

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Parallelsynthese von Bibliotheken
nichtpeptidischer $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten
für den Einsatz
in Tumortherapie und -diagnostik**

Gábor Sulyok

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

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

Die Dissertation wurde am 19.09.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.10.2001 angenommen.

den opfern des terroranschlags

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Januar 1998 bis November 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Prof. Kessler danke ich für die interessante Themenstellung, die mir das Gebiet der medizinischen Chemie näher brachte, sowie für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen war es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, die Schaffung eines exzellenten Arbeitsklimas und die Unterstützung in allen Belangen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Christoph Gibson, Claudia Dahmen, Kirstin Dechantsreiter, Albert Schröder und Brenda Benningshof für das ausgezeichnete Laborklima,
- Dr. Christoph Gibson für die Einführung in das Gebiet der Azapeptide, sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen,
- Uli Hersel für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Christoph Gibson, Martin Kantlehner, Niko Schmiedeberg, Dirk Gottschling, Uli Hersel, Claudia Dahmen und Georgette Thumshirn für die ständige Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch,
- Kirstin Dechantsreiter, Albert Schröder und Mona Wolff, sowie meinen Praktikanten Mario Vierle, Kjerstin Bruus-Jensen, Martin Mayershofer, Lina Lässig und Martin Ortner für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit,
- Dr. Günter Hölzemann, Dr. Matthias Wiesner und Dr. Simon L. Goodman für das Interesse an meiner Arbeit auf dem Gebiet der RGD-Mimetika, sowie allen Mitarbeitern bei Merck KGaA – insbesondere Diane Hahn – für die Durchführung der biologischen Untersuchungen,
- Dr. Rainer Haeßner für die Hilfe bei allen NMR-, Hardware- und Softwarefragen,
- Maria Kranawetter für die gute Zusammenarbeit im HPLC-Bereich, sowie für die Durchführung von HPLC-Analytiken und Trennungen,

- Markus Urzinger und Burghard Cordes für die reibungslose und prompte Aufnahme der ESI-MS-Spektren,
- Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für die Unterstützung im Kampf gegen die Bürokratie,
- allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für das hervorragende Arbeitsklima, sowie die vielen Unternehmungen außerhalb des Arbeitskreises: Kino-, Konzert- und Museumsbesuche, Spieleabende, Squashen und Skifahren (bzw. Snowboarden) und verschiedenste (Geburtstags-)Feiern.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern und Silke Werner für das entgegengebrachte Verständnis und ihre einzigartige Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Integrine und ihre Funktion	4
2.1	Struktur der Integrine	5
2.2	Integrinliganden	8
2.3	Vorkommen und Funktion der $\alpha\nu$ -Integrine	11
2.4	Bedeutung der Integrine $\alpha\nu\beta3$ und $\alpha\nu\beta5$ bei Tumormetastasierung und Angiogenese	12
2.5	Bedeutung der $\alpha\nu\beta3$ - und $\alpha\nu\beta5$ -Integrine im Knochenstoffwechsel	16
2.6	Wirkungsweisen von Integrinantagonisten	17
3	Wirkstoff-Design in der medizinischen Chemie	19
3.1	Leitstrukturoptimierung	19
3.1.1	Leitstruktursuche	19
3.1.2	Optimierung durch Strukturmodifizierung	20
3.1.3	Optimierung durch <i>virtual screening</i>	21
3.1.4	Optimierung mithilfe von Struktur-Wirkungs-Beziehungen	22
3.2	ADME-Parameter	22
3.2.1	Die Lipophilie	23
3.2.2	Pfizer's 'Rule of Five'	24
3.2.3	Metabolisierung von Wirkstoffen	25
3.2.4	Biotransformationen	27
3.2.5	Untersuchung der Metaboliten	29
3.3	Toxizität	29
3.4	Das Prodrug-Konzept	30
3.5	Entwicklung von $\alpha\nu\beta3$ -Integrinantagonisten	32
3.5.1	Die RGD-Sequenz als Leitstruktur für $\alpha IIb\beta3$ -Antagonisten	32
3.5.2	Proteine und Peptide als selektive $\alpha\nu\beta3$ -Antagonisten	32
3.5.3	Entwicklung von Peptidomimetika als $\alpha\nu\beta3$ -Antagonisten	33
3.5.4	Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung	34
3.5.5	Benzodiazepine: Nichtpeptidische $\alpha\nu\beta3$ -Antagonisten mit oraler Bioverfügbarkeit	35
3.5.6	Entwicklung hochselektiver $\alpha\nu$ -Antagonisten	37
4	Synthese der RGD-Mimetika	38
4.1	Grundlagen – Festphasensynthese und Kombinatorik	38
4.1.1	Grundlagen der Festphasensynthese	38
4.1.2	Grundlagen der kombinatorischen Chemie	39

4.2	Konzeption der RGD-Mimetika-Synthese	41
4.2.1	Eine lineare aza-RGD-Sequenz als Leitstruktur	41
4.2.2	Kombinatorische Synthese der RGD-Mimetika	44
4.2.3	Planung der verwendeten Bausteine	45
4.3	Synthese der Säurebausteine A ₁ und A ₂	46
4.3.1	Synthese der Fmoc-geschützten β-Aminosäuren (Baustein A ₁).....	47
4.3.2	Synthese der Glutarsäuren (Säurebaustein A ₂).....	51
4.4	Synthese der geschützten aza-Glycinbausteine B ₁ und B ₂	53
4.5	Kombination der Bausteine A ₂ und B ₂	55
4.6	Spacerbaustein C	57
4.7	Synthese des Basenbausteins D.....	58
4.7.1	Basenbaustein Guanidin	60
4.7.2	Basenbaustein Amidin	60
4.7.3	Basenbaustein Aminopyridin.....	61
4.7.4	Basenbaustein Amino-Dihydroimidazol.....	64
4.7.5	Basenbaustein Aminobenzimidazol.....	64
4.8	Optimierung der Festphasensynthese der RGD-Mimetika	66
4.8.1	Einführung des Säurebausteins A ₂	67
4.8.2	Synthese der festphasengebundenen Bausteine AB	70
4.8.3	Einführung des Spacerbausteins C an fester Phase	71
4.8.4	Untersuchung der Guanylierung an fester Phase.....	72
4.8.5	Untersuchung der Amidinylierung an fester Phase	73
4.8.6	Einführung von Dihydroimidazol an festphasengebundene Amine ..	74
4.8.7	Abspaltung der RGD-Mimetika vom Harz.....	75
4.9	Festphasensynthese der RGD-Mimetika-Bibliotheken	78
4.9.1	Synthese ausgewählter RGD-Mimetika.....	78
4.9.2	Parallelsynthese von RGD-Mimetika-Bibliotheken	79
4.9.3	Probleme bei der Synthese der RGD-Mimetika-Bibliotheken	81
4.10	Synthese der RGD-Mimetika in Lösung.....	82
4.10.1	Synthese von aza-RGD-Mimetika	83
4.10.2	Synthese von azacarba-RGD-Mimetika	84
4.11	Synthese von Prodrugs	86
5	<i>in vitro</i>-Studien von RGD-Mimetika.....	88
5.1	Affinitäts-Studien an isolierten Integrinrezeptoren.....	88
5.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	93
5.3	Toxizitäts-Studien	99
6	<i>in vivo</i>-Studien von RGD-Mimetika.....	101
6.1	Untersuchungen zur Pharmakokinetik	101

6.2	Tumordiagnostik mittels radiomarkierter RGD-Mimetika	105
6.2.1	Überlegungen zur Markierung von RGD-Mimetika	106
6.2.2	Synthese von azacarpa-RGD-Mimetika mit freier OH-Gruppe	108
6.2.3	Radioaktive Markierung und Untersuchungen der Biodistribution	110
6.3	Untersuchung von RGD-Mimetika in der Tumorthherapie	111
6.4	Klinische Studien – Ausblick	113
7	Zusammenfassung	115
8	Experimenteller Teil.....	118
8.1	Allgemeine Arbeitstechniken.....	118
8.2	Synthese der Bausteine.....	121
8.2.1	Synthese der Säurebausteine A ₁	121
8.2.2	Synthese der Säurebausteine A ₂	129
8.2.3	Synthese der aza-Glycinbausteine B.....	134
8.2.4	Synthese der kombinierten Bausteine A ₂ B ₂	135
8.2.5	Synthese der Basenbausteine	144
8.2.6	Synthese der kombinierten Bausteine CD	145
8.3	Festphasensynthese der RGD-Mimetika	149
8.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese	149
8.3.2	Festphasensynthese	153
8.4	Lösungssynthese der RGD-Mimetika	186
8.4.1	Synthese der aza-RGD-Mimetika	186
8.4.2	Synthese der azacarpa-RGD-Mimetika	189
8.5	Prodrug	190
8.6	Etherspaltung.....	191
9	Literatur	192

ABKÜRZUNGEN

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
AcOH	Essigsäure
ADME	A bsorption, D istribution, M etabolismus, E limination
AMP	Adenosinmonophosphat
Aim	A minodihydro i midazol
Ami	A midin
Apy	A minopyridin
Äquiv.	Äquivalent(e)
Ar	Aromat
AS	Aminosäure
AUC	<i>area under curve</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bel.	Belegung
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
br.	breit
BV	orale Bioverfügbarkeit
CL	<i>clearance</i>
Col	Kollagen
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ED ₅₀	effektive Dosis eines Wirkstoffs für 50 % der Versuchstiere
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> '-[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
Ep	Epiligrin
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
HR-FAB-MS	<i>(high resolution) fast atom bombardment mass spectrometry</i>
Fb	Fibrinogen
Fbu	Fibulin
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Fib	Fibrillin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Fn	Fibronectin
GC	Gaschromatographie
Gua	Guanidin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor- <i>isopropanol</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
iC3b	<i>inactivate complement factor 3b</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
In	Invasin
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LD ₅₀	lethale Dosis eines Wirkstoffs für 50 % der Versuchstiere
Ln	Laminin
Log <i>P</i>	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P
m	Multipllett
MAdCAM	<i>mucosal adressing cell adhesion molecule</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
MDO	<i>multidimensional drug optimization</i>
MRT	<i>magnetic resonance tomography</i>
Naph	Naphthalin
n.b.	nicht bestimmt
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Opn	Osteopontin
PEG	Polyethylenglycol
PET	<i>positron emission tomography</i>
PKC	Protein Kinase C
PMMA	Polymethylmethacrylat
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
qn	Quintett
QSAR	<i>quantitative structure activity relationship</i>

R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	<i>structure activity relationship</i>
Smp	Schmelzpunkt
SPECT	<i>single photon emission computer tomography</i>
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMS-Cl	Trimethylsilyl-Chlorid
Tn	Tenascin
Tsp	Thrombospondin
UHTS	<i>ultra high throughput screening</i>
UDP	Uridindiphosphat
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule.</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vn	Vitronectin
vWF	von Willebrand Faktor
WDI	<i>world drug index</i>

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

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die medizinische Chemie beschäftigt sich mit der Entdeckung und dem Design neuer, therapeutisch anwendbarer, chemischer Verbindungen und deren Entwicklung zu Arzneimitteln. Die Entwicklung eines Wirkstoffs mit potentiell therapeutischen Nutzen beginnt mit der Identifizierung einer geeigneten Leitstruktur. Diese Substanz besitzt eine – oftmals schwache – biologische Wirkung und genügt in der Regel nicht den Ansprüchen, die an ein Arzneimittel gestellt werden. Es folgt die schrittweise Optimierung der Leitstruktur durch Synthese ähnlicher Substanzen, wobei die Verbesserung der biologischen Wirkung zunächst im Vordergrund steht.

Im letzten Jahrzehnt konnten die Prozesse der Leitstruktursuche und -optimierung durch enorme Fortschritte bei der Herstellung und Untersuchung einer großen Zahl von Verbindungen verbessert werden. Innerhalb weniger Monate können mithilfe der kombinatorischen Chemie Wirkstoff-Bibliotheken mit bis zu einer Million Substanzen hergestellt und mittels Hochdurchsatz-*screening*-Methoden (HTS: *high throughput screening*) bezüglich ihrer Bindung an ein entsprechendes Zielmolekül (*target*) untersucht werden. Dieses kombinatorische Wirkstoffdesign wird durch rationales Design unterstützt, bei dem versucht wird, die essentiellen Parameter zu erfassen, die für die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung verantwortlich sind. Dabei kann bei Kenntnis der Struktur des biologischen Zielmoleküls mit Hilfe von Computerprogrammen abgeschätzt werden, wie stark die Bindung der untersuchten Verbindung an das *target* ist. Neue Entwicklungen, wie das Vorscreenen großer, per Computer generierter Verbindungsbibliotheken (*in silico-screening*), unterstützen die Wirkstoffentwicklung im Labor.

Neben der Verbesserung der biologischen Wirkung einer Substanz darf die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften, wie Resorption, Verfügbarkeit oder Verweildauer im Organismus nicht außer acht gelassen werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Berücksichtigung der Toxizität einer Substanz oder ihrer Abbauprodukte im Körper.

Bis vor kurzem wurde die Optimierung der Wirkung und die Optimierung der Pharmakokinetik in getrennten, aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Oftmals scheitern Wirkstoffkandidaten jedoch aufgrund schlechter pharmakokinetischer Eigenschaften. Seit einigen Jahren findet ein Umdenken in der Wirkstoff-Forschung statt. Die Integration pharmakokinetischer Prinzipien bereits während der ersten Stufen der Leitstrukturoptimierung führt zu einer effizienteren Wirkstoff-Entwicklung. Dieses Prinzip wird als multidimensionale Wirkstoffoptimierung (MDO: *multidimensional drug optimization*) bezeichnet. Hierunter versteht man die Durchführung verschiedener *in vitro*-Untersuchungen, z.B. hinsichtlich Membrangängigkeit oder Toxizität, während der frühen Phase der Leitstrukturoptimierung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese potentieller Tumorstoffe unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Parameter.

Die Inhibierung von Integrinrezeptoren erlaubt die Beeinflussung verschiedener, pathophysiologischer Prozesse. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die α v-Integrine und insbesondere der α v β 3-Rezeptor, der an adhäsiven Vorgängen während der Migration und Extravasation von Tumorzellen beteiligt ist und eine entscheidende Rolle bei der tumorinduzierten Angiogenese spielt. Ein häufig vorkommendes Integrinbindungsmotiv ist die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD), die als erste Leitstruktur für die Entwicklung von Integrinantagonisten dient (siehe Abbildung 1.1). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch *screening* einer mittels kombinatorischer Chemie (Mischungssynthese) hergestellten RGD-Mimetika-Bibliothek eine peptidomimetische Leitstruktur identifiziert werden. Diese Verbindung dient als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Integrinantagonisten mit verbesserter biologischer Aktivität und Selektivität, sowie optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften.

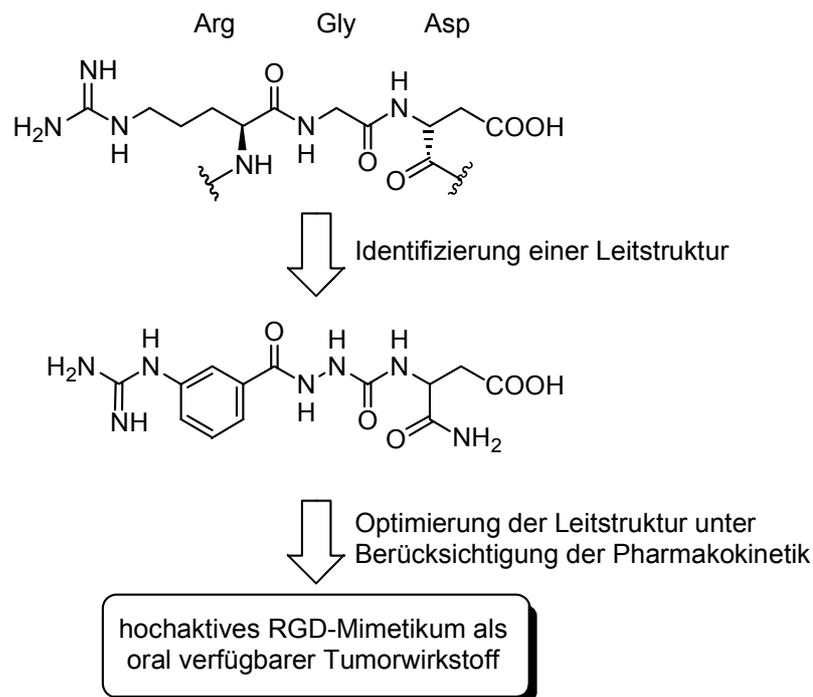


Abbildung 1.1: Entwicklung hochaktiver $\alpha\beta 3$ -Antagonisten durch Leitstruktur-Identifizierung und -Optimierung.

Während zur Identifizierung einer Leitstruktur mittels kombinatorischer Chemie vor allem die Mischungssynthese verwendet wird, dient die Parallelsynthese zur schnellen Optimierung bereits bekannter Leitstrukturen. Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit RGD-Mimetika-Bibliotheken mittels Parallelsynthese hergestellt werden. Dafür wird die Leitstruktur retrosynthetisch in einzelne Bausteine zerlegt, die an einem festen Träger miteinander verknüpft werden sollen. Zunächst müssen die einzelnen Schritte der Festphasensynthese anhand ausgewählter Verbindungen optimiert werden, bevor sie auf die Synthese von Verbindungsbibliotheken angewandt werden können.

Durch Variation verschiedener funktioneller Gruppen der Leitstruktur sollen außerdem Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Bindung an die unterschiedlichen α -Integrine $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ und $\alpha\beta 6$ aufgestellt werden. Die Synthese selektiver Antagonisten für die einzelnen Integrinsubtypen ist insbesondere für biologische Untersuchungen von großem Interesse.

2 INTEGRINE UND IHRE FUNKTION

Adhäsive Kontakte von Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) sind für zahlreiche Zelladhäsions- und Migrationsphänomene verantwortlich. Sie spielen in mehrzelligen Organismen eine entscheidende Rolle für die physiologische Funktion des Gewebes und seiner Entwicklung und sind unter anderem bei der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort von Bedeutung.^[1-3]

Diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Proteine der Zelloberfläche, sogenannte Zelladhäsionsrezeptoren vermittelt, die in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden können: Cadherine, Immunglobulin-Superfamilie, Selectine und Integrine. Dabei bilden die Integrine die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie.^[4,5] Der Name erklärt sich durch ihre Funktion als *integrale* Membrankomplexe bei der Verbindung von Proteinen der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Cytoskelett. Integrine übernehmen neben der Verankerung der Zelle die Aufgabe, Signale in beiden Richtungen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung zu übertragen.^[4,6-11] Durch Bindung eines Integrins an einen Liganden der ECM wird ein Signal in die Zelle übertragen, was zu einer Umorientierung des Cytoskeletts führen kann. Bei der lokalen Anhäufung von Integrinrezeptoren in der Zellmembranebene (*cluster*-Bildung) entstehen Aggregate, die fokale Adhäsionskomplexe genannt werden. Der als *outside-in signaling* bezeichnete Prozess kann das zelluläre Verhalten steuern, wie Veränderung der Zellform, Migration oder verankerungsabhängige Proliferation. Es ist aber auch der umgekehrte Weg der Signaltransduktion vom Zellinneren nach außen möglich (*inside-out signaling*), wobei Faktoren innerhalb der Zelle die Integrine aus einem passiven, schwach adhäsiven in einen aktiven, adhäsiven Zustand umschalten.^[11] Bei der Aktivierung kann eine scherenartige Öffnung der Integrinrezeptoren beobachtet werden.^[12-14] Die Beteiligung der Integrine an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden konnte mittlerweile nachgewiesen werden. So führt die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe beispielsweise zur Aktivierung von Elementen des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signaltransduktionswegs.

Dennoch sind noch viele Details der integrinvermittelten Signalübertragung ungeklärt.^[9,11,15]

2.1 Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind (siehe Abbildung 2.1).^[16] Die Untereinheiten sind nichtkovalent miteinander verknüpft und müssen zunächst *N*-glycosyliert werden, bevor sie im endoplasmatischen Retikulum $\alpha\beta$ -Heterodimere ausbilden können.^[5] Die größere α -Untereinheit besitzt etwa 1100 Aminosäuren und besteht aus zwei meist unterschiedlich langen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der α -Einheit ist durch drei bis vier Bereiche von ca. 12 bis 15 Aminosäuren am *N*-Terminus gekennzeichnet, die divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) binden. Hierbei treten Sequenzanalogien zu den EF-Hand-Strukturen der Calcium-Bindungs-Motive anderer Proteine wie z.B. Calmodulin auf.^[17]

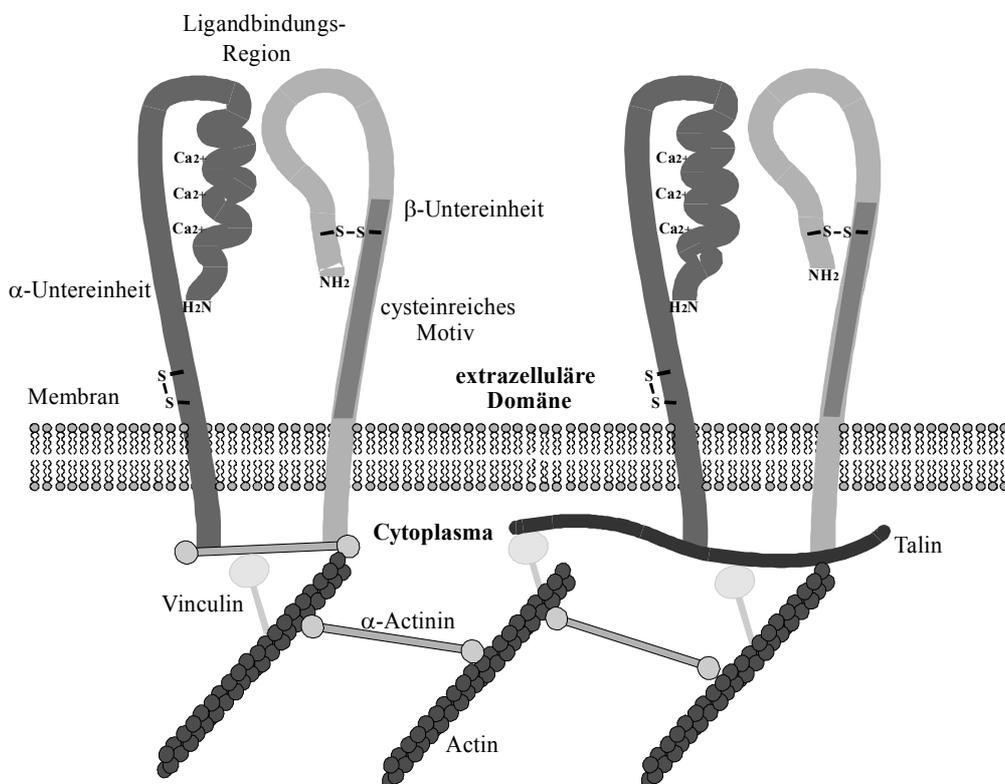


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Integrine und der Wechselwirkung mit Proteinen des Cytoskeletts.

Die β -Untereinheit besteht mit Ausnahme von β_4 (ca. 1750 Aminosäuren)^[18] aus knapp 800 Aminosäuren. Sie enthält vier hoch konservierte, cysteinreiche Domänen von je ca. 40 Aminosäuren in der Nähe der transmembranen Region, sowie einen großen *loop* am *N*-Terminus des extrazellulären Teils. Beide Untereinheiten besitzen eine kurze membranständige Region aus 20 bis 30 Aminosäuren und eine cytoplasmatische Domäne aus 20 bis 50 Aminosäuren, die für die Heterodimerbildung jedoch nicht essentiell sind.^[19-21]

Der *C*-Terminus der β -Untereinheit^[2,22] verbindet über intrazelluläre Proteine wie Talin^[23], Vinculin^[24,25] und α -Actinin^[26] den Rezeptor mit dem Aktinfilament des Cytoskeletts. Damit ermöglichen die Integrine sowohl eine feste Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix als auch die Signalübertragung in das Zellinnere (siehe Abbildung 2.1).

Die *N*-terminalen Regionen aller α -Untereinheiten enthalten sieben hintereinander angeordnete, sich wiederholende Abschnitte, die in Form eines sieben-blättrigen β -Propellers gefaltet sind (siehe Abbildung 2.2).^[27,28] Einige α -Untereinheiten (z.B. in $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_1\beta_1$) enthalten zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt ein zusätzliches, ca. 200 Aminosäuren langes Segment. Dieses Segment wird als I-Domäne (*inserted domain*) bezeichnet (seltener auch als A-Domäne).^[28] Die röntgenkristallographisch untersuchte I-Domäne zeigt eine Tertiärstruktur mit einem β -Faltblatt aus fünf parallelen Strängen und einem antiparallelen Strang, umgeben von sieben α -Helices.^[29-33] Oberhalb der β -Faltblätter befindet sich eine Bindungsstelle für divalente Kationen, die als MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) bezeichnet wird. Das Kation ist von fünf Aminosäureresten des Integrins umgeben, während an die sechste, freie Koordinationsstelle möglicherweise ein Glutaminsäurerest des Liganden koordinieren kann.^[29] Dies bewirkt eine signifikante Änderung der Tertiärstruktur der gesamten I-Domäne.^[33,34] Diese Theorie wird durch weitere Untersuchungen bestätigt, wonach sich die Affinität zu den entsprechenden Liganden durch Zugabe von divalenten Kationen, wie Mn^{2+} , steigern lässt.^[35-39]

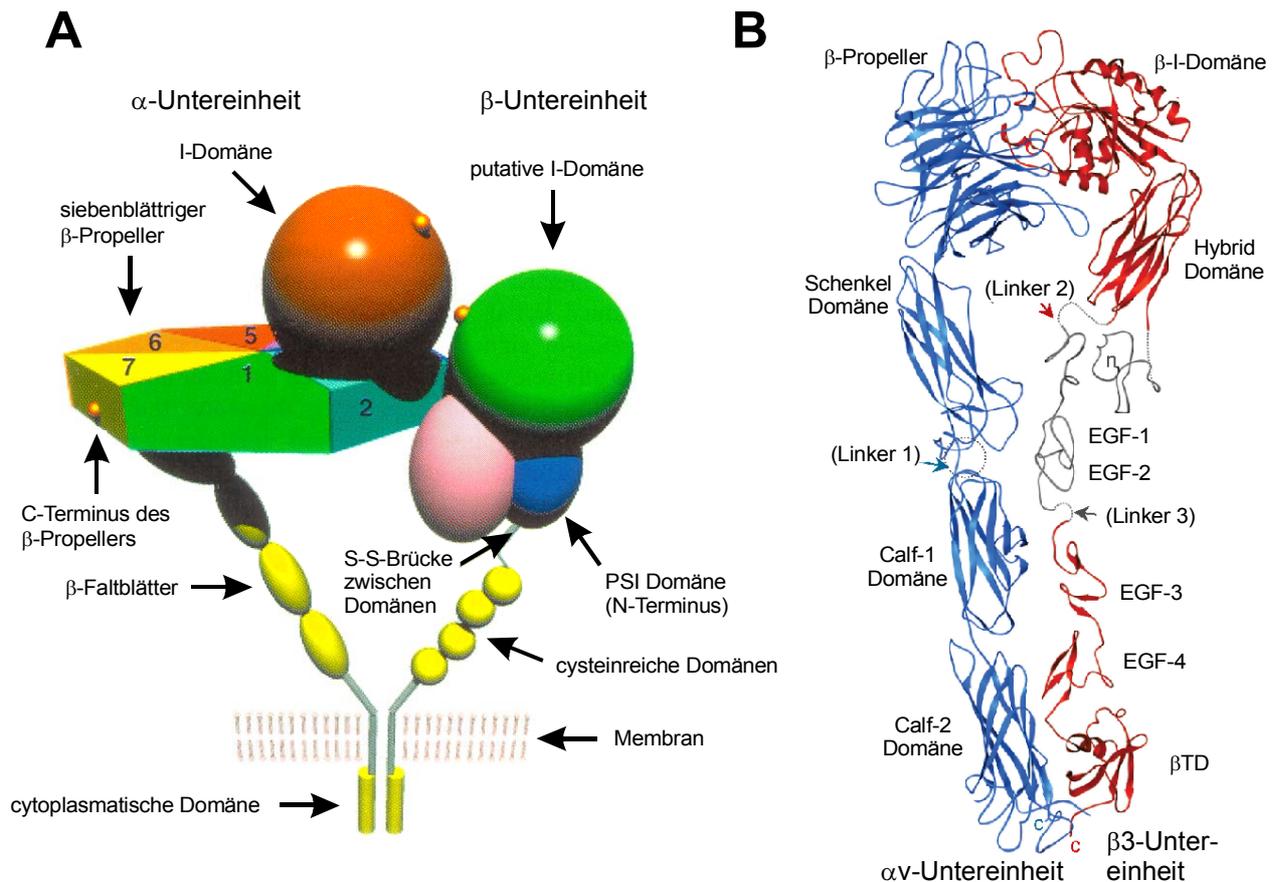


Abbildung 2.2: A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine. Die α -Untereinheit enthält einen sieben-blättrigen β -Propeller und meist eine I-Domäne, die auch für die β -Untereinheit postuliert wird.^[28] B) Korrigierte Röntgenstruktur des extrazellulären Teils von $\alpha v \beta 3$ mit 4 Domänen der α -Untereinheit und 8 Domänen der β -Untereinheit.^[40]

Es gibt jedoch auch Integrine ohne I-Domäne in der α -Untereinheit, die mit hoher Aktivität Liganden binden können, wie z.B die αv -Einheit. Auch bei der β -Untereinheit wurde eine ca. 200 Aminosäuren lange hochkonservierte Region mit einem Metallbindungsmotiv ähnlich der α -Untereinheit gefunden.^[28] Man nimmt deshalb an, dass auch die β -Untereinheit eine strukturell ähnliche, ‚putative‘ I-Domäne besitzt, die bei Integrinen mit fehlender α -I-Domäne deren Funktion übernehmen.^[29,41] Laut experimenteller Daten ist dabei das zweite und dritte Propellerblatt der α -Untereinheit in räumlicher Nähe zur putativen I-Domäne der β -Untereinheit orientiert.^[42] Das

bedeutet, dass Liganden dieser Integrine an die Metallbindungsstellen der β -Untereinheiten binden könnten.

Diesen Monat wurde von Xiong *et al.* die erste Kristallstruktur eines Integrins vorab im Internet veröffentlicht.^[40] Abbildung 2.2 zeigt die korrigierte Röntgenstruktur des $\alpha v\beta 3$ -Integrinrezeptors ohne Transmembran- und cytoplasmatischen Teil. Die unkorrigierte Struktur enthält einen Knick im Bereich der flexiblen Linker 1 und 3 (nicht abgebildet), der durch das Fehlen der Membran erklärt wird. Die Kontaktfläche zwischen dem β -Propeller der αv -Einheit und der I-Domäne der $\beta 3$ -Untereinheit weist eine sehr große Ähnlichkeit zur $G\alpha/G\beta$ -Grenzfläche in G-Proteinen auf. Der ²⁶¹Arginin-Seitenkettenrest einer 3_{10} -Helix des β -Strangs (bei G-Proteinen handelt es sich um einen Lysin-Rest) ragt in einen Hohlraum des Propellers der α -Untereinheit, der vorwiegend aus aromatischen Seitenketten besteht. Dabei kann man direkte Kationen- π -Wechselwirkungen^[43] mit drei Phenylalanin- und zwei Tyrosinresten, sowie weiteren flankierenden aromatischen Seitenketten erkennen. Bei der Ligandenbindung des Integrins nimmt möglicherweise das Arginin der RGD-Sequenz diese Position ein, während die Asparaginsäure in der MIDAS-Region der I-Domäne der β -Untereinheit bindet. Die Lösung der Kristallstruktur könnte zu einem neuen Aufschwung bei der Entwicklung selektiver Integrinantagonisten führen.

