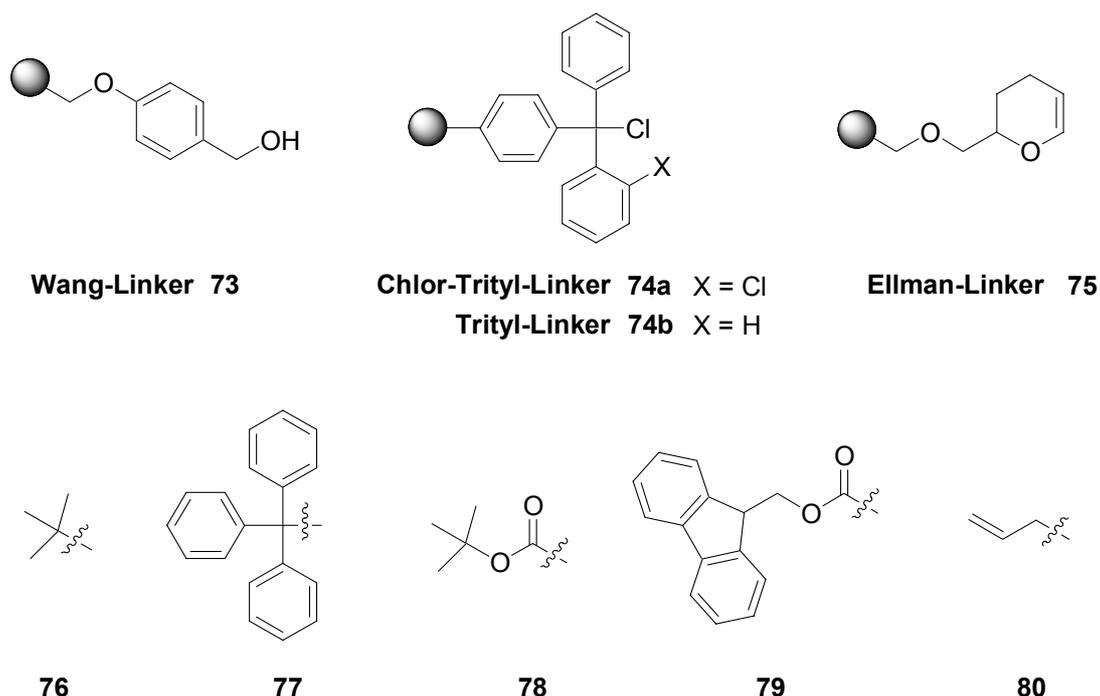


Abbildung 4: Linker und Schutzgruppen für die Festphasensynthese

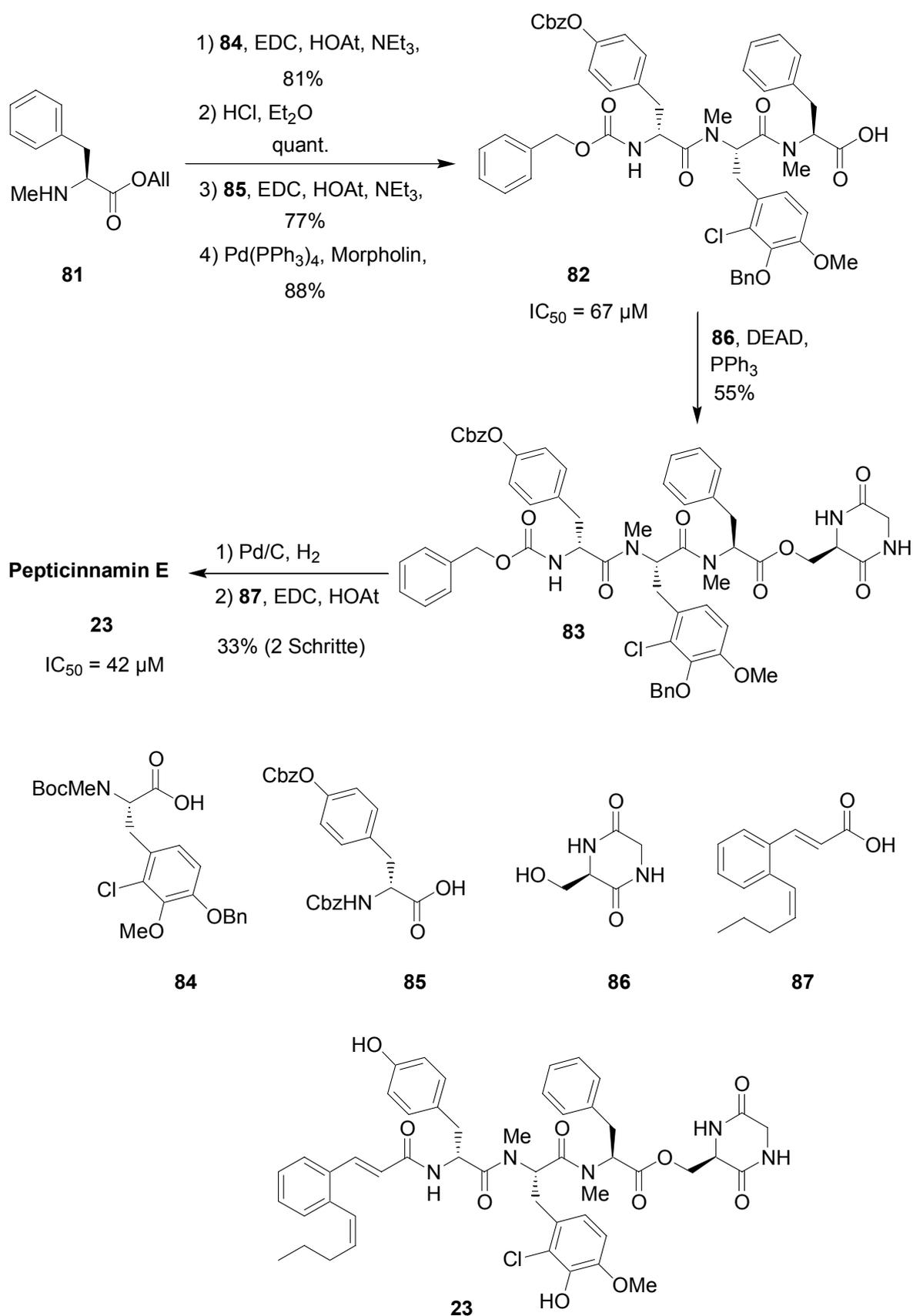
Wegen der drohenden Readdition und anderen Nebenreaktionen der bei der Abspaltreaktion gebildeten Kationen werden diese häufig mit geeigneten Reagenzien abgefangen. Hierzu werden neben Wasser und Alkoholen hocheffiziente Silane als Hydridendonoren und S-Nucleophile in Form von Thioethern und Mercaptanen verwendet.^[128, 134]

Als temporäre *N*-terminale Schutzgruppe hat sich neben der sauer spaltbaren Boc-Gruppe **78** vor allem das 9-Fluorenylmethoxycarbonylurethan (Fmoc)^[135] **79** etabliert.^[79, 93] Letzteres, im basischen Milieu deblockierbares Carbamat, bietet den Vorteil, dass aufgrund seiner chromophoren Eigenschaften UV-spektroskopische Analyse und damit quantitative Aussagen über Beladung und Reaktionsverlauf möglich sind.^[99, 126, 136] Desweiteren ermöglicht Fmoc im Vergleich zu Boc eine weitaus größere Auswahl an orthogonalen Schutzgruppen und Linkern.

Als temporäre Schutzgruppe für *C*-terminale Verlängerung wurde der Allylester^[137] erfolgreich eingesetzt.^[98] Die Allylgruppe **80** läßt sich mit Hilfe von katalytischen Mengen eines Pd⁰-Komplexes und einem geeigneten Allyl-Fänger-Reagenz unter wahlweise neutralen oder leicht basischen Bedingungen entfernen und bietet somit absolute Orthogonalität zu den gebräuchlichen säure- und baselabilen Maskierungsgruppen und Anker.^[138]

2.9 Synthese von Pepticinnamin E

Der dieser Arbeit zugrundeliegende Naturstoff Pepticinnamin E, ursprünglich isoliert aus Streptomyceten Stämmen^[72, 73], war bereits auf synthetischem Weg erhalten worden^[74, 139]. Bei der Totalsynthese^[139] zeigte sich, dass zum erfolgreichen Aufbau die Abfolge der einzelnen Verknüpfungsschritte eine entscheidende Rolle spielt. Ausgehend vom Phenylalanin **81** wurde schrittweise das Tripeptid durch *N*-terminale Verlängerung aufgebaut, wobei das Boc-Urethan als temporäre Stickstoff-Schutzgruppe diente, welche sauer entfernt wurde und zur Anknüpfung der Bausteine **84** und **85** das Carbodiimid EDC und das Additiv HOAt Verwendung fanden (Schema 8). Die Entschützung der *C*-terminalen Allylesterschutzgruppe lieferte das Tripeptidfragment **82** an welches der Diketopiperazinbaustein **86** durch Mitsunobu-Reaktion angeknüpft wurde. Diverse alternative Veresterungsmethoden scheiterten hier. Nach Deblockierung der Schutzgruppen vom Benzyloxycarbonyl- und Benzyl-Typ durch Hydrogenolyse wurde der Naturstoff **23** durch Anbindung des Pentenyl-Zimtsäurederivats **87** vervollständigt. Während die gesamten Schutzgruppen-Deblockierungsschritte und der Tripeptidaufbau durchgehend hohe bis sehr hohe Ausbeuten lieferten, waren die Anknüpfungen des Zimtsäurederivats und des Diketopiperazins nur mit moderaten Ausbeuten von 33 und 55 % möglich. Mit der Synthese konnte die L-Konfiguration des DOPA-Derivats belegt werden, welche sich als elementar für die biologische Aktivität erwies. Weitere biologische Untersuchungen^[74, 139] des Naturstoffs und von Zwischenprodukten zeigten, dass größere Strukturvariationen am Naturstoff toleriert werden. So scheinen die exakte Substitution an den aromatischen Seitenketten, die lipophile Pentenyl-Kette am *N*-terminalen Baustein, sowie das Diketopiperazin nicht unbedingt erforderlich, wie der Vergleich der biologischen Aktivität von **23** und **82** zeigt.



Schema 8: Synthese des Naturstoffs Pepticinnamin E

3. Ziel der Arbeit

Im Verlauf der Entwicklung von Farnesyltransferase-Inhibitoren als potentiell nebenwirkungsfreie Tumorthapeutika wurden bisher vielversprechende Resultate erzielt.^[30, 42] Trotzdem ist die exakte Wirkungsweise dieser Wirkstoffklasse noch weitgehend unklar, lediglich die Auslösung von Apoptose gilt bei einer Vielzahl der Kandidaten als gesichert.^[9] Essentiell für eine Etablierung und einen Ausbau dieses neuen Therapieansatzes ist das Auffinden des molekularen Angriffspunktes. Aufgrund widersprüchlicher Effekte sind sogar mehrere Zielproteine der Signalkaskade wahrscheinlich.^[9] In diesem Zusammenhang sind Verbindungen von Interesse, die die Farnesyltransferase (FTase) aufgrund verschiedener Wirkmechanismen inhibieren.^[140] In dieser Hinsicht wertvolle Verbindungen könnten Analoga des Naturstoffs Pepticinnamin E **23** sein (Abbildung 5), der als Bisubstratinhibitor fungiert und somit das Wirkspektrum der vorhandenen FTase-inhibitoren ideal ergänzt (siehe hierzu Kapitel 2.3).

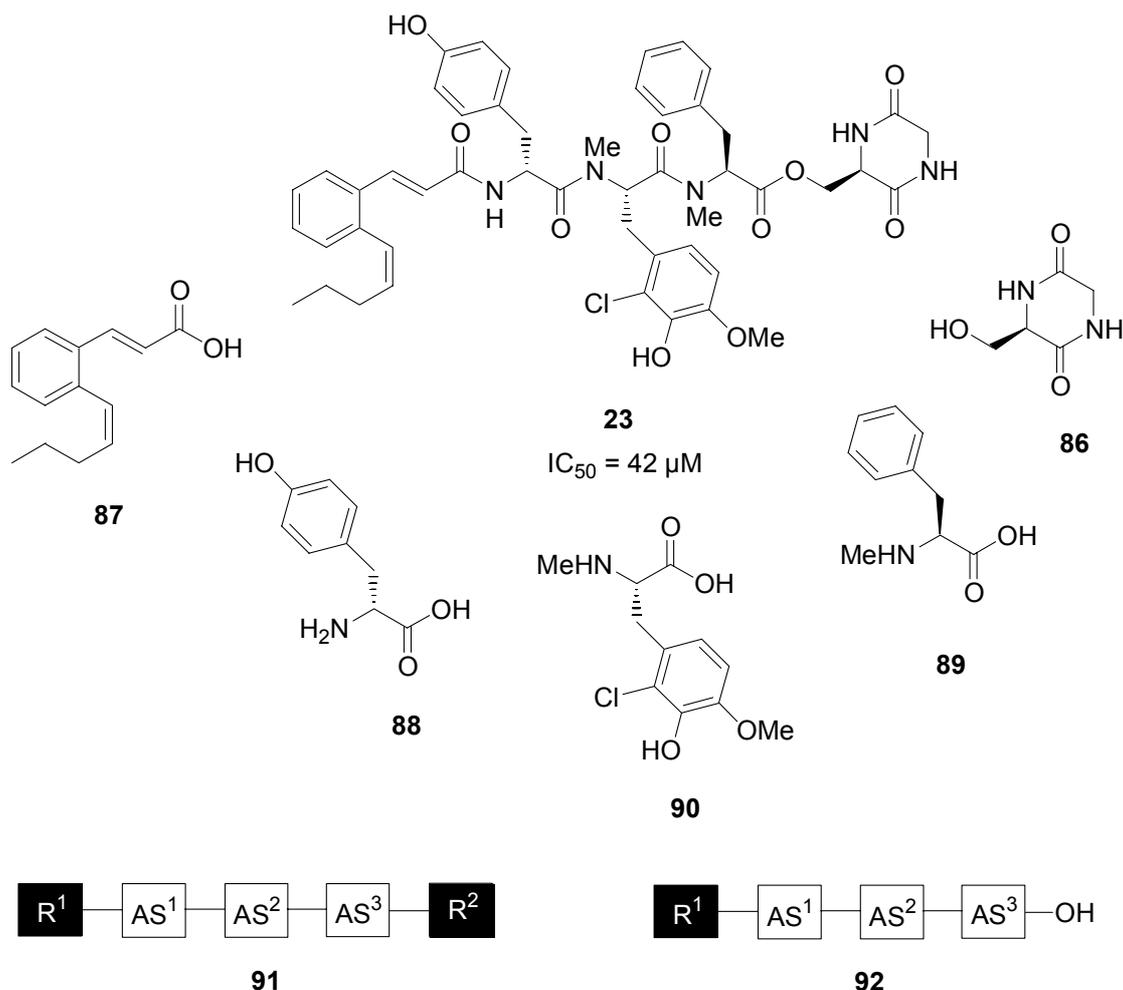


Abbildung 5: Der Bisubstratinhibitor Pepticinnamin E **23** und seine Komponenten

Mit seiner moderaten Aktivität im zweistelligen mikromolaren Bereich stellt Pepticcinnamin E einen interessanten Ausgangspunkt dar, durch Strukturvariation die Inhibitionseigenschaften hinsichtlich Aktivität und Selektivität zu verbessern. Durch seinen modularen Aufbau aus den drei zentralen aromatischen Aminosäuren **88-90**, der lipophilen Pentenylzimtsäure **87** und dem polaren Diketopiperazin **86** bietet Pepticcinnamin E beste Voraussetzungen für eine Wirkstoffoptimierung durch kombinatorische Chemie (Abbildung 5).

Aufgrund der peptidischen Struktur lässt sich zur kombinatorischen Variation auf einen großen Pool an Aminosäurebausteinen zurückgreifen, wodurch hohe Diversität^[86] ermöglicht wird. Ferner ist die Knüpfung der erforderlichen Amid- und Esterbindungen gut an polymeren Trägern durchführbar,^[94] was eine Automatisierung der Synthese erschließt. Aufgrund der *D*-Konfiguration des Tyrosins und der *N*-Methylierung der weiteren Aminosäuren sollte diese Verbindung im Gegensatz zu gewöhnlichen Peptiden Stabilität gegenüber peptidspaltenden Enzymen zeigen,^[141] und damit ihre Einsetzbarkeit in zellulären Assays erhöhen. Die *N*-Methylierung bewirkt zusätzlich eine konformative Restriktion des Peptid-Rückgrats,^[141] was sich im Allgemeinen vorteilhaft in Bezug auf effektive Inhibition auswirkt. Die Erkenntnis, dass größere strukturelle Abwandlungen ohne bedeutenden Aktivitätsverlust toleriert werden (siehe Kapitel 2.9), schien einen breiten Variationsspielraum zu geben.

Somit war das Ziel dieser Arbeit, eine kombinatorische Festphasensynthese von Pepticcinnamin E-Analoga zu entwickeln. Auf der Basis dieser Synthese sollte eine Bibliothek von Analoga des Naturstoffs als potentielle Farnesyltransferase-Inhibitoren aufgebaut werden. Das Ziel waren Pentamere **91**, Derivate des Naturstoffs **23** und Tetramere **92**, die sich von Verbindung **82** (Kapitel 2.9) ableiten, wobei alle Bausteine breit variiert werden sollten. Hierzu war ein parallelsynthetischer Ansatz geplant, der reine, definierte Verbindungen liefern sollte. Dem synthetischen Teil sollten sich dann weitreichende biologische Studien anschließen. Es war vorgesehen, die dargestellten Verbindungen in einem *in vitro*-Inhibitions-Assay gegen FTase zu testen, wobei die Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen eine wirkungsvolle Leitstrukturoptimierung gewährleisten sollte. Kinetische Studien sollten Auskunft über den Wirkmechanismus der effektivsten Inhibitoren geben. Hinsichtlich Selektivität waren auch Tests gegenüber anderen Prenyltransferasen wie der GGTase geplant. Zur Evaluierung der potentiellen Wirkung auf zelluläre Targets sollten transformierte Zell-Linien mit charakteristischen Mutationen der Ras-Signalkaskade herangezogen werden. Die vorliegende Arbeit hat hinsichtlich der Suche nach den biologischen Zielproteinen vorwiegend orientierenden Charakter und soll die Basis für spätere intensivere Arbeiten in diese Richtung bilden.

4. Spezieller Teil

4.1 Grundlegende Planungen zur kombinatorischen Festphasensynthese

Die bei der Totalsynthese des Naturstoffs^[74] gemachten Erfahrungen bildeten die Grundlage für die geplante Analoga-Synthese an der Festphase. Da die bei der Naturstoffsynthese verwendeten Schutzgruppen- und Synthesestrategien nicht unmittelbar auf Umsetzungen am polymeren Träger übertragbar waren, und auch wenig kombinatorische Perspektiven boten, war eine diese Faktoren berücksichtigende Neuplanung der Synthese erforderlich. Hier musste sowohl den Erfordernissen der Festphasensynthese Rechnung getragen werden als auch eine breite Variationsmöglichkeit der Bausteine einbezogen werden. Die Anknüpfung an den polymeren Träger sollte über eine phenolische Tyrosin-Seitenfunktion erfolgen und wegen der generell schwierigen Verknüpfung des ersten Bausteins mit dem polymeren Träger^[128], sollte dieses Modul **93X** stets konstant gehalten werden, während die übrigen Fragmente breit und unabhängig voneinander variiert werden sollten (Abbildung 6). Als Verbrückung zum Polymer sollte ein säurelabiler Linker dienen, der mit Trifluoressigsäure problemlos spaltbar ist. Hier konnte auf den Ellman-Linker **E**^[130] zugegriffen werden, an dem schon erste Anknüpfungen und Umsetzungen durchgeführt worden waren^[142]. Als alternative Ankergruppen boten sich die für Phenole etablierten Wang- **W** und Trityl-Linker **T** an.^[127, 128] Als polymerer Träger fiel die Wahl auf das bewährte Merrifield-Harz (Polystyrolmatrix mit 1% Divinylbenzol copolymerisiert), das Standard-Harz zum Aufbau kurzer Peptide.^[128]

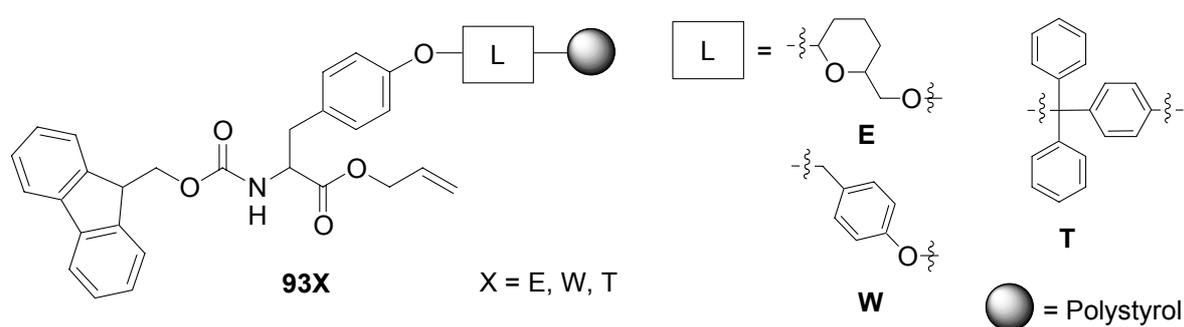
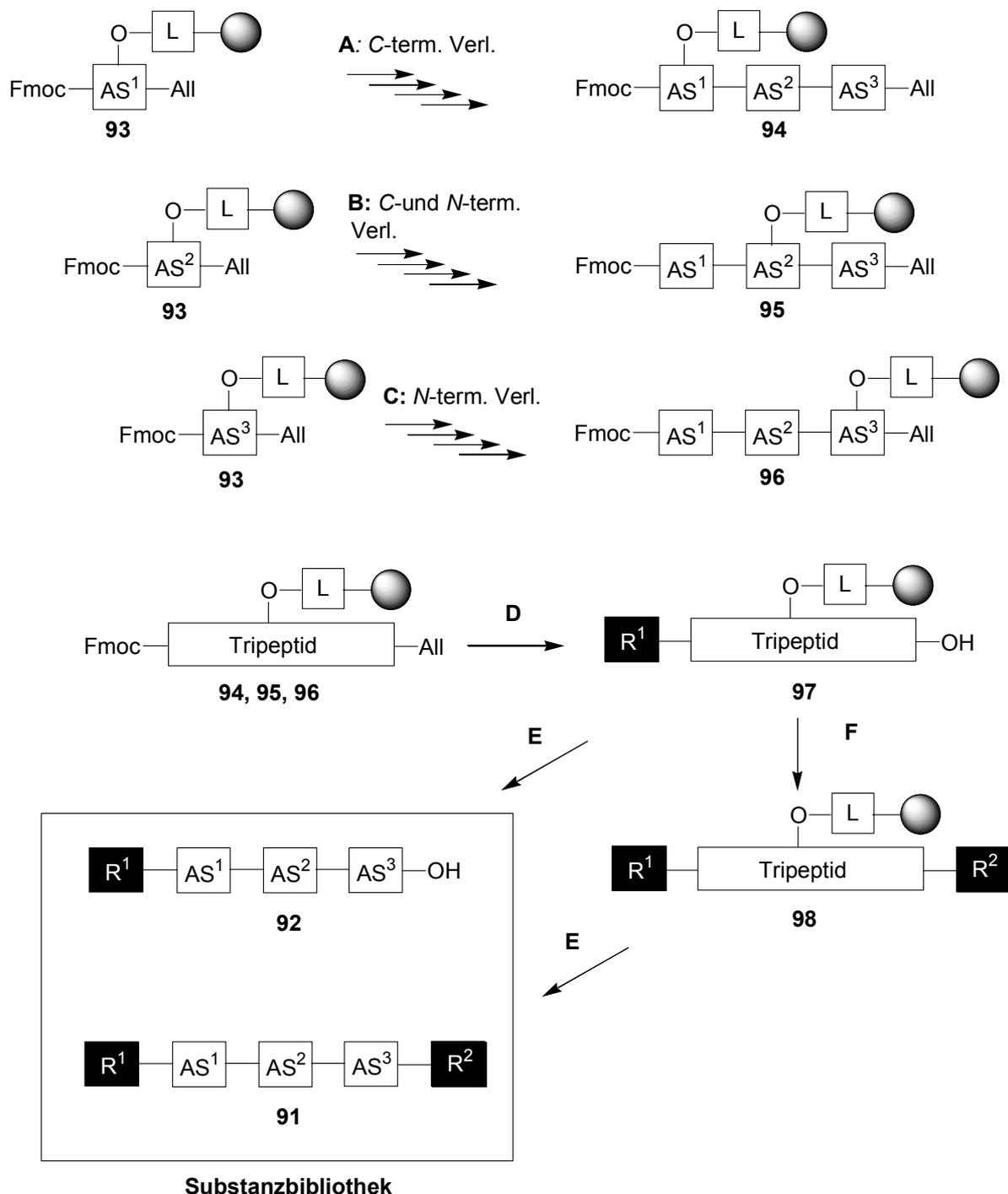


Abbildung 6: Unterschiedliche Verbrückungsvarianten des Bausteins **93X**

Es war geplant, die Seitenfunktionen und sonstigen funktionellen Gruppen der Bausteine, die an den Kupplungen nicht beteiligt sind, mit TFA-labilen Permanent-Schutzgruppen zu versehen. Als temporäre Amino-Schutzgruppe sollte das mit Piperidin spaltbare Fmoc-Urethan dienen. Zum Schutz der Carbonsäure sollte der Allylester Anwendung finden, der unter Pd⁰-

Katalyse deblockiert werden kann. Durch Verwendung von Phenylsilan oder *N*-Methylanilin als Allylfänger^[138] werden neutrale bzw. schwach basische Abspaltungsbedingungen erreicht, die Orthogonalität zu den übrigen Linker- und Schutzgruppen herstellen (Abbildung 6).



Schema 9: Geplante Festphasensynthese zum Aufbau einer Substanzbibliothek

Um alle Fragmente variieren zu können, war geplant, an den drei Aminosäure-Positionen AS¹, AS² und AS³ in drei unterschiedlichen Ansätzen von jeweils festphasengebundenem

Tyrosin **93** ausgehend, die zentrale Tripeptideinheit schrittweise aufzubauen (Schema 9). Somit würde sich in jeder der dargestellten Verbindungen mindestens eine aromatische Gruppe befinden, ein Strukturelement, welches in einem Großteil der in Kapitel 2.3 beschriebenen FTase-Inhibitoren vorkommt. Ausgehend von den drei Startpunkten AS¹, AS² und AS³ sollen über *C*-terminale (Weg A), *N*-terminale (Weg C) und eine Kombination von *C*-und-*N*-terminaler (Weg B) Verlängerung, durch sequenzielle Deblockierungs- und Kupplungsschritte die Tripeptide **94**, **95** und **96** aufgebaut werden. Nach Freisetzung des *N*-Terminus des jeweiligen Fragments würde der lipophile Rest R¹ angeknüpft, gefolgt von Allylesterspaltung zu **97** (Weg D). Diese, zur Naturstoffsynthese inverse Reihenfolge ermöglicht nach Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Gruppe eine spätere Anknüpfung von R² unter stark basischen Bedingungen. *N*-acylierte Tripeptide **92** könnten als Analoga von **82** (Schema 8, Kapitel 2.9) auf dieser Stufe vom Harz abgelöst werden (Weg E, Schema 9). Zum Aufbau der naturstoffanalogen Pentamerstruktur **98** würden durch *C*-terminale Veresterung und Amidknüpfung die Reste R² angeknüpft (Schema 9).

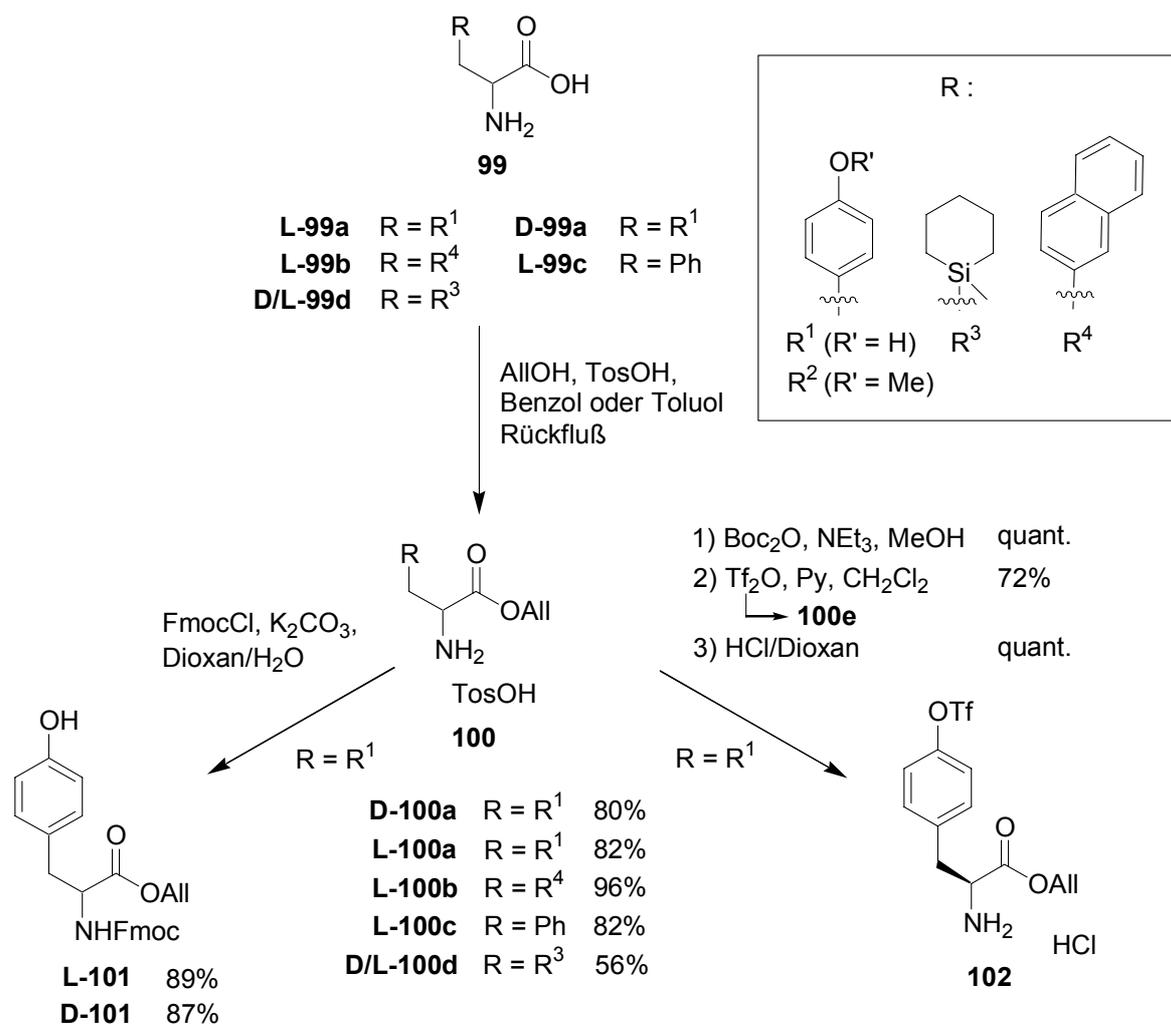
Finale Spaltung vom Harz durch Säurebehandlung, die gleichzeitig die Permanentschutzgruppen ablösen sollte, und Reinigung der Produkte, würde die gewünschte Substanz-Bibliothek, bestehend aus den Verbindungen vom Typ **91** und **92** liefern.

4.2 Anknüpfung des ersten Bausteins

4.2.1 Synthese der Aminosäurebausteine

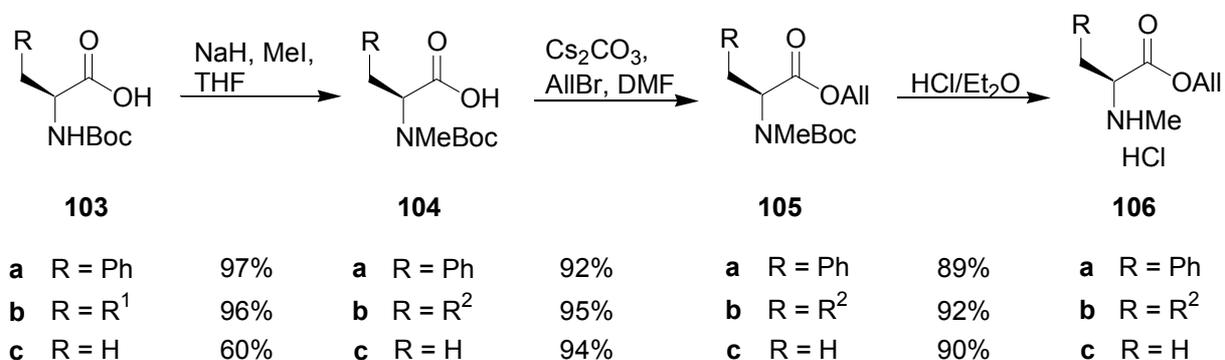
Die Darstellung der Aminosäureallylester-Hydrosylat-Bausteine **100** gemäß Standardbedingungen^[137] ausgehend von den entsprechenden Aminosäuren **99** verlief problemlos, mit Ausnahme der Silyl-Aminosäure **100d**, deren moderate Ausbeute auf ungenügende Löslichkeit zurückzuführen ist (Schema 10). Fmoc-Schützungen beider Enantiomere von **100a** lieferte die Verbindungen **L-101** und **D-101**, die zentralen Module für die phenolische Festphasenverankerung. Das in drei Schritten aus **L-100a** zugängliche Aminosäureallylester-Hydrochlorid **102** sollte nach Einbau in das Peptid aufgrund seiner Triflat-Gruppe Pd-katalysierte C-C-Verknüpfungen und damit diversitätserhöhende Seitenkettenmodifikationen an der festen Phase erlauben.^[143, 144]

Die *N*-methylierten Aminosäuren **104** waren ausgehend von den Boc-geschützten Vorläufern **103** durch Alkylierung gemäß einer Variante^[142] von Benoiton et al.^[145] zugänglich, wobei im Gegensatz zur Vorschrift^[142] nur durch einen hohen Überschuß von 8-9 Äquivalenten Methyljodid eine vollständige Reaktion erreicht werden konnte (Schema 11).

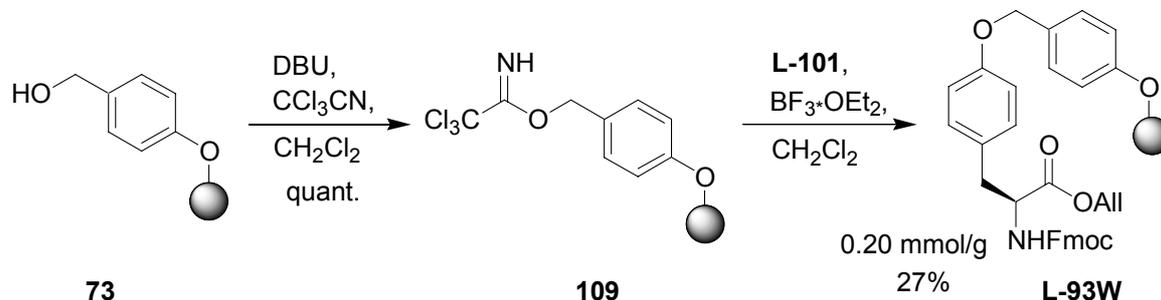


Schema 10: Darstellung der Bausteine für die Festphasensynthese

Im Fall von **103b** erfolgte zusätzlich, wie geplant, die Methylierung der phenolischen Seitenfunktion zu **104b**. Blockierung der Carboxyl-Gruppe als Allylester **105** und nachfolgende saure Entschützung des Boc-Urethans führten zu den Kupplungs-Komponenten **106**.

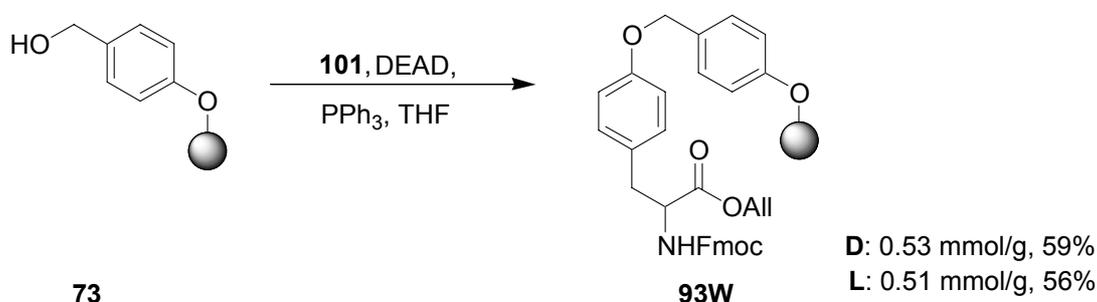
Schema 11: Synthese der *N*-methylierten Synthesebausteine **106**

der Anknüpfung einschließlich Nebenprodukten führte, lieferte die Lewis-Säure BF_3 -Diethyletherat ein sauberes Anknüpfungsprodukt **L-93W**, jedoch nur mit einer Beladung von 0.20 mmol/g, entsprechend 27%.



Schema 13: Anknüpfung von **L-101** an den Wang-Linker via Trichloracetimidat-Methode

Eine zu diesem Zeitpunkt veröffentlichte Arbeit beschreibt die Anknüpfung des zu **101** analogen Fmoc-Tyrosinmethylesters mittels Mitsunobu Reaktion.^[151] Unter diesen Bedingungen konnten mit DEAD und PPh_3 in THF ein akzeptables Resultat (0.53 mmol/g Beladung, 59% Ausbeute) erzielt werden (Schema 14), wobei der in der Literatur beschriebene Wert^[151] (0.23 mmol/g, 24%) deutlich übertroffen wird.

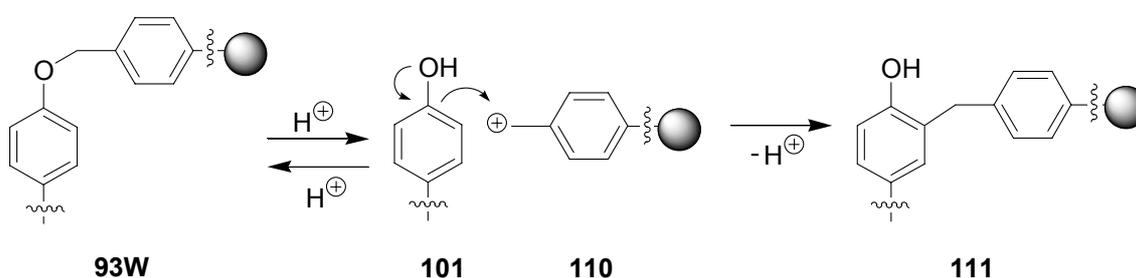


Schema 14: Anknüpfung des Tyrosinbausteins **101** via Mitsunobu-Reaktion

Bei dieser mehrfach durchgeführten Reaktion wurde festgestellt, dass die jeweils erreichte Anknüpfungsausbeute im besonderen Maße vom polymeren Träger abhängig ist und je nach Hersteller und Produktionscharge in ungünstigen Fällen bei 40-45% liegen kann. Die Kombination DIAD/PPh_3 lieferte gegenüber DEAD/PPh_3 vergleichbare Ergebnisse, während PPh_3 sich dem als reaktiver geltenden $\text{P}(n\text{-Bu})_3$ ^[152] überlegen erwies.

4.2.3 Abspaltung vom polymeren Träger

Erste Versuche zur sauren Abspaltung der gebundenen Bausteine **101** von **93E** und **93W** zeigten laut Bestimmung der verbliebenen Fmoc-Menge am Harz, dass die Behandlung mit einem Gemisch von TFA/H₂O 95:5 für 1.5 h zur vollständigen Ablösung vom THP-Linker bei **93E** führt, dass im gleichen Zeitraum bei **93W** die Ablösung jedoch nur 60% beträgt, die auch durch längere Umsetzungsdauer nicht erhöht, sondern sogar noch leicht gesenkt wurde. Dieser Befund spricht für eine Readdition des abgespaltenen Tyrosinbausteins **101** an das Benzyl-Kation **110** unter stark sauren Bedingungen, welche durch Alkylierung der aromatischen 3- oder 5-Position zu **111** auf irreversible Weise erfolgen kann (Schema 15).^[95]



Schema 15: Mechanismus der irreversiblen Readdition von Tyrosin an den Wang-Linker

Durch wiederholte Umsetzungen mit TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50:45:5) für kurze Reaktionszeiten konnte die Rückreaktion teilweise zurückgedrängt und die Abspaltungsrate auf bis zu 75% gesteigert werden, während sowohl mit 50 als auch 90%igen TFA-Lösungen durch Zusatz von 5% der Kationen-Fänger-Reagenzien TES und TIPS über 80% Abspaltung erzielt werden konnte. Die besten Abspaltungsergebnisse von über 90% lieferte die Umsetzung mit 90% TFA, 5% Wasser und 5% Zusatz der schwefelhaltigen Fänger Ethandithiol (EDT), Ethanthiol, oder Ethylmethylsulfid (EMS). Die Verwendung oben genannter Fängerreagenzien bietet sich ferner zur Erleichterung der Abspaltung von säurelabilen Schutzgruppen an, deren Kationen ebenfalls readdieren und alkylierend wirken können.^[134]

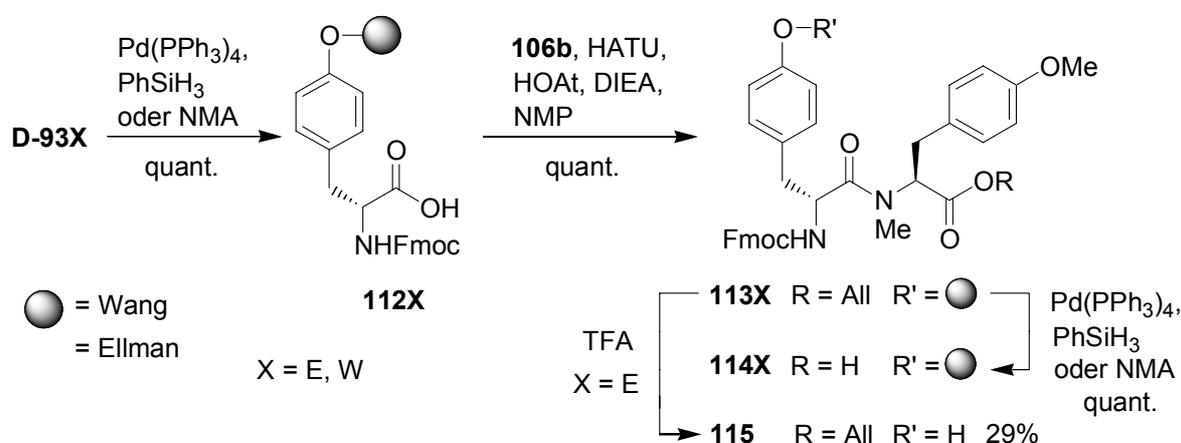
Bei der Prüfung der Säurestabilität der Linker von **93E** und **93W** zeigte sich, dass trotz der zur Abspaltung angegebenen Säurekonzentrationen von 10%-95% (Ellman) bzw. 50%-95% (Wang),^[127, 128] schon bei unter 1% bzw. bei 2-3 % TFA merkliche Spaltung beobachtbar ist, die sich im Falle des Wang-Linkers jedoch nicht für präparative Abspaltung eignet, so dass die oben angegebenen, relativ hohen Abspaltkonzentrationen, durchaus ihre Berechtigung haben. Aufgrund der hohen Säurelabilität von **93E** wurden in den nachfolgenden Reaktionen

die Deblockierungs- und Kupplungsreaktionen stets unter basischen Bedingungen durchgeführt.

4.3 Synthese der Tripeptideinheit

4.3.1 Aufbau durch C-terminale Verlängerung

Zuerst wurde der Aufbau der Tripeptideinheit durch C-terminale Verlängerung ausgehend von Aminosäureposition AS¹ (Schema 9) angegangen, über welche das Naturstoffgrundgerüst zugänglich sein sollte. Pd-vermittelte Allylester-Deblockierung des sowohl via Ellman- als auch Wang-Harz gebundenen Tyrosins **D-93X** lieferte die freie Säure **112X** (Schema 16). Beste Garantien für einen vollständigen Umsatz waren das Entgasen des Lösungsmittels, vorzugsweise THF, das Arbeiten unter Schutzgas und die Verwendung von 10-20 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium. Sowohl Phenylsilan als auch *N*-Methylanilin erwiesen sich hierbei als leistungsfähige Allylfänger.



Schema 16: Aufbau des Dipeptids **114X** durch C-terminale Verlängerung

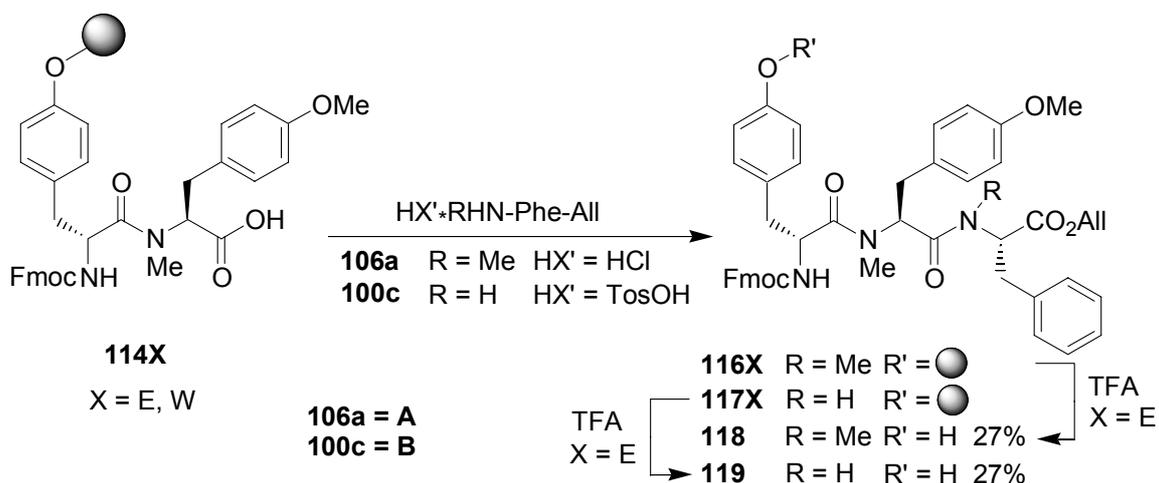
Hieran schloss sich die Kupplung des *N*-methylierten Bausteins **106b** an, durch den das strukturell komplexe, jedoch für die Inhibition scheinbar weniger wichtige, DOPA-Derivat des Naturstoffs ersetzt wurde (Schema 16, vergleiche Naturstoffstruktur, Schema 8). Aufgrund des besonderen sterischen Anspruchs *N*-methylierter Aminosäuren^[101], gekoppelt mit der Problematik von Aktivierungs- und Amidknüpfungsschritt an der Festphase bei der C-terminalen Verlängerung^[97], wurden die für schnelle Aktivierung bekannten Aminiumsalze als Kupplungsreagenzien^[101, 109] eingesetzt. Zur Vermeidung von Guanidinbildung (siehe

hierzu Kapitel 2.7) wurde die festphasengebundene Carboxylkomponente **112X** mit dem Aktivierungsreagenz für 30-60 min voraktiviert und die Amino-Komponente **106b** erst nach Waschen des Harzes zugegeben. Unter den verwendeten Kupplungsreagenzien ergab alleinig HATU **59b**, kombiniert mit der Base Diisopropylethylamin (DIEA) und dem Lösungsmittel *N*-Methylpyrrolidon (NMP) vollständige Umsetzung zu einem laut HPLC sauberen Produkt, ohne Hinweise auf Racemisierung. DMF und die Base *N*-Methylmorpholin (NMM) lieferten etwas schlechtere Ergebnisse, während sich die Base Lutidin als völlig ineffektiv erwies. Trotz erfolgreicher Umsetzung wurde nach Abspaltung von der Festphase (**113E**, Ellman-Linker) und Reinigung des Produkts **115** eine überraschend geringe Ausbeute erzielt, die zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden konnte. Im Anschluß an die reibungslos verlaufende Pd-katalysierte Carboxyl-Freisetzung zu **114X** folgten Versuche zur Anknüpfung des nächsten *N*-methylierten Bausteins **106a** (Tabelle 1). Während aufgrund des Fmoc-Urethans an **112X** bei der vorhergehenden Kupplung eine mögliche Racemisierung und andere Nebenreaktionen unterdrückt wurden (Schema 16), war jener Schutz bei **114X** nicht mehr gegeben, so dass bei den folgenden Umsetzungen besonderes Augenmerk auf die Verhinderung der Racemisierung gelegt werden musste.

Das im vorigen Schritt bewährte, und für komplexe Kupplungsfälle empfohlene^[101] Reagenz HATU **59b** lieferte unter verschiedenen Bedingungen völlig unzureichende Ergebnisse (Tabelle 1, Einträge 1-5). Selbst Vierfach-Kupplung führte nur zu einem Umsatz von 25%, begleitet von der befürchteten Racemisierung (Eintrag 6). Die Kupplung bei 60°C lieferte zwar einen deutlichen Produktüberschuss, die optische Reinheit blieb jedoch nach wie vor inakzeptabel (Eintrag 7). Als Alternative schien von den für die *C*-terminale Verlängerung beschriebenen Methoden die Mukaiyama-Redox-Kondensation für dieses Kupplungsproblem geeignet, dennoch wurde hier keine Reaktion beobachtet (Eintrag 8). Das für die Kupplung *N*-alkylierter Aminosäuren empfohlene, Säurefluoride generierende TFFH^[118] **59c** versagte ebenso wie PyBroP^[117] **61c** (Einträge 9-10).

Die Lösung war die Verwendung des Phosphonium-Salzes PyAOP^[116] **61b**, welches einen OAt-Aktivester bildet, im Gegensatz zu Aminium-Salzen^[109] wie **58**, **59** und **60** jedoch keine Voraktivierung benötigt. Die entsprechende direkte Umsetzung einer Mischung von Kupplungsreagenz und Aminkomponente mit **114X** lieferte erstmals eine Umsetzung von annähernd 70% mit geringer Racemisierung (Eintrag 11).

Diese Reaktion, bei 60 °C durchgeführt (Eintrag 12), lieferte einen geringeren Umsatz und eine niedrigere optische Reinheit, da sich das Kupplungsreagenz wahrscheinlich unter diesen Bedingungen zersetzte.^[109]



Eintr.	Kupplungsbedingungen (Äquiv.)	Zeit (h)	Temp (°C)	Verhältnis ^a Edukt : Produkt	Epim. ^a (%)
1	A (4), HATU (3), DIEA (10), NMP	2 x 3	RT	91:9 (114E:116E)	- ^b
2	A (6), HATU (3), DIEA (10), NMP	24	RT	75:25 (114E:116E)	- ^b
3	A (6), HATU (3), HOAt (1), DIEA (12), NMP	2 x 24	RT	72:28 (114E:116E)	- ^b
4	A (4), HATU (3), DIEA (10), DMF	48	RT	93:7 (114E:116E)	- ^b
5	A (4), HATU (3), NMM (10), DMF	48	RT	99:1 (114E:116E)	- ^b
6	A (6), HATU (3), HOAt (1), DIEA (19), NMP	4 x 24	RT	72:28 (114E:116E)	45
7	A (8), HATU (4), DIEA (12), NMP	15	60	33:67 (114E:116E)	31
8	A (3), (PyS) ₂ (30), PySH (30), PPh ₃ , (30), DIEA (6), CH ₂ Cl ₂	19	RT	100:0 (114W:116W)	-
9	A (8), TFFH (3), DIEA (16), NMP	24	RT	87:13 (114E:116E)	28
10	A (8), PyBroP (4), DIEA (16), DMF	48	RT	63:37 (114E:116E)	41
11	A (8), PyAOP (6), DIEA (12), NMP	48	RT	31:69 (114E:116E)	7
12	A (8), PyAOP (6), DIEA (12), NMP	48	60	53:47 (114E:116E)	54
13	A (4), PyAOP (3 + 3), HOAt (1), DIEA (12), NMP	48	RT	23:77 (114E:116E)	5
14	B (4), PyAOP (3 + 3), HOAt (1), DIEA (12), NMP	48	RT	13:87 (114E:117E)	3

Tabelle 1 (Fortsetzung umseitig)

Eintr.	Kupplungsbedingungen (Äquiv.)	Zeit (h)	Temp (°C)	Verhältnis ^a Edukt : Produkt	Epim. ^a (%)
15	A (6), PyAOP (6), HOAt (2), DIEA (24), NMP	42	RT	11:89 (114W:116W)	7
16	A (6), PyAOP (6), HOAt (2), DIEA (24), NMP	2 x 20	RT	6:94 (114W:116W)	9

^a Analyse mittels HPLC (Merck-Hittachi: Einträge 1-5; HP1100: Einträge 6-16)

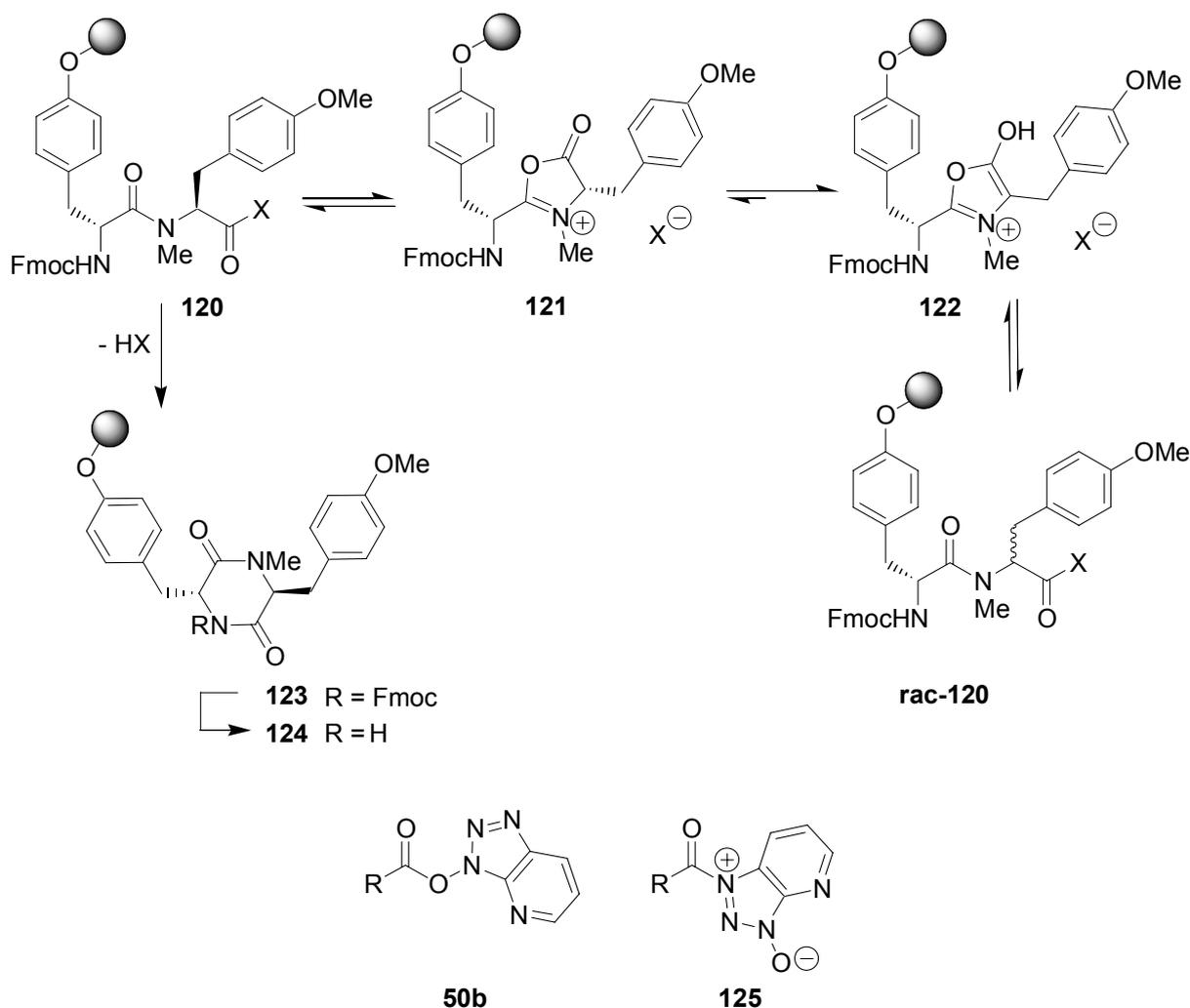
^b Analyse mittels analyt. HPLC (Merck-Hittachi) ergab keine Peak-Aufspaltung.

Tabelle 1 (Fortsetzung): Versuche zur C-terminalen Anbindung von **106a** an **114X**.

Durch Zugabe von HOAt **57** und weiteren Äquivalenten des bei Raumtemperatur nur begrenzt stabilen^[109] Kupplungsreagenzes konnte die Ausbeute noch gesteigert werden (Einträge 13-15), wobei letztendlich doppelte Kupplung in Gegenwart von zwei Äquivalenten HOAt nahezu vollständigen Umsatz lieferte (Eintrag 16).

Die Erklärung des erfolgreichen Einsatzes von PyAOP im Vergleich zu den anderen Reagenzien liegt vermutlich in der extrem schnellen Bildung des OAt-Aktivesters **50b**, welche durch Zugabe von weiterem HOAt noch beschleunigt wird (Schema 17). Das bereits in der Reaktionsmischung vorliegende Amin **106a** kann direkt mit der derart aktivierten Carboxylkomponente **50b** reagieren, so dass die Halbwertszeit des aktivierten Zustands minimiert und die Racemisierung gesenkt wird. Da bei der empfohlenen Voraktivierung mit HATU^[110] der gebildete Aktivester nicht sofort weiterreagieren kann war möglicherweise die Umlagerung zum deutlich schwächer aktiven Verbindung **125** erfolgt (Schema 17),^[153] wodurch sich der letztendliche Misserfolg des Einsatzes von HATU erklären lässt. Hierfür sprechen auch Ergebnisse neuerer Arbeiten, bei denen bei C-terminaler Verlängerung eine Voraktivierung vermieden wurde.^[154] Im Gegensatz zur sekundären Aminosäure Prolin können N-methylierte Aminosäuren nach dem Oxazolone-Mechanismus racemisieren (Schema 17).^[155] Dementsprechend dürfte die aktivierte Komponente **120** zum Oxazolone-Ion **121** cyclisiert sein, welches möglicherweise über die Stufe **122** zum partiell racemisierten Gemisch **rac-120** führt. Die Cyclisierung der aktivierten Komponente zu Diketopiperazinen wie **123** und **124** könnte ein weiteres Problem obiger Reaktion gewesen sein.^[97] Dies würde Nebenprodukte bei den fehlgeschlagenen Kupplungen (Tabelle 1, Einträge 1-10) erklären, die in den erfolgreichen Umsetzungen (Tabelle 1, Einträge 11, 13, 15 und 16) vernachlässigbar waren, wobei letztendlich die Bildung der Produkte **123** und **124** jedoch nicht nachgewiesen

werden konnte. Unvollständiger Umsatz und Racemisierung treten schon bei C-terminaler Kupplung^[97] gewöhnlicher primärer Aminosäuren auf, wenn auch in geringerem Ausmaß^[155]. Diese Erfahrung wurde bei obigen Kupplungsexperimenten bestätigt (vergleiche Einträge 13 und 14, Tabelle 1). Somit sind die erzielten Resultate bei der Kupplung von N-methylierten Aminosäuren mit einer Racemisierung von unter 10% als Erfolg zu werten, wobei es sich hier um das erste Beispiel dieses Typs handelt.



Schema 17: Racemisierungsmechanismus, Nebenprodukte und Zwischenprodukte der Kupplungsreaktion von **114X** mit **106a**.

In der Kupplungsmischung wurden bei der Verwendung von an Ellman-Linker-gebundener Verbindungen nach Waschen der Harze **116E** und **117E** die Verbindungen **118** und **119** detektiert, was für eine nicht ausreichende Linkerstabilität spricht. Dies erklärt auch die nach saurer Abspaltung und Reinigung erhaltenen geringen Ausbeuten von **115** (Schema 16),

sowie **118** und **119** (Tabelle 1). Aus diesem Grund und den nur geringen erzielbaren Belastungen beim Ellman-System wurde in den weiteren Synthesen ausschließlich mit dem stabileren Wang-Linker gearbeitet.