2.2 Integrinliganden

Es gibt eine große Anzahl unterschiedlicher Integrine, die sich aus mindestens 17 α - und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen. Durch Assoziation der verschiedenen Untereinheiten ergeben sich 23 bisher bekannte Kombinationen (siehe Tabelle 2.1).^[2,4,44,45] Die größten Integrinfamilien sind die beiden β -Familien $\beta 1$ (11 Integrine) und $\beta 2$ (4 Integrine), sowie die αv -Familie mit 5 Integrinen.

Tabelle 2.1: Darstellung der bekannten Kombinationen aus α - und β -Untereinheit sowie der jeweiligen natürlichen Liganden.^[5,45-47] Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine mit RGD-abhängiger Ligand-Bindung.^[48]

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	Col, Ln							
$\alpha 2$	Col, Ln, Fn							
$\alpha 3$	Col, Ln5, Fn							
$\alpha 4$	Fn, In VCAM-1						MAdCAM-1 VCAM-1, Fn	
$\alpha 5$	Fn							
$\alpha 6$	Ln			Ln, Ep				
$\alpha 7$	Ln							
$\alpha 8$	Fn, Vn, Tn							
$\alpha 9$	Col, Ln, Tn							
$\alpha 10$	Col							
αE							E-Cadherin	
αL		ICAM-1 ICAM-2						
αM		iC3b, Fb Faktor X ICAM-1 ICAM-2						
αX		iC3b, Fb						
αD		ICAM-3 VCAM-1						
αIIb			Fb, Fn, Vn vWF, Tsp					
αv	Vn, Fn, Opn		Vn, Ln, Fn vWF, Tsp Tn, Opn, Fib, Fbu		Vn, Fn Opn, Fb vWF	Fn Fb Tn		Vn

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

Die Integrine können mit verschiedenen Liganden in Wechselwirkung treten, wobei die Bindung über Kontaktstellen in der Nähe des *N*-Terminus stattfindet. An dieser Bindung sind beide Untereinheiten beteiligt.^[1,4,22,49] Bei den Liganden kann es sich um Proteine der ECM, andere Zelloberflächenproteine oder Plasmaproteine handeln. Die Basalmembran besteht zu einem Teil aus extrazellulären Matrixproteinen.^[50] Hier befinden sich Zellstruktur bestimmende Glykoproteine wie Laminin und Fibronectin sowie extrazelluläre Plasmaproteine (Fibrinogen, Thrombospondin, von Willebrand Faktor), die eine Rolle bei der Regulation der Hämostase spielen.^[51] Vitronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein und tritt sowohl im Bindegewebe als auch im Plasma auf. Osteopontin (*bone sialo protein 1*) ist vor allem auf der Knochenoberfläche lokalisiert und ist beim Knochenabbau durch Osteoclasten involviert (siehe Kapitel 2.5).^[51]

Das Bindungsverhalten verschiedener Integrinsubtypen gegenüber den natürlichen Liganden variiert innerhalb der Integrinfamilie sehr stark. So erkennen manche Integrine selektiv ein oder nur wenige Proteine, während andere Subtypen eine weitaus geringere Ligandenspezifität aufweisen, wie vor allem der $\alpha v \beta 3$ -Integrinrezeptor (siehe Tabelle 2.1).

Die Bindungsmotive der Integrinliganden sind sehr verschieden und häufig besitzen Liganden mehrere Bindungssequenzen für unterschiedliche Integrine.^[52] Das ECM-Protein Fibrinogen bindet z.B. über die Peptidsequenz GPRP an $\alpha x \beta 2$ und über die Sequenz RGD an $\alpha IIb \beta 3$. Andere Liganden binden über dieselbe Sequenz, aber mit unterschiedlicher Affinität, an verschiedene Integrine, wie z.B. Vitronectin an $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ und $\alpha IIb \beta 3$ über die RGD-Sequenz. Die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) wird auch als ‚universelles‘ Zellerkennungsmotiv bezeichnet, da sie in einem Großteil der Matrixproteine vorkommt (siehe grau hinterlegte Felder in Tabelle 2.1).^[1,44,48,53] Bemerkenswert ist die häufig beobachtete hohe Bindungsspezifität einzelner Liganden mit gleichem Bindungsmotiv gegenüber bestimmten Integrinsubtypen. Man nimmt an, dass zusätzliche Bindungsregionen einen Beitrag zur Selektivität leisten.^[48] Beispielsweise ist bei der Bindung von Fibrinogen an $\alpha IIb \beta 3$ neben der RGD-Sequenz eine Decapeptidsequenz der γ -Kette von Fibrinogen beteiligt.^[54]

Desweiteren vermutet man, dass konformationelle Unterschiede der Erkennungssequenz für die Integrinspezifität verantwortlich sind. Diese Annahme konnte durch umfassende Untersuchungen mit cyclischen Penta- und Hexapeptiden bestätigt werden.^[55-60] In kleinen cyclischen Peptiden lässt sich die Konformation der RGD-Sequenz fixieren. Während sie in gestreckter Form bevorzugt an $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ bindet, wird durch einen Knick die Bindung an $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ begünstigt. Die RGD-Sequenz erwies sich als ideale Leitstruktur für die Entwicklung niedermolekularer $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ - und $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antagonisten. So besitzen diese sogenannten RGD-Mimetika eine Carbonsäure und ein basisches Pharmakophor, resultierend aus der Carbonsäure und dem basischen Guanidin der RGD-Sequenz (siehe Kapitel 3.5.4).

2.3 Vorkommen und Funktion der αv -Integrine

Im Folgenden werden die unterschiedlichen αv -Integrinsubtypen näher betrachtet, die für diese Arbeit von besonderem Interesse sind. Die αv -Untereinheit wird von nahezu allen Zelltypen exprimiert und kann mit fünf verschiedenen β -Untereinheiten zu den Integrinen $\alpha\text{v}\beta\text{1}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ dimerisieren. Alle αv -Integrine zeigen ein RGD-abhängiges Ligandenbindungsverhalten (siehe Tabelle 2.1).

Der Integrinrezeptor $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ ^[61] ist hauptsächlich auf neuronalem Gewebe lokalisiert, während $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ ^[62] von vielen Zelltypen exprimiert wird. Das $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -Integrin ist vor allem auf Epithelzellen vorhanden und spielt eine Rolle bei der Regulation der Epithelproliferation und der Wundheilung.^[63,64] Darüberhinaus konnten sämtliche αv -Integrine auf verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden.^[47]

Die ähnlichen Integrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ werden von einer größeren Zahl von Zelltypen exprimiert: Endothelzellen (vor allem neoangiogenetische), glatte Muskelzellen, Epithelzellen, Leukozyten und Karzinomzellen.^[47] Darüberhinaus wird $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ von Osteoclasten, von fast allen Zellen mesenchymalen Ursprungs und in geringen Mengen von Blutplättchen exprimiert. Der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor ist im Vergleich zu anderen Integrinen bezüglich seiner Ligandenbindung relativ unspezifisch (siehe Tabelle 2.1), bindet jedoch bevorzugt an Osteopontin.

$\alpha\beta 3$ spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Adhäsions-Prozessen, wie z.B. bei der Knochenresorption,^[65,66] bei der Phagozytose apoptotischer Zellen,^[67] bei akutem Nierenversagen,^[68] bei Arthritis,^[69] Restenose^[70] und bei tumorinduzierter Angiogenese^[71-73]. Darüberhinaus ist $\alpha\beta 3$ an verschiedenen Prozessen während der Tumormetastasierung beteiligt.^[74] In einem Mausmodell konnte weiterhin eine Bedeutung bei der Neovaskularisation in der Netzhaut nachgewiesen werden.^[75]

Die $\beta 5$ -Untereinheit weist eine hohe Homologie zur $\beta 3$ -Untereinheit auf,^[76,77] was sich in großer funktioneller Ähnlichkeit äußert. Beide Integrinsubtypen sind für die Ausbreitung und Migration der Zellen verantwortlich. Allerdings benötigen $\alpha\beta 5$ -abhängige Zellen hierfür eine zusätzliche Aktivierung durch die Proteinkinase C (PKC).^[78] Im Gegensatz zu $\alpha\beta 3$ bindet der $\alpha\beta 5$ -Rezeptor bevorzugt an Vitronectin, obwohl $\alpha\beta 3$ historisch bedingt als Vitronectinrezeptor bezeichnet wird.

Die Integrine, insbesondere $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$, spielen auch bei dem als Apoptose bezeichneten programmierten Zelltod eine entscheidende Rolle.^[79-81] Von vielen Zelltypen ist bekannt, daß sie in die Apoptose übergehen, wenn sie den Kontakt zur ECM verloren haben. Die Apoptose ist somit ein natürlicher Schutzmechanismus des Organismus gegen unkontrolliertes Gewebewachstum. In umfassenden Studien konnte eine Abhängigkeit der Apoptoserate von der Geometrie adhärenter Zellen beobachtet werden.^[82] Bei Zellen, die sich ungehindert ausbreiten konnten und eine dementsprechend flache und ausgedehnte Geometrie besaßen, wurde die Apoptoserate drastisch abgesenkt. Verhinderte man die Ausdehnung, so dass die adhärenter Zellen rund blieben, wurde eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen beobachtet.

2.4 Bedeutung der Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ bei Tumormetastasierung und Angiogenese

Die Tumormetastasierung, die Ausbildung von Sekundärtumoren durch das invasive Verhalten der Zellen des Primärtumors, ist die Hauptursache für den tödlichen Verlauf der meisten Krebserkrankungen.^[83] Für die Migration der Krebszellen müssen unter

anderem eine Reihe von Matrixproteinbarrieren überwunden und die Anlagerung an anderes Gewebe ermöglicht werden.

Daher spielen bei der Tumormetastasierung sowohl proteolytische Prozesse, die vor allem das kollagene Bindegewebe betreffen, als auch unterschiedliche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine große Rolle.

Die einzelnen Schritte der Tumormetastasierung sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Nach Auflösung adhäsiver Zell-Zell-Wechselwirkungen im Primärtumor findet die Invasion abgelöster Tumorzellen in umliegendes Gewebe statt. Die Ablösung wird vermutlich durch eine *down*-Regulierung der Expression spezieller Cadherine eingeleitet. Desweiteren haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Expression von Integrinen, die an der Ausbildung fester Kontakte und der Gewebeorganisation beteiligt sind (z.B. $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$), auf Tumorzellen stark reduziert ist.^[84-88]

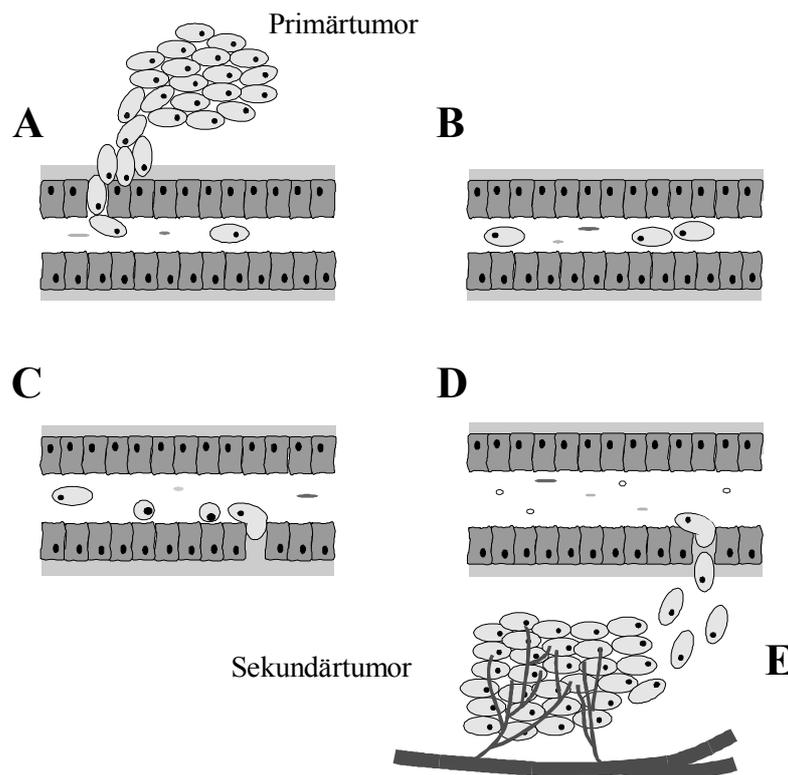


Abbildung 2.3: Schritte der Tumormetastasierung. A) Ablösen der Krebszellen vom Primärtumor und Invasion; B) Wanderung der Tumorzellen im Blut- oder Lymphsystem; C) Adhäsion im Kapillarsystem; D) Extravasation; E) Festsetzen in fremdem Gewebe und tumorinduzierte Angiogenese.

Die Tumorzellen können sich anschließend über die Blutgefäße oder das lymphatische System im ganzen Körper ausbreiten. Sie adhäreren schließlich in den Venen oder dem Kapillarsystem des Zielorgans, durchdringen die Endothelschicht und die enzymatisch aufgelöste Basalmembran und gelangen in das Gewebe (Extravasation). Für diese Prozesse ist wiederum die Expression bestimmter adhäsiver Rezeptoren essentiell, die an der Migration durch das Gewebe beteiligt sind. So wird sowohl der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor^[89-93] als auch der $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Rezeptor^[92,93] bei zahlreichen Tumorarten stark exprimiert. In Untersuchungen mit Melanomzellen konnte eine direkte Abhängigkeit des Metastasepotentials von der Expression des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins beobachtet werden.^[94] Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Migration bestimmter Melanomzellen auf immobilisiertem Vitronectin durch $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, nicht aber durch $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ vermittelt wird.^[95] Bei Melanomzellen, die durch PKC aktiviert sind, liegt dagegen ein $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -abhängiger Mechanismus vor.^[78] Die Inhibierung dieser Integrine könnte die Migration der Tumorzellen einschränken und die Tumormetastasierung unterdrücken.

Die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) spielt nicht nur bei der Entwicklung von Organen, bei der Wundheilung und bei Entzündungen, sondern auch bei der Tumorbildung eine Schlüsselrolle. Für die aggressive Proliferation von Tumorzellen ist eine ausreichende Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff erforderlich, ohne die sie nicht überlebensfähig wären.^[72] Die neu gebildeten Blutgefäße dienen außerdem der Ausbreitung der Tumorzellen zur Bildung von Sekundärtumoren (siehe Abbildung 2.3). Tumoren sind in der Lage die Angiogenese selbst zu stimulieren, wobei man von tumorinduzierter Angiogenese spricht (siehe Abbildung 2.4).^[72,96,97]

Die Angiogenese ist durch Invasion, Migration und Proliferation von Endothelzellen gekennzeichnet. Zur Aktivierung der Endothelzellen der Blutgefäße und zur Regulierung beim Aufbau neuer Kapillaren sind Cytokine und verschiedene Wachstumsfaktoren verantwortlich, wie z.B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor*) und Angiogenin.^[98]

Die stimulierten Endothelzellen bauen die Basalmembran mithilfe von Proteasen ab, so dass Endothelzellen in Richtung des Stimulus in das Stroma eindringen und neue Blutgefäße ausbilden können.^[97] Für die zielgerichtete Wanderung der Endothelzellen während der Gefäßneubildung sind adhäsive Zell-Matrix-Wechselwirkungen entscheidend.^[95,99] Das Ausbleiben dieser Wechselwirkungen induziert bei den an der Angiogenese beteiligten Endothelzellen Apoptose, so dass die Neovaskularisation unterdrückt wird.^[100]

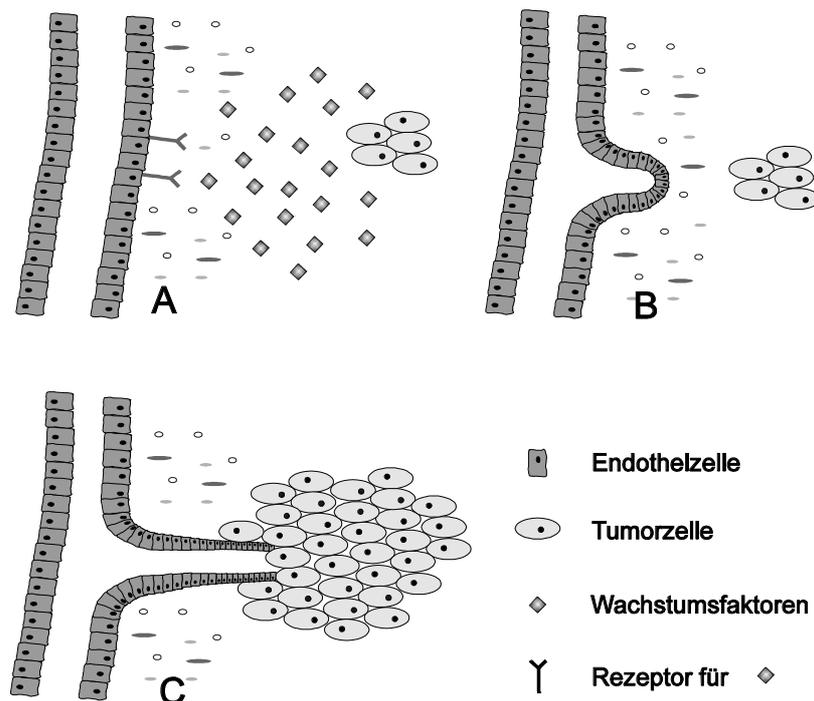


Abbildung 2.4: Tumorinduzierte Angiogenese: A) Die Tumorzelle stimuliert benachbarte Endothelzellen durch Freisetzen von Wachstumsfaktoren (bFGF oder VEGF) zur Proliferation. B) Diese setzen proteolytische Enzyme frei und exprimieren verstärkt die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$. Dadurch wird eine zielgerichtete Invasion der ECM in Richtung der Tumorzellen unter Ausbildung neuer Blutgefäße ermöglicht. C) Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ist für das Tumorwachstum essentiell.

Brooks *et al.* konnten zeigen, daß der $\alpha\beta3$ -Rezeptor auf Zellen der Blutgefäße des Granulationsgewebes stark exprimiert wird, nicht aber auf Zellen der Blutgefäße des normalen Gewebes.^[99]

Für die Expression des $\alpha\beta3$ -Rezeptors sind die Angiogenese-Faktoren bFGF und TNF- α verantwortlich, während die Expression des $\alpha\beta5$ -Rezeptors durch VEGF stimuliert wird.^[101] Die bFGF-induzierte Angiogenese lässt sich durch spezifische $\alpha\beta3$ -Antikörper oder das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Cyclopeptid cyclo-(RGDfV) inhibieren.^[55,58] Bereits existierende Blutgefäße werden jedoch nicht beeinflusst, da sie keine $\alpha\beta3$ -Rezeptoren mehr exprimieren.^[100] Auch die tumorinduzierte Angiogenese kann durch $\alpha\beta3$ -Antagonisten inhibiert werden. Dies konnte in Untersuchungen mit einer Melanomzelllinie (M21-L) gezeigt werden, die selbst keine $\alpha\beta3$ -Rezeptoren besitzt. Auf diese Weise können Wechselwirkungen der Antagonisten mit den Tumorzellen selbst ausgeschlossen werden.

Diese Untersuchungen zeigen, daß sowohl der $\alpha\beta3$ - als auch der $\alpha\beta5$ -Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der durch verschiedene Faktoren induzierten Angiogenese spielen. Obwohl einige besonders aggressive Melanome den physiologischen Angiogeneseprozess umgehen, indem sie selbst aus Melanomzellen Blutgefäße ausbilden,^[102] bleibt die Blockierung der tumorinduzierten Angiogenese durch Inhibierung des $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Rezeptors ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie.

2.5 Bedeutung der $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Integrine im Knochenstoffwechsel

Auch im Knochenstoffwechsel spielen integrinvermittelte Zelladhäsionsvorgänge eine große Rolle. Das Knochenskelett unterliegt einem permanenten Umbau durch knochenaufbauende Osteoblasten und knochenabbauende Osteoclasten. Bei der Osteoporose kommt es zu einer Aktivierung der Osteoclasten, die über das $\alpha\beta3$ -Integrin an extrazelluläre Proteine der Knochenmatrix wie Osteopontin binden.^[103] Nach Adhäsion an die Knochenmatrix degradieren sie mineralische Knochenbestandteile durch Sekretion von Salzsäure, sowie Matrixproteine mithilfe proteolytischer Enzyme. Durch die Osteoclasten-Adhäsion wiederum wird die Proliferation knochenaufbauender Osteoblasten stimuliert. Die Wechselwirkungen von Osteoblasten mit dem Knochengewebe werden neben dem $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptor auch durch andere Integrine, wie z.B. $\alpha\beta5$ vermittelt.^[104]

Somit sollten $\alpha\beta3$ -Antagonisten vor allem die Adhäsion der Osteoclasten verhindern und dadurch die Knochenresorption unterdrücken. Tatsächlich konnte eine Inhibierung der Knochenresorption durch verschiedene *in vitro*^[105,106] und *in vivo* Studien^[107,108] gezeigt werden.

In einem dazu konträren Ansatz werden $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Antagonisten genutzt, um Knochenimplantate in natürliches Knochengewebe zu integrieren. So konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung verschiedener Materialien mit RGD-haltigen Peptiden die Adhäsion von Zellen an die Oberfläche vermitteln kann.^[109-111] In unserem Arbeitskreis wurde zur Beschichtung des gängigen Implantatmaterials Polymethylmethacrylat (PMMA) ein $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -spezifisches cyclisches Peptid entwickelt.^[112-114] Für verschiedene Osteoblastenkulturen, auf denen die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ nachgewiesen wurden, konnte eine Bindung an die mit dem cyclischen Peptid beschichteten PMMA-Oberflächen gezeigt werden.

2.6 Wirkungsweisen von Integrinantagonisten

Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von synthetischen Integrinliganden mit medizinischer Relevanz sind in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. Einerseits können lösliche, niedermolekulare Integrinliganden an Stelle der ECM-Proteine an die Integrinrezeptoren binden. Die Zelle wird daraufhin von der ECM abgelöst und verliert dabei ihre Polarität, d. h. die Integrine verteilen sich über die gesamte Zelloberfläche. Daraufhin wird die Zelle rund und geht in die Apoptose über. Die therapeutische Wirkung von $\alpha\beta3$ -Antagonisten, beispielsweise gegen Krebs (Tumorzellen, neoangiogenetische Endothelzellen) oder Osteoporose (Osteoclasten), beruht auf dieser Wirkung.

Andererseits können immobilisierte $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Antagonisten Zelladhäsion induzieren. Dadurch bewirken sie ein Ausbreiten der Zelle und verleihen ihr eine Polarität, so dass die Zelle überlebt und proliferiert (siehe Abbildung 2.5). In diesem Fall rufen die Integrinliganden die gleiche Wirkung hervor, wie die natürlichen ECM-Proteine.

Für die Medizin ist die Beschichtung von Implantatoberflächen mit zelladhäsiven Molekülen von großem Interesse. Hierdurch wird ein stabiler mechanischer Kontakt zwischen Implantat und angrenzendem Gewebe ermöglicht und die Implantate können schneller und besser in das Gewebe einwachsen.

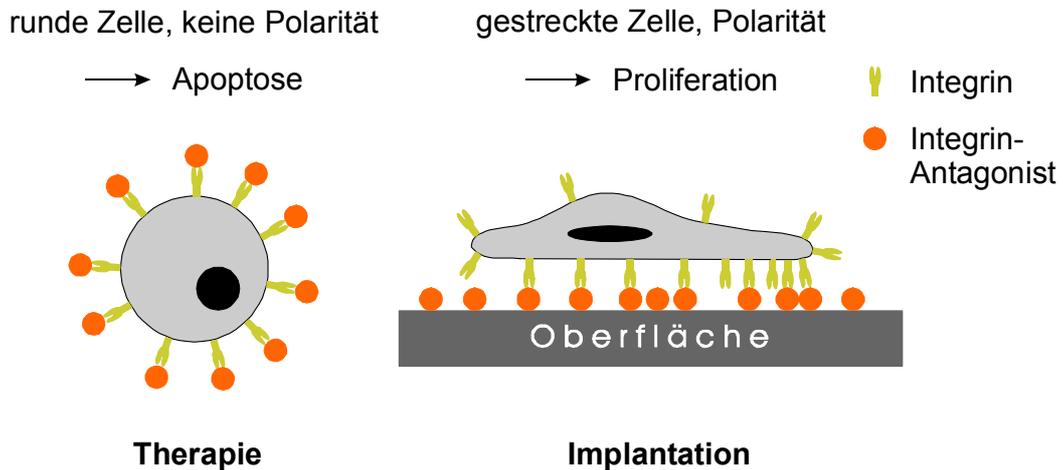


Abbildung 2.5: *Unterschiedliche Wirkungsweise von Integrinliganden: Lösliche Integrinliganden unterbrechen den Kontakt zwischen Zelle und ECM. Die Zelle geht in die Apoptose über (links). Immobilisierte Integrinliganden induzieren Zelladhäsion, die Zelle wird gestreckt und überlebt (rechts).*

3 WIRKSTOFF-DESIGN IN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE

Die medizinische Chemie beschäftigt sich mit der Entdeckung und dem Design neuer, therapeutisch anwendbarer, chemischer Verbindungen und deren Entwicklung zu Arzneimitteln.^[115,116] Dazu werden Substanzen synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Die Aktivität eines Wirkstoffs im Organismus hängt von zwei Prozessen ab: zum einen von der **Pharmakokinetik**, die den Weg des Medikaments von der Eintrittsstelle im Körper zum Wirkort beschreibt (ADME-Parameter; siehe Kapitel 3.2), zum anderen von der **Pharmakodynamik**, die die Wechselwirkungen des Wirkstoffs mit dem spezifischen Zielsystem behandelt.^[117,118]

3.1 Leitstrukturoptimierung

Bei der Entwicklung eines Wirkstoffs für ein bestimmtes biologisches, therapeutisches Zielsystem (*target*) geht man in der Regel von einer Leitstruktur aus. Unter einer Leitstruktur versteht man eine biologisch wirksame Verbindung, die jedoch noch weiter optimiert werden muss. Dieses Kapitel stellt verschiedene Konzepte der Leitstrukturoptimierung vor. Man versucht, durch Strukturmodifizierungen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowohl eine Verbesserung der biologischen Wirkung (Aktivität, Spezifität) *in vitro* und *in vivo*, als auch der pharmakokinetischen Eigenschaften, sowie eine Verminderung der Toxizität zu erreichen.

3.1.1 Leitstruktursuche

Als Leitstrukturen können sowohl natürlich vorkommende Verbindungen (Naturstoffe) als auch synthetisch hergestellte Verbindungen dienen.

Eine Vielzahl von Wirkstoffen werden aus Pflanzen isoliert. Sie bieten eine große strukturelle Vielfalt: z.B. Alkaloide, Terpene, Flavone oder Glykoside. Zwei Naturstoffe mit Makrolidstruktur, die bereits wenige Jahre nach ihrer Isolierung in der Tumorthherapie eingesetzt wurden, sind die Epothilone^[119,120] und Taxol^[121,122]. Diese Naturstoffe dienen außerdem als Leitstrukturen für die Entwicklung verbesserter Wirkstoffe. Neben pflanzlichen werden auch tierische oder aus Mikroorganismen isolierte

Naturstoffe als Leitstrukturen verwendet. Hier müssen vor allem die Antibiotika, wie Penicilline oder Tetracycline, genannt werden. Eine große Zahl neuartiger Leitstrukturen gewinnt man durch Isolierung mariner Naturstoffe aus Meerespflanzen oder Meerestieren.

Für die Suche nach Leitstrukturen gewinnt neben der Naturstoffisolierung das sogenannte *screening* synthetischer Bibliotheken immer stärker an Bedeutung. Dabei wird eine große Anzahl synthetischer Verbindungen mehr oder weniger gezielt auf ihre biologische Aktivität geprüft. Während diese Substanzen früher einzeln synthetisiert wurden, hat sich in den letzten Jahren die kombinatorische Chemie als Methode für die Synthese großer Substanzbibliotheken durchgesetzt (siehe Kapitel 4.1.2).^[123,124] Hierbei werden viele definierte Substanzen gleichzeitig hergestellt.

Ihren Aufschwung verdankt die kombinatorische Chemie unter anderem erheblichen Fortschritten bei der biologischen Prüfung synthetischer Verbindungen. Während man anfang der 90er Jahre ca. 1000 Verbindungen pro Woche auf ihre Aktivität testen konnte, werden heutzutage mittels Hochdurchsatz-Screening-Verfahren (HTS oder UHTS: *ultra high throughput screening*) auf *1536er well plates* bis zu 100 000 Verbindungen innerhalb eines Tages untersucht.^[125,126] Die meisten großen Pharmafirmen haben in den letzten Jahren Substanzbibliotheken aufgebaut, die Hunderttausend bis einige Millionen Verbindungen enthalten.

3.1.2 Optimierung durch Strukturmodifizierung

Nachdem eine erste Leitstruktur gefunden wurde, müssen die für die biologische Aktivität wichtigen Gruppen, die sogenannten Pharmakophore identifiziert werden. Die Pharmakophore dürfen nicht oder nur geringfügig verändert werden, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden. Oftmals erhält man erst während der Optimierung Aufschlüsse über die pharmakophoren Gruppen.

Eine wichtige Methode der Leitstrukturoptimierung ist die Strukturmodifizierung, d. h. die Modifizierung verschiedener funktioneller Gruppen bzw. ihrer räumlichen Anordnung. Hier sollen einige Prinzipien der Strukturmodifizierung dargestellt werden. Durch Einbau oder Entfernung von Methyleneinheiten (**Homologie-Prinzip**) kann

man sowohl die Abstände pharmakophorer Gruppen verändern als auch die Lipophilie der Verbindung erhöhen. Weiterhin kann durch den Einbau **cyclischer Analoga** die Flexibilität der Verbindung gesenkt werden. Diese konformationelle Beschränkung kann zu einer Erhöhung der Aktivität und/oder Spezifität, sowie zur Verbesserung der metabolischen Stabilität führen. Eine dritte, häufig angewandte Strategie ist die **bioisostere Modifikation**. Hierunter versteht man den Austausch einer Gruppe durch eine chemisch oder physikalisch ähnliche mit einem weitgehend gleichen biologischen Wirkspektrum.^[127] Einige Beispiele für bioisostere Modifikationen (nichtklassische Isostere) sind der Ersatz einer Carbonsäure durch ein Sulfonamid, eine Sulfonsäure oder ein Tetrazol, eines Halogens durch eine Trifluormethyl- oder Cyanogruppe, eines Wasserstoff- durch ein Fluoratom oder der Austausch einer Alkyl- durch eine Arylgruppe. Ein weiteres Modifikationsprinzip ist der Einsatz von **Gerüstmimetika** (*scaffolds*) als Templat für pharmakophore Gruppen.^[128] Dabei werden meist cyclische Systeme (z.B. Kohlenhydrate) als Gerüste verwendet, die eine Anknüpfung der pharmakophoren oder anderer funktioneller Gruppen über unterschiedlich lange Linker erlauben. Voraussetzung für eine erfolgreiche Optimierung ist der Erhalt der richtigen räumlichen Orientierung der Pharmakophore.

3.1.3 Optimierung durch *virtual screening*

Die Optimierung der Leitstruktur ist ein sehr aufwändiger und teurer Prozess. Daher verwendet man seit einigen Jahren häufig auch Computermethoden, wie das sogenannte *in silico* oder *virtual screening*.^[129-131] Hierbei werden virtuelle Verbindungsbibliotheken generiert und mithilfe von Computerprogrammen bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum eines Zielproteins untersucht. Für diese Methode muss allerdings die Struktur des Zielproteins bekannt sein. Die besten Verbindungen werden synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Ziel der Leitstrukturoptimierung ist es, in möglichst wenigen, iterativen Schritten zu einem geeigneten Wirkstoff zu kommen. Die im folgenden Kapitel beschriebene Kenntnis von Zusammenhängen zwischen Struktur und Wirkung verschiedener Verbindungen ermöglicht hierbei eine effektivere Entwicklung wirksamer Substanzen.

3.1.4 Optimierung mithilfe von Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Das Aufstellen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR: *structure activity relationships*) ist der Versuch, die Leitstrukturoptimierung auf eine rationale Basis zu stellen. Dabei lassen sich Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Wirkung einerseits, sowie Struktur und pharmakokinetischer Eigenschaften andererseits aufstellen. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge, für die eine Vielzahl ähnlicher Verbindungen untersucht werden müssen, ermöglicht eine zielgerichtetere Optimierung von Wirkstoffen.

Erste Zusammenhänge zwischen strukturell ähnlichen Verbindungen und ihrer biologischen Wirkung wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts beobachtet.^[132,133] Sie bilden die Grundlage für Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Ein interessantes Beispiel sind die in den 30er Jahren durchgeführten SAR-Studien mit über 10000 Verbindungen der antibakteriell wirksamen Sulfonamide.^[134] Dies führte zu einer starken Verbreitung dieser Strukturklasse in der Pharmaforschung. In den sechziger Jahren versuchte man erstmals mit Erfolg, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit physikalisch-chemischen Parametern zu quantifizieren (QSAR).^[117,118] Mithilfe von Computern wurden diese Methoden vor allem in den letzten Jahren weiter verfeinert und immer komplexere QSAR-Modelle entwickelt.^[135-138] Zu den verschiedenen QSAR-Parametern gehören Lipophilie (Hansch-Gleichung), Löslichkeit, elektronische (Hammett-Gleichung) und sterische Effekte (Taft-Gleichung) und Polarisierbarkeit. Der wichtigste dieser Parameter ist die Lipophilie eines Wirkstoffs (siehe Kapitel 3.2.1).

3.2 ADME-Parameter

Die Faktoren, die das pharmakologische Profil eines Wirkstoffs ausmachen, werden unter dem Begriff ADME-Parameter zusammengefasst. Sie beschreiben die Aufnahme einer Substanz (*Absorption*), ihre Verteilung im Körper (*Distribution*), sowie den Abbau insbesondere in der Leber (*Metabolismus*) und die Ausscheidung vor allem über Niere und Darm (*Elimination*).

Man unterscheidet in diesem Zusammenhang die zwei Begriffe Resorption und Bioverfügbarkeit. Während man unter Resorption die gesamte aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommene Wirkstoffmenge versteht, beschreibt die Bioverfügbarkeit den Anteil der aktiven Verbindung, die dem Kreislauf nach oraler Gabe zur Verfügung steht. Für eine optimale Resorption, Bioverfügbarkeit und Wirkdauer eines Arzneistoffs sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Dazu gehören vor allem die Wasserlöslichkeit, die die Aufnahme über das Blut erst ermöglicht, und die Lipophilie einer Substanz, die ihre Membrangängigkeit beschreibt (siehe Kapitel 3.2.1). Ebenfalls wichtig sind die metabolische Stabilität des Wirkstoffs, sowie die Molekülgröße.

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe für orale Applikation ist die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit einer biologisch aktiven Leitsubstanz von großer Bedeutung. Zu oft scheitern neue Wirkstoffkandidaten aufgrund ungenügender Bioverfügbarkeit. In letzter Zeit werden deshalb die ADME-Parameter, sowie die Toxizität, verstärkt bereits frühzeitig im Prozess der Leitstrukturoptimierung miteinbezogen, was man als multidimensionale Wirkstoffoptimierung (MDO: *multidimensional drug optimization*) bezeichnet: z.B. durch CaCo-2-Zellstudien (Absorption), Pfizer's 'Rule of Five' (Absorption/orale Bioverfügbarkeit), *in vitro*-Assays mit Leberenzymen (Metabolismus), Ames-Test (Toxizität).^[125]

3.2.1 Die Lipophilie

Ein Medikament muss auf dem Weg zum Wirkort Membranen durchqueren. Dabei kann es sich z.B. um die Magen-Darm-Wand im Fall der Resorption eines Wirkstoffs oder eine Zellmembran handeln. Die Membrangängigkeit einer Substanz wird durch ihre Lipophilie beschrieben. Als Modell für den Transport eines Wirkstoffs durch eine Membran wurde von Hansch *et al.* die Verteilung der Verbindung zwischen 1-Octanol (ahmt die Lipidmembran nach) und Wasser vorgeschlagen.^[117,118] Den Verteilungskoeffizient P zwischen 1-Octanol und Wasser betrachtete er als geeignetes Mass für die Lipophilie eines Wirkstoffs:

$$\text{Log P} = \log \left(\frac{[\text{Verbindung}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Verbindung}]_{\text{Wasser}} \cdot (1 - \alpha)} \right)$$

α : Dissoziationsgrad der Verbindung in Wasser

Eine Verbindung mit negativem Log P ist demnach in Wasser besser löslich als in 1-Octanol und sie verliert im Extremfall ihre Fähigkeit, Lipidmembranen zu durchqueren. Bei höherer Löslichkeit in der organischen Phase (Octanol) ist der Log P positiv. Wird der Log P einer Verbindung zu groß, verliert sie dementsprechend ihre Löslichkeit in Wasser. Für jedes Membransystem gibt es also einen für die biologische Aktivität optimalen Verteilungskoeffizienten Log P₀, der dem Maximum einer Gauß-Verteilung entspricht. Der Log D-Wert (= Log P bei einem physiologischen pH-Wert von 6.5) oral verabreichter Wirkstoffe, bei denen die Resorption vor allem aus dem Dünndarm stattfindet, sollte in einem Bereich zwischen -2 und 3 liegen.^[138]

Die Beiträge, die einzelne Atome bzw. Atomgruppen zum Verteilungskoeffizienten liefern, verhalten sich additiv. Das bedeutet, dass mehrere Substituenten den gleichen Effekt ausüben wie die Summe der einzelnen Substituenten. Aus diesem Grund ist es möglich, den Log P -Wert einer Verbindung zu berechnen bzw. abzuschätzen und man erhält den sogenannten cLog P-Wert.

3.2.2 Pfizer's ‚Rule of Five‘

Lipinski *et al.* von der Firma Pfizer Inc. untersuchten vor einigen Jahren ca. 2250 oral bioverfügbare Wirkstoffe (Verbindungen aus der WDI-Datenbank, die mindestens die klinische Phase II erreicht haben) auf verschiedene Parameter, die für das Absorptionsverhalten von Bedeutung sind.^[139] Die Eigenschaften, die auf jeweils ca. 90 % der untersuchten, oral bioverfügbaren Wirkstoffe zutrafen, fassten sie in den sogenannten ‚*Rule of Five*‘ zusammen:

- Die Anzahl an Wasserstoff-Donoren ist kleiner **5**.
- Die Anzahl an Wasserstoff-Akzeptoren ist kleiner **10**.
- Das Molekulargewicht ist kleiner als **500** g/mol.
- Der LogP-Wert ist kleiner als **5**.
- Verbindungen, die Substrate für biologische Transportsysteme darstellen, sind ausgenommen.

Auch wenn man diese sogenannten Regeln nicht als absolut ansehen sollte, kann man sie als wichtige Hinweise für das Design von Wirkstoffen in Bezug auf Resorption und Permeabilität verstehen. Es lassen sich anhand der ‚*Rule of Five*‘ jedoch kaum Aussagen über die metabolische Stabilität der Verbindungen ableiten.

3.2.3 Metabolisierung von Wirkstoffen

Normalerweise werden fremde, in den Körper eindringende Moleküle (Xenobiotika) vom Immunsystem durch Antikörperbildung bekämpft. Kleine Fremdmoleküle lösen in der Regel jedoch keine Antikörperreaktion aus, weshalb der Körper zum Schutz vor diesen Umweltgiften einen anderen Mechanismus entwickelt hat. Sie werden durch unspezifische Enzyme in polare Verbindungen umgewandelt und können so anschließend ausgeschieden werden (Metabolismus). Da der Körper nicht zwischen Umweltgift und Medikament unterscheiden kann, werden auch Wirkstoffe durch enzymatische Biotransformationen abgebaut (*Wirkstoffmetabolismus*). Aufgrund der hohen Komplexität des menschlichen Organismus mit einer Vielzahl beteiligter Enzyme sind Vorhersagen zur Wirkstoff-Metabolisierung sehr schwierig. Trotzdem sollten Metabolisierungsprozesse beim Design von Wirkstoffen berücksichtigt werden. Es gibt eine Vielzahl an Untersuchungen, die beschreiben, welche funktionellen Gruppen welchen enzymatischen Biotransformationen unterliegen (siehe Kapitel 3.2.4). Mit diesen Kenntnissen kann man durch Austausch funktioneller Gruppen bestimmte enzymatische Abbauewege vermeiden. So verhindert beispielsweise die Einführung eines Fluoratoms in para-Position eines Phenylrings den Abbau durch oxidative Hydroxylierung. Andererseits ist es wiederum wünschenswert, dass ein Wirkstoff, nachdem er seinen Wirkort erreicht hat und den gewünschten Effekt ausgelöst hat, metabolisiert und eliminiert wird. Aus diesem Grund kann man funktionelle Gruppen als sogenannte Metabolisierungs-Sollbruchstellen einbauen.

Es gibt in Abhängigkeit von der Applikationsform verschiedene Möglichkeiten für die Metabolisierung eines Wirkstoffs. Abbildung 3.1 zeigt den Weg eines Wirkstoffs nach oraler Einnahme, der häufigsten und einfachsten Form der Applikation. Dabei

wird der Wirkstoff, sofern er nicht bereits im Magen metabolisiert wird, über die Dünndarm- bzw. Magenschleimhaut aufgenommen (*Absorption*).

Aus dem Magen-Darm-Trakt wird er über das Blut zuerst zur Leber transportiert, die eine große Zahl unterschiedlicher, meist unspezifischer Enzyme besitzt. Bei diesem ersten Kontakt mit den Leberenzymen werden viele Wirkstoffe bereits metabolisiert (*Metabolismus*), was auch als *first pass*-Effekt bezeichnet wird. Über den Blutkreislauf wird der Wirkstoff und seine Metaboliten anschließend im Körper verteilt (*Distribution*). Bei der Metabolisierung werden die Substanzen in der Regel in polare Metaboliten umgewandelt, die über die Niere (renal) ausgeschieden werden (*Eliminierung*). Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht über 500 g/mol gewinnt die Ausscheidung über die Galle an Bedeutung.

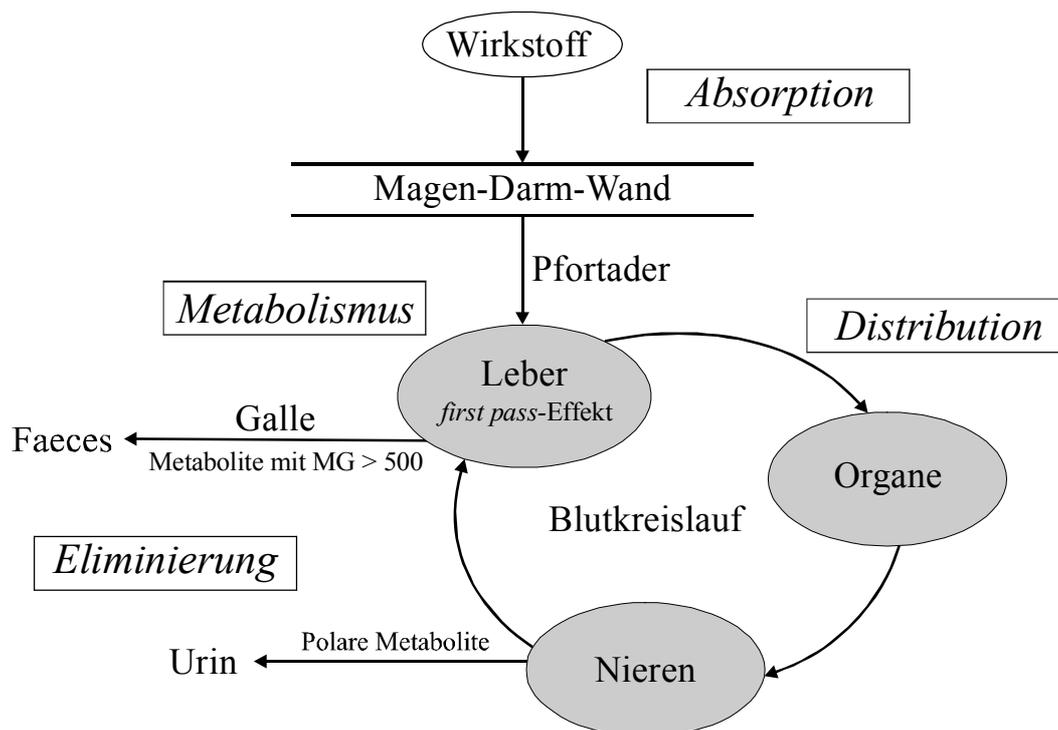


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Metabolisierung eines Wirkstoffs nach oraler Gabe.

3.2.4 Biotransformationen

Die während der Metabolisierung eines Wirkstoffs stattfindenden Prozesse (Biotransformationen) werden in zwei Kategorien unterteilt. Reaktionen, bei denen eine funktionelle Gruppe eingeführt oder freigelegt wird, nennt man *Phase-I-Transformationen*. Dadurch wird in der Regel die Hydrophilie eines Wirkstoffs erhöht und er wird für *Phase-II-Biotransformationen* vorbereitet. Diese zweite Kategorie umfasst die Bildung von polaren Konjugaten, z.B. Glucuroniden oder Schwefelsäureestern, die über die Niere ausgeschieden werden können.

Phase-I-Biotransformationen

Oxidationen sind die häufigsten Prozesse im Wirkstoffmetabolismus und können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören Reaktionen, bei denen ein Sauerstoff in das Molekül eingebaut wird, wie z.B. Hydroxylierungsreaktion, Epoxid- oder Sulfoxidbildung. Die zweite Gruppe der oxidativen Biotransformationen umfasst die Desalkylierungsreaktionen (im Fall primärer Amine spricht man von Desaminierung).

Reduktionen höher oxidierten, funktioneller Gruppen (z.B. Säuren, Ketone, Nitrogruppen) entstehen vor allem Amino- und Hydroxygruppen. Weitere Reaktionen dieser Kategorie sind die reduktive Dehalogenierung und die Reduktion von Nitrogruppen, Azoverbindungen oder Aminoxiden zu (Hydroxyl)-Aminen.

Durch **hydrolytische Reaktionen** von Estern und Amiden während des Wirkstoffmetabolismus entstehen Carbonsäuren, Alkohole und Amine, die anschließend leicht über Phase-II-Konjugation reagieren und ausgeschieden werden können. Obwohl alle Gewebe zur Hydrolyse eines Wirkstoffs beitragen, haben die Leber, der Gastrointestinaltrakt und das Blut die höchste hydrolytische Aktivität.

Diese Tatsache lässt sich beim Einsatz sogenannter Prodrugs ausnützen, wofür vor allem Ester verwendet werden. Dabei wird der eigentliche Wirkstoff im Körper durch enzymatische, hydrolytische Spaltung freigesetzt wird (siehe Kapitel 3.4).

Phase-II-Biotransformationen

Die **Konjugation mit Glucuronsäure** ist die häufigste Form der Konjugatbildung beim Menschen. Dabei findet die Übertragung auf den Wirkstoff durch die an UDP gebundene Coenzymform der Glucuronsäure statt. Glucuronide sind aufgrund der Carboxylat- und Hydroxygruppen sehr gut wasserlöslich und erleichtern die renale Ausscheidung.

Bei der **Sulfatkonjugation** wird eine als AMP-Ester aktivierte Schwefelsäure übertragen. Hauptsubstrate der Sulfotransferasen sind Phenole, sowie seltener auch aliphatische Alkohole und Aniline.

Für die **Konjugation mit Aminosäuren** verwendet der menschliche Organismus vor allem Glycin, seltener auch Glutamin. Die Konjugation mit Glycin findet vor allem bei aromatischen bzw. heterocyclischen Carbonsäuren und Phenyllessigsäurederivaten statt. Der erste bei einem Säugetier isolierte Wirkstoffmetabolit war Hippursäure, ein Konjugat aus Glycin und Benzoesäure.^[140]

Die **Konjugation mit Glutathion** ist eine wichtige Schutzreaktion. Das Tripeptid H- γ -Glu-Cys-Gly-OH wirkt als *scavenger* („Abfänger“) zum Schutz des Organismus, vor der toxischen Reaktion zellulärer Nukleophile (z.B. DNA, Proteine) mit elektrophilen Metaboliten. Hierbei reagiert die stark nukleophile Thiolgruppe von Glutathion (GSH) in S_N2- oder aromatischen S_N-Reaktion (Epoxide, Halogenide), Acylierungen (Anhydride, Sulfonsäureester), Michael-Additionen oder Reduktionen (Disulfide, Radikale).

Bei der **Konjugation mit Acetylgruppen** werden im Gegensatz zu den bisher genannten Konjugationen lipophilere Metaboliten erzeugt. Sie spielt vor allem bei der Metabolisierung von Verbindungen mit Aminogruppe (Amine, Aniline, Aminosäuren, Sulfonamide, Hydrazinverbindungen) eine große Rolle. Die Aufgabe der Acetylierung, wie auch der **Methylierung** besteht vermutlich in einer Deaktivierung des Wirkstoffs.

3.2.5 Untersuchung der Metaboliten

Für die Arzneimittelsicherheit eines potentiellen Wirkstoffs ist die Untersuchung seines Metabolismus von entscheidender Bedeutung. So muss sichergestellt sein, dass sowohl der Wirkstoff selber, als auch seine Metabolisierungsprodukte nicht toxisch und gut verträglich sind. Um für die Untersuchung des Metabolismus, sowie der Metaboliten die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen, wird der Wirkstoff in der Regel radioaktiv markiert. Als Radioisotope für die Markierung des Wirkstoffs für den Tierversuch werden üblicherweise schwache β -Strahler, wie ^3H oder ^{14}C (bevorzugt) eingesetzt. Da die Metabolisierung normalerweise nur unter geringer Fragmentierung des Wirkstoffs verläuft, genügt meist die Einführung eines Radioisotops.

3.3 Toxizität

Die Abschätzung der Toxizität einer Verbindung, sowie ihrer toxischen Metaboliten, ist einer der schwierigsten Aspekte der präklinischen Forschung.

Zunächst wird die Substanz in Mutagenitäts- bzw. Kanzerogenitätsuntersuchungen, wie dem *Ames-Test* überprüft. Bei diesem *in vitro*-Test wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit Rattenleber-Enzymen mit einer Bakterienkultur vermischt, die Histidin nicht produzieren kann und somit absterben würde. Da die Bakterien nur durch Mutationen überleben können, die zur Histidinsynthese führen, lässt sich auf diese Weise die Mutagenitätsrate der Verbindung bestimmen. Diese korreliert in der Regel mit der Karzinogenität. Im Ames-Test erhält man durch den Zusatz von Leberenzymen bereits Hinweise auf die Toxizität der Metabolisierungsprodukte.

In der präklinischen Phase werden weitere Untersuchungen zur akuten und chronischen Toxizität in Tierversuchen durchgeführt. Als Richtwert für die Quantifizierung der akuten Toxizität dient die lethale Dosis (LD_{50}), d. h. die Menge eines Wirkstoffs bezogen auf das Körpergewicht, die bei der Hälfte der Versuchstiere zum Tod führt. Der LD_{50} -Wert lässt jedoch keine Aussage über mögliche, durch mutagene Wirkungen auftretende Langzeitschäden zu. Setzt man den LD_{50} -Wert in Beziehung zum ED_{50} -Wert (effektive Dosis), so erhält man den *therapeutischen Index* als

Maß für das Verhältnis unerwünschter zu wünschenswerten Wirkstoffeffekten. Die Erhöhung des therapeutischen Index ist ein wichtiges Ziel beim Wirkstoffdesign.

Bei allen Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass in verschiedenen Organismen unterschiedliche Metabolisierungsreaktionen ablaufen. Beispielsweise zeigt ein Vergleich der LD₅₀-Werte von Tetrachlordibenzodioxin bei den verwandten Spezies Hamster und Meerschweinchen einen Toxizitätsunterschied um den Faktor 1000. Die Übertragung der Ergebnisse der Tierversuche auf den Menschen ist deshalb immer mit Vorsicht zu betrachten.

3.4 Das Prodrug-Konzept

In der Regel wird ein Wirkstoff durch die bei der Metabolisierung stattfindenden Strukturveränderungen pharmakologisch deaktiviert. Man kann die Biotransformationen jedoch auch benutzen, um den Wirkstoff aus einer biologisch unwirksamen Vorstufe zu aktivieren. Anfang der 50er Jahre wurde durch Albert hierfür der Begriff *Prodrug* eingeführt.^[141,142]

Nach Wermut werden Prodrugs in *carrier*-gebundene und solche, die auf dem Konzept der Biotransformationen beruhen (Vorläufermetabolite), unterteilt. Zu den wichtigsten *carrier*-gebundenen Prodrugs gehört die Gruppe der Carbonsäureester, die durch Hydrolyse gespalten werden. Die *carrier*-Komponente darf über keine biologische Aktivität oder Toxizität verfügen. Zur zweiten Kategorie, den Vorläufermetaboliten, zählt man Verbindungen, die z.B. durch Oxidation oder Reduktion in den eigentlichen Wirkstoff umgewandelt werden.

Eine Prodrug-Strategie wird aus unterschiedlichen Gründen verfolgt. So lässt sich bei einem lipophilen Wirkstoff durch Einführung einer hydrophilen Gruppe, z.B. eines Zuckers, die Wasserlöslichkeit erhöhen. Andererseits kann ein hydrophiler Wirkstoff zur Verbesserung der Resorption unter anderem durch Veresterung in eine unpolare Form überführt werden, wie z.B. bei dem blutdrucksenkenden ACE-Hemmer Enalapril.

Durch die Anwendung des Prodrug-Konzepts kann außerdem die Wirkortspezifität erhöht werden, z.B. wenn ein bestimmtes Enzym ausschließlich am Wirkort vorkommt. Das bedeutet, das Prodrug wird nur am Wirkort aktiviert. Ein interessantes Beispiel hierfür ist ein von Bodor *et al.* entwickeltes Modell zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und anschließender Freisetzung des Wirkstoffs.^[143,144] Dieses Modell wurde auf den krampflösend (antikonvulsiv) wirkenden Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) angewandt, der als Prodrug Progabid verabreicht wird und sich im Gehirn anreichert (siehe Abbildung 3.2). Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Prodrugs ist die Verlangsamung der Wirkstoff-Freisetzung (Retardeffekt) im Körper. Dieser Effekt kann durch den Einsatz langkettiger, aliphatischer Ester erreicht werden, die sehr viel langsamer gespalten werden als kurzkettinge.

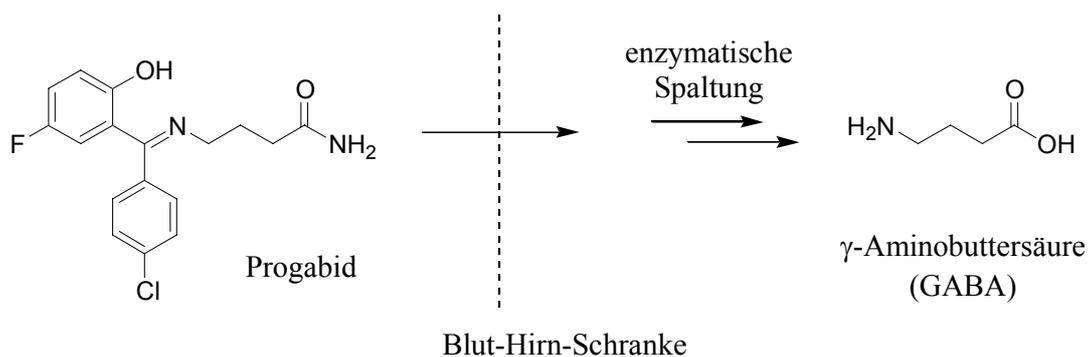


Abbildung 3.2: Nach der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke als lipophiles, neutrales Molekül wird aus Progabid anschließend der Neurotransmitter GABA freigesetzt.

Carbonsäureester stellen aus mehreren Gründen den wichtigsten Prodrug-Typ dar: Esterasen sind überall im Körper vorhanden, d.h. die Regenerierung des Wirkstoffs ist kein Problem. Esterderivate lassen sich mit verschiedenen hydrophilen oder lipophilen Eigenschaften herstellen und es wird durch sie ein großer Stabilitätsbereich abgedeckt. Neben Alkoholen und Carbonsäuren spielen Amine und Carbonylverbindungen eine eher untergeordnete Rolle für das Design von Prodrugs.

3.5 Entwicklung von $\alpha v\beta 3$ -Integrinantagonisten

Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über die Entwicklung selektiver $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten geben, ohne jedoch den Anspruch auf Vollständigkeit zu haben. Eine komplette Darstellung der Entwicklung auf diesem Gebiet würde den Rahmen dieser Arbeit deutlich sprengen.

3.5.1 Die RGD-Sequenz als Leitstruktur für $\alpha IIb\beta 3$ -Antagonisten

Anfänglich dient häufig eine Protein- oder Peptidsequenz eines biologisch interessanten Proteins als Leitstruktur für das Design eines Wirkstoffs. Im Fall der $\beta 3$ -Integrine stellt die, in einer Vielzahl natürlicher Liganden vorkommende RGD-Tripeptidsequenz eine geeignete Leitstruktur dar (siehe Kapitel 2.2). Als erstes Mitglied der Integrinfamilie erlangte der Blutplättchenrezeptor $\alpha IIb\beta 3$ therapeutische Bedeutung, da durch seine Inhibierung die Blutplättchenaggregation unterdrückt werden kann. Inzwischen sind bereits drei $\alpha IIb\beta 3$ -Antagonisten als Infusionslösungen auf dem Markt (Abciximab, Eptifibatid, Tirofiban) und einige oral verfügbare Inhibitoren (Xemilofiban, Orbofiban) befinden sich in der klinischen Prüfung.^[46,145-150] Aufgrund des hohen pharmazeutischen Potentials wurden in den letzten Jahren jedoch große Anstrengungen unternommen, hochaffine und gegenüber $\alpha IIb\beta 3$ hochselektive Antagonisten für den $\alpha v\beta 3$ -Rezeptor zu entwickeln.

3.5.2 Proteine und Peptide als selektive $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten

Die erste selektive Inhibierung des $\alpha v\beta 3$ -Rezeptors gelang 1987 mit dem monoklonalen Antikörper LM609^[151,152], der zur Zeit in klinischen Phase-II-Studien unter dem Namen Vitaxin geprüft wird.^[47,153] Die RGD-Sequenz wurde in unserem Arbeitskreis in cyclische Peptide eingebaut und führte mit dem Cyclopeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (**1**) zu dem ersten synthetischen, $\alpha v\beta 3$ -selektiven Inhibitor, der bereits in zahlreichen Tiermodellen untersucht wurde (siehe Kapitel 2.4).^[55,56,58,60,154]

Systematische Derivatisierung dieser Cyclopeptid-Leitstruktur führte schließlich zu dem *N*-methylierten Cyclopeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-) (**2**), einer hochaffinen und selektiven Verbindung, die die Bindung von Vitronectin an $\alpha v \beta 3$ mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM inhibiert (siehe Tabelle 3.1).^[155,156] Diese Verbindung befindet sich momentan ebenfalls in klinischen Phase-II-Studien als Angiogenese-Inhibitor (EMD 121974, *Merck KGaA*). Darüber hinaus wurde in der Tumorthherapie ein ausgeprägter synergistischer Effekt zwischen Peptid **2** und einem Fusionsprotein, bestehend aus tumorspezifischem Antikörper und Interleukin 2, nachgewiesen.^[157] So konnte an Mäusen gezeigt werden, daß die kombinierte Anwendung von Peptid **2** mit dem Fusionsprotein zu einer verstärkten Rückbildung der Tumoren führte. Dagegen führte die isolierte Applikation dieser Substanzen jeweils nur zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums. Wermuth^[158] und Schmitt^[159] konnten zudem zeigen, daß das Glycin der Cyclopeptide **1** und **2** ohne Aktivitätsverlust gegen aza-Glycin ausgetauscht werden kann (siehe Verbindungen **3** und **4** in Tabelle 3.1). Dieses Ergebnis ist von zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit.

3.5.3 Entwicklung von Peptidomimetika als $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten

Bis Mitte der 90er Jahre wurden vor allem cyclische Peptide als $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten beschrieben.^[160-164] Der Einbau verschiedener β -Turnmimetika in Cyclopeptide führte zu keinen $\alpha v \beta 3$ -selektiven Inhibitoren.^[165-167] Da Peptide ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften besitzen, wurde ab Mitte der 90er Jahre der Schwerpunkt auf die Synthese von peptidähnlichen Verbindungen (Peptidomimetika) bzw. nichtpeptidischen Verbindungen gelegt. Das von der Firma *Searle/Monsanto* entwickelte Peptidomimetikum **5** zeigt *in vitro* bei moderater Selektivität eine sehr gute Affinität zu $\alpha v \beta 3$. Zudem inhibiert diese Verbindung *in vivo* die bFGF-induzierte Angiogenese, sowie auch das Tumorwachstum bei Ratten bzw. Mäusen.^[168,169]

3.5.4 Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung

Inzwischen ist in der Literatur eine enorme Zahl peptidischer und nichtpeptidischer α I**II** β 3- und α v**\beta**3-Integrinantagonisten beschrieben.^[47,170-174] Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen dieser RGD-Mimetika erlauben es, Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung abzuleiten, die für die Synthese weiterer selektiver RGD-Verbindungen von großem Interesse sind.