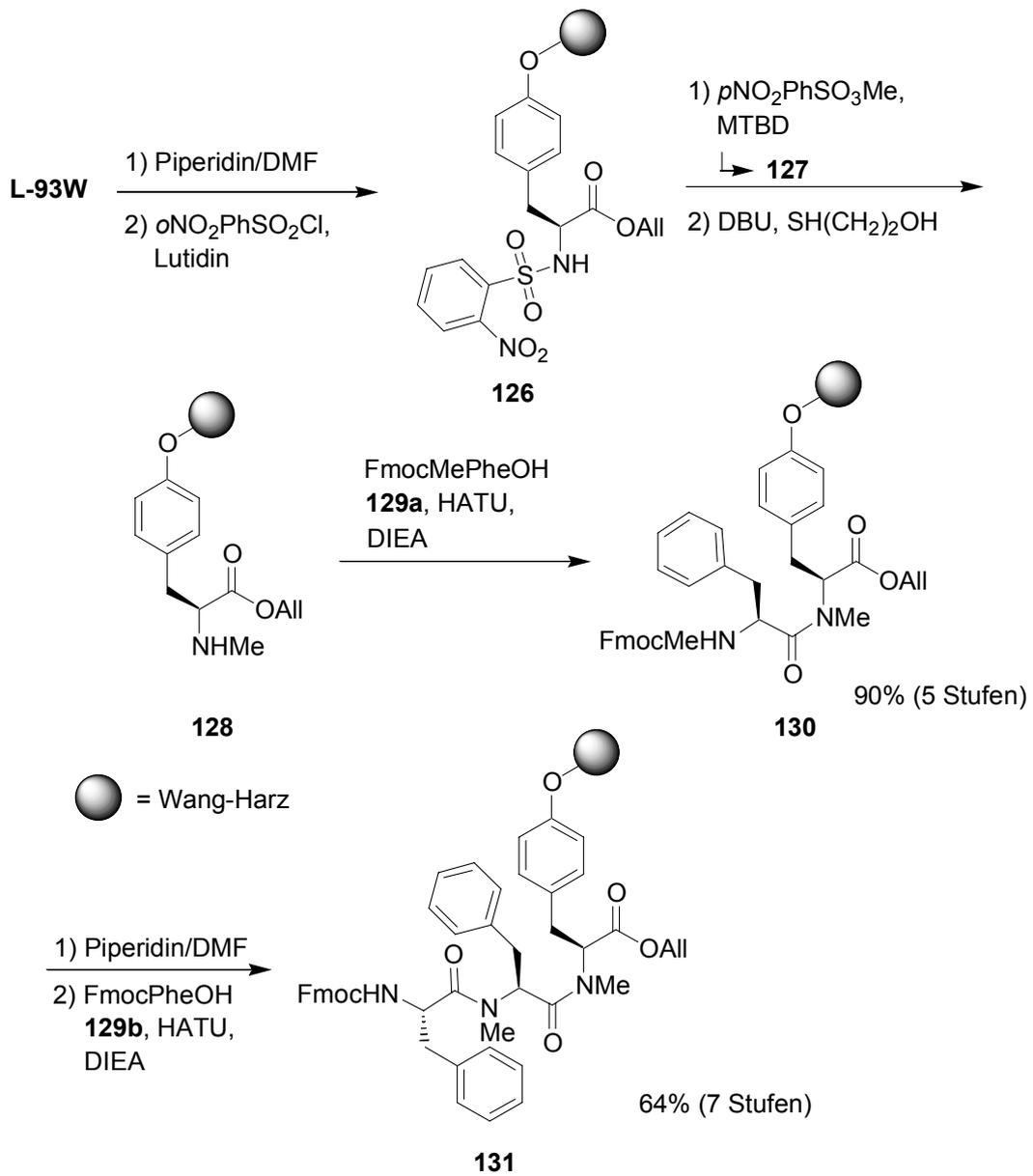
4.3.2 Aufbau durch *N*-terminale Verlängerung

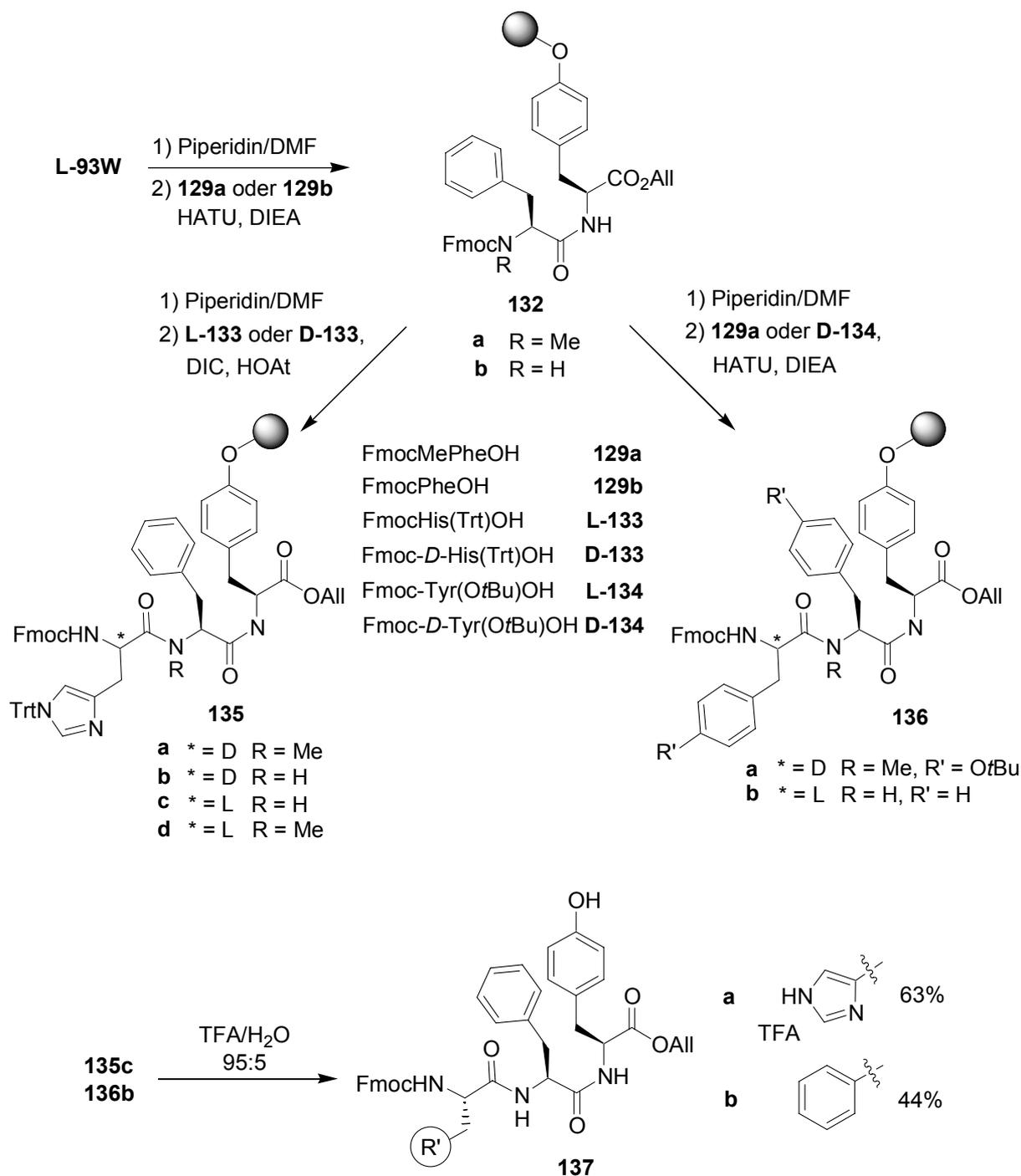
Als alternativer Startpunkt wurde von Aminosäureposition AS³ (Schema 9) ausgegangen. Dadurch würde sich das Tripeptid über etablierte *N*-terminale Verlängerung aufbauen lassen, während Position AS¹ als zentrale Bindungsstelle für das Zinkion der FTase breit variierbar wäre. Aufgrund der linearen Verlängerung lässt sich ferner der Reaktionsverlauf mittels der Fmoc-Methode^[99, 126, 136] bestimmen.

Zur Vermeidung aufwendiger Schutzgruppenoperationen in Lösung wurde *N*-methyliertes Tyrosin **128** durch Alkylierung an der festen Phase nach Miller et al.^[156, 157] hergestellt (Schema 18).

Ausgehend von **L-93W** wurde nach Fmoc-Abspaltung unter basischen Bedingungen das *o*-Nitrobenzolsulfonamid **126** gebildet, gefolgt von *N*-Methylierung mit *p*-Nitrobenzol-sulfonsäuremethylester und Spaltung des gebildeten *N*-Methylsulfonamids **127** mit DBU und 2-Mercaptoethanol als Fänger zu **128** (Schema 18). Anschließend erfolgte die Anknüpfung des nächsten *N*-methylierten Bausteins **129a** zu **130**, wobei bezogen auf 5 Stufen eine hervorragende Gesamtausbeute von 90% (98%/Schritt) erzielt werden konnte (ermittelt mit Hilfe der Fmoc-Methode). Nach Fmoc-Deblockierung verlief die Kupplung des dritten Bausteins zu **131** nach zweifacher Umsetzung mit einem für *N*-methylierte Aminosäuren akzeptablen Ergebnis.

Ausgehend von **L-93W** verlief der Aufbau der Dipeptide **132** und die Umsetzungen zu den Tripeptiden **135** und **136** laut Ninhydrin-Test^[158] weitgehend quantitativ und führte laut HPLC-Analyse zu nur minimal verunreinigten Zielprodukten (Schema 19). Aufgrund der charakteristischen Racemisierungsempfindlichkeit von Histidin wurde zur Kupplung der Bausteine **133** eine Kombination von DIC und HOAt unter Verzicht^[159] auf eine Hilfsbase verwendet. Die nach der Abspaltung der Verbindungen **137a** und **137b** von der Festphase und HPLC-Reinigung erzielten Ausbeuten waren zufriedenstellend, die isolierten Produktmengen entsprachen den Anforderungen für die geplanten biologischen Tests (Schema 19).


 Schema 18: Aufbau von zweifach *N*-methylierten Tripeptiden

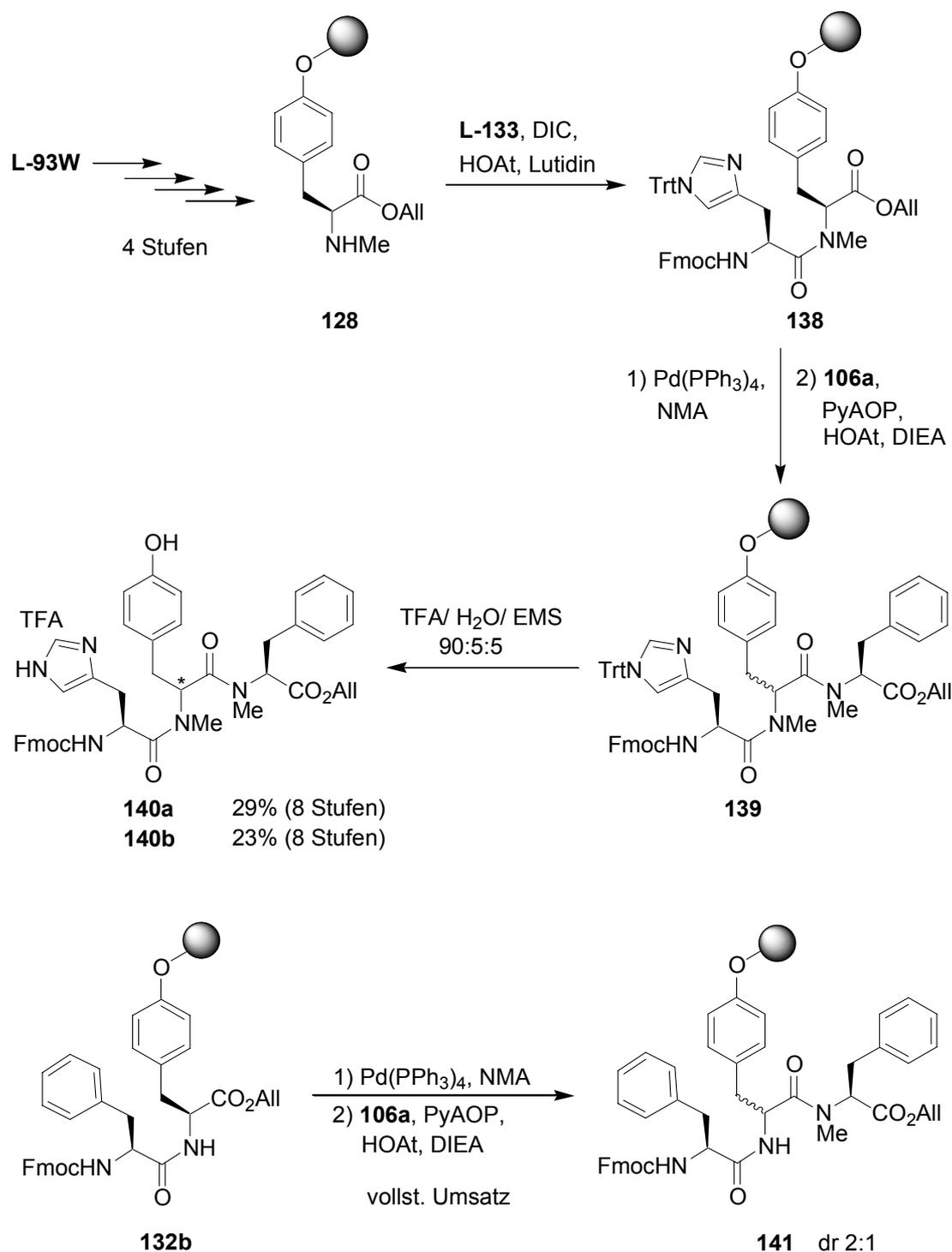


Schema 19: Aufbau von Tripeptiden mit einfacher bzw. ohne *N*-Methylierung

4.3.3 Aufbau durch *C*-und *N*-terminale Verlängerung

Dem Startpunkt Aminosäureposition AS² (Schema 9) kommt hinsichtlich FTase-Inhibition eine besondere Bedeutung zu, da sich sowohl AS¹ als auch AS³ variieren lassen, wobei es sich um Zink-Bindungsstelle (AS¹) und den Bereich der aromatischen Tasche (AS³) handelt (Vergleiche Kapitel 2.3, Abbildung 2). Analog zum vorgehenden Kapitel 4.3.2 wurde der

Baustein **128** durch Methylierung an der festen Phase ausgehend von **L-93W** dargestellt (Schema 20).



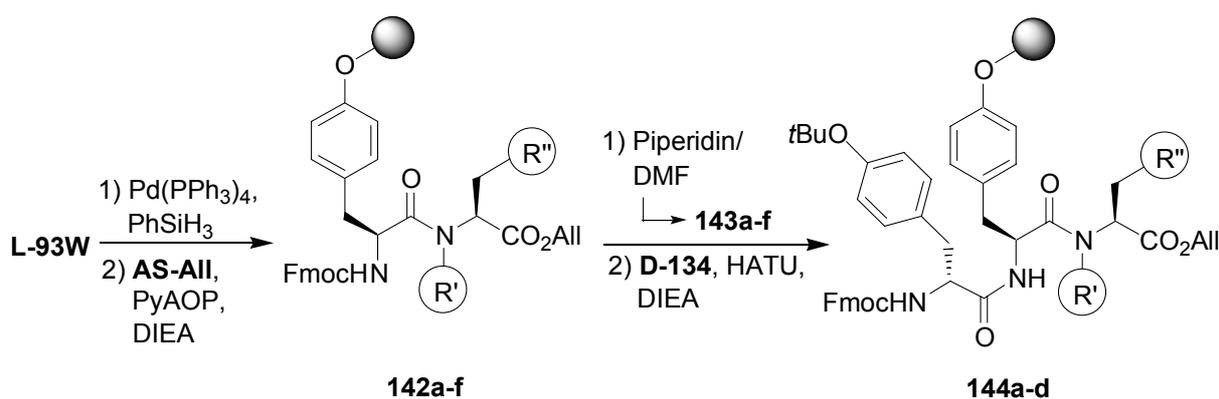
Schema 20: Tripeptidaufbau durch *N*-terminale und *C*-terminale Verlängerung

Anschließend erfolgte die Anknüpfung des racemisierungsanfälligen Histidinbausteins **L-133** unter schwach basischen Bedingungen, welche laut HPLC-MS das reine Zielprodukt ohne erkennbares Auftreten von Racemisierung lieferte. Nach *C*-terminaler Deblockierung folgte die

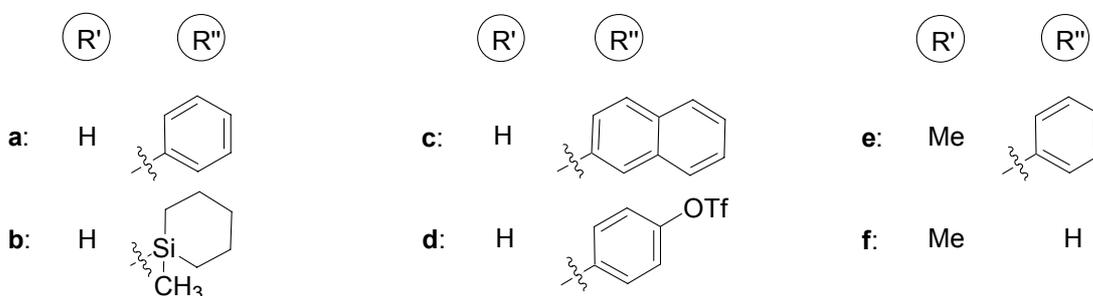
Kupplung mit dem Phenylalanin **106a** zum Tripeptid **139**, die vollständig verlief, aber trotz exakt befolgter Kupplungsbedingungen von Kapitel 4.3.1 trat über 40% Racemisierung auf. Nach saurer Abspaltung mit TFA gelang die Trennung beider Diastereomere **140a** und **140b** mittels HPLC. Offensichtlich ist die Racemisierung unabhängig von dem Histidin und der *N*-Methylierung des Tyrosins, da die analog durchgeführte Synthese des Tripeptids **141** ebenfalls zu einem Epimeren-Gemisch führte (Schema 20).

Da diese Ergebnisse im krassen Gegensatz zu den Resultaten aus Kapitel 4.3.1 stehen, muss angenommen werden, dass die Moleküleigenschaften in hohem Masse von der jeweiligen Sequenz bestimmt werden und deshalb die in Kapitel 4.3.1 ausgearbeitete Methode hinsichtlich Racemisierungsminimierung nicht universell anwendbar ist. Dennoch stellt vom kombinatorischen Standpunkt aus die Bildung zweier epimerer Verbindungen einen Diversitätsgewinn dar und ist durchaus erwünscht, vor allem wenn eine Trennung beider Diastereomere problemlos möglich ist.

Alternativ wurde die inverse Vorgehensweise gewählt, die racemisierungsarm verlaufen sollte (Schema 21).



AS-All = 100b, 100c, 100d, 102, 106a, 106c



Schema 21: Tripeptidaufbau durch *C*-terminale und *N*-terminale Verlängerung

Nach Deblockierung der Carboxylfunktion von **L-93W** erfolgte die *C*-terminale Anknüpfung der Allylester-Bausteine **100**, **102** und **106** zu den Dipeptiden **142**. Nun wurde der *N*-

Terminus entschützt und die Umsetzung mit dem Tyrosinbaustein **D-134** zu den Tripeptiden **144** durchgeführt. Während die Umsetzungen ausgehend von **142a-d** ohne feststellbare Racemisierung die gewünschten Produkte **144a-d** lieferten, wurden bei den methylierten Verbindungen **140e** und **140f** sehr polare Verbindungen detektiert, bei den es sich weder um das jeweilige Amin **143e** oder **143f**, noch um das erwartete Tripeptid **144e** oder **144f** handelte. Ungünstigerweise ergaben Charakterisierungsversuche durch verschiedene Massenspektroskopie-Methoden (MALDI, ESI) keine verwertbaren Aussagen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die Bildung von Diketopiperazinen^[79] erfolgt (siehe Kapitel 2.6), die im Falle von *N*-methylierten Aminosäuren begünstigt ist^[79]. Als Lehre folgt daraus, dass bei den methylieren Aminosäuren sehr kurze Enschützungszeiten sinnvoll sind und bei der nachfolgenden Kupplung leistungsfähige Reagenzien Anwendung finden sollten.^[101]

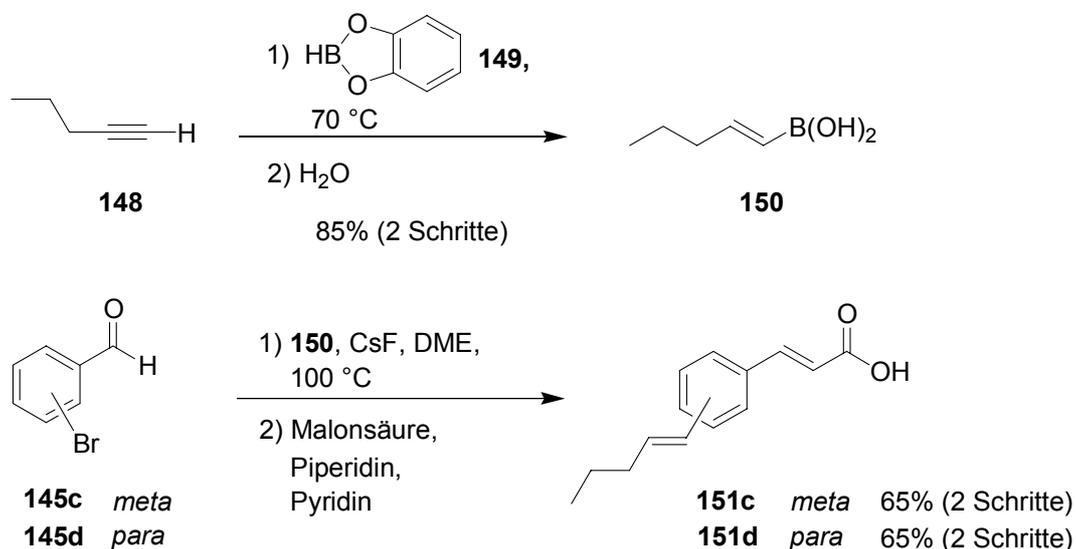
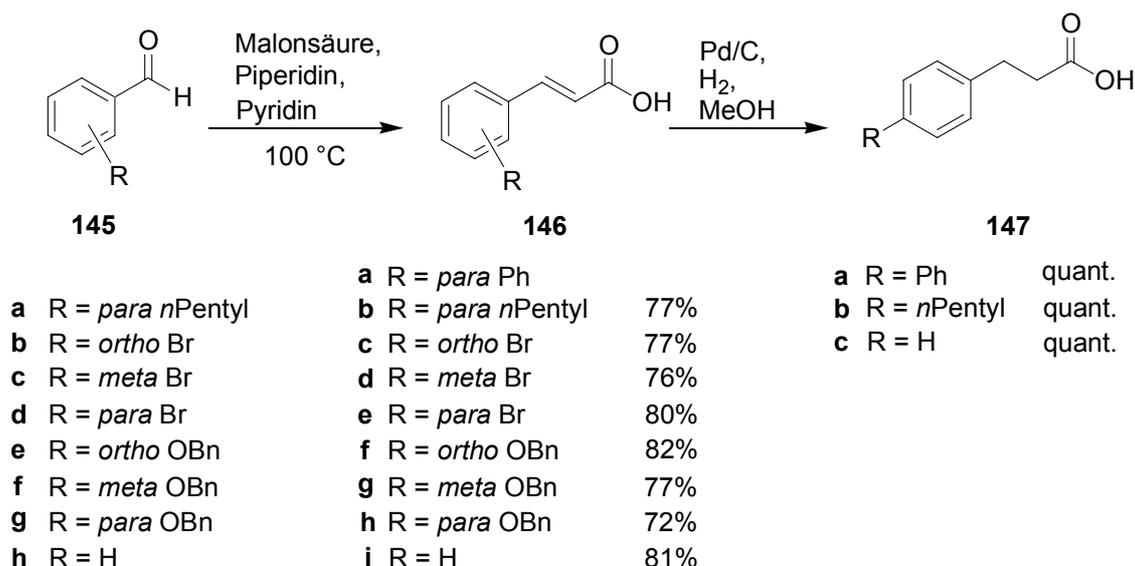
Fazit

Ein Aufbau der zentralen Tripeptideinheit auf verschiedenen Wegen am polymeren Träger wurde erfolgreich durchgeführt. Die Synthese von Dipeptiden in beliebiger Richtung gelang in effizienter Weise, unabhängig von einer *N*-Methylierung. Die *C*-terminale Verlängerung zum Aufbau des Tripeptid-Naturstoff-Rückgrats war nach Optimierung der Bedingungen möglich. Die konventionelle *N*-terminale Verlängerung zu Tripeptiden verlief unproblematisch. Die Kombination von *C*- und *N*-terminaler Verlängerung war zum größten Teil wirkungsvoll, in einigen Fällen wurden Racemisierung oder Nebenreaktionen beobachtet.

4.4 Anknüpfung des lipophilen *N*-terminalen Acylrests

4.4.1 Synthese der Bausteine

Nach dem erfolgreichen Aufbau der Tripeptideinheit wurde der Schwerpunkt auf die Anknüpfung von lipophilen Bausteinen auf der Basis von aromatischen Carbonsäuren und Benzylchloroformiaten gelegt. Während Zimtsäurederivate **146**, soweit nicht kommerziell erhältlich, durch Knoevenagel-Kondensation^[160] aus den entsprechenden Benzaldehyden **145** zugänglich waren, ließen sich die Hydrozimtsäuren **147** leicht aus **146** durch Reduktion der Doppelbindung erhalten (Schema 22).



Schema 22: Synthese der lipophilen Bausteine

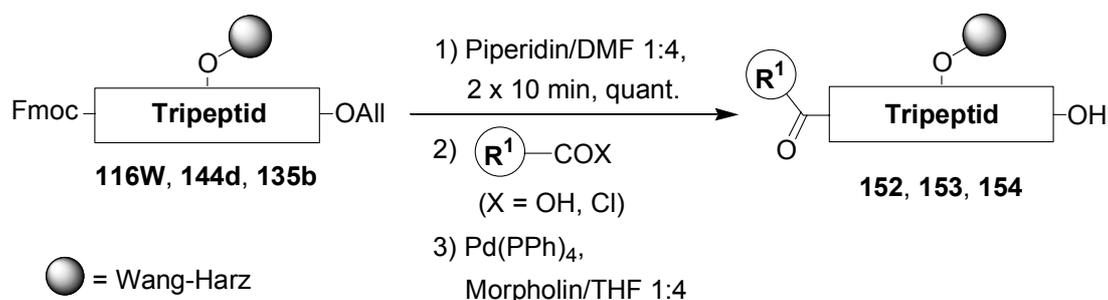
Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Hydrierung über Nacht in Methanol zu beträchtlichen Mengen des Methylrests führen kann und deshalb die Reaktionszeit von wenigen Stunden nicht überschritten werden sollte.

Zur Synthese von Alkenylzimtsäuren des Typs **151** wurden Pd-katalysierte C-C Knüpfungen ins Auge gefasst (Schema 22). Erste Anknüpfungsversuche von 1-Penten und 1-Pentin durch Heck^[161]- bzw. Sonogashira-Reaktion^[162] an die Brom-Zimtsäuren **146c-e** verliefen erfolglos, in erster Linie sicherlich aufgrund des geringen Siedepunkts und der hohen Flüchtigkeit von Alken und Alkin. Deshalb wurde die Alkenylseitenkette als Boronsäure **150** eingeführt, die durch Hydroborierung von Pentin **148** durch Catecholboran **149** und anschließende Hydrolyse zugänglich war.^[163] Suzuki-Reaktion^[164] mit dem entsprechenden Brombenzaldehyd lieferte

die Benzaldehyde, die nicht isoliert, sondern direkt durch Knoevenagel-Kondensation in die Zielprodukte **151c** und **151d** mit hohen Gesamtausbeuten umgewandelt wurden.

4.4.2 Anknüpfung der Bausteine an festphasengebundene Tripeptide

Nach *N*-terminaler Deblockierung der Modellpeptide **116W**, **144d** und **135b** wurden intensive Versuche unternommen, die Zimt- und Hydrozimsäurederivate, sowie Benzylchloroformiate anzuknüpfen (Tabelle 2). Während Hydrozimsäuren **147b** und **147c**, Zimsäure **146i** und Benzylchloroformiat mit HATU oder PyAOP bzw. HOAt/DMAP problemlos und unter kompletter Umsetzung in die jeweiligen Tetramere überführt werden konnten (Tabelle 2, Einträge 1-4), waren bei Verwendung des Pentenylzimsäurederivats **87** unter den oben genannten Bedingungen die Kupplungen unvollständig und führten zu einem Produktgemisch (Einträge 5-6). Genauere Untersuchungen dieser Gemische mittels LC-MS-Analyse wiesen auf eine *E/Z*-Isomerisierung hin, die später im Detail belegt werden konnte (Kapitel 4.6). Die vorher rein *E*-ständige Doppelbindung scheint während der Anknüpfungsreaktion in einem beträchtlichen Maße zur *Z*-Konfiguration umgewandelt worden zu sein, woraus ein *E/Z*-Gemisch resultierte. Bezüglich Nachweis und möglicher Erklärungen siehe Kapitel 4.6. Da eine spätere Trennung nicht realistisch erschien, wurden diverse weitere Kupplungsbedingungen untersucht (Einträge 7-10), wovon PyAOP gemeinsam mit DMAP (Eintrag 10) vollständige Umsetzung unter Erhalt der *E*-Konfiguration lieferte. Diese positiven Ergebnisse wurden mit obigen Reagenzien auch bei der Anknüpfung von **87** und der bromsubstituierten Zimsäurereste **146c-e** an das histidinhaltige Tripeptid **135b** erzielt (Einträge 11 und 12).



Eintr.	Edukt	R ¹ COX	Kupplungsbed.	Ergebnis	Umsatz ^b
1	116W	147c	PyAOP, DIEA	152a	vollständig
2	144d	147b	HATU, DIEA	153	vollständig
3	116W	CbzCl	DMAP, HOAt	152c	vollständig
4	116W	146i	PyAOP, HOAt	152b	vollständig
5	116W	87	HATU, DIEA	Produktgem. 152d ^a	unvollst.
6	116W	87	PyAOP, DIEA	Produktgem. 152d ^a 1:1.5	unvollst.
7	116W	87	PyBrOP, DIEA	Produktgem. 152d ^a 1:1.2	unvollst.
8	116W	87	(PyS) ₂ , PPh ₃ , PySH,	Produktgem. 152d ^a 1:3	unvollst.
9	116W	87	PO(O ₂ Ph) ₂ N ₃ , DMAP	Produktgem. 152d ^a 1.1:1	unvollst.
10	116W	87	PyAOP, DMAP	152d	vollständig
11	135b	87	PyAOP, DMAP	154d	vollständig
12	135b	146c-e	PyAOP, DMAP	154e-g	>95%

^a Gemisch zweier Produkte mit der Masse des Zielprodukts gemäß HPLC und LC-MS

^b laut HPLC und Ninhydrin-Test^[158]

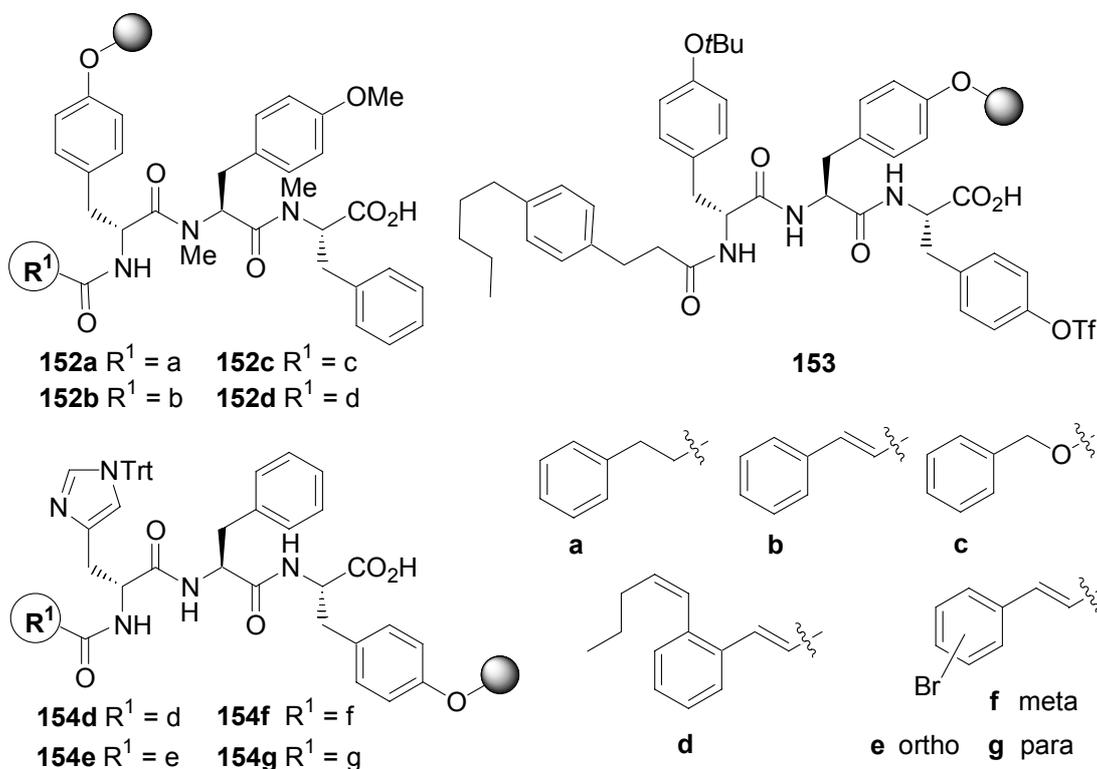
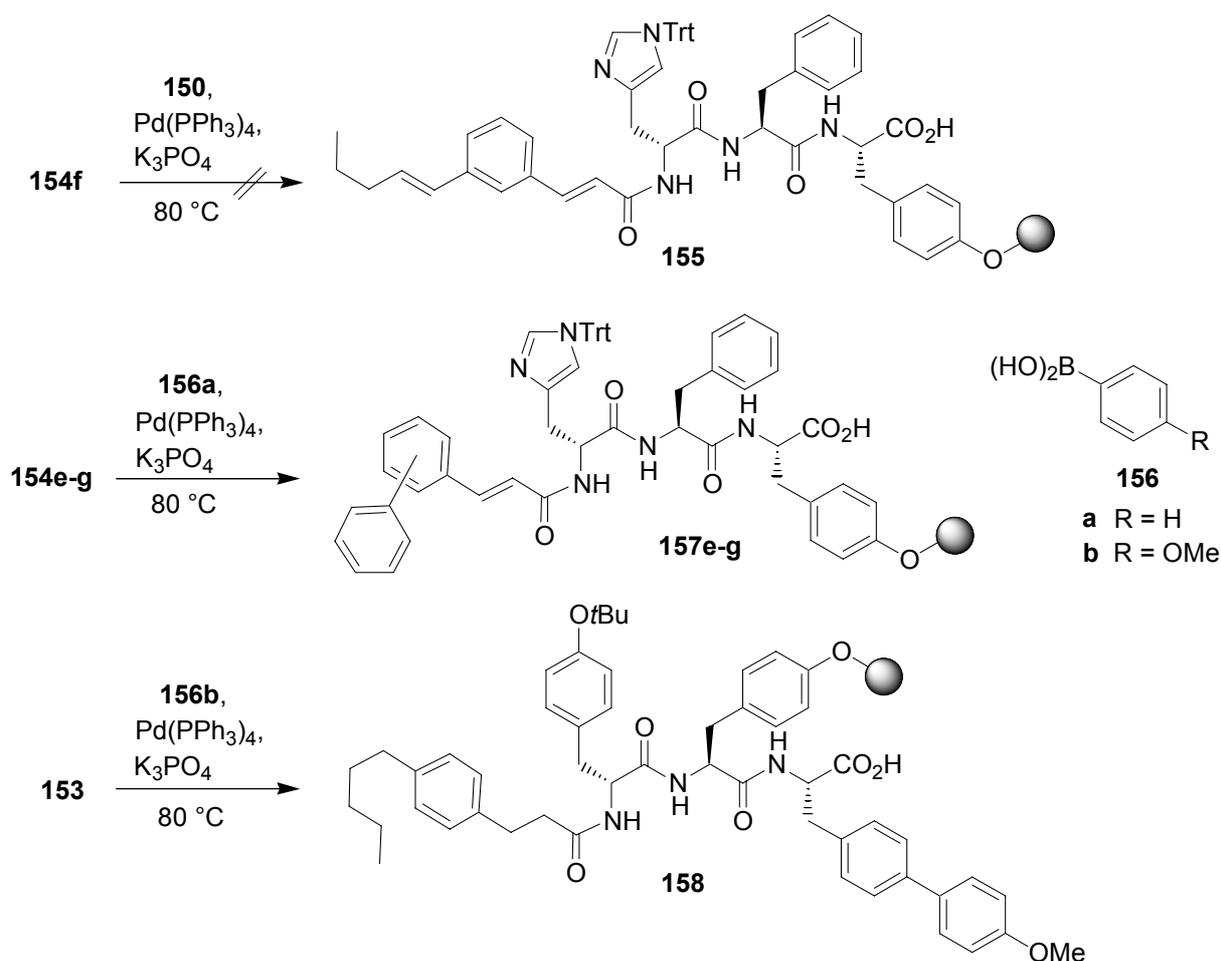


Tabelle 2: Anknüpfung des lipophilen Bausteins und C-terminale Deblockierung

4.4.3 Suzuki-Reaktion am polymeren Träger

Desweiteren wurden Versuche unternommen, durch Suzuki-Reaktion Alkenyl- und Aryl-methan-Reste in polymergebundene Verbindungen mit aromatischen Brom- und Trifluor-methansulfonat-Substituenten einzuführen und damit die Diversität zu erhöhen. Unter den verwendeten Bedingungen^[165] ließen sich ausgehend von Phenylboronsäure **156a** und **154e-g** in *ortho*-, *meta*-, und *para*-Position eine Phenylgruppe einbringen, während bei der Pentenboronsäure **150** und **154f** keine Reaktion beobachtet wurde (Schema 23).

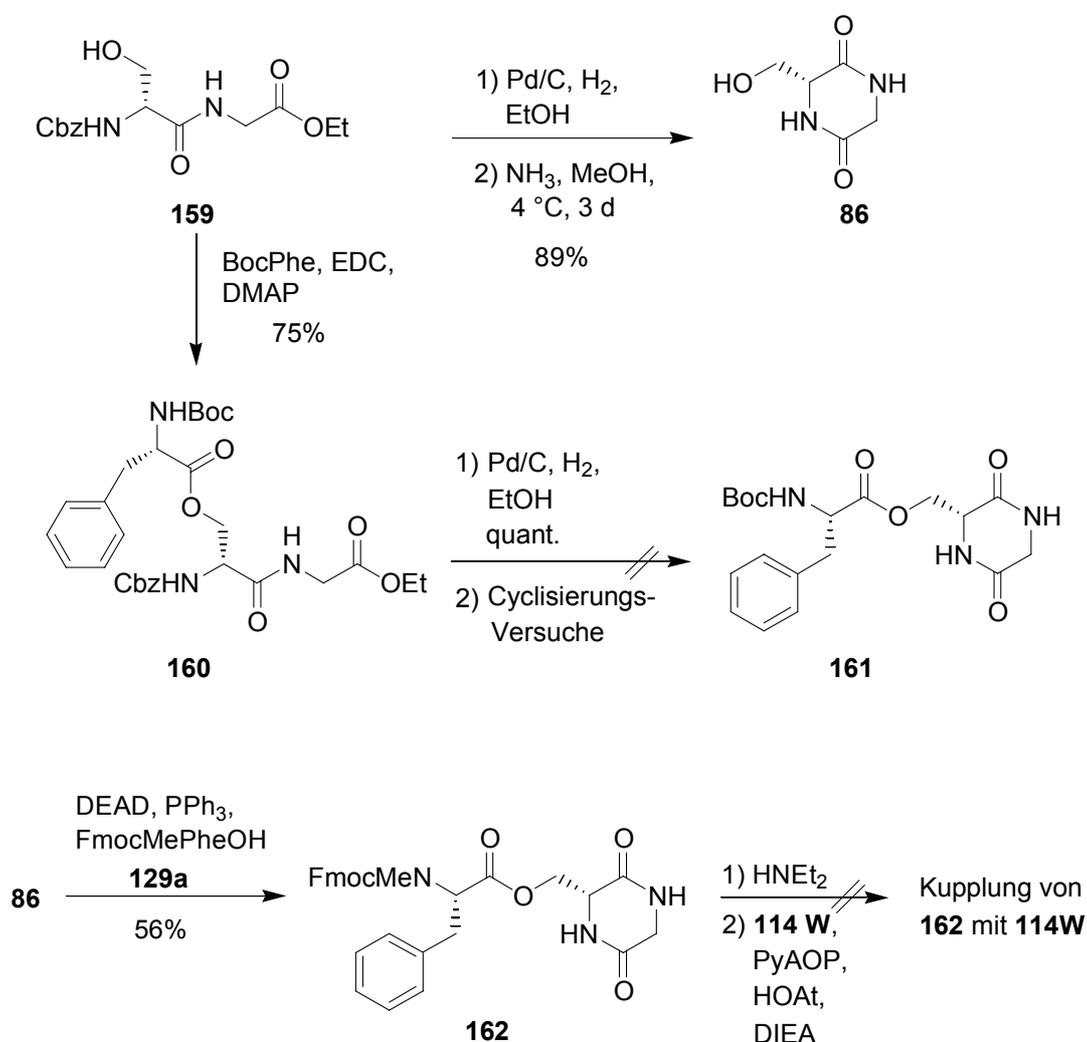


Schema 23: Versuche zur C-C-Verknüpfung durch Suzuki-Reaktion an der Festphase

Auf diese Weise konnte aus dem Triflat **153** durch Umsetzung mit **156b** eine *p*-Methoxyphenylgruppe eingebaut werden. Die Bildung von **157e-g** und **158** als Hauptprodukte konnte eindeutig durch LC-ESI-MS und MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden, war jedoch begleitet von Nebenprodukten.

4.5 Vervollständigung der Pentamerstruktur

Da sich in Pepticinnamin E eine polare Diketopiperazin-Endgruppe befindet, deren Einbau sich im Verlauf der Naturstoffsynthese als problematisch erwiesen hatte^[142], lag der Schwerpunkt in diesem Abschnitt auf der Ausarbeitung zuverlässiger festphasengeeigneter Einbau-Verfahren. Das Diketopiperazin **86** war aus dem Dipeptid **159** zugänglich, jedoch ausschließlich unter den in Schema 24 beschriebenen Bedingungen, außerdem war die Anbindung von **86** im Verlauf der Naturstoffsynthese nur mit niedriger Ausbeute und lediglich durch Mitsunobu-Veresterung möglich gewesen. Geplant war nun, den Vorläufer **159** und vergleichbare Dipeptide über die Hydroxyl-Funktion an ein polymergebundenes Tetramer zu binden und an der Festphase zu cyclisieren.



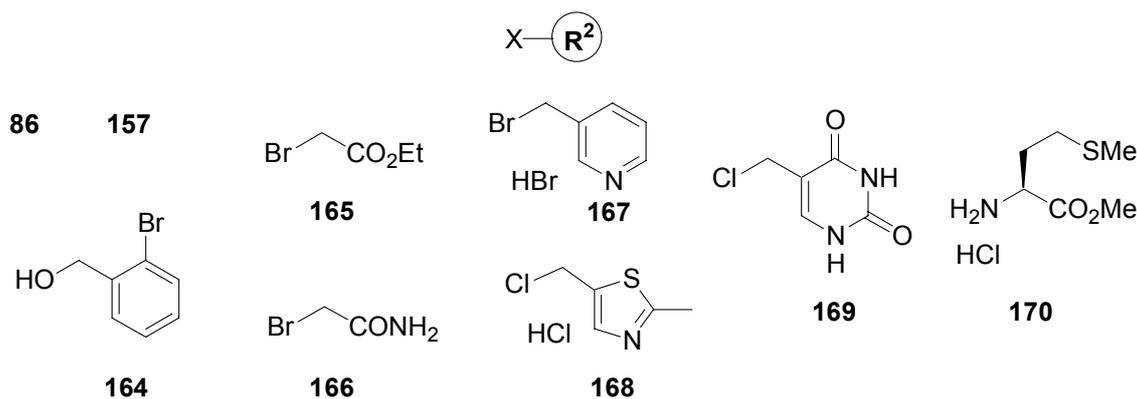
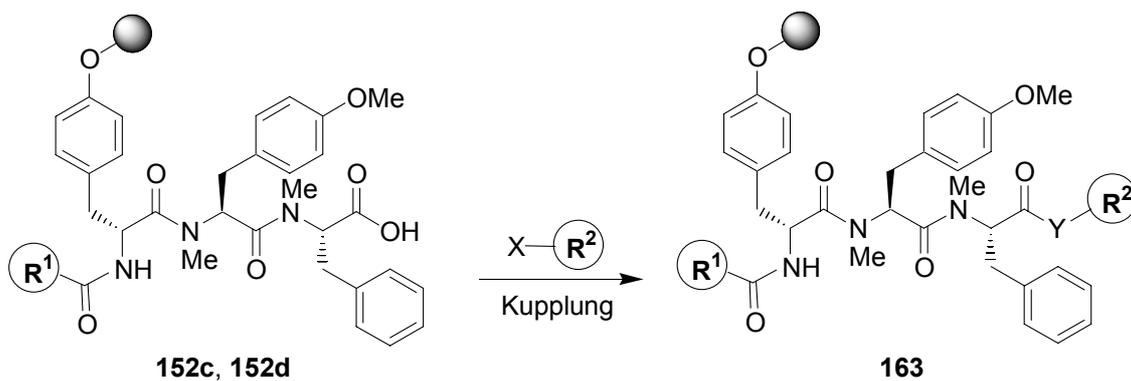
Schema 24: Versuche zur Einführung des Diketopiperazinfragments **86**

Während die Veresterung von **159** unter Steglich-Bedingungen^[123] mit der Phenylalanin-Modellverbindung zu **160** eine hohe Ausbeute lieferte, gelang nach Deblockierung des *N*-Terminus keine der zahlreichen Cyclisierungsversuche zu **161**. Selbst die zur Darstellung von **86** erprobte Variante der ammoniakalischen Lösung^[142] scheiterte (Schema 24). Dieses Ergebnis überrascht, da Diketopiperazinbildung oftmals spontan abläuft und es sich demzufolge um eine häufig auftretende Nebenreaktion der Peptidsynthese handelt.^[79]

Demgegenüber ließ sich die zu **161** analoge Verbindung **162** durch Veresterung des Diketopiperazins **86** mit dem Aminosäurebaustein **129a** durch Mitsunobu-Reaktion^[125] erhalten (Schema 24). Die Ausbeute von 56% entspricht dem bei der Pepticcinnamin E-Synthese erzielten Wert.^[142] Nach Deblockierung des *N*-Terminus gelang es jedoch nicht, das Fragment an das Tripeptid **114W** mittels PyAOP zu koppeln, was die negativen Erfahrungen bei der Naturstoffsynthese^[142] bestätigt.

Analog zur Naturstoffsynthese wurden nun Versuche durchgeführt, durch Mitsunobu-Veresterung Diketopiperazin **86**, Dipeptid **159** und 2-Brombenzylalkohol (**164**) anzuknüpfen (Tabelle 3). Tatsächlich wurde weder bei der problematischen Verbindung **86**, die nur in DMF ausreichend löslich ist, noch bei den Alkoholen **159** und **164** eine Umsetzung beobachtet. Lediglich in einem Fall (Eintrag 3) wurden im LC-MS-Chromatogramm Spuren des Zielprodukts detektiert. Da diese Reaktion, wenn auch in mäßiger Ausbeute, in Lösung erfolgreich durchführbar ist (Schema 24), scheint das Scheitern an der festen Phase unmittelbar mit dem polymeren Träger zusammenhängen, der möglicherweise einen negativen sterischen Einfluss ausübt. Zwar handelte es sich bei der Harzanknüpfung zu Beginn der Synthese ebenfalls um eine Mitsunobu-Reaktion (Kapitel 4.2), hier war jedoch nur ein kleines Fragment involviert und die acide Komponente befand sich im Gegensatz zu diesem Fall in Lösung.

Als Alternative zur Mitsunobu-Reaktion wurde die Veresterung der Carbonsäurefunktion durch Alkylierung mit Alkyl- und Arylmethylhalogeniden untersucht.^[166] Die Standard-Veresterungsmethode mit Alkoholen unter DMAP-Katalyse^[123] sollte anhand der in Kapitel 4.3 gemachten und literaturbekannteren^[124] Erfahrungen zu Racemisierung und Nebenreaktionen führen und wurde deshalb nicht in Betracht gezogen. Die Aktivierung der Carbonsäure durch Überführung in das nucleophile Cäsiumsalz und Umsetzung mit Bromessigsäurederivaten **165** und **166** bei Raumtemperatur lieferte praktisch quantitativ die gewünschten Ester (Tabelle 3, Einträge 6 und 7).



Eintr.	Edukt	Bedingung	R^1	$\text{Y}-\text{R}^2$	Produkt	Umsatz (%)
1	152d	86 , DEAD, PPh ₃ , DMF, 2 x 6 h			163a	-
2	152d	86 , DIAD, PBu ₃ , DMF, 2 x 6 h			163a	-
3	152c	86 , DEAD, PPh ₃ , DMF, Molekular-Sieb 4Å, 44 h			163b	Spuren
4	152d	159 , DIAD, PBu ₃ , THF, 2 x 6 h			163c	-
5	152d	164 , DIAD, PBu ₃ , THF, 2 x 6 h			163d	-
6	152c	165 , Cs ₂ CO ₃ , DMF, 15 h			163e	> 95

Tabelle 3: Fortsetzung umseitig

Eintr.	Edukt	Bedingung	R ¹	R ²	Produkt	Umsatz (%)
7	152c	Cs ₂ CO ₃ , 166 , DMF, 15 h			163f	> 95
8	152c	1) Cs ₂ CO ₃ , DMF, H ₂ O, 2) 167 , DMF, 24 h			163g	90
9	152c	1) Cs ₂ CO ₃ , DMF, H ₂ O, 2) 168 , KI, DMF, 24 h			163h	70
10	152c	1) Cs ₂ CO ₃ , DMF, H ₂ O, 2) 169 , KI, DMF, 24 h			163i	75
11	151d	1) Cs ₂ CO ₃ , DMF, H ₂ O, 18 h; 2) 169 , KI, 50 °C, 2 x 24 h			163j	84
12	151c	170 , PyAOP (5), (5), HOAt (5), DIEA (20), NMP, 36 h			163k	76

Tabelle 3 (Fortsetzung): C-terminale Anknüpfung von Bausteinen R²

Ein nahezu vergleichbares Ergebnis wurde mit dem Arylmethylbromid **167** durch getrennte Voraktivierung und anschließender Alkylierung erreicht (Eintrag 8). Die weniger aktiven Chloride **168** und **169** lieferten trotz Zugabe von katalytischen Mengen KI nur Umsätze von ca. 70% (Einträge 9 und 10). Durch Erhitzen auf 50 °C konnte die Ausbeute jedoch merklich gesteigert werden (Eintrag 11). Diese Methode eignet sich jedoch nicht zur Anknüpfung des Diketopiperazin-Bausteins **86**, da diverse Versuche zur Überführung der Hydroxy-Funktion in ein elektrophiles Tosylat^[142], Mesylat und Iodid nicht gelangen, wobei sich **86** bei diesen Reaktionen zersetzte. Mit PyAOP wurden ein Amin bzw. die Aminosäure **170** eingeführt und auf diese Weise das Amid **163k** gebildet (Eintrag 12). Die erreichten 76% Umsatz, ohne feststellbare Racemisierung, ließen sich durch Verwendung anderer Reagenzien wie CIP/HOAt^[113] und den Mukaiyama-Redox-Bedingungen^[120] nicht steigern. Resultate in dieser Höhe sind aber auf der letzten Stufe durchaus akzeptabel auch da sich zeigte, dass sich die jeweils nicht umgesetzte Säure in der Regel vom Produkt abtrennen lässt. In kombinatorischer Hinsicht ist dies interessant, da auf diese Weise pro durchgeführte Synthese ein Pentamer **91** und das zugehörige Tetramer **92**, also zwei potentiell aktive Verbindungen, zugänglich sind.

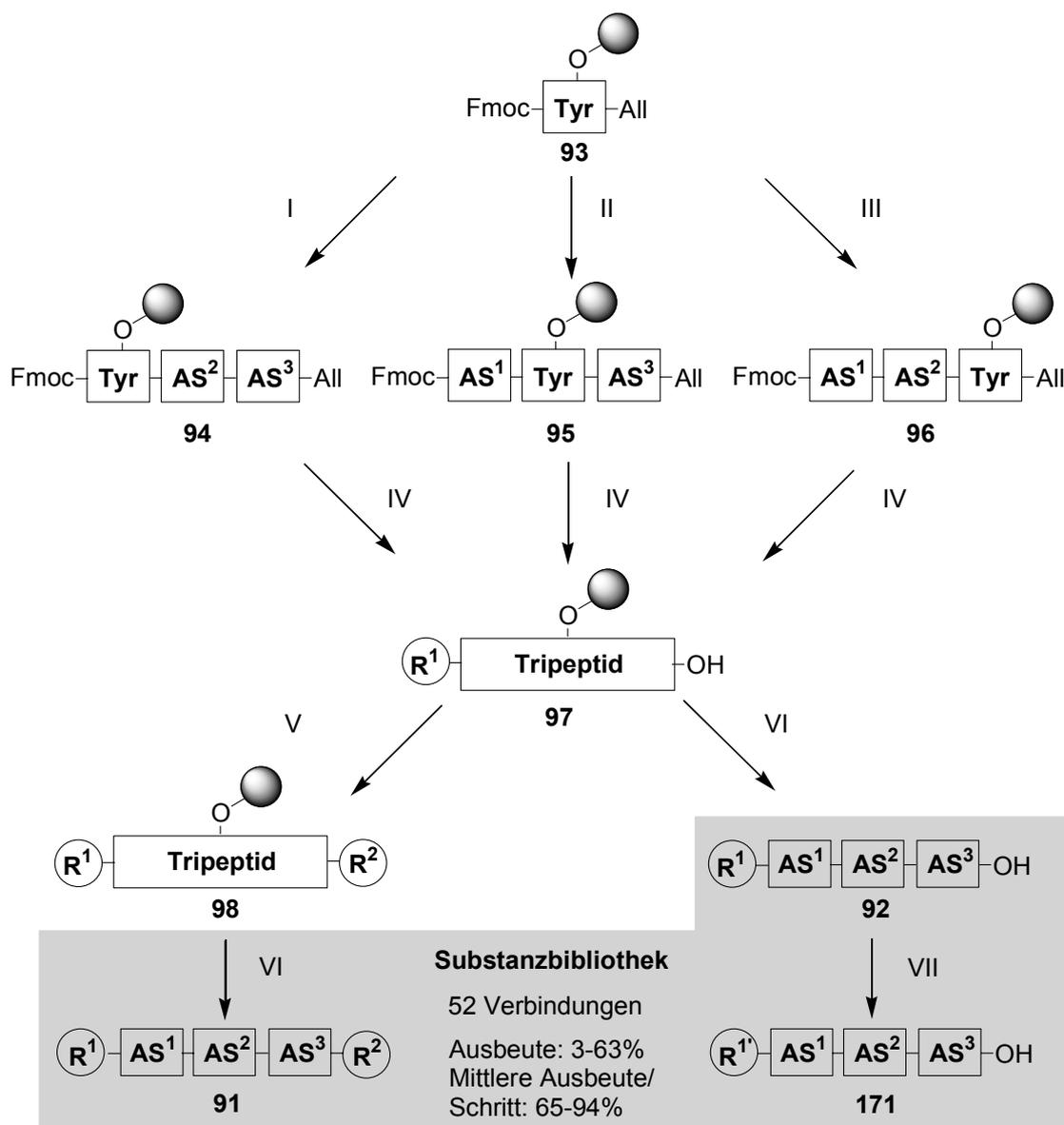
Fazit: An die festphasengebundene Tripeptideinheit ließen sich nach *N*-terminaler Deblockierung erfolgreich Zimtsäure-, Hydrozimtsäurederivate und Benzylchloroformiat anbinden. Bei einem Zimtsäurederivat trat bei der Kupplung *E/Z*-Isomerisierung auf, die durch Optimierung der Reaktionsbedingungen vermieden werden konnte. Nach Freisetzung des *C*-Terminus wurden polare Bausteine an dieser Position durch alkylierende Veresterung und konventionelle Amidknüpfung mit Aminen eingeführt.

4.6 Aufbau der Substanzbibliothek

Nach Ausarbeitung der einzelnen Syntheseschritte und der Darstellung der hierzu erforderlichen Bausteine wurde die kombinatorische Festphasensynthese von Peptidcinnamin *E*-Analoge als potentielle FTase-Inhibitoren durchgeführt. Aufgrund der Absicht, auf parallelsynthetischem Weg diese Bibliothek, bestehend aus reinen, definierten Verbindungen, zu erstellen und diese Substanzen umfangreichen biologischen Tests zu unterziehen, war die Dimension der Bibliothek von vorneherein begrenzt. Demzufolge mussten aus den Millionen von Möglichkeiten eine geeignete Auswahl getroffen werden. Hierbei diente das peptidische Naturstoffgerüst als hauptsächliche Orientierung, wobei aber nicht zuletzt Strukturelemente anderer Farnesyltransferase-Inhibitoren wie z. B. eine Imidazol-Gruppe Berücksichtigung fanden. Somit wurden der aromatische Charakter der Seitengruppen des Tripeptids, sowie der lipophile, aromatische Rest R^1 unter Variation beibehalten, auf den polaren Rest R^2 aber in einem Großteil der Fälle verzichtet, als erste biologische Tests auf bemerkenswerte Aktivität von Tetramerverbindungen hindeuteten (Schema 25). Bezüglich der Synthese wurde bei 60% der Einzelverbindungen die Festphasensynthese in gebräuchlichen Glas- oder Polyethylenreaktoren auf Standard-Festphasenschüttlern unter manueller Reagenzzugabe und manuellen Waschschritten durchgeführt, während in den übrigen Fällen ein thermostatischer und mit einer automatischen Waschfunktion ausgestatteter Quest 210 Synthesizer der Firma Argonaut Technologies zum Einsatz kam. Ausgehend von dem an Wang-Harz-gebundenen Tyrosin **93** mit Beladungsgraden zwischen 0.40-0.53 mmol/g wurden in einer ersten Etappe die zentralen Tripeptide **94**, **95** und **96** via *C*-terminaler (Schema 25, Weg I), zweier Varianten einer Kombination von *N*-und *C*-terminaler (Weg II) und *N*-terminaler (Weg III) Verlängerung gemäß den in Kapitel 4.3 ausgearbeiteten Deblockierungs- und Kupplungsmethoden aufgebaut. Anschließend wurden nach Fmoc-Spaltung verschiedene lipophile Reste R^1 angeknüpft, wobei abhängig vom jeweiligen Baustein unterschiedliche Reagenzien Anwendung fanden (Schema 25, IV, siehe hierzu auch Kapitel 4.4.2). Darauf folgte die Freisetzung des *C*-Terminus mit Pd^0 -Katalyse. Auf dieser Stufe wurden ca. 75% der Ver-

bindungen als Tetramere **92** mit TFA/Fänger-Mischung abgespalten. Obwohl mit Hydrid-Donor- und schwefelhaltigen Fängerreagenzien die besten Abspaltungsergebnisse erzielt wurden (Kapitel 4.2), wurde wegen partieller Reduktion von Doppelbindungen durch die Silylhydride und generell hohem Abtrennungsaufwand der im Überschuß eingesetzten Fänger auf diese speziellen Reagenzien in den meisten Fällen verzichtet. Mehrfache Umsetzung mit einer Kombination von TFA/H₂O lieferte die Produkte in akzeptablen Mengen und Ausbeuten und erleichterte die Reinigung erheblich. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde der jeweilige Rückstand einer Reinigung durch präparative HPLC, weitgehend im Hochdurchsatz-Modus, unterzogen.

Durch Pd-katalysierte Hydrierung von Zimtsäurefragmenten mit Wasserstoff liessen sich ausgehend von **92** weitere Analoga **171** mit gesättigten Resten R¹ darstellen, wobei wegen des sauberen und quantitativen Reaktionsverlaufs keine weitere Reinigung erforderlich war. Diese Reaktion konnte auch problemlos an dem Rohprodukt nach der Abspaltung durchgeführt werden. Ausgehend von den polymergebundenen Tetrameren **97** wurden Reste R² durch Amidknüpfung und Alkylierung angeknüpft (siehe hierzu Kapitel 4.5), was die Pentamere **98** lieferte. Saure Abspaltung und HPLC-Reinigung lieferte die Verbindungen **91**. Somit wurde eine Bibliothek von 52 Pepticcinnamin-Analoga durch 8-11-stufige Synthese am polymeren Träger mit Gesamtausbeuten zwischen 3% und 63% über alle Stufen erhalten, was einer mittleren Ausbeute von 65-94% je Stufe entspricht (im Regelfall werden über 80% erreicht). Die erzielten Reinheiten liegen bis auf wenige Ausnahmen bei > 90%. Die erhaltenen Substanzen lassen sich in drei Untergruppen unterteilen, die sich hauptsächlich durch ihre zugrundeliegende Tripeptidgerüste unterscheiden, was von der unterschiedlichen Darstellungsweise (Schema 25, Wege I-III) herrührt. Bei der Sub-Bibliothek 1 (Tabelle 4) wurde das Naturstoffrückgrat konserviert, wobei lediglich das zentrale DOPA-Derivat durch ein methyliertes Tyrosin substituiert worden war. Variiert wurden zwei Parameter, lipophiler Rest R¹ und polarer Kopf R². Neben unterschiedlich verzweigenden, langkettigen Resten R¹ (Tabelle 4, Einträge 1-12), wurden kurze aromatische Anker eingebaut (Einträge 14-24). Als Reste R² wurden polare cyclische Gruppen (Einträge 1, 2 und 16), Aminosäuren (Einträge 14, 15 und 20) und Hydroxyessigsäuregruppen (Einträge 21 und 22) eingeführt. Demgegenüber lieferten einige Anbindungsversuche des 5. Bausteins nur Produktpuren (Eintrag 6), ausschließlich nicht umgesetztes Edukt (Einträge 9 und 11) oder ein Abbauprodukt der gewünschten Zielverbindung (Eintrag 7).



- I:** a) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃ oder NMA; b) **AS²**All, HATU; c) Pd(PPh₃)₄, NMA; d) **AS³**All, PyAOP
- II:** Variante A: a) Piperidin; b) Fmoc**AS¹**OH, DIC/HOAt; c) Pd(PPh₃)₄, NMA; d) **AS³**All, PyAOP
 II: Variante B: a) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃; b) **AS³**All; PyAOP, c) Piperidin; d) Fmoc**AS¹**OH, HATU
- III:** a) Piperidin; b) Fmoc**AS²**OH, HATU; a) Piperidin; b) Fmoc**AS¹**OH, HATU oder DIC/HOAt
- IV:** a) Piperidin; b) **R¹CO₂H**, HATU (R¹ = alkyl) oder **R¹CO₂H**, PyAOP, DMAP (R¹ = alkenyl);
 oder **R¹COCl**, DMAP, HOAt (R¹ = OBn); c) Pd(PPh₃)₄, Morpholin
- V:** XR², PyAOP (X = NH₂) oder XR², Cs₂CO₃ (X = Hal)
- VI:** TFA, Allyl-Scavenger: H₂O oder Et₃SiH oder *i*Pr₃SiH oder EtSMe
- VII:** Pd/C, H₂

Schema 25: Kombinatorische Festphasensynthese der Substanzbibliothek

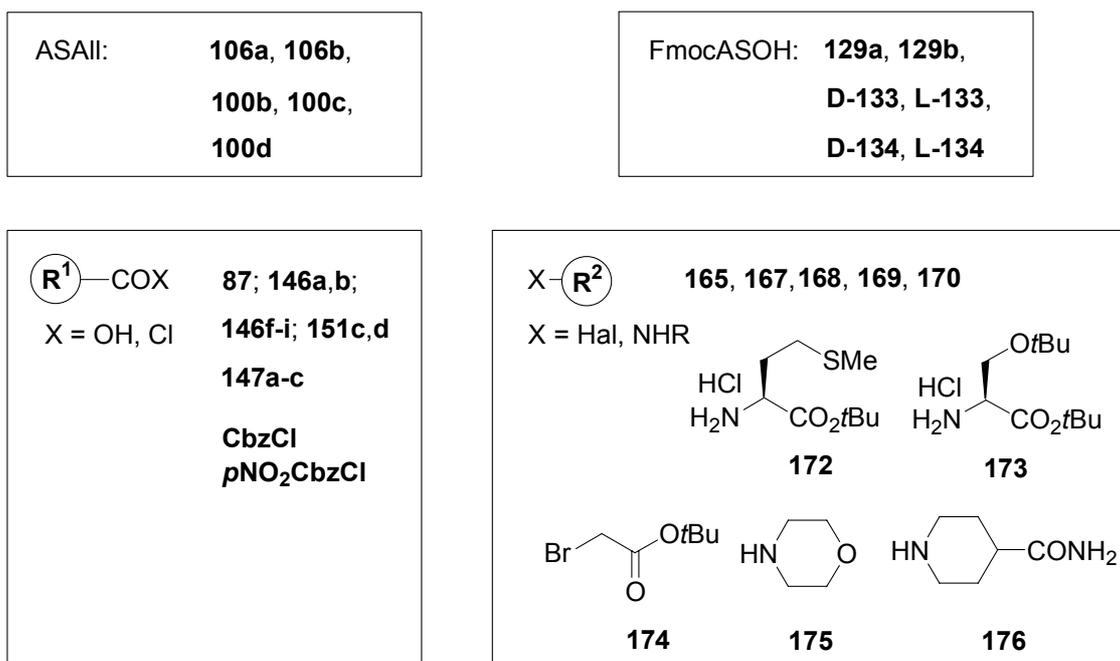
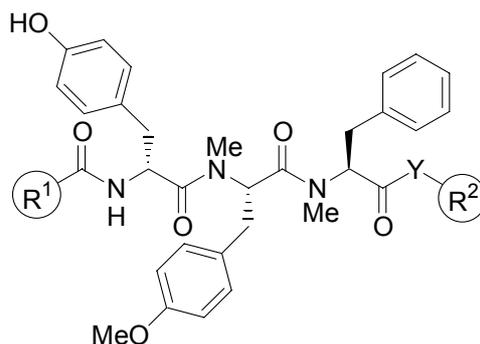


Abbildung 7: Verwendete Synthesebausteine für die Festphasensynthese

Als Erklärungen können im Fall der Pyridin-Gruppe (Eintrag 6) Reinigungsverluste, beim Methionin (Eintrag 7) dessen Labilität^[95] und im Fall des Serins (Eintrag 9) ein zu starker sterischer Anspruch der zwei *tert*-Butyl-Gruppen im Edukt-Baustein **173** (Abbildung 7) angeführt werden. Demzufolge ist das Scheitern dieser Reaktionen weitgehend auf individuelle Schwierigkeiten zurückzuführen und spricht nicht gegen die Reaktionen als solche.