Es wurden eine saure und eine basische Gruppe als die, für die Bindung an die β 3-Integrine essentiellen Pharmakophore identifiziert. Für eine hohe β 3-Integrinaffinität benötigt man die Carbonsäure einer β -Aminosäure mit geschütztem Amin in α -Position (Urethan/Sulfonamid) oder mit aromatischem Substituent in β -Position. Dagegen ermöglicht die Wahl der basischen Gruppe eine selektivere Bindung an die β 3-Integrine. Für die Bindung an das α I**II** β 3-Integrin werden starke basische Gruppen, wie Amin, Amidin oder Guanidin benötigt ($pK_a > 10$).^[175] Für die Bindung an den α v**\beta**3-Rezeptor muss jedoch ein Guanidin oder Guanidinmimetikum vorhanden sein, wobei die Basizität auch geringer sein kann ($pK_a > 4$).^[173,176] Von großer Bedeutung für die Selektivität zu diesen beiden Integrinrezeptoren ist – neben der Art der Base – der Abstand der Pharmakophore (Säure und Base) voneinander.^[166,177,178] Im Fall von α v**\beta**3 geht man von einer *side-on*-Bindung des Guanidins an den Rezeptor aus (siehe Abbildung 3.3).^[179] Im Gegensatz dazu nimmt man für den α I**II** β 3-Integrinrezeptor eine *end-on*-Bindung des Guanidins an, was somit einer längeren, optimalen Entfernung der pharmakophoren Gruppen entspricht.

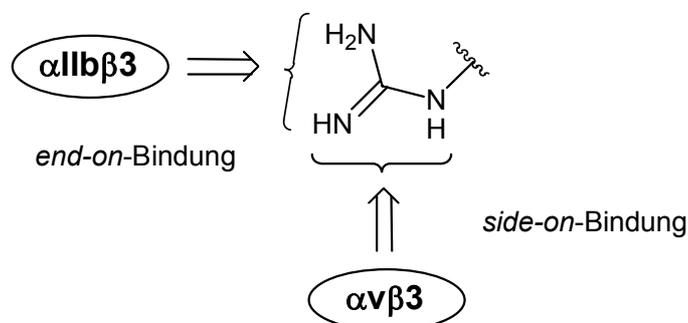


Abbildung 3.3: Angenommener Bindungsmodus der basischen Guanidineinheit eines Antagonisten an die Integrine α v**\beta**3 (*side-on*-Bindung) und α I**II** β 3 (*end-on*-Bindung) nach Peyman et al.^[179]

Für die Verknüpfung der pharmakophoren Gruppen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher, meist cyclischer Grundgerüste (*scaffolds*) verwendet: Harnstoffe^[180], Benzodiazepine^[181-184], Piperazine^[180], Arylether^[185-187], Isoxazoline^[176,188], Indazole^[189,190], Hydantoine^[179], Purine^[191], Tetrahydrofurane^[192], Kohlenhydrate^[193], sowie eine große Zahl anderer, in der Patentliteratur beschriebener *scaffolds*^[170].

Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen führen können, wurden bisher lediglich für α IIb β 3-Rezeptorantagonisten aufgestellt.^[178,194] Die große Anzahl von neuen, in den letzten Jahren beschriebenen α v β 3-Antagonisten wird jedoch wahrscheinlich auch auf diesem Gebiet zu weiteren *QSAR*-Untersuchungen führen.

3.5.5 Benzodiazepine: Nichtpeptidische α v β 3-Antagonisten mit oraler Bioverfügbarkeit

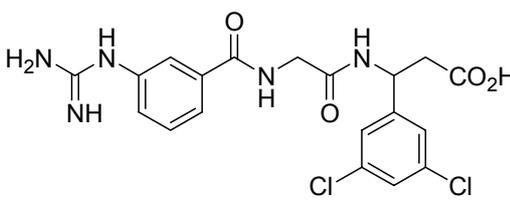
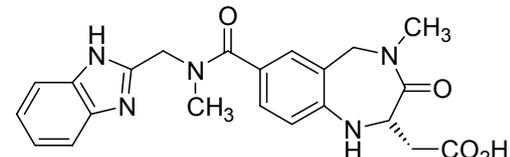
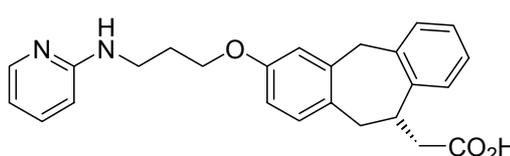
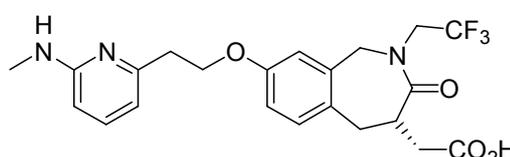
Ein besonders eindrucksvolles Beispiel in der Entwicklung nichtpeptidischer Integrinantagonisten kann die Firma GlaxoSmithKline vorweisen. 1993 berichtete eine Forschergruppe dieser Firma von der Synthese eines 3-Oxo-1,4-benzodiazepins, das eine hohe Affinität und Selektivität zu dem Blutplättchenrezeptor α IIb β 3 aufweist.^[195,196] Dieser α IIb β 3-Antagonist diente derselben Forschergruppe als Leitstruktur bei der Entwicklung einer Reihe von α v β 3-Antagonisten, von denen das 3-Oxo-1,4-benzodiazepin **6** mit einem IC₅₀-Wert von 2 nM für den α v β 3-Rezeptor und einer ca. 10000-fachen Selektivität gegenüber dem α IIb β 3-Integrin die besten Bindungseigenschaften besitzt (siehe Tabelle 3.1).^[181,197]

Zur Reduzierung der Basizität des Guanidins und somit zur Steigerung der Lipophilie wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Guanidinmimetika untersucht, von denen Benzimidazol und verschiedene Aminopyridine am besten geeignet waren.^[182,197,198] Kurze Zeit später gelang es, von dem 3-Oxo-1,4-benzodiazepin **6** Verbindung **7** mit stark reduziertem Heteroatomanteil unter Erhalt der Aktivität und Selektivität abzuleiten.^[183] Diese Verbindung zeigt im Vergleich zu **6** ein deutlich verbessertes pharmakokinetisches Profil: Die Halbwertszeit in der Ratte stieg von 9-16 min auf 181-378 min und die orale Bioverfügbarkeit verbesserte sich von 3-7 % auf etwa 100 %.

Bei der genaueren Untersuchung des Metabolismus von Verbindung **7** erkannte man, dass sie vermutlich einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt.^[173,199] Das bedeutet, die Substanz wird nach Konjugation einer polaren Gruppe (siehe Kapitel 3.2.4) über die Galle ausgeschieden, im Darm wieder gespalten und erneut resorbiert.

Dieses Problem konnte mit dem durch Einführung einer Trifluorethylgruppe ebenfalls sehr lipophilen $\alpha\nu\beta 3$ -Antagonisten **8** umgangen werden, der mit einer oralen Bioverfügbarkeit von 72 % immer noch sehr gute pharmakokinetische Eigenschaften besitzt.^[184] Darüber hinaus ergaben *in vivo*-Studien an Ratten, daß auch Verbindung **8** nach oraler Applikation Knochenresorption und Arthritis verhindern kann.^[108,200,201]

Tabelle 3.1: Übersicht ausgewählter, selektiver $\alpha\nu\beta 3$ -Antagonisten.

Nr.	Struktur	IC ₅₀ [nM]			Ref.
		$\alpha\nu\beta 3$	$\alpha\nu\beta 5$	$\alpha II\beta 3$	
1	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)	2.5	—	1700	[55]
2	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-)	4	70	600	[281]
3	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-Val-)	4	500	6000	[281]
4	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-N(Me)Val-)	10	40	2800	[281]
5		1.1	—	152	[169]
6		2 ^a	—	30000 ^a	[184]
7		4 ^a	1.3 ^a	9000 ^a	[184]
8		1.2 ^a	0.3 ^a	3800 ^a	[184,201]

^a Hierbei handelt es sich nicht um den IC₅₀-Wert, sondern um die Bindungskonstante K_i.

3.5.6 Entwicklung hochselektiver αv -Antagonisten

Obwohl bereits eine Reihe von $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten mit zum Teil guten pharmakokinetischen Eigenschaften gefunden wurden, ist die Entwicklung von aktiven und selektiven Integrinantagonisten nicht abgeschlossen. Die meisten Integrinantagonisten wurden bisher jeweils nur auf Aktivität zu $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$ untersucht. Viele der untersuchten Verbindungen zeigen – wenn überhaupt bekannt – nur geringe Aktivitätsunterschiede zwischen dem $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor (vergleiche Tabelle 3.1). Darüberhinaus sind aber bisher mindestens acht weitere RGD-abhängige Integrine bekannt (siehe Kapitel 2.2), die auch durch die bisher bekannten RGD-Mimetika inhibiert werden könnten. Um möglichen Nebenwirkungen vorzubeugen, sollten die Inhibitoren jedoch möglichst spezifisch nur an einen Rezeptor binden. Vor diesem Hintergrund bleibt die Erschließung möglichst universeller Zugänge zu neuen Integrininhibitoren auch weiterhin eine wichtige Aufgabe der medizinischen Forschung, der sich durch die kürzlich publizierte erste Kristallstruktur eines Integrinrezeptors ($\alpha v\beta 3$) vollkommen neue Möglichkeiten eröffnen.^[40]

4 SYNTHESE DER RGD-MIMETIKA

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Parallelsynthese nichtpeptidischer RGD-Mimetika an fester Phase. Im ersten Abschnitt werden die für diese Arbeit wichtigen Grundlagen zur Festphasensynthese und zur kombinatorischen Chemie beschrieben. In Kapitel 4.2 wird die Konzeption der Synthese, sowie die Auswahl der für die Synthese verwendeten Bausteine vorgestellt. Die weiteren Kapitel beschäftigen sich mit der Synthese der Bausteine und ihrer Verwendung in der parallelen Festphasensynthese. Die Entwicklung der Synthese von RGD-Mimetika in Lösung, sowie die Synthese von Prodrugs wird in den Kapiteln 4.10 und 4.11 beschrieben.

4.1 Grundlagen – Festphasensynthese und Kombinatorik

4.1.1 Grundlagen der Festphasensynthese

Das Konzept der Festphasensynthese wurde Anfang der 60er Jahre von Merrifield zur Herstellung von Peptiden entwickelt.^[202] Etwa zwei Jahrzehnte später wurden die ersten Beispiele der Anwendung organischer Synthesen auf die Festphasenchemie beschrieben.^[203,204] Die Zahl der, auf die Festphasensynthese übertragenen, organischen Reaktionen ist mittlerweile enorm gestiegen.^[205-209]

Bei Festphasensynthesen sind die aufzubauenden Moleküle während der Synthese über einen Linker an einen polymeren Träger gebunden (siehe Abbildung 4.1). Als polymere Träger werden Polystyrolharz und TentaGel-Harz (Polystyrolharz mit zusätzlichem PEG-Linker) eingesetzt.^[210] Die Linker sind inzwischen in großer Vielfalt kommerziell erhältlich, so dass die Bedingungen, unter denen die Produkte vom Harz abgelöst werden können, nahezu beliebig gewählt werden können.^[211] Eine neue Entwicklung stellen die sogenannten *traceless linker* dar.^[212] Die meist verbreitete Definition besagt, dass bei Abspaltung einer Verbindung vom Harz an der Verknüpfungsstelle ein Wasserstoffatom eingeführt wird. Dadurch ist die ursprüngliche funktionelle Gruppe, über die die Verknüpfung mit dem Linker erfolgte, nicht mehr vorhanden (Spurlosigkeit).

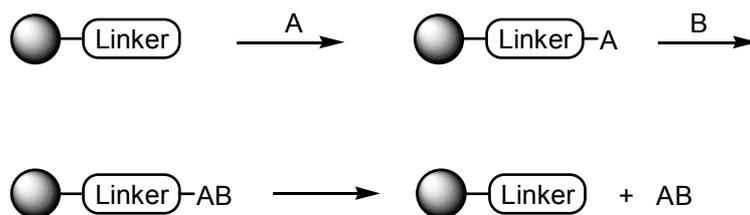


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Festphasensynthese: Zunächst wird an den Linker Baustein **A** gekuppelt. Nach der Umsetzung mit weiteren Bausteinen **B** wird die Verbindung vom Harz abgespalten.

Die Vorteile der Festphasensynthese liegen vor allem in den Möglichkeiten der automatisierten Durchführung mithilfe von Syntheserobotern und in der Verwendung eines großen Reagenzienüberschusses, sowie in der sehr einfach durchführbaren Reinigung nach jedem Kupplungsschritt. Die Festphasensynthese wird heutzutage insbesondere in der kombinatorischen Chemie angewandt.

4.1.2 Grundlagen der kombinatorischen Chemie

Die kombinatorische Synthese hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Teilgebiet der Wirkstoff-Forschung entwickelt.^[123,124,213-217] Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in einer Synthesestufe nicht nur mit einem Baustein, sondern mit vielen verschiedenen Bausteinen erfolgt. Sie kann parallel in getrennten Gefäßen oder simultan in Mischung durchgeführt werden. Es werden in jeder Stufe alle möglichen Kombinationen gebildet, so dass aus nur wenigen Bausteinen eine große Zahl an Produkten, eine sogenannte Verbindungsbibliothek entsteht. Setzt man beispielsweise 10 Verbindungen vom Typ **A** mit 10 Verbindungen vom Typ **B** um, erhält man eine Bibliothek mit 100 Produkten. Dieses Syntheseprinzip kann ohne weiteres auch auf mehrstufige Synthesen ausgeweitet werden.

Diese Technik wurde erstmals in den 80er Jahren von Furka in der Festphasen-Peptidsynthese angewandt.^[218,219] In den letzten Jahren konnte das Potential der kombinatorischen Synthese an fester Phase und in Lösung deutlich gesteigert werden und sie hat sich von der Peptidsynthese auf viele andere Bereiche der Chemie ausgedehnt. So ist die Kombinatorik für die Synthese niedermolekularer Verbindungen in der orga-

nischen Chemie (z.B. Wirkstoff-Forschung)^[220,221], aber auch in der anorganischen Chemie (z.B. Katalysator-Forschung)^[222,223], zu einer unverzichtbaren Methode geworden.

In der kombinatorischen Chemie werden grundsätzlich zwei Synthesekonzepte unterschieden: die Mischungs- und die Parallelsynthese. Bei der **Mischungssynthese** werden in jedem Reaktionsschritt Mischungen von Reaktanden eingesetzt, so dass in einem Reaktionsgefäß gleichzeitig mehrere Produkte entstehen. Ein Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, ohne großen Aufwand eine Vielzahl von Substanzen zu synthetisieren. Aufwändiger gestaltet sich die anschließende Identifizierung der einzelnen Substanzen der Mischung. Die **Parallelsynthese** beschreibt die Herstellung getrennt vorliegender, diskreter Einzelsubstanzen. Dabei wird jede der durch Kombination aller Bausteine hergestellten Verbindungen in einem separaten Reaktionsgefäß synthetisiert. Vorteile dieser Methode sind einfache Isolierung und Identifizierung des Produkts, sowie genaue Zuordnung biologischer Ergebnisse. Während die Mischungssynthese vor allem zur Identifizierung einer Leitstruktur verwendet wird, dient die Parallelsynthese zur schnellen Optimierung bereits bekannter Leitstrukturen.

Eine Variante der Mischungssynthese an fester Phase ist die von Furka eingeführte ‚Split-Methode‘. Dabei wird der feste Träger in m gleiche Teile aufgeteilt und mit je einem Baustein des Typs **A** (A_1 - A_m) umgesetzt.^[219] Nach vollständiger Reaktion werden die Produktharze gemischt, erneut aufgeteilt (in n gleiche Teile) und jeweils mit dem nächsten Baustein des Typs **B** (B_1 - B_n) umgesetzt. Man erhält auf diese Weise alle Kombinationen der Bausteine **A** und **B**, also $m \cdot n$ verschiedene Verbindungen. Die Wiederholung des Reaktionszyclus (Aufteilen, Reaktion, Mischen) ermöglicht den Aufbau großer Substanzbibliotheken in kurzer Zeit. Durch Aufteilung des Harzes können alle Verbindungen trotz eventueller Unterschiede in der Reaktivität der Bausteine in äquimolaren Mengen synthetisiert werden.

Anfang der 90er Jahre erkannten Lam *et al.* einen weiteren Vorteil der Split-Methode. Auf jedem Harzpartikel (*bead*) wird jeweils genau eine Verbindung erzeugt (*one-bead-one-compound*). Dieses Konzept nutzten sie, um eine Verbindungsbiblio-

theke ohne Abspaltung der Substanzen vom festen Träger in einem biologischen Bindungs-Assay zu untersuchen (*on-bead-screening*).^[215,224]

Stark an ein Protein bindende Substanzen wurden durch Standard-Antikörperreaktionen angefärbt. Anschließend wurden intensiv gefärbte Harzpartikel manuell aussortiert und die auf dem jeweiligen *bead* vorhandene Verbindung identifiziert.

4.2 Konzeption der RGD-Mimetika-Synthese

4.2.1 Eine lineare aza-RGD-Sequenz als Leitstruktur

Die lineare Tripeptidsequenz RGD bietet eine ideale Leitstruktur für die Synthese von Integrinantagonisten (siehe Kapitel 2.2). Der Einbau dieser Sequenz in cyclische Peptide führte in unserer Arbeitsgruppe zu großen Erfolgen bei der Entwicklung selektiver Integrininhibitoren.^[55,60,156] Einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Entwicklung nichtpeptidischer RGD-Mimetika erzielte C. Gibson durch die Identifizierung des linearen aza-RGD-Mimetikums **9** (siehe Abbildung 4.2).^[225,226] Mittels kombinatorischer Chemie („Split-Methode“) synthetisierte er nach dem *one-bead-one-compound*-Konzept Bibliotheken auf festem Trägermaterial, die aus bis zu 330 Verbindungen bestanden (siehe Kapitel 4.1.2). Durch *on-bead-screening* dieser Bibliotheken bezüglich ihrer Bindungsstärke an verschiedene Integrinrezeptoren und massenspektrometrische Charakterisierung konnte Verbindung **9** mit relativ hoher Affinität und Spezifität zu $\alpha v \beta 3$ (IC₅₀ 150 nM) als neue, niedermolekulare Leitstruktur identifiziert werden. Diese Leitstruktur weist mit aza-Glycin und *meta*-Guanylbenzoesäure bereits peptidomimetische Elemente auf.

Ein Vergleich mit den hochaffinen Cyclopeptiden **1-4** (siehe Kapitel 3.5.6) zeigte, dass die biologische Aktivität dieser neuen Strukturklasse weiter verbessert werden muss. Im Hinblick auf eine Entwicklung nichtpeptidischer und oral verfügbarer RGD-Mimetika sind ebenfalls Verbesserungen der Pharmakokinetik notwendig, da Verbindung **9** für einen oral zu verabreichenden Wirkstoff viel zu polar ist. Daher soll zunächst die Asparagin-Amid-Gruppe durch einen Phenylring ersetzt werden (siehe Abbildung 4.2).

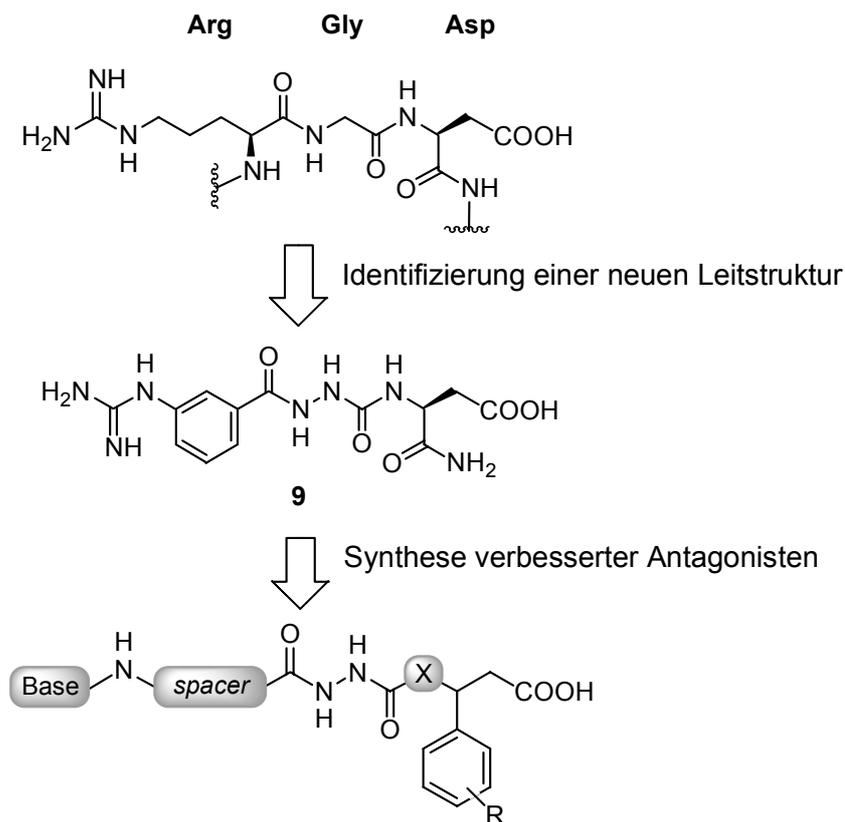


Abbildung 4.2: Ausgehend von der linearen RGD-Sequenz wurde durch kombinatorische Synthese die neue Leitstruktur **9** identifiziert.^[225,226] Durch Variation verschiedener Bausteine soll eine Bibliothek von Integrinantagonisten synthetisiert werden.

Durch die Verwendung von Aromaten anstelle des Amidrestes könnte sowohl eine Steigerung der Integrinaffinität bzw. -selektivität als auch eine Verbesserung der Resorptionseigenschaften erreicht werden. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, den Einfluss des Substitutionsmusters am Phenylring auf die biologische Affinität und Selektivität zu untersuchen. Ähnliche Verbindungen wurden bereits von Forschern der Firma Monsanto/Searle als potente Integrinantagonisten beschrieben.^[168,169]

Wie bereits in Kapitel 3.5.6 erwähnt, sind die Säuregruppe und das Guanidin bzw. ein Guanidinmimetikum als basische Gruppe für die Bindung an den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor essentiell.^[166,177] Wichtig – unter anderem für die Selektivität – ist außerdem der richtige Abstand dieser beiden funktionellen Gruppen, der sich über die Art und Länge des Spacers variieren lässt. Daneben soll der Einbau verschiedener Guanidinmimetika als Basen untersucht werden (siehe Abbildung 4.2).

Die Leitstruktur kann zusätzlich durch die Einführung eines neuen peptidomimetischen Elements variiert werden: der Austausch der NH-Gruppe des Säurebausteins durch eine Methyleneinheit führt zu einer sogenannten **azacarba**-Bindung. Abbildung 4.3 zeigt den Übergang vom Peptid zu einem aza-Peptid.^[227] Bei der von Limal *et al.* als Peptidomimetikum eingeführten carbaza-Bindung ist zusätzlich die Carbonylgruppe durch eine Methylengruppe ersetzt.^[228] Dagegen wird bei der in dieser Arbeit vorgestellten azacarba-Verknüpfung die Aminosäure-NH-Einheit durch eine Methyleneinheit ausgetauscht. Für diese Art der Verknüpfung wurde von Gante später ebenfalls der Begriff carbaza-Bindung verwendet.^[229] Um Unklarheiten zu vermeiden wird im Rahmen dieser Arbeit die hier dargestellte Nomenklatur verwendet, d. h. die vorgestellten Verbindungen werden als aza- (Abbildung 4.2: X = NH) und azacarba-RGD-Mimetika (Abbildung 4.2: X = CH₂) bezeichnet.

Die Kombination der beschriebenen Variationen führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen. In den beiden folgenden Kapitel wird die Konzeption der kombinatorischen Synthese dieser RGD-Mimetika, sowie eine Auswahl der dabei eingesetzten Bausteine vorgestellt.

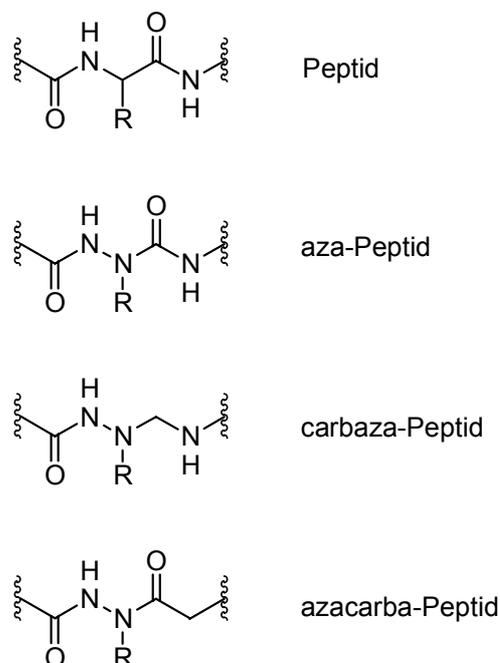


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung verschiedener Peptidbindungs-Mimetika (aza-, carbaza- und azacarba-Peptid).

4.2.2 Kombinatorische Synthese der RGD-Mimetika

Bei der retrosynthetischen Betrachtung der RGD-Mimetika erscheint eine Zerlegung in folgende vier Bausteine sinnvoll (siehe Abbildung 4.4): Säurebaustein **A**, aza-Glycinbaustein **B**, Spacerbaustein **C** und Basenbaustein **D**. Die Variation der Gruppe **X** führt zu den beiden Säurebausteinen **A₁** und **A₂**. Ist **X = NH**, handelt es sich dabei um eine β -Aminosäure (Baustein **A₁**) mit dem entsprechenden aza-Glycin-Baustein **B₁**. Im Fall der azacarba-RGD-Mimetika ist **X = CH₂** und man erhält eine Glutarsäure als Säurebaustein **A₂**. Als entsprechenden Baustein **B₂** erhält man bei dieser Zerlegung Hydrazin.

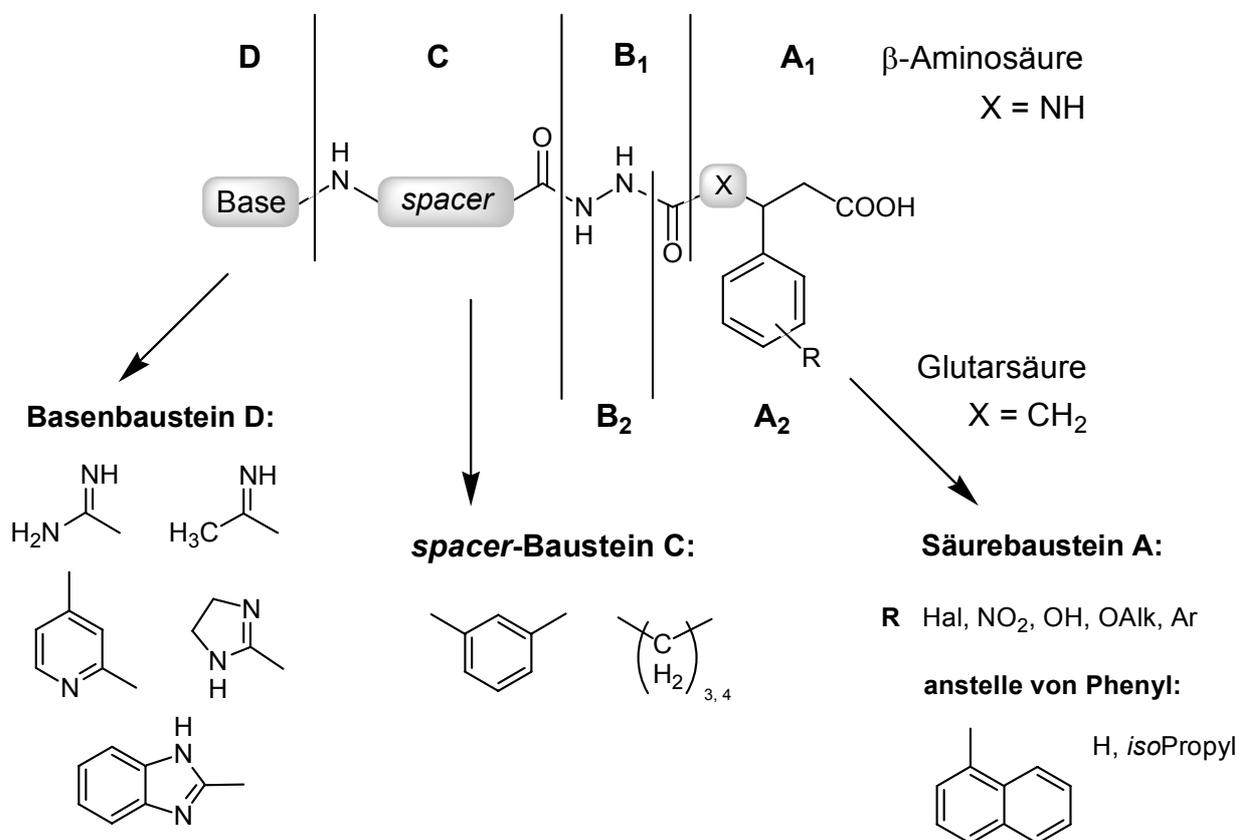


Abbildung 4.4: Die retrosynthetische Zerlegung der aza- und azacarba-RGD-Mimetika führt zu einem modularen Aufbau aus einem Säurebaustein **A**, einem aza-Glycinbaustein **B**, einem Spacerbaustein **C** und einem Basenbaustein **D**.

Durch Kombination verschiedener Bausteine **A**, **B**, **C** und **D** soll eine RGD-Mimetika-Bibliothek zur Optimierung der Leitstruktur **9** aufgebaut werden. Hierfür

bietet sich die Festphasensynthese an. Eine Untersuchung der Verbindungsbibliothek auf biologische Aktivität durch *on-bead-screening* ist allerdings nicht sinnvoll. Da die zu erwartenden Unterschiede in den biologischen Aktivitäten relativ gering sind, kann man mit dieser Methode nur schlecht zwischen einzelnen, aktiven Verbindungen differenzieren. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit eine Verbindungsbibliothek mittels Parallelsynthese aufgebaut (siehe Kapitel 4.1.2).

Für die Festphasensynthese wird die Säuregruppe der RGD-Mimetika, die in allen Verbindungen unverändert vorkommt, als Anknüpfungsstelle an das Trägerharz gewählt. Die Verwendung von TCP-Harz (Tritylchlorid-Polystyrol-Harz) als polymerer Träger erlaubt die Abspaltung der Verbindungen vom Harz im schwach Sauern und man erhält die Verbindung als freie Säure. In den letzten Jahren ist die Bedeutung von TCP-Harz in der Festphasensynthese nichtpeptidischer Verbindungen stark gestiegen.^[230] Die Synthese wird nach der Fmoc-Schutzgruppen-Strategie an fester Phase durchgeführt.^[231,232] Bei dieser Methode dient die basisch abspaltbare Fmoc-Gruppe (Fluorenyloxycarbonyl) als temporäre Schutzgruppe. Nach ihrer Abspaltung wird die Verbindung mit einem weiteren Fmoc-geschützten Baustein umgesetzt.

4.2.3 Planung der verwendeten Bausteine

Die unterschiedlichen Bausteine, die für die Synthese der RGD-Mimetika-Bibliothek verwendet werden sollen, sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Als **Säurebaustein A** sollen vor allem unterschiedliche Substituenten am Phenylring untersucht werden: Halogene, Nitro-, Hydroxy-, Alkoxy- und Phenyl-Substituenten. Zusätzlich soll der Phenylring durch andere Substituenten ersetzt werden: Wasserstoff, *iso*Propyl- und Naphthylreste.

Da die Methylierung des **aza-Glycin-Bausteins B** zu einem Verlust an Rezeptoraffinität führt, soll dieser Baustein unverändert eingesetzt werden.^[225] Zu Art und Länge des **Spacerbausteins C** wurden für ähnliche RGD-Mimetika bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt.^[169,225,233] Es haben sich dabei Alkylketten unterschiedlicher Länge, sowie ein meta-substituierter Aromat als optimal herausgestellt, weshalb der Spacerbaustein C weniger stark variiert werden soll.

Während sich bei der Entwicklung von α I**II** β 3-Antagonisten auch sekundäre Amine als geeignete basische Gruppen erwiesen haben, ist für α v β 3-Antagonisten bisher kein Beispiel mit einem Amin anstelle eines Guanidins in der Literatur beschrieben. Diese Antagonisten benötigen für hohe Affinitäten auf jeden Fall entweder ein Guanidin(mimetikum) oder ein Amidin(mimetikum). Im Gegensatz zu α I**II** β 3-Inhibitoren können für Antagonisten des α v β 3-Rezeptors allerdings auch geringer basische Guanidinmimetika verwendet werden. Das bedeutet, dass die Selektivität zwischen diesen beiden Integrinrezeptoren durch die Basizität des Guanidinmimetikums beeinflussbar ist.^[176] Aus diesem Grund sollen neben Guanidin auch geringer **basische Bausteine D** eingesetzt werden: Methylamidin, Aminopyridin, Aminoimidazolin, Aminobenzimidazol und Aminopyridazin (siehe Abbildung 4.4).

4.3 Synthese der Säurebausteine A₁ und A₂

Baustein **A** repräsentiert die Asparaginsäure der RGD-Sequenz. Als Säurebausteine sollen unterschiedliche, aromatische β -Aminosäuren und Glutarsäuren eingesetzt werden. β -Aminosäuren haben sich in den letzten Jahren insbesondere in der kombinatorischen Chemie zu beliebten Synthesebausteinen entwickelt. Dieser Trend lässt sich zwar anhand steigender Zahlen kommerziell erhältlicher, unnatürlicher α - und β -Aminosäuren beobachten, das Spektrum aromatischer β -Aminosäuren ist allerdings immer noch relativ gering. Im Fall substituierter 3-Phenyl-Glutarsäuren beschränkt sich die Auswahl auf wenige Verbindungen. Deshalb wurde nach einer Substanzklasse mit folgenden Eigenschaften gesucht:

- Es muss sich um aromatische Substanzen handeln.
- Es sollte eine große Auswahl an Substanzen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster kommerziell erhältlich sein.
- Die Substanzen müssen als Edukte für die Synthese von β -Aminosäuren **und** Glutarsäuren eingesetzt werden können.
- Es sollte sich um einfache und schnelle Reaktionen handeln.

Als Substanzklassen kommen Benzaldehyde und Zimtsäuren in Frage, wobei Zimtsäuren wiederum aus Benzaldehyden hergestellt werden können. Benzaldehyde haben den Vorteil, dass sie in größerer Vielfalt kommerziell erhältlich sind. Abbildung 4.5 zeigt die unterschiedlichen Substitutionsmuster, die für die Synthese der β -Aminosäuren und der Glutarsäuren aus Benzaldehyden verwendet werden:

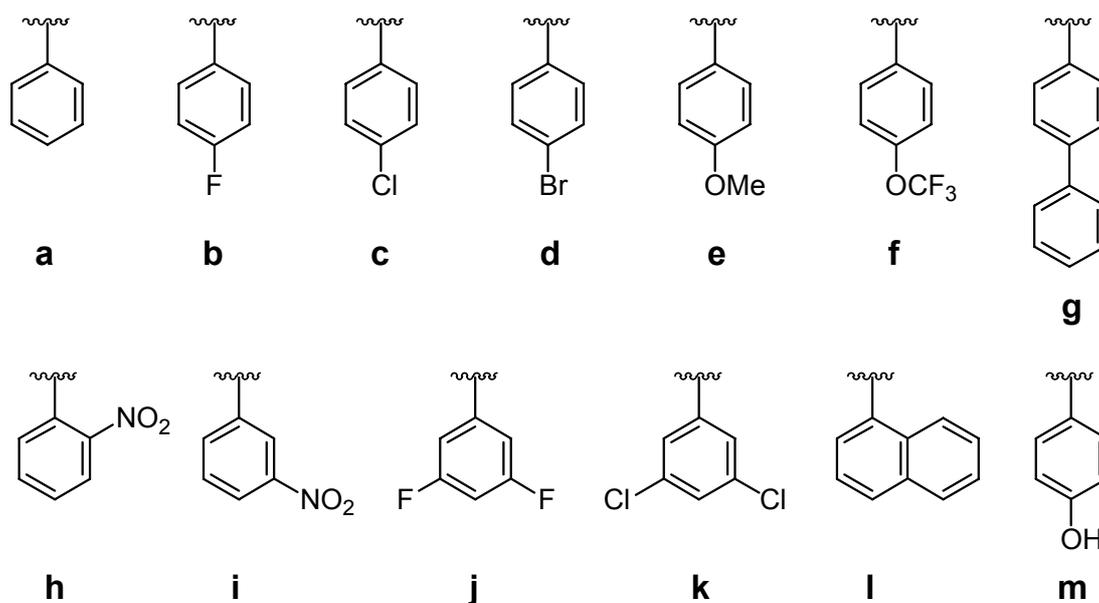
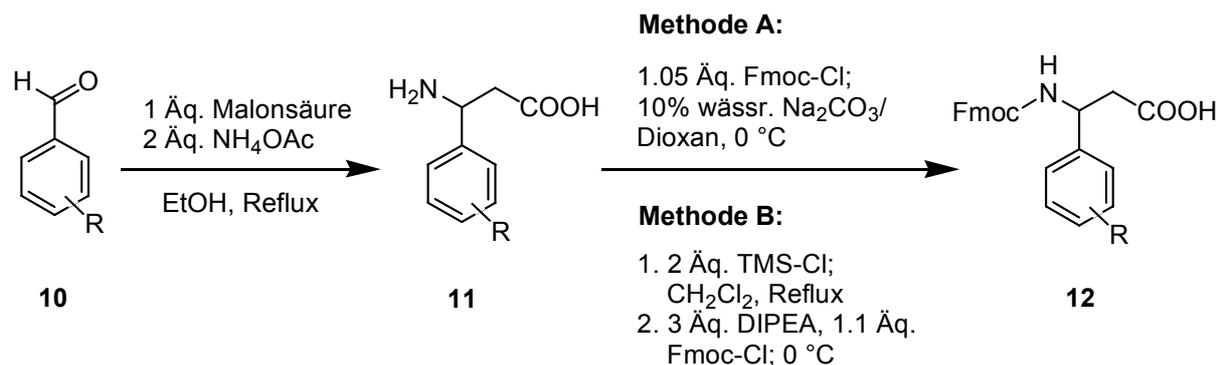


Abbildung 4.5: Substituenten der aromatischen Säurebausteine **A** (die Verwendung von Baustein **m** ist in Kapitel 6.2.2 beschrieben).

4.3.1 Synthese der Fmoc-geschützten β -Aminosäuren (Baustein **A**₁)

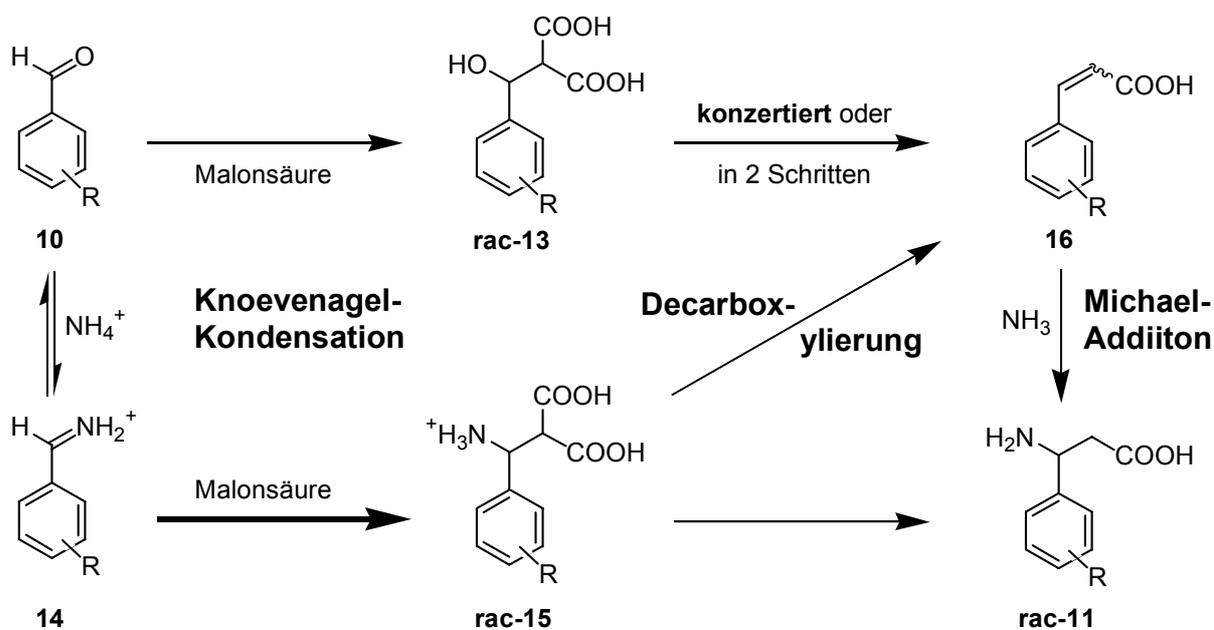
Die Säurebausteine **A**₁ müssen für den Einsatz in der Festphasensynthese temporär geschützt werden. Hierfür wurde die urethanische Fmoc-Schutzgruppe (Fluorenyloxycarbonyl) verwendet.

Die Benzaldehyde **10** wurden mit Malonsäure und Ammoniumacetat in Ethanol unter Rückfluss zu den entsprechenden β -Aminosäuren **11** umgesetzt (siehe Schema 4.1).^[234]



Schema 4.1: *Synthese des Fmoc-geschützten Säurebausteins A₁. Für die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe wurde Methode A nach Bolin et al.^[235] oder Methode B nach Chang et al.^[236] verwendet.*

Für die Eintopfsynthese der β -Aminosäuren **11** werden verschiedene Reaktionswege diskutiert (siehe Schema 4.2).^[237] In einer Gleichgewichtsreaktion bildet sich aus Benzaldehyd **10** und Ammoniumacetat das Iminiumion **14**.^[238] In einer Knoevenagel-Kondensation mit Malonsäure fungiert vermutlich das protonierte Imin als Elektrophil, da es reaktiver ist als der Aldehyd. Es entsteht die racemische α -Carboxy- β -amino-säure **15**.



Schema 4.2: *Mögliche Reaktionswege bei der Synthese der racemischen β -Aminosäure 11.*

Bei der anschließenden Decarboxylierung entsteht entweder direkt die β -Aminosäure **11** als Racemat oder die Zimtsäure **16** durch konzertierte Eliminierung/Decarboxylierung. Zimtsäure **16** reagiert in einer Michaeladdition mit Ammoniak zur β -Aminosäure **11**. Parallel läuft möglicherweise die Knoevenagel-Reaktion des Benzaldehyds **10** mit Malonsäure ab, wobei dieser Weg nur über die Zimtsäure **16** zur β -Aminosäure **11** führt.

Die racemischen β -Aminosäuren **11b,d,e,g,j,k** fielen im Verlauf der Reaktion als weißer Niederschlag aus und konnten in der Regel in guten Ausbeuten (70-80 %) und hoher Reinheit isoliert werden (siehe Tabelle 4.1). Die Bildung unterschiedlicher Zwischenprodukte während der Reaktion erschwerte eine Reaktionskontrolle mittels DC. Bei dem Versuch, nachträglich aus der Mutterlauge weitere Fraktionen des Produkts zu erhalten, konnte meist nur die entsprechende Zimtsäure **16** isoliert werden. Die Difluor- und Dichlor-substituierten β -Aminosäuren **11j** und **11k** konnten nur in geringen Ausbeuten von 31 bzw. 46 % isoliert werden. Die Mutterlösung enthielt jeweils größere Mengen der entsprechenden Zimtsäure **16j** bzw. **16k**, d. h. die Reaktion war noch nicht vollständig abgeschlossen. Bei der Umsetzung von 4-Biphenylcarbaldehyd (**10g**) entstand nach 6 Stunden ein Produktgemisch, in dem das Dicarbonsäureaddukt **15g** und 4-Phenylzimtsäure (**16g**) als Hauptprodukte vorlagen. Erst nach einer längeren Reaktionszeit von 14 Stunden konnte das gewünschte Produkt **11g** in hoher Reinheit erhalten werden.

Die β -Aminosäuren **11** wurden anschließend durch Einführung der Fmoc-Schutzgruppe in die geschützten Säurebausteine **A₁** umgewandelt (siehe Schema 4.1). Bei der Durchführung dieser Reaktion nach Methode A (modifiziert nach Chang *et al.*)^[236] arbeitet man in einer Mischung aus Dioxan und wässriger Na₂CO₃-Lösung als Base und tropft Fmoc-Chlorid zu. Bei dieser Methode kann in geringer Menge auch das geschützte Dipeptid als Nebenprodukt entstehen. Dieses Problem wurde jedoch nur bei der Synthese von **12j** beobachtet, das jeweils 5 % der beiden diastereomeren Formen des Fmoc-geschützten Dipeptids aufwies.

Die Dipeptidbildung lässt sich durch Anwendung der Methode B nach Bolin *et al.*^[235] umgehen. Dabei wird aus der β -Aminosäure **11** und TMS-Chlorid zunächst

temporär der TMS-Ester hergestellt. Dieses Intermediat wird unter wasserfreien Bedingungen in CH_2Cl_2 mit einem geringen Überschuss Fmoc-Chlorid und DIPEA als Base umgesetzt. Die Einführung der Fmoc-Gruppe nach Methode B gelang jedoch nur im Fall von **12a** und **12n** mit Ausbeuten von 100 bzw. 55 %. Bei der Umsetzung der β -Aminosäuren **11c** und **11h** entstanden die gewünschten Produkte nur in geringen Ausbeuten und geringer Reinheit (Gesamtausbeuten: 12 bzw. 10 %). Diese Verbindungen wurden deshalb wieder nach Methode A synthetisiert. Tabelle 4.1 stellt eine Liste aller in der Festphasensynthese eingesetzten *N*-Fmoc- β -Aminosäuren **12** dar.

Tabelle 4.1: Liste aller in der Festphasensynthese eingesetzten Säurebausteine A_1 .

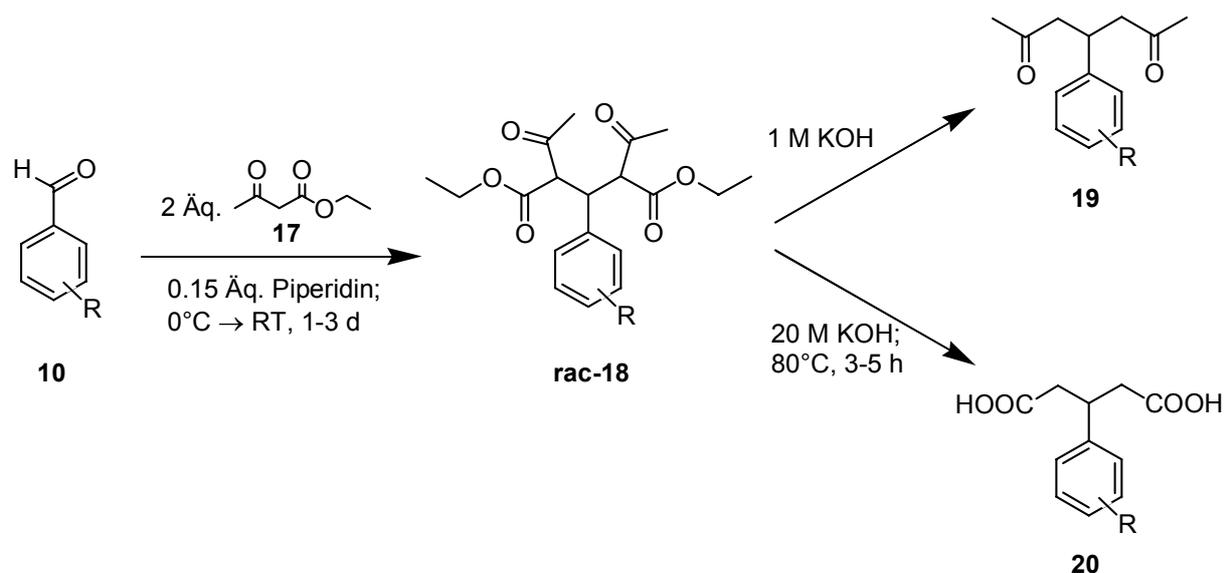
Verb.	Rest R	Ausbeute β -AS 11	Ausbeute Fmoc-AS 12	Methode	Bemerkung
a	H	(Acros)	100 %	B	
b	4-F	73 %	60 %	A	
c	4-Cl	(Chempur)	91 %/30 %	A/B	Reinheit 12c : 40 % nach Methode B
d	4-Br	83 %	79 %	A	
e	4-OCH ₃	78 %	82 %	A	
f	4-OCF ₃	(Merck)	96 %	A	
g	4-Phenyl	73 %	(Neosystem)	—	16 h Rkts.-zeit für 11g
h	2-NO ₂	(Chempur)	78 %/40 %	A/B	Reinheit 12h : 25 % nach Methode B
i	3-NO ₂	(Merck)	100 %	A	
j	3-F,5-F	31 %	59 %	A	Reinheit 12j : 90 % (10 % Dipeptid)
k	3-Cl,5-Cl	46 %	88 %	A	
l	(1-Naphthyl)	—	(Neosystem)	—	
n	(H)	—	(Schmitt)	—	
o	(isoPropyl)	(Acros)	55 %	B	
p	[Nipecotinsre]	—	(Neosystem)	—	

Acros, Chempur, Neosystem: käuflich erworben; Merck: von G. Hölzemann (Merck KGaA, Darmstadt) erhalten; Schmitt: von H. Schmitt erhalten.

4.3.2 Synthese der Glutarsäuren (Säurebaustein A₂)

Die Synthese der Säurebausteine A₂ wurde ebenfalls ausgehend von unterschiedlich substituierten Benzaldehyden durchgeführt.

Hierzu wurde der jeweilige Benzaldehyd **10** mit katalytischen Mengen Piperidin als Base und zwei Äquivalenten Acetessigsäureethylester (**17**) umgesetzt (2.3 Äq. bei **10g** aufgrund schlechter Löslichkeit), das gleichzeitig als Lösungsmittel dient (siehe Schema 4.3).^[239] Die Reaktionsmischung erstarrte langsam innerhalb von drei Tagen ohne Rühren. Zunächst reagiert ein Äquivalent Acetessigester (**17**) mit dem Benzaldehyd **10** unter Wasserabspaltung in einer Knoevenagel-Kondensation zu einem Acetozimtsäureester. Dieser reagiert unter Michaeladdition zum racemischen 2,4-Bisaceto-3-phenylglutarsäurediethylester (**18**).^[240] Das Zwischenprodukt **18** wurde anschließend mit wenig Ethanol (~ 1 M) umkristallisiert.



Schema 4.3: Synthese des Säurebausteins A₂. Die Umsetzung des Benzaldehyds **10** führt über die isolierbare Zwischenstufe **18** zur 3-Phenylglutarsäure **20** (Säurebaustein A₂).

Aufgrund geringer Löslichkeit mussten die Zwischenprodukte **18e** und **18k** aus der zwei- bis dreifachen Menge Ethanol umkristallisiert werden (0.3-0.5 M Lösung). Für die Verbindungen **18g** und **18i** wurde Ethylacetat (~ 1 M) als Lösungsmittel gewählt und die Fällung durch Zugabe geringer Mengen EtOH unterstützt. Die Ausbeuten

lagen zwischen 50 und 70 % – bezogen auf die erste Fraktion der Kristallisation – und ließen sich durch Einengen des Lösungsmittels und wiederholte Fällung weiter steigern.

Die anschließende Verseifung in 20 M KOH-Lösung führte zur 3-Phenylglutarsäure **20**. Bei der Deacetylierung handelt es sich um eine Retro-Claisenkondensation (sogenannte ‚Säurespaltung‘), die nur aufgrund der hohen Hydroxidkonzentration stattfindet. Diese Reaktion muss in stark basischem Medium durchgeführt werden, da sonst eine Verseifung mit anschließender Decarboxylierung zum entsprechenden Diketon **19** stattfinden würde.^[240] Tabelle 4.2 stellt eine Liste aller in der Festphasensynthese eingesetzten [3-Phenyl]-Glutarsäuren **20** dar. 3-Phenylglutarsäure (**20a**) und unsubstituierte Glutarsäure (**20m**) waren die einzigen kommerziell erhältlichen Bausteine **A₂**.

Tabelle 4.2: Liste aller in der Festphasensynthese eingesetzten Säurebausteine **A₂**.

Verb.	Rest R	Ausbeute Zwischenst. 18	Ausbeute Glutarsäure 20	Bemerkung
a	H	—	(Lancaster)	
b	4-F	63 %	86 %	
c	4-Cl	69 %	58 %	
d	4-Br	52 %	76 %	
e	4-OCH ₃	58 %	86 %	Umkristallisation aus 2.5•EtOH
g	4-Phenyl	71 %	95 %	2.3 Äq. 17 ; Um- kristall. aus EE
i	3-NO ₂	63 %	87 %	Umkristallisation aus EE
j	3-F,5-F	72 %	42 %	
k	3-Cl,5-Cl	83 %	93 %	Umkristallisation aus 2•EtOH
n	(H)	—	(Lancaster)	

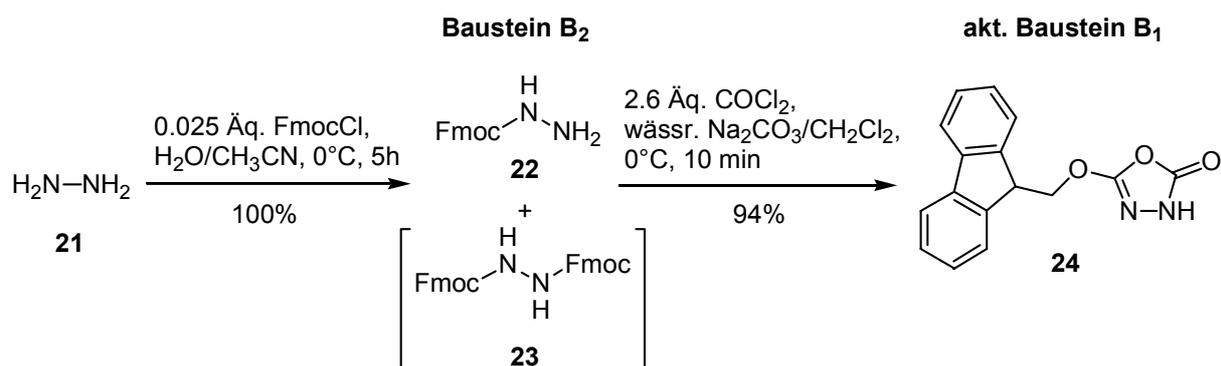
Lancaster: kommerziell erworben.

4.4 Synthese der geschützten aza-Glycinbausteine **B**₁ und **B**₂

Der Austausch einer Aminosäure durch eine Azaaminosäure in Peptiden bewirkt eine Veränderung struktureller sowie biologischer Eigenschaften.^[227,241] Dabei ist insbesondere das Potential der Azapeptide, im Vergleich zu Peptiden gegen enzymatischen Abbau resistenter zu sein, von pharmakologischem Interesse.^[242] So konnte vor kurzem mit der Entwicklung hochaktiver und oral verfügbarer Azadipeptid-Isostere zur Inhibierung der HIV-1-Protease das pharmakologische Potential der Hydrazinderivate belegt werden.^[243] Die Einführung einer Azaaminosäure (Baustein **B**) in die RGD-Mimetika könnte somit helfen, deren pharmakokinetische Eigenschaften zu verbessern.

Zur Struktur von aza-Aminosäuren in Peptiden wurden verschiedene Studien durchgeführt. Die berechnete niedrige Energiebarriere für die Rotation um die *N-N*-Bindung bei 180° in Diformylhydrazin steht im Einklang mit Kristallstrukturen von nichtalkylierten Diacylhydrazinen, die einen planaren CO-N-N-CO-Diederwinkel von 180° aufweisen.^[244-246] Bei substituierten Azapeptiden wurde hingegen immer ein um den Betrag von ca. 60-120° verdrehter CO-N-N-CO-Dieder gefunden.^[227,247,248] Da der Azabaustein **B** die Aminosäure Glycin der RGD-Sequenz repräsentiert, werden Substituenten an dieser Stelle von den Integrinrezeptoren nicht toleriert. Dies konnte durch Einbau der methylierten aza-Glycin-Analoga aza-Alanin und aza-Sarcosin in RGD-Mimetika gezeigt werden.^[225]

Schema 4.4 zeigt die Synthese der Fmoc-geschützten aza-Glycin-Bausteine **B**₁ und **B**₂. Durch Umsetzung von Fmoc-Chlorid mit einem 40-fachen Überschuss Hydrazin (**21**) konnte der geschützte Baustein **B**₂, Fmoc-Hydrazin (**22**), in exzellenter Ausbeute und hoher Reinheit (95 %) dargestellt werden.^[249] Da das als Nebenprodukt angefallene *N,N'*-Bis-Fmoc-Hydrazin (**23**) bei der weiteren Umsetzung nicht mitreagiert, wurde auf eine Reinigung verzichtet.



Schema 4.4: Synthese der Fmoc-geschützten aza-Glycin-Bausteine **B₁** und **B₂**.

Der aza-Glycin-Baustein **B₁** besitzt eine zusätzliche Carbonylgruppe zur Kupplung mit der β -Aminosäure (Baustein **A₁**), die für den Einsatz in der Festphasensynthese aktiviert werden muss. Zur Transformation des Fmoc-geschützten Hydrazins **22** in die korrespondierende aktivierte Spezies musste es mit einer zweifach aktivierten Carbonsäure umgesetzt werden. Dafür wurde eine kommerziell erhältliche Lösung von Phosgen in Toluol eingesetzt. Phosgen besitzt eine außerordentlich hohe Reaktivität und ein Überschuss kann im Gegensatz zum gleichreaktiven aber kristallinen Triphosgen bequem und vollständig im Vakuum entfernt werden.

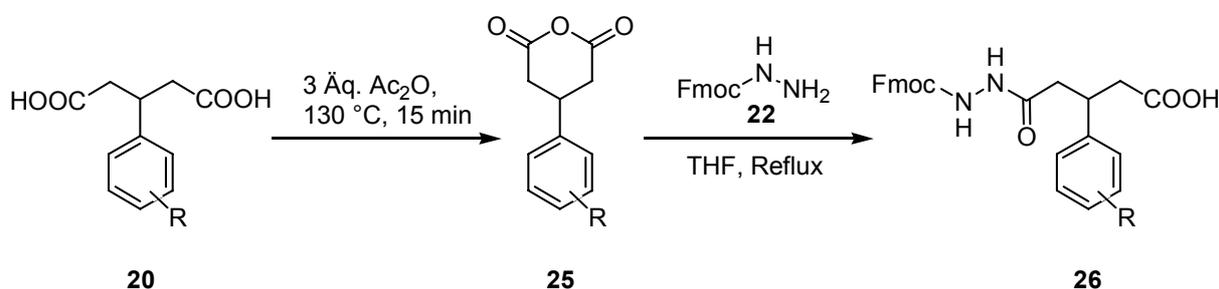
Nach einer von C. Gibson zur Darstellung von Isocyanaten beschriebenen Methode konnte Fmoc-Hydrazin (**22**) in guter Ausbeute in das hoch reaktive 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-on **24** überführt werden.^[250] Dazu wurde Fmoc-Hydrazin (**22**) in einer 1:1-Mischung aus CH_2Cl_2 und wässriger NaHCO_3 -Lösung suspendiert und anschließend mit einem dreifachen Überschuss an Phosgen versetzt. Das zunächst entstandene Hydrazincarbonsäurechlorid reagiert in einer intramolekularen Cyclisierung sofort zum 1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-on **24** weiter.^[227] Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten musste zur Aufarbeitung lediglich die organische Phase isoliert und das Lösungsmittel entfernt werden. Man erhielt das Oxadiazolon **24**, das als Feststoff isoliert werden konnte. **24** erwies sich als relativ stabil und konnte bei 4 °C über mehrere Monate gelagert werden, ohne an Reaktivität zu verlieren.

4.5 Kombination der Bausteine **A₂** und **B₂**

Die Festphasenstrategie sah vor, alle Bausteine separat in der Synthese einzusetzen. Da der direkte Einbau der ungeschützten Glutarsäuren **20** (Bausteine **A₂**) in der Festphasensynthese jedoch zu Problemen führte (siehe Kapitel 4.8.1), musste ein alternativer Weg gesucht werden.

Eine Alternative ist der Schutz einer der beiden Säuregruppen der Glutarsäure **20**. Für die Einführung der Schutzgruppe sollte genau eine der Säuregruppen aktiviert werden, um eine monogeschützte Glutarsäure zu erhalten. Als Methode der Wahl wurde die Überführung der Dicarbonsäure in das intramolekulare Anhydrid angesehen. Durch den bei der Reaktion entstehenden Sechsring wird die Anhydridbildung zusätzlich begünstigt. Da die Glutarsäure **20** bei der Mimetikasynthese als Racemat eingesetzt werden sollte, musste die Reaktion nicht bezüglich ihrer Stereoselektivität untersucht werden. Für die Einführung und Abspaltung der Schutzgruppe werden zwei zusätzliche Arbeitsschritte benötigt. Daher erschien es sinnvoll, als sogenannte Schutzgruppe, gleich den Baustein **B₂** einzubauen.

Schema 4.5 zeigt die Synthese des cyclischen Glutarsäureanhydrids **25**, sowie die weitere Umsetzung mit Fmoc-Hydrazin (**22**) zum Baustein **A₂B₂**. Die Glutarsäure **20** wurde mit drei Äquivalenten Essigsäureanhydrid bis zur vollständigen Lösung nach 10 bis 15 Minuten unter Rückfluss erhitzt.^[251] Das Produkt **25** wurde durch Kristallisation unter Zugabe kleiner Mengen Diethylether erhalten.



Schema 4.5: Verknüpfung der Bausteine **A₂** und **B₂**: Überführung der Glutarsäure **20** in das Anhydrid **25** und nachfolgende Ringöffnung mit Fmoc-Hydrazin (**22**).

Das Glutarsäureanhydrid **25** wurde mit Fmoc-Hydrazin (**22**) umgesetzt, das unter Ringöffnung zur *N'*-Fmoc-Hydrazino-5-oxo-3-phenylpentansäure **26** führte. Da die entstehende Säuregruppe nicht aktiviert ist, erfolgt keine weitere Reaktion mit Fmoc-Hydrazin (**22**). Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht. Zunächst wurde die Reaktion in Chloroform mit einem Überschuss **22** (1.2 Äq.) und DIPEA als Base durchgeführt. Zum Abtrennen des restlichen Fmoc-Hydrazins (**22**) musste die Produktmischung sauer extrahiert werden, wobei das Produkt **26** lediglich in einer Ausbeute von 40 % erhalten wurde. In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktion in DMF durchgeführt, um das Produkt **26** nach Beendigung der Reaktion direkt mit TCP-Harz weiter umsetzen zu können. Hierbei wurde jedoch teilweise die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, was bei der nachfolgenden Umsetzung mit TCP-Harz zu Problemen führen würde.