Bei der Teilbibliothek 2, dargestellt über Weg IIa in Schema 1 (Einträge 1, 3, 5, 6-8, Tabelle 5) bzw. Weg IIb in Schema 1 (Einträge 2 und 4, Tabelle 5) wurden ausschließlich Tetramere des Typs **92** synthetisiert. Die Erfahrungen aus Kapitel 4.3 scheinen hier bestätigt zu werden, da Tripeptid-Aufbau über Weg IIb zu Racemisierung, also einem Isomerengemisch führt, das ungünstigerweise auf dieser Stufe nicht trennbar war (Einträge 2 und 4). Ferner wird über Weg IIa bei *N*-methylierten Verbindungen kein Produkt detektiert (Einträge 1, 3 und 5), während unmethylierte Analoga (Einträge 6-8) problemlos die gewünschten Produkte lieferten. An Position R¹ wurden Benzyloxycarbonyl-, Hydrocinnamoyl- und *n*-Pentylhydrocinnamoylreste angefügt. Weiterhin wurden die Konfiguration an AS¹ und die entsprechende Seitenkette variiert sowie die *N*-Methylierung und die lipophile Seitengruppe R².

Teilbibliothek 1



Eintr.	Verb.	R^1	R^2	Ausbeute (Ausb./Schritt) [%]	Reinheit
1	91/1			14 (80)	> 95
2	91/2			10 (77)	> 95
3	92/1			12 (76)	> 95
4	171/1			14 (78)	> 95
5	92/2			13 (77)	> 95
6	91/3			- ^a	-
7	91/4			- ^b	-
8	92/3			13 (77)	95
9	91/5			- ^b	-
10	92/4			18 (81)	> 95

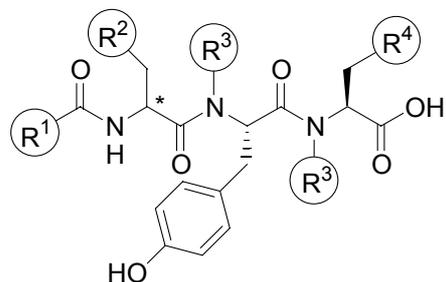
Tabelle 4 (Fortsetzung umseitig)

Eintr.	Verb.	R^1	R^2	Ausbeute (Ausb./Schritt) [%]	Reinheit
11	91/6			- ^b	-
12	92/5			10 (75)	> 95
13	92/6			11 (76)	> 95
14	91/7			10 (77)	> 95
15	91/8			5 (72)	> 95
16	91/9			13 (78)	60
17	92/7			5 (69)	> 95
18	92/8			13 (77)	> 95
19	92/9			13 (77)	> 95
20	91/10			8 (76)	91
21	91/11			28 (87)	> 95
22	91/12			40 (90)	> 95
23	91/13			31 (85)	> 95
24	92/10			36 (88)	95

^a Zielprodukt detektiert, jedoch nur in Spuren isoliert; ^b Zielprodukt nicht detektiert.

Tabelle 4 (Fortsetzung): Aufstellung der synthetisierten Verbindungen (Teilbibliothek 1, dargestellt über Weg I, Schema 25)

Teilbibliothek 2

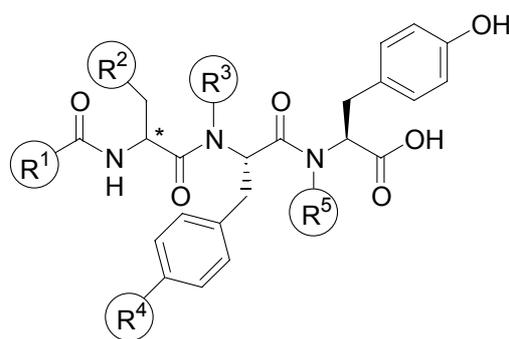


Eintr.	Verb.	R ¹	R ²	* R ³	R ⁴	Ausb. (Ausb./ Schritt) [%].	Reinh.
1	92/11			D Me		- ^a	-
2	92/12			L Me		16 (85)	Isom. Gem. 7 : 3
3	92/13			L Me		- ^a	-
4	92/14			L Me		50 (92)	Isom.- Gem. 7 : 3
5	92/15			D Me		- ^a	-
6	92/16			D H		14 (78)	> 95
7	92/17			D H		22 (83)	> 95
8	92/18			D H		21 (82)	D/L 1 : 1 (AS ³)

^a Produkt nicht detektiert

Tabelle 5: Aufstellung der synthetisierten Verbindungen (Teilbibliothek 2, dargestellt über Weg II, Schema 25)

Teilbibliothek 3



Eintr.	Verb.	R ¹	R ²	*	R ³	R ⁴	R ⁵	Ausb. (Ausb./ Schritt) [%]	Reinh.
1	92/19			D	Me	H	Me	- ^a	-
2	92/20			D	H	H	Me	- ^a	-
3	92/21			D	Me	H	H	14 (78)	78
4	92/22			D	H	H	H	18 (81)	> 95
5	92/23			D	H	OH	H	21 (82)	> 95
6	92/24			L	H	OH	H	31 (86)	> 95
7	92/25			L	H	H	H	18 (81)	> 95
8	92/26			D	H	H	H	31 (86)	> 95
9	92/27			D	Me	H	Me	- ^a	-
10	92/28			D	Me	H	H	24 (84)	> 95

Tabelle 6 (Fortsetzung umseitig)

Eintr.	Verb.	R ¹	R ²	*	R ³	R ⁴	R ⁵	Ausb. (Ausb./ Schritt) [%]	Reinh.
11	92/29			L	Me	H	H	24 (84)	85
12	92/30			L	H	H	H	24 (84)	95
13	92/31			D	H	H	H	63 (94)	> 95
14	92/32			D	Me	H	H	21 (82)	> 95
15	92/33			L	Me	H	H	30 (86)	> 95
16	92/34			D	H	H	H	24 (84)	> 95
17	92/35			L	H	H	H	19 (81)	93
18	92/36			D	H	H	H	15 (79)	95
19	92/37			L	H	H	H	3 (65)	E/Z- Gem. 1 : 1
20	92/38			D	H	H	H	13 (77)	> 95
21	92/39			D	H	H	H	38 (89)	90
22	171/2			D	H	H	H	30 (86)	95
23	92/40			D	H	H	H	34 (87)	> 95

Tabelle 6 (Fortsetzung umseitig)

Eintr.	Verb.	R ¹	R ²	*	R ³	R ⁴	R ⁵	Ausb. (Ausb./ Schritt) [%]	Reinh.
24	92/41			D	H	H	H	21 (82)	E/Z- Gem. 1.7 : 1
25	92/42			D	H	H	H	10 (75)	E/Z- Gem. 1 : 2.5
26	92/43			L	H	H	H	13 (77)	89
27	92/44			D	H	H	H	28 (85)	E/Z- Gem. 1.7 : 1
28	92/45			L	H	H	H	21 (82)	91
29	92/46			D	H	H	H	10 (75)	> 95
30	92/47			L	H	H	H	11 (76)	E/Z- Gem. 1.6 : 1

^a Produkt nicht detektiert

Tabelle 6: Aufstellung der synthetisierten Verbindungen (Teilbibliothek 3, dargestellt über Weg III, Schema 25)

Bei der zahlenmäßig umfangreichsten Substanzbibliothek 3 wurden sechs strukturelle Parameter jeweils variiert, wobei die Reste R¹, R² und R⁴ hervorzuheben sind, neben der Modifizierung der AS¹-Konfiguration und des Rests R³.

Die Synthese gelang hier weitgehend reibungslos. Lediglich die Darstellung von an Position R⁵ methylierten Verbindungen scheiterte. (Tabelle 6, Einträge 1, 2 und 9). Bei einigen Beispielen (Tabelle 6, Einträge 19, 24, 25, 26, 30) trat trotz reiner *E*-Konfiguration der verwendeten Bausteine bei der Anknüpfung benzyloxy- und *para*-phenylsubstituierter Zimtsäuren eine unerwartete *E/Z* Isomerisierung auf, was durch LC-MS und NMR-Analyse des Produktgemischs eindeutig belegt werden konnte: Beide Substanzen weisen identische

Molekülmasse und Fragmentierungsmuster auf, während in den ^1H -NMR-Spektren die Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen der zwei getrennte Olefin-Dubletts unterschiedlicher Intensität mit $J_{\text{trans}} = 15.8 \text{ Hz}$ (*E*-Isomer) und $J_{\text{cis}} = 12.8 \text{ Hz}$ (*Z*-Isomer) mit Vergleichsspektren von *E*- und *Z*-konfigurierten Zimtsäureamiden hinsichtlich chemischer Verschiebung und Kopplungskonstanten übereinstimmen.^[167]

In der Literatur ist eine derartige Umlagerung von Zimtsäurederivaten unter Lichteinfluß beschrieben,^[168] der von Donor-Substituenten am Aromaten^[168] sowie Brønstedt- und Lewis-Säuren^[169] begünstigt wird und präparativ genutzt werden kann.^[170] Da dieser Effekt von den Kupplungsbedingungen abhängig ist, scheint er auf dieser Stufe aufzutreten und da nicht explizit unter Lichtausschluß gearbeitet wurde, wäre ein photo-induzierter Umlagerungsmechanismus vorstellbar. Dies überrascht, da die verwendeten, rein *E*-konfigurierten Zimtsäurebausteine auch nach längerer Lagerung im Sonnenlicht keine merkliche Photolabilität aufweisen.

Obwohl sich zeigt, dass die ausgearbeiteten Methoden nicht universell auf alle Verbindungen gleichermaßen erfolgreich anwendbar sind, konnten in 85% der Fälle die gewünschten Zielverbindungen erhalten werden. In 85% der Fälle wurden Reinheiten von über 80% erreicht, in 70% der Fälle wurden Reinheiten von 95% und mehr erreicht.

Fazit

Die in den vorliegenden Kapiteln entwickelte Festphasensynthese lieferte eine Substanzbibliothek von Peptidcinnamin E-Analoga wobei weitgehend ausreichende Mengen und hohe Reinheiten für die nachfolgenden biologischen Tests erreicht wurden.

4.7 Durchführung der biologischen Tests

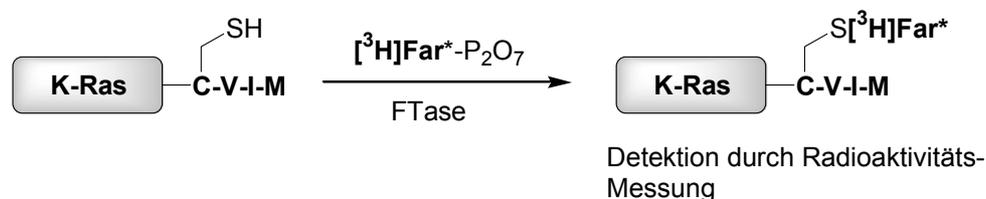
Die Verbindungen der Bibliothek und einige weitere synthetisierte Substanzen wurden in verschiedenen Assays gegenüber Farnesyltransferase, GeranylGeranyltransferase I und transformierten Zelllinien getestet.

4.7.1. Inhibition der Farnesyltransferase

Die nachfolgend beschriebenen Tests sollten quantitative Aussagen hinsichtlich der Inhibitionsfähigkeit der Naturstoffanaloga gegenüber der Farnesyltransferase liefern. Weitere, kinetische Studien bezüglich FTase sollten Aufschluß über den Inhibitionsmechanismus der Verbindungen geben. Hierzu dienten drei unterschiedlich Assays, die auf drei Varianten der FTase (Mensch, Ratte, Hefe) basieren.

4.7.1.1 Radioaktivität-basierter Inhibitionstest

In diesem Standard-FTase-Assay^[171] wird ein Tritium-markierter Farnesylrest FTase-katalysiert auf ein K-Ras-Protein übertragen (Schema 26). Anhand der Radioaktivität im ausgefällten Protein lässt sich der Inhibierungsgrad ermitteln.



Schema 26: Radioaktiver Assay zur Inhibition der Farnesyltransferase (FTase)

Hierbei wurde Human-FTase aus Plazenta verwendet, bei K-Ras handelt es sich um die Ras-Variante, deren Gen-Mutation in menschlichen Tumorzellen am weitaus häufigsten auftritt. Dieser Hochdurchsatz-Test im 96-Well-Mikrotiterplatten-Format wurde in Zusammenarbeit mit Michael Bate, AstraZeneca UK, Alderley Park durchgeführt, der freundlicherweise auch Enzym und K-Ras zur Verfügung stellte. Bei diesem Ansatz wurden Enzym, Ras-Protein und Inhibitor vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des FPP-Substrats gestartet. In einem ersten Screening-Durchgang wurden bei Inhibitorkonzentrationen von 30 $\mu\text{mol/l}$ gearbeitet. Verbindungen, deren IC_{50} -Wert oberhalb dieses Grenzwerts lag, wurden nicht weiter getestet.

Von den übrigen wurden Verdünnungsreihen mit 3 Messungen pro Konzentration aufgenommen und durch graphische Auftragung die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt. Hierbei wiesen 10 Verbindungen Aktivitäten unterhalb von 20 $\mu\text{mol/l}$ auf, hiervon zeigten 7 Vertreter 50% Inhibition im einstelligen mikromolaren Bereich, wobei bis zu 1 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurden. Die aktivsten Verbindungen sind in Abbildung 8 dargestellt, eine Gesamtaufstellung der Ergebnisse des Inhibitionstests ist aus Tabelle 8 ersichtlich.

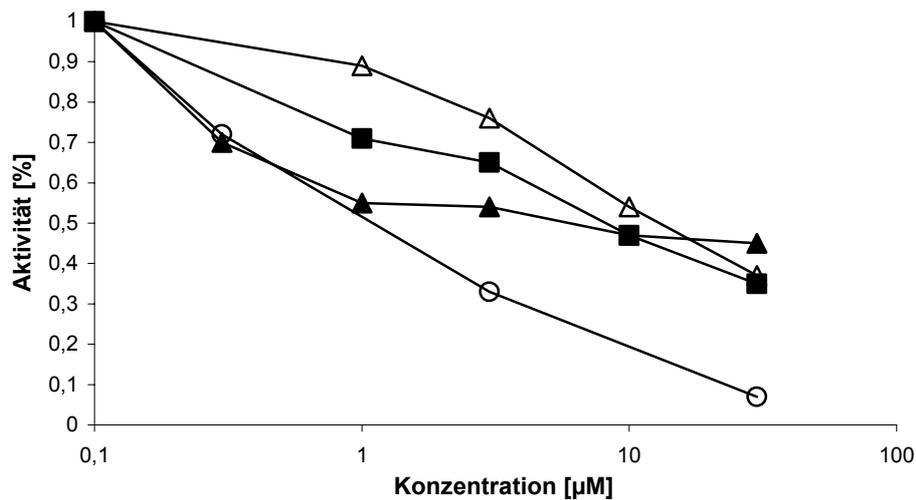
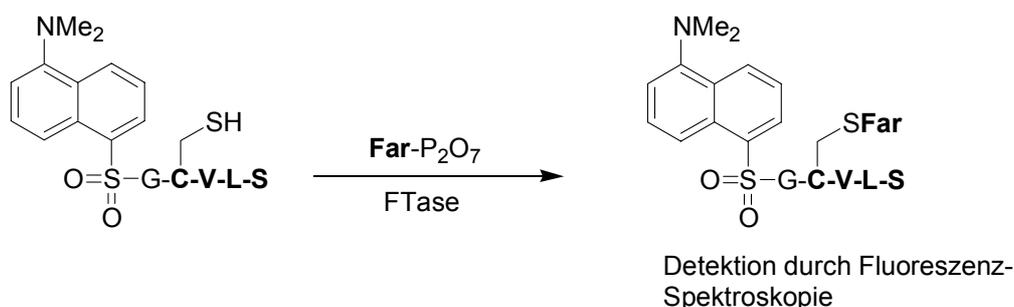


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven einer Auswahl getesteter Verbindungen; **171/1** (▲), **92/35** (○), **92/8** (■), **92/9** (△).

4.7.1.2 Fluoreszenz-basierter Inhibitionstest

Hierbei katalysiert die FTase die Übertragung des Farnesylrests vom FPP-Substrat auf ein Dansyl-markiertes Peptid welches die CAAX-Box von H-Ras imitiert (Schema 27).^[172] Da durch den Farnesyltransfer die räumliche Umgebung des Dansyl-Fluoreszenzfarbstoffs verändert wird, so dass die Quantenausbeute um ein Vielfaches ansteigt und sich die Emissionswellenlänge deutlich zu niedrigeren Wellenlängen verschiebt, lässt sich selektiv die Produktbildung detektieren. Aufgrund der Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Fluoreszenzzunahme kann der Reaktionsverlauf in Abhängigkeit von der Inhibition fluoreszenzspektroskopisch vermessen werden.



Schema 27: Fluoreszenz-basierter Assay zur Inhibition der Farnesyltransferase (FTase)

4.7.1.2.1 Screening von Manumycin-Analoga

In einem Nebenprojekt dieser Arbeit wurden eine Reihe von Analoga^[173] **177** und **178** (Tabelle 7) des natürlichen FTase-Inhibitors Manumycin A **14**, gegenüber Hefe-FTase getestet. Diese Verbindungen wurden von Dipl.-Chem. O. Block, Abteilung Prof. Dr. H.-J. Altenbach, Univ. Wuppertal zur Verfügung gestellt. In einem parallelen Ansatz wurden diese Verbindungen von Dipl.-Chem. C. Arenz, Abteilung Prof. Dr. A. Giannis, Univ. Karlsruhe auf ihre Inhibition gegenüber der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase) untersucht. Das Ziel dieser Gemeinschaftsarbeit war herauszufinden, ob Manumycin und strukturelle Analoga in der Lage sind, sowohl die FTase als auch die N-SMase zu inhibieren um damit die vielfältigen biologischen Eigenschaften des Naturstoffs aufzuklären. Die Funktion des Enzyms N-SMase wird mit Prozessen in Verbindung gebracht, die Entzündungen, den Zellcyclus und die Apoptose steuern.^[174]

Bei diesem fluoreszenzbasierten Assay gemäß einer neueren Variante^[142] wurden Enzym, Substratpeptid und Inhibitor vorgelegt, die Reaktion durch FPP-Zugabe gestartet und mit einem LS-50B-Fluoreszenzspektrometer die einzelnen Messpunkte nacheinander vermessen. Die Farnesyltransferase von *S. cerevisiae*, überexprimiert aus *E. coli*, wurde freundlicherweise von S. Vollmer, Abteilung von Professor Dr. J. Rétey, Univ. Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Bei einem Vergleich der erhaltenen Inhibitionsergebnisse mit jenen von C. Arenz^[175] für N-SMase werden unterschiedliche Wirkmechanismen deutlich: Verbindungen **14**, **177a** und **178b** inhibieren die FTase reversibel, im oberen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich, während N-SMase von diesen irreversibel blockiert wird (Tabelle 7).

Eintrag	Verbindung ^a	FTase ^b Inhibition IC ₅₀ [μM]	Neutrale Sphingomyelinase ^c N-SMase Inhibition ^d [%]
1	14	19.4	34
2	177a	0.85	10
3	177b	8.4	90
4	177c	- ^e	- ^e
5	178a	- ^e	- ^e
6	178b	- ^e	- ^e
7	178c	- ^e	- ^e

^a Verbindung **14** wurde von Sigma bezogen, Verbindungen **177** und **178** wurden von O. Block, Prof. Altenbach, Univ. Wuppertal zur Verfügung gestellt; ^b Hefe-FTase [freundlicherweise von S. Vollmer, Prof. Rétey zur Verfügung gestellt]; ^c die Inhibitionstests an der neutralen Sphingomyelinase wurden von C. Arenz, Prof. Giannis, Univ. Karlsruhe durchgeführt; ^d bei 50 μM InhibitorKonzentration; ^e keine beobachtete Inhibitionswirkung.

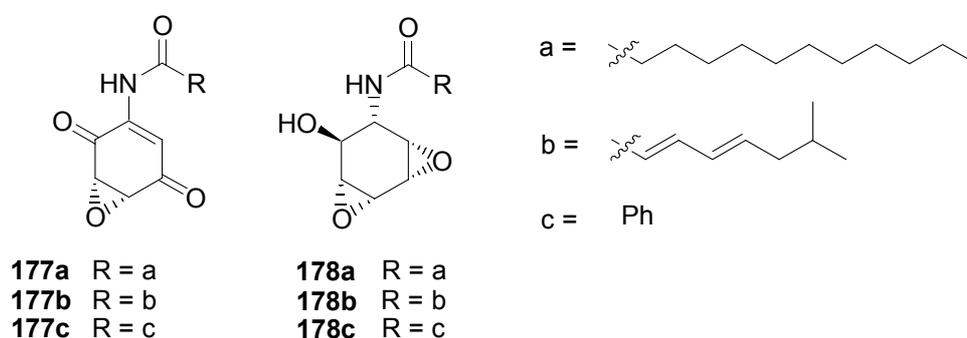


Tabelle 7: Inhibition von Hefe-FTase und N-SMase durch Manumycin A und Analoga.

Demgegenüber zeigen Analoga **177c** und **178a-c** gegenüber beiden Enzymen keinen Effekt. Offenbar wird eine gewisse Selektivität durch den Charakter der lipophilen Kette erzielt, da **177a** mit gesättigter Rest gegenüber FTase die beste Wirkung erzielt. Demgegenüber ist dies ein vergleichsweise schwacher N-SMase-Inhibitor, während **177b** mit ungesättigtem Rest die stärkste Inhibition hervorruft.

Als wichtigste Erkenntnis dieses Projektes konnte festgestellt werden, dass Manumycin A und bestimmte Analoga neben der FTase auch N-SMase inhibieren und deshalb die biologische Aktivität zumindest partiell mit der N-SMase korreliert scheint.^[176]

4.7.1.2.2 Screening der Substanzbibliothek

Die unter 4.7.1.2.1 durchgeführte lineare Screening-Technik eignet sich hervorragend für eine kleine Anzahl von Testsubstanzen. Angesichts der Größe der dargestellten Substanzbibliothek und der Absicht, umfangreiche kinetische Studien durchzuführen, war jedoch eine parallele

Arbeitsweise angebracht, vereint mit ökonomischer Miniaturisierung des Assays. Wie in Kapitel 4.7.1.2.1 wurde das standardisierte 96-Well-Mikrotiterplattenformat gewählt. Entsprechend wurde auf ein geeignetes Platten-Lesegerät in Form des Ascent FL Fluorometers zurückgegriffen. Aus den vorgegeben Filterpaaren für Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde die Kombination 355 nm (λ_{ex})/460 nm (λ_{em}) verwendet, die zwar von den optimalen Werten 340 nm (λ_{ex})/505 nm (λ_{em}) abweicht, das UV-Spektrum der Reaktionsmischung (nicht gezeigt) belegt aber, dass der Intensitätsverlust gering ist und dass auf diese Weise eindeutig zwischen Produkt und Edukt differenziert werden kann.

Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biochem. B. Popkirova, Abteilung Dr. J. Kuhlmann, MPI Dortmund, die auch die in diesen Tests verwendete, aus *E. coli* überexprimierte, Ratten-FTase zur Verfügung stellte. Hierzu wurden Dansylpeptid, FPP und Inhibitor in den entsprechenden Plattenvertiefungen vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe der FTase gestartet. Aufgrund dieser Vorgehensweise wurde eine Vorinkubation durch den Inhibitor oder eine Substratkomponente unterbunden. Die Verwendung der Dispenserfunktion des Geräts zur Enzym-Zugabe ermöglichte die vollautomatische Parallel-Messung der gesamten 96 Felder.

Bei einem ersten Grob-Screening wurden die 52 Mitglieder der Substanzbibliothek durchgängig bei 50 μM Inhibitorkonzentration vermessen und Verbindungen mit weniger als 50% Inhibition ausgesondert. Von den aktiven Inhibitoren wurden Dosis-Wirkungskurven mit 4-6 Messpunkten pro Konzentration aufgenommen und die entsprechenden IC_{50} -Werte graphisch ermittelt (siehe hierzu Beispielverbindungen in Abbildung 9).

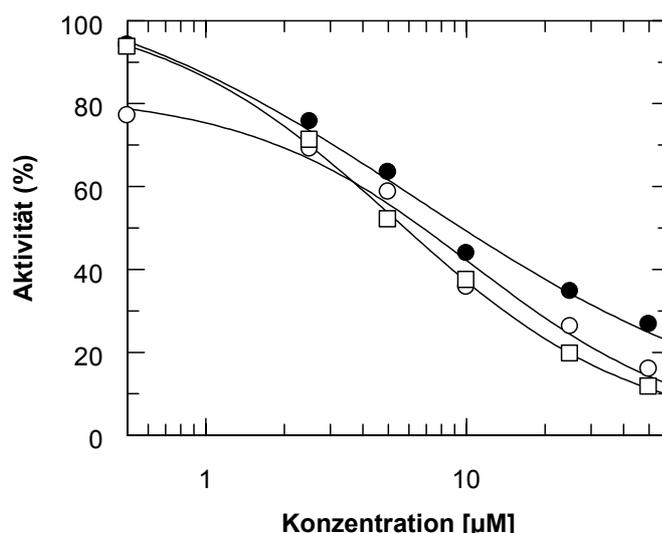


Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurven einer Auswahl getesteter Verbindungen; 92/8 (\square), 92/43 (\circ), 92/32 (\bullet).

Hiervon wiesen 25 Verbindungen Aktivitäten unterhalb von 40 $\mu\text{mol/l}$ auf, 19 unterhalb von 20 $\mu\text{mol/l}$ und 13 zeigten Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich, mit 5.3 $\mu\text{mol/l}$ als höchste Aktivität. Eine Aufstellung der IC_{50} -Werte sind in Kapitel 4.7.4 Tabelle 8 ersichtlich, wo auch eine ausführliche Diskussion erfolgt.

4.7.1.2.3 Messung der Inhibitionskinetik

Die in Kapitel 4.7.1.2.2 angewendete Parallelmesstechnik wurde nun für die kinetischen Messungen verwendet. Hierbei wurden bei drei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen jeweils die Konzentration einer Substratkomponente konstant gehalten, während die der anderen variiert wurde. Aus einer reziproken Auftragung von $1/\text{Reaktionsgeschwindigkeit}$ gegen $1/\text{Substratkonzentration}$ nach Lineweaver-Burk kann anschließend auf den Inhibitionsmechanismus^[177] der variierten Komponente geschlossen werden: Bei einem kompetitiven Mechanismus muss bei sehr hoher Substratkonzentration unabhängig von der Inhibitorkonzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden, so dass sich alle Geraden in einem Punkt der Ordinate schneiden. Aus den besten der im vorhergehenden Screening ermittelten Inhibitoren wurden exemplarisch die naturstoffnahen Verbindungen **92/8** und **92/5**, sowie die histidinhaltigen Inhibitoren **92/43**, **29/32** und **92/28** ausgewählt, die repräsentativ für die einzelnen Strukturklassen der Bibliothek stehen.

Die Lineweaver-Burk-Auftragungen dieser fünf Inhibitoren, jeweils für FPP- und Dansylpeptidkonzentration-Variation, sind in den Abbildung 10 und 11 ersichtlich. Während bei Verbindung **92/43** für beide Substrate die Endgeschwindigkeiten im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmen und demzufolge die Inhibition einem kompetitiven Mechanismus folgt (Abbildung 10a, b), wird bei den ebenfalls histidin-enthaltenden Inhibitoren **92/28** und **92/32** nur Konkurrenz gegenüber dem Peptid-Substrat erreicht (Abbildung 10d, und f). Die Lage der Schnittpunkte in den FPP-Diagrammen 10c und 10e sprechen eindeutig gegen kompetitive Hemmung. Der äußerst ungewöhnliche, jedoch reproduzierbare, Abfall der Geraden ohne Inhibitorzusatz in 10d und 10f spricht für Substratinhibition durch das Dansylpeptid, welche für DansylGCVLS bereits beobachtet wurde.^[178]

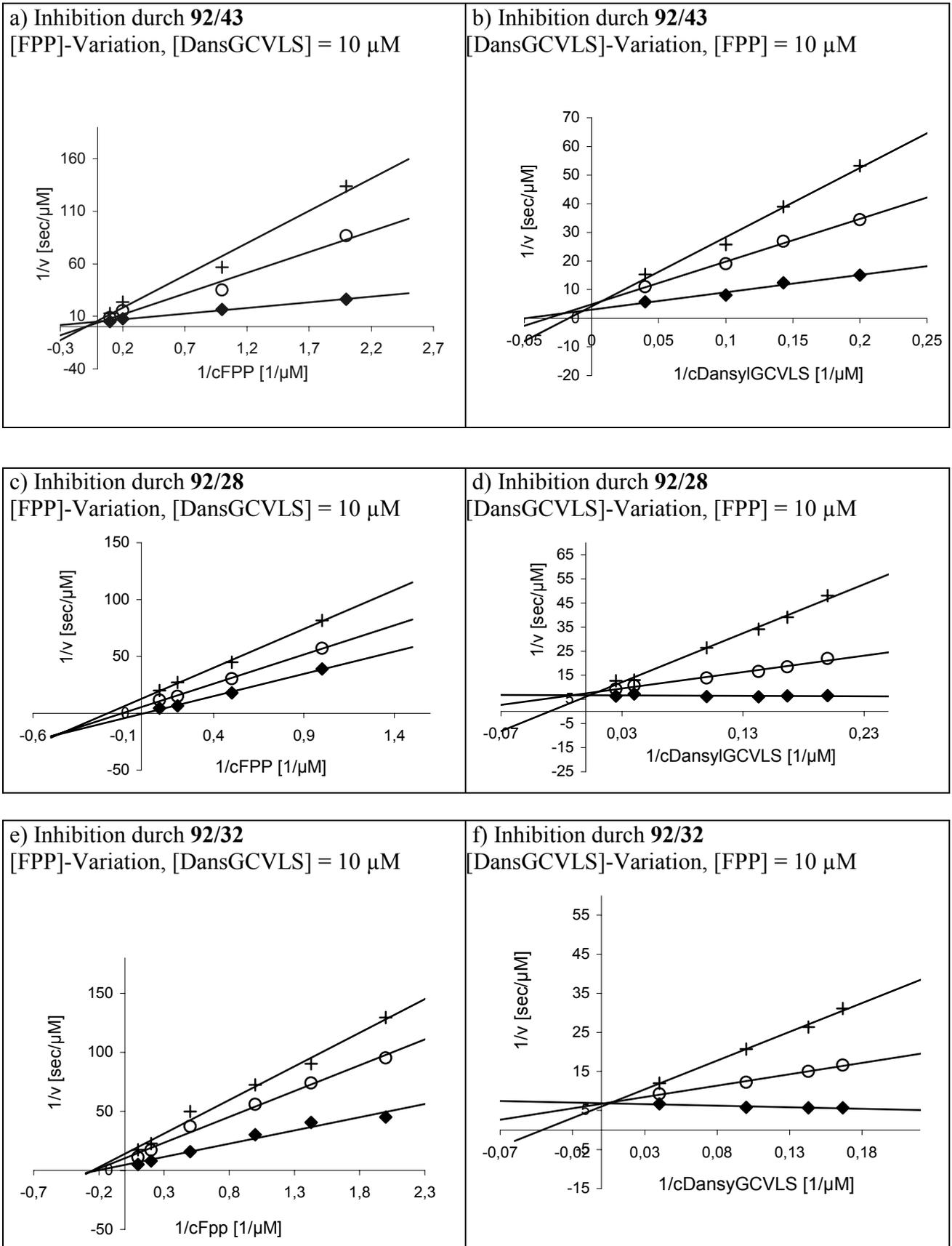


Abbildung 10: Auftragung von $1/v$ gegen $1/c_{\text{Substrat}}$ nach Lineweaver-Burk für **92/43**, **92/28** und **92/32**; Inhibitorkonzentration: 0 (\blacklozenge), 10 (O) und 20 (+) μM ; v = Anfangsgeschwindigkeit

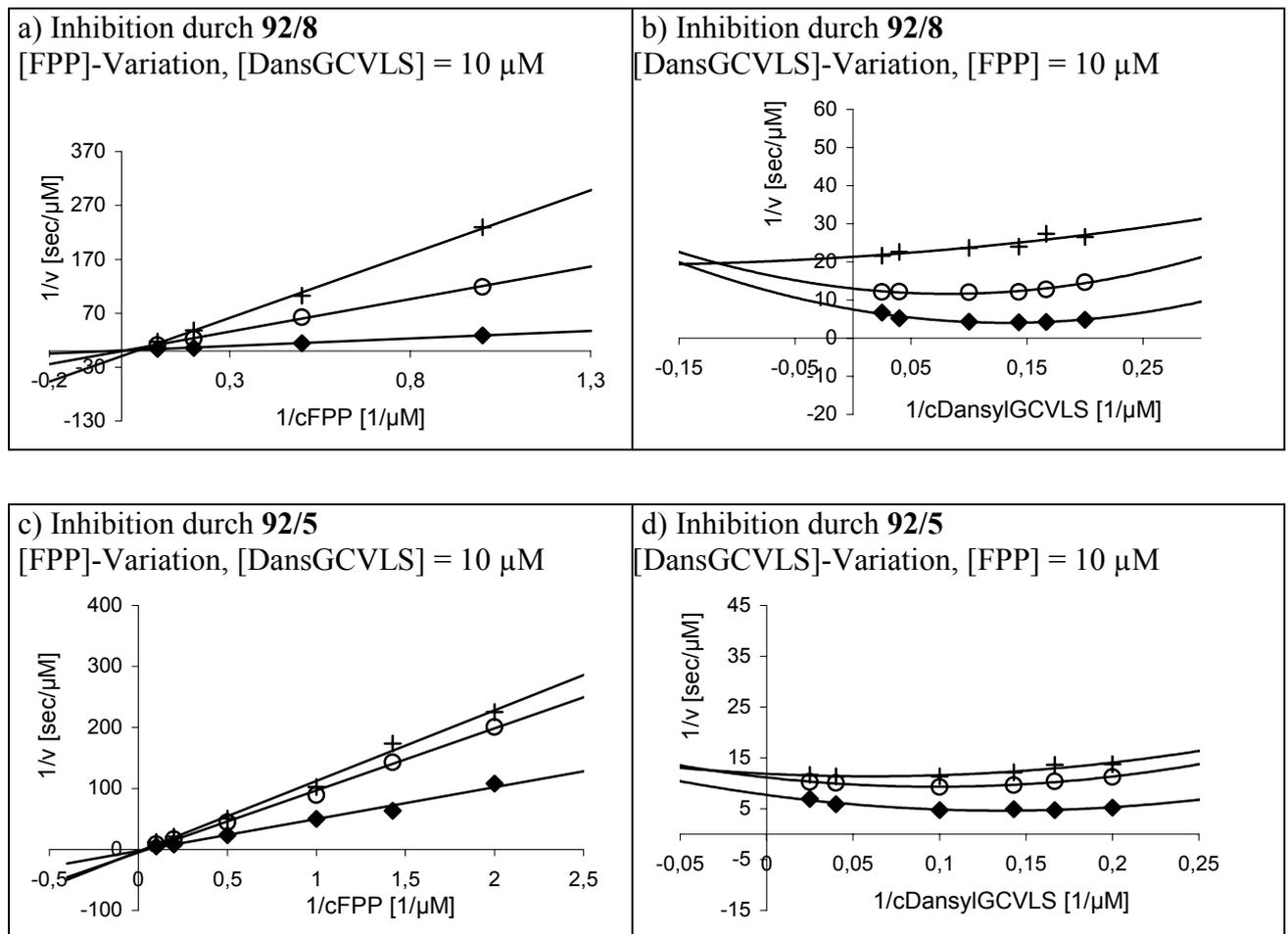


Abbildung 11: Auftragung von $1/v$ gegen $1/c_{\text{Substrat}}$ nach Lineweaver-Burk für **92/8** und **92/5**; Inhibitorkonzentration: 0 (\blacklozenge), 10 (o) und 20 (+) μM ; v = Anfangsgeschwindigkeit

Besonders gravierend scheint sich dieser Effekt bei den Verbindungen **92/8** und **92/5** auszuwirken (Abbildung 11b, d). Dieser Verlauf gleicht den Ergebnissen von Poulter et al.^[178], die Substratinhibition für DansylGCVLS nachweisen konnten. Somit scheint es sich im Fall von **92/8** und **92/5** nicht um eine kompetitive Hemmung hinsichtlich des Dansylpeptids zu handeln, demgegenüber weisen die Diagramme 11a und 11c eindeutig auf eine Verdrängung des FPP-Substrats hin.

Diese Ergebnisse werden von Modelling-Studien untermauert, die freundlicherweise von Diplom-Chemiker Lars Kissau zur Verfügung gestellt wurden.^[179] In Abbildung 12a, welche die Ausrichtung der Verbindung **92/43** im aktiven Zentrum der Farnesyltransferase zeigt, wird deutlich, dass diese als Bisubstratinhibitor sowohl die Peptidbindungsstelle blockiert, als auch in den Bindungsraum des Farnesylrests hineinragt. In erster Linie fixiert durch die Bindung des Histidins an das Zink-Ion und eine polare Wechselwirkung des Carboxylats in der rechten

oberen Hälfte mit einer von basischen Aminosäuren gebildeten polaren Tasche, ist der CAAX-Raum praktisch vollständig ausgefüllt. Durch die hydrophobe Wechselwirkung der Benzylgruppe des Rests R^1 mit der aromatischen Tasche im linken oberen Bereich ragt der Zimtsäure-Substituent senkrecht in den Bindungsraum des Lipidrests hinein (im Hintergrund) und blockiert ihn damit. Einen ähnlichen Bindungsmodus ergaben die Berechnungen bei Inhibitor **92/32**, der demjenigen von **92/28** vergleichbar ist (Abbildung 12b). Da hier der lipophile Rest R^1 zum Betrachter hin in eine aromatische Bindungstasche im Vordergrund bindet (von dem Ausläufer im Vordergrund teilweise verdeckt), wird lediglich die Peptidbindungsstelle belegt, jedoch nicht die Farnesyltasche.

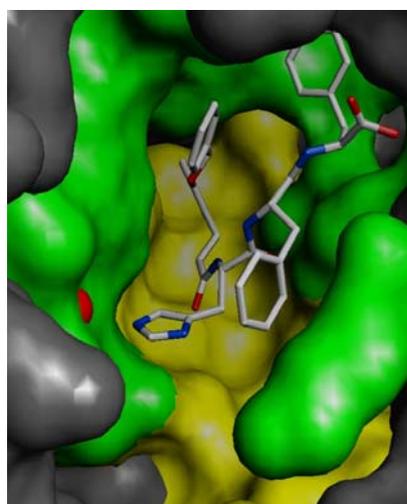
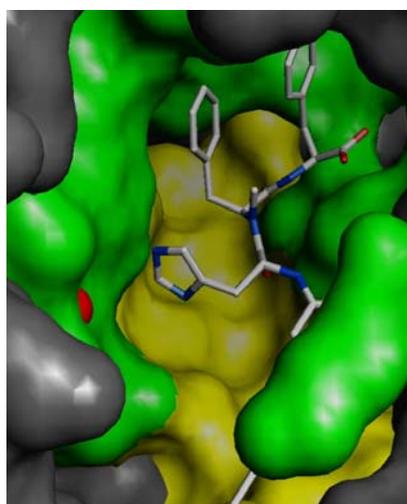
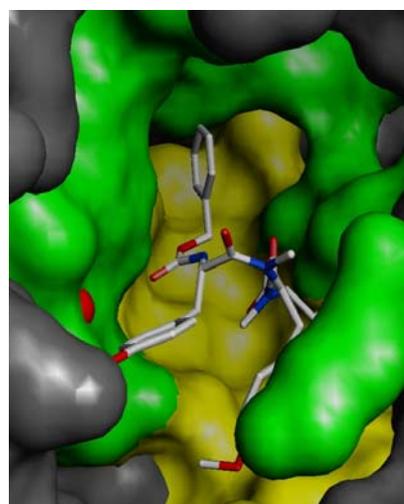
a) **92/43**b) **92/32**c) **92/8**

Abbildung 12: Inhibitoren a) **92/43**, b) **92/32**, c) **92/8** im aktiven Zentrum der Farnesyltransferase als Ergebnis von Molecular Modelling Berechnungen

Im Fall von **92/8** (Abbildung 12c) und ebenso **92/5** (nicht gezeigt) bewirken die beiden *N*-Methylgruppen eine deutliche Rigidisierung des Moleküls und erzwingen damit eine andere gebundene Konformation als bei **92/43** und **92/32**. Der aromatische Rest des D-Tyrosins wechselwirkt über das π -System mit dem Zink-Ion, was durch H-Brücken der phenolischen OH-Funktion mit polaren Gruppen in der Zink-Umgebung ergänzt wird. Die freie Carboxylatgruppe bindet nicht in die polare Tasche wie **92/43** und **92/32**, sondern wechselwirkt mit einem Arginin-Rest in der rechten unteren Hälfte (verdeckt) und stabilisiert damit die Turn-Konformation. Der Methoxyphenylalaninrest der mittleren Aminosäure, (am unteren Rand, teilweise verdeckt) blockiert die Pyrophosphat-Bindungsstelle, während der

aromatische Substituent der Cbz-Gruppierung (Mitte, obere Hälfte) an die hydrophobe Tasche bindet, wobei zusätzlich durch den Sauerstoff H-Brückenbindungen ausgebildet werden. Aufgrund dieser räumlichen Anordnung blockiert **92/8** die Pyrophosphat-Bindungstasche, lässt aber ausreichend Raum für die Bindung des Peptidsubstrats.

4.7.2 Inhibition der GeranylGeranyltransferase I

Als weitere Prenyltransferase wurde die Inhibition der GGTase I (siehe Kap. 2.2) durch Bibliothek-Mitglieder untersucht. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch Hemmer der GGTase I Apoptose bewirken können.^[9] Bei diesem, von Dipl.-Biochem. E.-B. Dursina, Abteilung Dr. K. Alexandrov, MPI Dortmund, durchgeführten Assay^[180] wurde die durch GGTase I katalysierte Übertragung eines Fluoreszenz-markierten GeranylGeranyl-Analogons^[181] aus einem entsprechenden Pyrophosphat auf Rho A gemessen. Die Reaktionslösungen mit und ohne Inhibitor wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und der Inhibitionsverlauf durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit der Kontrolle qualitativ ausgewertet. Die entsprechenden Gele sind in Abbildung 13 dargestellt, wobei hier jeweils die Fluoreszenz des Farbstoffs detektiert wurde. Eine Auswahl von exemplarischen Vertretern der einzelnen Strukturgruppen wurde diesem Test unterzogen. Während nicht umgesetztes GerGerPyrophosphatanalogon am unteren Rand nur schwach erkennbar ist, ist das prenylierte und damit Fluoreszenzmarkierte Rho-Protein deutlich als leuchtende Bande oberhalb des unteren Drittels ersichtlich (Kontrolle). Eine Reihe von Reaktionen zeigte trotz Inhibitorzusatz (**92/8**, **92/5**, **92/3**, **91/11**, **91/12**, **91/1**, **92/2**, **91/2**, **92/4**) eine, der Kontrolle vergleichbare Fluoreszenz, so dass offensichtlich keine nennenswerte Inhibition bei 100 μM erfolgte. Demgegenüber zeigte sich bei vier Verbindungen (**92/28**, **92/43**, **92/29** und **92/35**) vollständige Inhibition der Lipidierung. Die Aktivität der übrigen Verbindungen liegt zwischen den beiden Extremfällen Totalinhibition und keinem Effekt. Eine ausführliche Diskussion der hier beobachteten Wirkungen erfolgt in Kapitel 4.7.4. Trotz der nur begrenzt quantifizierbaren Aussagen gibt dieser Test aufschlussreiche Tendenzen wieder.

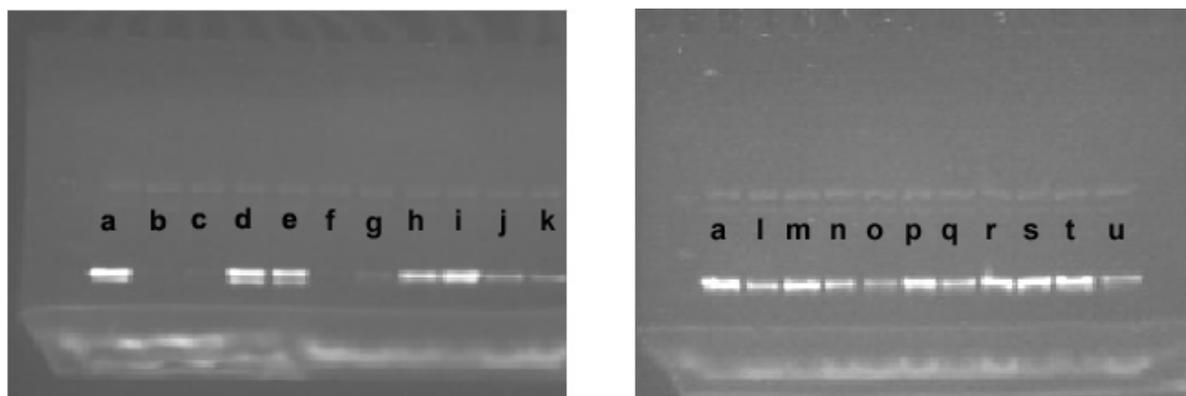


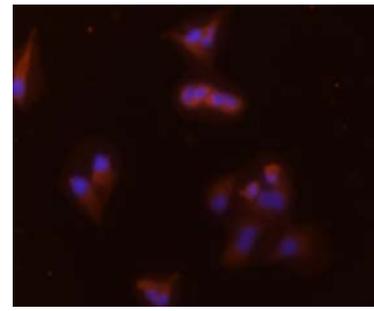
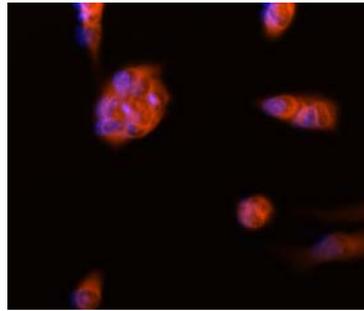
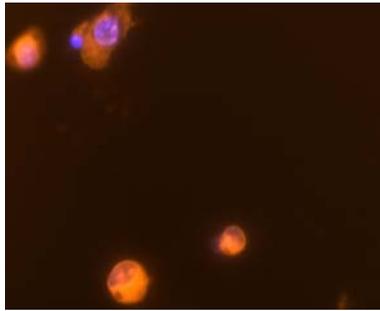
Abbildung 13: SDS Gel nach inhibierten, von GGTase I-katalysierten Prenylierungsreaktionen (jeweils 100 μ M Inhibitorkonzentration): **Kontrolle** (a), **92/28** (b), **92/43** (c), **92/8** (d), **92/5** (e), **92/29** (f), **92/35** (g), **92/3** (h), **91/11** (i), **92/16** (j), **92/12** (k), **92/18** (l), **91/12** (m), **91/9** (n), **92/26** (o), **91/1** (p), **92/22** (q), **92/2** (r), **91/2** (s), **92/4** (t), **92/14** (u).

4.7.3 Test gegenüber transformierten MDCK-f3 Zelllinien

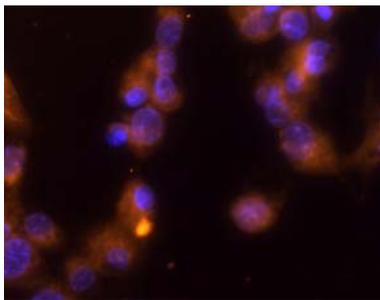
Neben der vorstehenden Betrachtung von Enzym-basierten Modellsystemen wurde ca. die Hälfte der synthetisierten Verbindungen auf ihre Wirkungen gegenüber einer Tumorzelllinie getestet. Hierzu diente ein Assay^[182], der sich auf mit onkogenem H-Ras transfizierten MDCK-f3-Tumorzellen aus Hundenieren stützt.^[183] Die transformierten MDCK-f3-Zellen unterscheiden sich von den entsprechenden nicht transformierten MDCK-Zellen in zahlreichen morphologischen Parametern. Eine Zellteilung-inhibierende, Morphologie-verändernde oder Apoptose-induzierende Wirkung einer Substanz auf MDCK-f3-Zellen zeigt eine Beeinflussung des Ras-Signaltransduktionspfades an. Bei der Durchführung, die in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. I.-M. Karaguni, Abteilung von Priv.-Doz. Dr. O. Müller, MPI Dortmund, erfolgte, wurden nach einer Inkubation der MDCK-f3-Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor für 6 h die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die Zellmorphologie im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei dem größten Teil der untersuchten Substanzen (siehe Tabelle 8, Kapitel 4.7.4) wurde keine Wirkung festgestellt, die Tumorzellen wiesen unverändert ihre fadenförmige Gestalt auf (Abbildung 14i). Demgegenüber lösten die Verbindungen **92/2**, **92/3**, **92/4**, **171/1** und **92/17** bei den MDCK-f3-Zellen Apoptose aus. Während bei 100 μ M Konzentration von **92/2**, **92/3** und **92/4** ein Anfangsstadium der Apoptose erreicht wird, welches sich in allmählichen Abrunden der Zellen zeigt (Abbildungen 14d, 14e, 14f) sind bei **171/1** und **92/17** ein Apoptoseendstadium

erreicht, erkennbar durch weitgehende Auflösung bzw. Fragmentierung des Zellkerns. (Abbildungen 14a und 14b). Eine Absenkung der Inhibitorkonzentration zeigte im Fall von **171/1** bei 20 μM Konzentration keinen Effekt mehr, während bei 50 μM Apoptose im Frühstadium beobachtet werden konnte (Abbildung 14c). **92/17** zeigte schon bei 50 μM keine Aktivität mehr.

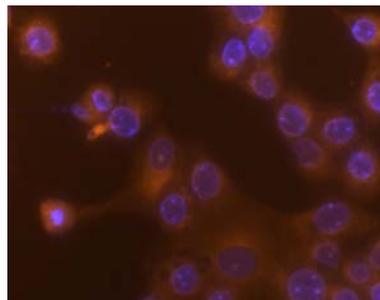
a) **171/1** (100 μM), MDCK-f3 b) **92/17** (100 μM), MDCK-f3 c) **171/1** (50 μM), MDCK-f3



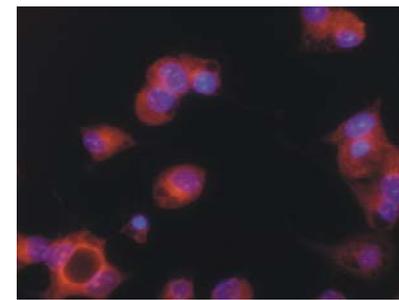
d) **92/3** (100 μM), MDCK-f3



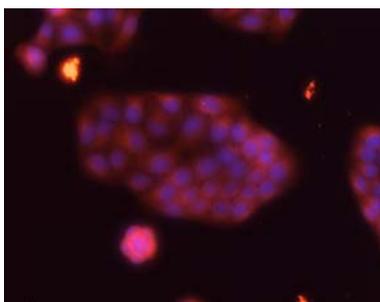
e) **92/2** (100 μM), MDCK-f3



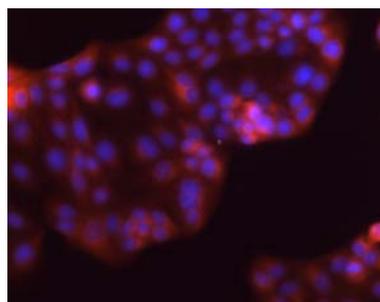
f) **92/4** (100 μM), MDCK-f3



g) **171/1** (100 μM), MDCK



h) **92/17** (100 μM), MDCK



i) Negativ-Kontrolle, MDCK-f3

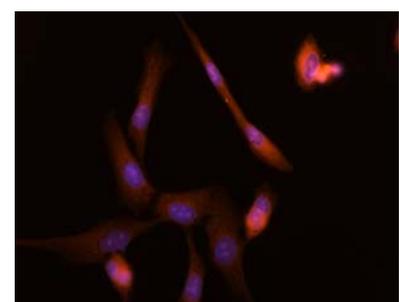


Abbildung 14: Fluoreszenzaufnahmen der Zellkulturen nach Inhibitoreinwirkung von 6 h

Um auszuschließen, dass die Verbindungen unselektiv cytotoxisch wirken wurden in einem Vergleichstest unter ansonsten identischen Bedingungen gegenüber Wildtyp-MDCK-Zellen getestet. Hier wurde sowohl bei **171/1** und **92/17** keinerlei Aktivität festgestellt (Abbildungen 14g und 14h zeigt die vollständig intakten Zellkolonien), was eindeutig gegen eine generelle

Cytotoxizität spricht und desweiteren die Wirkung unmittelbar mit dem transformierten Ras-Signalweg in Verbindung bringt.

4.7.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Ein Vergleich der Inhibitionsergebnisse beider FTase-Assays für die gleiche Substanz zeigt, dass in einigen Fällen die Resultate beider Tests nahezu exakt übereinstimmen (Tabelle 8, Einträge 8, 9, 31, 36), in den meisten anderen ergeben sich größere Abweichungen, welche besonders hoch bei den Verbindungen **171/1**, **92/31**, **92/42** und **92/45** (Einträge 4, 34, 47 und 50) ausfallen. Diese Unterschiede sollten weitgehend mit den unterschiedlichen Assay-Komponenten (Ratten-FTase/DansylGCVLS gegenüber humaner FTase/K-Ras) und der Versuchsdurchführung (Start durch FPP-Zugabe gegenüber Start durch Enzymzugabe, wobei im ersten Fall eine Vorinkubation erfolgt, die im zweiten unterblieb) in Zusammenhang stehen. Weiterhin könnte eine unterschiedliche Löslichkeit der Inhibitoren in den beiden Assay-Medien eine Rolle gespielt haben. Generell war die Löslichkeit, besonders der Histidin-freien Verbindungen, problematisch und damit ein begrenzender Faktor hinsichtlich der Aktivität in allen verwendeten wässrigen Medien. Dies wurde besonders eindrucksvoll in einem Projekt mit Frau Dipl.-Biochem. K. Reinecke, Abteilung von Priv. Doz. Dr. H. Prinz, MPI Dortmund, bestätigt, bei dem ein Großteil der verwendeten Verbindungen über keine ausreichende Wasserlöslichkeit verfügte und deshalb nicht vermessen werden konnte.^[184]

Hinsichtlich der strukturellen Zusammensetzung der Bibliothek (siehe hierzu die Tabellen 4, 5 und 6) lassen sich die dargestellten Inhibitoren in drei Substanzgruppen unterteilen: Verbindungen, die ein an den Naturstoff angelehntes Rückgrat aufweisen (Tabelle 8, Einträge 1-20), Verbindungen mit ähnlichen aromatischen Seitenketten, jedoch ohne zweifache *N*-Methylierung (Tabelle 8, Einträge 21-30) und nicht zuletzt Analoga mit Histidin an Aminosäureposition 1 (Tabelle 8, Einträge 31-57).

Ein Vergleich der Naturstoff-nahen Analoga (Tabelle 8, Einträge 1-20) zeigt, dass sowohl Pentamere als auch Tetramere mit längeren Alkylresten an *N*-terminaler Position **91/1**, **91/2**, **92/1**, **92/2**, **92/3** und **92/4** (Einträge 1, 2, 3, 5, 6 und 7) trotz der Möglichkeit, den Farnesylrest zu imitieren, keine nennenswerte Aktivität zeigen. Eine Ausnahme bildet die Verbindung **171/1**, die zwar bei Test a nur sehr schwach inhibiert, bei Testsystem b aber deutliche Aktivität im mikromolaren Bereich zeigt.

Eintr.	Verb.	FTase ^a (IC ₅₀) [μM]	FTase ^b (IC ₅₀) [μM]	FTase ^a bezügl. CAAX ^c	FTase ^a bezügl. FPP ^d	MDCK-f3 Apoptose Inhibitor [μM]	MDCK Apoptose	GGTaseI ^e Inhib. [%]
1	91/1	- ^f	>30			- ^h		0 ^k
2	91/2	- ^f	>30			- ^h		0 ^k
3	92/1	>50	57% ^g			- ^h		
4	171/1	>50	6.4			50 ⁱ ; 100 ^j	- ^h	
5	92/2	- ^f	30			100 ⁱ		0 ^k
6	92/3	- ^f	30			100 ⁱ		0 ^k
7	92/4	- ^f	30			100 ⁱ		0 ^k
8	92/8	5.3	6.7	n. komp.	komp.	- ^h		0 ^k
9	92/9	16.2	12.8					
10	92/7	>50	>30					
11	92/10	>50	>30					
12	92/5	9.3	57% ^g	n. komp.	komp.	- ^h		0 ^k
13	92/6	16.0						
14	91/7	42.4						0 ^k
15	91/8	>50						
16	91/9	28.2						
17	91/10	>50	>30					
18	91/11	- ^f	>30			- ^h		0 ^k
19	91/12	36.3	>30			- ^h		0 ^k
20	91/13	- ^f	>30					
21	92/21	>50	>30					
22	92/22	>50	>30			- ^h		l
23	92/24	- ^f	>30					
24	92/25	24.0	>30					
25	92/23	- ^f	>30					
26	92/26	- ^f	>30			- ^h		l
27	137b	- ^f	>30					
28	92/16	- ^f				- ^h		l
29	92/17	>50				100 ^g	- ^h	
30	92/18	- ^f				- ^h		l
31	92/28	8.0	6.4	komp.	n. komp.	- ^h		100 ^m
32	92/29	13.3	30.5			- ^h		100 ^m
33	92/30	>50	>30					
34	92/31	57.9	1.1			- ^h		
35	92/32	10.5		komp.	n. komp.	- ^h		
36	92/33	11.6	16.9					
37	92/34	9.3						
38	92/35	7.1	1.1			- ^h		100 ^m
39	92/36	8.1						
40	92/37	31.0						
41	92/38	31.2						
42	92/39	24.4						
43	92/40	31.6						

Tabelle 8 (Fortsetzung umseitig)

Eintr.	Verb.	FTase ^a (IC ₅₀) [μM]	FTase ^b (IC ₅₀) [μM]	FTase ^a bezügl. CAAX ^c	FTase ^a bezügl. FPP ^d	MDCK-f3 ^c Apoptose Inhibitor [μM]	MDCK ^d Apoptose	GGTaseI ^e Inhib. [%]
44	171/2	52.4						
45	92/41	7.7	22.1					
46	92/42	15.3	1.0			- ^h		
47	92/43	6.4	19.2	komp.	komp.	- ^h		100 ^m
48	92/44	12.5						
49	92/45	>50	7.6					
50	92/46	23.1	4.1					
51	92/47	8.2						
52	92/12	8.6				- ^h		1
53	92/14	50.0	>30			- ^h		1
54	140a	>50	>30					
55	140b	>50	>30					
56	137a	- ^f	>30					

^a Fluoreszenz-Assay: Ratten-FTase, DansylGCVLS und FPP als Substrate; ^b Radioaktiver Assay: Human-FTase, K-Ras und [³H]FPP als Substrate, ^c H-Ras-transformierte MDCK-f3-Krebszelle, ^d MDCK-Wild-Typ; ^e Fluoreszenz-Assay: GGTaseI, RhoA und ein Fluoreszenzmarkiertes GGPP-Analogen, 100 μM Inhibitor-konzentration; ^f keine Inhibition bei 50 μM Inhibitor-konzentration; ^g %Inhibition bei 30 μM Inhibitor-konzentration. ^h keine erkennbare Apoptose bei 100 μM (6 h); ⁱ Apoptose im Frühstadium (nach 6h); ^j Apoptose im Endstadium (nach 6 h); ^k keine eindeutig erkennbare Inhibition bei 100 μM; teilweise Inhibition bei 100 μM Inhibitor-konzentration; ^m vollständige Inhibition bei 100 μM.

Tabelle 8 (Teil 2): Screening der Bibliotheken gegenüber FTase, GGTase I und MDCK-f3-Krebszellen

Auffallend ist, dass die strukturell ähnlichen Verbindungen **92/2**, **92/3**, **92/4** und **171/1** (Einträge 4-7) Apoptose bei den MDCK-f3-Tumorzellen auslösen, obwohl außer bei **171/1** gegenüber Human-FTase keine nennenswerte Aktivität gegenüber diesem Enzym festgestellt werden konnte. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein anderes Target betroffen ist. Hierbei scheint es sich nicht um GGTase I zu handeln, wofür die negativen Testergebnisse für **92/2**, **92/3** und **92/4** (Einträge 5-7) sprechen.

Bei Verbindungen mit kurzen *N*-terminalen Ankern (**92/8**, **92/9**, **92/7**, **92/10**; Einträge 8, 9, 10, 11) lässt sich eine klare Tendenz erkennen: Im Gegensatz zu einem Hydrozimsäurerest (Eintrag 11) scheint eine Zimtsäure- (Eintrag 9), vor allem aber ein Cbz-Gruppierung (Eintrag 8) maßgeblich zu einer starken Wechselwirkung mit dem Enzym beizutragen. Ein etwas schwächerer Effekt wird durch das sterisch anspruchsvollere Fmoc-Urethan **92/6** (Eintrag 13) ausgeübt, wobei das *para*-Nitro-Derivat (Eintrag 10) keine nennenswerte Wirkung zu zeigen scheint.