Bei einer Umsetzung in THF als Lösungsmittel wurde die Notwendigkeit der Base DIPEA untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Produkt **26** ohne Basenzusatz in exzellenter Reinheit (100 % gegenüber 90 % mit DIPEA) erhalten werden konnte. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf die Rückflusstemperatur von 66 °C konnten die Reaktionszeiten von mehreren Tagen auf 5 bis 10 Stunden reduziert werden. Gante führte eine ähnliche Umsetzung in einer 1:1-Mischung aus CH₂Cl₂ und THF bei Raumtemperatur durch.^[229] Entfernung des Lösungsmittels nach Beendigung der Reaktion ergab die Produkte **26a-e,g,i-k,m** in exzellenten Ausbeuten (siehe Tabelle 4.3). **26a** und **26m** wurden zur Abtrennung von Bis-Fmoc-Hydrazin (**23**) mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Da **23** bei der weiteren Umsetzung nicht reagieren kann, wurde bei den anderen Produkten auf diesen Reinigungsschritt verzichtet.

Tabelle 4.3: Liste aller in der Festphasensynthese eingesetzten Bausteine A_2B_2 .

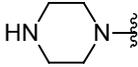
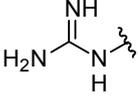
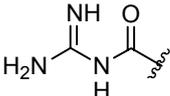
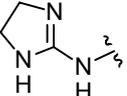
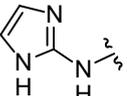
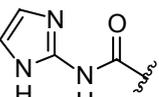
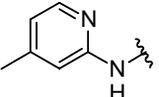
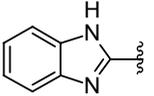
Verb.	Rest R	Ausbeute	
		Anhydrid 25	A_2B_2 26
a	H	77 %	94 % ^a
b	4-F	56 %	99 %
c	4-Cl	65 %	100 %
d	4-Br	84 %	100 %
e	4-OCH ₃	77 %	99 %
g	4-Phenyl	74 %	100 %
i	3-NO ₂	85 %	100 %
j	3-F,5-F	74 %	100 %
k	3-Cl,5-Cl	65 %	100 %
n	(H)	48 %	26 % ^a

^a nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie

4.6 Spacerbaustein C

Durch die Länge des Spacerbausteins lässt sich die Selektivität zu den Integrinrezeptoren $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$ einstellen (siehe Kapitel 3.5.4). Hierzu gibt es in unserer Arbeitsgruppe bereits zahlreiche Untersuchungen.^[225] Abbildung 4.6 zeigt die verschiedenen Spacerbausteine **C**, die von C. Gibson in der Synthese von aza-RGD-Mimetika-Bibliotheken eingesetzt wurden: Alkylketten unterschiedlicher Länge sowie cyclische Spacer, wie Cyclohexan, Piperidin, Piperazin, Pyrolidin, Benzol.

Tabelle 4.4: Basizität verschiedener Guanidinmimetika.

Base	Struktur	pK _a -Wert	Integrin-Rezeptor	Literaturstelle
Piperidin		11.1	αIIbβ3	[175]
Guanidin		12 – 12.5	αIIbβ3 und αvβ3	[175]
Acylguanidin		6.6 – 7.6	αvβ3	[175]
Aminoimidazolin		9 – 12	αvβ3	[180]
Aminoimidazol		8.6	αvβ3	[176]
Acylaminoimidazol		< 4	αvβ3	[176]
Aminopyridin		~ 7	αvβ3	[176,252]
Benzimidazol		6	αvβ3	[173]

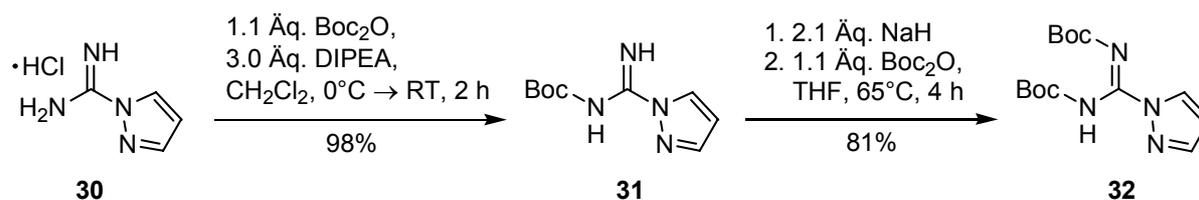
Durch den Einbau vor allem cyclischer Guanidinmimetika kann man außerdem die Lipophilie der RGD-Verbindungen steigern, was einen positiven Effekt auf die orale Bioverfügbarkeit haben sollte.^[170,252]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Basenbausteine Guanidin, Methylamidin und Aminopyridin verwendet (siehe Kapitel 4.2.3). Die Basen Aminoimidazolin, Aminobenzimidazol wurden nicht in der Synthese der Bibliotheken eingesetzt, sondern nur in ausgewählte RGD-Mimetika eingebaut.

4.7.1 Basenbaustein Guanidin

Für die Transformation eines Amins oder Anilins in ein Guanidin wurden bereits verschiedene Reagenzien beschrieben.^[253-256] Bis-Boc-guanylpyrazol **32** gehört aufgrund seiner hohen Reaktivität zu einem geeigneten Vertreter dieser Reagenzklasse.^[257]

In Schema 4.6 ist die Synthese von Bis-Boc-guanylpyrazol dargestellt, das später auch kommerziell verfügbar war. Zuerst wurde Guanylpyrazol (**30**) mit Boc₂O in Gegenwart von DIPEA als Base in das monogeschützte Guanylpyrazol **31** überführt (Ausbeute 98 %). Für die Einführung der zweiten Boc-Schutzgruppe musste **31** mit NaH deprotoniert und ein zweites Mal mit Boc₂O umgesetzt werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäure abgebrochen. Das Guanylierungsreagenz **32** konnte in 81 % Ausbeute erhalten werden.

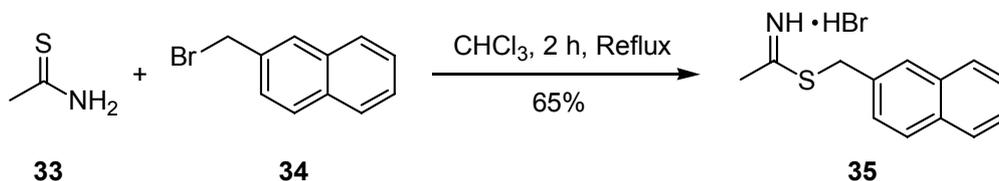


Schema 4.6: Synthese des Guanylierungsreagenzes *N,N'*-Bis-Bocguanylpyrazol **32**.

4.7.2 Basenbaustein Amidin

Geht man von der Vermutung einer *side-on* Bindung des Guanidins an den αvβ3-Rezeptor aus (siehe Kapitel 3.5.4), sollte ein Austausch der endständigen Amino-Gruppe durch eine Methylengruppe toleriert werden. Das entsprechende Methylamidin soll, wie auch das Guanidin, durch direkte Umsetzung mit einem Amin oder Anilin an fester Phase synthetisiert werden. Während die Reaktivität von Acetimidaten für die Amidinylierung von Aminen ausreicht, reagieren sie mit Anilinen nur sehr schlecht. Eine Verbesserung kann durch die Verwendung von Thioimidaten erzielt werden, die anstelle einer alkoholischen Abgangsgruppe ein Thiol besitzen.^[258] Das Thioacetimidat **35** besitzt gegenüber anderen Thioimidaten den Vorteil, dass das bei der Reaktion gebildete Thiol schwer flüchtig und somit geruchsarm ist.^[259]

Schema 4.7 skizziert die Synthese von *S*-2-Naphthylmethylthioacetimidat-hydrobromid (**35**) aus Thioacetamid (**33**) und 2-Brommethyl-naphthalin (**34**). Das Produkt **35** konnte nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei 60 °C in einer Ausbeute von 65 % als stabiles Hydrobromidsalz isoliert werden.



Schema 4.7: Synthese von Thioacetimidat **35** als Reagenz zur Herstellung von Methylamidinen.

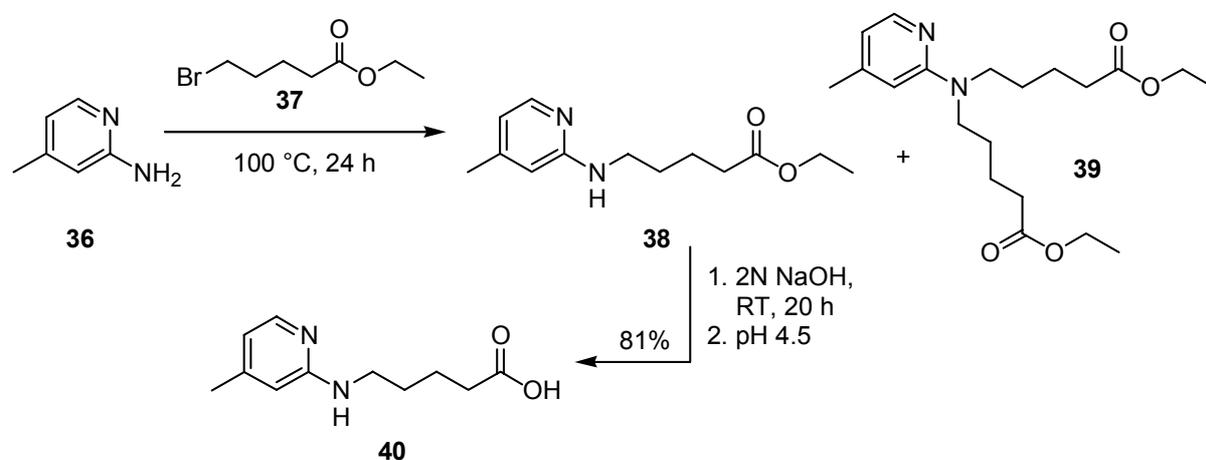
4.7.3 Basenbaustein Aminopyridin

Zur Steigerung der Lipophilie der RGD-Mimetika sollte die polare Guanidingruppe durch aromatische, weniger basische Bausteine ersetzt werden. Der Austausch eines Guanidins durch stickstoffhaltige Heterocyclen, wie Aminopyrimidin, Aminopyrazin oder Aminopyridin wurde von Misra *et al.* 1994 am Beispiel von Thrombin-Antagonisten beschrieben.^[252] Dabei konnten sie eine deutliche Erhöhung der Caco-2-Zellpermeabilität beobachten, wobei die biologische Aktivität teilweise sogar verbessert werden konnte.

Die Verwendung von Aminopyrimidin als Guanidinmimetikum in RGD-Mimetika führte allerdings zu einem Verlust an Bindungsaffinität zum $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin.^[225] Daraufhin sollte Aminopyridin eingebaut werden, das 1999 auch von GlaxoSmithKline als basische Gruppe in $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antagonisten mit guten Bindungs- und pharmakokinetischen Eigenschaften beschrieben wurde.^[182,183]

Für die Umsetzung eines unsubstituierten Pyridins mit einem Amin werden meist Temperaturen über 100 °C benötigt. Die Reaktion bei niedrigen Temperaturen ist nur für Pyridine mit stark elektronenziehenden Substituenten^[260,261] oder Pyrimidine^[262] beschrieben. Aus diesem Grund erschien die direkte Umsetzung dieses Basenbausteins mit einem Amin an fester Phase als nur schwer umsetzbar. Der Basenbaustein sollte deshalb zunächst in Lösung mit einem Spacerbaustein **C** zu dem kombinierten Baustein **CD** umgesetzt werden.

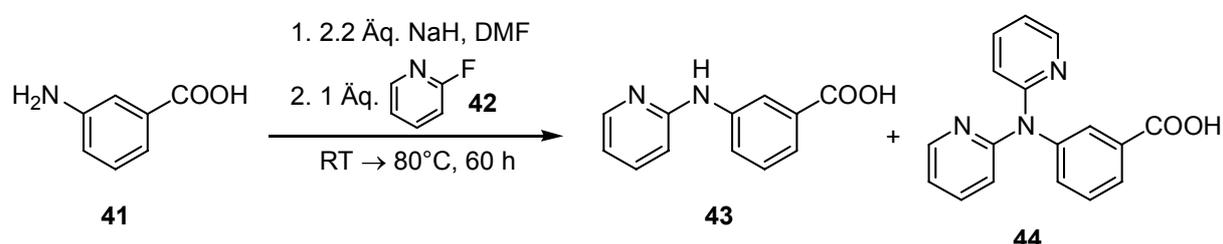
Schema 4.8 zeigt die Reaktion von 2-Amino-4-methylpyridin (**36**) mit 5-Brompentansäureethylester (**37**). Das Aminopyridin **36** wurde in 1.5 bis 4-fachem Überschuss eingesetzt und die Reaktionsmischung für ca. 24 Stunden bei einer Temperatur von 100 °C gerührt. Trotz des Überschusses konnte keine vollständige Umsetzung von **37** erreicht werden (maximaler Umsatz: ca. 75 %). Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf eine Woche führte zu einem Anstieg des bisalkylierten Nebenprodukts **39**. Die Reaktionskontrolle wurde erschwert, da das Edukt **36** im Überschuss eingesetzt wurde, während das andere Edukt **37** weder mittels DC noch HPLC detektiert werden konnte. Die Abtrennung des Aminopyridin-Überschusses konnte nur durch Flash-Chromatographie durchgeführt werden, wobei **36** zurückgewonnen werden konnte. Wegen zusätzlicher Löslichkeitsprobleme in den bei der Flash-Chromatographie eingesetzten Lösungsmitteln (Ethylacetat/Hexan), konnte der 5-[N-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäureethylester (**38**) nur in einer Gesamtausbeute von 20 % erhalten werden.



Schema 4.8: Kombination von Aminopyridin als Basenbaustein **D** mit einem Alkylspacer **C** in Lösung zum Baustein **CD** (**40**).

Anschließend wurde der Ethylester **38** mit 2 N wässriger NaOH-Lösung verseift. Da das Produkt **40** sowohl eine basische als auch eine saure Gruppe besitzt, konnte es nicht durch Extraktion isoliert werden. Für die Isolierung wurde ein pH-Wert von 4.5 eingestellt, bei dem das Produkt als inneres Salz vorliegt und ausfällt (isoelektrischer Punkt).

Aminopyridin als Basenbaustein **D** sollte außerdem mit einem aromatischen Spacerbaustein **C** kombiniert werden. Für diese Reaktion wurde 2-Fluorpyridin (**42**) als kommerziell erhältlicher Basenbaustein mit 3-Aminobenzoesäure (**41**) umgesetzt (siehe Schema 4.9). Nach Deprotonierung der Aminobenzoesäure **41** mit Natriumhydrid wurde 2-Fluorpyridin (**42**) zugegeben. Bei der Verwendung von 2.2 Äquivalenten **42** entstand zu ca. 30 % das Bisarylierungsprodukt **44**. Diese Nebenreaktion konnte durch Umsetzung mit nur einem Äquivalent **42** reduziert werden, wobei die Reaktion unvollständig verlief. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/MS wurde durch die schlechte Ionisierbarkeit erschwert. Aufgrund ähnlicher Löslichkeitseigenschaften der entstandenen Produkte bereitete die Abtrennung der noch vorhandenen 3-Aminobenzoesäure (**41**) Probleme. Deshalb konnte das Produkt **43** nach Extraktion der wässrigen Phase bei einem pH-Wert von 3 und Ultraschallbehandlung einer Ethylacetat-Suspension lediglich mit 20 % Ausbeute isoliert werden.



Schema 4.9: Kombination von Aminopyridin als Basenbaustein **D** mit einem Arylspacer **C** in Lösung zum Baustein **CD** (**43**).

Eine andere Methode zur Herstellung von Aminopyridinen verwendet 2-Chlorpyridin-*N*-oxid.^[252] Durch das *N*-Oxid ist die 2-Position des Chlorpyridins für einen nukleophilen Angriff zusätzlich aktiviert. Das Aminopyridin erhält man durch Reduktion des *N*-Oxids mit Pd/NH₄HCO₂, wobei die Gesamtausbeute mit 25 % ebenfalls sehr gering ist. Die Verwendung von Palladium- oder Nickel-Katalysatoren ist eine weitere Möglichkeit der Reaktionsführung, die in den letzten zwei Jahren verstärkt untersucht wurde.^[263-265]

4.7.4 Basenbaustein Amino-Dihydroimidazol

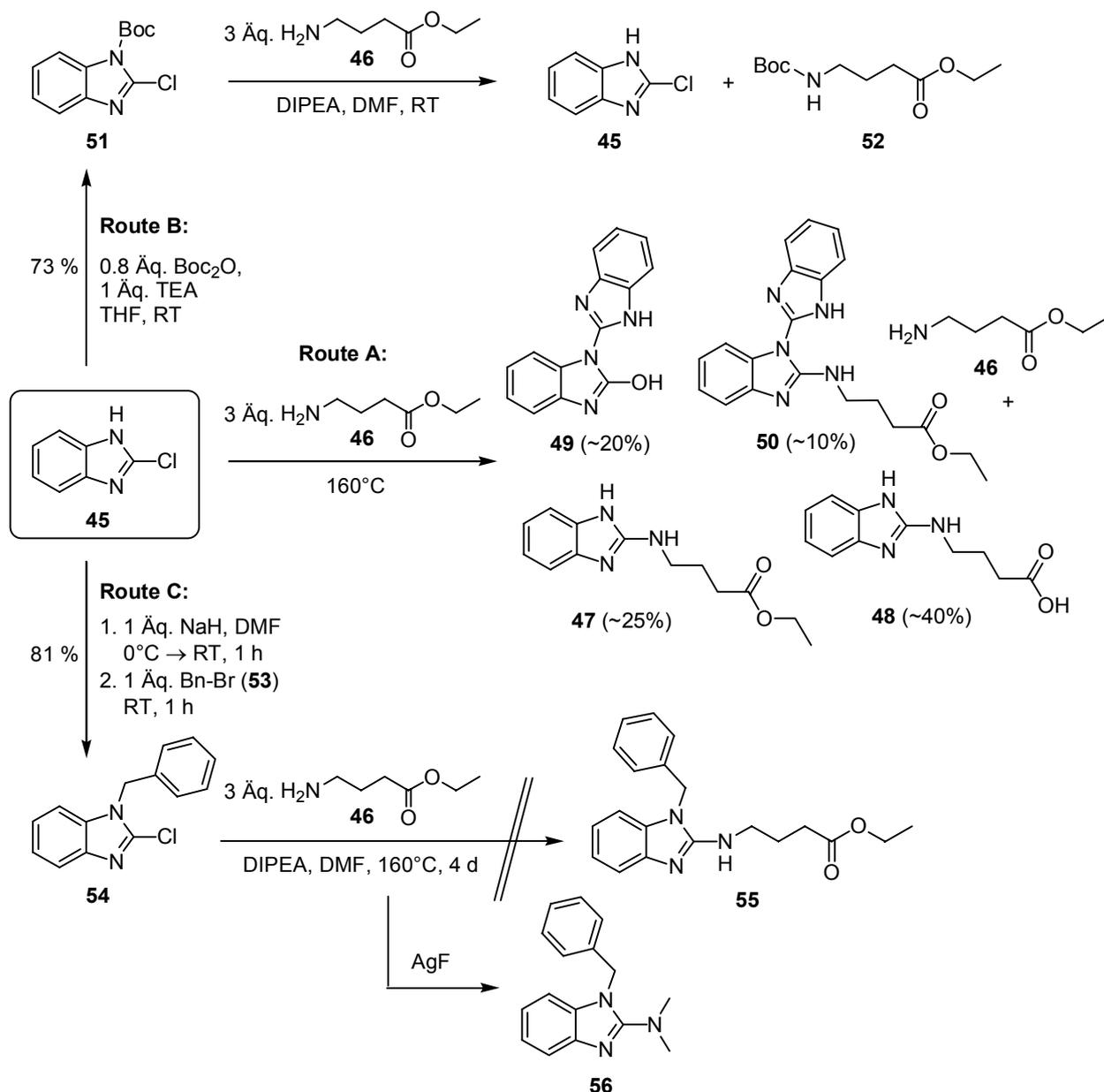
Durch die Verbrückung der Guanidin-Stickstoffe über eine Ethyleneinheit kann die Basizität gesenkt und die Lipophilie erhöht werden. Durch diese strukturelle Änderung kommt man zu einer Amino-Dihydroimidazol-Gruppe als Basenbaustein, die bereits in RGD-Mimetika eingebaut wurde.^[180] Für die Einführung des Bausteins durch Reaktion mit einem Amin kann man das käuflich erhältliche 2-(3,5-Dimethylpyrazolyl)-4,5-dihydroimidazol (**73**) verwenden (siehe Kapitel 4.8.6). Dabei fungiert das Dimethylpyrazol als Abgangsgruppe, ähnlich dem für die Guanylierung verwendeten bis-Boc-guanylpyrazol.

4.7.5 Basenbaustein Aminobenzimidazol

Während Benzimidazol als Base bereits von der Firma GlaxoSmithKline in $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinantagonisten eingebaut wurde^[181,185], wurde Aminobenzimidazol zu Beginn dieser Arbeit nicht als basische Gruppe für Integrinantagonisten verwendet. Im Jahr 2000 beschrieben Peyman *et al.* erstmals entsprechende Verbindungen mit guten Affinitäten ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$: IC_{50} 40 nM).^[179] Die Verknüpfung mit einem Spacerbaustein **C** sollte, wie im Fall von Aminopyridin, in Lösung durchgeführt werden.

Schema 4.10 zeigt die Verknüpfung von Aminobutansäure als Baustein **C** und Chlorbenzimidazol als Baustein **D** zu einem kombinierten Baustein **CD**. Hierfür wurden verschiedene Syntheserouten untersucht.

Syntheseroute A verfolgt die direkte Umsetzung von 2-Chlorbenzimidazol (**45**) mit 4-Aminobutansäureethylester (**46**) bei 160 °C. Dabei entstand ein Produktgemisch, in dem das gewünschte Produkt **47** zu ca. 25 % vorhanden war. **47** konnte in einer Ausbeute von 15 % isoliert werden, wobei eine vollständige Abtrennung des im Überschuss eingesetzten Aminosäureesters **46** nur durch Flash-Chromatographie möglich war. Daneben enthielt die Mischung die beiden, in einer Reaktion mit Chlorbenzimidazol (**45**) entstandenen Nebenprodukte **49** (~20 %) und **50** (~10 %), sowie das im Überschuss eingesetzte Edukt **46**. Zum größten Teil entstand bei dieser Reaktion mit ca. 40 % das Verseifungsprodukt **48**, das in 20 % Ausbeute isoliert wurde. **48** ist zusätzlich mit NaCl verunreinigt.



Schema 4.10: Kombination von Aminobenzimidazol als Basenbaustein **D** mit einem Alkylspacer **C** in Lösung zum Baustein **CD** (**48**): Verschiedene Varianten der Umsetzung von 2-Chlorbenzimidazol (**45**) mit dem 4-Aminobutansäureester **46**.

Um die Bildung der, durch intermolekulare Reaktion mit **45** entstandenen Nebenprodukte zu verhindern, sollte die NH-Gruppe von 2-Chlorbenzimidazol (**45**) vor der Umsetzung mit **46** temporär geschützt werden. Als Schutzgruppen wurde die Boc-Gruppe (Route B) und die Benzylgruppe (Route C) untersucht.

Die Boc-Schutzgruppe wurde durch Umsetzung des Benzimidazols **45** mit Boc-Anhydrid eingeführt (siehe Schema 4.10). Da sich **45** im Laufe der Reaktion zersetzte, wurden nach 14 Stunden weitere 0.2 Äquiv. Benzimidazol **45** zugegeben. Die Ausbeute des Boc-geschützten Chlorbenzimidazols **51** betrug nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie 73 %. **51** wurde anschließend mit einem Überschuss Aminopentansäureester **46** in DMF umgesetzt. Da bei Raumtemperatur keine Reaktion erfolgte, wurde die Temperatur langsam erhöht und es kam bei 80 °C zur Zersetzung der Edukte. Die Zugabe von DIPEA führte zwar zu vollständigem Umsatz, es entstand jedoch zu 100 % der Boc-geschützte Aminosäureester **52**. Benzimidazol fungiert in diesem Fall als Abgangsgruppe, ähnlich der zur Säureaktivierung eingesetzten Imidazole oder Pyrazole.^[266]

Aus diesem Grund wurde die Benzylgruppe als alternative Schutzgruppe gewählt (Route C). Die Umsetzung mit Benzylbromid (**53**) führt nach Deprotonierung von **45** mit Natriumhydrid zum *N*-Benzyl-2-Chlorbenzimidazol (**54**) in 81 % Ausbeute.^[267] Die anschließende Reaktion mit dem Aminosäureester **46** wurde analog zu Route A durchgeführt. Allerdings konnte auch nach Basenzusatz keine Umsetzung zum Produkt **55** erreicht werden. Vermutlich wird die Reaktivität von Chlorbenzimidazol durch die *N*-Benzylgruppe gesenkt. Bei dem Versuch, die Reaktion durch Zugabe von Silberfluorid zu unterstützen, entstand bei einer Temperatur von 120 °C das Dimethylamino-substituierte Benzimidazol **56** zu 90 % durch Reaktion mit dem Lösungsmittel DMF.

4.8 Optimierung der Festphasensynthese der RGD-Mimetika

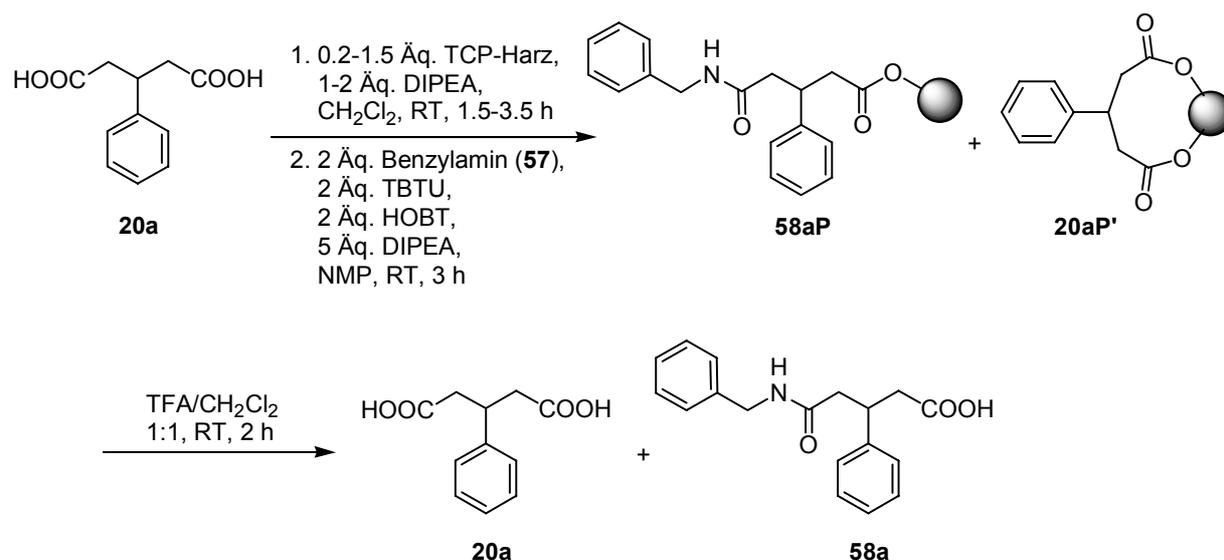
Die verschiedenen Bausteine **A-D** sollten anschließend zur Parallelsynthese von RGD-Mimetika-Bibliotheken an fester Phase eingesetzt werden. Die Festphasensynthese wurde nach der Fmoc-Strategie mit TCP-Harz als polymerem Trägermaterial durchgeführt, wobei die einzelnen Kupplungen zunächst am Beispiel ausgewählter Verbindungen optimiert werden sollten. Zur Optimierung wurden jeweils die unsubstituierten Säurebausteine **A₁** und **A₂** eingesetzt. Nach der Umsetzung mit Baustein **C**, Aminobenzoesäure oder Aminopentansäure, wurden die Verbindungen an fester Phase guanyliert, amidinyliert oder dihydroimidazolyliert.

Anschließend sollten nach dem ausgearbeiteten Schema zwei Bibliotheken von Einzelsubstanzen – aza- und azacarba-RGD-Mimetika – hergestellt werden. Durch die Herstellung ausgewählter Verbindungen sollte die Auswahl der in der Synthese der Bibliotheken eingesetzten Bausteine optimiert werden. Zur Vereinfachung der Nummerierung harzgebundener Substanzen wird in dieser Arbeit folgende Nomenklatur verwendet: nach der Nummer wird jeweils der Buchstabe P (polymergebunden) angehängt.

4.8.1 Einführung des Säurebausteins A₂

Die Glutarsäuren **20** sollten für die Festphasensynthese an TCP-Harz gebunden werden. Für eine Verknüpfung mit dem Harz stehen dabei zwei Säuregruppen zur Verfügung, was zu Quervernetzung führen kann. Bei Quervernetzung der Glutarsäure würde zum einen ein Teil des Bausteins für weitere Kupplungen verloren gehen (geringere Ausbeute), zum anderen müsste die, nach der Abspaltung vom Harz vorliegende, Glutarsäure abgetrennt werden (geringere Reinheit). Es muss daher die Frage geklärt werden, inwieweit die direkte Anknüpfung möglich ist oder ob eine Säuregruppe vorher geschützt werden muss. Als Modellverbindung für die Untersuchung dieser Reaktion wurde 3-Phenylglutarsäure **20a** verwendet.

Schema 4.11 zeigt die Kupplung von **20a** an TCP-Harz, die nach 1.5 bis 3 Stunden durch Zugabe von Methanol abgebrochen wurde. Methanol dient zum Blockieren der noch freien Stellen am Harz (*capping*). Die freie Säurefunktion der harzgebundenen 3-Phenylglutarsäure (**20aP**) wurde unter Standardbedingungen (TBTU, HOBt, DIPEA) mit Benzylamin (**57**) umgesetzt. Dadurch kann man erkennen, ob eine der Säurefunktionen frei ist oder ob die Glutarsäure quervernetzt am Harz vorliegt bzw. wie groß der Grad der Quervernetzung ist. Anschließend wurden die Produkte mit Trifluoressigsäure (TFA) vom Harz abgespalten.



Schema 4.11: Untersuchung der Harzbelegung mit dem Säurebaustein A₂ am Beispiel der 3-Phenylglutarsäure (**20a**).

Die Produkte wurden mittels HPLC und NMR-Spektroskopie analysiert. Da sich durch die Reaktion mit Benzylamin das Absorptionsverhalten verändert, musste das Verhältnis von Produkt **58a** zu Edukt **20a** durch NMR-Untersuchungen quantifiziert werden. Als Referenz wurden die Methylenprotonen des Benzylamins von **58a** ($\delta = 4.43$ ppm in CDCl₃) und das β -Proton der Phenylglutarsäure von **20a** ($\delta = 3.43$ ppm) bzw. **58a** ($\delta = 3.32$ ppm) untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Durch den Einsatz von **20a** im Überschuss (Konzentration: 0.3 M) sollte der Grad der Quervernetzung niedrig gehalten werden. Ein 5-facher Überschuss führte nach 1.5 Stunden und ein bzw. zwei Äquivalenten Base jeweils zu einem Verhältnis Produkt zu Edukt von 1:2 (**R1** und **R2**). Unter Verwendung eines zweifachen Überschusses wurde dagegen kein Produkt erhalten (**R3**). Der Versuch, durch Zugabe von Methanol während der Reaktion die Quervernetzung in einer Konkurrenzreaktion zu unterdrücken, führte zu einer Verbesserung des Verhältnisses auf 1:1 (**R4**). Ebenso ergab die Verwendung eines Unterschusses von **20a** ein Verhältnis von 1:1 (**R5** und **R6**).

Tabelle 4.5: Belegung von TCP-Harz mit 3-Phenylglutarsäure (**20a**).

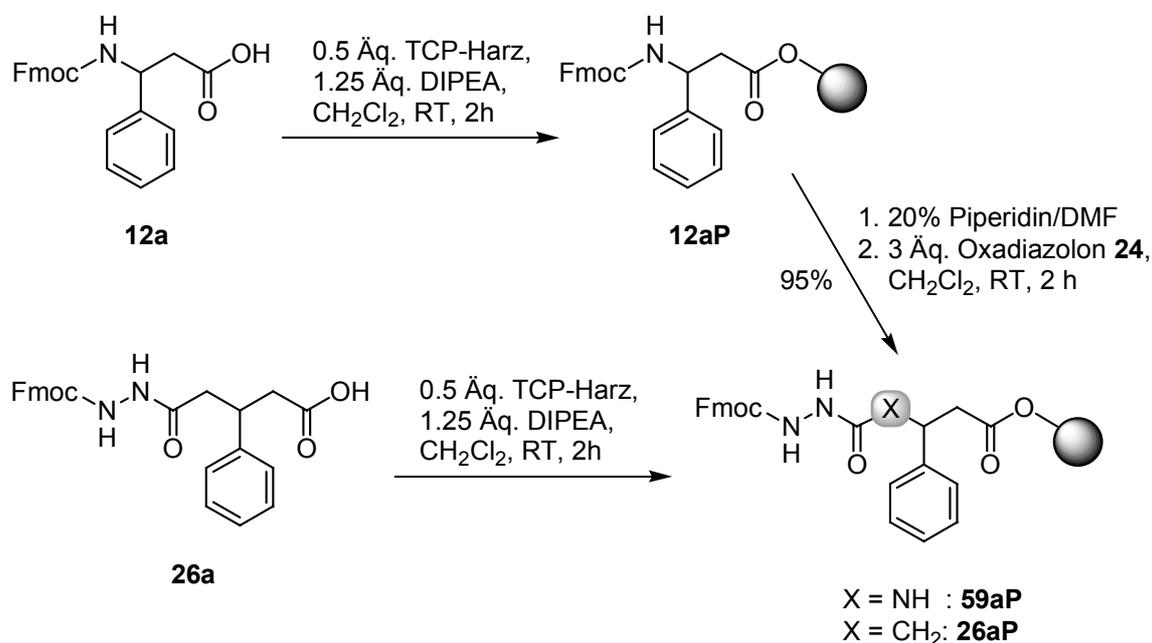
Rkt.	max. th. Harzbel. [mmol]	inges. Menge 20a [mmol]	Rkts.- Zeit [h]	Menge DIPEA [Äq.]	Verhältnis 28a : 20a	
R1	0.10	0.48	1.5	1.0	1:2	
R2	0.10	0.48	1.5	2.0	1:2	
R3	0.14	0.30	3.0	1.0	0:1	
R4	0.14	0.30	3.0	2.0 + 1.5	1:1	<i>capping</i> mit MeOH während der Reaktion
R5	0.48	0.30	3.5	1.5	1:1	
R6	0.19	0.15	2.0	1.2	1:1	

Die quervernetzte Glutarsäure kann in der anschließenden Festphasensynthese der RGD-Mimetika nicht mitreagieren und führt deshalb nicht zu Nebenprodukten. Allerdings wird sie zum Schluss ebenfalls vom Harz abgespalten. Da die RGD-Mimetika nach der Abspaltung in der Regel mittels präparativer HPLC gereinigt werden müssen, kann die Glutarsäure vermutlich auf diese Weise abgetrennt werden.

Aus diesem Grund wurde die Festphasensynthese nach einer Harzbelegung mit ca. 50 % Quervernetzung am Beispiel eines RGD-Mimetikums untersucht. Die Synthese wurde entsprechend der Herstellung der azacarba-Verbindung **76a** durchgeführt (siehe folgende Kapitel). Die Ausbeute nach Abspaltung vom Harz war mit ca. 40 % (bezogen auf die Harzbelegung) erwartungsgemäß gering. Die Reinigung mittels HPLC führte allerdings zu weiteren Problemen. Zum einen besitzen das Produkt **76a** und die Glutarsäure **20a** ähnliche Retentionszeiten (10-60 % in 30 min: R_t (**76a**) = 17.0 min und R_t (**20a**) = 16.2 min, breit). Zum anderen ist das von **20a** erzeugte Signal sehr breit, weshalb eine Abtrennung des RGD-Mimetikums **76a** nicht möglich war. Deshalb wurden die Säurebausteine **A**₂ zunächst in Lösung mit dem Baustein **B**₂ umgesetzt (siehe Kapitel 4.5).

4.8.2 Synthese der festphasengebundenen Bausteine AB

Schema 4.12 zeigt die Anknüpfung der Fmoc-geschützten Bausteine A_1 bzw. A_2B_2 an TCP-Harz, wobei der Säurebaustein in zwei-fachem Überschuss eingesetzt wurde. Die nach der Belegung des Harzes noch freien Anknüpfungsstellen wurden durch Zugabe von Methanol blockiert (*capping*), um Nebenreaktionen zu verhindern. Durch Auswaage des getrockneten Harzes wurde die Harzbelegung bestimmt. Sie betrug für Baustein A_1 (**12aP**) 0.58 mmol/g belegtes Harz, für Baustein A_2B_2 (**26aP**) 0.56 mmol/g belegtes Harz. In trockenem Zustand lassen sich die Fmoc-geschützten festphasengebundenen Bausteine problemlos einige Monate lagern.

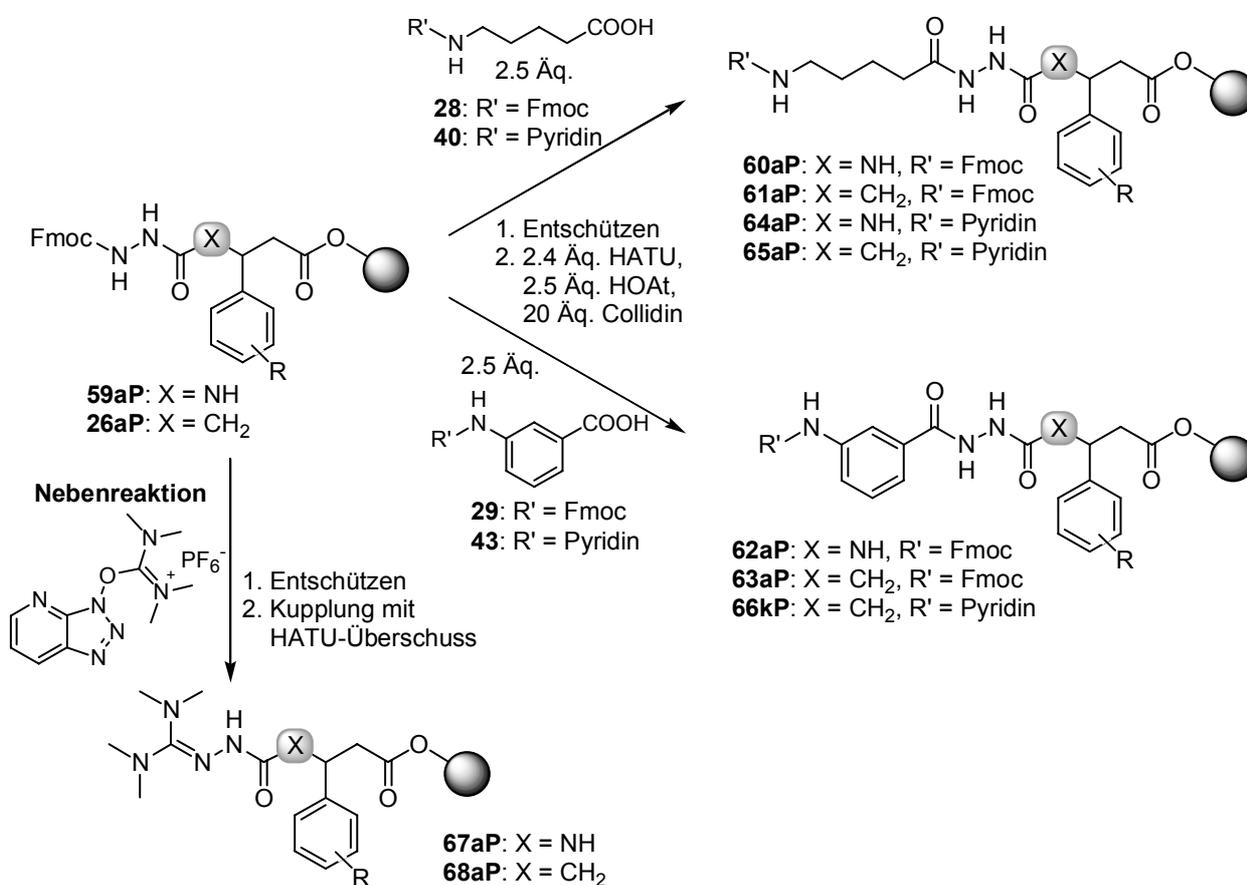


Schema 4.12: Synthese der festphasengebundenen Bausteine AB am Beispiel des unsubstituierten Säurebausteins **12a** bzw. **26a**.

Der festphasengebundene, Fmoc-geschützte Baustein A_1 (**12aP**) wurde anschließend mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF entschützt und mit dem aktivierten Baustein B_1 , dem Oxadiazolon **24**, in CH₂Cl₂ umgesetzt. Zur Bestimmung der Kupplungsausbeute wurde das harzgebundene Produkt **59aP** sauer von der Festphase abgespalten. Die mittels HPLC bestimmte Ausbeute betrug 95 %.

4.8.3 Einführung des Spacerbausteins C an fester Phase

Für die Anknüpfung an die festphasengebundenen Bausteine **AB**, **26aP** und **59aP**, wurde die Säuregruppe des *N*-terminal geschützten Spacers **C** mit dem Kupplungsreagenz HATU aktiviert. Der zunächst entstehende HOAt-Aktivester des Spacers reagiert mit dem entschützten, harzgebundenen Hydrazin (siehe Schema 4.13). Diese Reaktion wurde mit einem 2.5-fachen Spacer-Überschuss durchgeführt. Dabei wurden die Einzelbausteine **C** (**28** und **29**), sowie die kombinierten Bausteine **CD** (**40** und **43**) eingesetzt. Die Reaktion von **43** mit dem Dichlor-substituierten Baustein **26k** wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.



Schema 4.13: Kupplung der Spacerbausteine **C** bzw. der kombinierten Bausteine **CD**.

Während die Ausbeuten der Umsetzungen mit den Spacern **C** (**28** und **29**) bei 100 % lagen, entstand bei der Reaktion mit dem kombinierten Baustein **40** zu 60 bzw. 80 % ein Nebenprodukt. Mithilfe von HPLC/MS- und NMR-Untersuchungen konnten die Nebenprodukte als Tetramethylguanidine **67a** und **68a** identifiziert werden. Diese

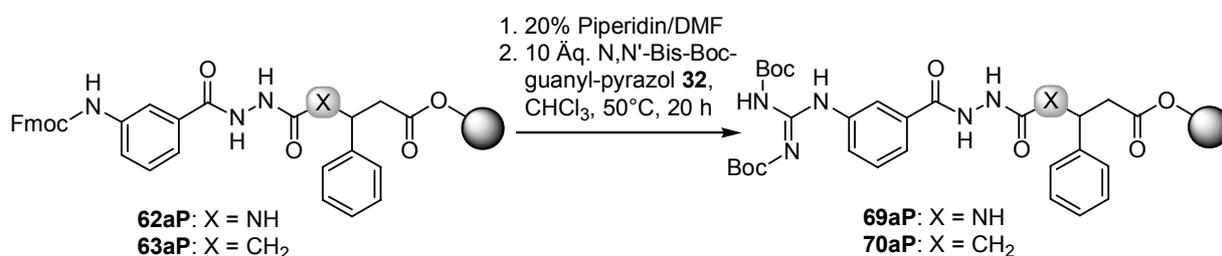
entstehen, wenn HATU im Vergleich zur Säure im Überschuss eingesetzt wird. Das Kupplungsreagenz wird dann nicht vollständig für die Aktivesterbildung verbraucht und reagiert mit dem harzgebundenen Hydrazin unter Abspaltung von HOAt zum entsprechenden Tetramethylguanidin.

Die Nebenreaktion lässt sich dadurch erklären, dass Baustein **40** wegen eines hohen Salzanteils im Unterschuss zum Kupplungsreagenz eingesetzt wurde. Eine Wiederholung mit dem salzfreien Baustein ergab eine Kupplungsausbeute von 100 %.

4.8.4 Untersuchung der Guanylierung an fester Phase

Durch die Umsetzung mit dem Spacerbaustein **C** wurden geschützte, harzgebundene Amine und Aniline erhalten. Amine sind wegen ihrer höheren Nucleophilie reaktiver als Aniline. Für die Überprüfung der Guanylierung an fester Phase wurden deshalb die Anilinderivate (aromatischer Spacerbaustein **C**) untersucht.

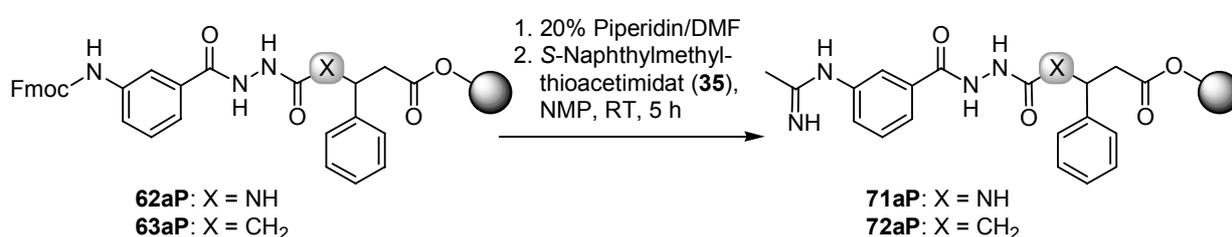
Schema 4.14 zeigt die Guanylierung der harzgebundenen Aniline **62aP** und **63aP** nach Entschützung mit Piperidin. Hierfür wurde *N,N'*-Bis-Boc-guanyl-pyrazol **32**, verwendet, das für die Reaktion mit Anilinen an fester Phase in unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht wurde.^[225] Die Umsetzung wurde bei einer Temperatur von 50 °C in einem Glasgefäß durchgeführt, das mit CHCl₃-Dampf gesättigt war. Später wurde hierfür ein beheizbarer Reaktionsblock mit Schüttler verwendet, der eine bessere Kontrolle der Reaktion erlaubt. Die hohe Reinheit der Produkte **69a** und **70a** nach Abspaltung vom Harz (Umsetzung 95 %) zeigt die Anwendbarkeit der Guanylierung an fester Phase für die Parallelsynthese.



Schema 4.14: Festphasensynthese der guanidinylierten RGD-Mimetika **69aP** und **70aP**.

4.8.5 Untersuchung der Amidinylierung an fester Phase

Die Einführung des Methylamidins sollte – wie die Guanylierung – durch Umsetzung mit harzgebundenen Anilinen durchgeführt werden. Als Amidinylierungsreagenz wurde *S*-2-Naphthylmethylthioacetimidat-hydrobromid (**35**) verwendet (siehe Kapitel 4.7.2). Es gibt bislang keine Untersuchungen zur Verwendung von (Thio)-Acetimida-ten an fester Phase. Schema 4.15 zeigt die Umsetzung des Amidinylierungs-reagenz **35** mit der **62aP** (X = NH) und **63aP** (X = CH₂) nach Abspaltung der Schutzgruppe.



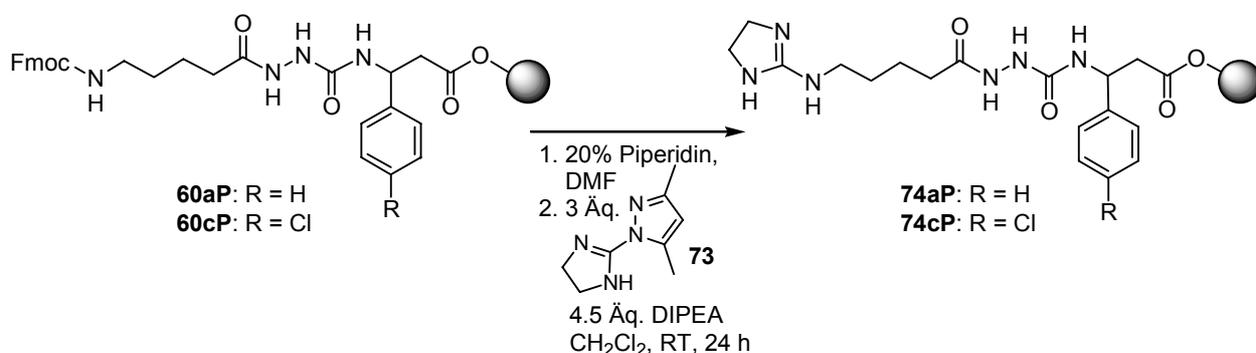
Schema 4.15: Amidinylierung der harzgebundenen Aniline **62aP** und **63aP** zu den Amidinen **71aP** und **72aP**.

Um eine Protonierung des Anilins durch Hydrobromid und damit eine Desaktivierung zu verhindern, wurde DIPEA als Base zur Reaktionslösung zugesetzt. Es konnte nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden und Abspaltung vom Harz allerdings keine Umsetzung zu den harzgebundenen Amidinen **71aP** und **72aP** beobachtet werden. Das Thioacetimidat **35** zersetzt sich vermutlich im nicht-protonierten Zustand relativ schnell und steht für eine Reaktion nicht mehr zur Verfügung. Bei Verzicht auf eine Base führte die geringe Löslichkeit des Thioacetamidsalzes **35** zu einem weiteren Problem. Bei der Untersuchung verschiedener Lösungsmittel, die in der Festphasensynthese mit TCP-Harz eingesetzt werden können (CH₂Cl₂, CHCl₃, DMF, NMP) erwies sich NMP noch als bestes Lösungsmittel. Allerdings war die für einen dreifachen Überschuss **35** verwendete Konzentration von 0.15 mmol/mL für eine vollständige Lösung der Verbindung zu hoch. Deshalb wurde die Suspension von **35** in NMP nicht durch die Spritze aufgezogen, sondern nach Abnahme des Stempels von der anderen Seite zugegeben.

Die Durchführung der Reaktion ohne Zugabe einer Base ergab nach 5 h die gewünschten Produkte **71a** und **72a** zu 95 %. Die Amidinylierung kann somit zur Synthese von RGD-Mimetika-Bibliotheken an fester Phase verwendet werden.

4.8.6 Einführung von Dihydroimidazol an festphasengebundene Amine

Die Reaktion von 4,5-Dihydroimidazol mit festphasengebundenen Aminen wurde bereits von Corbett *et al.* beschrieben.^[180] Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden die aza-Verbindungen **60aP** und **60cP** mit 2-(3,5-Dimethylpyrazolyl)-4,5-dihydroimidazol (**73**) bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂ umgesetzt.



Schema 4.16: Einführung von Dihydroimidazol an fester Phase.

Eine Analyse der Rohprodukte nach Abspaltung vom Harz zeigte jedoch nur zu 35-40 % die gewünschten Produkte **74a** und **74c**, während zu jeweils 30 % zwei Nebenprodukte entstanden waren. Bei einem Nebenprodukt handelte es sich um die entschützten Amine **60a** und **60c** aufgrund unvollständiger Kupplung. Das andere Nebenprodukt hatte eine um *m/z* 13 größere Molekülmasse und konnte nicht identifiziert werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf mehrere Tage, die Verwendung von DMF als Lösungsmittel und einer geringeren Menge der Base, sowie eine nachträgliche Zugabe von 3 Äquivalenten **73** ergaben keine Verbesserung der Ausbeute. Eventuell könnte man durch eine höhere Reaktionstemperatur den Umsatz steigern. Für den Einsatz in der Bibliothekssynthese müsste diese Reaktion allerdings noch verbessert werden.

4.8.7 Abspaltung der RGD-Mimetika vom Harz

Der Trityl-Linker, über den die synthetisierten RGD-Mimetika an das TCP-Harz gebunden sind, erlaubt eine Abspaltung vom Harz mit schwachen Säuren, wie Essigsäure oder Hexafluor-*iso*Propanol (HFIP). Für die Abspaltung wurde entweder eine Mischung aus 20 % AcOH, 20 % TFE in CH₂Cl₂ oder 20 % HFIP in CH₂Cl₂ verwendet. Das Harz wurde je einmal 90 min, 30 min und 3 min mit der Abspalllösung behandelt. Da die RGD-Mimetika für die biologischen Untersuchungen eine Reinheit >95 % haben sollten, wurden sie anschließend mittels präoperativer HPLC gereinigt. Dabei sank die Ausbeute meist sehr stark um 30-70 %.

Die Boc-geschützten, guanylierten Verbindungen **69** und **70** müssen nach der Abspaltung vom Harz noch mit TFA entschützt werden. Durch Verwendung von TFA zur Abspaltung der Verbindungen vom Harz kann ein Arbeitsschritt gespart werden. Da eine hohe TFA-Konzentration zur Bildung von Nebenprodukten führen kann, wurde als Abspalllösung eine 1:1-Mischung aus TFA und CH₂Cl₂ (mit 5 % TIPS) verwendet.^[225] Triisopropylsilan (TIPS) dient als sogenannter *scavenger* zum Abfangen reaktiver, kationischer Zwischenprodukte.

Die Verwendung einer 50 %igen TFA-Lösung für die Entschützung guanylierter RGD-Mimetika führt zu der Frage, inwiefern die Reaktionszeit verändert werden muss, um eine vollständige Entfernung der Boc-Schutzgruppen zu erreichen. Zur Untersuchung der Reaktionskinetik wurde das Bis-Boc-geschützte azacarba-RGD-Mimetikum **68e** zunächst mit HFIP vom Harz abgespalten. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde die Entschützung mit einer 1:1-Mischung aus TFA und CH₂Cl₂ (+ 5 % TIPS) untersucht (siehe Abbildung 4.7).

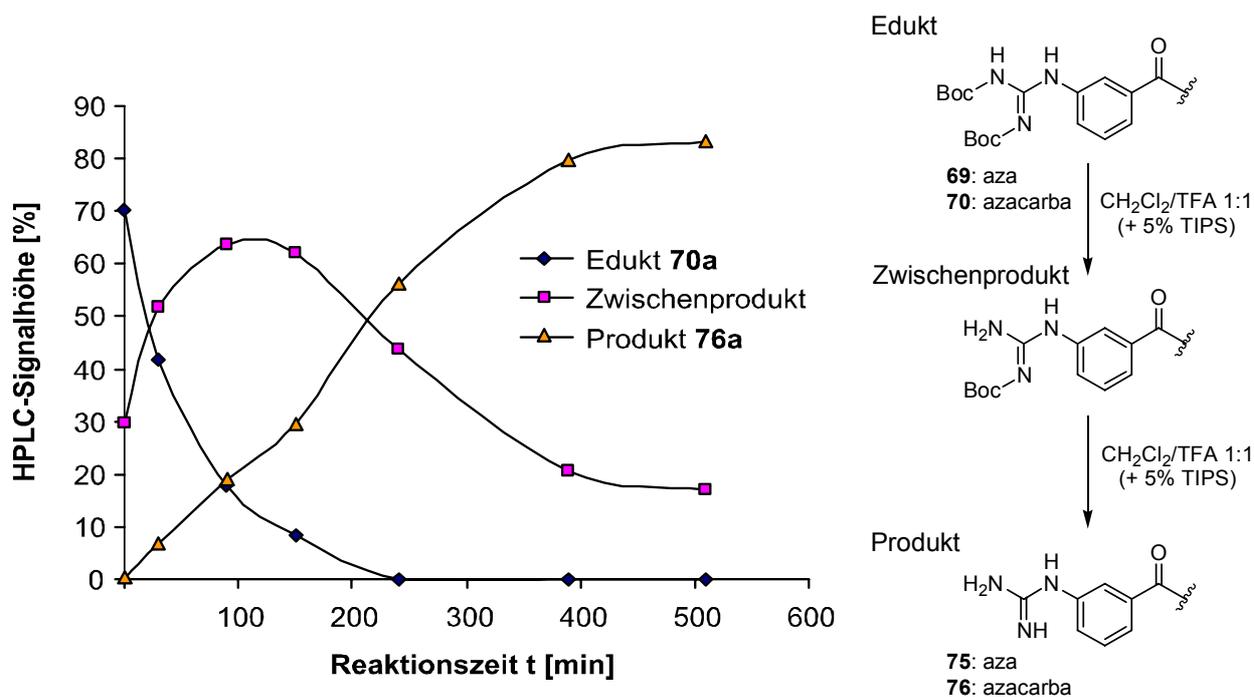


Abbildung 4.7: Untersuchung der Boc-Entschützung am Beispiel des azacarba-RGD-Mimetikums **70e**.

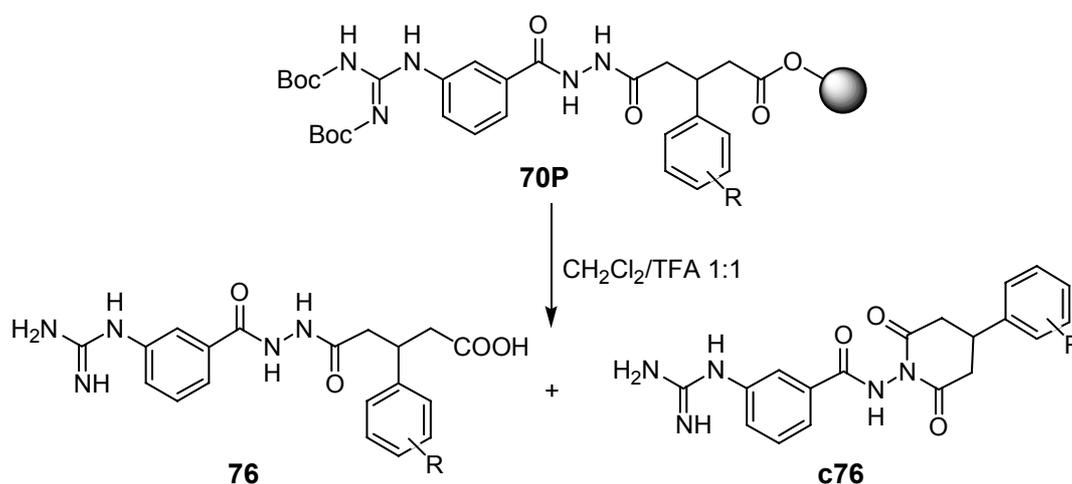
Die Entschützung verläuft relativ langsam. Nach 4 Stunden ist das Edukt **70e** vollständig zum mono-Boc-geschützten Zwischenprodukt umgesetzt. Die Abspaltung der zweiten Boc-Gruppe zum Produkt **76e** ist jedoch auch nach 6 bis 7 Stunden erst zu ca. 85 % verlaufen. Trotz dieses Reaktionsverlaufs erhält man bei der Abspaltung der RGD-Mimetika vom Harz innerhalb von zwei Stunden nahezu vollständig das zweifach entschützte Produkt. Dieser vermeintliche Widerspruch ergibt sich vermutlich aus der Aufkonzentration der TFA bei der Entfernung des Lösungsmittelgemischs.

Nebenreaktion bei der Abspaltung

Bei der Abspaltung des azacarba-RGD-Mimetikums **76a** vom Harz mit Trifluoressigsäure trat eine Nebenreaktion auf, die von C. Gibson bei einer ähnlichen *N*-alkylierten Verbindung ebenfalls beobachtet wurde (siehe Schema 4.17).^[225] Die HPLC-MS-Analyse zeigte neben dem gewünschten Produkt ein unpolares Nebenprodukt mit einer um *m/z* 18 reduzierten Molekülmasse.

Durch 2D-NMR-Untersuchungen konnte die Struktur des Nebenprodukts aufgeklärt werden (am Beispiel der in Kapitel 4.11 beschriebenen Verbindung **c64k**). Dabei handelt es sich um das cyclische Kondensationsprodukt einer Hydrazin-NH-Gruppe mit der freien Säure. Diese intramolekulare Cyclisierung wird vermutlich durch saure Katalyse der TFA ermöglicht und durch die Bildung des Sechsrings begünstigt.

Dieses Nebenprodukt wurde auch später bei einigen guanylierten **azacarba**-RGD-Mimetika beobachtet: **74a** (30 %), **74b** (30 %), **74c** (20 %), **74d** (10 %), **74e** (10 %), **74k** (30 %). Im Fall guanylierter **aza**-RGD-Mimetika trat diese Reaktion bei der Abspaltung vom Harz nur selten und maximal zu 5 % auf. Diese Nebenreaktion konnte unterdrückt werden, indem die Abspatlösung mit Dioxan verdünnt wurde. Da Dioxan (101 °C) einen höheren Siedepunkt besitzt als TFA (72 °C), wurde so eine zu hohe



Säurekonzentration verhindert.

Schema 4.17: Entstehung der cyclischen Nebenprodukte **c76** durch sauer katalysierte Kondensation bei der Abspaltung vom Harz.

Die Cyclisierung wurde erstaunlicherweise auch nach der HPLC-Trennung der **aza**-RGD-Mimetika **64b** und **64o** zu jeweils 20 % beobachtet. Diese Nebenprodukte entstanden allerdings erst bei der Entfernung der HPLC-Lösungsmittel, die 0.1 % TFA enthalten, durch die Aufkonzentration der Säure. Durch Lyophilisieren der Lösungsmittel wird die Aufkonzentration und damit die Bildung der cyclischen Produkte verhindert.

4.9 Festphasensynthese der RGD-Mimetika-Bibliotheken

Nachdem die unterschiedlichen Reaktionen für den Aufbau von aza- und azacarba-RGD-Mimetika an fester Phase optimiert worden waren, konnte die Parallelsynthese der Bibliotheken in Angriff genommen werden. Ziel der Bibliothekssynthese sollte es sein, durch eine Kombination aus rationalem und kombinatorischem Ansatz Verbindungen mit verbesserten Eigenschaften bezüglich biologischer Aktivität und/oder pharmakokinetischer Parameter herzustellen. Aus diesem Grund sollten die Bibliotheken nicht alle möglichen Kombinationen der vorgestellten Bausteine **A-D** beinhalten.