Die Inhibition bei Anwesenheit des Zimtsäurerests bei **92/9** sollte auf die Rigidität dieser Gruppe zurückgeführt werden. Ebenfalls merklich potent zeigt sich das Derivat **92/5** mit *o*-Benzyloxy-Zimtsäurerest gegenüber Ratten-FTase. Die kinetischen Studien belegen, gestützt durch Modelling-Ergebnisse (Kapitel 4.7.1.2.3), dass es sich bei **92/8** und **92/5** um FPP-Mimetika handelt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die gewisse strukturelle Verwandtschaft von **92/8** mit dem literaturbekannten FPP-analogen FTase-Inhibitor **15** (Abbildung 3, Kap. 2.3), der eine ähnliche Aktivität zeigt. Insgesamt ist festzustellen, dass ein C-terminaler, 5. Baustein wie in **91/1** (Eintrag 1) für eine starke Inhibition nicht unerlässlich ist, dass bestimmte, wasserstoffbrücken-bildende C-terminale Fragmente wie Amide und (unter physiologischen Bedingungen vorliegende) Carboxylate, aber zu höherer Aktivität führen, wie der Vergleich von **91/12** mit **92/10** (Einträge 19 und 11), sowie **91/7** und **91/9** mit **92/7** (Einträge 14, 16 und 10) zeigt. Eine freie, deprotonierbare Carbonsäurefunktion ist hierbei aber wichtig, wie durch einen Vergleich von **91/12** mit **91/11** (Einträge 19 und 18) ersichtlich wird. Leider zeigte sich hier, dass die erzielten Effekte aufgrund der Kombination mit den aktivitätssenkenden Hydrocinnamoyl- und *p*-Nitrobenzyloxycarbonyl-Gruppen gering sind. Bessere Resultate sollte eine Kombination mit dem *o*-Benzyloxycinnamoyl- oder dem Benzyloxycarbonylrest ergeben (siehe oben).

In der zweiten Gruppe wurde der Schwerpunkt auf die Variation des Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen und der Konfiguration an Aminosäureposition AS¹ gelegt, unter weitgehendem Verzicht auf *N*-Methylierung (Tabelle 8, Einträge 21-30). Hier stellte sich heraus, dass diese Variationen direkt zu Inaktivität gegenüber Farnesyltransferase führen, abgesehen von Verbindung **92/25** (Eintrag 25) die überraschenderweise moderate Wirkung zeigt. Demgegenüber löste die *N*-Methyl-freie und eine Naphtalin-Seitengruppe enthaltende Substanz **92/17** Apoptose aus, in vergleichbarem Maße wie **171/1**. Dies belegt, dass das zweifach methylierte Naturstoffgerüst nicht unbedingt für die Apoptose-Wirkung notwendig ist. Wichtig erscheint hierbei ein langkettiger, hydrophober Rest zu sein, wie ein Strukturvergleich mit **92/2**, **92/3**, **92/4** und **171/1** zeigt. Nach den ersten vorläufigen Ergebnissen des GGTase I-Assays scheinen **92/16** und **92/26** einen inhibierenden Effekt zu zeigen, so dass es vielversprechend erscheint, die Eigenschaften der Vertreter diese zweiten Gruppe hinsichtlich GGTase I intensiver zu untersuchen.

Zur gezielten Blockierung des zentralen-Zinkions im aktiven Zentrum und zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurde die polare Aminosäure Histidin mit ihrer Zink-komplexierenden Imidazol-Seitenkette an Aminosäureposition AS¹ eingebaut. Bei der inaktiven Verbindung **92/21** (Eintrag 21) führte der Austausch von Tyrosin gegen Histidin zu **92/28** (Eintrag 31) mit FTase-Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich. Demgegenüber ist das L-konfigurierte

Epimer **92/29** (Eintrag 32) ein etwas schwächerer FTase-Inhibitor, das vollständig unmethylierte Derivat **92/30** (Eintrag 33) dagegen nahezu inaktiv. Das doppelt methylierte, wiederum L-konfigurierte Derivat **92/12** (Eintrag 52) zeigt Aktivität im einstelligen Bereich. Demgegenüber sinkt die Aktivität rapide durch Austausch des Cbz-Urethans gegen einen Hydrozimsäurerest (Verbindung **92/14**, Eintrag 53), was die Bedeutung des Urethan-Strukturelements unterstreicht.

Tendenziell konnte durch den Einbau des polaren Histidin-Elements die Wasserlöslichkeit erheblich gesteigert werden.

Weiterhin wurden an unterschiedlichen Positionen substituierte Zimtsäure- und Hydrozimsäurederivate an Histidin-haltige Analoga geknüpft. Hier zeigen besonders *para*-pentyl-substituierte Verbindungen (**92/32**, **92/33**, **92/34**, **92/35** und **92/36**; Einträge 35-39) auffallende Aktivität, wobei die L-Histidin-Konfiguration gegenüber D bevorzugt scheint, *N*-Methylierung senkt offenbar die Aktivität, im Gegensatz zu den bereits gezeigten Benzyloxy-carbonylsubstituierten Verbindungen (**92/28-92/29**, Einträge 31-33). Alkenyl- und *ortho*-substituierte Derivate (**92/37**, **92/38**, **92/39**, **92/40**, Einträge 40-43) zeigen eine um den Faktor 3-4 schwächere Wirkung. Ein direkter Vergleich der Substanz **92/36** mit dem Tyrosin-haltigen Derivat **92/26** (Einträge 39 und 26) bestätigt, dass die Zink-bindende Imidazol-Gruppe einen maßgeblichen Anteil an der Inhibitionswirkung hat.

Weiterhin wurden Benzyloxy-substituierte Zimtsäure-Reste an die unmethylierte His-Phe-Tyr Tripeptideinheit geknüpft (Verbindungen **92/42-92/47**, Einträge 46-51). Auch in diesen Fällen wurden auffallende Aktivitäten beobachtet, die zwischen beiden FTasen jedoch unheitlich sind, so dass keine eindeutige Korrelation von Substitutionsposition und Histidinkonfiguration mit Aktivität ersichtlich ist.

Offensichtlich erfolgt, wie erwartet, durch die eingeführte Imidazol-Gruppe eine starke, den Inhibitor fixierende Bindung an das Zink-Ion im aktiven Zentrum der Farnesyltransferase, wodurch die Bindungsstelle des Peptid-Substrats blockiert wird. Hierbei scheint es sich um eine zentrale Wechselwirkung zu handeln, da nahezu alle Verbindungen mit dieser Funktionalität eine merkliche Inhibition zeigen. Dies wird durch die Modelling-Studien und die kinetischen Experimente mit den Verbindungen **92/32**, **92/28** und **92/43** bestätigt, die die Kompetition bezüglich der Peptidkomponente aufzeigen. Werden durch geeignete Substituenten am *N*-Terminus zusätzlich entscheidende Teile der Farnesylbindungstasche belegt, so fungieren diese Verbindungen als Bisubstratinhibitor, wie für **92/43** gezeigt. Erste Ergebnisse aus dem GGTase-Assay weisen bei den Verbindungen **92/43**, **92/28**, **92/29** und **92/35** auf ein beträchtliches Inhibitionspotential hin. Die Erklärung dürfte in der Tatsache begründet liegen, dass die mit FTase verwandte GGTase I ebenfalls ein Zink-Ion enthält.

Gegenüber den MDCK-f3-Zellen wurde bei keiner Verbindung dieser Untergruppe ein Effekt festgestellt. Der Grund könnte angesichts der nachgewiesenen *in-vitro*-FTase Inhibition eine mangelnde Membranpenetration sein. Diese Frage sollte sich durch Mikroinjektionsexperimente klären lassen.

Fazit

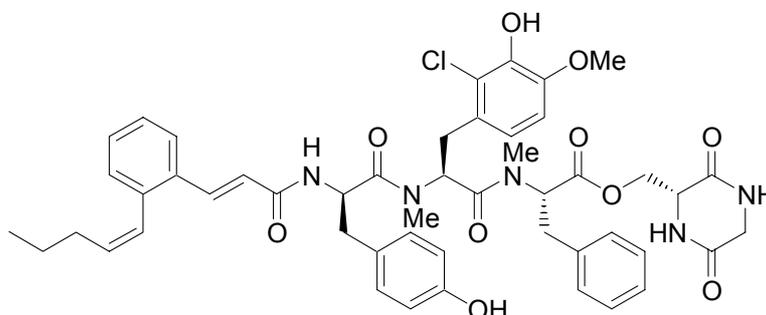
Die durchgeführten umfangreichen biologischen Tests belegen das Potenzial eines großen Teils der synthetisierten Pepticcinnamin E-Analoga als Farnesyltransferase-Inhibitoren mit bis zu einstelliger mikromolarer Größenordnung zu wirken. In kinetischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass unterschiedliche Inhibitionsmechanismen vorliegen und Tests an Tumorzelllinien zeigten, dass einige Verbindungen in transformierten Zellen selektiv Apoptose, den programmierten Zelltod, auslösen können.

Folgende Trends ergaben sich:

- Strukturell am Naturstoff angelehnte Verbindungen zeigten im allgemeinen keine oder nur geringe Aktivität gegenüber Farnesyltransferase. Ausnahmen bildeten benzyloxycarbonyl- oder benzyloxycinnamoyl-substituierte Tripeptide, die im einstelligen mikromolaren Bereich als kompetitive FPP-Mimetika fungierten.
- Histidinhaltige Verbindungen zeigten im Regelfall merkliche Inhibition der Farnesyltransferase, in vielen Fällen mit Aktivitäten unter 10 μ M. Diese Inhibitoren blockieren kompetitiv die Peptid-Bindungsstelle, während eine benzyloxycinnamoylsubstituierte Verbindung als Bisubstratinhibitor zusätzlich die FPP-Tasche besetzte.
- Histidin-freie Verbindungen mit aromatischen Seitengruppen und langen *N*-terminalen hydrophoben Ketten induzierten Apoptose.

5. Zusammenfassung

Bei der Farnesyltransferase handelt es sich um ein Enzym, welches eine Reihe von Proteinen lipidiert, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Zelltransformation und Tumorbildung gebracht werden.^[27] Farnesyltransferase-Inhibitoren stellen eine neue Wirkstoffklasse dar,^[5] deren Vertreter das Tumorwachstum hemmen oder sogar Tumorregression bewirken können,^[9] wobei bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet wurden. Obwohl die äußerst vielversprechende Wirkung weitgehend auf das Auslösen von Apoptose, den bei Tumorzellen gehemmten programmierten Zelltod, zurückgeführt wird, sind die betroffenen Zielproteine und zellulären Mechanismen bisher ungeklärt.^[9]



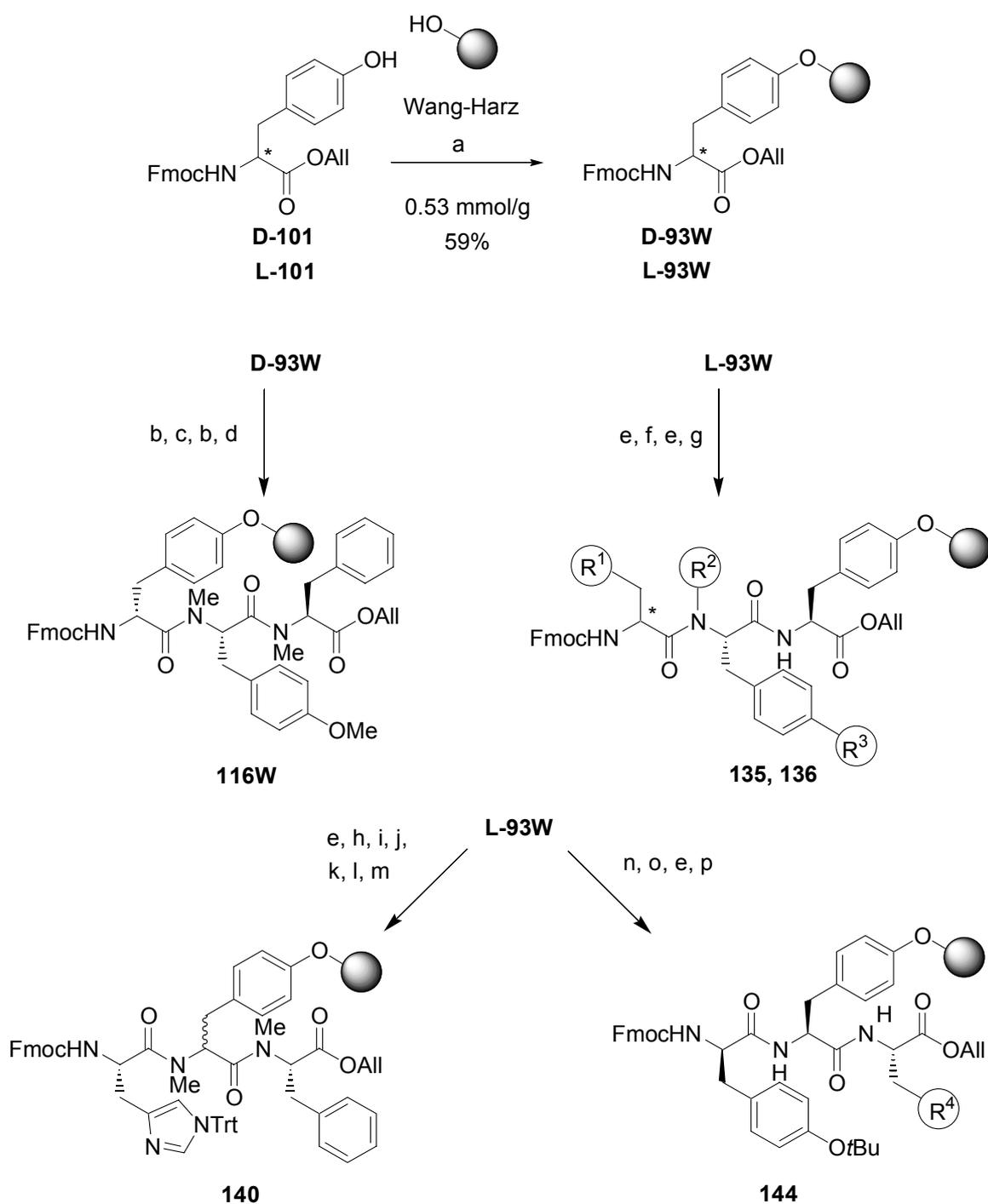
Pepticinnamin E **23**

IC₅₀ = 42 µM

Abbildung 15: Der Bisubstrat-Farnesyltransferase-Inhibitor Pepticinnamin E

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf der Basis des Naturstoffs Pepticinnamin E **23** eine kombinatorische Festphasensynthese von Pepticinnamin-Analoga entwickelt werden. Ziel war es, eine Substanzbibliothek von potentiellen Farnesyltransferase-Inhibitoren zu erstellen und deren biologische Wirkung in einer Reihe von Testsystemen zu evaluieren.

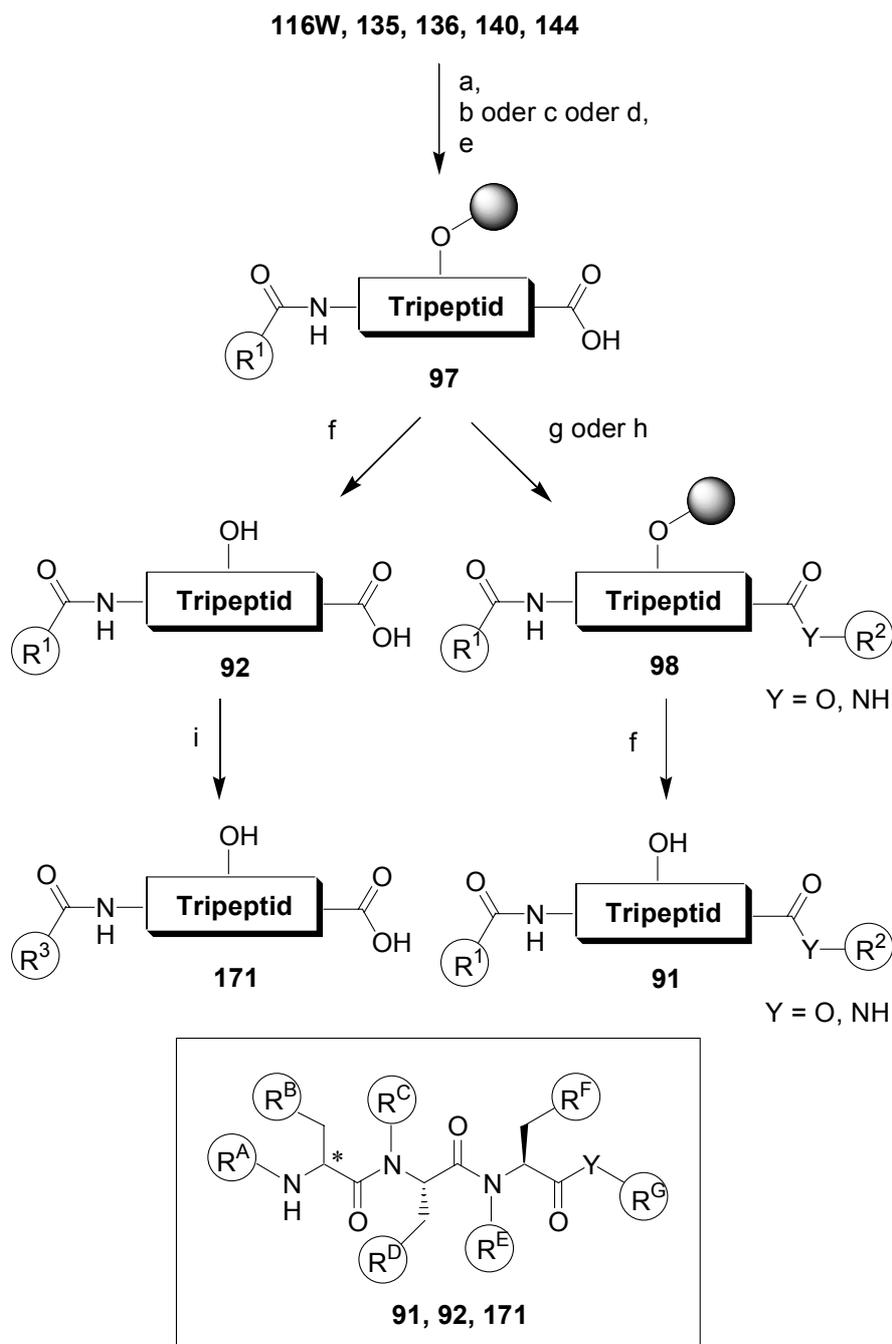
Um alle drei Aminosäurefragmente breit und unabhängig variieren zu können, wurden verschiedenen Synthesesequenzen ausgehend von drei unterschiedlichen Positionen AS¹, AS² und AS³ im Tripeptid entwickelt. Die Anbindung an ein mit dem Wang-Linker-funktionalisiertes Polystyrolharz erfolgte über eine Mitsunobu-Reaktion, welche angesichts dieses Anknüpfungstyps respektable Beladungsgrade von 0.50-0.53 mmol/g (entspricht Ausbeuten von 54-59%) lieferte (Schema 28).



Schema 28: Anknüpfung an den polymeren Träger und Synthese von Tripeptiden. a) DEAD, PPh₃, THF; b) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃ oder NMA; c) **106b**, HATU, HOAt, DIEA; d) **106a**, PyAOP, HOAt, DIEA; e) Piperidin/DMF 1:4; f) **129**, HATU, DIEA; g) **129**, **133** oder **134**, HATU, DIEA oder DIC, HOAt; h) *o*-NO₂PhSO₂Cl, Lutidin; i) *p*-NO₂PhSO₃Me, MTBD; j) DBU, 2-Mercaptoethanol; k) Fmoc-L-His(Trt)OH **133**, DIC, HOAt; l) Pd(PPh₃)₄, NMA; m) **106a**, PyAOP, DIEA; n) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, THF; o) **106** oder **100**, PyAOP, DIEA; p) Fmoc-*D*-Tyr(OtBu)OH, HATU, DIEA.

Zum Aufbau der Tripeptid-Einheit **116W** durch *C*-terminale Verlängerung ausgehend von **D-93W** wurden die Allylesterschutzgruppen Pd⁰-katalysiert mit Phenylsilan oder *N*-Methylanilin als Allylfänger gespalten. Anschließend wurden die *N*-methylierten Aminosäurebausteine unter Verwendung der hochleistungsfähigen Kupplungsreagenzien HATU und PyAOP angeknüpft (Schema 28). Hiermit wurde erstmals ein aus sterisch anspruchsvollen und für schwierige Kupplungen bekannten *N*-methylierten Aminosäuren bestehendes Tripeptid durch unkonventionelle *C*-terminale Verlängerung aufgebaut. Eine alternative *N*-terminale Verlängerung ausgehend von Baustein **L-93W** durch sequenzielle basische Fmoc-Spaltung und anschließende Kupplung lieferte problemlos die Tripeptide **135** und **136** (Schema 28).

Ferner wurde an **L-93W** nach *N*-Methylierung des Bausteins in vier Stufen an der Festphase ein Histidinfragment angeknüpft, gefolgt von *C*-terminaler Kupplung zum Tripeptid **140**. Hierbei trat im letzten Kupplungsschritt Racemisierung auf, während die Umsetzungen allesamt vollständig verliefen. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem in inverser Vorgehensweise zuerst die *C*-terminale Kupplung zum Dipeptid, gefolgt von *N*-terminaler Verlängerung zum Tripeptid **144** durchgeführt wurde, welche mit kompletter Umsetzung ohne erkennbare Racemisierung gelang. (Schema 28). Nach dem erfolgreichen Aufbau der Tripeptideinheit wurden verschiedene lipophile Zimtsäure- und Hydrozimtsäure-Derivate R¹CO₂H sowie Benzylchloroformiate R¹COCl angekuppelt, wobei die Anbindung der Zimtsäuren erst mit einer Kombination von PyAOP und DMAP zufriedenstellend gelang (Schema 29). Hierbei trat in einigen Fällen eine partielle Isomerisierung der *E*-ständige Doppelbindung zur *Z*-Konfiguration auf. Die Zimtsäure-Bausteine selbst wurden durch klassische Knoevenagel-Kondensation, die Hydrozimtsäuren durch Pd-katalysierte Hydrierung der Zimtsäuren erhalten. Alkenylreste am Aromaten wurden durch Suzuki-Kupplung eingeführt. Die Pd⁰-katalysierte Allylesterspaltung mit Morpholin und saure Abspaltung der *N*-acylierten Tripeptide **97** vom polymeren Träger lieferte die Verbindungen **92**, aus denen durch Hydrierung der Doppelbindung des Zimtsäurefragments weitere Analoga **171** mit gesättigten Resten R³ dargestellt wurden (Schema 29). Ausgehend von den polymergebundenen Verbindungen **97** ließen sich mittels PyAOP-Kupplung Amine zu Amidan anbinden, während entsprechende Ester durch Alkylierung des Cäsiumsalzes der Carbonsäurefunktion mit Alkylhalogeniden effizient zugänglich waren. Saure Ablösung vom Harz lieferte die Verbindungen **91**.



52 Verbindungen

Ausbeute: 3-63% (65-91% pro Schritt)

Reinheit: 60->95%

Schema 29: Vervollständigung der Synthese einer Peptidcinnamin-Analoga-Bibliothek. a) Piperidin/DMF 1:4; b) R^1CO_2H , HATU, HOAt, DIEA, NMP ($R^1 = ArCH_2CH_2-$); c) R^1CO_2H , PyAOP, DMAP, DIEA, CH_2Cl_2/DMF 1:2, ($R^1 = ArCH=CH-$); d) R^1COCl , HOAt, DMAP, DIEA, CH_2Cl_2/DMF 2:1; e) $Pd(PPh_3)_4$, Morpholin; f) TFA/ H_2O 95:5; g) R^2NH_2 , PyAOP, DIEA ($Y=NH$); h) Cs_2CO_3 , KI, R^2X , DMF ($X = Br$), RT oder 50 °C, ($X = Cl$) ($Y = 0$); i) Pd/C , 10%, H_2 , Dioxan oder MeOH.

Auf diese Weise wurde eine Bibliothek von 52 isolierten Peptidcinnamin-Analoga durch 8-11-stufige Synthese am polymeren Träger mit Gesamtausbeuten zwischen 3% und 63% über alle Stufen erhalten, was einer mittleren Ausbeute von 65-91% je Stufe entspricht (im Regelfall werden über 75% erreicht). Die erzielten Reinheiten liegen nach HPLC-Reinigung bis auf wenige Ausnahmen bei > 90% (Schema 29).

In Abbildung 16 ist eine Auswahl der wichtigsten Verbindungen illustriert, die sich allgemein in naturstoffnahe Produkte des Typs I und histidinhaltige Analoga des Typs II klassifizieren lassen.

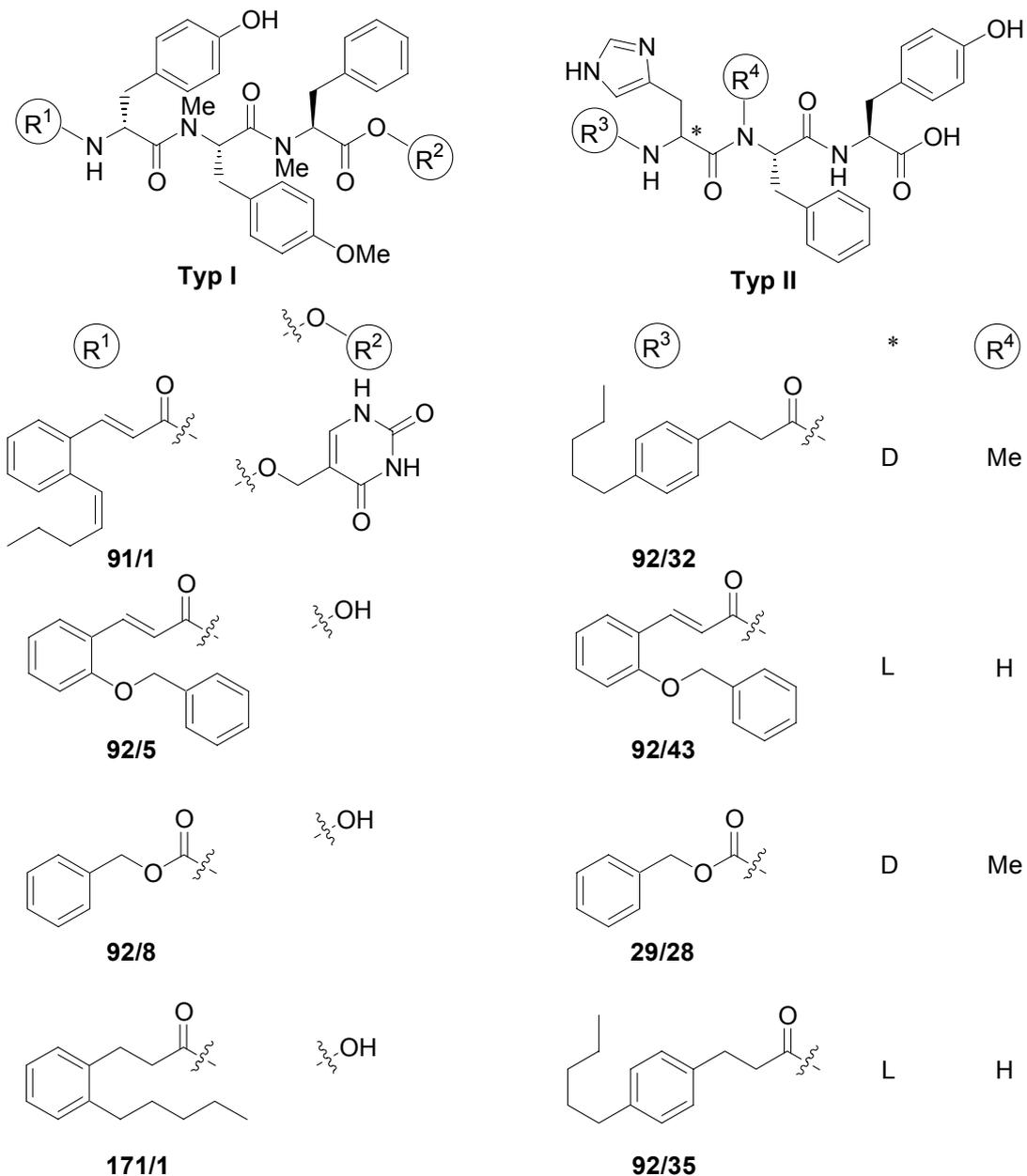


Abbildung 16: Auswahl der synthetisierten Verbindungen

Die synthetisierten Verbindungen wurden anschließend umfangreichen biologischen Tests unterzogen. In zwei Assays mit Farnesyltransferase aus zwei unterschiedlichen Quellen (Ratte und Mensch) wurde auf mögliche Inhibitoren der FTase geprüft. Unter anderem kam ein Fluoreszenz-basierter Assay zum Einsatz, der zum Zweck eines hohen Durchsatzes auf das 96er Mikrotiterplatten-Format erweitert wurde. Die Testergebnisse einer Substanzauswahl sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Eintr.	Verb.	Ausbeute (pro Schritt)	Reinh. (%)	Inhib. FTase ^a (IC ₅₀) [μM]	Inhib. FTase ^b (IC ₅₀) [μM]	Inhib. FTase ^a bezügl. CAAX ^c	Inhib. FTase ^a bezügl. FPP ^d	MDCK-f3 ^e Apoptose [μM]
1	91/1	14 (80)	> 95	- ^f	>30	n. g.	n. g.	- ^g
2	171/1	14 (78)	> 95	>50	6.4	n. g.	n. g.	50 ^h ; 100 ⁱ
3	92/8	13 (77)	> 95	5.3	6.7	n. komp.	komp.	- ^g
4	92/5	10 (75)	> 95	9.3	57% ^j	n. komp.	komp.	- ^g
5	92/28	24 (84)	> 95	8.0	6.4	komp.	n. komp.	- ^g
6	92/35	20 (81)	93	7.1	1.1	n. g.	n. g.	- ^g
7	92/32	21 (82)	> 95	10.5	n. g.	komp.	n. komp.	- ^g
8	92/43	13 (77)	89	6.4	19.2	komp.	komp.	- ^g

^a Fluoreszenz-Assay: Ratten-FTase, DansylGCVLS und FPP als Substrate; ^b Radioaktiver Assay: Human-FTase, K-Ras und [³H]FPP als Substrate; ^cVariation der Dansyl-Peptidkonz. in Gegenwart d. Inhibitors bei konstanter FPP-Konz.; ^dVariation der FPP-Konz. in Gegenwart des Inhibitors bei konstanter Dansyl-Peptidkonz.; ^e H-Ras-transformierte MDCK-f3-Krebszelle, ^f keine erkennbare Inhibition; ^g keine erkennbare Apoptose bei 100 μM (6 h); ^h Apoptose im Frühstadium (nach 6h); ⁱ Apoptose im Endstadium (nach 6 h); ^j %Inhibition bei 30 μM Inhibitorkonzentration; n. g. = nicht getestet.

Tabelle 9: Auswahl von Synthese- und Screeningergebnissen

Ungefähr die Hälfte der Verbindungen zeigt merkliche Inhibition beider FTase-Typen mit IC₅₀-Werten unterhalb von 50 μmol/l, hiervon 13 mit Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich mit einem Minimal-Wert von 1 μmol/l. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass dem Naturstoff strukturell nahestehenden Verbindungen wie **91/1** keine feststellbare Aktivität zeigten (Abbildung 16 und Tabelle 9, Eintrag 1). Demgegenüber scheinen verkürzte *N*-acylierte Tripeptide mit freiem C-Terminus **92** ein wichtiges Strukturmotiv zu sein. Besonders der Einbau von Histidin führt nahezu durchgängig zu beträchtlicher Aktivität.

Aus der Gruppe der wirksamsten Inhibitoren wurden die fünf strukturell diversen Verbindungen **92/5**, **92/8**, **92/28**, **92/32** und **92/43** ausgewählt und kinetischen Untersuchungen hinsichtlich des Inhibitionsmechanismus unterzogen. Hierbei wurden Verbindungen gefunden, die ausschließlich kompetitiv gegenüber dem Proteinsubstrat inhibieren (Tabelle 9, Einträge 5, 7), andere fungieren als kompetitive Inhibitoren hinsichtlich des Farnesylpyrophosphats (Einträge 3, 4), während eine Substanz als Bisubstratinhibitor wirkt (Eintrag 8). Diese Wirkmechanismen konnten durch Modelling-Studien rationalisiert werden.

In einem Test gegenüber Ras-transformierten MDCK-f3-Tumorzellen bewirkten Verbindungen wie **171/1** (Tabelle 9, Eintrag 2) die Auslösung von Apoptose (Tabelle 9), wobei jedoch kein Effekt gegenüber dem Wild-Typ erzielt wurde. Dies spricht für eine selektive, nicht allgemein cytotoxische Wirkung, die unmittelbar mit dem transformierten Ras-Signalweg in Zusammenhang steht.

6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit mit ihren positiven Resultaten kann den Weg für weitere, fokussierte Arbeiten in Bezug auf Hemmung der Protein-Farnesylierung und deren Effekte bei der Tumorbildung eröffnen.

Mitglieder der dargestellte Substanzbibliothek sollen bezüglich Inhibition weiterer Prenyltransferasen wie die GGTasen I und II geprüft werden, von deren Hemmung pharmakologisch relevante Effekte bekannt sind, bzw. erwartet werden.^[9,185] Ergebnisse von ersten orientierenden Tests (Kapitel 4.7.2) erscheinen vielversprechend. Vor allem sollen weitere Krebszelllinien als Testsysteme herangezogen werden, um die beobachtete Apoptosewirkung nach Möglichkeit zu verallgemeinern. In dieser Hinsicht erscheint es wichtig herauszufinden, ob die festgestellte Apoptose mit der Farnesyltransferase-Inhibition korreliert ist. Aus diesem Grund sollten hierzu die stärksten FTase-Inhibitoren wie **92/8**, **92/28** und **92/35** zum Einsatz kommen, deren potentiell geringe Membrangängigkeit und dem damit verbundenen Aktivitätsverlust durch Mikroinjektion umgangen werden könnte. Desweiteren bieten sich die Verbindungen **92/5**, **92/8**, **29/28**, **29/32** und **92/43** mit ihren unterschiedlichen Wirkprofilen als Leitstrukturen für weitere Optimierungsschritte an. Hierzu stehen die in dieser Arbeit entwickelten, hohe Diversität ermöglichenden, Synthesemethoden zur Verfügung. Ein Schwerpunkt könnte die Anknüpfung eines C-terminalen, fünften Bausteins als Amid oder Ester sein (Abbildung 17), der bei polarem Charakter von R^4 die Blockierung des aktiven Zentrums der FTase steigern könnte, worauf einige bisher erzielte Resultate hinweisen (Kapitel 4.7). Demgegenüber könnten hydrophobe Reste R^4 , angebunden als Protease-labiler Ester-Prodrug, die Membrangängigkeit erhöhen, worauf dann innerhalb der Zelle nach enzymatischer Abspaltung wieder die wirksame freie Säure gebildet werden würde. Die Zink-Bindungstendenz und somit die Aktivität der Imidazol-haltigen Derivate dürfte weiterhin durch Einführung eines Alkylrestes R^5 am τ -Stickstoffs des Imidazol-Restes gesteigert werden können, wie es in vielen potenten FTase-Inhibitoren der Fall ist.

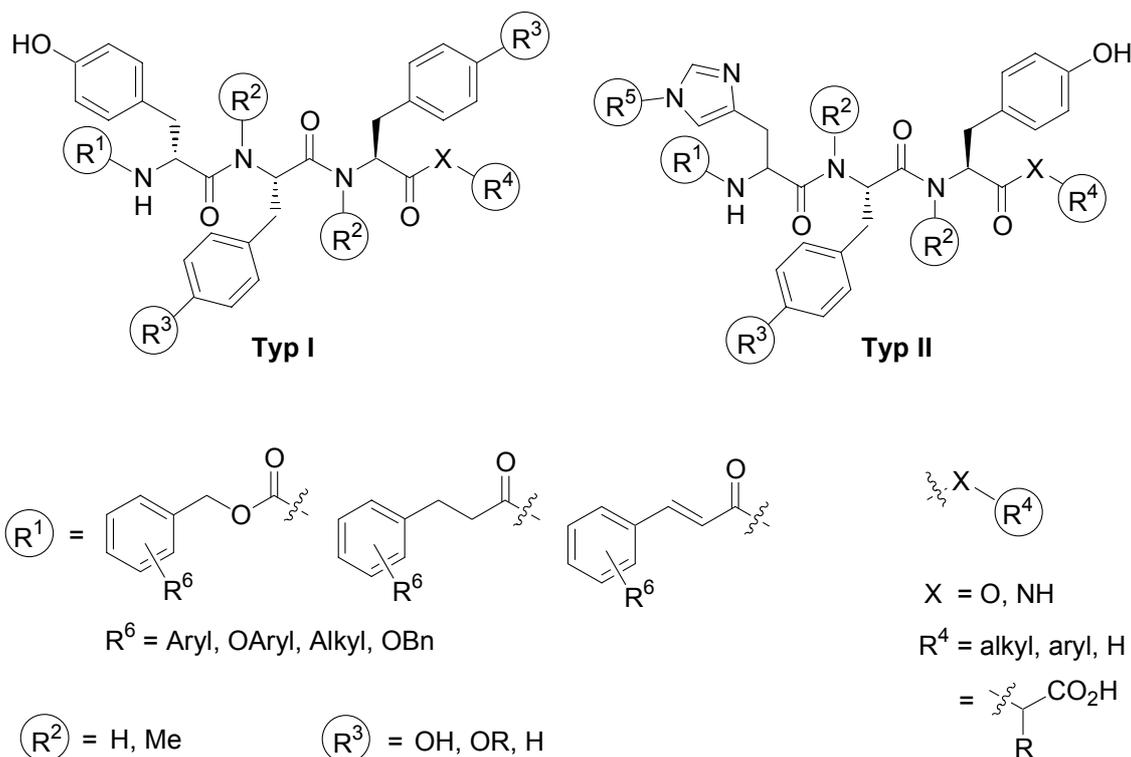


Abbildung 17: Vorgeschlagene Struktur motive zur weiteren Wirkungsoptimierung

Da der tatsächliche Einfluß der *N*-Methylierung bisher nicht geklärt werden konnte, wäre eine Permutation der Methylierung durch Variation von R^2 bei den Verbindungen der Typen I und II interessant. Da Modelling-Studien dafür sprechen, dass starke hydrophobe Wechselwirkungen mit einer aromatischen Tasche eine entscheidende Rolle vor allem hinsichtlich Bisubstratinhibition spielen, sollte weitreichende Einführung und Variation von aromatische Substituenten R^6 an Zimtsäureresten erfolgen. Hierzu könnten auch Pd-vermittelte C-C-Knüpfungen an der Festphase, zu denen hier erste Vorarbeiten geleistet wurden, weiteren Variationsspielraum eröffnen. Die beobachtete, wahrscheinlich lichtinduzierte partielle Doppelbindungs isomerisierung von Zimtsäurederivaten während der Kupplungsreaktion sollte intensiv untersucht werden, um durch gezielte Steuerung dieser Reaktion jeweils selektiv ein Isomer zu generieren und damit ein weiteres kombinatorisches Element nutzbar zu machen. Durch die Variation von Alkyl- und Alkenylresten R^6 in den Substituenten R^1 beim Inhibitor-Typ I könnten möglicherweise Verbindungen mit erhöhter Apoptoseaktivität erhalten werden (vergleiche hierzu Verbindung **171/1**, Tabelle 9, Eintrag 2).

Somit könnten nach weiteren kombinatorischen Variationszyklen Verbindungen mit optimalen Inhibitionseigenschaften und multiplen Wirkmechanismen neben den schon

vorhandenen Inhibitoren erhalten werden. Diese könnten gemeinsam als molekulare Werkzeuge zur gezielten Hemmung des Proteinfarnesylierungsprozesses und zum Studiums der daraus resultierenden Konsequenzen auf zellulärerer Ebene einen wertvollen Beitrag zur Klärung der Wirkungsweise von Farnesyltransferase-Inhibitoren leisten.

7. Experimenteller Teil

7.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Für die Aufnahme der NMR-Spektren standen folgende Geräte zur Verfügung:

250 MHz ^1H -NMR	Bruker AC 250
400 MHz ^1H - und 100.6 MHz ^{13}C -NMR	Bruker AM 400
400 MHz ^1H -, 100.6 MHz ^{13}C -NMR	Varian Mercury 400
500 MHz ^1H - und 125.7 MHz ^{13}C -NMR	Bruker DRX 500
600 MHz ^1H -NMR	Varian Inova 600

Die chemischen Verschiebungen δ beziehen sich auf Tetramethylsilan als Standard und sind in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die ^{13}C -NMR-Spektren sind breitbandenkoppelt. Die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplet, td = Triplet von Dublett, q = Quartett, quint. = Quintett, m = Multiplett, br. = verbreitertes Signal, überl. = überlagertes Signal.

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem IFS 88 Fourier-Transform-IR-Spektrometer der Firma Bruker. Feststoffe wurden mittels diffuser Reflektion (drift) von KBr-Verreibungen vermessen.

Die 70 eV-Elektronenionisations- (EI) und Fast Atom Bombardment (FAB) Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde bei den FAB-MS-Spektren 3-Nitrobenzylalkohol (3-NBA) verwendet.

Die Messung der MALDI-TOF Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometryTM Workstation und einer Voyager-DE Pro BioSpectrometryTM Workstation der Firma PerSeptive Biosystems aufgenommen mit 2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix.

Zur Massenbestimmung mittel Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) standen folgende LC-gekoppelte Geräte zur Verfügung:

LC-ESI 1: Thermoquest LCQ ESI-Massenspektrometer der Firma Finnigan gekoppelt mit dem analytischen HPLC-System LC-MS1.

LC-ESI 2: ZMD 2000 ESI-Massenspektrometer der Firma Waters, gekoppelt mit dem analytischen HPLC-System LC-MS2.

Die Spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin Elmer Polarimeter 241 oder einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 gemessen und beziehen sich auf die Natrium-D-Linie. Verwendete Lösungsmittel und Konzentrationen in g/100 ml sind jeweils angegeben.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi 530 oder einem Büchi B 540 Schmelzpunktmeßgerät gemessen und sind nicht korrigiert.

Die Elementaranalysen wurden mit einem Elementar CHN-Rapid Analysator erstellt.

Die automatisierte kombinatorische Festphasensynthese wurde mit einem Quest-210-Synthesizer der Firma Argonaut Technologies durchgeführt.

Zur analytischen und präparativen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) benutzt. Zur Detektion wurde UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) und zur Anfärbung folgende Reagenzien verwendet: A 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-Sulfat, 6 ml Schwefelsäure in 94 ml Wasser; B 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure in 997 ml Ethanol; C 5 g Kaliumpermanganat in 100 ml Wasser. Die entsprechenden Laufmittel und R_F-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel der Firma Baker (Korngröße 40-60 μm) mit einem Überdruck von 0.3-0.8 bar. Die verwendeten Laufmittel sind jeweils angegeben.

Für die analytische HPLC wurden folgende Systeme verwendet:

- A1: L-6000A/Merck-Hittachi mit Multi-Channel L3000 Detektor; Säule: LiChrosorbR-RP-18 100 x 5 mm, 5 μm Korngröße/Merck, Detektion: 210 und 305 nm; Flussrate: 1ml/min; Laufmittel-Gradient: (CH₃CN/H₂O/TFA): 45/55/0.1 TFA, innerhalb von 30 min auf 100/0/0.1 TFA.
- A2: HP Modell 1100/Hewlett Packard; Säule: VP 50/10 Nucleosil C18PPN/Macherey-Nagel, 100 x 5 mm, 5 μm Korngröße, Detektion: 210, 220, 254 und 305 nm; Flussrate: 1ml/min; Laufmittel-Gradienten sind jeweils angegeben.

Für die präparative HPLC wurden folgende Systeme verwendet:

- P1: Pro Star 215/Varian mit Varian Detektor Modell 340, Säule: VP 250/21 Nucleosil C18PPN, 100 x 5 mm, 5 µm Korngröße/Macherey-Nagel, Detektion: 210 nm oder 305 nm. Die Flussraten, Laufmittel-Gradienten und die verwendete Temperaturen sind jeweils angegeben.
- P2: Gilson Abimed System 1105 mit ID16 Detektor, Säule: RPC18, Hypersil BDS 18, 100 x 21.1 mm, 5 µm Korngröße/Waters, Detektion: 210 nm, Flussrate: 18 ml/min; Laufmittel-Gradienten sind jeweils angegeben.
- P3: System Gold 126P/Beckmann, System Gold 168 Detektor, Säule: RPC18, 100 x 19 mm, 5 µm Korngröße/Waters Symmetry, Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 10 ml/min; Laufmittel-Gradienten sind jeweils angegeben.

Für die MS-gekoppelte, analytische HPLC wurden folgende Systeme verwendet:

- LC-MS1 HP Modell 1100/Hewlett Packard; Säule: VP 50/10 Nucleosil C18PPN/Macherey-Nagel, 100 x 5 mm, 5 µm Korngröße; Detektion: 210, 220, 254 und 305 nm; Flussrate: 1 ml/min Laufmittel-Gradient (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): A: 45/55/0.1 auf 90/10/0.1 in 30 min; B: 20/80/0.1 auf 90/10/0.1 in 30 min.
- LC-MS2: Waters 2790/Waters mit Waters 996 DAD-Detektor, Säule: RPC18 Synergy MAX, 50 x 2 mm, 3.5 µm Korngröße/Phenomenex, Detektion: 254 nm; Flussrate: 1.1 ml/min; Laufmittel-Gradient: (CH₃CN/H₂O/HCO₂H): 2.5/97.5/0.05, auf 97.5/2.5/0.05 in 4 min.

Die verwendeten Polystyrol-Harze (100-200 mesh, mit 1% Divinylbenzol quervernetzt) wurden von den Firmen Novabiochem, Advanced ChemTech und Fluka bezogen. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Aldrich, Senn Chemicals, Sigma, Acros Chimica, Avocado, Novabiochem und Advanced ChemTech bezogen. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach gebräuchlichen Laboratoriumsmethoden^[186] absolutiert.

Die Verbindung **87** wurde freundlicherweise von Dr. K. Hinterding und die Verbindung **99d** von R. Smith, Arbeitsgruppe Dr. S. Bienz, Universität Zürich, zur Verfügung gestellt.

7.2 Versuche zu Kapitel 4.2

7.2.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-tyrosinalylester 101**

Zu einer Suspension von D- oder L-Tyrosinalylester-hydrotosylat (6.00 g, 15.3 mmol) in 16 ml Wasser wird bei 0°C langsam eine Lösung von K₂CO₃ (4.22 g, 30.5 mmol) in 8 ml Wasser gegeben. Nach Lösen des ausgefallenen weißen Feststoffs durch Zugabe von 32 ml Dioxan wird bei 0°C portionsweise 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (3.95 g, 15.3 mmol) zugegeben. Nach vierstündigem Rühren bei dieser Temperatur wird die wässrige Phase mit 3 x 70 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Kristallisation aus Methylenchlorid liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: L-Enantiomer 6.02 g, 13.6 mmol, 89 % weiße Kristalle

D-Enantiomer 5.90 g, 13.3 mmol, 87 % weiße Kristalle

R_f = 0.5 (Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 11.90 min

Smp.: 98-99°C

$[\alpha]_D^{20} = +15.8^\circ$ (CH₂Cl₂, c = 1.0), Lit.^[187] = +15.1° (CHCl₃, c = 0.4) [L-Enantiomer]

$[\alpha]_D^{20} = -15.6^\circ$ (CH₂Cl₂, c = 1.0), Lit.^[142] = -16.2° (CH₂Cl₂, c = 0.5) [D-Enantiomer]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.00-3.11 (m, 2 H, Tyr-β-CH₂), 4.20 (t, ³J = 7.0 Hz, 1 H, Fmoc-CHCH₂), 4.34-4.51 (m, 3 H, Tyr-α-CH, Fmoc-CHCH₂), 4.63 (d, ³J = 5.8 Hz, Allyl-OCH₂), 5.25-5.35 (m, 3 H, NH, Allyl-CH=CH₂), 5.40-5.84 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.12 (s, 1 H, Ph-OH), 6.73 (d, ³J = 8.3 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.95 (d, ³J = 8.3 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.29-7.42 (m, 4 H, Fmoc-arom. CH), 7.56 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.76 (d, ³J = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 37.46 (β-CH₂), 47.10 (Fmoc-CHCH₂), 55.03 (α-CH), 66.24 (Fmoc-CHCH₂), 67.14 (Allyl-OCH₂), 115.57 (2 Tyr-arom. CH), 119.28 (Allyl-CH=CH₂), 120.01 (Fmoc-arom. CH), 125.13 (Fmoc-arom. CH), 127.10 (Fmoc-arom. CH), 127.76 (Fmoc-arom. CH), 130.00 (2 Tyr-arom. CH), 131.31 (All-CH=CH₂), 141.30 (2 C, Fmoc-arom. C_q), 143.64 (Fmoc-arom. C_q), 144.01 (Tyr-C_q), 155.21 (Tyr-C_q), 155.86 (NC=O), 171.55 (C=O).

IR (KBr, drift): 3318 (Tyr-OH), 3067, 2950, 1701 (C=O), 1614, 1516, 1449, 1341, 1213, 1105, 1051, 938, 838, 759, 741.

MS (MALDI-TOF): 466.7 [M+Na]⁺

C₂₇H₂₅NO₅ (443.49)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[187, 142] überein.

3-(2-Naphthyl)-L-alaninallylester-hydrotosylat 100b

Ein Gemisch von 3-(2-Naphthyl)-L-alanin **99b** (454 mg, 2.11 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (603 mg, 3.17 mmol) wird unter Rückfluß in 9 ml Allylalkohol gelöst. Dann gibt man 20 ml Toluol hinzu und erhitzt für 24 h bei 150°C unter Wasserabscheidung. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der ausgefallen Feststoff abfiltriert und mit 3 x 3 ml Et₂O gewaschen. Umfällen des Feststoffs aus CH₂Cl₂/Et₂O 5:1 (v/v) liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 867 mg, 2.03 mmol, 96 % hell-brauner Feststoff

R_f = 0.28 (Ethylacetat/Cyclohexan 2:1, 2% NEt₃ (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 9.83 min

Smp.: 188°C

$[\alpha]_D^{20} = -4.9^\circ$ (MeOH, c = 0.51)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.37 (s, 3 H, Tosyl-CH₃), 3.38-3.46 (d, ³J = 6.8 Hz, 2 H, β-CH₂), 4.46 (t, ³J = 6.8 Hz, 1 H, α-CH), 4.68-4.70 (m, 2 H, Allyl-OCH₂), 5.19-5.30 (m, 2 H, All-CH=CH₂), 5.81-5.88 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 7.24 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tosyl-arom. CH), 7.38-7.41 (m, 1 H, arom. CH), 7.49-7.52 (m, 2 H, arom. CH), 7.71-7.76 (m überl., 1 H, arom. CH), 7.72 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, Tosyl-arom. CH), 7.83-7.90 (m, 3 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 21.30 (Tosyl-CH₃), 37.56 (β-CH₂), 55.11 (α-CH), 67.84 (Allyl-OCH₂), 119.80 (Allyl-CH=CH₂), 126.91 (2 arom. CH, Tosyl), 127.15, 127.38, 127.94, 128.63 (4 arom. CH, Naphtyl), 128.71 (2 Tosyl-arom. CH.), 129.60, 129.82, (2 arom. CH, Naphtyl), 132.29, 132.69, 134.21 (3 arom. C_q, Naphtyl), 134.89 (Allyl-CH=CH₂), 141.72, 143.35 (2 arom. C_q, Tosyl), 169.71 (C=O).

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 256.1 [M+H]⁺

MS (EI, 70 eV, m/z): 255 (M⁺)

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₆H₁₈O₂ [M+H]⁺ gem. 256.1361, ber. 256.1338

C₁₆H₁₇NO₂ (255.3117) * C₇H₈O₃S (172.20)

3-(1-Methyl-1-silacyclohexyl)-D/L-alaninallylester-hydrotosylat 100d

Eine Mischung von **99d** (150 mg, 750 μmol), *p*-Toluolsulfonsäure (171 mg, 900 μmol), 2 ml Allylalkohol und 20 ml Benzol wird für 9 h bei 120°C unter Wasserabscheidung erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 25 ml Et₂O zugegeben, das ausgefallene nicht umgesetzte Ausgangsmaterial als Hydrotosylat abfiltriert und mit 3 x 5 ml Et₂O gewaschen. Einengen der vereinigten Ether-Phasen im Vakuum lieferte das Zielprodukt.

Ausbeute: 173 mg, 420 μmol , 56 % hellbrauner wachsartiger Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 10.55 min

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = - 0.06 (s, 3 H, SiCH₃), 0.47-0.53 (m, 4 H, 2 SiCH₂), 1.04 (d, ³J = 7.2 Hz, 2 H, β -CH₂), 1.17-1.29 (m, 2 H, SiCH₂CH₂CH₂), 1.40-1.55 (m, 4 H, 2 CH₂, SiCH₂CH₂), 2.23 (s, 3 H, Tosyl-CH₃), 3.84-3.92 (m, 1 H, α -CH), 4.41-4.46 (m, 1 H, Allyl-OCH), 4.56-4.61 (m, 1 H, Allyl-OCH), 5.11-5.24 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.74-5.84 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 7.09 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Tosyl-arom. CH), 7.59 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Tosyl-arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = - 4.49 (SiCH₃), 13.72 [14.08] (2 SiCH₂), 18.09 (β -CH₂), 21.42 (Tosyl-CH₃), 25.11 [25.23] (2 SiCH₂CH₂), 30.81 (SiCH₂CH₂CH₂), 52.15 (α -CH), 67.97 (Allyl-OCH₂), 120.19 (Allyl-CH=CH₂), 126.83, 129.86 (2 x 2 Tosyl-arom. CH), 132.38 (Allyl-CH=CH₂), 141.71, 143.31 (2 Tosyl C_q), 170.67 (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 242.0 [M+H]⁺

MS (EI, 70 MHz, m/z): 241 (M⁺)

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₂H₂₄SiNO₂ [M+H]⁺ ber. 242.1576, gem. 242.1570

C₁₂H₂₃SiNO₂ (241.41) *C₇H₈O₃S (172.20)

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-3-[4-[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]-L-alaninallylester 100e**

Zu einer Lösung von L-Tyrosinallylester-hydrotosylat (5.00 g, 12.7 mmol) in 1.5 ml MeOH wird bei 0°C NEt₃ (5.29 ml, 38.1 mmol) und anschließend Di-*tert*-butyl-dicarbonat (3.05 g, 14.0 mmol) gegeben. Anschließend wird für 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wird der gelbe ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat gelöst und mit 2 x 30 ml 0.5 N HCl-Lsg., 2 x 30 ml 0.5 N NaHCO₃-Lsg. und 30 ml H₂O gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ und Einengen im Vakuum erhält man *N*-**tert-Butyloxycarbonyl-L-tyrosinallylester** als gelbes hochviskoses Öl welches langsam zu

einem wachsartigen Feststoff erstarrt, der nicht weiter gereinigt werden braucht und direkt weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 4.13 g, 12.9 mmol, quant. gelbes Wachs

R_f = 0.46 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.93-3.04 (m, 2 H, β-CH₂), 4.52-4.60 (m, 3 H, Allyl-OCH₂, α-CH), 5.09-5.32 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.80-5.88 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.72 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.23 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH).

C₁₇H₂₃NO₅ (213.37)

Zu einer Lösung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-L-tyrosinallylester (3.5 g, 10.8 mmol) in 20 ml CH₂Cl₂ wird bei 0°C Pyridin (5 ml) gegeben. Anschließend tropft man innerhalb von 2 h 2.19 ml (13.0 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid hinzu, sodass die Reaktionstemperatur zwischen 0 und 5°C liegt. Nach Rühren für weitere 30 min bei 0°C werden 30 ml H₂O und 60 ml CH₂Cl₂ zugegeben. Anschließend werden die Phasen getrennt und die organische Phase wird mit 30 ml 0.5 N NaOH-Lsg, 30 ml H₂O, 2 x 50 ml 10 %ige Zitronensäure und 30 ml H₂O gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO₄ und Einengen im Vakuum wird der Rückstand einer Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:6 (v/v)) unterzogen, welche das Zielprodukt liefert.

Ausbeute: 3.44 g, 7.79 mmol, 72 % gelbes Wachs

R_f = 0.56 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 29.59 min

[α]_D²⁰ = -9.0° (MeOH, c = 0.50)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.41 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.02-3.08 (m, 1 H, β-CHH), 3.14-3.19 (m, 1 H, β-CHH), 4.59 (d, ³J = 6.1 Hz, Allyl-OCH₂), 5.03-5.05 (m, α-CH), 5.25 (d, ³J = 9.4 Hz, 1 H, Allyl-CH=CHH), 5.28 (d, ³J = 15.8 Hz, 1 H, Allyl-CH=CHH), 5.78-5.88 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 7.19 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.23 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH).

MS (MALDI-TOF): 476.5 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₈H₂₃F₃NO₇S [M+H]⁺ 454.1147, gem. 454.1165

C₁₈H₂₂F₃NO₇S (453.43)

3-[4-[[Trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]-L-alaninallylester-hydrochlorid 102

Man löst **100e** (2.02 g, 4.46 mmol) in 40 ml einer HCl-Lösung in Dioxan (4 N, 160 mmol) und rührt für 4 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das Zielprodukt, welches nicht weiter gereinigt werden muss.

Ausbeute: 1.75 g, 4.50 mmol, quant. gelbes Pulver

R_f = 0.18 (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1, 1% NEt₃ (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 13.32 min

Smp.: 143-144°C

$[\alpha]_D^{20} = +9.4^\circ$ (MeOH, c = 0.5)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): δ = 3.24-3.18 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1 H, β-CHH), 3.32-3.37 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1 H, β-CHH), 4.13-4.24 (m, 1 H, α-CH), 4.52 (d, ³J = 6.1 Hz, 2 H, Allyl-OCH₂), 5.14-5.19 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.63-5.71 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 7.15 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.32 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): δ = 35.15 (β-CH₂), 53.54 (α-CH), 66.88 (Allyl-OCH₂), 116.90 (Allyl-CH=CH₂), 119.81, 121.58 (2 x 2 Tyr-arom. CH), 130.20 (Tyr arom. C_q), 131.39 (Allyl-CH=CH₂), 134.54 (Tyr-arom. C_q), 148.83 (CF₃-C_q), 167.92 (C=O).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 353.92 [M+H]⁺; R_t = 1.51 min

MS (MALDI-TOF): 353.4 [M+H]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₃H₁₅F₃NO₅S [M+H]⁺ 354.0623, gem. 354.0616

Elementaranalyse: ber. C 40.06, H 3.88, N 3.59

gem. C 40.3, H 4.0, N 3.6

C₁₃H₁₄F₃NO₅S (353.32)*HCl (36.46)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung N-tert-Butyloxycarbonyl, N-methyl-aminosäuren (AAV 1)

Eine Lösung der N-Boc-Aminosäure (9.8 mmol) in 30 ml abs. THF wird bei 0°C mit MeI (78.4 mmol, 8 Äquiv.) und mit NaH (50%ige Suspension in Mineralöl, 29.4 mmol, 3 Äquiv.) versetzt. Man rührt zunächst für 1 h bei 0°C, anschließend für 24 h bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 20 ml Ethylacetat und 3.3 ml 25%iger NH₃-Lsg. bei 0°C wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der pH-Wert der Mischung bei 0°C mit 1 N HCl-Lsg. auf 2 eingestellt. Man extrahiert mit 3 x 100 ml Ethylacetat und wäscht die vereinigten organischen Phasen mit 20 ml 10%iger Na₂SO₃-Lsg und 20 ml H₂O. Nach Trocknung über

MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das jeweilige Produkt wird über Säulenchromatographie bzw. durch Kristallisation gereinigt.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 104a**

Gemäß AAV 1 wird **103a** (2.60 g, 9.8 mmol) mit MeI (4.88 ml, 78.4 mmol) alkyliert. Säulenchromatographie des Rohprodukts an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:2, 1 % HOAc (v/v)) liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 2.67 g, 9.56 mmol, 97% farbloses Öl

R_f = 0.30 (Ethylacetat/Hexan 1:2, 1 % HOAc (v/v))

$[\alpha]_D^{20} = -80.3^\circ$ (MeOH, c = 1.0), Lit.^[188] = -84.9° (MeOH, c = 1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.33$ [1.38] (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.69 [2.75] (s, 3 H, NCH₃), 2.99-3.11 (m, 1 H, β -CHH), 3.28-3.37 (m, 1 H, β -CHH), 4.60-4.63 [4.88-4.92] (m, 1 H, α -CH), 7.16-7.29 (m, 5 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 21.64$ (+, NCH₃), 28.14 [28.25] (+, C(CH₃)₃), 34.73 [35.26] (β -CH₂), 60.25 [61.50] (α -CH), 80.56 [80.78] (q, C(CH₃)₃), 125.30 [126.75], 128.45 [128.60], 128.91 [129.03] (3 x 2 arom. CH), 137.16 [137.84] (arom. C_q), 155.11 [156.24] (C=O Urethan), 176.37 [177.38] (q, C=O).

C₁₅H₂₁NO₄ (279.33)

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[188] überein.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-alanin 104c**

Gemäß AAV 1 wird **103c** (2.5 g, 13.2 mmol) mit MeI (6.60 ml, 10.6 mmol) umgesetzt. Kristallisation aus einem Gemisch von Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v) liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 1.61 g (7.93 mmol, 60 %) weißer Feststoff

R_f = 0.35 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 92°C, Lit.^[189]: 93-94°C

$[\alpha]_D^{20} = -43.6^\circ$ (CH₂Cl₂, 0.78), Lit.^[189] = -30.4° (EtOH, c = 0.5)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.42$ -1.46 (m, 12 H, β -CH₃, C(CH₃)₃), 2.84 (m, 3 H, NCH₃), 4.45 [4.84] (m, 1 H, α -CH), 10.63 (br. s, 1 H, CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.78 [15.24] (β -CH₃), 28.54 (C(CH₃)₃), 30.84 [31.46] (NCH₃), 55.78 [55.23] (α -CH), 80.76 (C(CH₃)₃), 156.53 (C=O Urethan), 178.01 (C=O).

C₉H₁₇NO₄ (203.24)

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[189] überein.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosin 104b**

Gemäß AAV 1 wird **103b** (1.54 g, 5.20 mmol) mit MeI (2.59 ml, 41.6 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan = 1:2, 1% HOAc (v/v)) erhält man die Zielverbindung.

Ausbeute: 1.57 g, 0.50 mmol, 96% farbloses Öl

R_f = 0.42 (Ethylacetat/Hex = 1:1, 1% HOAc (v/v))

$[\alpha]_D^{20}$ = -82.4° (MeOH, c = 1.0), Lit.^[190] = -16.9° (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.34 [1.38] (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.68 [2.74] (s, 3 H, NCH₃), 2.91-3.08 (m, 1 H, β -CHH), 3.19-3.29 (m, 1 H, β -CHH), 3.77 (s, 3 H, OCH₃); 4.54 [4.77] (dd, ³J = 10.8 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1 H, α -CH), 6.82 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr arom. CH), 7.08 [7.11] (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Tyr arom. CH).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 28.20 [28.28] (C(CH₃)₃), 32.64 [32.99], (NCH₃), 33.85 [34.41] (β -CH₂), 55.26 (OCH₃), 60.90 [61.62] (α -CH), 80.68 (C(CH₃)₃), 113.90 [114.04] (2 Tyr-arom. CH), 129.10 [129.41] (Tyr-arom. C_q), (129.91 [129.95] (2 Tyr-arom. CH), 155.05 [156.41] (Tyr-arom. C_q), 158.37 [158.45] (C=O Urethan), 176.15 [176.56] (C=O).

MS (EI, 70 eV, m/z): 309 (5) [M⁺], 253 (7) [M⁺ - C₄H₈], 236 (4) [M⁺ - C₄H₈ - OH], 178 (66) [M⁺ - C₄H₈ - OH - CO₂ - CH₂], 164 (4) [M⁺ - C₄H₉ - CO₂ - CO₂], 121 (100) [C₆H₅OCH₃], 57 (34) [C₄H₉⁺].

C₁₆H₂₃NO₅ (309.36)

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[190] überein, lediglich der Drehwert weicht ab.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-aminosäureallylestern (AAV 2)

Zu einer Lösung der *N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-aminosäure (3.8 mmol) in 20 ml trockenem DMF wird Cs₂CO₃ (1.24 g, 3.8 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Mischung wird

für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend gibt man Allylbromid (658 μl , 7.6 mmol, 2 Äquiv.) tropfenweise hinzu und rührt 45 min bei Raumtemperatur. Die anorganischen Salze werden abfiltriert und mit 2 ml Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 5 ml gesätt. NaHCO_3 -Lsg. aufgenommen. Nach Extraktion mit 3×20 ml Ethylacetat, Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 und Entfernung des Lösungsmittels erhält man das jeweilige Produkt.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-L-phenylalaninallylester 105a**

Gemäß AAV 2 wird **104a** (2.57 g, 9.54 mmol) mit Allylbromid (1.65 ml, 19.10 mmol) umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 2.64 g, 8.27 mmol, 92 % farbloses, wenig viskoses Öl

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 14.05$ min

$R_f = 0.42$ (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:4 (v/v))

$[\alpha]_D^{20} = -66.7^\circ$ (CH_2Cl_2 , $c = 0.98$); Lit.^[142] = -67.7 (CH_2Cl_2 , $c = 0.75$)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.34$ [1.38] [s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 2.70 [2.73] (s, 3 H, NCH_3), 2.94-3.12 (m, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 3.22-3.40 (m, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 4.61 [4.94] (m überl., 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.62 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, Allyl-OCH_2), 5.19-5.41 (m, 2 H, Allyl-CH=CH_2), 5.81-6.02 (m, 1 H, Allyl-CH=CH_2), 7.09-7.34 (m, 5 H, arom. CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.19$ [28.25] ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.14 [32.47] (NCH_3), 35.05 [35.47] ($\beta\text{-CH}_2$), 59.79 [61.62] ($\alpha\text{-CH}$), 65.63 [65.67] (Allyl-OCH_2), 79.94 [80.29] ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118.26 [118.62] (Allyl-CH=CH_2), 126.51 [126.66], 128.38 [128.54] (2 x 2 arom. CH), 128.95 [129.02] (arom. CH), 131.69 [131.90] (Allyl-CH=CH_2), 137.43 [137.65] (arom. C_q), 154.96 [155.77] (C=O Urethan), 170.78 [171.08] (C=O).

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ (319.40)

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[142] überein.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl, *N,O*-dimethyl-L-tyrosinallylester 105b**

Gemäß AAV 2 wird **104b** (1.18 g, 3.8 mmol) mit Allylbromid (658 μl , 9.20 mmol, 7.6 mmol) umgesetzt. Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:5 (v/v)) ergibt das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 1.26 g, 3.6 mmol, 95 % farbloses, wenig viskoses Öl

$R_f = 0.60$ (Ethylacetat/Hexan = 1:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 13.20$ min

$[\alpha]_D^{20} = -80.4^\circ$ (CH₂Cl₂, c = 0.5)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.34 [1.38] (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.71 [2.73] (s, 3 H, NCH₃), 2.94-3.01 (m, 1 H, β-CHH), 3.20-3.26 (m, 1 H, β-CHH), 3.77 (s, 3 H, OCH₃); 4.52 [4.89] (dd, ³J = 10.6 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1 H, α-CH), 4.63 (d, ³J = 5.5 Hz, 2 H, Allyl-OCH₂), 5.21-5.34 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.89-5.92 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.82 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.08 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 28.22 [28.28] (C(CH₃)₃), 32.07 [32.57], (NCH₃), 34.15 [34.59] (β-CH₂), 55.24 (OCH₃), 59.86 (α-CH), 61.78 (Allyl-OCH₂) 79.93 [80.23] (C(CH₃)₃), 113.80 [113.97] (2 Tyr-arom. CH), 118.24 [118.59] (Allyl-CH=CH₂), 129.39 [129.58] (arom. C_q), 129.91 [129.96] (2 Tyr-arom. CH), 131.71 [131.91] (Allyl-CH=CH₂), 155.01 [155.82] (C_q-OCH₃), 158.27 [158.39] (C=O Urethan), 170.84 [171.15] (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

MS (EI, 70 eV): 349 (1) [M⁺], 276 (8) [M⁺ - C₄H₈ - CH₃], 248 (2) [M⁺ - C₄H₉ - CO₂], 228 (1) [M⁺ - CH₂C₆H₅OCH₃], 218 (100) [M⁺ - C₄H₉ - CO₂ - OCH₂], 208 (9) [M⁺ - C₄H₈ - CO₂ - C₃H₅], 128 (40) [M⁺ - C₄H₈ - CO₂ - NCH₃ - OC₃H₅ - OCH₂], 121 (68) [CH₂C₆H₅OCH₃⁺], 57 (44) [C₄H₉⁺].

Elementaranalyse: ber. C 65.31, H 7.79, N 4.01

gef. C 65.55, H 7.81, N 4.07

C₁₉H₂₇NO₅ (349.44)

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-alaninallylester 105c**

gemäß AAV 2 wird **104c** (1.61 g, 7.92 mmol) wird mit Allylbromid (1.37 ml, 15.84 mmol) umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 1.82 g, 7.45 mmol, 94% leicht gelbliches, wenig viskoses Öl.

$R_f = 0.38$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:4 (v/v))

$[\alpha]_D^{20} = -28.5^\circ$ (CH₂Cl₂, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.40 (m überl. 3 H, β-CH₃), 1.43 [1.46] [s, 9 H, C(CH₃)₃], 2.80 [2.87] (s, 3 H, NCH₃), 4.45 [4.85] (m, 1 H, α-CH), 4.60 (d, ³J = 5.6 Hz, 2 H, All-OCH₂), 5.22-5.34 (m, 2 H, Allyl-CH₂), 5.85-5.95 (m, 1 H, Allyl-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.82$ [15.25] ($\beta\text{-CH}_3$), 28.34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.49 [31.17] (NCH_3), 53.53 [55.15] ($\alpha\text{-CH}$), 65.50 (OAllyl-CH_2), 80.01 [80.25] ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118.12 [118.44] (Allyl-CH=CH_2), 131.79 [131.90] (Allyl-CH=CH_2), 155.25 [155.93] (C=O Urethan), 172.05 (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

MS (EI, 70 eV, m/z (%)): 243 (3) [M^+], 170 (7) [$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9 - \text{CH}_4$], 158 (34) [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_5 - \text{CO}_2$], 142 (17) [$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9 - \text{CO}_2$], 102 (100) [$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9 - \text{CO}_2 - \text{C}_3\text{H}_4$], 57 (34) [C_4H_9^+], 41 (31) [C_3H_5^+].

HR-MS (EI, 70 eV, m/z): ber. 243.1471, gem. 243.1488

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ (243.30)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von *N*-Methylaminosäureallylesterhydrochloriden (AAV 3)

Der jeweilige *N-tert*-Butyloxycarbonyl-*N*-methylaminosäureallylester (7.26 mmol) wird in 150 ml mit Chlorwasserstoff gesättigtem Diethylether bei 0°C gelöst und anschließend für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Kristallisation des Rückstands aus einem Gemisch von MeOH und Et_2O erhält man das gewünschte Produkt.

N-Methyl-L-phenylalaninallylester-hydrochlorid 106a

Der Allylester **105a** (2.32 g, 7.26 mmol) wird gemäß AAV 3 mit 150 ml mit Chlorwasserstoff gesättigtem Ether umgesetzt. Nach Kristallisation aus MeOH/ Et_2O 1:2 (v/v) erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 1.66 g, 6.49 mmol, 89 % weißer Feststoff

R_f = 0.27 (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1, 1% NEt_3 (v/v))

Smp.: 111-112°C

$[\alpha]_D^{20} = -17.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.5$)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.78$ (s, 3 H, NCH_3), 3.32-3.42 (m, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 3.62-3.69 (m, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 4.09 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.55 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 2 H, All-OCH_2), 5.15-5.21 (m, 2 H, Allyl-CH=CH_2), 5.61-5.77 (m, 1 H, Allyl-CH=CH_2), 7.21-7.34 (m, 5 H, arom. CH), 9.81 (br. s, 1 H, NH), 10.61 (br. s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 31.94 (NCH₃), 35.85 (β -CH₂), 62.45 (α -CH), 66.85 (Allyl-OCH₂), 119.84 (Allyl-CH=CH₂), 127.63 (arom. CH), 128.84 (2 arom. CH), 129.31 (2 arom. CH), 130.46 (Allyl-CH=CH₂), 134.13 (arom. C_q), 167.41 (C=O).

IR (KBr, drift): 3494 (NH), 2936 (CH), 2737 (NCH₃), 2698, 2424 (C-NR₂H⁺), 1755 (C=O), 1653, 1605, 1575, 1472 (CH), 1456 (CH), 1397 (CH₃), 1264.

MS (FAB, m/z): 219.969 [M+H]⁺

Elementaranalyse: ber. C 61.05, H 7.09, N 5.48
gem. C 61.11, H 6.96, N 5.45

C₁₃H₁₇NO₂ (219.28)*HCl (36.46)

***N,O*-Dimethyl-L-tyrosinalylester-hydrochlorid 106b**

Der Allylester **105b** (597 mg, 1.71 mmol) wird gemäß **AAV 3** mit 60 ml Chlorwasserstoffgesättigtem Ether umgesetzt. Nach Kristallisation aus MeOH/Et₂O 1:2 (v/v) erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 449 mg, 1.57 mmol, 92% weißer Feststoff

R_f = 0.25 (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1, 1% NEt₃ (v/v))

Smp.: 107°C

$[\alpha]_D^{20} = +9.4^\circ$ (MeOH, c = 0.5)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.77 (s, 3 H, NCH₃), 3.28-3.37 (m, 1 H, β -CHH), 3.53-3.61 (m, 1 H, β -CHH), 3.76 (s, 3 H, OCH₃), 4.05 (m, 1 H, α -CH), 4.57 (d, ³J = 5.9 Hz, 2 H, Allyl-OCH₂), 5.19–5.26 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.66–5.82 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.82 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.20 (d, ³J = 8.4 Hz, Tyr-arom. CH), 9.59 (br. s, 1 H, NH), 10.53 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 32.10 (NCH₃), 35.08 (β -CH₂), 55.22 (OCH₃), 62.67 (α -CH), 66.91 (Allyl-OCH₂), 114.24 (2 Tyr-arom. CH), 119.92 (Allyl-CH=CH₂), 125.87 (arom. C_q), 130.44 (2 Tyr-arom. CH), 130.53 (Allyl-CH=CH₂), 159.05 (C_q-OCH₃), 167.46 (C=O).

IR (KBr, drift): 3476 (NH), 3003 (arom. CH), 2913, 2839 (CH), 2698, 2449 (C-NR₂H⁺), 1745 (C=O), 1653, 1605, 1575, 1465 (CH), 1453 (CH), 1397 (CH₃), 1252.

MS (EI, 70 eV, m/z (%)): 249 (2) [M⁺ - HCl], 164 (35) [M⁺ - HCl - CO₂ - C₃H₅], 128 (100) [M⁺ - NCH₃ - OCH₂ - OC₃H₅], 121 (23) [CH₂C₆H₄OCH₃⁺], 82 (5) [2 × C₄H₁₀⁺], 41 (11) [C₃H₅⁺].

Elementaranalyse: ber. C 58.84, H 7.05, N 4.90

gem. C 59.00, H 6.93, N 4.78

$C_{14}H_{29}NO_3$ (249.31)*HCl (36.46)

***N*-Methyl-L-alaninallylester-hydrochlorid 106c**

Der Allylester **105c** (1.55 g, 6.39 mmol) wird gemäß AAV 3 in 150 ml mit Chlorwasserstoff gesättigtem Ether umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein leicht gelbliches Öl, welches nach mehreren Tagen am Pumpenvakuum erstarrt. Umfällen aus MeOH/Et₂O 1:6 (v/v) liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 1.03 g, 5.75mmol, 90% gelblichbraunes Wachs

R_f = 0.18 (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1, 1% NEt₃ (v/v))

$[\alpha]_D^{20} = -5.3^\circ$ (MeOH, c = 0.75)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.69 (d, ³J = 7.0 Hz, 3 H, β-CH₃), 2.76 (s, 3 H, NCH₃), 3.98 (m, 1 H, α-CH), 4.67 (d, ³J = 5.8 Hz, 2 H, All-OCH₂), 5.24-5.35 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.83-5.98 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 9.68 (bs, 1 H, NH), 9.91 (bs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.28 (β-CH₃), 30.91 (NCH₃), 56.12 (α-CH), 66.95 (Allyl-OCH₂), 119.75 (Allyl-CH=CH₂), 130.78 Allyl-CH=CH₂), 168.44 (C=O).

IR (KBr, drift): 3416 (N-H), 2956, 2717, 2439, 1745 (C=O), 1681, 1650, 1556, 1504, 1455, 1384, 1338, 1304, 1226, 1196, 1104, 1038, 946, 820, 752.

MS (EI, 70 eV, m/z (%)): 143 (1) (M⁺ - HCl), 142 (1) (M⁺ - HCl - H), 128 (1) (M⁺ - HCl - CH₃), 102 (1) (M⁺ - HCl - C₃H₅), 58 (100) [C₄H₁₀], 41 (31) [C₃H₅⁺], 36 (7) (HCl).

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₇H₁₄NO₂ [M+H]⁺ 143.0946, gem. 143.0930

C₇H₁₃NO₂ (143.18)*HCl (36.46)

7.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Monitoring der *N*-terminalen Kupplungsreaktion mittels qualitativen Ninhydrin Test^[158] (AAV AP1)

Man suspendiert 1 mg Polymer in 1 ml einer Ninhydrin-Lösung (300 mg Ninhydrin in 3 ml Essigsäure und 97 ml *n*-Butanol) und erhitzt für 2 min zum Sieden. Kommt es dabei zu einer Blaufärbung des Polymers, so weist dies auf eine unvollständig verlaufene Kupplung. Tritt keine Blaufärbung auf, so verlief die Umsetzung quantitativ.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Belegungsgrades mittels UV-Spektroskopie^[99,136] (AAV AP2)

Eine eingewogene Menge zwischen 5 und 10 mg Polymer wird mit 12 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und für 20 min geschüttelt. Man entnimmt 3 ml und bestimmt UV-spektroskopisch die Absorption bei 301 nm. Die Konzentration und damit der Belegungsgrad lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800$).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung von einer Polymerprobe zwecks nachfolgender Analytik (AAV AP3)

Man versetzt 1 mg Polymer mit 0.5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) und schüttelt für 20 min. Nach Abfiltrieren des Harzes wird es mit 2 x 0.5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und die vereinigten Lösungen werden im Vakuum eingengt. Der Rückstand lässt sich mittels DC, HPLC, MALDI-TOF und ESI-MS analysieren.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Palladium⁰-katalysierten Spaltung von Allylestern an der festen Phase (AAV P1)

Variante A: Man wäscht das entsprechende Harz (0.6 mmol) unter Inertgasatmosphäre mit jeweils 2 x 5 ml THF, CH₂Cl₂ und dem jeweiligen trockenen und im Ultraschallbad entgasten Lösungsmittel und läßt es im gleichen Medium für mehrere Minuten quellen. Dann wird eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄-Katalysator zugegeben und unter Schütteln gelöst. Anschließend gibt man 10-30 Äquiv. Phenylsilan hinzu und schüttelt die Mischung unter Argon und Lichtausschluss. Nach Abfiltrieren des Harzes wird es mit jeweils 2 x 5 ml CH₂Cl₂, DMF/H₂O 1:1 (v/v), DMF, MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen.

Variante B: Man wäscht das entsprechende Harz (0.6 mmol) unter Inertgasatmosphäre mit jeweils 2 x 5 ml THF, CH₂Cl₂ und einer trockenen und im Ultraschallbad entgasten Mischung von NMA/THF (1:5 (v/v)) und läßt das Polymer in 10 ml obiger NMA/THF-Mischung für mehrere Minuten quellen. Dann wird eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄-Katalysator zugegeben und man schüttelt die Mischung unter Argon und Lichtausschluss. Nach Abfiltrieren des Harzes wird es analog Variante A gewaschen.

Variante C: Man wäscht das entsprechende Harz (0.6 mmol) unter Inertgasatmosphäre mit jeweils 2 x 5 ml THF, CH₂Cl₂ und einer Mischung von Morpholin/THF (1:9 (v/v)) (trocken und im Ultraschallbad entgast) und läßt das Harz in 10 ml obiger Morpholin/THF-Mischung für mehrere Minuten quellen. Dann wird eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄-Katalysator zugegeben

und man schüttelt die Mischung unter Argon und Lichtausschluß. Nach Abfiltrieren des Harzes wird es analog Variante A gewaschen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur basenvermittelten Spaltung von Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppen an der festen Phase (AAV P2)

Das Polymer (0.5 mmol/g, 50 µmol) wird mit einer Mischung von 3 ml Piperidin/DMF 1:4 (v/v) versetzt und zwischen 5 und 30 min geschüttelt. Anschließend spült man, gibt weitere 3 ml obiger Mischung hinzu und schüttelt wieder zwischen 5 und 30 min. Nun wird mit 4 x 5 ml DMF, 4 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und das Harz direkt weiter umgesetzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur C-terminalen Kupplung von Aminosäureallylestern an festphasengebundene Aminosäuren (AAV P3)

Variante A: Zu einer in NMP gequollener polymergebundenen Verbindung (0.50 mmol/g, 0.50 mmol) wird eine Lösung von 3-6 Äquivalenten HATU, 1-2 Äquivalenten HOAt und 3-6 Äquivalenten DIEA in NMP gegeben. Nach Schütteln für 30-60 min wird abfiltriert, mit 2 x 5 ml NMP gewaschen und dann eine Lösung von 3-6 Äquivalenten der Aminkomponente und 6-12 Äquivalenten DIEA in NMP zugegeben. Nach mehrstündigem Schütteln wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1 (v/v), 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Variante B: Zu einer Lösung von 3-6 Äquivalenten PyAOP, 3-6 Äquivalenten Aminkomponente und wahlweise 1-2 Äquivalenten HOAt in NMP werden 12-15 Äquivalente DIEA gegeben, und diese Lösung wird unmittelbar zu einer Suspension der entsprechenden polymergebundenen Verbindung (0.50 mmol/g, 0.50 mmol) in NMP gegeben. Nach mehrstündigem Schütteln wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1 (v/v), 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur N-terminalen Anknüpfung von N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren an der Festphase (AAV P4)

Variante A: Zu einer Lösung von 3-5 Äquivalenten der N-Fluorenylmethoxycarbonylamino-säure, 2.8-4.8 Äquivalenten HATU und wahlweise 1 Äquivalent HOAt in ml NMP werden 10-16 Äquivalente DIEA gegeben und die Mischung für einige Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man dieses Gemisch zu in 5 ml NMP gequollenem Polymer (0.50 mmol/g,

0.50 mmol). Nach Schütteln der Mischung für mehrere Stunden wird das Polymer abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1, 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Variante B: Zu einer Lösung von jeweils 4-6 Äquivalenten Aminosäure, HOAt und wahlweise 2,6-Lutidin in 15 ml absolutem DMF werden 4-6 Äquivalente *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid gegeben. Nach 5-minütigem Schütteln wird diese Lösung zu einer Mischung von in 10 ml DMF gequollenem Polymer (0.50 mmol/g, 1.0 mmol) gegeben und die Suspension für mehrere Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Harz abfiltriert, mit 5 x 5 ml DMF, 5 x 5 ml DMF/H₂O 1:1 (v/v), 5 x 5 ml DMF, 5 x 5 ml MeOH und 8 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Verbindungen vom polymeren Träger (AAV P5)

Variante A: Nach Quellen des Harzes in 5 ml CH₂Cl₂ für 10 min wird das Lösungsmittel abgesaugt und eine Mischung von TFA und dem jeweiligen Fänger zugegeben. Nach mehrstündigem Schütteln wird der polymere Träger abfiltriert und mit 5 ml TFA, 5 ml CHCl₃, 2 x 5 ml CH₂Cl₂, 5 ml MeOH und 5 ml Toluol gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden anschließend im Vakuum eingeengt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgt die Reinigung mittels präparativer HPLC. Gefriertrocknung liefert das jeweilige Zielprodukt als pulverförmigen Feststoff.

Variante B: Nach Quellen des Harzes in 5 ml CH₂Cl₂ für 10 min wird das Lösungsmittel abgesaugt und mit 5 ml einer Mischung von TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) versetzt. Nach Schütteln für mehrere Minuten wird die Lösung abgesaugt. Analog wird dieser Vorgang mit 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und 2 x 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) wiederholt, wobei jeweils für mehrere Minuten bis Stunden geschüttelt wird. Nach Abfiltrieren und Waschen des Polymers mit 3 x 5 ml CH₂Cl₂, 2 x 5 ml EtOH und 5 ml Toluol werden die vereinigten Waschlösungen eingeengt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgt die Reinigung mittels präparativer HPLC. Gefriertrocknung liefert das jeweilige Zielprodukt als pulverförmigen Feststoff.

Darstellung eines 2,3-Dihydro-4H-pyran-2-carbinol-modifizierten Merrifield-Harzes 75

Eine Lösung von mit 2-Hydroxymethyl-5,6 dihydropyran **107** (216 µl, 2.79 mmol) in 6 ml DMF wird bei 0°C mit NaH (112 mg, 2.80 mmol, 60%ige Suspension in Mineralöl) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird Merrifield-Harz **108** (750

mg, 1.24 mmol/g, 0.93 mmol) zugegeben und für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Harzes wird es mit 2 x 10 ml DMF, 10 ml H₂O, 2 x 10 ml DMF/H₂O 1:1 (v/v), 2 x 10 ml DMF, 2 x 10 ml EtOH, 2 x 10 ml CH₂Cl₂ und 2 x 10 ml absolutem CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

IR (KBr, drift): 3083, 3060, 3027, 2925, 2852, 1944, 1872, 1804, 1747, 1651, 1602, 1493, 1453, 1362, 1241, 1071.

Synthese des polymergebundenen Tyrosinbausteins D-93E

Man wäscht Oxymethyldihydropyranfunktionalisiertes Merrifield-Harz **75** (450 mg, 1.24 mmol/g, 0.56 mmol) jeweils mit 2 x 5 ml absoluten THF und CH₂Cl₂, trocknet das Polymer für 2 h im Vakuum und transferiert es in einen ausgeheizten Kolben. Nach Quellen in 5 ml trockenem 1,2-Dichlorethan werden **D-101** (989 mg, 2.23 mmol) und PPTS (280 mg, 1.12 mmol) zugegeben und man erhitzt die Suspension unter vorsichtigem Rühren für 60 h bei 80°C. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Polymer abfiltriert, mit 2 x 10 ml CH₂Cl₂, 2 x 10 ml MeOH, 2 x 10 ml CH₂Cl₂, 2 x 10 ml Hexan, und 2 x 10 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

IR (KBr, drift): 3434 (Amid-NH), 3082, 3059, 3026, 2926, 2851, 1943, 1874, 1802, 1729 (C=O), 1667, 1601, 1493, 1453, 1362, 1104, 1070.

Belegung: 0.26 mmol/g, 28% (Fmoc-Bestimmung gemäss AAV AP2)

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 11.58 min

R_f = 0.46 (Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v))

Die analytischen Daten stimmen mit der Verbindung **101** überein.

Trichloracetimid-funktionalisiertes Wang-Harz 109

Nach Waschen mit 2 x 5 ml trockenem THF und 2 x 5 ml CH₂Cl₂, Trocknen im Vakuum über Nacht und Transfer in einen ausgeheizten Kolben wird Wang-Harz (277 mg 0.71 mmol/g, 197 µmol) in 4 ml trockenem CH₂Cl₂ für 30 min gequollen. Anschließend werden Trichloracetimid-nitril (520 mg, 3.6 mmol) und bei 0°C DBU (30 µl, 0.20 mmol) zugegeben. Es wird nun 1 h bei 0°C und weitere 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird das Polymer abfiltriert, mit 20 ml CH₂Cl₂, 10 ml DMSO, 2 x 5 ml DMF, 2 x 5 ml THF und 2 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Im IR-Spektrum zeigt sich die charakteristische C=N-Bande bei 1665 cm^{-1} .

IR (KBr, drift): 3341 (Imid-NH), 3083, 3060, 3026, 2924, 2850, 1944, 1877, 1804, 1747, 1665 (C=N), 1602, 1584, 1514, 1493, 1301, 1244, 1070, 1028.

Darstellung des polymergebundenen Tyrosinfragments L-93W (Trichloracetimid-Kupplung)

Das mit 2 x 5 ml THF und 2 x 5 ml CH_2Cl_2 gewaschene und über Nacht getrocknete Polymer **109** (300 mg, 0.71 mmol/g, 230 μmol) wird für 30 min in 3 ml CH_2Cl_2 gequollen. Anschließend erfolgt die Zugabe einer Lösung von **L-101** (205 mg, 460 μmol) in 5 ml CH_2Cl_2 und anschließend $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (30 μl , 240 mmol). Nach Rühren für 10 min wird das Polymer abfiltriert, mit 2 x 5 ml CH_2Cl_2 , 5 ml MeOH, 5 ml DMF/ H_2O 1:1 (v/v), 2 x 5 ml DMF, 2 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH_2Cl_2 gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Im IR-Spektrum ist das Verschwinden der C=N-Bande und die Bildung einer C=O-Bande bei 1734 cm^{-1} ersichtlich.

IR (KBr, drift): 3531 (br. Amid-NH), 3429 (br. Amid-NH), 3082, 3059, 3025, 2922, 2849, 1944, 1872, 1799, 1727 (C=O), 1601, 1509, 1493, 1452, 1242, 1029.

Belegung: 0.20 mmol/g, 27% (Fmoc-Bestimmung gemäß AAV AP2)

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 11.75\text{ min}$

$R_f = 0.46$ (Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v))

Die Analytischen Daten stimmen mit den Werten für Verbindung **L-101** überein

Darstellung des polymergebundenen Tyrosinbausteins 93W (Mitsunobu-Reaktion)

Ein mit 2 x 5 ml THF und 2 x 5 ml CH_2Cl_2 gewaschenes und für 20 h im Vakuum getrocknetes Wang-Harz (500 mg, 1.29 mmol/g, 0.65 mmol) wird für 45 min in 4 ml trockenem THF gequollen. Anschließend gibt man eine Lösung von **L-101** oder **D-101** (865 mg, 1.95 mmol) und Triphenylphosphin (511 mg, 1.95 mmol) in 4 ml THF hinzu. Daraufhin wird bei 0°C langsam eine Lösung von DEAD (303 μl , 1.95 mmol) in 1 ml THF getropft. Man läßt die Suspension unter gelegentlichem Schütteln bei dieser Temperatur stehen und schüttelt dann 24 h bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren und Waschen mit 2 x 5 ml THF, 2 x 5 CH_2Cl_2 , 2 x 5 DMF, 2 x 5 ml DMF/ H_2O 1:1 (v/v), 2 x 5 DMF, 2 x 5 MeOH und 2 x 5 CH_2Cl_2 wird das Polymer im Vakuum getrocknet.

IR (KBr, drift): 3530 (Amid-NH), 3430 (Amid-NH), 3083, 3060, 3026, 2923, 2848, 1944, 1873, 1802, 1734 (C=O), 1602, 1507, 1493, 1452, 1182, 1068, 1028.

Belegung: 0.53 mmol/g, 59% (Fmoc-Bestimmung gemäß AAV AP2)

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 11.52 min

R_f = 0.45 (Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v))

Die Analytischen Daten stimmen mit den Werten für Verbindung **L-101** überein

Zum Blockieren von nicht abreagierten Hydroxyfunktionen der Wang-Harz-Ankergruppe wäscht man das Harz (500 mg, 0.53 mmol/g) mit 2 x 5 ml THF und 2 x 5 ml CH₂Cl₂ (jeweils absolut) unter Schutzgas und gibt eine Lösung von 1.5 ml Pyridin und 1.5 ml Acetanhydrid in 20 ml CH₂Cl₂ hinzu. Nach Schütteln für 30 min bei wird das Harz abfiltriert und mit 3 x 10 ml CH₂Cl₂, 3 x 10 ml DMF, 3 x 10 ml MeOH und 2 x 10 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

7.3 Versuche zu Kapitel 4.3

7.3.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1

Festphasengebundenes *N*-Fluorenylmethoxycarbonyltyrosin 112E

Gemäß AAV AP1 Variante A wird polymergebundene Verbindung **93E** (280 mg, 0.20 mmol/g, 56 μmol) mit Pd(PPh₃)₄ und Phenylsilan (104 μl, 0.84 mmol) in 2 ml CH₂Cl₂ umgesetzt.

IR (KBr, drift): 3437 (Amid-NH), 3082, 3058, 3025, 2924, 2851, 1943, 1875, 1805, 1728 (C=O), 1651, 1602, 1583, 1511, 1493, 1453, 1238, 1181.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

R_f = 0.23 (Ethylacetat/Hexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.77 min

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben für die Referenzverbindung 9-*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosin ^[191] überein und belegen eine vollständige Umsetzung.

Festphasengebundenes *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyltyrosin 112W

Die polymergebundene Verbindung **D-93W** (2 g, 0.52 mmol/g, 1.04 mmol) wird gemäß AAV P1 Variante B für 24 h mit Pd(PPh₃)₄ in 50 ml NMA/THF umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A1): R_t = 8.43 min

(A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.50 min

R_f = 0.28 (Ethylacetat/Hexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für die Referenzverbindung *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosin^[191] überein und sprechen für eine vollständige Umsetzung.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosin-allylester 113E

Gemäß AAV P3 Variante A wird polymergebundene Verbindung **112E** (800 mg, 0.25 mmol/g, 0.2 mmol) mit einer Lösung von HATU (228 mg 0.6 mmol), HOAt (27 mg, 0.2 mmol) und DIEA (102 µl, 0.6 mmol) in 5 ml NMP für 60 min voraktiviert und anschließend mit **106b** (1.16 g, 4.05 mmol) und DIEA (238 µl, 1.4 mmol) in 5 ml NMP für 72 h umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

R_f = 0.40 (Ethylacetat/Hexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A1): R_t = 17.50 min

(A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 15.62 min

C₃₈H₃₈N₂O₇ (634.73)

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für die der Referenzverbindung **115** überein.

Die Ausgangsverbindung wurde vollständig in **113E** überführt.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosin-allylester 113W

Gemäß AAV P3 Variante A wird die polymergebundene Verbindung **112W** (2.00 g, 0.50 mmol/g, 1.0 mmol) in 5 ml mit einer Lösung von HATU (1.54 g 4.05 mmol), HOAt (184 mg, 1.35 mmol) und DIEA (690 µl, 4.05 mmol) in 5 ml NMP für 60 min voraktiviert und anschließend mit **106b** (1.16 g, 4.05 mmol) und DIEA (1.05 ml) in 10 ml NMP für 24 h umgesetzt.

IR (KBr, drift): 3434 (Amid-NH), 3083, 3060, 3026, 2925, 2852, 1945, 1874, 1802, 1731 (C=O), 1650, 1602, 1583, 1511, 1494, 1453, 1423, 1365, 1239, 1181.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

R_f = 0.43 (Ethylacetat/Hexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A1): R_t = 17.66 min

(A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 15.84 min

C₃₈H₃₈N₂O₇ (634.73)

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für die Referenzverbindung **115** überein. Die Ausgangsverbindung wurde vollständig in **113W** überführt.

N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosinalylester **115*

Eine Probe des Harzes **113E** (160 mg, 0.21 mmol/g, 33 µmol) wird mit 2 ml CH₂Cl₂/TFA/EtOH 2:2:1 (v/v) versetzt und für 4 h geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Polymers, Waschen mit 3 x 3 ml CH₂Cl₂ und Einengen der vereinigten Filtrate im Vakuum liefert die Chromatographie des Rückstands an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:2 (v/v)) die Zielverbindung.

Ausbeute: 6.0 mg, 9.5 µmol, 29% hellbraunes Wachs

R_f = 0.40 (Ethylacetat/Hex 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A1): R_t = 17.72 min

$[\alpha]_D^{20} = -35.8^\circ$ (MeOH, c = 0.3)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.50-2.54 (m, 1 H, β-CH), 2.61-2.65 (m, 1 H, β-CH), 2.70 (s, 3 H, NCH₃), 2.74-2.96 (m, 2 H, 2 β-CH), 3.72 [3.74] (s, 3 H, OCH₃), 4.08-4.47 (m, 4 H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, α-CH) 4.62-4.65 (d, ³J = 6.3 Hz, 2 Allyl-OCH₂), 4.80-4.82 (m, 1 H, α-CH), 5.20-5.31 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.80-5.91 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.60-6.61 (d, 4 H, ³J = 8.3 Hz, Tyr-arom. CH), 6.80-6.82 (d, 4 H, ³J = 8.5 Hz, Tyr-arom. CH), 7.27-7.32 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.36-7.39 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.53-7.58 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.73-7.75 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 30.95 (NCH₃), 33.86 (β-CH₂), 37.74 (β-CH₂), 47.00 [47.10] (Fmoc-CH), 52.35 (α-CH), 55.20 [55.28] (OCH₃), 59.43 (α-CH), 66.11 (Fmoc-CHCH₂), 67.44 (Allyl-OCH₂), 114.17 [114.59] (2 Tyr-arom. CH), 115.39 [115.60] (2 Tyr-arom. CH), 118.94 [119.95] (Allyl-CH=CH₂), 125.16 [125.22] (2 Fmoc-arom. CH), 127.08 [127.72] (2 Fmoc-arom. CH), 128.49 (arom. C_q), 129.86 (2 Fmoc-arom. CH), 130.14 (2 Fmoc-arom. CH), 130.38 [130.54] (2 Fmoc-arom. CH), 131.47 (Allyl-CH=CH₂), 141.23

(2 Fmoc-arom. C_q), 143.24 (2 Fmoc-arom. C_q), 154.83 (arom. C_q-OH), 155.90 (C=O Urethan), 159.52 (arom. C_q-OCH₃), 167.59 (C=O), 173.02 (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₃₉N₂O₇ [M+H]⁺ 635.2757, gef. 635.2893

C₃₈H₃₈N₂O₇ (634.73)

Polymergebundene Verbindung N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-N,O-Dimethyl-L-tyrosin 114E

Gemäß AAV P1 Variante A wird polymergebundene Verbindung **113E** (189 mg, 0.21 mmol/g, 40 μmol) mit Pd(PPh₃)₄ und Phenylsilan (74 μl, 600 μmol) in 1.5 ml CH₂Cl₂ für 24 h umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3 liefert **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-N,O-Dimethyl-L-tyrosin (Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH)**

HPLC (A1): R_t = 7.02 min

(A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 9.21 min

R_f = 0.21 (Ethylacetat/Hexan 2:1, 1% HOAc (v/v))

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₅H₃₅N₂O₇ [M+H]⁺ 595.2444, gem. 595.2404

C₃₅H₃₄N₂O₇ (594.65)

Die analytischen Daten belegen die vollständige Umsetzung zur Zielverbindung.

Polymergebundene Verbindung N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-N,O-Dimethyl-L-tyrosin 114W

Gemäß AAV P1 Variante B wird polymergebundene Verbindung **113W** (6.22 g, 0.52 mmol/g 3.23 mmol) mit Pd(PPh₃)₄ und 50 ml NMA/THF 1:4 (v/v) für 24 h umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 9.10 min

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-Dimethyl-L-tyrosin überein. Die Ausgangsverbindung wurde vollständig in **114W** überführt.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester 116E

Gemäß AAV P3 Variante B wird die polymergebundene Verbindung **114E** (242 mg, 0.26 mmol/g, 63 μ mol) mit PyAOP (99 mg, 189 μ mol), **106a** (57 mg, 252 μ mol) und DIEA (129 μ l, 756 μ mol) für 48 h in 20 ml NMP umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 8.48 min (19%, **Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH**) 17.25 min (5%, **118**, Epimer 1), 17.60 min (76%, **118**, Epimer 2).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 595.2 [M+H]⁺, R_t = 10.01 min (**Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH**); 818.4 [M+Na]⁺, R_t = 20.45 min (**118**, Epimer 1); 818.4 [M+Na]⁺, R_t = 20.89 min (**118**, Epimer 2)

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für die Referenzverbindungen **114** und **118** überein. Laut HPLC-Analyse wurde ein Edukt/Produkt-Verhältnis von 19:81 erzielt, wobei 5% Epimerisierung auftrat.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester 116W

Gemäß AAV P3 Variante B wird die polymergebundene Verbindung **114W** (2.40 g, 0.45 mmol/g, 1.08 mmol) mit PyAOP (1.69 g, 3.24 mmol), **106a** (731 mg, 3.24 mmol), HOAt (147 mg, 1.08 mmol) und DIEA (2.22 ml, 13.0 mmol) für 42 h in 20 ml NMP umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 8.48 min (11%, **Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH**), 17.28 min (7%, **118**, Epimer 1), 17.62 min (82%, **118**, Epimer 2).

Die analytischen Daten stimmen mit den Werten für die Referenzverbindungen **114** und **118** überein. Laut HPLC-Analyse wurde ein Edukt/Produkt-Verhältnis von 11:89 erzielt, wobei 7% Epimerisierung auftrat.

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester 118**

Gemäß AAV P5 Variante B wird von polymergebundener Verbindung **116E** (75 mg, 0.26 mmol/g, 19.6 μ mol) für 5, 60 und 120 min mit 1, 1.5 und 2 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v)

abgespalten und entsprechend aufgearbeitet. Chromatographie des Rückstands an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:2) liefert das Zielprodukt **118**.

Ausbeute: 4.2 mg, 5.3 μmol , 27% hellbraunes Wachs

R_f = 0.69 (Ethylacetat/Hex 2:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 16.90 min

$[\alpha]_D^{20} = -43.6^\circ$ (MeOH, c = 0.25)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.22-2.75 (m überl., 4 H, 2 β -CH₂), 2.34 [2.64] (s überl., 3 H, NCH₃) 2.80 [2.86] (s, 3 H, NCH₃), 2.90-2.94 [3.05-3.11] (m, 1 H, β -CHH), 3.27-3.33 (m, 1 H, β -CHH), 3.73 [3.75] (s, 3 H, OCH₃), 4.13-4.18 [4.23-4.28] (m, 2 H, Fmoc-CH, α -CH), 4.36-4.41 (m, 2 H, Fmoc-CHCH₂), 4.54-4.62 (m, 2 H, Allyl-OCH₂), 4.97-5.06 (m, 1 H, α -CH), 5.14-5.27 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.41-5.44 [5.52-5.54] (m, 1 H, α -CH), 5.69-5.90 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.60-6.75 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.81-6.88 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.92-6.94 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.15-7.18 (m, 3 H, arom. CH), 7.25-7.36 (m, 4 H, 2 Fmoc-arom. CH, 2 arom. CH), 7.41-7.38 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.54 (d, ³J = 7.2 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.75 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 818.5 [M+Na]⁺, R_t = 25.87 min

MS (MALDI-TOF): 818 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₈H₄₉N₃O₈ [M+H]⁺ 796.3597, gem. 796.3550

C₄₈H₄₉N₃O₈ (795.92)

N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-L-phenylalanin-allylester **119*

Gemäß AAV P3 Variante B wird polymergebundene Verbindung **114E** (242 mg, 0.26 mmol/g, 63 μmol) mit PyAOP (99 mg, 189 μmol), **100c** (57 mg, 252 μmol) und DIEA (129 μl , 756 μmol) für 48 h in 0.6 ml NMP zu der polymergebundenen Verbindung *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-L-phenylalaninallylester (**117E**) umgesetzt.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 8.42 min (13%, **Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH**), 17.28 min (3%, **119** Epimer 1), 17.62 min (85%, **119** Epimer 2).

Die analytischen Daten stimmen mit der Referenzverbindungen **Fmoc-Tyr-Me(OMe)Tyr-OH** und **119** überein. Laut HPLC-Analyse wurde ein Edukt/Produkt-Verhältnis von 12:88 erzielt, wobei 3% Epimerisierung auftrat.

Gemäß AAV P5 Variante B wird von einer Probe der polymergebundenen Verbindung **117E** (67 mg, 0.26 mmol/g, 17.4 μ mol) Polymer für 5, 60 und 120 min mit 1, 1.5 ml und 2 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) abgespalten und entsprechend aufgearbeitet. Chromatographie des Rückstands an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:2 (v/v)) liefert das Zielprodukt **119**.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 3.7 mg, 4.7 μ mol, 27%

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 17.69$ min

$[\alpha]_D^{20} = -34.6^\circ$ (MeOH, $c = 0.40$)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.21$ - 2.74 (m überl., 2 H, β -CH), 2.49 (s überl., 3 H, NCH₃) 2.76 - 3.30 (m, 3 H, β -CH), 3.39 - 5.80 (m, 1 H, β -CH), 3.69 (s, 3 H, OCH₃), 4.01 - 4.19 (m, 2 H, Fmoc-CH, α -CH), 4.28 - 4.39 (m, 2 H, Fmoc-CHCH₂), 4.50 - 4.61 (m, 2 H, Allyl-OCH₂), 4.82 - 4.88 (m, 1 H, α -CH), 5.12 - 5.34 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.40 - 5.54 (m, 1 H, α -CH), 5.69 - 5.89 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.52 - 6.82 (m, 6 H, Tyr-arom. CH), 6.84 - 6.93 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.07 - 7.42 (m, 9 H, arom. CH), 7.55 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.75 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

LC-MS (ESI-MS 1, Grad. B): 804.4 [M+Na]⁺, $R_t = 25.07$ min

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₇H₄₇NaN₃O₈ [M+Na]⁺ 804.3261 , gem. 804.3233

C₄₇H₄₇N₃O₈ (781.90)

7.3.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2

Festphasengebundener *N*-(*o*-Nitro-benzolsulfonyl)-L-tyrosinalylester **126**

Polymergebundene Verbindung **L-93W** (2.80 g, 0.50 mmol/g, 1.0 mmol) wird gemäß AAV P2 für 2 x 15 min mit 2 x 10 ml Piperidin/DMF umgesetzt und anschließend das Polymer unter Argon mit 6 x 5 ml trockenem THF und 6 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen. Dann gibt man eine Lösung von *o*-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid (1.24 g, 5.6 mmol) und 2,6-Lutidin (813 μ l, 7.0 mmol) in 10 ml CH₂Cl₂ zu und schüttelt die Suspension für 11 h unter Argonatmosphäre. Anschließend wird das Polymer abfiltriert und mit 3 x 5 ml CH₂Cl₂, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1 (v/v), 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 5 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen.

IR (KBr, drift): 3338 (Amid-NH), 3082, 3058, 3025, 2923, 2851, 1744 (C=O), 1650, 1612, 1584, 1542, 1510, 1494, 1453, 1422, 1359, 1299, 1241, 1174, 1114, 1015.

Ninhydrin Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

$R_f = 0.50$ (Ethylacetat/Hexan 2:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 6.88$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 405 [M-H]⁻, $R_t = 5.15$ min

C₁₈H₁₈N₂O₇S, (406.41)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N*-(*o*-Nitro-benzolsulfonyl)-*N*-methyl-*L*-tyrosinallylester **127**

Polymergebundene Verbindung **126** (2.80 g, 0.50 mmol/g, 1.4 mmol) wird unter Argon mit 8 x 5 ml trockenem THF, 4 x 5 ml CH₂Cl₂ und 2 x 5 ml DMF gewaschen. Nach 15 minütigem Quellen in 5 ml DMF wird MTBD (603 µl, 4.2 mmol) und anschließend eine Lösung von 4-Nitrobenzolsulfonsäuremethylester (1.22 g, 5.6 mmol) 15 ml DMF zugegeben. Nach Schütteln für 1.5 h wird das Polymer abfiltriert und mit 2 x 10 ml DMF, 2 x 10 ml MeOH und 3 x 10 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

IR (KBr, drift): 3081, 3058, 3025, 2923, 2851, 1742 (C=O), 1678, 1610, 1584, 1545, 1510, 1493, 1453, 1421, 1373, 1298, 1241, 1175, 1120, 1059, 1013.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 8.67$ min

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Eine Probe von polymergebundener Verbindung **127** (70 mg, 0.50 mmol/g, 35 µmol) wird entnommen, mit einer Mischung von 2 ml TFA/CH₂Cl₂ 1:9 (v/v) für 15 min umgesetzt und das Polymer abfiltriert. Anschließend wird mit 2 ml CH₂Cl₂/TFA/H₂O 50:48:2 (v/v/v) und 2 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) für jeweils 15 min umgesetzt, abfiltriert und mit 5 ml CH₂Cl₂, 5 ml CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (v/v) und 5 ml MeOH gewaschen. Nach Einengen der vereinigten Lösungen im Vakuum liefert Reinigung über präparative Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v)) ***N*-(*o*-Nitro-benzolsulfonyl)-*N*-methyl-*L*-tyrosinallylester**.

Ausbeute: 12 mg, 28 µmol, 80% hellbraunes Wachs

$R_f = 0.55$ (Ethylacetat/Hex 2:1 (v/v))

HPLC(A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 8.60$ min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.91$ (dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 3.03 (s, 3 H, NCH_3), 3.29 (dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 4.53-4.60 (m, 3 H, Allyl- OCH_2 , $\alpha\text{-CH}$), 5.26 (m, 2 H, Allyl- $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.79 (m, 1 H, Allyl- $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.41 (s, 1 H, OH), 6.68 [6.78] (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.07 [7.16] (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.55-7.58 (m, 2 H, arom. CH), 7.64 (td, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.78 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.40$ Hz, 1 H, arom. CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta = 30.88$ (NCH_3), 34.83 ($\beta\text{-CH}_2$), 61.15 ($\alpha\text{-CH}$), 66.08 (Allyl- OCH_2), 115.47 (2 Tyr-arom. CH), 119.00 (Allyl- $\text{CH}=\text{CH}_2$), 124.16 (Allyl- $\text{CH}=\text{CH}_2$), 127.99 (arom. C_q), 130.30 (2 Tyr-arom. CH), 130.83 (arom. CH), 131.26 (arom. CH), (arom. CH), 132.78 (arom. C_q), 147.89 (arom. $\text{C}_q\text{-NO}_2$), 133.24 (arom. CH), 154.62 (arom. $\text{C}_q\text{-OH}$), 169.83 ($\text{C}=\text{O}$).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

MS (EI, 70 eV, m/z (%)): 420 (7) [M^+], 335 (14) [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_5 - \text{CO}_2$], 149 (49), [$\text{M}^+ - \text{CO}_2 - \text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 - \text{C}_3\text{H}_5 - \text{OH}$], 107 (100) [$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^+$], 77 (4), [C_6H_5^+].

HR-MS (EI, 70 eV, m/z): ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ [M^+] 420.0991, gem. 420.0999

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ (420.44)

Festphasengebundener *N*-Methyl-*L*-tyrosinalylester 128

Polymergebundene Verbindung **127** (2.70 g, 0.50 mmol/g, 1.35 mmol) wird mit 3 x 10 ml trockenem THF, 2 x 5 ml CH_2Cl_2 und 5 ml DMF gewaschen. Nach 5 minütigem Quellen in 15 ml DMF werden DBU (1.05 ml, 7 mmol) und 2-Mercaptoethanol (981 μl , 14 mmol) zugegeben und man schüttelt die Suspension für 1 h, wobei sich die Lösung gelb-grün färbt. Anschließend wird das Polymer abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/ H_2O 1:1 (v/v), 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 4 x 5 ml CH_2Cl_2 gewaschen und das Polymer im Vakuum getrocknet.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

$R_f = 0.13$ (Ethylacetat/Hex 2:1, 1% NEt_3 (v/v))

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 1.94$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 236.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, $R_t = 2.04$ min

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (235.28)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*N*-methyl-*L*-tyrosinallylester 130

Verbindung **128** (270 mg, 0.50 mmol/g, 135 μ mol) wird gemäß AAV P4 Variante A mit **129a** (294 mg, 760 μ mol), HATU (266 mg, 700 μ mol) und DIEA (260 μ l, 1.52 mmol) in 2 ml NMP für 13 h zum polymergebundenem Zielprodukt umgesetzt.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Belegung: 0.45 mmol/g, 90% (Fmoc-Bestimmung gemäß AAV AP2)

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

R_f = 0.47 (Ethylacetat/Hexan 2:1, 1% NEt₃, (v/v))

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 641.4 [M+Na]⁺, R_t = 18.85 min

C₃₈H₃₈N₂O₆ (618.72)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*N*-methyl-*L*-tyrosinallylester 131

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **130** (100 mg, 0.50 mmol/g, 50 μ mol) für 2 x 30 min mit je 2 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **129b** (108 mg, 280 μ mol) durch doppelte Kupplung mit HATU (99 mg, 260 μ mol) und DIEA (96 μ l, 560 μ mol) in 2 ml NMP für 2 x 24 h.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): schwach positiv

Belegung: 0.32 mmol/g, 64% (Fmoc-Bestimmung gemäß AAV AP2)

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

R_f = 0.55 (Ethylacetat/Hexan 3:1, 2% NEt₃ (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 25.13 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 788.4 [M+Na]⁺; R_t = 21.21 min

MS (MALDI-TOF): 787.73 [M+Na]⁺, 803.74 [M+K]⁺

C₄₇H₄₇N₃O₇ (765.89)

Die analytischen Daten sprechen für eine Umsetzung von >90%. Bei der Reaktion kam es neben der Zielverbindung zur Bildung von nicht eindeutig charakterisierbaren Nebenprodukten, die ca. 10% der Produktmenge ausmachen.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-tyrosinallylester 132a

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **L-93W** (580 mg, 0.50 mmol/g, 290 μ mol) für 2 x 15 min mit je 5 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **129a** (629 mg, 1.57 mmol) durch Kupplung mit HATU (555 mg, 1.46 mmol) in Gegenwart von DIEA (534 μ l, 3.13 mmol) in 5 ml NMP für 20 h.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 15.68$ min

LC-MS (LC-ESI): 627.5 [M+Na]⁺; $R_t = 23.09$ min,

C₃₇H₃₆N₂O₆ (604.26)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-tyrosinallylester 132b

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **L-93W** (696 mg, 0.52 mmol/g, 362 μ mol) für 2 x 30 min mit je 10 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **129a** (651 mg, 1.68 mmol) durch Kupplung mit HATU (597 mg, 1.57 mmol) und DIEA (575 μ l, 3.36 mmol) in 10 ml NMP für 5 h.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

$R_f = 0.47$ (Ethylacetat/Hex 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 14.74$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 613.3 [M+Na]⁺, $R_t = 20.62$ min

C₃₆H₃₄N₂O₆ (590.67)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Polymergebunder *N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N*^{1m}-triphenylmethyl)-*D*-histidyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-tyrosinallylester 135a

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **132a** (1.5 g, 0.40 mmol/g, 600 μ mol) für 2 x 5 min mit je 20 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend erfolgt

gemäß AAV P4 Variante B die Anknüpfung von **D-133** (1.49 g, 2.40 mmol) durch Kupplung mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (372 μ l, 2.40 mmol) und HOAt (327 mg, 2.40 mmol) in 20 ml DMF für 14 h zum Zielprodukt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung ***N* ^{α} -9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-histidyl-*N*-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester-hydrotrifluoracetat.**

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 742.3 [M+H]⁺, R_t = 1.95 min

C₄₃H₄₃N₅O₇ (741.32)*CHF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N* ^{α} -9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^{Im}-(triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester 135b

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **132b** (2.1 g, 0.40 mmol/g, 840 μ mol) für 2 x 5 min mit je 20 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante B die Anknüpfung von **L-133** (2.08 g, 3.36 mmol) durch Kupplung mit DIC (520 μ l, 3.36 mmol) und HOAt (457 mg, 3.36 mmol) in 25 ml DMF für 14 h zum Zielprodukt.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung ***N* ^{α} -9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester-hydrotrifluoracetat.**

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 19.28 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 728.3 [M+H]⁺, R_t = 1.94 min,

C₄₂H₄₁N₅O₇ (727.80)*CHF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Festphasengebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*O*-*tert*-butyl)-D-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester 136a

Gemäß AAV P2 wird Polymergebundene Verbindung **132a** (450 mg, 0.50 mmol/g, 225 μ mol) für 2 x 5 min mit je 5 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **134** (565 mg, 1.23 mmol) durch Kupplung mit HATU (437 mg, 1.15 mmol) und DIEA (534 μ l, 3.13 mmol) in 5 ml NMP für 20 h.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe gemäß AAV A3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung ***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester**

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 13.90$ min

ESI-MS (ESI-1 ohne LC-Kupplung): 790.5 [M+Na]⁺; $R_t = 19.87$ min

C₄₆H₄₅N₃O₈ (767.86)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

***N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester-hydrotri-fluoracetat 137a**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **132b** (270 mg, 0.41 mmol/g, 110 μmol) für 2 x 5 min mit 2 x 2 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **L-133** (196 mg, 316 μmol) durch Kupplung mit HATU (112 mg, 294 μmol) und DIEA (108 μl, 632 mmol) in 3 ml NMP für 5 h zur polymergebundenen Verbindung **135c**.

Von 117 mg Harz wird gemäß AAV P5 Variante A für 2 x 30 min TFA/H₂O 95:5 (v/v) abgespalten und aufgearbeitet.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 75/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

117 mg, 0.41 mmol/g, 48 μmol

Ausbeute: 20.4 mg, 25 μmol, 63% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): $R_t = 20.90$ min

Smp.: 146°C

$[\alpha]_D^{20} = -11.61^\circ$ (MeOH, c = 0.62)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.80-3.01$ (m, 6 H, 3 β-CH₂), 4.08-4.16 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.29-4.52 (m, 3 H, Fmoc-CHCH₂, α-CH), 4.49-4.60 (m, 4 H, Allyl-OCH₂, 2 α-CH), 5.15-5.26 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.79-5.86 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.65 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.97-6.99 (m, 3 H, 2 Tyr-arom. CH, 1 His-arom. CH), 7.07-7.22 (m, 5 H, arom. CH), 7.26-7.29 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.32-7.39 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.58 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.67 (d, ³J = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 8.65 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 728.3 [M+H]⁺, 750.3 [M+Na]⁺, $R_t = 7.73$ min

MS (MALDI-TOF): 728.33 [M+H]⁺, 750.3292 [M+Na]⁺, 766.31 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₂H₄₂N₅O₇ [M+H]⁺ 728.3084, gem. 728.3071

$C_{42}H_{41}N_5O_7$ (727.8044)* CHF_3O_2 (114.02)

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester 137b**

Gemäß AAV AP2 wird polymergebundene Verbindung **132a** (268 mg, 0.41 mmol/g, 110 μ mol) für 2 x 5 min mit je 2 ml einer Lösung von Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend liefert gemäß AAV P4 Variante A die Anknüpfung von **129b** (128 mg, 330 μ mol) durch Kupplung mit HATU (118 mg, 310 μ mol) und DIEA (109 μ l, 660 μ mol) in 2 ml NMP für 5 h in das polymergebundene Tripeptid **136b**.

Von 92 mg (38 μ mol) Harz wird gemäß AAV P5 Variante A für 2 x 30 min mit TFA/H₂O 95:5 (v/v) abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 75/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 13 mg, 17 μ mol, 44% weißer Feststoff

R_f = 0.53 (Ethylacetat/Hexan 2:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 16.74 min

Smp.: 168°C

$[\alpha]_D^{20} = -20.5^\circ$ (MeOH, c = 0.4)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.68-2.89 (m, 1 H, β -CHH), 2.90-2.94 (m, 1 H, β -CHH), 2.95-3.03 (m, 2 H, β -CH₂), 3.04-3.13 (m, 1 H, β -CHH), 3.11-3.18 (m, 1 H, β -CHH), 4.05-4.17 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.23-4.34 (m, 2 H, Fmoc-CHCH₂), 4.49-4.60 (m, 3 H, Allyl-OCH₂, α -CH), 4.61-4.68 (m, 1 H, α -CH), 4.80-4.92 (m, 1 H, α -CH), 5.03-5.34 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.78-5.85 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.68 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.98 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.07-7.22 (m, 9 H, arom. CH), 7.26-7.29 (m, 2 H, arom. Fmoc-CH), 7.32-7.39 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.58 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.67 (d, ³J = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 38.97 (β -CH₂), 40.04 (β -CH₂), 40.17 (β -CH₂), 49.35 (Fmoc-CHCH₂), 56.79 (α -CH), 56.92 (α -CH), 58.98 (α -CH), 68.02 (Allyl-OCH₂), 69.31 (Fmoc-CH-CH₂), 117.53 (2 Tyr-arom. CH), 120.03 (Allyl-CH=CH₂), 122.09 (2 arom. CH), 127.40 (arom. CH), 127.52 (arom. CH), 128.88 (2 arom. CH), 128.94 (2 arom. CH), 129.37 (2 arom. CH), 129.67 (2 arom. CH), 129.97 (2 arom. CH), 130.64 (2 arom. CH), 130.61 (2 arom. CH), 131.62, (2 arom. CH), 132.55 (Tyr-arom. C_q), 134.41 (arom. C_q), 139.77 (arom. C_q), 143.75 (2 Fmoc-arom. C_q), 146.39 (2 Fmoc-arom. C_q), 158.67 (C=O Urethan), 159.32 (arom. C_q-OH), 173.62 (C=O), 174.19 (C=O), 174.92 (C=O).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 738.3 [M+H]⁺, 760.5 [M+Na]⁺; R_t = 23.07 min

MS (MALDI-TOF): 738.6 [M+H]⁺, 760.7 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₅H₄₄N₃O₇ [M+H]⁺ 738.3179, gem. 738.3188

C₄₅H₄₃N₃O₇ (737.84)

7.3.3 Versuche zu Kapitel 4.3.3

Polymergebundener *N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N*tmtriphenylmethyl)-L-histidyl-N-methyl-L-tyrosylallylester 138

Verbindung **128** (1.20 g, 0.52 mmol/g, 624 μmol) wird gemäß AAV P4 Variante B mit **L-133** (2.08 g, 3.36 mmol), *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (520 μl, 3.36 mmol), HOAt (457 mg, 3.36 mmol) und Lutidin (390 μl, 3.36 mmol) in 15 ml DMF für 24 h zum polymergebundenen Zielprodukt **138** umgesetzt.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 5.13 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 595.4 [M+H]⁺, 617.3 [M+Na]⁺, R_t = 4.22 min

C₃₄H₃₄N₄O₆ (594.25)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

***N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-histidyl-N-methyl-L/D-tyrosin-N-methyl-L-phenylalaninallylester-hydrotrifluoracetat 140**

Vom polymergebundenen Dipeptid **138** (1.2 g, 0.52 mmol/g, 624 μmol) wird die Allylestergruppe durch Umsetzung mit einer Lösung von Pd(PPh₃)₄ in THF/NMA 4:1 (v/v) gemäß AAV P1 Variante B im Verlauf von 24 h abgespalten. Anknüpfung der Aminosäure **106a** (569 mg, 2.52 mmol) durch Kupplung mit PyAOP (1.32 g, 2.52 mmol), HOAt (114 mg, 840 μmol) und DIEA (1.29 ml, 7.56 mmol) gemäß AAV P3 Variante B liefert das festphasengebundene Tripeptid *N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N*tmtriphenylmethyl)-L-histidyl-N-methyl-L/D-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalaninallylester **139**.

Von der polymergebundenen Verbindung **139** (331 mg, 0.52 mmol/g, 172 μmol) wird gemäß AAV P5 Variante A für 2 x 2.5 h mit jeweils 5 ml eines Gemischs von TFA/H₂O/EMS 90:5:5 abgespalten, gefolgt von Reinigung und Gefriertrocknung.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 75/35/0.1 in 60 min, 20 ml/min, 50°C)
Man erhält zwei diastereomere Verbindungen, was für das Auftreten von Epimerisierung während der Kupplungsreaktion spricht.

Diastereomer I (140a)

Ausbeute: 38 mg, 50 µmol, 29% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.35 min

Smp.: 115-116°C

$[\alpha]_D^{20} = -100.7^\circ$ (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.34-2.54 (m überl., 2 H, β-CH₂), 2.40 [2.54] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.67-3.05 (m überl., 3 H, β-CH), 2.53 [2.74] (s überl., 3 H, NCH₃), 3.11-3.18 (m, 1 H, β-CH), 4.01-4.08 [4.22-4.30] (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.37-4.59 (m, 4 H, Allyl-OCH₂, Fmoc-CHCH₂), 4.61-4.68 (m, 1 H, α-CH), 4.80 (m, 2 H, α-CH), 5.03-5.34 (m, 3 H, NH, Allyl-CH=CH₂), 5.78-5.85 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.55 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.80 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.90 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.04-7.06 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.10-7.19 (m, 5 H, arom. CH), 7.22-7.28 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.58 (d, ³J = 7.6 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.67 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 8.56 (s, 1 H, His-CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI 1, Grad. B): 756.2 [M+H]⁺, 778.4 [M+Na]⁺, R_t = 12.09 min

Diastereomer II (140b)

Ausbeute: 31 mg, 41 µmol, 23% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 7.99 min

Smp.: 113-114°C

$[\alpha]_D^{20} = -192.3^\circ$ (MeOH, c = 0.20)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.38-3.23 (m, 12 H, 2 NCH₃, 3 β-CH₂), 4.09-4.20 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.37-4.59 (m, 2 H, Fmoc-CHCH₂), 4.49-4.70 (m, 2 H, Allyl-OCH₂), 4.72-4.85 (m, 2 H, α-CH), 5.14-5.25 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.50 (m, 1 H, α-CH), 5.79-5.89 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.62 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.80-6.83 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.00-7.01 [7.02-7.04] (m, 1 H, His-CH), 7.09-7.21 (m, 5 H, arom. CH), 7.27-7.31 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.37-7.40 (t, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.57 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.78 (d, ³J = 7.6 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH), 8.67 (s, 1 H, His-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-ESI (ESI-1, Grad. B): 756.3 [M+H]⁺, R_t = 14.02 min

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₄H₄₅N₅O₇ [M+H]⁺ 756.3397, gef. 756.3410

C₄₄H₄₅N₅O₇ (755.88)*CHF₃O₂ (114.02)

Festphasengebundener N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L/D-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanylallylester 141

Von polymergebundenem Dipeptid **132b** (120 mg, 0.52 mmol/g, 66 µmol) wird der C-Terminus durch Umsetzung mit einer Lösung von Pd(PPh₃)₄ in 3 ml DMF/NMA (12:1, v/v) innerhalb von 4.5 h gemäß AAV P1 Variante B deblockiert. Anknüpfung der Aminosäure **106a** (75 mg, 330 µmol) durch Kupplung mit PyAOP (172 mg, 330 µmol), HOAt (15 mg, 110 µmol) und DIEA (225 µl, 1.32 mmol) in 2 ml NMP für 6 h gemäß AAV P3 Variante B liefert das gewünschte Festphasengebundene Tripeptid.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

Laut LC-MS-Analyse war die Umsetzung vollständig, es wurden jedoch zwei Produktisomere gebildet (Verhältnis 2:1, laut HPLC).

Isomer 1 (Hauptisomer):

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 18.19 min

LC-MS (ESI-1, Grad A): 774.6 [M+Na]⁺; R_t = 24.47 min

Isomer 2 (Nebenisomer):

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 18.65 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 774.5 [M+Na]⁺; R_t = 24.97 min

C₄₆H₄₅N₃O₇ (751.86)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Dipeptiden vom Typ 142 (AAV P6)

Gemäß AAV P3 Variante B liefert die Umsetzung von Verbindung **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 µmol) mit dem jeweiligen Kupplungspartner (1.8 - 3 Äquivalente), PyAOP (256 mg, 490 µmol) und DIEA (528 µl, 3.10 mmol) in 5 ml NMP für 8 h das jeweilige polymergebundene Zielprodukt.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-L-phenylalaninallylester 142a

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **100c** (185 mg, 490 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 12.90$ min

LC-MS (ESI-1, Grad A): 613.3 [M+Na]⁺; $R_t = 15.09$ min

MS (MALDI-TOF): 613.7 [M+Na]⁺ 629.6 [M+K]⁺

C₃₆H₃₄N₂O₆ (590.67)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 89%.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-L-3-(1-methyl-1-silacyclohexyl)-D/L-alaninallylester 142b

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **D/L-100d** (118 mg, 290 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C):

$R_t = 19.80$ min (Epimer 1), $R_t = 20.26$ min (Epimer 2)

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 649.9 [M+Na]⁺; $R_t = 22.15$ min (Diastereomer 1), $R_t = 22.69$ min (Diastereomer 2)

MS (MALDI-TOF): 649.9 [M+Na]⁺

C₃₆H₄₂N₂O₆Si (626.81)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 89%.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-L-3-(2-naphthyl)alaninallylester 142c

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **100b** (209 mg, 490 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 15.49$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 641.2 [M+H]⁺, 663.3 [M+Na]⁺, $R_t = 11.83$ min

$C_{40}H_{36}N_2O_6$ (640.73)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 84%.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-L-3-[4-[[[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]alaninallylester 142d

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **102** (191 mg, 490 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 16.81$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 739.1 [M+H]⁺, 761.3 [M+Na]⁺, $R_t = 19.06$ min

MS (MALDI-TOF): 761.9 [M+Na]⁺

$C_{37}H_{33}F_3N_2O_9S$ (738.73)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 87%.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalaninallylester 142e

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **106a** (125 mg, 490 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 14.10$ min

LC-ESI (ESI-1, Grad A): 627.4 [M+Na]⁺, $R_t = 16.19$ min

MS (MALDI-TOF): 627.8 [M+Na]⁺

$C_{37}H_{36}N_2O_6$ (604.69)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 77%.

Polymergebundener *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-alaninallylester 142f

Durch Umsetzung von **L-112W** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) mit **106c** (63 mg, 490 μ mol) gemäß AAV P6 erhält man die polymergebundene Zielverbindung.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 9.70$ min

LC-MS (ESI-1, Grad A): 551.3 [M+Na]⁺, R_t = 11.83 min

MS (MALDI-TOF): 551.7 [M+Na]⁺

C₃₁H₃₂N₂O₆, (528.60)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von 79%.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Tripeptiden vom Typ 144 (AAV P7)

Gemäß AAV P2 wird das jeweilige polymergebundene Dipeptid **142** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μmol) für 2 x 3 min mit jeweils 5 ml einer Mischung von Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend liefert die Anknüpfung von **D-134** (223 mg, 486 μmol) durch Kupplung mit HATU (170 mg, 440 μmol), HOAt (22 mg, 162 μmol) und DIEA (277 μl, 162 μmol) in 5 ml NMP für 14 h gemäß AAV P4 Variante A das gewünschte polymergebundene Tripeptid **144**.

Polymergebundener N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-phenylalaninallylester 144a

Ausgehend von **142a** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μmol) wird durch Umsetzung gemäß AAV P7 das Zielprodukt erhalten.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitenkettenentschützte Verbindung **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-phenylalaninallylester**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 16.81 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 754.1 [M+H]⁺, R_t = 13.58 min

C₄₅H₄₃N₃O₈ (753.84)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Polymergebundener N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-D/L-3-(1-methyl-1-silacyclohexyl-alaninallylester 144b

Ausgehend von **142b** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μmol) wird durch Umsetzung gemäß AAV P7 das Zielprodukt erhalten.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe mit TFA gemäß AAV AP3 liefert die seitenkettenentschützte Verbindung **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-D/L-3-(1-methyl-1-silacyclohexyl-alaninallylester** als Gemisch der beiden Diastereomere.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 16.81 min

LC-MS (ESI-1, Grad A): 790.2 [M+H]⁺, R_t = 19.65 min

C₄₅H₅₁N₃O₈Si (789.99)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Polymergebundener N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-(2-naphthyl)alaninallylester 144c

Ausgehend von **142c** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 µmol) wird durch Umsetzung gemäß AAV P7 das Zielprodukt erhalten.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe mit TFA gemäß AAV AP3 liefert die seitenkettenentschützte Verbindung **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-(2-naphthyl)alaninallylester**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 13.96 min

MS (MALDI-TOF): 827.0 [M+Na]⁺, 842.9 [M+K]⁺

C₄₉H₄₅N₃O₈ (803.91)

Die analytischen Daten sprechen für die vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials.

Polymergebundener N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-[4-[[trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]alaninallylester 144d

Ausgehend von **142d** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 µmol) wird durch Umsetzung gemäß AAV P7 das Zielprodukt erhalten.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): schwach positiv

Abspaltung einer Probe mit TFA gemäß AAV AP3 liefert die seitenkettenentschützte Verbindung **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-[4-[[trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]alaninallylester**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.93 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 902.1 [M+H]⁺, R_t = 17.57 min

C₄₆H₄₂F₃N₃O₁₁S (901.90)

Die analytischen Daten belegen einen Umsatz von >90%.

7.4 Versuche zu Kapitel 4.4

7.4.1 Versuche zu Kapitel 4.4.1

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung *E*-Alkenylbenzaldehyden (AAV 4)

Zu einer Lösung von Brombenzaldehyd (1 mmol), **150** (1.2 Äquiv.) und CsF (2 Äquiv.) in 4 ml entgastem DME wird Pd(PPh₃)₄ (3 mol%) gegeben. Anschließend rührt man die gelbe Lösung für 14 h bei 100°C unter Argonatmosphäre. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Wasser zugegeben und die Mischung mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ und Einengen im Vakuum erhält man die Zielverbindungen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Zimtsäurederivaten ausgehend von Benzaldehyden (AAV 5)

Zu einer Lösung von Malonsäure (20 mmol) in Pyridin (3 ml) werden nach Abklingen der exothermen Reaktion der jeweilige Benzaldehyd (17 mmol) und Piperidin (1.7 mmol) zugegeben. Anschließend erhitzt man das Reaktionsgemisch auf 100°C bis zur Beendigung der Gasentwicklung. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung auf ein Gemisch von Eis und konzentrierter Salzsäure gegeben. Die sich als Feststoff abscheidenden Zimtsäuren werden abfiltriert und mit 1 N HCl gewaschen. Durch Extraktion der Reaktionsmischung mit Et₂O lässt sich weiteres Produkt isolieren. Kristallisation oder Säulenchromatographie liefert die reinen Verbindungen.

3-(4-*n*-Pentylphenyl)-*E*-acrylsäure **146b**

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (2.12 g, 20.4 mmol) mit 4-*n*-Pentylbenzaldehyd (**145a**) (3.00 g, 17 mmol) und Piperidin (169 µl, 1.7 mmol) in 3 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Cyclohexan liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 2.87 g, 13.2 mmol, 77% weißer Feststoff

R_f = 0.36 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 130-133°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): δ = 0.88-0.92 (t, ³J = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.31-1.36 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.59-1.67 (m, 2 H, 2 CH₂), 2.61-2.65 (t, ³J = 7.6 Hz, 2 H, PhCH₂), 6.40-

6.44 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H), 7.21-7.23 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.77-7.79 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.81 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): $\delta = 13.97$ (CH₃), 22.49 (CH₃CH₂), 30.86 (CH₃CH₂CH₂), 31.43 (CH₂CH₂Ph), 35.86 (CH₂Ph), 116.17 (CH=CH-C=O), 128.39 (arom. CH), 129.03 (arom. CH), 131.53 (arom. C_q), 146.31 (arom. C_q), 147.11 (CH=CH-C=O), 172.63 (C=O).

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 217.1 [M-H]⁻

C₁₄H₁₈O₂ (218.30)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[192] überein.

3-(2-Bromphenyl)-*E*-acrylsäure 146c

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (6.48 g, 62 mmol) mit 2-Brombenzaldehyd (**145b**) (10.00 g, 54 mmol) und Piperidin (535 μ l, 5.4 mmol) in 9.7 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 10.8 g, 48 mmol, 77% weißer Feststoff

R_f = 0.38 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 213°C, Lit.^[193]: 217-218°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ und 10% CD₃OD): $\delta = 6.28$ (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H), 7.13 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.2 (ddd, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.52 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2 H, 2 arom. CH), 7.95 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): $\delta = 120.88$ (CH=CH-C=O), 125.02 (arom. C_q-Br), 127.54 (arom. CH), 127.64 (arom. CH), 131.05 (arom. CH), 133.17 (arom. CH), 134.22 (arom. C_q), 143.38 (CH=CH-C=O), 168.47 (C=O).

C₉H₇BrO₂ (227.06)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[193] überein.

3-(3-Bromphenyl)-*E*-acrylsäure 146d

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (6.48 g, 62 mmol) mit 3-Brombenzaldehyd (**145c**) (10.00 g, 54 mmol) und Piperidin (535 μ l, 5.4 mmol) in 9.7 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 9.26 g, 63 mmol, 76% weißer Feststoff

$R_f = 0.37$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 177°C, Lit.^[194]: 178-179°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.34$ (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H), 7.18 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.37 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.4 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.52 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H), 7.59 (t, $^4J = 1.8$ Hz, 1 H, 2-CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): $\delta = 119.53$ (CH=CH-C=O), 122.79 (arom. C_q-Br), 126.52 (arom. CH), 130.21 (arom. CH), 130.62 (arom. CH), 132.88 (arom. CH), 136.32 (arom. C_q), 143.52 (CH=CH-C=O), 168.73 (C=O).

C₉H₇BrO₂ (227.06)

Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten^[195] überein.

3-(4-Bromphenyl)-*E*-acrylsäure 146e

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (6.48 g, 62 mmol) mit 4-Brombenzaldehyd (**145d**) (10.00 g, 54 mmol) und Piperidin (535 μ l, 5.4 mmol) in 9.7 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 11.3 g, 50 mmol, 80% weißer Feststoff

$R_f = 0.37$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 257°C, Lit.^[196]: 251-253°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): $\delta = 6.34$ (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H), 7.33 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.45 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.53 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz, 1 H, CH=CH-CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 10% CD₃OD): $\delta = 119.06$ (CH=CH-C=O), 124.51 (arom. C_q-Br), 129.55 (2 arom. CH), 132.15 (2 arom. CH), 133.45 (arom. C_q), 143.93 (CH=CH-C=O), 174.61 (C=O).

C₉H₇BrO₂ (227.06)

Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten^[195] überein.

3-(2-Benzyloxyphenyl)-*E*-acrylsäure 146f

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (1.77 g, 16.9 mmol) mit 2-Benzyloxybenzaldehyd (**145e**) (3.00 g, 14.1 mmol) und Piperidin (140 μ l, 120 mg, 1.41 mmol) in 3 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 2.95 g, 12 mmol, 82% weißer Feststoff

$R_f = 0.42$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 139°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 5.18$ (s, 2 H, Ph-CH₂-O), 6.48 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH=CH-CO), 6.97 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.15 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.23-7.51 (m, 6 H, arom. CH), 7.68 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.83 (d, $^3J = 16.2$ Hz, 1 H, CH=CH-CO), 12.23 (s, 1 H, CO₂H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 70.11$ (Ph-CH₂), 113.47 (arom. CH), 119.78 (CH=CH-CO), 121.33 (arom. CH), 123.21 (arom. C_q), 128.00 (2 arom. CH), 128.34 (arom. CH), 128.90 (3 arom. CH), 131.99 (arom. CH), 137.11 (arom. C_q), 139.00 (CH=CH-CO), 157.12 (arom. C_q-O), 168.15 (C=O).

MS (ESI ohne LC-Kopplung): 253.2 [M-H]⁻

C₁₆H₁₄O₃ (254.28)

3-(3-Benzyloxyphenyl)-*E*-acrylsäure 146g

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (1.77 g, 16.9 mmol) mit 3-Benzyloxybenzaldehyd (**145f**) (3.00 g, 14.1 mmol) und Piperidin (140 μl , 120 mg, 1.41 mmol) in 3 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 2.8 g, 11 mmol, 77% hellbrauner Feststoff

$R_f = 0.40$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 153°C, Lit.^[197]: 151-153°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 5.13$ (s, 2 H, Ph-CH₂-O), 6.52 (d, 1 H, $^3J = 16.1$ Hz, CH=CH-C=O), 7.04 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.22 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.26-7.47 (m, 7 H, arom. CH), 7.64 (d, $^3J = 15.9$ Hz, 1 H, CH=CH-CO), 12.35 (s, 1 H, CO₂H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 69.67$ (Ph-CH₂-O), 114.16 (arom. CH), 117.40 (arom. CH), 119.97 (CH=CH-C=O), 121.38 (arom. CH), 128.11 (2 arom. CH), 128.20 (2 arom. CH), 128.78 (arom. CH), 130.30 (arom. CH), 136.05 (arom. C_q), 137.30 (arom. C_q), 144.15 (CH=CH-C=O), 159.05 (arom. C_q-O), 167.88 (C=O).

C₁₆H₁₄O₃ (254.28)

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten sprechen mit den Literaturwerten ^[197] überein.

3-(4-Benzyloxyphenyl)-E-acrylsäure 146h

Gemäß AAV 5 wird Malonsäure (5.87 g, 56.4 mmol) mit 4-Benzyloxybenzaldehyd (**145g**) (10.0 g, 47 mmol) und Piperidin (465 μ l, 5.7 mmol) in 7 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Ethanol liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 40.61 mmol, 72 % hellbrauner Feststoff

R_f = 0.37 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 202°C, Lit.^[198]: 208-209°C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.14 (s, 2 H, Ph-CH₂-O), 6.37 (d, ³*J*_{trans} = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 7.04 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2 H, arom. CH), 7.27-7.46 (m, 5 H, arom. CH), 7.50 (d, ³*J*_{trans} = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 7.62 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2 H, arom. CH), 12.18 (s, 1 H, CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 69.96 (OCH₂), 115.08 (2 arom. CH), 116.09 (CH=CH-CO₂H), 127.21 (2 arom. CH), 127.31 (2 arom. CH), 127.98 (2 arom. CH), 128.49 (arom. C_q), 129.66 (arom. CH), 131.98 (arom. C_q), 144.98 (CH=CH-CO₂H), 160.43 (arom. C_q-OCH₂), 169.42 (C=O)

MS (ESI ohne LC-Kopplung): 253.1 [M-H]⁻

C₁₆H₁₄O₃ (254.28)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten ^[198] überein.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Hydrierung von Acrylsäuren AAV 6

Zu einer Lösung der Acrylsäure in entgastem Lösungsmittel wird Pd auf Aktivkohle gegeben und die Suspension unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Abfiltrieren des Katalysators über Celite, Nachwaschen mit 4 x 5 ml des jeweiligen Lösungsmittels und Entfernen des Lösungsmittels der vereinigten Filtrate im Vakuum liefert die hydrierten Produkte, die keine Reinigung mehr erfordern.

3-(4-Biphenyl)propionsäure 147a

Gemäß AAV 6 wird **146a** (1.50 g, 6.69 mmol) in 60 ml Dioxan mit Pd (150 mg, 10% auf Aktivkohle) und Wasserstoff für 7 h umgesetzt.

Ausbeute: 1.52 g, 6.70 mmol, quant. weißer Feststoff

R_f = 0.39 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 149-150°C, Lit.^[199]: 147-149°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.75 (t, ³J = 8.6 Hz, 2 H, PhCH₂CH₂-CO₂H), 3.03 (t, ³J = 8.6 Hz, 2 H, PhCH₂CH₂-CO₂H), 7.28-7.32 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, arom. CH), 7.34-7.37 (td, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1 H, arom. CH), 7.42-7.47 (t, ³J = 7.8 Hz, 2 H, arom. CH), 7.53-7.57 (m, ³J = 8.4 Hz, 2 H, arom. CH), 7.57-7.62 (m, ³J = 8.4 Hz, 2 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 30.17 (Ph-CH₂), 35.50 (CH₂CO₂H), 126.98 (2 arom. CH), 127.13 (arom. CH), 127.27 (2 arom. CH), 128.67 (2 arom. CH), 128.71 (2 arom. CH), 139.19 (arom. C_q), 139.35 (arom. C_q), 140.86 (arom. C_q), 179.02 (q, CO₂H).

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[199] überein.

3-(4-Pentylphenyl)-propionsäure 147b

Gemäß AAV 6 wird **146b** (1.00 g, 4.58 mmol) in 40 ml MeOH mit Pd (100 mg, 10% auf Aktivkohle) und Wasserstoff für 5 h umgesetzt.

Ausbeute: 1.01 g, 4.58 mmol, quant. weißer Feststoff

R_f = 0.31 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:2, 1% HOAc (v/v))

Smp.: 62-64°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (m, 3 H, CH₃), 1.39 (m, 4 H, CH₂), 1.66 (m, 2 H, CH₂), 2.63 (m, 2 H, PhCH₂), 2.72 (m, 2 H, PhCH₂), 2.97 (m, 2 H, CH₂CH₂-CO₂H), 7.16 (m, 4 H, arom. CH), 12.01 (s, 1 H, CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.01 (CH₃), 22.53 (CH₂CH₃), 30.18 (CH₂), 31.19 (CH₂), 31.53 (CH₂), 35.51 (Ph-CH₂), 35.65 (CH₂CH₂CO₂H), 128.08 (2 arom. CH), 128.55 (2 arom. CH), 137.26 (arom. C_q), 140.99 (arom. C_q), 179.09 (CO₂H).

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 219.2 [M-H]⁻

C₁₄H₁₀O₂ (220.31)

1-(1-Penten)boronsäure 150

1-Pentin (**148**) (0.9 ml, 9.1 mmol) wird unter Schutzgas mit Catecholboran **149** (1.0 ml, 9.0 mmol) versetzt. Nach Erhitzen der Mischung bei 70°C für 5 h und Abkühlen auf Raumtemperatur wird überschüssiges Alkin im Vakuum entfernt. Das ölige Produkt wird bei 0°C auf 10 ml Wasser gegeben und die Emulsion für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Abfiltrieren des ausgefallene Feststoff und Waschen mit kaltem Wasser liefert das Zielprodukt, welches keine weitere Reinigung erfordert.

Ausbeute: 871 mg, 7.64 mmol, 85% hellbraunes Wachs

$R_f = 0.48$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 6.91$ min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.93$ (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.46-1.52 (m, 2 H, CH₃CH₂), 2.17-2.22 (m, 2 H, CH₂CH=), 5.51-5.56 (d $^3J_{trans} = 17.6$ Hz, 1 H, CH=CH-B), 6.92-7.00 (m, 1 H, CH=CH-B).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 13.74$ (CH₃), 21.39 (CH₂), 37.72 (CH₂), 122.19 (CH=CH-B), 157.60 (CH=CH-B).

C₅H₁₁BO₂ (113.95)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[200] überein.

3-(3-(1-*E-n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acrylsäure 151c

Gemäß AAV 4 werden 3-Brombenzaldehyd (**145c**) (117 μ l, 1.0 mmol) mit **150** (137 mg, 1.2 mmol), CsF (365 mg, 2.4 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (46 mg, 0.04 mmol) umgesetzt und man erhält **3-(1-*E-n*-Pentenyl)benzaldehyd** als gelbes Öl, welches ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt wird.

$R_f = 0.32$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:20 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.82$ (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3 H, CH₃), 1.36 (m, 2 H, CH₃CH₂), 2.15-2.17 (m, 2 H, CH₂CH=), 6.12-6.20 (m, 1 H, CH₂CH=CHPh), 6.25 (d, $^3J_{trans} = 15.8$ Hz, 1 H, CH₂CH=CHPh) 7.22-7.24 (m, 1 H, arom. CH), 7.40-7.44 (m, 1 H, arom. CH), 7.48-7.52 (m, 1 H, arom. CH), 7.62-7.66 (m, 1 H, arom. CH), 9.83 (s, 1 H, CHO).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 12.67$ (CH₃), 21.32 (CH₃CH₂), 34.00 (CH₂=CH), 125.68 (arom. CH), 127.60 (arom. CH), 128.02 (CH=CH), 130.72 (CH=CH), 131.84 (arom. CH), 133.62 (arom. CH), 135.61 (arom. C_q), 137.79 (arom. C_q), 191.22 (CHO).

C₁₂H₁₄O (174.24)

Der Pentenylbenzaldehyd wird gemäß AAV 5 mit Malonsäure (125 mg, 1.2 mmol) und Piperidin (9.9 μ l, 0.1 mmol) in 1 ml Pyridin umgesetzt. Säulenchromatographie des Rohprodukts an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:2, 1 % HOAc (v/v)) liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 140 mg, 647 μ mol, 65% hellgelbes Wachs

$R_f = 0.40$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 10.72$ min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.01 (t, 3J = 7.2 Hz, 3 H, CH₃), 1.55 (m, 2 H, CH₃CH₂), 2.24 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂), 6.27-6.33 (m, 1 H, CH₂CH=CH-Ph), 6.40 (d, $^3J_{\text{trans}}$ = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-Ph), 6.48 (d, $^3J_{\text{trans}}$ = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 7.37-7.40 (m, 2 H, 2 arom. CH), 7.50 (s, 1 H, arom. CH), 7.34 (d, 3J = 7.6 Hz, 1 H, arom. CH), 7.80 (d, $^3J_{\text{trans}}$ = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 12.40 (s, 1 H, CO₂H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.03 (CH₃), 22.72 (CH₃CH₂), 35.38 (CH₂CH=), 117.64 (CH=CH-C=O), 126.24 (arom. CH), 126.89 (arom. CH), 128.44 (arom. CH), 129.28 (CH=CH), 129.37 (CH=CH), 132.42 (arom. CH), 134.47 (arom. C_q), 138.91 (arom. C_q), 147.39 (CH=CH-C=O), 173.08 (C=O).

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 215.1 [M-H]⁻

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₄H₁₇O₂ [M+H]⁺ 217.1229, gem. 217.1256

C₁₄H₁₆O₂ (216.28)

3-(4-(1-*E-n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acrylsäure 151d

Gemäß AAV 4 wird 4-Brombenzaldehyd (**145d**) (185 mg, 1.0 mmol) mit **150** (137 mg, 1.2 mmol), CsF (365 mg, 2.4 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (46 mg, 0.04 mmol) umgesetzt und man erhält **4-(1-*E-n*-Pentenyl)benzaldehyd** als gelbes Öl, welches ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt wird.

R_f = 0.28 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:20 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (t, 3J = 7.4 Hz, 3 H, CH₃), 1.43-1.49 (sext, 3J = 7.4 Hz, 2 H, CH₃CH₂), 2.15-2.17 (m, 2 H, CH₂CH=), 6.30-6.39 (m, 2 H, CH₂CH=CH-Ph), 7.40 (d, 3J = 8.0 Hz, 2 H, arom.-CH), 7.73 (d, 3J = 8.2 Hz, 2 H, arom. CH), 9.88 (s, 1 H, CHO).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 13.93 (CH₃), 22.46 (CH₃CH₂), 35.43 (CH₃CH₂CH₂), 126.53 (2 arom. CH), 128.77 (CH=CH), 129.32 (2 arom. CH), 130.26 (CH=CH), 135.07 (arom. C_q), 140.20 (arom. C_q), 191.75 (CHO).

C₁₂H₁₄O (174.24)

Der Pentenylbenzaldehyd wird gemäß AAV 5 mit Malonsäure (125 mg, 1.2 mmol) und Piperidin (9.9 μ l, 0.1 mmol) in 1 ml Pyridin umgesetzt. Kristallisation aus Cyclohexan liefert die Zielverbindung.

Ausbeute: 141 mg, 654 μ mol, 65% hellgelber Feststoff

R_f = 0.40 (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 11.58 min

Smp.: 175°C (Zers.)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (t, 3J = 7.2 Hz, 3 H, CH₃), 1.55 (m, 2 H, CH₂), 2.15 (m, CH₂CH₂-CH=), 6.21-6.28 (m, 1 H, CH₂CH=CH-Ph), 6.32 (d überl., $^3J_{\text{trans}}$ = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-Ph), 6.33 (d überl., $^3J_{\text{trans}}$ = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 7.29 (d, 3J = 8.4 Hz, 2 H, arom. CH), 7.40 (d, 3J = 8.4 Hz, 2 H, arom. CH), 7.60 (d, $^3J_{\text{trans}}$ = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-C=O).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.08 (CH₃), 23.43 (CH₃CH₂), 36.18 (CH₃CH₂CH₂), 118.31 (CH=CH-CO₂H), 127.35 (2 arom. CH), 129.38 (CH=CH), 130.54 (CH=CH), 133.49 (2 arom. CH), 134.09 (arom. C_q), 141.36 (arom. C_q), 146.04 (CH=CH-C=O), 170.41 (C=O).

MS (ESI-1 ohne LC-Kopplung): 215.1 [M-H]⁻

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₁₄H₁₇O₂ [M+H]⁺ 217.1229, gem. 217.1252

C₁₄H₁₆O₂ (216.28)

7.4.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur N-terminalen Anknüpfung von Acrylsäurederivaten an der Festphase (AAV P8)

Nach Waschen des Polymers (0.5 mmol/g, 0.15 mmol) mit 2 x 5 ml THF, 2 x 5 ml CH₂Cl₂ und anschließendem Quellen in 3 ml DMF für 30 min wird DIEA (10 Äquivalente) zugegeben. Dann versetzt man mit einer Lösung der Acrylsäure, PyAOP und HOAt (jeweils 3-6 Äquivalente) in 6 ml eines Gemischs von DMF/CH₂Cl₂ 1:1 (v/v), absolut. Nach Schütteln für 1 min werden 0.5 Äquivalente DMAP zugegeben und die Mischung wird für mehrere Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Harz abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1, 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 3 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anknüpfung von gesättigten Carbonsäuren an der Festphase (AAV P9)

Zu einer Lösung der Säure (3-5 Äquivalente), HATU (2.8-4.8 Äquivalente) und wahlweise HOAt (1 Äquivalent) in 10 ml NMP wird DIEA (10-15 Äquivalente) gegeben und die Mischung für einige Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man dieses voraktivierte Gemisch zu in 5 ml NMP gequollenem Polymer (0.50 mmol/g, 55 μ mol). Nach mehrstündigem Schütteln der Mischung wird das Polymer abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml

DMF/H₂O 1:1 (v/v), 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 3 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anknüpfung von Benzylchloroformiaten (AAV P10)

Zu einer Lösung von HOAt (3-6 Äquivalente), DMAP (0.1-1 Äquivalent) und DIEA (10-15 Äquivalente) in 6 ml eines Gemischs von CH₂Cl₂/DMF 1:1 (v/v), absolut, wird bei 0°C langsam Benzyloxycarbonylchlorid (10-20 Äquivalente) gegeben. Nach 10 min bei 0°C wird die Mischung zu in 3 ml trockenen CH₂Cl₂ gequollenem Polymer (0.5 mmol/g, 0.15 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur für mehrere Stunden geschüttelt. Dann wird das Polymer abfiltriert, mit 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml DMF/H₂O 1:1, 3 x 5 ml DMF, 3 x 5 ml MeOH und 3 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin 152a**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (919 mg, 0.52 mmol/g, 0.48 mmol) für 1 h mit 10 ml Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend liefert die Umsetzung mit **147c** (264 mg, 1.75 mmol), HATU (627 mg, 1.65 mmol), HOAt (75 mg, 0.55 mmol) und DIEA (941 µl, 5.5 mmol) in 15 ml NMP gemäß AAV P9 für 4.5 h das polymergebundene Zwischenprodukt ***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalaninallylester**.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 14.45 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 728.4 [M+Na]⁺, R_t = 13.41 min

MS (MALDI-TOF): 728.7 [M+Na]⁺, 744.7 [M+K]⁺

C₄₂H₄₇N₃O₇ (705.84)

Die analytischen Daten belegen die vollständige Umsetzung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF-Gemisch für 5 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **152a**.

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min): R_t = 8.63 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 664.3 [M-H]⁻, R_t = 8.18 min

MS (MALDI-TOF): 687.70 [M+Na]⁺, 703.33 [M+K]⁺

C₃₉H₄₃N₃O₇ (665.78)

Die analytischen Daten belegen die vollständige Umsetzung.

Polymergebundenes *N*-3-Phenyl-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 152b

Gemäß AAV P2 wird die polymergebundene Verbindung **116W** (300 mg, 0.50 mmol/g, 0.15 mmol) für 2 x 10 min mit jeweils 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend liefert die Umsetzung mit **146i** (89 mg, 0.60 mmol), PyAOP (313 mg, 0.60 mmol), HOAt (82 mg, 0.60 mmol), DMAP (18 mg, 0.15 mmol) und DIEA (257 μ l, 1.5 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 20 h gemäß AAV P8 das polymergebundene Zwischenprodukt ***N*-3-Phenyl-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester**:

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-3-Phenyl-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 14.46$ min

MS (MALDI-TOF): 726.7451 [M+Na]⁺

C₄₂H₄₅N₃O₇ (703.82)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ in 8 ml Morpholin/THF-Gemisch für 4 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **152b**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-3-Phenyl-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 6.75$ min

LC-MS (ESI-2): 662.1 [M-H]⁻; $R_t = 2.55$ min

MS (MALDI-TOF): 686.7 [M+Na]⁺

C₃₉H₄₁N₃O₇ (663.77)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Polymergebundenes *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 152c

Gemäß AAV P2 wird die polymergebundene Verbindung **116W** (300 mg, 0.50 mmol/g, 0.15 mmol) für 2 x 10 min mit jeweils 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend liefert die Umsetzung mit Benzylchloroformiat (85 μ l, 0.60 mmol), HOAt (82 mg, 0.60 mmol), DMAP (18 mg, 0.15 mmol) und DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 20 h gemäß AAV

P10 das polymergebundene Zwischenprodukt ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N*,*O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester**.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 13.89$ min

MS (MALDI-TOF): 730.5592 [M+Na]⁺

C₄₁H₄₅N₃O₈ (707.82)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ und 8 ml Morpholin/THF-Gemisch für 4 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **152c**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N*,*O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 7.21$ min

LC-MS (ESI 2): 666.07 [M-H]⁻, $R_t = 2.60$ min

MS (MALDI-TOF): 691.0 [M+Na]⁺

C₃₈H₄₁N₃O₈ (667.76)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

***N*-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N*,*O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 152d**

Gemäß AAV P2 wird die polymergebundene Verbindung **116W** (300 mg, 0.50 mmol/g, 0.15 mmol) für 2 x 10 min mit jeweils 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend liefert die Umsetzung mit **87** (130 mg, 0.60 mmol), PyAOP (313 mg, 0.60 mmol), HOAt (82 mg, 0.60 mmol), DMAP (18 mg, 0.15 mmol) und DIEA (257 µl, 1.5 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 20 h gemäß AAV P8 das polymergebundene Zwischenprodukt ***N*-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N*,*O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalaninallylester**.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 18.25$ min

MS (MALDI-TOF): 794.71 [M+Na]⁺

C₄₇H₅₃N₃O₇ (771.96)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ und 8 ml Morpholin/THF-Gemisch für 4 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **152d**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert **3-(2-(1-Z-Pentenyl)phenyl)-E-acryloyl-D-tyrosyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanin**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 13.29 min

LC-MS (ESI-2): 730.1 [M-H]⁻, R_t = 3.02 min

MS (MALDI-TOF): 754.9 [M+Na]⁺

C₄₄H₄₉N₃O₇ (731.89)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Polymergebundenes N-3-(4-n-Pentylphenylpropionyl)-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-[4-[[[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]alanin 153

Gemäß AAV P2 wird die polymergebundene Verbindung **144d** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 µmol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend liefert die Umsetzung mit **147b** (117 mg, 0.53 mmol), HATU (188 mg, 0.49 mmol), HOAt (22 mg, 162 µmol) und DIEA (277 µl, 1.62 mmol) in 5 ml NMP für 24 h gemäß AAV P8 das polymergebundene Zwischenprodukt **N-3-(4-n-Pentylphenylpropionyl)-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-3-[4-[[[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]-L-alaninallylester**.

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): schwach positiv

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung **N-3-(4-n-Pentylphenylpropionyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-3-[4-[[[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]-L-alaninallylester**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 19.78 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): (880.3 [M-H]⁻, 882.1 [M+H]⁺): R_t = 21.66 min

MS (MALDI-TOF): 882.9 [M+H]⁺, 904.9 [M+Na]⁺

C₄₅H₅₀F₃N₃O₁₀S (881.95)

Die analytischen Daten sprechen für eine Umsetzung von >90%.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ und 5 ml Morpholin/THF für 14 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **152**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung **N-3-(4-n-Pentylphenylpropionyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-3-[4-[[[(trifluormethyl)sulfonyl]oxy]phenyl]-L-alanin**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 25.74 min

MS (MALDI-TOF): 842.7 [M+H]⁺, 864.8 [M+Na]⁺

C₄₂H₄₆F₃N₃O₁₀S (841.89)

Die analytischen Daten sprechen für eine Umsetzung von >95%.

Polymergebundenes *N*^α-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-(*N*^{Im}-triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin 154d

Gemäß AAV 2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt. Anschließend liefert die Umsetzung mit **87** (104 mg, 0.48 mmol), PyAOP (250 mg, 0.48 mmol), DMAP (15 mg, 120 μmol), HOAt (16 mg, 120 μmol) und DIEA (205 μl, 1.2 mmol) in 7.5 ml DMF/CH₂Cl₂ gemäß AAV P8 für 24 h das polymergebundene Zwischenprodukt *N*^α-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-(*N*^{Im}-triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester:

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitengruppenentschützte Verbindung *N*^α-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester-**hydrotrifluoracetat**:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 18.76 min

MS (MALDI-TOF): 704.83 [M+H]⁺

C₄₁H₄₅N₅O₆ (703.83)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF für 14 h gemäß AAV P1 Variante C, das Zielprodukt **154d**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert die seitenkettenentschützte Verbindung *N*^α-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-**hydrotrifluoracetat**.

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 14.57 min

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 664.3 [M+H]⁺, R_t = 16.09 min

MS (MALDI-TOF): 664.7 [M+H]⁺, 686.6 [M+Na]⁺, 702.6 [M+K]⁺

C₃₈H₄₁N₅O₆ (663.77)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Polymergebundenes N^{α} -3-(3-Bromphenyl)-*E*-acryloyl-(N^{Im} -triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin 154e

Gemäß AAV P2 wird die polymergebundener Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend liefert die Umsetzung mit **146d** (109 mg, 480 μ mol), PyAOP (250 mg, 480 μ mol), HOAt (16 mg, 120 μ mol), DMAP (15 mg, 120 μ mol), DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) in 6 ml DMF/CH₂Cl₂ gemäß AAV P8 für 24 h das polymergebundene Zwischenprodukt **N^{α} -3-(3-Bromphenyl)-*E*-acryloyl-(N^{Im} -triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosinallylester-hydrotrifluoracetat:**

Ninhydrin-Test (gemäß AAV AP1): negativ

Analyse nach Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 14.99$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 714.2 [716.2] [M+H]⁺, 712.3 [714.3] [M-H]⁻; $R_t = 16.16$ min

MS (MALDI-TOF): 714.8 [716.8] [M+H]⁺, 736.8 [738.8] [M+Na]⁺

C₃₆H₃₆BrN₅O₆ (714.61)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten sprechen für eine vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung.

Anschließend liefert die Deblockierung der Allylgruppe mit Pd(PPh₃)₄ und 5 ml Morpholin/THF für 14 h gemäß AAV P1 Variante C das Zielprodukt **153e**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert **N^{α} -3-(3-Bromphenyl)-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat:**

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 11.03$ min

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 672.3 [674.2] [M-H]⁻, 674.2 [676.2] [M+H]⁺; $R_t = 12.41$ min

MS (MALDI-TOF): 674.5 [676.4] [M+H]⁺, 696.7 [698.7] [M+Na]⁺

C₃₃H₃₂BrN₅O₆ (674.54)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von >95%.

7.4.3 Versuche zu Kapitel 4.4.3

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Suzuki-Kupplung an der festen Phase (AAV P11)

Zu einer Suspension der polymergebundenen Verbindung, K₃PO₄ (2 Äquivalente) und der jeweiligen Boronsäure (10 Äquivalente) in einer entgasten Mischung von DMF/H₂O 6:1 (v/v) wird eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄ gegeben und die Mischung für 24 h bei 80°C vorsichtig

unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Polymer abfiltriert, mit DMF, DMF/H₂O 1:1 (v/v), DMF, MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

N^α-3-(3-Biphenyl)-E-acryloyl-(N^{1m}-triphenylmethyl)-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin
157e

Ein Gemisch der polymergebundenen Verbindung **154e** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol), K₃PO₄ (55 mg, 240 μmol), Phenylboronsäure **156a** (146 mg, 1.2 mmol) und einer Spatelspitze Pd(PPh₃)₄ wird in 7 ml DMF/H₂O gemäß AAV P11 umgesetzt. Auf diese Weise erhält man das polymergebundene Zielprodukt **157e**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N^α-3-(3-Biphenyl)-E-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat***:

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 12.06 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 670.4 [M-H]⁻, 672.3 [M+H]⁺, R_t = 13.17 min

MS (MALDI-TOF): 672.9 [M+H]⁺, 694.8 [M+Na]⁺

C₃₉H₃₇N₅O₆ (671.74)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten belegen die vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung. Neben dem Zielprodukt **157e** wurden weitere, nicht weiter charakterisierbare, Nebenprodukte gebildet.

Polymergebundenes *N-3-[4-(n-Pentyl)phenyl]propionyl-(O-tert-butyl)-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-4-(4-methoxyphenyl)phenylalanin* **158**

Ein Gemisch der polymergebundenen Verbindung **153** (20 mg, 0.42 mmol/g, 8 μmol), K₃PO₄ (6 mg, 16 μmol), 4-Methoxyphenylboronsäure (**156b**) (13 mg, 84 μmol) und eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄ in 1 ml DMF/H₂O wird gemäß AAV P11 umgesetzt. Auf diese Weise erhält man das polymergebundene Zielprodukt **158**.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N-3-[4-(n-Pentyl)phenyl]propionyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-4-(4-methoxyphenyl)phenylalanin***:

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 800.0 [M+H]⁺, 822.4 [M+Na]⁺, R_t = 28.80 min

MS (MALDI-TOF): 823.0 [M+Na]⁺, 838.9 [M+K]⁺

C₄₈H₅₃N₃O₈ (799.93)

Die analytischen Daten belegen die vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindung. Neben dem Zielprodukt **158** werden weitere, nicht weiter charakterisierbare, Nebenprodukte gebildet.

7.5 Versuche zu Kapitel 4.5

N-Benzyloxycarbonyl-D-serylglycinethylester **159**

Zu einer Lösung von *N*-Benzyloxycarbonyl-D-serin (2.0 g, 8.36 mmol), Glycinethylesterhydrochlorid (1.17 g, 8.36 mmol) und DIEA (1.7 ml, 10 mmol) in 60 ml CH₂Cl₂ werden bei 0°C Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (1.53 g, 10 mmol) und EDC (1.60 g, 8.36 mmol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 24 h werden 50 ml 1 N HCl-Lösung zugegeben und nach Phasentrennung die organische Phase mit 3 x 50 ml 1 N HCl, 3 x 50 ml 1 N NaHCO₃-Lsg. und 2 x 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ lieferte Abdestillieren des Lösungsmittels die Zielverbindung.

Ausbeute: 2.37 g, 6.25 mmol, 75% weisser Feststoff

Smp.: 97-98°C, Lit.^[201]: 98-101°C

$[\alpha]_D^{20} = -5.9^\circ$ (EtOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.26 (t, ³J = 7.0 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 2.16 (m, 1 H, OH), 3.66-3.70 (m, 1 H, HO-CHH), 3.99-4.06 (m, 3 H, HO-CHH, GlyCH₂), 4.18 (q, ³J = 7.0 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 4.27-4.34 (m, 1 H, α-CH), 5.11 (s, 2 H, PhCH₂O), 5.98-5.99 (m, 1 H, NH), 7.14 (m, 1 H, NH), 7.32-7.34 (m, 5 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 14.04 (OCH₂CH₃), 41.39 (Gly-CH₂), 55.70 (OCH₂CH₃), 61.74 (α-CH), 62.94 (HO-CH₂), 67.28 (PhCH₂O), 128.03 (arom. CH), 128.23 (2 arom. CH), 128.52 (2 arom. CH), 135.95 (arom. C_q), 165.11 (C=O, Urethan), 169.94 (C=O), 171.33 (q, C=O).

C₁₅H₂₀N₂O₆ (324.33)

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[201] überein.

3-(R)-3-Hydroxymethyl-piperazin-2,5-dion **86**

Eine Suspension von 60 mg Pd auf Aktivkohle (10%) und Verbindung **159** (1.00 g, 3.08 mmol) in 20 ml MeOH wird für 2 d unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der ölige Rückstand in 30 ml einer gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol gelöst und für 3 d bei 4°C gelagert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum löste man den Rückstand in 0.5 ml Methanol und versetzte mit 1 ml Et₂O, worauf das Zielprodukt auskristallisierte.

Ausbeute: 394 mg, 2.73 mmol, 89% gelblich-weißer Feststoff

Smp.: 224-226°C, Lit.^[202]: 227°C

$[\alpha]_D^{20} = -40.2^\circ$ (MeOH, c = 0.50)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD): $\delta = 3.74$ (dd, $^2J = 11.4$ Hz, $^3J = 2.8$ Hz, 1 H, OCHH-CH), 3.83 (d, $^2J = 17.7$ Hz, 1 H, Gly-CHH), 3.92 (m, 1 H, α -CH), 3.97 (dd, $^3J = 2.91$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, 1 H, OCHH-CH), 4.05 (d, $^2J = 17.7$ Hz, 1 H, Gly-CHH).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 3.46$ -3.80 (m, 5 H, HO-CH₂, α -CH, Gly-CH₂), 5.15 (s, 1 H, OH), 7.98 (bs, 2 H, NH).

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 44.46$ (CH₂), 57.30 (CHCH₂OH), 63.30 (CHCH₂OH), 166.41 (C=O), 167.26 (C=O).

C₅H₈N₂O₃ (144.13)

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[202] überein.

***N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl)-*D*-seryl-glycinethylester 160**

Zu einer Lösung von BocPheOH (491 mg, 1.85 mmol), Z-SerGlyOEt (600 mg, 1.85 mmol) und 4-DMAP (114 mg, 0.93 mmol) in 30 ml trockenem CH₂Cl₂ wird EDC (355 mg, 1.85 mmol) gegeben und die Lösung für 48 h gerührt. Nach Zugabe von 10 ml 0.5 N HCl-Lsg. und Phasentrennung wird die organische Phase noch mit 2 x 10 ml 0.5 N HCl, 3 x 10 ml 0.5 N NaHCO₃-Lsg und 3 x 10 ml gesätt. NaCl-Lsg gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird einer Chromatographie an Kieselgel unterzogen (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:2 (v/v)), welche das Zielprodukt liefert.

Ausbeute: 790 mg, 1.38 mmol, 75% weißer Feststoff

R_f = 0.33 (Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v))

Smp.: 109-110°C

$[\alpha]_D^{20} = +2.8^\circ$ (MeOH, c = 0.50)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.26$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.37 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.99 (s, 1 H, OH), 2.94-2.99 (m, 1 H, Phe- β -CH), 3.05-3.10 (m, 1 H, Phe- β -CH), 3.92-4.05 (m, 2 H, Gly-CH₂), 4.18 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 4.45-4.50 (m, 4 H, Ser- β -CH₂, 2 α -CH), 5.12 (s, 2 H, PhCH₂O), 5.93 (s, 1 H, NH), 6.79 (s, 1 H, NH), 7.14 (m, 2 H, arom. CH), 7.21-7.31 (m, 3 H, arom. CH), 7.32-7.35 (m, 5 H, arom. CH).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.32$ (OCH_2CH_3), 28.44 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 37.98 ($\text{Phe-}\beta\text{-CH}_2$), 41.64 (GlyCH_2), 54.36 ($\alpha\text{-CH}$), 54.96 ($\alpha\text{-CH}$), 61.79 ($\text{Ser-}\beta\text{-CH}_2$), 64.64 (OCH_2CH_3), 67.62 (PhCH_2O), 80.45 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.30 (arom. CH), 128.43 (2 arom. CH), 128.49 (arom. CH), (2 arom. CH), 128.85 (2 arom. CH), 129.48 (2 arom. CH), 136.15 (arom. C_q), 142.08 (arom. C_q), 155.59 ($\text{C}=\text{O}$, Urethan), 155.89 ($\text{C}=\text{O}$, Urethan), 169.26 ($\text{C}=\text{O}$), 169.57 ($\text{C}=\text{O}$), 172.18 ($\text{C}=\text{O}$).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 594.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $R_t = 27.03$ min

FAB-HR (FAB, m/z): ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 572.2608, gem. 572.2630

Elementaranalyse: ber. C 60.93, H 6.52, N 7.35

gem. C 61.3, H 6.4, N 7.3

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_9$ (571.62)

***N*^α-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-3-(*R*)-2,5-dioxo-piperazin-3-ylmethylester 162**

Zu einer Mischung von **129b** (100 mg, 0.25 mmol), Triphenylphosphin (131 mg, 0.50 mmol), Verbindung **86** (71 mg, 0.50 mmol) und Molsieb 4 Å in 6 ml trockenem DMF wird Diethylazodicarboxylat (78 μl , 0.50 mmol) getropft. Anschließend rührt man die Mischung für 36 h unter Argon. Nach Abfiltrieren des Molsiebs und Waschen mit 3 x 2 ml wird das Filtrat im Hochvakuum eingengt. Den Rückstand löst man in 10 ml H_2O , extrahiert mit 3 x 30 ml Ethylacetat und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 . Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand einer Säulenchromatographie an Kieselgel unterzogen (Laufmittel: Ethylacetat/Ethanol 9:1, 1% HOAc). Kristallisation des öligen Rückstands aus Methanol lieferte das Zielprodukt.

Ausbeute: 75 mg, 0.14 mmol, 56% weiße Kristalle

$R_f = 0.31$ (Ethylacetat/EtOH 9:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 6.39$ min

Smp.: 174-175°C

$[\alpha]_D^{20} = -66.0$ (DMSO, $c = 0.20$)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.42\text{-}2.52$ (m, 3 H, NCH_3), 2.75-2.87 (m, 1 H, $\text{Phe-}\beta\text{-CHH}$), 3.07-3.10 (m, 1 H, $\text{Phe-}\beta\text{-CHH}$), 3.72-3.82 (m, 2 H, GlyCH_2), 3.86-4.40 (m, 7 H, Fmoc-CHCH_2 , $\text{Ser-}\beta\text{-CH}_2$, 2 $\alpha\text{-CH}$), 6.75 (m, 1 H, NH), 7.09-7.49 (m, 9 H, 5 arom. CH, 4 Fmoc- arom. CH), 7.52-7.54 (m, 2 H, 2 Fmoc- arom. CH), 7.74-7.76 (m, 2 H, 2 Fmoc- arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 550.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $R_t = 7.20$ min

MS (MALDI-TOF): 550.67 [M+Na]⁺

FAB-HR (FAB, m/z): ber. für C₃₀H₃₀N₃O₆ [M+H]⁺ 528.2135, gem. 528.2111

C₃₀H₂₉N₃O₆ (527.57)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur elektrophilen Anknüpfung (AAV P12):

Variante A: Zu dem Polymer (20 mg, 0.3 mmol/g, 6 µmol) wird eine Lösung von Cs₂CO₃ (10 Äquivalente) in 0.5 ml H₂O, 0.5 ml EtOH und 3 ml DMF gegeben und für 5 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Anschließend wird mit DMF, EtOH, CH₂Cl₂ und trockenem DMF gewaschen. Nach 10 minütigem Quellen in 1 ml trockenem DMF werden variable Äquivalente des Halogenids und wahlweise Kaliumiodid (1-2 Äquivalente) zugegeben und die Mischung unter Lichtausschluß geschüttelt. Anschließend wird mit DMF (4 x 5 ml), DMF/H₂O 1:1 (4 x 5 ml), DMF (4 x 5 ml), MeOH (2 x 5 ml) und CH₂Cl₂ (6 x 5 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Variante B: Nach Waschen des Polymers (20 mg, 0.3 mmol/g, 6 µmol) mit trockenem THF (5 x 2 ml) und trockenem CH₂Cl₂ (5 x 2 ml), wird es in 1 ml DMF für 30 min gequollen. Dann werden Cs₂CO₃ (10 Äquiv.) und Halogenid (10-20 Äquiv.) zugegeben und die Mischung unter Lichtausschluß geschüttelt. Anschließend wird das Polymer analog Variante A gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Polymergebundener *N*-Benzyloxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin-ethoxycarbonylmethylester 163e

Gemäß AAV P12 Variante B wird polymergebundene Verbindung **152c** (20 mg, 0.40 mmol/g, 8 µmol) mit Bromessigsäurethylester (**165**) (17.4 µl, 160 µmol), Cs₂CO₃ (52 mg, 160 µmol) in 2 ml DMF für 15 h umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin-ethoxycarbonylmethylester:**

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 18.34 min

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 840.5 [M+Na]⁺; R_t = 22.62 min

MS (MALDI-TOF): 839.28 [M+Na]⁺

C₄₈H₅₆N₄O₈ (816.98)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von > 95% zum Zielprodukt.

Polymergebundener *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-carbamoylmethylester 163f

Gemäß AAV P12 Variante B wird die polymergebundene Verbindung **152c** (30 mg, 0.40 mmol/g, 12 μ mol) mit Bromacetamid (**166**) (34 mg, 240 μ mol) und Cs₂CO₃ (78 mg, 240 μ mol) in 1 ml DMF für 24 h umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-carbamoylmethylester**

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 723.2 [M-H]⁻, 747.4 [M+Na]⁺; R_t = 15.75 min

C₄₀H₄₄N₄O₉ (724.80)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von > 95% zum Zielprodukt.

Polymergebundener *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-pyridin-3-ylmethylester 163g

Gemäß AAV P12 Variante A wird die polymergebundene Verbindung **152c** (30 mg, 0.40 mmol/g, 12 μ mol) mit 3-Brommethylpyridin-Hydrobromid (**167**) (36 mg, 120 μ mol) und Cs₂CO₃ (39 mg, 120 μ mol) in 1 ml DMF für 24 h umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-pyridin-3-ylmethylester-hydrotrifluoracetat:**

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 759.2 [M+H]⁺, 782.4 [M+Na]⁺; 8.38 min

C₄₄H₄₆N₄O₈ (758.86)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von 90% zum Zielprodukt.

Polymergebundener *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2-methyl-thiazol-5-ylmethylester 163h

Gemäß AAV P12 Variante B wird polymergebundene Verbindung **152c** (30 mg, 0.40 mmol/g, 12 μ mol) mit Cs₂CO₃ (39 mg, 120 μ mol), **168** (36 mg, 120 μ mol) und Kaliumjodid (2 mg, 12 μ mol) in 1 ml DMF für 24 h umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2-methyl-thiazol-5-ylmethylester.**

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 723.2 [M-H]⁻, 779.1 [M+H]⁺; R_t = 13.85 min

C₄₃H₄₆N₄O₈S (778.91)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von 70% zum Zielprodukt.

Polymergebundener *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5ylmethylester 163i

Gemäß AAV P12 Variante A wird polymergebundene Verbindung **152c** (30 mg, 0.40 mmol/g, 12 μ mol) mit **169** (38 mg, 240 μ mol), Cs₂CO₃ und Kaliumjodid (2 mg, 12 μ mol) in 1 ml DMF für 24 h umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5ylmethylester**:

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 792.2 [M+H]⁺, 814.4 [M+Na]⁺, 790.2 [M-H]⁻; R_t = 7.43 min

MS (MALDI-TOF): 814.8 [M+Na]⁺

C₄₃H₄₅N₅O₁₀ (791.85)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung zum Zielprodukt von 75%.

Polymergebundener *N*-3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5ylmethylester 163j

Gemäß AAV P12 Variante A wird polymergebundene Verbindung **152d** (250 mg, 0.49 mmol/g, 130 μ mol) mit Cs₂CO₃ (456 mg, 1.3 mmol), **169** (209 mg, 1.3 mmol) und KI (46 mg, 280 μ mol) in 5 ml DMF für 2 x 24 h bei 50°C umgesetzt.

Abspaltung einer Probe gemäß AAV AP3 liefert **3-(2-(1-*Z*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5ylmethylester**:

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 854.3 [M-H]⁻, 856.1 [M+H]⁺, 878.3 [M+Na]⁺, R_t = 11.80 min

MS (MALDI-TOF): 878.93 [M+Na]⁺, 894.88 [M+K]⁺

C₄₀H₅₃N₅O₉ (855.97)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von 84% zum Zielprodukt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur nucleophilen Anknüpfung (AAV P13)

Die polymergebundene Verbindung (50 μmol) wird mit einer Mischung von 8 x 2 ml MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, 1% HOAc, 3 x 5 ml THF, 3 x 5 ml CH₂Cl₂ und 2 x 5 ml NMP gewaschen. Nach 15 minütigem Quellen in 3 ml NMP wird eine Lösung der Aminkomponente (5-6 Äquivalente), PyAOP (5-6 Äquivalente), HOAt (1 Äquivalent) und DIEA (12-19 Äquivalente) in 3 ml NMP zugegeben und für mehrere Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit 4 x 5 ml DMF, DMF/H₂O 1:1, 4 x 5 ml DMF, 2 x 5 ml MeOH und 5 x 5 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet.

***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyltyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methioninmethylester**

Gemäß AAV P13 wird polymergebundene Verbindung **152c** (30 mg, 0.40 mmol/g, 12 μmol) mit Methioninmethylester-hydrochlorid (**170**) (10 mg, 60 μmol), PyAOP (17 mg, 60 μmol), HOAt (8 mg, 60 μmol) und DIEA (40 μl , 24 μmol) in 1 ml NMP für 24 h umgesetzt.

Abspaltung von einer Harzprobe gemäß AAV AP3 liefert ***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyltyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methioninmethylester**:

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 835.3 [M+Na]⁺; R_t = 13.45 min

MS (MALDI-TOF): 835.6 [M+Na]⁺, 851.6 [M+K]⁺

C₄₄H₅₂N₄O₉S (812.98)

Die analytischen Daten belegen eine Umsetzung von 76% zum Zielprodukt.

7.6 Versuche zu Kapitel 4.6***N*-3-(2-(1-*Z*-*n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-ylmethylester 91/1**

Gemäß AAV P12 Variante A wird polymergebundene Verbindung **152d** (260 mg, 0.50 mmol/g, 0.13 mmol) mit **169** (209 mg, 1.3 mmol), Cs₂CO₃ (424 mg, 1.3 mmol) und KI (43 mg, 0.26 mmol) in 5 ml DMF für 24 h bei Raumtemperatur und dann für 24 h bei 50°C umgesetzt. Anschließend wird gemäß AAV P5 Variante B für 2 x 20 min mit 2 x 10 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 30 min mit 15 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 75/35/0.1 in 30 min, 20 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 15 mg, 18 μmol , 14% weißer Feststoff

$R_f = 0.64$ (Ethylacetat/EtOH 5:1 (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 50°C): $R_t = 50.41$ min

Smp.: > 250 (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -50.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.64$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.79$ (t, ³J = 7.5 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.34 (m, 2 H, CH₂CH₃), 1.93 (td, ³J = 7.34 Hz, ³J = 1.5 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₃), 2.14-2.23 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 6.0, 1 H, β -CHH), 2.43-2.48 (dd, ²J = 15.0 Hz, ³J = 7.5 Hz, 1 H, β -CHH), 2.56 [2.57] (s, 3 H, NCH₃), 2.67-2.70 (m, 2 H, β -CH₂), 2.87 [2.88] (s, 3 H, NCH₃), 2.96-3.04 (m, 2 H, β -CH₂), 3.70 [3.73] (s, 3 H, OCH₃), 4.61-4.65 [4.72-4.74] (m, 1 H, α -CH), 4.87-4.91 (m, 2 H, OCH₂), 4.96-5.02 [5.07-5.11] (m, 1 H, α -CH), 5.36-5.39 (m, 1 H, α -CH), 5.59-5.63 (m, 1 H, NH), 5.73-5.78 (m, 1 H, CH=CH-Ph), 6.48 (d überl., ³J_{cis} = 10.6 Hz, 1 H, CH=CH-Ph), 6.50 (d überl., ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.64-6.70 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.80-6.89 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.91-6.94 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.00-7.02 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.19 (m, 4 H, arom. CH), 7.21-7.37 (m, 5 H, arom. CH), 7.53-7.58 (m, 1 H, Olefin-Pyrimidin-CH), 7.64 (d, ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad B): 854.4 [M-H]⁻, 856.1 [M+H]⁺, 878.3 [M+Na]⁺; $R_t = 11.80$ min

MS (MALDI-TOF): 878.93 [M+Na]⁺, 894.88 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₀H₅₄N₅O₉ [M+H]⁺ 856.3922, gef. 856.3941

C₄₀H₅₃N₅O₉ (855.97)

***N*-(3-(2-(1-*Z*-*n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N*,*O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin-2-methyl-thiazol-5-ylmethylester 91/2**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Umsetzung mit **87** (97 mg, 450 μ mol), PyAOP (235 mg, 450 μ mol), DMAP (18 mg, 150 μ mol), HOAt (61 mg, 450 μ mol) und DIEA (257 μ l, 1.5 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 17 h. Dann wird für 24 h mit Pd(PPh₃)₄ gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und anschließend gemäß AAV P12 Variante A mit **168** (209 mg, 1.3 mmol), Cs₂CO₃ (977 mg, 3 mmol) und KI (25 mg, 150 μ mol) für 24 h bei 50°C umgesetzt. Dann wird gemäß AAV P5 Variante B für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 2 h mit 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 11 mg, 13 μmol , 10% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 23.17$ min

Smp.: 87-89°C

$[\alpha]_D^{20} = -72.1^\circ$ (MeOH, $c = 0.59$)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.79$ [0.80] (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.35 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2CH_3), 1.92-1.96 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.35-2.40 (m überl., 1 H, $\beta\text{-CH}$), 2.40 (s überl., 3 H, NCH_3), 2.56-2.58 (m überl., 1 H, $\beta\text{-CH}$), 2.56 [2.58] (s überl., 3 H, NCH_3), 2.64-2.67 (m überl., 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 2.66 (s überl., 1 H, $\beta\text{-CHH}$), 2.77-2.79 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$), 3.70 [3.73] (s, 3 H, OCH_3), 4.76-4.81 (m, $\alpha\text{-CH}$), 4.87-4.91 [4.99-5.10] (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 5.17 (s, 2 H, OCH_2) 5.40-5.44 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 5.75-5.83 (m, 1 H, $\text{CH}=\text{CH-Ph}$), 6.49-6.55 (m überl., 1 H, $\text{HC}=\text{CH-Ph}$), 6.53 (d überl., $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CH-CO}$) 6.63-6.75 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.82-6.89 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.99-7.00 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.18 (m, 5 H, arom. CH), 7.25-7.32 (m, 4 H, arom. CH), 7.55 [7.60] (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.66 [7.71] (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CHCO}$).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 843.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $R_t = 3.25$ min

MS (MALDI-TOF): 865.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 843.3791, gem. 843.3803

$\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ (843.04)

***N*-3-(2-(1-*Z*-*n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 92/1**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 μmol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Umsetzung mit **87** (112 mg, 0.52 mmol), PyAOP (313 mg, 600 μmol), DMAP (18 mg, 150 μmol), HOAt (82 mg, 600 μmol) und DIEA (205 μl , 1.2 mmol) für 20 h in 9 ml DMF/ CH_2Cl_2 . Dann wird für 4 h mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 47:47:6 (v/v) und für 30 und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 15 μmol , 12% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 11.96 min

Smp.: 93-94°C

$[\alpha]_D^{20} = -63.6^\circ$ (MeOH, c = 0.11)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 0.81-0.87 [0.92-1.0] (t, ³J = 7.4 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.33-1.42 (m, 2 H, CH₂CH₃), 1.94-2.0 [2.03-2.09] (m, 2 H, CH₂CH₂CH₃), 2.13-2.43 (m überl., 1 H, β-CHH), 2.32 [2.41] (s, 3 H, NCH₃), 2.43-2.70 (m überl., 1 H, β-CHH), 2.56 [2.57] (s, 3 H, NCH₃), 2.67-2.70 (m, 2 H, β-CH₂), 2.96-3.04 (m, 2 H, β-CH₂), 3.70 [3.73] (s, 3 H, OCH₃), 4.67-4.73 (m, 1 H, α-CH), 5.45-5.51 (m, 1 H, α-CH), 5.68-5.74 [5.78-5.86] (m, 1 H, α-CH), 5.92-6.08 (m, 1 H, CH₂CH=CH-Ph), 6.40 (d, ³J_{cis} = 11.3 Hz, 1 H, CH₂-CH=CH-Ph), 6.54 (d, ³J_{trans} = 15.6 Hz, 1 H, CH=CH-C=O). 6.61-6.77 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.80-6.89 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.91-6.94 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.00-7.02 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.19 (m, 7 H, arom. CH), 7.21-7.37 (m, 2 H, arom. CH), 7.72 (d, ³J_{trans} = 16.0 Hz, 1 H, CH=CH-C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 730.1 [M-H]⁻, R_t = 3.02 min

MS (MALDI-TOF): 754.9 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₄H₅₀N₃O₇ [M+H]⁺ 732.3649, gem. 732.3664

C₄₄H₄₉N₃O₇ (731.89)

***N*-3-[2-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 171/1**

Gemäß AAV P5 Variante A wird festphasengebundene Verbindung **152d** (230 mg, 0.50 mmol/g, 114 μmol) für 18 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 95:5:5 (v/v) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet und gereinigt.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 80/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)
Der Rückstand wird in 5 ml Methanol gelöst, mit Pd (50 mg, 10% auf Kohle) versetzt und für 6 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Filtration des Katalysators über Celite, Waschen mit 2 x 5 ml Methanol und Einengen des Filtrats im Vakuum liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 12 mg, 16 μmol, 14% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.72 min

Smp.: 119-122°C

$[\alpha]_D^{20} = -27.8^\circ$ (MeOH, c = 0.32)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.87-0.91 (m, 3 H, CH₃), 1.28-1.39 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.53-1.56 (m, 2 H, CH₂), 2.11-2.21 (m, 3 H, Ph-CH), 2.36-2.46 (m, 1 H, Ph-CH), 2.58-2.70 (m, 4 H, NCH₃, CH), 2.80-2.94 (m, 3 H, Ph-CH), 2.82 (s überl., 3 H, NCH₃), 3.43-3.48 (m, 2 H, Ph-CH₂), 3.68 [3.72] (s, 3 H, OCH₃), 4.61-4.72 (m, 1 H, α -CH), 5.04-5.16 [5.36-5.44] (m, 1 H, α -CH), 5.63-5.74 (m, 1 H, α -CH), 6.58-6.67 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.75-6.80 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 7.06-7.12 (m, 5 H, arom. CH), 7.22-7.27 (m, 4 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 736.2 [M+H]⁺, 758.5 [M+Na]⁺; R_t = 15.80 min

MS (MALDI-TOF): 758.7 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber für C₄₄H₅₄N₃O₇ [M+H]⁺ 736.3962, gem. 736.3937

C₄₄H₅₃N₃O₇ (735.92)

***N*-3-(3-(1-*E*-*n*-Pentenyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 92/2**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (240 mg, 0.50 mmol/g, 120 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Anknüpfung von **151c** (97 mg, 450 μ mol), PyAOP (235 mg, 450 μ mol), DMAP (18 mg, 150 μ mol), HOAt (61 mg, 450 μ mol) und DIEA (257 μ mol, 1.5 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 66 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 12 mg, 16 μ mol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 26.21 min

Smp.: 127-129°C

$[\alpha]_D^{20} = -64.1^\circ$ (MeOH, c = 0.32)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.93 [0.94] (t, ³J = 8.0 Hz, 3 H, CH₃), 1.26-1.34 (m, 2 H, CH₃CH₂), 1.43-1.50 (m, 2 H, CH₂), 2.25-2.57 (m überl., 2 H, β -CH₂), 2.31 [2.43] (s überl., NCH₃), 2.63-2.92 (m überl., 2 H, β -CH₂), 2.78 [2.87] (s überl., 3 H, NCH₃), 3.04-3.14 (m, 1 H, β -CHH), 3.22-3.34 (m, 1 H, β -CHH), 3.73 [3.74] (s, 3 H, OCH₃), 4.79-4.83 (m, 1 H, α -CH), 5.03-5.15 (m, 1 H, α -CH), 5.37-5.41 (m, 1 H, α -CH), 5.77-5.84 (m, 1 H, NH), 6.28-6.42 (m, 3 H, CH=CH, CH=CH-CO), 6.67-6.90 (m, 8 H, 8 Tyr-CH), 7.09-7.21 (m, 2 H, Ph-CH),

7.18-7.23 (m, 4 H, arom. CH), 7.27-7.35 (m, 3 H, arom. CH), 7.43 [7.56] (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CHCO).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI 2): 730.07 [M-H]⁻; R_t = 3.10 min

MS (MALDI-TOF): 754.8 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₄H₅₀N₃O₇ [M+H]⁺ 732.3649, gem. 732.3627

C₄₄H₄₉N₃O₇ (731.89)

***N*-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 92/3**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (240 mg, 0.50 mmol/g, 120 µmol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Anknüpfung von **146b** (105 mg, 480 µmol), PyAOP (313 mg, 600 µmol), DMAP (18 mg, 150 µmol), HOAt (82 mg, 600 mg) und DIEA (257 µl, 1.5 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 66 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 12 mg, 16 µmol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 40/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.33 min

Smp.: 134°C

$[\alpha]_D^{20} = -49.6^\circ$ (MeOH, c = 0.22)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.85-0.88 (m, 3 H, CH₃), 1.26-1.34 (m, 6 H, 3 CH₂), 1.55-1.61 (m, 2 H, CH₂), 1.80-2.16 (m, 2 H, β-CH₂), 2.27-2.55 (m überl., 3 H, NCH₃), 2.32 [2.43] (s überl., NCH₃) 2.63-2.92 (m überl., 1 H, β-CHH), 3.05-3.14 (m, 1 H, β-CHH), 3.22-3.33 (m, 1 H, β-CH₂), 3.73 [3.75] (s, 3 H, OCH₃), 4.79-4.82 (m, 1 H, α-CH), 5.05-5.15 (m, 1 H, α-CH), 5.38-5.41 (m, 1 H, α-CH), 5.77-5.84 (m, 1 H, NH), 6.28 [6.35] (d, $^3J = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.60-6.91 (m, 8 H, Tyr-arom. CH), 7.09-7.21 (m, 5 H, arom. CH), 7.29-7.45 (m, 4 H, arom. CH), 7.56 (d, $^3J = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 732.14 [M-H]⁻; R_t = 3.18 min

MS (MALDI-TOF): 757.1 [M+Na]⁺, 773.1 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $C_{44}H_{52}N_3O_7$ $[M+H]^+$ 734.3805, gem. 734.3831

$C_{44}H_{51}N_3O_7$ (733.90)

***N*-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin 92/4**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Anknüpfung von **147b** (99 mg, 450 μ mol), HATU (171 mg, 450 μ mol), HOAt (20 mg, 150 μ mol) und DIEA (257 μ l, 1.5 mmol) in 8 ml NMP für 66 h. Dann wird für 4 h mit $Pd(PPh_3)_4$ in 8 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 47:47:6 (v/v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, $CH_3CN/H_2O/TFA$, 40/60/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 17 mg, 23 μ mol, 18% weißer Feststoff

HPLC (A2, $CH_3CN/H_2O/TFA$, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C) $R_t = 21.34$ min

Smp.: 101°C

$[\alpha]_D^{20} = -71.7^\circ$ (MeOH, $c = 0.54$)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.85$ (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 1.28-1.35 (m, 4 H, 2 CH_2), 1.53-1.57 (m, 2 H, CH_2), 1.80-2.16 (m, 2 H, Ph- CH_2), 2.27-2.58 (m, 7 H, Ph- CH_2 , NCH_3), 2.67-2.73 (m, 2 H, Ph-CH), 2.82-2.91 (m, 2 H, Ph-CH), 2.93 [2.95] (s, 3 H, NCH_3), 3.00-3.10 [3.13-3.25] (m, 1 H, Ph-CH), 3.33-3.41 (m, 1 H, CH), 3.68 [3.71] (s, 3 H, OCH_3), 4.54-4.62 (m, 1 H, α -CH), 4.84-4.94 (m, 1 H, α -CH), 5.02-5.11 (m, 1 H, α -CH), 6.52 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.60 [6.66] (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.71-6.83 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 7.18 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.04 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.11-7.22 (m, 3 H, arom. CH), 7.24-7.29 (m, 2 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 734.16 $[M-H]^-$; $R_t = 3.15$ min

MS (MALDI-TOF): 758.7 $[M+H]^+$

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $C_{44}H_{54}N_3O_7$ $[M+H]^+$ 736.3962, gem. 736.3942.

$C_{44}H_{53}N_3O_7$ (735.92)

N-3-(2-Benzyloxyphenyl)-E-acryloyl-D-tyrosyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanin 92/5

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Umsetzung mit **146f** (114 mg, 450 μ mol), PyAOP (235 mg, 450 μ mol), DMAP (18 mg, 150 μ mol), HOAt (61 mg, 450 μ mol) und DIEA (257 μ l, 1.5 mmol) für 66 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 8 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 10 mg, 13 μ mol, 10% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 10.03 min

Smp.: 120°C

$[\alpha]_D^{20} = -88.0^\circ$ (MeOH, c = 0.10)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.23-2.70 (m überl. 4 H, 2 β -CH₂), 2.32 [2.58] (s überl. 3 H, NCH₃), 2.79-3.00 (m, 4 H, NCH₃, β -CH), 3.21-3.28 (m, 1 H, β -CH), 3.70 [3.73] (s, 3 H, OCH₃), 4.72-4.80 [4.85-4.96] (m, 1 H, α -CH), 5.08 (m, 2 H, Ph-CH₂O), 5.05-5.19 (m, 1 H, α -CH), 5.50 (m, 1 H, α -CH), 5.94-5.98 (m, 1 H, NH), 6.62-6.84 (m, 7 H, 6 Tyr-arom. CH, CH=CH-CO) 6.88 (d, ³J = 8.6 Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.92-7.02 (m, 4 H, 1 Tyr-arom. CH, 3 arom. CH), 7.08-7.18 (m, 4 H, arom. CH), 7.19-7.36 (m, 5 H, arom. CH), 7.40-7.46 (m, 1 H, arom. CH), 7.54-7.61 (d, ³J_{trans} = 15.4 Hz, 1 H, CH=CHCO).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 768.1 [M-H]⁻; R_t = 2.86 min

MS (MALDI-TOF): 792.9 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₆H₄₈N₃O₈ [M+H]⁺ 770.3441, gem. 770.3428

C₄₆H₄₇N₃O₈ (769.89)

N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanin 92/6

Gemäß AAV P1 Variante B wird polymergebundene Verbindung **116W** (230 mg, 0.50 mmol/g, 115 μ mol) für 16 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml NMA/THF 1:4 (v/v) umgesetzt. Dann

wird gemäß AAV P5 Variante A für 19 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 95:5:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 75/35/0.1 in 30 min, 20 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 9.6 mg, 12.7 µmol, 11% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 9.87 min

Smp.: 223°C

$[\alpha]_D^{20} = -18.9^\circ$ (MeOH, c = 0.26)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.18-2.70 (m überl., 4 H, 2 β-CH₂), 2.31 [2.50] (s überl., 3 H, NCH₃) 2.81 [2.89] (s, 3 H, NCH₃), 3.02-3.09 (m, 1 H, β-CHH), 3.21-3.37 (m, 1 H, β-CHH), 3.75 [3.76] (s, 3 H, OCH₃), 4.15-4.18 (m, 1 H, FmocCHCH₂), 4.25-4.55 (m, 2 H, FmocCHCH₂), 4.63-4.69 (m, 1 H, α-CH), 4.95-4.97 [5.17-5.21] (m, 1 H, α-CH), 5.48-5.50 [5.54-5.62] (m, 1 H, α-CH), 6.67 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.72-6.81 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.84-6.92 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.14 (m, 1 H, arom. CH), 7.18-7.22 (m, 2 H, arom. CH), 7.23-7.31 (m überl., 4 H, 2 arom. CH, 2 Fmoc-arom. CH), 7.39 (t, ³J = 6.8 Hz, 2 H, 2 Fmoc-arom. CH), 7.50-7.54 (m, 2 H, Fmoc-arom. CH), 7.75 (d, ³J = 7.0 Hz, 2 H, Fmoc-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 756.1 [M+H]⁺, 778.2 [M+Na]⁺, 754.1 [M-H]⁻, R_t = 13.27 min

MS (MALDI-TOF): 778.8 [M+Na]⁺, 794.8 [M+K]⁺

C₄₅H₄₅N₃O₈, (755.85)

***N*-4-Nitro-benzyloxycarbonyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanyl-L-methionin 91/7**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (250 mg, 0.50 mmol/g, 130 µmol) für 2 x 20 min mit Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Umsetzung mit *p*-Nitro-benzylchloroformiat (129 mg, 600 µmol), DMAP (18 mg, 150 µmol), HOAt (82 mg, 600 µmol) und DIEA (205 µl, 1.2 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 17 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P13 mit Methionin-*tert*-butylester-hydrochlorid (**172**) (145 mg, 600 µmol), PyAOP (313 mg, 600 µmol), HOAt (20 mg, 150 µmol) und DIEA (257 µl, 1.5 mmol) für 16 h umgesetzt. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 13 μmol, 10% gelblicher Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.99 min

Smp.: 122°C

$[\alpha]_D^{20} = -23.4^\circ$ (MeOH, c = 0.30)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.82-2.18 (m überl., 2 H, SCH₂CH₂), 2.19 [2.24] (s überl., 3 H, SCH₃), 2.31-2.72 (m, 6 H, SCH₂CH₂, NCH₃, β-CH), 2.80-3.03 (m, 6 H, NCH₃, 3 β-CH), 3.30-3.32 (m, 2 H, β-CH₂), 3.70 [3.72] (s, 3 H, OCH₃), 4.36-4.46 [4.61-4.68] (m, 1 H, α-CH), 4.74-4.83 (m, 1 H, α-CH) 4.98-5.28 (m, 2 H, PhCH₂O), 5.42-5.68 (m, 2 H, α-CH), 6.68-6.82 (m, 5 H, Tyr-arom. CH), 6.88-6.95 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.24 (m, 5 H, arom. CH), 7.33-7.46 (m, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH), 8.18 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. B) 866.2 [M+Na]⁺; R_t = 23.30 min

MS (MALDI-TOF): 867.1 [M+Na]⁺

C₄₃H₄₉N₅O₁₁S (843.95)

Fraktion 2:

***N*-4-Nitro-benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalalanin 92/7**

Ausbeute: 4 mg, 6 μmol, 5% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.66 min

Smp.: 115°C

$[\alpha]_D^{20} = -10.0^\circ$ (MeOH, c = 0.29)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.28-2.63 (m, 5 H, β-CH₂, NCH₃), 2.74-2.99 (m, 6 H, 3 β-CH, NCH₃), 3.00-3.02 (m, 1 H, β-CH), 3.66 [3.67] (s überl., 3 H, OCH₃), 3.92-3.95 (m, 1 H, α-CH), 4.50-5.55 (m, 1 H, α-CH), 5.05-5.11 (m, 2 H, PhCH₂O), 5.44-5.46 (m, 1 H, α-CH), 6.61-6.80 (m, 10 H, 8 Tyr-arom. CH, 2 arom. CH), 6.92-7.11 (m, 3 H, arom. CH), 7.32-7.39 (m, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH), 8.09-8.18 (m, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 735.00 [M+Na]⁺; R_t = 2.58 min

MS (MALDI-TOF): 735.7 [M+Na]⁺

C₃₈H₄₀N₄O₁₀ (712.75)

Fraktion 3:

***N*-4-Nitro-benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methioninsulfoxid 91/8**

Ausbeute: 5.2 mg, 6 μ mol, 5% gelblich-weißer Feststoff

LC-MS (ESI-1, Grad. B) 882.3 [M+Na]⁺; R_t = 18.27 min

C₄₃H₄₉N₅O₁₂S (859.95)

***N*-4-Nitro-benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-piperidin-4-carbonsäureamid 91/9**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (250 mg, 0.50 mmol/g, 130 μ mol) für 2 x 20 min mit Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Anknüpfung von *p*-Nitro-benzylchloroformiat (129 mg, 600 μ mol), DMAP (18 mg, 150 μ mol), HOAt (82 mg, 600 μ mol) und DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 17 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P13 mit 4-Piperidin-carbonsäureamid (77 mg, 600 μ mol), PyAOP (313 mg, 600 μ mol), HOAt (20 mg, 150 μ mol) und DIEA (257 μ l, 1.5 mmol) für 16 h umgesetzt. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 30 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 60 und 120 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 50/50/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 13 μ mol, 13% gelber Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C):

R_t = 6.34 min (Isomer 1); R_t = 6.63 min (Isomer 2)

Smp.: 105°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.71-1.78 (m, 2 H, CH₂), 2.17-2.24 (m, 2 H, CH₂), 2.36-2.76 (m, 8 H, NCH₃, 1 CH, 2 β -CH₂), 2.80-3.14 (m, 5 H, NCH₃, β -CH₂), 3.37-3.39 (m, 2 H, 2 CH), 3.62-3.69 (m, 2 H, 2 CH), 3.75 [3.76] (s, 3 H, OCH₃), 4.36-4.46 [4.61-4.68] [4.74-4.83] (m, 1 H, α -CH), 4.98-5.28 (m, 2 H, PhCH₂O), 5.42-5.68 (m, 2 H, α -CH), 6.68-6.82 (m, 5 H, Tyr-arom. CH), 6.88-6.95 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.24 (m, 5 H, arom. CH), 7.33-7.46 (m, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH), 8.18 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, NO₂-Phenyl-arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 845.10 [M+Na]⁺; R_t = 2.36 min

MS (MALDI-TOF): 845.8 [M+Na]⁺

C₄₄H₅₀N₆O₁₀ (822.9132)

***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 92/8**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 µmol) für 2 x 20 min mit 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Reaktion mit Benzylchloroformiat (85 µl, 600 µmol), DMAP (18 mg, 150 µmol), HOAt (82 mg, 600 µmol) und DIEA (205 µl, 1.2 mmol) für 20 h in 9 ml DMF/CH₂Cl₂. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 40/60/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 17 µmol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.87 min

Smp.: 112°C

$[\alpha]_D^{20} = -127.1^\circ$ (MeOH, c = 0.24)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.17-2.45 (m, 2 H, β-CH₂), 2.27 [2.42] (s überl., 3 H, NCH₃) 2.46-2.91 (m, 2 H, β-CH₂), 2.76 [2.86] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.98-3.09 (m, 1 H, β-CHH), 3.21-3.37 (m, 1 H, β-CHH), 3.72 [3.75] (s, 3 H, OCH₃), 4.40-4.42 [4.59-4.63] (m, 1 H, α-CH), 4.86-5.05 (m, 2 H, Ph-CH₂O), 5.11-5.14 (m, 1 H, α-CH), 5.41-5.44 [5.62-5.66] (m, 1 H, α-CH), (m, 8 H, Tyr-arom. CH), 7.12-7.22 (m, 4 H, arom. CH), 7.28-7.32 (m, 6 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 666.07 [M-H]⁻; R_t = 2.60 min

MS (MALDI-TOF): 691.0 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₂N₃O₈ [M+H]⁺ 668.2972, gem. 668.2987

C₃₈H₄₁N₃O₈ (667.76)

***N*-3-Phenyl-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanin 92/9**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (260 mg, 0.50 mmol/g, 130 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Anknüpfung von **146i** (77 mg, 0.52 mmol), PyAOP (313 mg, 600 μ mol), DMAP (18 mg, 150 μ mol), HOAt (82 mg, 600 μ mol) und DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) für 20 h in 9 ml DMF/CH₂Cl₂. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 8 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 30 min und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P3, CH₃CN/H₂O/TFA, 40/60/0.1 - 70/30/0.1 in 20 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 17 μ mol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 6.38 min

Smp.: 114-116°C

$[\alpha]_D^{20} = -10.0^\circ$ (MeOH, c = 0.12)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.29-2.58 (m überl., 2 H, β -CH₂), 2.29 [2.42] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.68-2.91 (m, 2 H, β -CH₂), 2.79 [2.88] (s, 3 H, NCH₃), 3.04-3.14 (m, 1 H, β -CHH), 3.22-3.34 (m, 1 H, β -CHH), 3.73 [3.75] (s, 3 H, OCH₃), 4.13-4.15 (m, 1 H, α -CH), 4.81-4.84 [5.03-5.08] (m, 1 H, α -CH), 5.12-5.16 [5.37-5.41] (m, 1 H, α -CH), 6.31 [6.39] (d, ³J = 15.6 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 6.66-6.92 (m, 8 H, Tyr-arom. CH), 7.09-7.11 (m, 5 H, arom. CH), 7.19-7.21 (m, 3 H, arom. CH), 7.29-7.35 (m, 1 H, arom. CH), 7.37-7.47 (m, 1 H, arom. CH), 7.58 (d, ³J = 15.6 Hz, 1 H, CH=CH-CO).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 662.1 [M-H]⁻, R_t = 2.55 min

MS (MALDI-TOF): 686.7 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₉H₄₂N₃O₇ [M+H]⁺ 664.3023, gem. 664.2990

C₃₉H₄₁N₃O₇ (663.77)

***N*-3-Phenylpropionyl-*D*-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-*L*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methioninmethylester 91/10**

Gemäß AAV P13 wird polymergebundene Verbindung **152a** (126 mg, 0.50 mmol/g, 63 μ mol) zweimal mit **170** (66 mg, 380 μ mol), PyAOP (197 mg, 378 μ mol), HOAt (8.6 mg, 63 μ mol) und DIEA (108 μ l, 630 μ mol) in 3 ml NMP für 2 x 8 h umgesetzt. Anschließend wird gemäß

AAV P5 Variante A für 12 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 90:5:5 (v/v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 4 mg, 5 μ mol, 8 % hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 50°C): R_t = 31.98 min

Smp.: 80°C

$[\alpha]_D^{20} = -63.6^\circ$ (MeOH, c = 0.11)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.71-2.22 (m überl., 11 H, CH₂, 2 Met-CH₂, β -CH₂) 1.23 (s überl., 3 H, SCH₃), 2.23-2.68 (m überl., 8 H, CHH, NCH₃, 2 β -CH₂), 2.84 (s überl., 3 H, NCH₃), 2.93 (m, 1 H, CHH), 3.58 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.70 (s, 3 H, OCH₃), 4.48-4.59 (m, 1 H, α -CH), 5.05-5.14 (m, 1 H, α -CH), 5.15-5.23 [5.39-5.47] (m, 1 H, α -CH), 6.05-6.13 [6.29-6.34] (m, 1 H, NH), 6.44-6.62 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.64-6.83 (m, 5 H, Tyr-arom. CH), 7.08-7.20 (m, 10 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI): 833.3 [M+Na]⁺, R_t = 12.54 min

MS (MALDI-TOF): 833.8 [M+Na]⁺, 849.8 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₅H₅₄N₃O₉S [M+H]⁺ 812.3581, gef. 812.3396

C₄₅H₅₃N₃O₉S (811.99)

***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin-methoxycarbonylmethylester 91/11**

Gemäß AAV P12 Variante B wird **152a** (113 mg, 0.48 mmol/g, 54 μ mol) zuerst mit Cs₂CO₃ (293 mg, 0.9 mmol) und anschließend mit Bromessigsäuremethylester (166 μ l, 1.8 mmol) in 1 ml DMF für 44 h umgesetzt. Dann wird gemäß AAV P5 Variante A für 12 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 90:5:5 (v/v/v), dann für 12 h mit 10 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 100/0/0.1, 30 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 11 mg, 15 μ mol, 28% weißer Feststoff

R_f = 0.31 (Ethylacetat/Hexan 2:1, 1% HOAc (v/v))

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 100/0/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 12.17 min

Smp.: 110°C

$[\alpha]_D^{20} = -119.4^\circ$ (MeOH, c = 0.32)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.00-2.11 (m, 1 H, CHH), 2.29-2.55 (m, 5 H, CHH, 2 CH₂), 2.66 (s, 3 H, NCH₃), 2.70-2.79 (dd, ²J = 15.8 Hz, ³J = 8.0 Hz, 2 H, β-CH₂), 2.85 [2.98] (s, 3 H, NCH₃), 3.01-3.10 (m, 1 H, CHH), 3.27-3.37 (m, 1 H, CHH), 3.70 [3.71] (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.77 [3.72] (s, 3 H, OCH₃), 4.44 [4.61] (d, ²J = 15.8 Hz, 1 H, OCHH-C=O), 4.67 (d, ²J = 15.8 Hz, 1 H, OCHH-C=O), 4.77-4.82 (m, 2 H, α-CH), 5.11-5.15 (m, 1 H, α-CH), 5.46-5.50 (t, ³J = 7.7 Hz, 1 H, α-CH), 6.26-6.31 (m, 1 H, NH), 6.56-6.64 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.71-6.74 (d, ³J = 8.3 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.78-6.83 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.97-6.98 (d, ³J = 6.0 Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.08-7.20 (m, 5 H, arom. CH), 7.23-7.26 (m, 4 H, arom. CH), 7.33-7.42 (m, 1 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 29.88 (NCH₃), 30.38 (NCH₃), 31.43 [31.51] (CH₂), 33.44 (CH₂), 34.59 (CH₂), 37.26 [37.42] (CH₂), 37.98 (CH₂), 49.99 [50.19] (α-CH), 52.43 [52.48] (CO₂CH₃), 53.61 (α-CH), 54.89 [55.38] (OCH₃), 59.64 [60.36] (α-CH), 61.15 [61.48] (OCH₂CO₂CH₃), 113.74, [113.80] (2 Tyr-arom. CH), 115.33, [115.38] (2 Tyr-arom. CH), 126.26 [126.30] (arom. CH), 126.84 [126.97] (arom. CH), 127.24 (arom. CH), 128.17 [128.24] (arom. CH), 128.40 [128.52] (arom. CH), 128.63 [128.73], (arom. CH), 128.82 [128.98] (2 Tyr-arom. CH), 130.18 [130.32] (2 Tyr-arom. CH), 136.63 (arom. C_q), 135.34 (arom. C_q), 140.31 (arom. C_q), 140.34 (arom. C_q), 155.03 (arom. C_q-OH), 158.46 (arom. C_q-OCH₃), 167.83 (C=O), 169.55 (C=O), 169.75 (C=O), 171.45 (C=O), 171.88 (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 736.2 [M-H]⁻, 760.5 [M+Na]⁺, R_t = 12.23 min

MS (MALDI-TOF): 738.85 [M+H]⁺, 759.17 [M+Na]⁺, 775.45 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₂H₄₈N₃O₉ [M+H]⁺ 738.3391, gef. 738.3405

C₄₂H₄₇N₃O₉ (737.84)

***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanyl-carboxymethylester 91/12**

Gemäß AAV P12 Variante B wird polymergebundene Verbindung **152a** (126 mg, 0.50 mmol/g, 63 μmol) zuerst mit Cs₂CO₃ (450 mg, 1.5 mmol) und dann mit Bromessigsäuremethylester (488 μl, 3.0 mmol) in 6 ml DMF für 44 h umgesetzt. Dann wird gemäß AAV P5 Variante A für 12 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 90:5:5 (v/v/v), dann für 12 h mit 10 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz gespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 10 mg, 25 μmol, 40% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 9.11 min

$[\alpha]_D^{20} = -93.1^\circ$ (MeOH, c = 0.39)

Smp.: 95-97°C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.93-1.98 (t, ³J = 7.8 Hz, 1 H, PhCHHCH₂), 2.21-2.43 (m überl., 4 H, PhCHHCH₂, 3 β-CH), 2.40 [2.50] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.61-2.74 (m überl., 3 H, 3 β-CH), 2.71 [2.86] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.92-3.05 (m, 1 H, PhCH₂CHH), 3.18-3.29 (m, 1 H, PhCH₂CHH), 3.64 [3.65] (s, 3 H, OCH₃), 4.41-4.67 (m, 2 H, OCH₂-C=O), 4.78-4.95 (m, 2 H, α-CH), 5.39-5.44 (t, ³J = 7.7 Hz, 1 H, α-CH), 6.52-6.63 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.68 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.74 (d, ³J = 8.3 Hz, 2 H, Tyr-CH) 6.76 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.01 (d, ³J = 7.2 Hz, 2 H, arom. CH), 7.04-7.13 (m, 3 H, arom. CH), 7.14-7.23 (m, 4 H, arom. CH), 7.25-7.32 (m, 1 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 724.0 [M+H]⁺, R_t = 7.45 min

MS (MALDI-TOF): 746.8 [M+Na]⁺, 762.8 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₁H₄₆N₃O₉ [M+H]⁺ 724.3234, gef. 724.3305

C₄₁H₄₅N₃O₉ (723.81)

***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalaninallyles- ter 91/13**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **116W** (919 mg, 0.52 mmol/g, 478 μmol) für 2 x 10 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Umsetzung mit **147c** (264 mg, 1.75 mmol), HATU (627 mg, 1.65 mmol), HOAt (75 mg, 550 μmol) und DIEA (941 μl, 5.5 mmol) in 15 ml NMP für 4.5 h.

Gemäß AAV P5 Variante A werden von einem Teil der festphasengebundenen Verbindung (168 mg, 0.52 mmol/g 87 μmol) für 12 h mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 90:5:5 (v/v/v) abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 19 mg, 27 μmol, 31% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 100/0/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.65 min

Smp.: 77-80°C

$[\alpha]_D^{20} = -122.1^\circ$ (MeOH, c = 0.33)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.29-2.62 (m überl., 5 H, 2 CH₂, CHH), 2.34 [2.59] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.56-2.83 (m überl., 3 H, CH₂, CHH), 2.79 [2.87] (s überl., 3 H, NCH₃), 3.04-3.12 (m, 1 H, β -CH), 3.27-3.35 (m, 1 H, β -CH), 3.71 [3.73] (s, 3 H, OCH₃), 4.60 (d, ³J = 5.8 Hz, 2 H, Allyl-CH₂O), 4.82-5.08 (m, 2 H, α -CH), 5.20-5.33 (m, 2 H, Allyl-CH=CH₂), 5.50 (t, ³J = 7.5 Hz, 1 H, α -CH), 5.73-5.91 (m, 1 H, Allyl-CH=CH₂), 6.13-6.22 (m, 1 H, NH), 6.58-6.64 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.72-6.75 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.79-6.83 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.93-6.95 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.10-7.19 (m, 6 H, arom. CH), 7.21-7.27 (m, 4 H, arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

MS (MALDI-TOF): 728.7 [M+Na]⁺, 744.7 [M+K]⁺

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 728.4 [M+Na]⁺, R_t = 13.41 min

FAB (3-NBA): 706.4 [M+H]⁺, 728.3 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber für C₄₂H₄₈N₃O₇ [M+H]⁺ 706.3492, gef.: 706.3398

C₄₂H₄₈N₃O₇ (705.84)

***N*-3-Phenylpropionyl-D-tyrosyl-*N,O*-dimethyl-L-tyrosyl-*N*-methyl-L-phenylalanin 92/10**

Gemäß AAV P5 Variante A wird von polymergebundener Verbindung **152a** (194 mg, 0.50 mmol/g, 97 μ mol) mit 10 ml TFA/Triisopropylsilan/H₂O 90:5:5 (v/v/v) für 12 h und anschließend mit 10 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) für 12 h vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 65/35/0.1 in 60 min, 10 ml/min)

Ausbeute: 23 mg, 35 μ mol, 36% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 100/0/0.1 in 30 min): R_t = 8.73 min

Smp.: 126°C

$[\alpha]_D^{20} = -105.1^\circ$ (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.16-2.53 (m überl., 4 H, 2 CH₂), 2.24 [2.32] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.56-2.83 (m überl., 4 H, 2 CH₂), 2.65 [2.76] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.93-3.03 (m, 1 H, β -CH), 3.12-3.29 (m, 1 H, β -CH), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 4.17-4.28 (m, 1 H, α -CH), 4.63-4.72 [4.73-4.84] (m, 1 H, α -CH), 4.97 [5.30] (t, ³J = 7.3 Hz, 1 H, α -CH), 6.48-6.82 (m, 8 H, arom. Tyr-CH), 6.91-7.26 (m, 10 H, arom. CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 29.67 [29.94] (NCH₃), 30.31 (NCH₃), 31.28 (CH₂), 31.39 (CH₂), 33.94 (CH₂), 34.92 (CH₂), 36.81 (CH₂), 37.80 (CH₂), 50.10 [50.54] (α -CH), 53.78 (α -CH), 55.23 [55.26] (OCH₃), 55.92 [60.88] (α -CH), 113.78 [113.85] (2 Tyr-arom. CH), 115.57 [15.67] (2 Tyr-arom. CH), 126.33 [126.38] (arom. CH), 126.70 [127.12] (arom.

CH), 128.18 [128.26] (2 arom. CH), 128.33 [128.54] (2 arom. CH), 128.58 [128.64] (2 arom. CH), 128.81 [128.98] (2 arom. CH), 129.00 [130.06] (2 arom. CH), 130.16 [130.40] (2 arom. CH), 130.81 (arom. C_q), 136.78 (arom C_q), 137.26 (arom C_q), 140.06 [140.20] (arom C_q), 155.41 [155.59] (arom. C_q-OH), 158.31 [158.43] (arom C_q-OCH₃), 168.99 (C=O), 169.84 (C=O), 171.71 (C=O), 172.50 (C=O).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 664.3 [M-H]⁻, R_t = 8.18 min

MS (MALDI-TOF): 687.70 [M+Na]⁺, 703.33 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₉H₄₄N₃O₇ [M+H]⁺ 666.3179, gef. 666.3164

C₃₉H₄₃N₃O₇ (665.78)

***N*^α-Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-N-methyl-L/D-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanin-hydrotrifluoracetat 92/12**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **140** (336 mg, 0.52 mmol/g, 175 μmol) für 2 x 15 min mit 2 x 6 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Reaktion mit Benzylchloroformiat (191 μl, 1.12 mmol), DMAP (14 mg, 112 μmol), HOAt (152 mg, 1.12 mmol) und DIEA (383 μl, 2.24 mmol) in 9 ml DMF/CH₂Cl₂ für 8 h. Dann wird für 24 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante A mit einem Gemisch von TFA/H₂O/TES 90:5:5 (v/v/v) für 24 h vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Man erhält ein nicht weiter auftrennbares Gemisch von Isomeren (7:3, laut HPLC).

Ausbeute: 21 mg, 28 μm, 16% brauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C):

R_t = 11.33 min (Isomer 1), R_t = 11.83 min (Isomer 2)

Smp.: 109°C

$[\alpha]_D^{20} = -65.3^\circ$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.34-3.22 (m, 12 H, 2 NCH₃, 6 β-CH), 4.58-4.78 (m, 2 H, α-CH), 5.08-5.14 (m, 1 H, α-CH), 5.41-5.49 (m, 2 H, PhCH₂O), 6.56-6.71 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.91 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.98-7.03 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.08-7.35 (m, 10 H, arom. CH), 8.63-8.67 (m, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad A): 628.2 [M+H]⁺, 650.2 [M+Na]⁺, R_t = 2.43 (Isomer 1), R_t = 2.48 (Isomer 2)

MS (MALDI-TOF): 628.62 [M+H]⁺, 650.61 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₄H₃₈N₅O₇ [M+H]⁺ 628.2771, gem. 628.2761.

C₃₄H₃₇N₅O₇ (627.69)*C₂HF₃O₂ (114.02)

N^α-3-Phenylpropionyl-L-histidyl-N-methyl-L/D-tyrosyl-N-methyl-L-phenylalanin-hydrotrifluoracetat 92/14

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **140** (346 mg, 0.52 mmol/g, 180 μmol) für 2 x 15 min mit 2 x 6 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Reaktion mit **147c** (135 mg, 896 μmol), HATU (319 mg, 840 μmol), HOAt (38 mg, 280 μmol) und DIEA (479 μl) in 9 ml NMP für 8 h. Dann wird für 24 h mit Pd(PPh₃)₄ in 10 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante A mit einem Gemisch von TFA/H₂O/TES 90:5:5 (v/v/v) für 24 h vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Man erhält ein nicht weiter auftrennbares Gemisch von Isomeren (7:3, laut HPLC)

Ausbeute: 66 mg, 90 μmol, 50% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 50 min, 50°C)

R_t = 17.88 min (Isomer 1), R_t = 19.14 min (Isomer 2)

Smp.: 122°C

$[\alpha]_D^{20} = -71.8^\circ$ (MeOH, c = 0.32)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.29-3.23 (m, 16 H, 2 NCH₃, 6 β-CH, 2 CH₂), 4.58-4.64 (m, 1 H, α-CH), 5.08-5.14 (m, 1 H, α-CH), 5.28-5.48 (m, 1 H, α-CH), 6.56-6.75 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.85-6.93 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.01-7.04 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.13-7.38 (m, 10 H, arom. CH), 8.61 [8.64] (m, 1 H, His-arom CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad A): 626.2 [M+H]⁺, 648.3 [M+Na]⁺; R_t = 2.50 min

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₅H₄₁N₅O₆ [M+H]⁺ 626.2979, gem. 626.2958

C₃₅H₄₀N₅O₆ (625.71)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Tripeptiden des Typs *N*-3-[(4-*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-Tyr-Tyr-X-OH (AAV P14)

Gemäß AAV P2 wird das entsprechende polymergebundene Tripeptid **144** (400 mg, 0.41 mmol/g, 162 μ mol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Reaktion mit **147b** (117 mg, 530 μ mol), HATU (188 mg, 480 μ mol), HOAt (22 mg, 162 μ mol) und DIEA (277 μ l, 1.62 mmol) in 5 ml NMP für 12 h. Dann wird für 12 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 15 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten. HPLC-Reinigung und Gefriertrocknung liefert die Zielverbindungen.

***N*-3-[(4-*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-phenylalanin 92/16**

Ausgehend von Tripeptid **144a** erhält man nach Umsetzung gemäß AAV P14 die Zielverbindung.

Ausbeute: 16 mg, 23 μ mol, 14% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 8.25 min

Smp.: 214°C

$[\alpha]_D^{20} = -1.1^\circ$ (MeOH, c = 0.47)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.74 (t, ³J = 6.8 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.16-1.18 (m, 4 H, 2 CH₂CH₂CH₃), 1.42-1.47 (m, 2 H, CH₂), 2.26-2.32 (m, 2 H, CH₂), 2.39-2.43 (m, 2 H, CH₂), 2.51-2.61 (m, 2 H, CH₂), 2.65-2.72 (m, 4 H, 4 β -CH), 2.86-2.91 (m, 1 H, β -CH), 3.03-3.07 (m, 1 H, β -CH), 4.26-4.33 (m, 2 H, α -CH), 4.51-4.54 (m, 1 H, α -CH), 6.51-6.55 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.61 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.70 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.92-7.15 (m, 9 H, arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 694.2 [M+H]⁺, 716.4 [M+Na]⁺; R_t = 11.78 min

MS (MALDI-TOF): 694.9 [M+H]⁺, 716.8 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₁H₄₈N₃O₇ [M+H]⁺ 694.3492, gem. 694.3522

C₄₁H₄₇N₃O₇ (693.83)

***N*-3-[(4-*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-3-(2-naphthyl)alanin 92/17**

Ausgehend von Tripeptid **144d** erhält man nach Umsetzung gemäß AAV P14 die Zielverbindung.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 26.3 mg, 35 μmol, 22% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 9.74 min

Smp.: 102°C

$[\alpha]_D^{20} = +2.0^\circ$ (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃MeOD): δ = 0.78 (t, ³J = 6.9 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.20-1.22 (m, 4 H, CH₂CH₂CH₃), 1.46-1.49 (m, 2 H, CH₂), 2.24-2.29 (m, 2 H, CH₂), 2.45 (t, ³J = 7.8 Hz, 2 H, CH₂), 2.48-2.62 (m, 2 H, CH₂), 2.63-2.75 (m, 4 H, 4 β-CH), 3.06-3.11 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1 H, β-CH), 3.23-3.28 (m, 1 H, β-CH), 4.29 (t, ³J = 7.0 Hz, 1 H, α-CH), 4.35 (dd, ³J = 5.9 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1 H, α-CH), 4.66 (dd, ³J = 5.5 Hz, ³J = 7.6 Hz, 1 H, α-CH), 6.52-6.57 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.64 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.68 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.94 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, arom. CH), 6.98 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, arom. CH), 7.18 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, Naphtyl-arom. 3-CH), 7.30-7.34 (m, 2 H, Naphtyl-arom. 6-CH, 7-CH), 7.52 (s, 1 H, Naphtyl-arom. 1-CH), 7.61-7.68 (m, 3 H, Naphtyl-arom. 4-CH, 5-CH, 8-CH).

LC-MS (ESI 1, Grad. A): 744.2 [M+H]⁺, 766.4 [M+Na]⁺; R_t = 14.45 min

MS (MALDI-TOF): 766.5 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₅H₅₀N₃O₇ [M+H]⁺ 744.3649, gem. 744.3660

ber. für C₄₅H₄₉N₃NaO₇ [M+Na]⁺ 766.3468, gem. 766.3498

C₄₅H₄₉N₃O₇ (743.89)

***N*-3-[(4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-D/L-3-(1-methyl-1-silacyclohexyl)alanin 92/18**

Ausgehend von Tripeptid **144b** erhält man nach Umsetzung gemäß AAV P14 die Zielverbindung.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 25.1 mg, 34 μmol, 21% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 13.73 min

Smp.: 118°C

$[\alpha]_D^{20} = -5.7^\circ$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.00 (s, 3 H, SiCH₃), 0.49-0.52 (m, 4 H, 2 SiCH₂), 0.81 (t, ³J = 7.0 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 0.90-1.02 (m, 1 H, Si-β-CH), 1.04-1.13 (m, 1 H, Si-β-CH), 1.14-

1.41 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.42-1.53 (m, 4 H, 2 SiCH₂CH₂), 1.54-1.63 (m, 2 H, CH₂), 2.32-2.49 (m, 4 H, 2 Ph-CH₂), 2.53-2.68 (m, 6 H, Ph-CH₂CH₂-C=O, 4 β-CH), 4.26-4.41 (m, 2 H, α-CH), 4.50-4.53 (m, 1 H, α-CH), 6.58-6.63 (m, 4 H, Tyr-arom. CH), 6.69-6.72 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.75 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.99 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, arom. CH), 7.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad A): 730.2 [M+H]⁺, 752.4 [M+Na]⁺: R_t = 17.58 min

MS (MALDI-TOF): 752.9 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₁H₅₆N₃O₇Si [M+H]⁺ 730.3809, gem. 730.3906

C₄₁H₅₅N₃O₇Si (729.98)

***N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-tyrosyl-*N*-methyl-*L*-phenylalanyl-*L*-tyrosin 92/21**

Durch sequenzielle *N*-terminale Deblockierung ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF für 2 x 5 min gemäß AAV P2 und Aminosäurekupplung von **129a** (169 mg, 420 μmol) für 2.5 h und anschließend von **D-134** (193 mg, 420 μmol) für 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μmol) in Gegenwart von DIEA (134 μl, 780 μmol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wird das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgte *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Umsetzung mit Benzylchloroformiat (73 μl, 520 μmol), gemäß AAV P10 für 10 h, Freisetzung des *C*-Terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 11 mg, 17 μmol, 14% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 15.74 min

Smp.: 116-117°C

$[\alpha]_D^{20} = +23.6^\circ$ (MeOH, c = 0.11)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.28-2.40 (m, 1 H, β-CH), 2.47 (s, 3 H, NCH₃), 2.60-2.69 (m, 1 H, β-CH), 2.75-2.87 (m, 2 H, β-CH₂), 3.05-3.16 (m, 2 H, β-CH₂), 4.46-4.50 (m, 1 H, α-CH), 4.56-4.60 (m, 1 H, α-CH), 4.95 (d, ²J = 12.5 Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 5.03 (d, ²J = 12.5 Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 5.39-5.42 (t, ³J = 5.5 Hz, 1 H, α-CH), 6.56 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.62 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.75 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.93 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.11-7.13 (m, 3 H, arom. CH), 7.17-7.25 (m, 7 H, arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 638.04 [M-H]⁻, R_t = 2.22 min

MS (MALDI-TOF): 662.6 [M+Na]⁺, 678.6 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₆H₃₇N₃NaO₈ [M+Na]⁺ 662.2478, gem. 662.2538

C₃₆H₃₇N₃O₈ (639.69)

***N*-Benzyloxycarbonyl-D-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin 92/22**

Durch sequenzielle schrittweise *N*-terminale Deblockierung ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) mit 2 x 5 ml Piperidin für 2 x 5 min gemäß AAV P2 und Aminosäurekupplung von **129b** (163 mg, 420 μmol) für 2.5 h und **D-134** (193 mg, 420 μmol) für 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μmol) in Gegenwart von DIEA (134 μl, 780 μmol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wurde das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgte *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Anknüpfung von Benzylchloroformiat (73 μl, 520 μmol) gemäß AAV P10 für 10 h, Freisetzung des C-terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h und gemäß AAV P5 Variante B wird für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) abgespalten und anschließend gemäß AAV P5 Variante B aufgearbeitet und das Produkt gereinigt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 14 mg, 22 μmol, 18% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 14.54 min

Smp.: 165°C

$[\alpha]_D^{20} = +1.0^\circ$ (MeOH, c = 0.35)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.52 (dd, ²J = 13.5 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1 H, β-CHH), 2.72 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 8.8 Hz, 2 H, β-CH₂), 2.86 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1 H, β-CHH), 2.95-3.06 (m, 2 H, β-CH₂), 4.15-4.18 (m, 1 H, α-CH), 4.50-4.56 (m, 2 H, α-CH), 4.90 (d, ²J = 12.5 Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 5.01 (d, ²J = 12.5 Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 6.57 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.62 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.81 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.02 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.10-7.16 (m, 4 H, arom. CH), 7.19-7.25 (m, 5 H, arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 624.48 [M-H]⁻; R_t = 3.88 min

MS (MALDI-TOF): 648.5 [M+Na]⁺, 664.5 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₅H₃₆N₃O₈ [M+H]⁺ 626.2502, gem. 626.2523

C₃₅H₃₅N₃O₈ (625.67)

***N*-Benzyloxycarbonyl-D-tyrosyl-L-tyrosyl-L-tyrosin 92/23**

Durch sequenzielle *N*-terminale Deblockierung ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) mit Piperidin/DMF für jeweils 2 x 5 min gemäß AAV P2 und Aminosäurekupplung von **L-134** (193 mg, 420 μ mol) für 2.5 h und **D-134** (193 mg, 420 μ mol) für 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μ mol) in Gegenwart von DIEA (134 μ l, 780 μ mol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wurde das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgt *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Umsetzung mit Benzylchloroformiat (73 μ l, 520 μ mol), DMAP (16 mg, 130 μ mol), HOAt (71 mg, 520 μ mol) und DIEA (178 μ l, 1.04 mmol) in 7.5 ml DMF/CH₂Cl₂ gemäß AAV P10 für 10 h und anschließend Freisetzung des *C*-Terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 16 mg, 25 μ mol, 21% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 11.33$ min

Smp.: 142-144°C

$[\alpha]_D^{20} = + 1.1^\circ$ (MeOH, $c = 0.54$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.53$ (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, β -CH), 2.65 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, β -CH), 2.77 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 2 H, β -CH), 2.87 (m, 2 H, β -CH₂), 3.03 (dd, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, β -CH) 4.17 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 1 H, α -CH), 4.47-4.53 (m, 2 H, α -CH), 4.89 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, PhCHHO), 5.01 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 6.58-6.65 (m, 6 H, Tyr-arom. CH), 6.82 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.87 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.96 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.20-7.23 (m, 5 H, arom. CH).

LC-MS (ESI 2): 640.77 [M-H]⁻; $R_t = 1.88$ min.

MS (MALDI-TOF): 664.8 [M+Na]⁺, 680.8 [M+K]⁺

MS-HR (FAB, m/z): ber. für C₃₅H₃₆N₃O₉ [M+H]⁺ 642.2452, gem. 642.2417

C₃₅H₃₅N₃O₉ (641.67)

***N*-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-tyrosin 92/24**

Durch sequenzielle *N*-terminale Deblockierung ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF für 2 x 5 min

gemäß AAV P2 und Aminosäurekupplung von **L-134** (193 mg, 420 μmol) für 2.5 h und **L-134** (193 mg, 420 μmol) für 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μmol) in Gegenwart von DIEA (134 μl , 780 μmol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wird das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgt *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Umsetzung mit Benzylchloroformiat (73 μl , 520 μmol), DMAP (16 mg, 130 μmol), HOAt (71 mg, 520 μmol) und DIEA (178 μl , 1.04 mmol) in 7.5 ml DMF/ CH_2Cl_2 gemäß AAV P10 für 10 h und Freisetzung des *C*-Terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h. Anschließend wird gemäß AAV P5 Variante B für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 24 mg, 37 μmol , 31% weißer Feststoff

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 11.20$ min

Smp.: 126°C

$[\alpha]_D^{20} = -12.7^\circ$ (MeOH, $c = 0.45$)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.57$ (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}$), 2.71 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}$), 2.82-2.87 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.91-3.07 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2$), 4.19 (dd, $^3J = 9.4$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.50 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.88 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, Ph-*CHH*-O), 4.98 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, Ph-*CHH*-O), 6.58-6.63 (m, 6 H, Tyr-arom. CH), 6.90-6.95 (m, 6 H, Tyr-arom. CH), 7.15-7.26 (m, 5 H, arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 640.00 $[\text{M-H}]^-$; $R_t = 1.90$ min,

MS (MALDI-TOF): 664.5 $[\text{M+Na}]^+$

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_9$ $[\text{M+H}]^+$ 642.2452, gem. 642.2462

$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9$ (641.67)

***N*-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin 92/25**

Durch sequenzielle *N*-terminale Deblockierungen ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF für 2 x 5 min gemäß AAV P2 und zweimalige Aminosäureanknüpfung von **129b** (163 mg, 420 μmol) für 2.5 h und 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μmol) in Gegenwart von DIEA (134 μl , 780 μmol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wird das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgt *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Umsetzung mit Benzylchloroformiat (73 μl , 520 μmol), DMAP (16 mg, 130 μmol), HOAt (71

mg, 520 μmol) und DIEA (178 μl , 1.04 mmol) in 7.5 ml DMF/ CH_2Cl_2 gemäß AAV P10 für 10 h und anschließend Freisetzung des C-Terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 13 mg, 21 μmol , 18% weißer Feststoff

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C) $R_t = 14.54$ min

Smp.: 201-202°C

$[\alpha]_D^{20} = -20.0^\circ$ (MeOH, $c = 0.39$)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.52$ (m, 1 H, $\beta\text{-CH}$), 2.78-2.94 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}$), 2.98-3.08 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}$), 4.26 (dd, $^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.50 (dd, $^2J = 7.8$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, $\alpha\text{-CH}$), 4.58 (dd, $^2J = 8.4$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.90 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, Ph-CHH-O), 4.94 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, Ph-CHHO), 6.63 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.96 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.08-7.22 (m, 15 H, arom. CH).

LC-MS (ESI 2): 608.47 $[\text{M-H}]^-$; $R_t = 2.43$ min

MS (MALDI-TOF): 632.9 $[\text{M+Na}]^+$, 648.8 $[\text{M+K}]^+$

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M+H}]^+$ 610.2553, gem. 610.2554

$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$ (609.69)

***N*-3-[(4-(*n*-Pentyl)phenyl)-*E*-acryloyl-*D*-tyrosyl-*L*-phenylalanyl-*L*-tyrosin 92/26**

Durch sequenzielle *N*-terminale Deblockierung ausgehend von polymergebundener Verbindung **L-93W** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF für 2 x 5 min gemäß AAV P2 und Aminosäurekupplung von **129b** (163 mg, 420 μmol) für 2.5 h und **D-134** (193 mg, 420 μmol) für 14 h durch jeweilige Kupplung mit HATU (148 mg, 390 μmol) in Gegenwart von DIEA (134 μl , 780 μmol) in 5 ml NMP gemäß AAV P4 Variante A wird das polymergebundene Tripeptid aufgebaut. Nun folgt *N*-terminale Deblockierung analog AAV P2, Anknüpfung von **146b** (85 mg μl , 390 μmol) gemäß AAV P8 für 18 h, Freisetzung des C-Terminus gemäß AAV P1 Variante C für 16 h. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 30 und 60 min mit jeweils 5 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 26 mg, 37 μmol , 31% weißer Feststoff

HPLC (A2, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): $R_t = 22.25$ min

Smp.: 131-132°C

$[\alpha]_D^{20} = -1.4^\circ$ (MeOH, $c = 0.58$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.82$ (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.22-1.29 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.52-1.56 (m, 2 H, CH₂), 2.53 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, PhCH₂CH₂), 2.61 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, β -CH), 2.71 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, β -CH), 2.79 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz, 1 H, β -CH), 2.88 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, β -CH), 2.96 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, β -CH), 3.04 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, β -CH), 4.49-4.55 (m, 3 H, α -CH), 6.48 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CHCO), 6.57 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.60 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.82 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.97 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.03 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.09-7.13 (m, 5 H, arom. CH), 7.36 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.56 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-CO).

LC-MS (ESI-2): 690.84 [M-H]⁻; R_t = 2.63 min

MS (MALDI-TOF): 714.6 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber für C₄₁H₄₆N₃O₇ [M+H]⁺ 632.3336, gem. 692.3332

C₄₁H₄₅N₃O₇ (691.81)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Tripeptide 92/28-92/30 (AAV P15)

Gemäß AAV P2 wird polymergebundenes Tripeptid **135** (400 mg, 0.40 mmol/g, 160 μ mol) für 2 x 5 min mit Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Reaktion mit Benzylchloroformiat (113 μ l, 800 μ mol), DMAP (24 mg, 200 μ mol), HOAt (109 mg, 800 μ mol) und DIEA (274 μ l, 1.6 mmol) in DMF/CH₂Cl₂ 2:1 (v/v) für 12 h. Dann wird für 16 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 45 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

N^α-Benzyloxycarbonyl-D-histidyl-N-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/28

Umsetzung gemäß AAV P15 ausgehend von **135a** liefert das Zielprodukt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 28 mg, 38 μ mol, 24% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C) R_t = 9.74 min

Smp.: 128°C

$[\alpha]_D^{20} = -52.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.51$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.48$ -2.51 (m, 2 H, β -CH), 2.66 (s, 3 H, NCH₃), 2.73-2.83 (m, 2 H, β -CH), 3.09 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 4.5$ Hz, 1 H, β -CH), 3.18 (dd, $^2J = 14.7$ Hz, $^3J = 5.09$, 1 H, β -CH), 4.58-4.61 (m, 2 H, α -CH), 4.93 (d, $^2J = 12.5$ Hz, 1 H, PhCHH-O), 5.01 (d, $^2J = 12.3$ Hz, 1 H, PhCHH-O), 5.36 (dd, $^3J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, α -CH), 6.56 [6.61] (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.90-7.01 (m überl., 1 H, His-arom. CH), 6.93 [6.99] (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.07-7.17 (m, 5 H, arom. CH), 7.18-7.32 (m, 5 H, arom. CH), 8.55 [8.58] (s, 1 H, His-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (LC-ESI 2): 614.08 [M+H]⁺, 636.07 [M+Na]⁺, $R_t = 1.42$ min,

MS (MALDI-TOF): 614.9 [M+H]⁺, 636.9 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₃H₃₆N₅O₇ [M+H]⁺ 614.2615, gem. 614.2650

C₃₃H₃₅N₅O₇ (613.66)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-N-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/29**

Umsetzung gemäß AAV P15 ausgehend von **135d** liefert das Zielprodukt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 28 mg, 39 μ mol, 24% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 10.82$ min

Smp.: 127°C

$[\alpha]_D^{20} = -64.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.88$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.44$ -2.59 (m, 2 H, β -CH), 2.74-2.97 (m, 5 H, 2 β -CH, NCH₃), 3.13-3.28 (m, 2 H, β -CH), 4.51-4.61 (m, 1 H, α -CH), 4.67-4.71 (m, 2 H, α -CH), 4.97-5.00 (m, 1 H, PhCHH-O), 5.06-5.09 (m, 1 H, PhCHH-O), 6.67 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.92 [6.97] (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.13-7.20 (m, 6 H, 5 arom. CH, 1 His-arom. CH), 7.26-7.34 (m, 5 H, arom. CH), 8.68 [8.73] (s, 1 H, His-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-2): 614.08 [M+H]⁺, 636.07 [M+Na]⁺; $R_t = 1.49$ min

MS (MALDI-TOF): 614.7 [M+H]⁺, 636.7 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₃H₃₆N₅O₇ [M+H]⁺ 614.2615, gem. 614.2637

$C_{33}H_{35}N_5O_7$ (613.66)* $C_2HF_3O_2$ (114.02)

***N*^α-Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/30**

Umsetzung gemäß AAV P15 ausgehend von **135c** liefert das Zielprodukt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 28 mg, 39 μmol, 24% leicht gelblicher Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 10.24 min

Smp.: 129°C

$[\alpha]_D^{20} = -7.3^\circ$ (MeOH, c = 0.56)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.88-2.98 (m, 3 H, β-CH), 3.06-3.14 (m, 3 H, β-CH), 4.36-4.40 (t, ³J = 6.8 Hz, 1 H, α-CH), 4.58 (dd, ³J = 5.3 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1 H, α-CH), 4.63 (dd, ³J = 5.3 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1 H, α-CH), 5.04 (s, 2 H, PhCH₂-O), 6.68 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.06 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.16-7.27 (m, 5 H, 5 arom. CH, His-arom. CH), 7.31-7.34 (m, 5 H, arom. CH), 8.63 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 600.08 [M+H]⁺, 622.05 [M+Na]⁺; R_t = 1.45 min,

MS (MALDI-TOF): 600.4 [M+H]⁺, 622.4 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₂H₃₄N₅O₇ [M+H]⁺ 600.2458, gem. 600.2476

$C_{32}H_{33}N_5O_7$ (599.63)* $C_2HF_3O_2$ (114.02)

***N*^α-4-Nitro-benzyloxycarbonyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/31**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundenes Tripeptid **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P10 Reaktion mit *p*-Nitro-benzylchloroformiat (112 mg, 520 μmol), DMAP (16 mg, 130 μmol), HOAt (71 mg, 520 μmol) und DIEA (178 μl, 1.04 mmol) in 7.5 ml DMF/CH₂Cl₂ 1:2 (v/v) für 20 h. Dann wird für 16 h mit Pd(PPh₃)₄ in Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 45 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 58 mg, 76 μmol, 63% hellgelber Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C) R_t = 8.96 min

Smp.: 124°C

$[\alpha]_D^{20} = +3.9^\circ$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.64-2.81 (m, 3 H, β -CH), 2.88-3.04 (m, 3 H, β -CH), 4.27 (dd, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, α -CH), 4.47 (dd, $^3J = 5.1$ Hz, $^3J = 8.41$ Hz, 1 H, α -CH), 4.53 (dd, $^3J = 4.7$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, 1 H, α -CH), 5.02 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.53 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.83 (s, 1 H, His-arom. CH), 6.90 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.03-7.09 (m, 5 H, Phe-arom. CH), 7.39 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, NO₂-Ph CH), 8.05 (d, $^3J = 8.80$ Hz, 2 H, NO₂-Ph CH), 8.51 (s, 1 H, His-arom. CH).

MS (MALDI-TOF): 645.6 [M+H]⁺, 667.6 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₂H₃₃N₆O₉ [M+H]⁺ 645.2309, gem. 645.2295

C₃₂H₃₂N₆O₉ (644.64)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Tripeptide 92/32, 92/33 und 92/35 (AAV P16)

Gemäß AAV P2 wird polymergebundenes Tripeptid **135** (400 mg, 0.40 mmol/g, 160 μ mol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Reaktion mit **147b** (110 mg, 500 μ mol), HATU (175 mg, 460 μ mol), HOAt (27 mg, 200 μ mol) und DIEA (342 μ l, 2.0 mmol) in 5 ml NMP für 12 h. Dann wird für 24 h mit Pd(PPh₃)₄ in Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 45 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

N^α-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-histidyl-N-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/32

Umsetzung gemäß AAV P16 ausgehend von **135a** liefert das Zielprodukt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 27 mg, 34 μ mol, 21% leicht gelbliche, farblose Kristalle

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/10/0.1 in 30 min, 50°C) R_t = 18.95 min

Smp.: 127°C

$[\alpha]_D^{20} = -20.0^\circ$ (MeOH, c = 0.75)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.86 (t, ³J = 7.0 Hz, 3 H, CH₃), 1.29-1.31 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.54 (quint, ³J = 7.4 Hz, 2 H, CH₂), 2.32-2.39 (m, 1 H, PhCH), 2.46-2.54 (m, 3 H, PhCH₂), 2.60 (dd, ²J = 15.3 Hz, ³J = 6.3 Hz, 2 H, β -CH₂), 2.70 (s, 3 H, NCH₃), 2.78 (t, ³J = 7.2 Hz, 2 H, Ph-CH₂-CH₂-C=O), 2.86-2.92 (m, 4 H, β -CH), 4.56 (dd, ³J = 5.1 Hz, ³J = 8.2 Hz, 1 H, α -CH), 4.56-4.62 (m, 2 H, 2 α -CH), 6.67 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.93 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.04 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.04-7.08 (m, 4 H, arom. CH), 7.17-7.25 (m, 5 H, arom. CH), 8.58 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 682.18 [M+H]⁺, 704.16 [M+Na]⁺, R_t = 1.92 min

HR-MS (FAB, m/z): ber für C₃₉H₄₇N₅O₆ [M+H]⁺ 682.3605, gem. 682.3615

C₃₉H₄₇N₅O₆ (663.76) *C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl- L-histidy-*N*-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin hydrotrifluoracetat 92/33**

Umsetzung gemäß AAV P16 ausgehend von Tripeptid **135d** liefert das Zielprodukt.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 38 mg, 48 μ mol, 30% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C) R_t = 18.36 min

Smp.: 120°C

$[\alpha]_D^{20}$ = - 12.3° (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.87 (m, 3 H, CH₃), 1.29 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.54 (m, 2 H, CH₂), 2.33-2.45 (m, 4 H, Ph-CH₂-CH₂-C=O, PhCH₂), 2.52 (s, 3 H, NCH₃), 2.65-2.71 (m, 2 H, β -CH₂), 2.79-2.92 (m, 4 H, Ph-CH₂-CH₂-C=O, β -CH₂), 3.12-3.23 (m, 2 H, β -CH₂), 4.55-4.67 (m, 1 H, α -CH), 4.94-5.00 (m, 1 H, α -CH), 5.27-5.39 (m, 1 H, α -CH), 6.67 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.94-6.96 (m, 3 H, 2 Tyr-arom. CH, 1 His-arom. H), 7.02-7.20 (m, 9 H, arom. CH), 8.71 (s, 1 H, His-H).

LC-MS (ESI-2):, 682.18 [M+H]⁺, 704.16 [M+Na]⁺; R_t = 1.99 min

MS (FAB): 682.3 [M+H]⁺, 704.3 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₉H₄₈N₅O₆ [M+H]⁺ 682.3605, gem. 682.3625

C₃₉H₄₇N₅O₆ (663.76) *C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/34**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Umsetzung mit **147b** (106 mg, 480 μmol), HATU (175 mg, 460 μmol), HOAt (27 mg, 200 μmol) und DIEA (342 μl, 2.0 mmol) in 5 ml NMP für 24 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 30 min und 3 h min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 23 mg, 29 μmol, 24% leicht gelblicher Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 16.69 min

Smp.: 130-131°C

$[\alpha]_D^{20} = +7.6^\circ$ (MeOH, c = 1.0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.87 (t, ³J = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.15-1.37 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.55 (quint, ³J = 7.6 Hz, 2 H, CH₂), 2.41-2.55 (m, 2 H, CH₂), 2.54 (t, ³J = 7.6 Hz, 2 H, 2 β-CH), 2.79 (m, 4 H, 2 CH₂), 2.90-3.02 (m, 2 H, β-CH), 3.10-3.16 (m, 2 H, β-CH), 4.55-4.64 (m, 3 H, α-CH), 6.68 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.88 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.08-7.11 (m, 6 H, 2 Tyr-arom. CH, 4 arom. CH), 7.14-7.22 (m, 5 H, arom. CH), 8.64 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 668.4 [M+H]⁺, 690.3 [M+Na]⁺, 666.4 [M-H]⁻; R_t = 17.27 min

MS (MALDI-TOF): 668.8 [M+H]⁺, 690.8 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₆N₅O₆ [M+H]⁺ 668.3448, gem. 668.3418

ber. für C₃₈H₄₅N₅NaO₆ [M+Na]⁺ 690.3268, gem. 690.3344

C₃₈H₄₅N₅O₆ (667.80)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/35**

Umsetzung Gemäß AAV P16 ausgehend von **135c** liefert das Zielprodukt **92/35**.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Ausbeute: 24 mg, 31 μmol, 19% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 20.04 min

Smp.: >210°C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -13.2^\circ$ (MeOH, $c = 0.19$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.87$ (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.25-1.36 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.52-1.59 (quint, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, CH₂), 2.44 (t, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Ph-CH₂-CH₂-C=O), 2.54 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, PhCH₂), 2.79 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, Ph-CH₂-CH₂-C=O), 2.81-2.94 (m, 3 H, β -CH), 3.00-3.13 (m, 3 H, β -CH), 4.56 (dd, $^3J = 5.1$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, α -CH), 4.56-4.62 (m, 2 H, 2 α -CH), 6.67 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.93 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.04 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.04-7.08 (m, 4 H, arom. CH), 7.17-7.25 (m, 5 H, arom. CH), 8.58 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI 2): 668.17 [M+H]⁺, 690.15 [M+Na]⁺, $R_t = 1.94$ min

MS (MALDI-TOF): 668.8 [M+H]⁺, 690.8 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₆N₅O₆ 668.3448, gem. 668.3433

C₃₈H₄₅N₅O₆ (667.79)* C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[4-(*n*-Pentyl)phenyl]-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/36**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Anknüpfung von **146b** (105 mg, 480 μ mol), PyAOP (250 mg, 480 μ mol), DMAP (15 mg, 120 μ mol), DIEA (103 μ l, 600 μ mol) in 3 ml DMF/CH₂Cl₂ für 24 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 min und 3 h min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 14 mg, 18 μ mol, 15% weisser Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): $R_t = 16.19$ min

Smp.: 149°C

$[\alpha]_D^{20} = -5.3^\circ$ (MeOH, $c = 0.53$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.90$ (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3 H, CH₃), 1.28-1.36 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.62 (quint, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, CH₂), 2.62 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, PhCH₂CH₂), 2.81 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, 1 H, β -CH), 2.90-2.97 (m, 2 H, β -CH), 3.08-3.16 (m, 3 H, β -CH), 4.58 (dd, 3J

= 5.3 Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, α -CH), 4.65 (dd, $^3J = 4.7$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1 H, α -CH), 4.71 (m, 1 H, α -CH), 6.55 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.67 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.95 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.04 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.15-7.26 (m, 8 H, arom. CH), 7.45 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.50 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CHC=O), 8.64 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 666.3 [M+H]⁺, 688.3 [M+Na]⁺, 664.4 [M-H]⁻; R_t = 17.78 min

MS (MALDI-TOF): 666.7 [M+H]⁺, 688.7 [M+Na]⁺, 704.6 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₄N₅O₆ [M+H]⁺ 666.3292, gem. 666.3317

ber. für C₃₈H₄₃N₅O₆Na [M+Na]⁺ 688.3111, gem. 688.3190

C₃₈H₄₃N₅O₆ (665.79)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[4-(1-*E-n*-Pentenyl)phenyl]-*E/Z*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/37**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) für 2 x 20 min mit Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Reaktion mit **151d** (60 mg, 270 μ mol), PyAOP (250 mg, 480 μ mol), DMAP (15 mg, 120 μ mol), DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) in 7.5 ml DMF/CH₂Cl₂ für 24 h. Dann wird für 4 h mit einer Lösung von Pd(PPh₃)₄ in 5 ml THF/Morpholin gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 min und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Man erhält das Produkt als nicht weiter auftrennbares Gemisch von *E*- und *Z*-Isomer (*E*:*Z* = 1:1, laut ¹H-NMR)

Ausbeute: 3.1 mg, 4.0 μ mol, 3% hellbrauner Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C):

R_t = 13.47 min (Isomer 1), R_t = 15.41 min (Isomer 2)

Smp.: 165°C

$[\alpha]_D^{20} = +6.3^\circ$ (MeOH, c = 0.24)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): **Z-Isomer:** $\delta = 0.96$ (m, 3 H, CH₂CH₃), 1.27-1.30 (m, 2 H, CH₂), 1.49-1.52 (m, 2 H, CH₂), 2.72-2.78 (m, 6 H, β -CH), 4.56-4.72 (m, 3 H, α -CH), 5.93 (d, $^3J_{\text{cis}} = 12.7$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.30-6.39 (m, 2 H, -CH₂-CH=CH-Ph), 6.65-6.68 [6.74-

6.77] (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.89 (m, 1 H, His-arom. CH), 6.99 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.15-7.27 (m, 7 H, 6 arom. CH, $CH=CH-C=O$), 7.39 (t, $^3J = 8.8$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.47 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, arom. CH), 8.54 (s, 1 H, His-arom. CH, Isomer).

E-Isomer: $\delta = 0.96$ (m, 3 H, CH_2CH_3), 1.27-1.30 (m, 2 H, CH_2), 1.49-1.52 (m, 2 H, CH_2), 2.72-2.78 (m, 6 H, β -CH), 4.56-4.72 (m, 3 H, α -CH), 6.30-6.39 (m, 2 H, $-CH_2-CH=CH-Ph$), 6.56 (d, $^3J_{trans} = 15.9$ Hz, 1 H, $CH=CH-C=O$), 6.74-6.77 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.93 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.04 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 7.15-7.27 (m, 6 H, arom. CH), 7.39 (t, $^3J = 8.8$ Hz, 2 H, arom. CH), 7.47 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.47 (d, $^3J_{trans} = 16.0$ Hz, 1 H, $CH=CH-C=O$), 8.56 (s, 1 H, His-arom. CH, Isomer).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 664.3 $[M+H]^+$, 686.3 $[M+Na]^+$; $R_t = 16.06$ min (Isomer 1),

$R_t = 17.67$ min (Isomer 2)

MS (MALDI-TOF): 664.9 $[M+H]^+$, 686.9 $[M+Na]^+$

HR-MS (FAB, m/z): ber. für $C_{38}H_{42}N_5O_6$ $[M+H]^+$ 664.3135, gem. 664.3096

$C_{38}H_{41}N_5O_6$ (663.31)* $C_2HF_3O_2$ (114.02)

***N*^α-3-[3-(1-*E-n*-Pentenyl)phenyl]-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/38**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (200 mg, 0.30 mmol/g, 60 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Anknüpfung von **151c** (39 mg, 180 μ mol), PyAOP (94 mg, 180 μ mol), DMAP (7 mg, 60 μ mol), HOAt (8 mg, 60 μ mol), DIEA (103 μ l, 600 μ mol) in 3 ml DMF/ CH_2Cl_2 für 24 h. Dann wird für 4 h mit $Pd(PPh_3)_4$ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 min und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/ H_2O 95:5 (v/v) abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, $CH_3CN/H_2O/TFA$, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 6.1 mg, 7.8 mmol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, $CH_3CN/H_2O/TFA$, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C); $R_t = 15.85$ min

Smp.: 144°C

$[\alpha]_D^{20} = -4.2^\circ$ (MeOH, c = 0.33)

¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.97$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.49-1.55 (m, 2 H, CH_2CH_3), 2.17-2.23 (m, 2 H, $CH_2CH_2CH_3$), 2.81 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 10.0$ Hz, 1 H, β -CH), 2.91-2.97 (m, 2 H, β -CH), 3.09-3.19 (m, 3 H, β -CH), 4.48-4.52 (m, 1 H, α -CH), 4.58-4.66 (m,

2 H, α -CH), 6.29-6.34 (m, 1 H, CH₂-CH=CH-Ph), 6.41 (d, $^3J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz, 1 H, CH₂-CH=CH-Ph), 6.60 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-CO), 6.67 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.95 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.04 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.16-7.24 (m, 4 H, arom. CH), 7.29-7.33 (m, 1 H, arom. CH), 7.37 (m, 2 H, arom. CH), 7.50-7.54 (m, 2 H, arom. CH), 7.73 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 1 H, CH=CH-CO), 8.40 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 664.3 [M+H]⁺, 686.3 [M+Na]⁺; R_t = 16.06 min

MS (MALDI-TOF): 664.7 [M+H]⁺, 686.7 [M+Na]⁺, 702.7 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₂N₅O₆ [M+H]⁺ 664.3135, gem. 664.3073

C₃₈H₄₁N₅O₆ (663.31)* C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[2-(1-*Z*-*n*-Pentenyl)phenyl]-*E*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/39**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μ mol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Reaktion mit **87** (104 mg, 480 μ mol), PyAOP (250 mg, 480 μ mol), DMAP (15 mg, 120 μ mol), DIEA (205 μ l, 1.2 mmol) in 3 ml DMF/CH₂Cl₂ für 24 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 min und 3 h min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 35 mg, 45 μ mol, 38% leicht gelblicher Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.90 min

Smp.: 134°C

$[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.76$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.28-1.33 (m, 2 H, CH₂CH₃), 1.89-1.95 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₃), 2.72-2.78 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 10.0$ Hz, 1 H, β -CHH), 2.86-2.95 (m, 2 H, β -CH₂), 2.99-3.10 (m, 3 H, CH₂, β -CHH), 4.48-4.52 (m, 1 H, α -CH), 4.58-4.66 (m, 2 H, α -CH), 5.63-5.80 (m, 1 H, CH₂-CH=CH-Ph), 6.46 (d, $^3J_{\text{cis}} = 11.1$ Hz, 1 H, CH=CH-Ph), 6.51 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CHCO), 6.61 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.87 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.00 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.08-7.16 (m, 6 H, arom. CH), 7.21-7.27 (m, 2 H, arom. CH), 7.59 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1 H, arom. CH), 7.73 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 1 H, CH=CHCO), 8.40 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1 Grad. A): 662.4 [M-H]⁻, 664.3 [M+H]⁺, 686.3 [M+Na]⁺; R_t = 15.53 min

MS (MALDI-TOF): 664.9 [M+H]⁺, 686.9 [M+Na]⁺, 702.9 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₂N₅O₆ [M+H]⁺ 664.3135, gem. 664.3193

C₃₈H₄₁N₅O₆ (663.77)*C₂HF₃O₂ (114.02)

N^α-3-[2-(*n*-Pentyl)phenyl]propionyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 171/2

Ausgehend von polymergebundener Verbindung **135b** (0.30 mmol/g, 120 μmol) wird gemäß AAV P5 Variante B für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v) und für 30 und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) abgespalten und das Polymer mit 2 x 5 ml TFA und 2 x 5 ml CHCl₃ gewaschen. Nach Entfernen der flüchtigen Komponenten der vereinigten Lösungen im Vakuum wird der Rückstand in 5 ml Dioxan gelöst, mit Pd (50 mg, 10% auf Kohle) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre für 8 h gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite, Einengen der Filtrate im Vakuum und HPLC-Chromatographie des Rückstands gefolgt von Gefriertrocknung erhält man die Zielverbindung.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 28 mg, 36 μmol, 30% weisser Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 14.70 min

Smp.: 120-121°C

$[\alpha]_D^{20} = +7.2^\circ$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 0.89 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₃), 1.31-1.35 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.52-1.58 (m, 2 H, CH₂), 2.43-2.49 (m, 2 H, CH₂), 2.60 (t, ³J = 7.8 Hz, 2 H, PhCH₂CH₂), 2.73-2.89 (m, 4 H, CH₂, 2 β-CH), 2.92-3.03 (m, 2 H, β-CH), 3.10-3.15 (m, 2 H, β-CH), 4.55-4.64 (m, 3 H, α-CH), 6.68 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.85 (s, 1 H, His-arom. CH), 7.04-7.09 (m, 7 H, 2 Tyr-arom. CH, 5 arom. CH), 7.15-7.22 (m, 4 H, arom. CH), 8.60 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 668.3 [M+H]⁺, 690.3 [M+Na]⁺, 666.5 [M-H]⁻, R_t = 16.33 min

MS (MALDI-TOF): 668.5 [M+H]⁺, 690.5 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₈H₄₆N₅O₆ [M+H]⁺ 668.3448, gem. 668.3421

ber. für C₃₈H₄₅N₅NaO₆ [M+Na]⁺ 690.3268, gem. 690.3298

C₃₈H₄₅N₅O₆ (667.80)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-(4-Biphenyl)-*E*-propionyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/40**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** (400 mg, 0.30 mmol/g, 120 μmol) für 2 x 20 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P9 Reaktion mit **147a** (109 mg, 480 μmol), HATU (186 mg, 480 μmol), HOAt (16 mg, 120 μmol) und DIEA (205 μl, 1.2 mmol) in 5 ml NMP für 24 h. Dann wird für 4 h mit Pd(PPh₃)₄ in 5 ml Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 10 und 20 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 30 min und 180 min mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P1, CH₃CN/H₂O/TFA, 30/70/0.1 - 60/40/0.1 in 60 min, 10 ml/min, 50°C)

Ausbeute: 32 mg, 41 μmol, 34% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 45/55/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 13.00 min

Smp.: 118-119°C

$[\alpha]_D^{20} = + 8.9$ (MeOH, c = 1.00)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 2.41-2.45 (m, 2 H, CH₂CH₂-CO), 2.63-2.93 (m, 6 H, 4 β-CH, CH₂CH₂-CO), 2.99-3.04 (m, 2 H, β-CH), 4.29 (t, ³J = 7.0 Hz, 1 H, α-CH), 4.35 (dd, ³J = 5.9 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1 H, α-CH), 4.66 (dd, ³J = 5.5 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1 H, α-CH), 6.58 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.78 (m, 1 H, His-arom. CH), 6.94 (d, ³J = 8.4 Hz, Tyr-arom. CH), 7.04-7.15 (m, 7 H, arom. CH), 7.16-7.21 (m, 2 H, arom. CH), 7.27-7.40 (m, 2 H, arom. CH), 7.39 (d, ³J = 7.8 Hz, 2 H, arom. CH), 7.45 (d, ³J = 7.8 Hz, 2 H, arom. CH), 8.49 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. A): 674.3 [M+H]⁺; R_t = 13.63 min

MS (MALDI-TOF): 674.9 [M+H]⁺, 696.9 [M+Na]⁺, 712.9 [M+K]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₃₉H₄₀N₅O₆ [M+H]⁺ 674.2979, gem. 674.2947

C₃₉H₃₉N₅O₆ (673.77)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-(4-Biphenyl)-*E/Z*-acryloyl-D-histidyl-*N*-methyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/41**

Gemäß AAV P2 wird polymergebundenes Tripeptid **135d** (400 mg, 0.40 mmol/g, 160 μmol) für 2 x 5 min mit Piperidin umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Umsetzung mit **146a** (179 mg, 800 μmol), PyAOP (417 mg, 800 μmol), HOAt (109 mg, 800 μmol), DMAP

(25 mg, 200 μ mol), DIEA (343 μ l, 2.0 mmol) in 7 ml DMF/CH₂Cl₂ 2:1 (v/v) für 18 h. Dann wird für 16 h mit Pd(PPh₃)₄ und Morpholin/THF gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert. Gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 45 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

Man erhält das Produkt als nicht weiter auftrennbares Gemisch von *E*- und *Z*-Isomer (*E/Z* = 1.6:1, laut ¹H-NMR).

Ausbeute: 27 mg, 34 μ mol, 21% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C):

$R_t = 15.20$ min (*E*-Isomer), $R_t = 16.34$ min (*Z*-Isomer)

Smp.: 161°C

$[\alpha]_D^{20} = -43.9^\circ$ (MeOH, $c = 0.59$)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): ***Z*-Isomer:** $\delta = 2.29$ -2.43 [2.59-2.70] (m überl., 1 H, β -CH), 2.42 [2.58] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.81-3.05 (m, 4 H, β -CH), 3.06-3.28 (m, 2 H, β -CH), 4.50-4.68 (m, 1 H, α -CH), 5.01-5.20 (m, 1 H, α -CH), 5.31-5.50 (m, 1 H, α -CH), 4.68-4.72 (m, 1 H, α -CH), 5.86 [5.96] [6.01] (d, $^3J_{cis} = 12.5$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.58 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.65-6.69 [6.78-6.82] [6.88-6.93] (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.97-7.01 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.09-7.25 (m, 9 H, 8 arom. CH, CH=CH-C=O), 7.32-7.36 (m, 1 H, arom. CH), 7.41-7.45 (m, 3 H, arom. CH), 7.52-7.56 (m, 1 H, arom. CH), 7.59-7.70 (m, 7 H, arom. CH), 8.65 [8.70] [8.73] (s, 1 H, His-arom. CH).

***E*-Isomer:** $\delta = 2.29$ -2.43 [2.59-2.70] (m überl., 1 H, β -CH), 2.42 [2.58] (s überl., 3 H, NCH₃), 2.81-3.05 (m, 4 H, β -CH), 3.06-3.28 (m, 2 H, β -CH), 4.50-4.68 (m, 1 H, α -CH), 5.01-5.20 (m, 1 H, α -CH), 5.31-5.50 (m, 1 H, α -CH), 6.46 [6.56] (d, $^3J_{trans} = 15.8$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.58 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.65-6.69 [6.78-6.82] [6.88-6.93] (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.97-7.01 (m, 1 H, His-arom. CH), 7.09-7.25 (m, 8 H, arom. CH), 7.32-7.36 (m, 1 H, arom. CH), 7.41-7.45 (m, 3 H, arom. CH), 7.52-7.56 (m, 1 H, arom. CH), 7.59-7.70 (m, 8 H, 7 arom. CH, CH=CH-C=O), 8.65 [8.70] [8.73] (s, 1 H, His-arom. CH).

Aufgespaltene Signale (in eckigen Klammern) deuten auf Rotamere hin.

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 686.2 [M+H]⁺, 708.3 [M+Na]⁺, $R_t = 14.22$ min (Isomer 1),

$R_t = 15.31$ min (Isomer 2)

MS (MALDI-TOF): 686.1 [M+H]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₀H₄₀N₅O₆ [M+H]⁺ 686.2979, gem. 686.3008

C₄₀H₃₉N₅O₆ (685.77)*C₂HF₃O₂ (114.02)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Verbindungen 92/42-92/47 (AAV P17)

Gemäß AAV P2 wird polymergebundene Verbindung **135b** oder **135c** (400 mg, 0.40 mmol/g, 160 μ mol) für 2 x 5 min mit 2 x 5 ml Piperidin/DMF umgesetzt, anschließend erfolgt gemäß AAV P8 Umsetzung von **146f**, **146g**, oder **146h** (122 mg, 480 μ mol), PyAOP (250 mg, 480 μ mol), DMAP (20 mg, 160 μ mol) und DIEA (274 μ l, 1.6 mmol) in 7 ml DMF/CH₂Cl₂ 2:1 (v/v) für 18 h. Dann wird für 8 h mit Pd(PPh₃)₄ gemäß AAV P1 Variante C der Allylester deblockiert und gemäß AAV P5 Variante B wird für 2 x 45 min mit jeweils 5 ml TFA/CH₂Cl₂/H₂O 47:47:6 (v/v/v) und für 2 x 1.5 h mit jeweils 5 ml TFA/H₂O 95:5 (v/v) vom Harz abgespalten.

Reinigung: HPLC (P2, CH₃CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 - 70/30/0.1)

***N*^α-3-[2-(Benzyloxy)phenyl]-*E/Z*-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotri-fluoracetat 92/42**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146f** ausgehend von **135b** liefert das Zielprodukt.

Man erhält das Produkt als nicht weiter auftrennbares Gemisch von *E*- und *Z*-Isomer (*E/Z* = 1:2.5, laut ¹H-NMR)

Ausbeute: 13 mg, 16 μ mol, 10% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C):

R_t = 14.12 min (*Z*-Isomer), R_t = 14.50 min (*E*-Isomer)

Smp.: 127°C

$[\alpha]_D^{20} = -15.3^\circ$ (MeOH, *c* = 0.50)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): ***Z*-Isomer:** δ = 2.74-3.10 (m, 6 H, β -CH), 4.43-4.58 (m, 3 H, 3 α -CH), 5.04 (s, 2 H, PhCH₂O), 5.90 (d, ³*J*_{cis} = 12.5 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.60 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.71-6.75 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.79-6.82 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.93-6.97 (m, 3 H, 2 arom. CH, His-CH), 7.10-7.12 (m, 6 H, arom. CH), 7.25-7.33 (m, 3 H, arom. CH), 7.36-7.42 (m, 3 H, 2 arom. CH, CH=CH-C=O), 7.53 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1 H, arom. CH), 8.27 (s, 1 H, His-CH).

***E*-Isomer:** δ = 2.74-3.10 (m, 6 H, β -CH), 4.43-4.58 (m, 3 H, 3 α -CH), 5.14 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.54 (d, ³*J*_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.60 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.71-6.75 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.79-6.82 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.93-6.97 (m, 3 H, 2 arom. CH, His-CH), 7.10-7.12 (m, 6 H, arom. CH), 7.25-7.33 (m, 3 H, arom. CH), 7.36-7.42 (m, 3 H, 2 arom. CH, CH=CH-C=O), 7.53 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1 H, arom. CH), 8.31 (s, 1 H, His-CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺; R_t = 17.77 min (Isomer 1),
702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺; R_t = 18.73 min (Isomer 2)
C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78) * C₂HF₃O₂ (114.02)

**N^α-3-[2-(Benzyloxy)phenyl]-E-acryloyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotri-
fluoracetat 92/43**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146f** ausgehend von **135c** liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 16 mg, 20 μmol, 13% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 15.61 min

Smp.: 118°C

$[\alpha]_D^{20} = -3.7^\circ$ (MeOH, c = 0.43)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.80 (d, ³J = 9.8 Hz, 1 H, β-CH), 2.89-2.95 (m, 2 H, 2 β-CH), 3.07-3.15 (m, 3 H, β-CH), 4.58 (d, ³J = 5.3 Hz, 1 H, α-CH), 4.64 (d, ³J = 4.9 Hz, 1 H, α-CH), 4.68-4.72 (m, 1 H, α-CH), 5.09 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.56 (d, ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.66 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.92-7.05 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 7.02-7.17 (m, 8 H, 1 His-arom CH, 7 arom. CH), 7.27-7.37 (m, 5 H, arom. CH), 7.42 (d, ³J = 7.2 Hz, 2 H, arom. CH), 7.56 (d, ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 8.63 (s, 1 H, His-CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 700.4 [M-H]⁻, 702.3 [M+H]⁺; R_t = 19.21 min

MS (Maldi-TOF): 703.09 [M+H]⁺, 725.59 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₀H₄₀N₅O₇ [M+H] 702.2928, gem. 702.2937

C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78) * C₂HF₃O₂ (114.02)

**N^α-3-[3-(Benzyloxy)phenyl]-E/Z-acryloyl-D-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotri-
fluoracetat 92/44**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146g** ausgehend von **135b** liefert das Zielprodukt.

Man erhält das Produkt als nicht weiter auftrennbares Gemisch von *E*- und *Z*-Isomer (*E/Z* = 1.7:1, laut ¹H-NMR)

Ausbeute: 37 mg, 45 μmol, 28% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C):

R_t = 14.76 min (*Z*-Isomer), R_t = 15.72 min (*E*-Isomer)

Smp.: 144°C

$[\alpha]_D^{20} = -3.5^\circ$ (MeOH, c = 0.48)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): **Z-Isomer**: δ = 2.69-2.88 (m, 3 H, β -CH), 2.94-3.09 (m, 3 H, 2 β -CH), 4.50-4.59 (m, 3 H, α -CH), 4.98 (s, 2 H, PhCH₂O), 5.78 (d, $^3J_{\text{cis}} = 12.7$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.59-6.61 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.81-6.89 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.92-7.01 (m, 4 H, 3 arom. CH, His-arom. CH), 7.05-7.17 (m, 5 H, arom. CH), 7.20-7.45 (m, 7 H, 6 arom. CH, 1 CH=CH-C=O), 8.52 (s, 1 H, His-arom. CH).

E-Isomer: δ = 2.69-2.88 (m, 3 H, β -CH), 2.94-3.09 (m, 3 H, β -CH), 4.50-4.59 (m, 3 H, α -CH), 5.05 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.41 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.59-6.61 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.81-6.89 (m, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.92-7.01 (m, 4 H, 3 arom. CH, His-arom. CH), 7.05-7.17 (m, 5 H, arom. CH), 7.20-7.45 (m, 7 H, 6 arom. CH, 1 CH=CH-C=O), 8.54 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺; R_t = 14.07 min (Isomer 1),
702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺; R_t = 15.02 min (Isomer 2)

MS (MALDI-TOF): 704.2 [M+H]⁺, 725.6 [M+Na]⁺

C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78) * C₂HF₃O₂ (114.02)

***N*^α-3-[3-(Benzyloxy)phenyl]-*E*-acryloyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotri-fluoracetat 92/45**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146g** ausgehend von **135c** liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 28 mg, 34 μ mol, 21% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 70/30/0.1 in 30 min, 50°C): R_t = 16.72 min

Smp.: 147°C

$[\alpha]_D^{20} = -23.9^\circ$ (MeOH, c = 0.90)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.80-3.21 (m, 3 H, β -CH) 3.07-3.15 (m, 3 H, β -CH), 4.56 (dd, $^3J = 5.3$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, α -CH), 4.61 (dd, $^3J = 5.3$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1 H, α -CH), 4.71-4.73 (m, 1 H, α -CH), 5.07 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.52 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.6$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.65 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2 H, Tyr-arom. CH), 6.98-7.04 (m, 3 H, 2 Tyr-arom. CH, 1 His-arom. CH), 7.06-7.20 (m, 8 H, arom. CH), 7.24-7.37 (m, 4 H, arom. CH), 7.38-7.42 (m, 2 H, arom. CH), 7.45 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 8.62 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺, 700.4 [M-H]⁻; R_t = 20.76 min

MS (MALDI-TOF): 703.66 [M+H]⁺, 725.80 [M+Na]⁺.

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₀H₄₀N₅O₇ [M+H]⁺ 702.2928, gem. 702.2945

C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N^α*-3-[4-(Benzyloxy)phenyl]-*E*-acryloyl-D-histidyl-*N*-L-phenylalanyl-L-tyrosin hydrotrifluoracetat 92/46**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146h** ausgehend von **135b** liefert das Zielprodukt.

Ausbeute: 13 mg, 16 μmol, 10% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 40 min, 50°C): R_t = 13.48 min

Smp.: 127°C

$[\alpha]_D^{20} = + 5.5^\circ$ (MeOH, c = 0.33)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.74 (d, ²J = 13.9 Hz, ³J = 9.8 Hz, 1 H, β-CH), 2.83-2.90 (m, 2 H, 2 β-CH), 3.01-3.09 (m, 3 H, β-CH), 4.51 (dd, ³J = 5.3 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1 H, α-CH), 4.69 (dd, ³J = 4.7 Hz, ³J = 9.6 Hz, 1 H, α-CH), 4.65 (dd, ³J = 6.5 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1 H, α-CH), 4.83 (s überl., 2 H, PhCH₂O), 6.52 (d, ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 6.55-6.63 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.68-6.77 (m, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.87 (s, 1 H, His-arom. CH), 6.93-6.99 (m, 2 H, arom. CH), 7.07-7.15 (m, 11 H, arom. CH), 7.31 (d, ³J = 7.6 Hz, 1 H, arom. CH), 7.88 (d, ³J_{trans} = 15.8 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 8.51 (s, 1 H, His-arom. CH).

LC-MS (ESI-2): 702.38 [M+H]⁺; R_t = 1.70 min

MS (MALDI-TOF): 702.6 [M+H]⁺, 724.6 [M+Na]⁺

C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78)*C₂HF₃O₂ (114.02)

***N^α*-3-[4-(Benzyloxy)phenyl]-*E/Z*-acryloyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-tyrosin-hydrotrifluoracetat 92/47**

Umsetzung gemäß AAV P17 mit **146h** ausgehend von **135c** liefert das Zielprodukt.

Man erhält das Produkt als Gemisch von *E*- und *Z*-Isomer (*E/Z* = 1.6:1, laut ¹H-NMR)

Ausbeute: 14.4 mg 17.6 μmol, 11% weißer Feststoff

HPLC (A2, CH₃CN/H₂O/TFA, 20/80/0.1 - 90/10/0.1 in 30 min, 50°C):

R_t = 15.84 min (*Z*-Isomer), R_t = 16.78 min (*E*-Isomer)

Smp.: 145°C

$[\alpha]_D^{20} = - 22.2^\circ$ (MeOH, c = 0.55)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): **Z-Isomer:** δ = 2.80-2.91 (m, 2 H, β-CH), 2.97-3.17 (m, 4 H, β-CH), 4.54-4.78 (m, 3 H, α-CH), 5.04 (s, 2 H, PhCH₂O), 5.79 (d, ³J_{cis} = 12.5 Hz, 1 H, CH=CH-CO), 6.64-6.67 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.86 (d, ³J = 8.8 Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.98-7.04 (m, 5 H, 4 arom. CH, 1 His-arom. CH), 7.07-7.18 (m, 2 H, arom. CH), 7.26-7.51 (m, 9 H, 8 arom. CH, CH=CH-CO), 8.60 (s, 1 H, His-CH).

E-Isomer: δ = 2.80-2.91 (m, 2 H, β -CH), 2.97-3.17 (m, 4 H, β -CH), 4.54-4.78 (m, 3 H, α -CH), 5.09 (s, 2 H, PhCH₂O), 6.41 (d, $^3J_{\text{trans}} = 15.8$ Hz, 1 H, CH=CH-C=O), 6.64-6.67 (m, 3 H, Tyr-arom. CH), 6.86 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, Tyr-arom. CH), 6.98-7.04 (m, 5 H, 4 arom. CH, 1 His-arom. CH), 7.07-7.18 (m, 2 H, arom. CH), 7.26-7.51 (m, 9 H, 8 arom. CH, CH=CH-C=O), 8.62 (s, 1 H, His-CH).

LC-MS (ESI-1, Grad. B): 702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺, R_t = 15.22 min (Isomer 1)

702.3 [M+H]⁺, 724.3 [M+Na]⁺, R_t = 16.16 min (Isomer 2)

MS (MALDI-TOF): 703.9 [M+H]⁺, 725.5 [M+Na]⁺

HR-MS (FAB, m/z): ber. für C₄₀H₄₀N₅O₇ [M+H]⁺ 702.2928, gem. 702.2859

C₄₀H₃₉N₅O₇ (701.78)*C₂HF₃O₂ (114.02)

7.7 Versuche zu Kapitel 4.7

Messung der FTase-Inhibition von Peptidcinnamin-Analoga (FTase-Test 1)

Pro Feld einer 96er-Mikrotiterplatte werden 10 μ l [³H]-FPP-Lösung (3.3 mM, 15-30 Ci mmol⁻¹, New England Nuclear) zu 100 μ l einer wässrigen Lösung von K-Ras (0.27 mg l⁻¹), humaner FTase, variierten Konzentrationen des Inhibitors (gelöst in 10 μ l Methanol/Wasser 1:9 zugegeben) und Puffer [MgCl₂ (8.6 mM), ZnCl₂ (17.1 μ M), DTT (1.32 mg ml⁻¹), Tris/HCl (86 mM, pH = 8.0) pipettiert und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l einer Lösung von konz. HCl in Ethanol (15%) abgebrochen, das ausgefallene Ras-Protein über Filtermatten (Typ B) in einem TomtecTM-Harvester filtriert und die übertragene Radioaktivität mit einem WallacTM 1024 Betaplate Szintillationszähler gemessen. Aus einem Vergleich der gemessenen Radioaktivität mit und ohne Inhibitorzusatz (jeweils nach Subtraktion der Nullrate) lässt sich der Inhibitionsgrad ermitteln

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet: **91/1-91/2, 91/10-91/13, 92/1-92/10, 92/14, 92/19-92/31, 92/32-92/33, 92/35, 92/41-92/47, 140a-b, 171/1.**

Die in Tabelle 9 illustrierten Verbindungen zeigten relevante Aktivität.

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)									
	92/29	92/28	92/35	92/33	92/41	92/43	92/44	92/45	92/31	92/46
30	40	28	7	42	45	32	18	13	16	28
3	81	61	33	77	85	93	73	38	49	65
0.3	79	77	72	82	100	93	100	62	52	86

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)		
	92/9	92/8	171/1
30	32	35	45
10	58	47	47
3	84	65	54
1	97	71	55
0.3	-	-	70

Tabelle 9: Ergebnisse aus FTase-Test 1

Die zugehörigen IC_{50} -Werte wurden durch Extrapolation der Daten erhalten. Siehe hierzu Kapitel 4.7.4 Tabelle 8.

Messung der FTase-Inhibition von Manumycin-Analoga (FTase-Test 2)

Zu 397 μl einer wässrigen Lösung von DansylGCVLS (42.1 μM), gereinigter Hefe-Farnesyltransferase, variierten Konzentrationen des Inhibitors (gelöst in 50 μl Methanol zugegeben), Probenpuffer (50 mM TrisHCl, 5 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 10 μM ZnCl_2) in einer Küvette (Typ Nr.: 115F-OS, Hellma, Schichtdicke 10 mm) werden 3 μl FPP (10 mM, Endkonzentration 75 μM) pipettiert und nach kurzem Umschwenken der Küvette die Fluoreszenzentwicklung bei 30°C für 10 min mit einem LS-50B Fluoreszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer gemessen. Aus einem Vergleich der Anfangssteigungen der Fluoreszenzentwicklung mit und ohne Inhibitorzusatz lässt sich der Inhibitionsgrad ermitteln.

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet: **14**, **177a-c**, **178a-c**

Die in Tabelle 10 illustrierten Verbindungen zeigten relevante Aktivität.

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)		
	177a	177b	14
50	0	8	15
25	2	17	40
5	22	63	89
1.25	42	-	-
0.96	76	-	-

Tabelle 10: Ergebnisse aus FTase-Test 2

Die zugehörigen IC_{50} -Werte wurden durch Extrapolation der Daten erhalten. Siehe hierzu Kapitel 4.7.1.2.1 Tabelle 7.

Messung der FTase-Inhibition von Pepticcinnamin-Analoga (FTase-Test 3)

Pro Feld einer 96er-Mikrotiterplatte wurden 20 μl einer Lösung von Ratten-Farnesyltransferase (2.6 μM im unten angegebenen Puffermedium, Endkonzentration 0.26 μM) über die Dispenserfunktion des Gerätes zu 180 μl einer bei 30°C vorinkubierten Lösung von FPP (10 μM), Dansyl-GCVLS-Peptid (10 μM), variierten Konzentrationen des Inhibitors (gelöst in 20 μl Methanol zugegeben) und Puffer [Tris/HCl (50 mM, pH 7.5), DTE (5 mM), ZnCl_2 (10 μM), MgCl_2 (5 mM), *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (0.2% w,v)] gegeben und anschließend der Kurvenverlauf während 5 min bei 30°C mit einem Fluoroscanscan-FL Fluorometer der Firma Ascent Labsystems (Filter: $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) aufgenommen. Aus einem Vergleich der Anfangssteigungen der Fluoreszenzentwicklung mit und ohne Inhibitorzusatz lässt sich der Inhibitionsgrad ermitteln.

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet: **91/1-91/2, 91/7-91/13, 92/1-92/10, 92/12, 92/14, 92/16-92/18, 19-92/31, 92/32-92/33, 92/35, 92/41-92/47, 137a-b, 140a-b, 171/1-171/2.**

Die in Tabelle 11 illustrierten Verbindungen zeigten relevante Aktivität.

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)									
	92/12	92/6	92/9	92/8	92/5	92/25	92/29	92/28	92/35	92/33
50	14	36	20	12	29	35	30	13	27	22
25	23	43	41	20	34	55	38	19	31	33
10	49	61	56	37	50	62	57	42	48	57
5	61	79	75	52	63	83	72	59	58	67
2,5	78	91	83	71	80	88	81	75	74	80
0,5	94	100	96	94	92	97	96	90	89	97

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)									
	92/32	92/41	92/43	92/47	92/42	92/44	92/31	92/46	92/39	91/9
50	16	33	27	12	22	23	51	27	29	31
25	26	39	35	16	35	35	72	50	55	50
10	46	56	44	40	58	58	85	67	75	79
5	59	74	63	52	68	83	92	85	88	90
2,5	69	89	76	76	79	91	67	88	97	98
0,5	77	100	94	83	90	100	91	100	100	100

Inhibitor-Konzentr. [μM]	Enzymaktivität (%)									
	91/7	91/12	92/7	92/34	92/36	92/40	92/39	92/37	171/2	92/38
50	44	46	52	24	46	42	29	59	54	47
25	59	59	64	35	47	63	55	57	73	56
10	77	79	81	50	56	79	75	68	89	64
5	85	84	86	66	79	87	88	86	97	80
2,5	90	95	89	75	91	100	97	93	100	89
0,5	94	100	95	93	100	100	100	97	100	95

Tabelle 11: Ergebnisse aus FTase-Test 3

Die zugehörigen IC_{50} -Werte wurden durch Extrapolation der Daten erhalten. Siehe hierzu Kapitel 4.7.4 Tabelle 8.

Messung der GGTase I-Inhibition von Pepticcinnamin-Analoga

Man lässt eine wässrige Lösung von GGPP-Analogen (15 μM), GGTase I (5 μM) Inhibitor (100 μM) und Puffer [Hepes (50 mM, pH 7.2), NaCl (50 mM), DTT (5 mM), CHAPS 0.3%, GDP (20 μM), MgCl_2 (3 mM)] für 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, gibt dann 5 μl RhoA (Endkonzentration 5 μM) hinzu und lässt die Prenylierungsreaktion für 15 min bei Raumtemperatur ablaufen. Dann werden 10 μl der Lösung gelektrophoretisch mittels einer SDS-PAGE (15% Polyacrylamid) aufgetrennt. Durch einen visuellen Vergleich der Fluoreszenz der Spots mit und ohne Inhibitorzusatz lässt sich der Inhibitionsgrad abschätzen.

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet:

92/2-92/5, 92/8, 92/12, 92/14, 92/22, 91/1-91/2, 91/9, 91/11-91/12, 92/16, 92/18, 92/26, 92/28-92/29, 92/35, 92/43.

Ein Fluoreszenzaufnahme des Gels ist in Kapitel 4.7.2 abgebildet.

Zur Auswertung siehe Kapitel 4.7.4 Tabelle 8.

Messung der Aktivität gegenüber MDCK-f3-Tumorzellen (MDCK-f3-Test)

Auf einem 8-Fach Objektträger werden MDCK-f3 Zellen in 500 μl Medium mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/ml mit variierten Konzentrationen (10, 20, 50 und 100 μM) der jeweiligen Testsubstanz für 6 h bei 37°C inkubiert (die Verbindungen werden gelöst in 0.5 μl DMSO zugegeben). Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit kaltem Methanol/Aceton (1:1) für 30 min fixiert und permeabilisiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS und Inkubation mit PBS/BSA 2% für 30 min werden sie mit Aktin-spezifischem Antikörper, gekoppelt mit Fluoreszenzmarker TRITC, für 1 h umgesetzt und danach für 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wird für 10 min mit dem Farbstoff DAPI (1:20.000) angefärbt und dann wieder für 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Nach Behandeln mit Moviol erfolgt Analyse mittels einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss, wobei die Fluoreszenzbilder fotografisch festgehalten werden.

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet:

91/1-91/2, 91/11-91/12, 92/1-92/5, 92/8, 92/12-92/14, 92/16-92/18, 92/22, 92/28-92/29, 92/31-92/32, 92/35, 92/42-92/43.

Hierbei zeigten die Substanzen **92/2-92/4, 92/17** und **171/1** einen Effekt. Die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen sind in Kapitel 4.7.3 dargestellt.

Zur Auswertung siehe Kapitel 4.7.4 Tabelle 8.

Messung der Aktivität gegenüber Wild-Typ MDCK-Zellen

In diesem Assay werden Wild-Typ MDCK-Zellen in 500 μ l Medium mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml verwendet. Ansonsten erfolgte die Durchführung analog der Vorschrift für den MDCK-f3-Test.

Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen getestet: **92/17** und **171/1**

Die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen sind in Kapitel 4.7.3 dargestellt.

Zur Auswertung siehe Kapitel 4.7.4 Tabelle 8.

8. Literaturverzeichnis

- [1] G. Eisenbrand, M. Metzler, *Toxikologie für Chemiker*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.
- [2] E. Mutschler, G. Geissler, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2001**.
- [3] H.-G. Neumann in *Pharmakologie und Toxikologie*, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke (Hrsg.), 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [4] T. Küttler, *Pharmakologie und Toxikologie*, 17. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Berlin, **1997**.
- [5] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1-13.
- [6] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3. Auflage, Scientific American Books, New York, **1995**.
- [7] G. Krauss, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [8] T. Jacks, R. A. Weinberg, *Nature* **1996**, 381, 643-644.
- [9] S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *Oncogene* **2000**, 19, 6584-6593.
- [10] H. Steller, *Science* **1995**, 267, 1445-1449.
- [11] A. H. Wyllie, J. F. Kerr, A. R. Currie, *Intern. Rev. Cytol.* **1980**, 68, 251-307.
- [12] C. B. Thompson, *Science* **1995**, 267, 1456-1462.
- [13] J. Y. J. Wang, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, 7, 39-45.
- [14] M. E. M. Noble, J. A. Endicott, N. R. Brown, L. N. Johnson, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 482-487.
- [15] A. C. Phillips, S. Bates, K. M. Ryan, K. Helin, K. H. Vousden, *Genes Dev.* **1997**, 11, 1853-1863.
- [16] T. Miyashita, J. C. Reed, *Cell* **1995**, 80, 293-299.
- [17] J. M. Jurgensmeier, Z. H. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, J. C. Reed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4997-5002.
- [18] T. Rosse, R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen, C. Borner, *Nature* **1998**, 391, 496-499.
- [19] Z. N. Oltvai, C. L. Milliman, S. J. Korsmeyer, *Cell* **1993**, 74, 609-619.
- [20] S. J. Korsmeyer, J. R. Shutter, D. J. Veis, D. E. Merry, Z. N. Oltvai, *Semin. Cancer Biol.* **1993**, 4, 327-332.
- [21] H. Zou, W. J. Henzel, X. S. Liu, A. Lutschg, X. D. Wang, *Cell* **1997**, 90, 405-413.

- [22] P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, X. D. Wang, *Cell* **1997**, *91*, 479-489.
- [23] N. A. Thornberry, Y. Lazebnik, *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.
- [24] P. Villa, S. H. Kaufmann, W. C. Earnshaw, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 388-393.
- [25] C. C. Harris, *Science* **1993**, *262*, 1980-1981.
- [26] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716-780, *Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 688-752.
- [27] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360-4383; *Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 4193-4214.
- [28] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133-139.
- [29] Y. Reiss, J. L. Goldstein, M. C. Seabra, P. J. Casey, M. S. Brown, *Cell* **1990**, *62*, 81-88.
- [30] D. M. Leonard, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2971-1990.
- [31] A. D. Cox, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1333*, F51-F71.
- [32] J. Z. Sun, M. A. Blaskovich, D. Knowles, Y. M. Qian, J. Ohkanda, R. D. Bailey, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4919-4926.
- [33] Y. Reiss, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6403-6408.
- [34] J. F. Moomaw, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17438-17443.
- [35] M. Katayama, M. Kawata, M. Yoshida, H. Hiriochi, Y. Takai, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9786-9794.
- [36] P. J. Casey, M. C. Seabra, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5289-5292.
- [37] H. W. Park, S. R. Boduluri, J. F. Moomaw, P. J. Casey, L. S. Beese, *Science* **1997**, *275*, 1800-1804.
- [38] S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Structure* **2000**, *8*, 209-222.
- [39] K. E. Hightower, C. C. Huang, P. J. Casey, C. A. Fierke, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15555-15562.
- [40] C. C. Huang, K. E. Hightower, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2593-2602.
- [41] E. S. Furfine, J. J. Leban, A. Landavazo, J. F. Moomaw, P. J. Casey, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6857-6862.
- [42] H. Waldmann, M. Thutewohl, *Topics Curr. Chem.* **2001**, *211*, 117-130.
- [43] L. A. Sorbera, R. Fernandez, J. Castaner, *Drugs* **2001**, *26*, 453-461.
- [44] A. Vogt, Y. M. Qian, T. F. McGuire, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *Oncogene* **1996**, *13*, 1991-1999.
- [45] P. F. Lebowitz, D. Sakamuro, G. C. Prendergast, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 708-713.
- [46] W. Du, A. X. Liu, G. C. Prendergast, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4208-4212.
- [47] J. Z. Sun, Y. M. Qian, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *Oncogene* **1998**, *16*, 1467-1473.

- [48] J. L. Mazet, M. Padieu, H. Osman, G. Maume, P. Mailliet, N. Dereu, A. D. Hamilton, F. Lavelle, S. M. Sebti, B. F. Maume, *FEBS Lett.* **1999**, *460*, 235-240.
- [49] E. C. Lerner, Y. M. Qian, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26770-26773.
- [50] P. F. Lebowitz, G. C. Prendergast, *Oncogene* **1998**, *17*, 1439-1447.
- [51] G. C. Prendergast, W. Du, *Drug Resist. Updates* **1999**, *2*, 81-84.
- [52] Z. Chen, J. Z. Sun, A. Pradines, G. Favre, J. Adnane, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17974-17978.
- [53] Y. Reiss, S. J. Stradley, L. M. Gierasch, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 732-736.
- [54] J. L. Goldstein, M. S. Brown, S. J. Stradley, Y. Reiss, L. M. Gierasch, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15575-15578.
- [55] E. C. Lerner, Y. M. Qian, M. A. Blaskovich, R. D. Fossum, A. Vogt, J. Z. Sun, A. D. Cox, C. J. Der, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26802-26806.
- [56] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, T. E. Rawson, T. C. Somers, R. S. McDowell, C. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson, J. C. Marsters, *Science* **1993**, *260*, 1937-1942.
- [57] K. Leftheris, T. Kline, G. D. Vite, Y. H. Cho, R. S. Bhide, D. V. Patel, M. M. Patel, R. J. Schmidt, H. N. Weller, M. L. Andahazy, J. M. Carboni, J. L. GulloBrown, F. Y. F. Lee, C. Ricca, W. C. Rose, N. Yan, M. Barbacid, J. T. Hunt, C. A. Meyers, B. R. Seizinger, R. Zahler, V. Manne, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 224-236.
- [58] T. M. Williams, J. M. Bergman, K. Brashear, M. J. Breslin, C. J. Dinsmore, J. H. Hutchinson, S. C. MacTough, C. A. Stump, D. D. Wei, C. B. Zartman, M. J. Bogusky, J. C. Culberson, C. Buser-Doepner, J. Davide, I. B. Greenberg, K. A. Hamilton, K. S. Koblan, N. E. Kohl, D. M. Liu, R. B. Lobell, S. D. Mosser, T. J. O'Neill, E. Rands, M. D. Schaber, F. Wilson, E. Senderak, S. L. Motzel, J. B. Gibbs, S. L. Graham, D. C. Heimbrook, G. D. Hartman, A. I. Oliff, J. R. Huff, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3779-3784.
- [59] K. S. Koblan, J. C. Culberson, S. J. Desolms, E. A. Giuliani, S. D. Mosser, C. A. Omer, S. M. Pitzenberger, M. J. Bogusky, *Protein Science* **1995**, *4*, 681-688.
- [60] D. W. End, G. Smets, A. V. Todd, T. L. Applegate, C. J. Fuery, P. Angibaud, M. Venet, G. Sanz, H. Poignet, S. Skrzat, A. Devine, W. Wouters, C. Bowden, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 131-137.
- [61] J. Zujewski, I. D. Horak, C. J. Bol, R. Woestenborghs, C. Bowden, D. W. End, V. K. Piotrovsky, J. Chiao, R. T. Belly, A. Todd, W. C. Kopp, D. R. Kohler, C. Chow, M.

- Noone, F. T. Hakim, G. Larkin, R. E. Gress, R. B. Nussenblatt, A. B. Kremer, K. H. Cowan, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 927-941.
- [62] J. T. Hunt, C. Z. Ding, R. Batorsky, M. Bednarz, R. Bhide, Y. Cho, S. Chong, S. Chao, J. Gullo-Brown, P. Guo, S. H. Kim, F. Y. F. Lee, K. Leftheris, A. Miller, T. Mitt, M. Patel, B. A. Penhallow, C. Ricca, W. C. Rose, R. Schmidt, W. A. Slusarchyk, G. Vite, V. Manne, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3587-3595.
- [63] F. G. Njoroge, A. G. Taveras, J. Kelly, S. Remiszewski, A. K. Mallams, R. Wolin, A. Afonso, A. B. Cooper, D. F. Rane, Y. T. Liu, J. Wong, B. Vibulbhan, P. Pinto, J. Deskus, C. S. Alvarez, J. del Rosario, M. Connolly, J. Wang, J. Desai, R. R. Rossman, W. R. Bishop, R. Patton, L. Wang, P. Kirschmeier, M. S. Bryant, A. A. Nomeir, C. C. Lin, M. Liu, A. T. McPhail, R. J. Doll, V. M. Girijavallabhan, A. K. Ganguly, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4890-4902.
- [64] I. M. Bell, *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2000**, *10*, 1813-1831.
- [65] M. Hara, K. Akasaka, S. Akinaga, M. Okabe, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh, F. Tamanoi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2281-2285.
- [66] D. M. Leonard, K. R. Shuler, C. J. Poulter, S. R. Eaton, T. K. Sawyer, J. C. Hodges, T. Z. Su, J. D. Scholten, R. C. Gowan, J. S. Sebolt-Leopold, A. M. Doherty, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 192-200.
- [67] T. Aoyama, T. Satoh, M. Yonemoto, J. Shibata, K. Nonoshita, S. Arai, K. Kawakami, Y. Iwasawa, H. Sano, K. Tanaka, Y. Monden, T. Kodera, H. Arakawa, I. Suzuki-Takahashi, T. Kamei, K. Tomimoto, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 144-147.
- [68] D. J. McNamara, E. Dobrusin, D. M. Leonard, K. R. Shuler, J. S. Kaltenbronn, J. Quin, S. Bur, C. E. Thomas, A. M. Doherty, J. D. Scholten, K. K. Zimmerman, B. S. Gibbs, R. C. Gowan, M. P. Latash, W. R. Leopold, S. A. Przybranowski, J. S. Sebolt-Leopold, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3319-3322.
- [69] R. S. Bhide, D. V. Patel, M. M. Patel, S. P. Robinson, L. W. Hunihan, E. M. Gordon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2107-2112.
- [70] V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. G. Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995**, *10*, 1763-1779.
- [71] M. Schlitzer, M. Bohm, I. Sattler, H. M. Dahse, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1991-2006.
- [72] S. Omura, D. Van der Pyl, J. Inokoshi, Y. Takahashi, H. Takeshima, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 222-228.
- [73] K. Shiomi, H. Yang, J. Inokoshi, D. Van der Pyl, A. Nakagawa, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 229-233.

- [74] K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1298-1301; *Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1236-1239.
- [75] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [76] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812; *Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799-810.
- [77] M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387-396.
- [78] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391; *Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 367-383.
- [79] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [80] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
- [81] P. Frischmann, W. Schäfer, K. Barlos, D. Gatos in *Peptides*, H. L. S. Maia (Hrsg.) ESCOM, Leiden **1995**.
- [82] A. Furka, *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem.*, Prag, **1988**, *5*, 47.
- [83] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Intern. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [84] *Combinatorial Libraries: The Theory and Practice of Combinatorial Chemistry*, R. A. Houghton (Hrsg.) ESCOM, Leiden, **1995**.
- [85] *Combinatorial Chemistry*, G. Jung (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [86] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488; *Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2289-2337.
- [87] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135-8173.
- [88] D. Tiebes in [85].
- [89] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *35*, 19-46; *Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.
- [90] F. Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [91] Kapitel 1 in [90]
- [92] G. Barany, N. Kneibcordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1987**, *30*, 705-739.
- [93] H. D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [94] Kapitel 13 in [90].
- [95] M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis* **1981**, 333-356.
- [96] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460-2465.
- [97] B. Henkel, L. S. Zhang, E. Bayer, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 2161-2168.
- [98] N. Thieriet, F. Guibé, F. Albericio, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1815-1817.
- [99] H. Benz, *Synthesis* **1994**, 337-358.
- [100] P. Lloydwilliams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11065-11133.
- [101] F. Albericio, L. A. Carpino, *Meth. Enzym.* **1997**, *289*, 104-126.

- [102] Kapitel 4 in [93].
- [103] D. H. Rich, J. Singh in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.), Academic Press, New York, **1979**.
- [104] E. Wünsch, F. Drees, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 110-119.
- [105] F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforschg.* **1966**, *B 21*, 426-433.
- [106] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [107] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034-2040.
- [108] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [109] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [110] T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 80-88.
- [111] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [112] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [113] K. Akaji, Y. Hayashi, Y. Kiso, N. Kuriyama, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 405-411.
- [114] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *Chem. Comm.* **1994**, 201-203.
- [115] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.
- [116] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
- [117] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- [118] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
- [119] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [120] R. Matsueda, H. Maruyama, E. Kitazawa, H. Takahagi, T. Mukaiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2573-2575.
- [121] S. Bernasconi, A. Comini, A. Corbella, P. Gariboldi, M. Sisti, *Synthesis* **1980**, 385-387.
- [122] T. Shioiri, Yokoyama, Y. Kasai, S. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *32*, 2211-2217.-.
- [123] G. Höfle, W. Steglich, *Synthesis* **1972**, 619-629.
- [124] E. Harthfritschy, D. Cantacuzene, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1997**, *50*, 415-420.
- [125] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [126] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [127] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [128] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.

- [129] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [130] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9333-9336.
- [131] R. B. C. W. H. Pearson, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7669-7672.
- [132] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.
- [133] T. W. Green, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, Wiley, New York, **1981**.
- [134] C. A. Guy, G. B. Fields, *Meth. Enzym.* **1997**, *289*, 67-83.
- [135] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [136] M. F. Gordeev, G. W. Luehr, H. C. Hui, E. M. Gordon, D. V. Patel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15879-15890.
- [137] H. Waldmann, H. Kunz, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1712-1725.
- [138] F. Guibé, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2967-3042.
- [139] K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 227-236.
- [140] J. E. Buss, J. C. Marsters, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 787-791.
- [141] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [142] K. Hinterding, Dissertation, Universität Karlsruhe **1998**.
- [143] W. C. Shieh, J. A. Carlson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 379-381.
- [144] G. M. Ksander, R. D. Ghai, R. Dejesus, C. G. Diefenbacher, A. Yuan, C. Berry, Y. Sakane, A. Trapani, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1689-1700.
- [145] S. T. Cheung, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 906-910.
- [146] D. A. Nugiel, L. A. M. Cornelius, J. W. Corbett, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 201-203.
- [147] G. C. Liu, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7712-7713.
- [148] H. P. Hsieh, Y. T. Wu, S. T. Chen, K. T. Wang, *Chem. Comm.* **1998**, 649-650.
- [149] B. Meseguer, D. Alonso-Díaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3083-3087; *Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2902-2906.
- [150] S. Hanessian, F. Xie, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 733-736.
- [151] C. Cabrele, M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353-4361.
- [152] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, S. Ito, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1639-1642.
- [153] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. W. Zhang, Y. S. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, K. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *41*, 457-461; *Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 442-445.
- [154] A. Johansson, E. Akerblom, K. Ersmark, G. Lindeberg, A. Hallberg, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 496-507.
- [155] J. S. Davies, A. K. Mohammed, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2982-2990.
- [156] S. C. Miller, T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301-2302.
- [157] S. C. Miller, T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690-2690-2691.

- [158] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [159] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307-4312
- [160] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Genz, K. Gewalt, R. Gulch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 19. Aufl., Barth Verlag, Berlin **1993**, S. 477.
- [161] R. P. Dickinson, K. N. Dack, C. J. Long, J. Stelle, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3442-3452.
- [162] G. Dyker, W. Stirner, G. Henkel, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1433-1441.
- [163] N. Miyaoura, H. Suginome, A. Suzuki, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3271-3277.
- [164] S. W. Wright, D. L. Hageman, L. D. McClure, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6095-6097.
- [165] U. Grether, Dissertation, Universität Karlsruhe, **2000**.
- [166] S. S. Wang, B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1286-1290.
- [167] R. Brettle, A. J. Mosedale, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 2185-2195.
- [168] F. D. Lewis, J. E. Elbert, A. L. Uthagrove, P. D. Hale, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5191-5192.
- [169] D. Lewis, J. D. Oxman, L. L. Gibson, H. L. Hampsch, S. L. Quillen, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3005-3015.
- [170] A. Balsamo, P. Crotti, A. Lapucci, B. Macchia, F. Macchia, A. Cuttica, N. Passerini, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 525-532
- [171] D. L. Pompliano, E. Rands, M. D. Schaber, S. D. Mosser, N. J. Anthony, J. B. Gibbs, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800-3807.
- [172] D. L. Pompliano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945-7946.
- [173] O. Block, G. Klein, H. J. Altenbach, D. J. Brauer, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 716-721.
- [174] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1498-1500; *Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1440-1442.
- [175] C. Arenz, Dissertation, Universität Karlsruhe **2001**.
- [176] C. Arenz, M. Thutewohl, O. Block, H. Waldmann, H. J. Altenbach, A. Giannis, *Chembiochem* **2001**, *2*, 141-143.
- [177] H. Bisswanger, *Enzym Kinetik*, 2. Auflage, Weinheim, **1994**.
- [178] J. M. Dolence, P. B. Cassidy, J. R. Mathis, C. D. Poulter, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16687-16694.
- [179] L. Kissau, geplante Dissertation, Universität Dortmund.
- [180] E.-B. Dursina., geplante Dissertation, Universität Bukarest.

- [181] R. Reents, geplante Dissertation, Universität Dortmund.
- [182] I. M. Karaguni, K. H. Glusenkamp, A. Langerak, C. Geisen, V. Ullrich, G. Winde, T. Moroy, O. Müller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 709-713.
- [183] J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Vanroy, W. Birchmeier, *Journal of Cell Biology* **1989**, *108*, 2435-2447.
- [184] K. Reinecke, geplante Dissertation, Universität Dortmund.
- [185] F. P. Coxon, M. H. Helfrich, B. Larijani, M. Muzylak, J. E. Dunford, D. Marshall, A. D. McKinnon, S. A. Nesbitt, M. A. Horton, M. C. Seabra, F. H. Ebetino, M. J. Rogers, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48213-48222.
- [186] D. D. Perrin, W. L. F. Armstrong, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [187] K. J. Jensen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 2119-2130.
- [188] H. Kessler, B. Kutscher, G. Mager, E. Grell, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1541-1550.
- [189] F. Cavelier, R. Jacquier, J. L. Mercadier, J. Verducci, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6173-6186.
- [190] D. L. Boger, D. Yohannes, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 487-499.
- [191] Die Referenzverbindung *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-D-tyrosin wurde durch Pd-katalysierte Deblockierung der Allylschutzgruppe ausgehend von **D-101** dargestellt. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten^[187] überein.
- [192] H. Nakai, M. Konno, S. Kosuge, S. Sakuyama, M. Toda, Y. Arai, T. Obata, N. Katsube, T. Miyamoto, T. Okegawa, A. Kawasaki, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 84-91.
- [193] D. R. Brittelli, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2514-2520.
- [194] R. Fuchs, Bloomfield, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3423-3425.
- [195] D. A. R. Happer, S. M. McKerrow, A. L. Wilkinson, *Austr. J. Chem.* **1977**, *30*, 1715-1725.
- [196] G. N. Dorofeenko, L. V. Mezheritskaya, Y. L. Ryabukhin, *J. Org. Chem. USSR.* **1973**, *9*, 393-398.
- [197] D. T. Connor, W. A. Cetenko, M. D. Mullican, R. J. Sorenson, P. C. Unangst, R. J. Weikert, R. L. Adolphson, J. A. Kennedy, D. O. Thueson, C. D. Wright, M. C. Conroy, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 958-965.
- [198] B. S. Joshi, N. Viswanathan, V. Balakrishnan, D. H. Gawad, K. R. Ravindranath, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1665-1671.
- [199] H. Kigawa, S. Takamuku, S. Toki, N. Kimura, S. Takeda, K. Tsumori, H. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5176-5179.
- [200] D. S. Matteson, P. K. Jesthi, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5608-5609.
- [201] E. Schnabel, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1965**, 238-249.

- [202] E. Fischer, T. Roesner, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1910**, 202-213.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Waldmann gilt mein Dank für die interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem Fonds der chemischen Industrie danke ich für seine finanzielle Unterstützung in Form eines Kekulé-Stipendiums. Besonderer Dank gilt AstraZeneca UK, für die finanzielle und materielle Förderung im Rahmen des Case Award Programms und für die damit verbundene Gelegenheit einen Teil dieser Dissertation in den Labors in Alderley Park zu bearbeiten.

Besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Nowak, AstraZeneca, meinem Betreuer während des Forschungsaufenthalts für sein außergewöhnliches Engagement, meine Arbeit zu unterstützen.

Weiterhin möchte ich meinen Kooperationspartnern in den zahlreichen gemeinschaftlichen Projekten für die gute Zusammenarbeit danken:

Lars Kissau, Christoph Arenz, Boriana Popkirowa, Michael Bate, Elena-Beatrice Dursina, Ionna-Maria Karaguni, Stefanie Vollmer, Patricia Hagenbuch, Kerstin Reinecke, Richard Smith und Veit Wascholowski.

Mein Dank gilt darüberhinaus allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Tipps und Ideen, die diese Arbeit vorangetrieben haben.

Für die Durchsicht des Manuskripts gilt mein besonderer Dank Lars Kissau, Björn Ludolph, Michael Scheck, Martin Völkert, Markus Koch, Eleni Gourzoulidou, Lars Wittenberg, Olaf Köhler, Michael Manger und Jantje Gerdes.

Heike Rimpel danke ich für die engagierte Mitarbeit.

Den analytischen Abteilungen der Universitäten Karlsruhe und Dortmund, sowie dem Max-Planck-Institut möchte ich mich für die Durchführung der Analysen bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Herbert Röttele für seine stete Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern, die mich während der Arbeit fortwährend ermutigt haben und durch deren Unterstützung dieses Studium erst ermöglicht wurde.

Lebenslauf

Name: Michael Thutewohl
Geboren: am 24.12.1972 in Kassel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

08/1979-07/1983 Grundsschule: Louise-Schröder-Schule, Niedenstein
08/1983-07/1989 Gymnasialzweig: Dr. Georg-August-Zinn-Schule, Gudensberg
08/1989-05/1992 Gymnasium: König-Heinrich-Schule, Fritzlar
05/1992 Abitur: Gesamtnote „1.6 ”

Wehrdienst

07/1992-09/1993 Panzeraufklärungsausbildungskompanie 3/2 Hess.-Lichtenau
und Fahrschulgruppe Fuldataal, Fuldataal-Rothwesten

Universitäre Ausbildung

10/1993-09/1998 Chemiestudium an der Georg-August-Universität zu Göttingen
10/1995 Vordiplom: Gesamtnote „sehr gut“
03-05/1996 Forschungsaufenthalt an der Universität Aix-Marseille, Frankreich, in der Gruppe von Prof. Dr. B. Waegell
10/1997-06/1998 Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. A. de Meijere:
„Synthese von 1-Azaspriropentan-2-carbonsäure-Derivaten und deren Einbau in einfache Dipeptide“
07/1998 Diplom: Gesamtnote „sehr gut“

Promotion

11/1998-09/2002 Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe und der Universität Dortmund: „Kombinatorische Festphasensynthese von Analoga des Farnesyltransferase-Inhibitors Peptidinnamin E und deren biologische Evaluierung“

Dortmund, im Juni 2002