4.9.1 Synthese ausgewählter RGD-Mimetika

Um für die Parallelsynthese der Bibliotheken eine sinnvolle Auswahl der einzusetzenden Bausteine treffen zu können, wurden zu den bereits beschriebenen RGD-Mimetika weitere Verbindungen synthetisiert (siehe Tabelle 4.6).

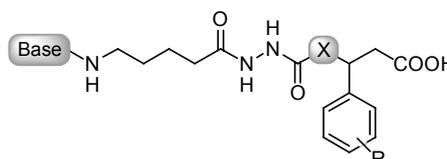


Tabelle 4.6: Ausgewählte RGD-Mimetika.

Verb.	analog	Rest R	X	Base	Auswirkung
77a	75a	H	NH	Guanidin	20-fach geringere
78a	76a	H	CH ₂	Guanidin	α v β 3-Affinität /
77c	75c	Cl	NH	Guanidin	geringere α I II β 3-
78c	76c	Cl	CH ₂	Guanidin	Selektivität
64n	64	(H)	NH	Aminopyridin	
65n	65	(H)	CH ₂	Aminopyridin	Verlust
64o	64	(<i>iso</i> Prop)	NH	Aminopyridin	der α v β 3-
64p	64	(Nip) ^a	NH	Aminopyridin	Affinität
64h	64a	2-NO ₂	NH	Aminopyridin	
64g	64a	4-Phenyl	NH	Aminopyridin	später synthetisiert

^a Nip : Nipecotinsäure als Baustein **A**₁.

Diese RGD-Mimetika wurden analog den in den vorhergehenden Kapiteln besprochenen Synthesen hergestellt. Dabei sollten vor allem die Kombination verschiedener Spacer- und Basenbausteine, sowie die Bedeutung des Aromaten am Säurebaustein untersucht werden. Die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wird in Kapitel 5.2 beschrieben. An dieser Stelle soll nur kurz die Bedeutung einzelner Gruppen bzw. Kombinationen im Hinblick auf die Parallelsynthese der Bibliotheken angesprochen werden.

Bei der Verwendung des Alkylspacers in Kombination mit Guanidin als Base (RGD-Mimetika **77a,c** und **78a,c**) verliert man aufgrund von Entropie-Effekten $\alpha\beta3$ -Integrinaffinität (bis zu 50-fach) und Selektivität gegenüber $\alpha\text{IIb}\beta3$ (bis zu 400-fach). Für die Parallelsynthese wurde Guanidin deshalb nur in Kombination mit Arylspacer eingesetzt. Da dieser Effekt bei Amidin als Base ebenfalls zu erwarten ist, wurde auch in diesem Fall nur der aromatische Spacer verwendet. Darüberhinaus wurde Amidin nur in azacarba-RGD-Mimetika eingebaut, von denen man sich bessere pharmakokinetische Eigenschaften erhoffte. Die Kombination aus Arylspacer und Aminopyridin als Basenbaustein (Verbindung **66k**) führte ebenfalls zu einem deutlichen $\alpha\beta3$ -Affinitätsverlust (40-fach). Deshalb wurde Aminopyridin nur in Verbindung mit einem Alkylspacer eingesetzt.

Der Einbau der Säurebausteine **A₁** und **A₂** führt zu hochaffinen Verbindungen. Deshalb wurden beide Bausteine für die Synthese der Bibliotheken verwendet. Die Entfernung des Aromaten von Baustein **A** (Verbindungen **64n,o,p**, **65n**) führt hingegen zu einem starken Affinitätsverlust, wie auch die Verwendung von *ortho*-Substituenten (Verbindung **64h**). Aus diesem Grund wurden ausschließlich aromatische Säurebausteine mit unterschiedlichen *meta*- und *para*-Substituenten eingesetzt.

4.9.2 Parallelsynthese von RGD-Mimetika-Bibliotheken

Abbildung 4.8 zeigt die Auswahl der Bausteine, die in der Synthese eingesetzt werden sollen. Durch die Unterteilung in aza- und azacarba-Verbindungen werden die beiden Bibliotheken **1** und **2** erhalten.

Für die Synthese von Bibliothek **1** werden 10 Säurebausteine **A**₁ und 2 Kombinationen aus Spacer und Basenbaustein verwendet und man erhält 20 Verbindungen. Bibliothek **2** enthält 8 verschiedene Säurebausteine **A**₂ und drei **CD**-Kombinationen, wodurch man 24 Verbindungen erhält.

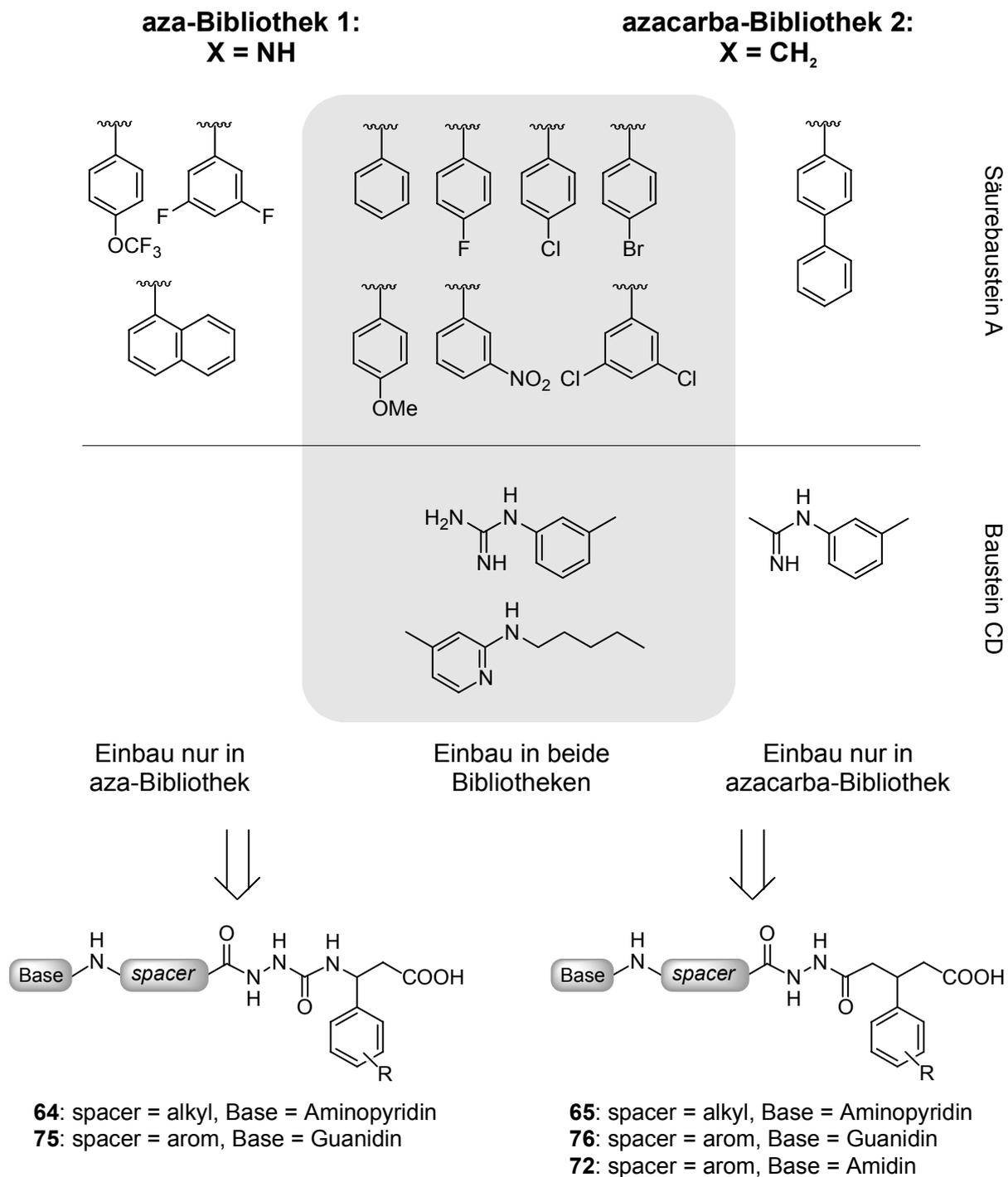


Abbildung 4.8: Bausteine **A** und **CD** für die Parallelsynthese der aza- und azacarba-RGD-Mimetika-Bibliothek.

Zur Durchführung der Parallelsynthese wurde für jede Verbindung ein eigenes Reaktionsgefäß verwendet (Spritze mit Fritte). Zunächst wurden die Bausteine **AB** an fester Phase entsprechend der in Kapitel 4.8.2 vorgestellten Synthese aufgebaut. Die Umsetzung von TCP-Harz mit Säurebaustein **A₁** ergab eine Harzbelegung zwischen 0.45 und 0.70 mmol/g belegtes Harz bzw. zwischen 0.36 und 0.56 mmol/g belegtes Harz für den kombinierten Baustein **A₂B₂** (siehe Kapitel 8.3.2, Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2). Die Aufteilung der Säurebausteine in einzelne Reaktionsgefäße fand im Anschluss an die Harzbelegung statt. Entsprechend der in Kapitel 4.8 beschriebenen Synthesen wurden die weiteren Bausteine **C** und **D** eingeführt. Nach der Abspaltung vom Harz wurden die einzeln hergestellten RGD-Mimetika mittels präparativer HPLC gereinigt.

Die Untersuchung der biologischen Aktivität dieser Verbindungen bezüglich verschiedenen Integrinrezeptoren wird in Kapitel 5 beschrieben.

4.9.3 Probleme bei der Synthese der RGD-Mimetika-Bibliotheken

Bei der Festphasensynthese einiger Amidine erfolgte keine vollständige Amidinylierung. Der Anteil des entsprechenden Anilins nach der Abspaltung vom Harz lag bei 10 % (**72c**), 15 % (**72d**) und 20 % (**72g**). Eventuell hatte sich das zur Amidinylierung verwendete Acetimidat **35** teilweise zersetzt. Die Reinigung dieser Verbindungen war problematisch, da analoge Aniline und Amidine sehr ähnliche Retentionszeiten besitzen. Die Ausbeute nach der HPLC-Reinigung sank bei diesen Verbindungen auf 10-15 %.

Bei der Synthese der zwei Nitroverbindungen **72i** und **75i** konnten die gewünschten Produkte nicht isoliert werden. Eine Untersuchung der harzgebundenen Säurebausteine zeigte, dass sich bereits diese Verbindungen vollständig zersetzt hatten. Die Lagerung festphasengebundener Nitroverbindungen ist auch unter Lichtausschluss nur kurze Zeit möglich.

4.10 Synthese der RGD-Mimetika in Lösung

Die Festphasensynthese ist für die Synthese von Verbindungs-Bibliotheken, d. h. einer größeren Anzahl an Verbindungen in kleiner Menge (Milligramm-Maßstab), ideal geeignet. Für die Herstellung einzelner Verbindungen in größerer Menge (Gramm-Maßstab) ist eine Übertragung von der Festphasen- auf die Lösungssynthese empfehlenswert. Sie ist kostengünstiger, die Reaktionszeiten in Lösung sind kürzer und größere Mengen sind besser zu handhaben. Das 3,5-Dichlor-substituierte aza-RGD-Mimetikum **64k** sollte für *in vivo*-Untersuchungen der Tumoraktivität in einer Menge von 400 mg hergestellt werden (siehe Kapitel 6.3). Aus diesem Grund wurde die Synthese der RGD-Mimetika in Lösung ausgearbeitet.

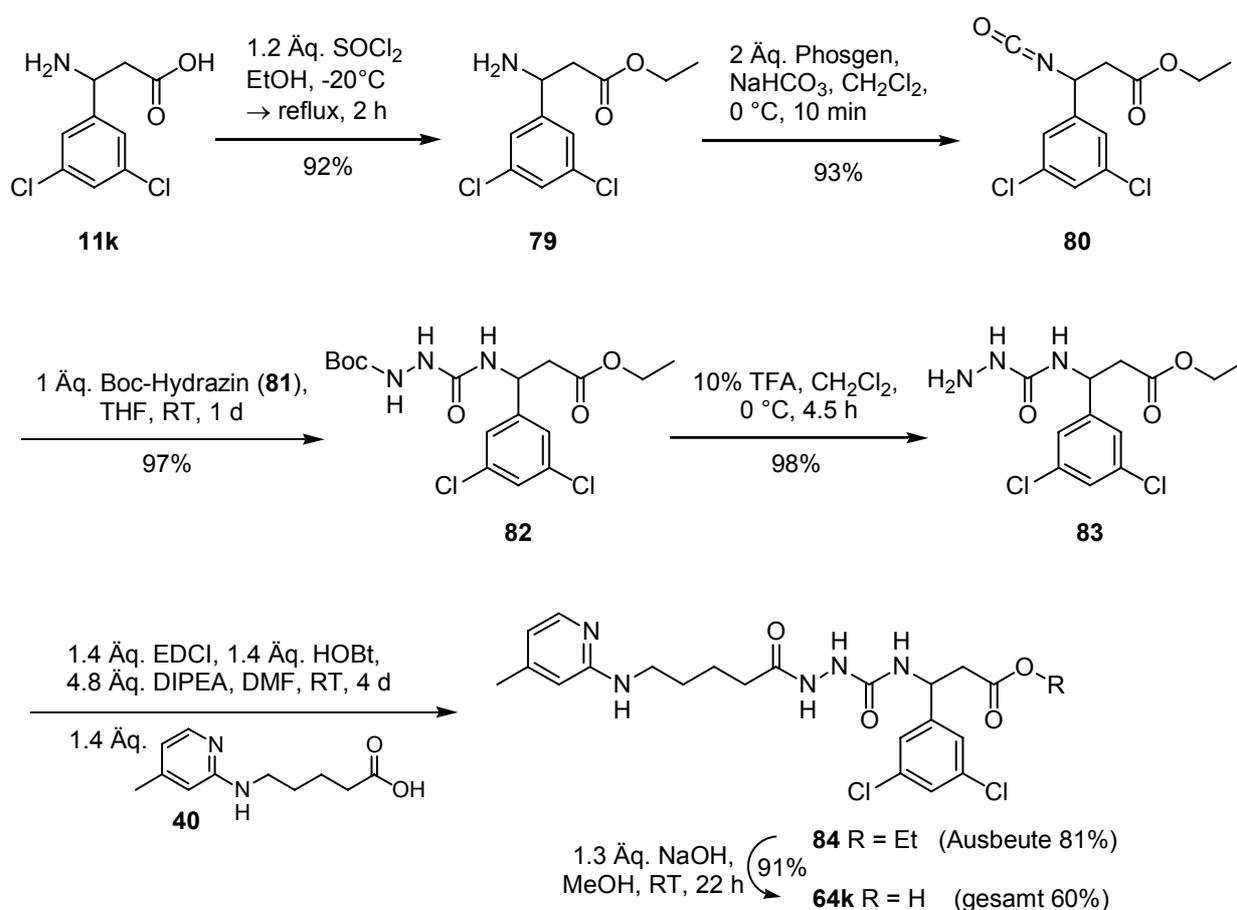
Der Aufbau der RGD-Mimetika soll dabei entsprechend dem Aufbau an fester Phase durchgeführt werden, d. h. angefangen mit dem Säurebaustein **A** in *N*-terminaler Richtung. Ein wichtiger Punkt der Synthese ist die Wahl einer geeigneten Schutzgruppenstrategie. Die in der Festphasensynthese verwendete Fmoc-Strategie eignet sich hierfür weniger gut, da die abgespaltene Schutzgruppe bzw. das für die Abspaltung verwendete Piperidin nur schlecht aus der Reaktionslösung entfernt werden kann. Eine häufig in der Lösungssynthese angewandte Methode ist die Verwendung der Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe. Bei Abspaltung mit Trifluoressigsäure entstehen lediglich CO₂ und *iso*Buten, die bei Raumtemperatur flüchtig sind. Ebenso lässt sich Trifluoressigsäure gut durch Destillation im Vakuum entfernen. Nach Festlegung der temporären Schutzgruppe ist man in der Auswahl der permanenten, *C*-terminalen Schutzgruppe stärker eingeschränkt:

- Die Schutzgruppe sollte einfach eingeführt werden können,
- sie muss unter den Abspaltungsbedingungen der Boc-Gruppe (stark sauer) stabil sein und
- die Verbindung muss stabil gegenüber den Abspaltungsbedingungen der permanenten Schutzgruppe sein.

Die Ethylestergruppe erfüllt diese Bedingungen. Sie wird im alkalischen Medium wieder entfernt.

4.10.1 Synthese von aza-RGD-Mimetika

Die Ausarbeitung der Lösungssynthese wurde am Beispiel der aza-Verbindung **64k** durchgeführt und ist in Schema 4.18 dargestellt. Der erste Schritt der Synthese bestand in der Einführung der permanenten Schutzgruppe. Die β -Aminosäure **11k** wurde in Ethanol suspendiert und mit Thionylchlorid versetzt, wobei der Ethylester **79** mit einer Ausbeute von 92 % erhalten wurde.



Schema 4.18: Ausarbeitung der Synthese des aza-RGD-Mimetikums **64k** in Lösung.

Die Einführung des aza-Glycins erfolgte durch Überführung der Aminogruppe in ein Isocyanat und Umsetzung mit *N*-Boc-Hydrazin (**81**). Zur Synthese des Isocyanats **80** wurde der Aminosäureester **79** mit einer Lösung von Phosgen in Toluol ähnlich der in Kapitel 4.4 beschriebenen Darstellung des aktivierten Bausteins **B₁** durchgeführt.^[268] Dazu wurde **79** in einer 1:1-Mischung aus CH₂Cl₂ und wässriger NaHCO₃-Lösung suspendiert und mit einem zweifachen Überschuss an Phosgen versetzt. Nach einer

Reaktionszeit von 10 Minuten konnte das Produkt **80** mit einer Ausbeute von 93 % isoliert werden. Anschließend wurde das Isocyanat **80** mit *N*-Boc-Hydrazin (**81**) in THF vollständig zu dem Boc-geschützten **A₁B₁**-analogen Baustein umgesetzt.

Vor der Umsetzung mit dem **CD**-Baustein **40** musste zunächst die Boc-Schutzgruppe entfernt werden. Bei der Entschützung von **82** mit 10 %iger TFA in CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur entstand nach 6 Stunden neben dem gewünschten Produkt **83** zu 15 % die mit TFA acetylierte Verbindung als Nebenprodukt. Nach Veränderung der Reaktionstemperatur auf 0 °C konnte **83** zu 100 % erhalten werden. Die Kupplung der Pyridylaminopentansäure **40** wurde nach gängigen Methoden der Peptidsynthese in Lösung durchgeführt. Zunächst wurde **40** mit je einem Äquiv. EDCI, HOBt und 3 Äquiv. DIPEA voraktiviert. Nach einer Stunde wurde **83** zugegeben und bei Raumtemperatur umgesetzt. Da die Reaktion nach 10 Stunden erst zu 50 % verlaufen war, wurden nochmals 0.4 Äquiv. der aktivierten Pyridylaminosäure zugegeben. Die Umsetzung zum Ethylester-geschützten Produkt **84** verlief sehr langsam und war erst nach 4 Tagen vollständig beendet. Durch mehrmalige Extraktion konnte der Überschuss an EDCI, HOBt und **40** entfernt werden. Die Ausbeute des isolierten Produkts betrug 81 %.

Zum Schluss musste die permanente Schutzgruppe wieder entfernt werden. Hierzu wurde der Ethylester **84** mit 1N NaOH über eine Reaktionszeit von 22 Stunden verseift. Das Produkt **64k** konnte bei einem pH-Wert von 5-6 gefällt und in einer Ausbeute von 91 % in hoher Reinheit (>95 %) isoliert werden. Die Gesamtausbeute der 6-stufigen Reaktion ausgehend von der β -Aminosäure **11k** betrug 60 %.

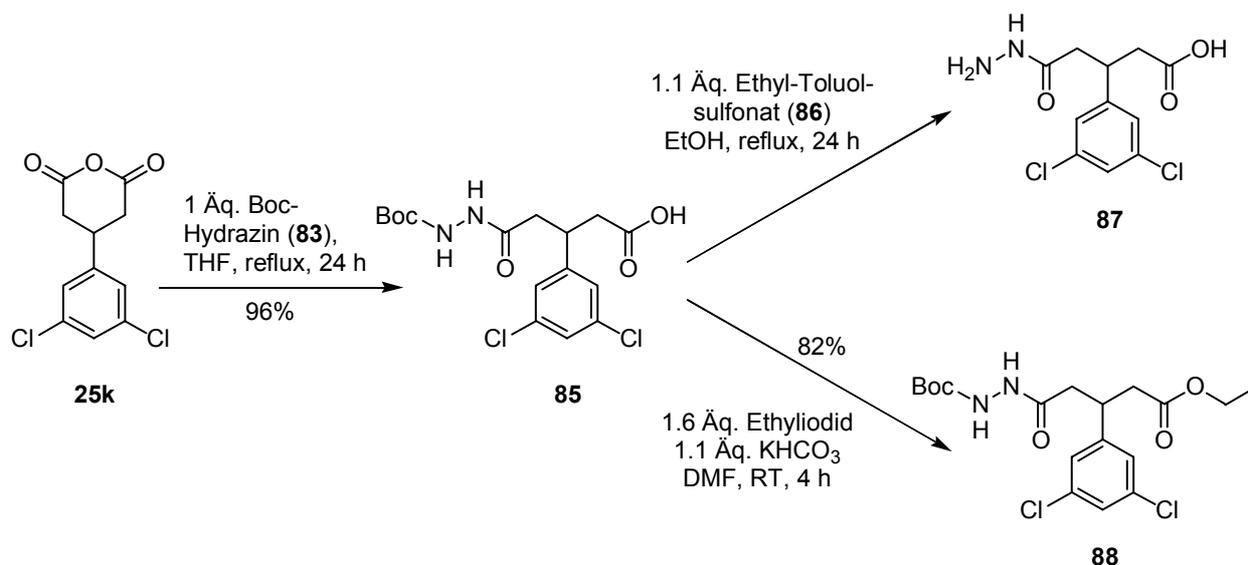
4.10.2 Synthese von azacarba-RGD-Mimetika

Die Synthese von azacarba-RGD-Mimetika in Lösung lässt sich relativ einfach durchführen. Der Unterschied zur Synthese der aza-RGD-Mimetika besteht im Aufbau des geschützten Bausteins **A₂B₂**. Schema 4.19 zeigt die Reaktion des Anhydrids **25k** mit *N*-Boc-Hydrazin (**81**) entsprechend den in Kapitel 4.5 beschriebenen Reaktionsbedingungen. Die Boc-geschützte Verbindung **85** konnte in einer Ausbeute von 96 %

isoliert werden. Für weitere Umsetzungen musste anschließend die freie Carbonsäure geschützt werden.

Die Veresterung einer freien Säure wird in der Regel sauer katalysiert durchgeführt. Das bei basischer Katalyse gebildete Carboxylation reagiert nur noch sehr langsam. Eine relativ milde Methode zur Veresterung wird von K. Ueda beschrieben.^[269] Dabei wird die entsprechende Säure in Ethanol bei 80 °C mit *para*-Toluolsulfonsäureethylester (**86**) umgesetzt. Bei der Durchführung dieser Reaktion mit der Säure **85** entstand jedoch als Hauptprodukt das Boc-entschützte Derivat **87**, während das gewünschte Produkt **88** nur in Spuren zu finden war. Daraufhin wurde eine Methode von Cervantes *et al.* untersucht, die mit KHCO_3 als fester Base in DMF arbeitet.^[270] Die Veresterung durch Zugabe eines Überschusses an Ethyliodid ergab das Produkt **88** nach 4 Stunden in einer Ausbeute von 82 % und hoher Reinheit.

Eine interessante Methode ist die von Chen *et al.* beschriebene Veresterung und gleichzeitige Entschützung einer Boc-geschützten Aminosäure.^[271] Hierbei wird die Aminosäure temporär mit TMS-Chlorid geschützt. Bei der Reaktion mit der Carbonsäure freiwerdendes HCl spaltet die Boc-Schutzgruppe und der Silylester reagiert mit dem als Lösungsmittel eingesetzten Alkohol.



Schema 4.19: *Synthese des doppelt geschützten, kombinierten azacarba-Bausteins A_2B_2 in Lösung.*

Mit den in diesem Kapitel dargestellten Synthesen lassen sich hochaffine und hochselektive Integrinantagonisten mit guten pharmakokinetischen Eigenschaften sehr einfach herstellen. Die Synthese des in der klinischen Entwicklung befindlichen cyclischen Peptids cyclo(RGDf[NMe]V) **2** ist sehr aufwändig und teuer. Die Herstellung der nichtpeptidischen aza- und azacarba-RGD-Mimetika ist dagegen im Vergleich unkompliziert und sehr günstig. Ausgehend von dem substituierten Benzaldehyd, Boc-Hydrazin, Aminopyridin und Brompentansäureethylester können die RGD-Verbindungen in 9 Synthesestufen in hohen Ausbeute hergestellt werden.

4.11 Synthese von Prodrugs

Durch den Einsatz von Prodrugs lassen sich Resorptionseigenschaften (orale Bioverfügbarkeit), sowie pharmakokinetische Parameter verbessern (siehe Kapitel 3.4). Die am häufigsten verwendete Modifizierung eines Wirkstoffs mit Carbonsäure ist die Esterfunktionalisierung mit Ethanol als Alkohol. Wichtig ist, dass bei der Zersetzung des Prodrugs im Körper keine toxischen Produkte gebildet werden. Der Einsatz amidischer Prodrugs ist wegen der hohen Stabilität seltener, aber auch möglich.

Das Prodrug-Konzept sollte am Beispiel des hochaffinen, oral verfügbaren aza-RGD-Mimetikums **64k** untersucht werden. Dazu sollten die in Abbildung 4.9 dargestellten Prodrugs synthetisiert werden. Die Verwendung von Ethylester-Prodrugs ist für verschiedene, oral verfügbare α IIb β 3-Antagonisten beschrieben, die sich teilweise in der klinischen Entwicklung befinden.^[272-275] Neben dem Ethylester sollte der Pivaloyloxymethylester (POM) hergestellt werden, der unter anderem im Bereich der β -Lactamantibiotika^[276], HIV-Hemmer wie PMEA (9-[2-(Phosphonomethoxy)-ethyl]adenine)^[277] oder Angiotensin-II-Antagonisten^[278] eingesetzt wurde. Als weitere, interessante Prodrug-Variante erschien das cyclische Diazandion, das durch sauer katalysierte Cyclisierung von **64k** synthetisiert werden sollte.

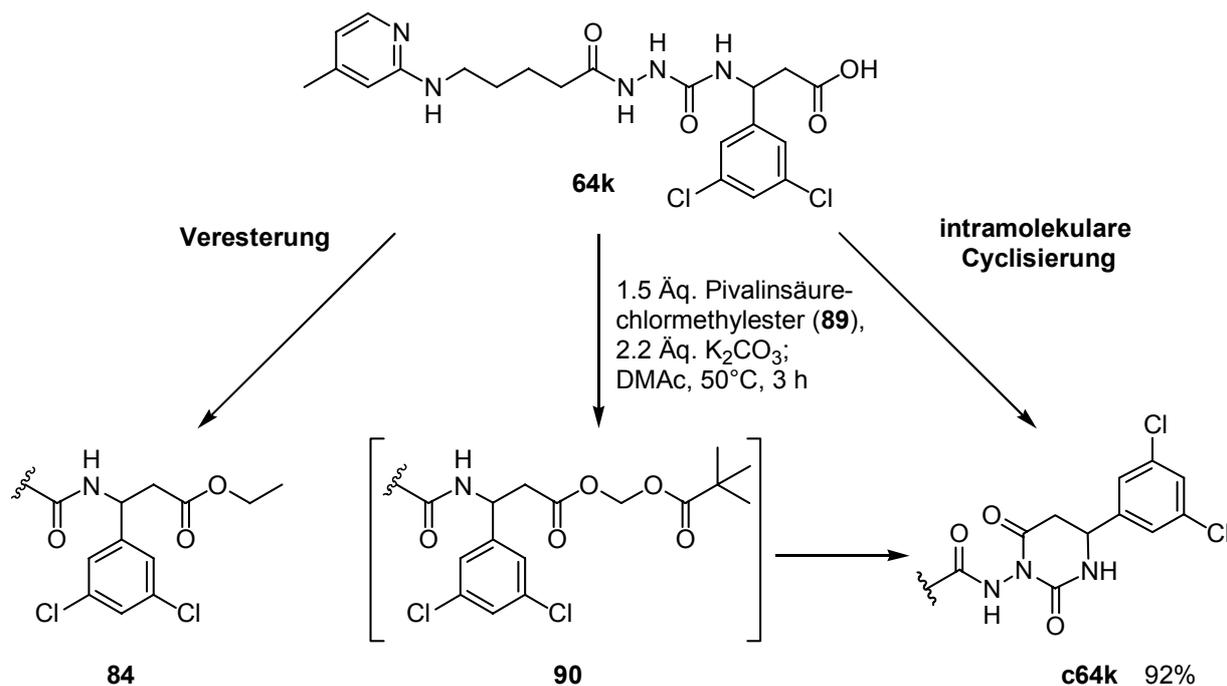


Abbildung 4.9: Prodrugs des aza-RGD-Mimetikums **64k**.

Die Synthese des Ethylesters **84** ist bereits in Kapitel 4.10.2 beschrieben. Zur Synthese des Pivaloyloxymethylesters **90** wurde das aza-RGD-Mimetikum **64k** in DMAc mit K₂CO₃ als Base und Pivalinsäurechloromethylester (**89**) umgesetzt.^[278] Die Umsetzung bei 50 °C war nach 3 h abgeschlossen, wobei als Produkt jedoch vollständig das bereits in Kapitel 4.8.7 beschriebene Kondensationsprodukt **c64k** entstand. Vermutlich reagiert der primär gebildete Pivalylester sofort durch intramolekulare Cyclisierung zu Verbindung **c64k** weiter. Nach Reinigung der Verbindung mittels präparativer HPLC wurde **c64k** ebenfalls als Prodrug eingesetzt. Die Ergebnisse der Pharmakokinetik-Untersuchung werden in Kapitel 6.1 beschrieben.

5 *IN VITRO*-STUDIEN VON RGD-MIMETIKA

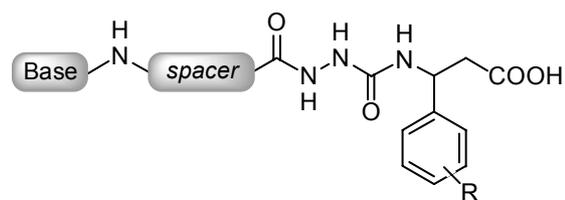
Die parallele Festphasensynthese der aza- und azacarba-RGD-Mimetika wurde mit dem Ziel durchgeführt, neue Integrinliganden zu finden. In diesem Kapitel werden die Bindungs-Affinitäten der Substanzen an den isolierten Integrinrezeptoren $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ und $\alpha IIb\beta 3$ untersucht. Die Untersuchungen wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, im Labor von Dr. S. Goodman durchgeführt.

5.1 Affinitäts-Studien an isolierten Integrinrezeptoren

Die verwendeten αv -Integrine wurden aus Plazenta und das $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin aus Blutplättchen menschlichen Ursprungs isoliert bzw. als lösliche Integrinrezeptoren gentechnisch hergestellt.^[279] Die natürlichen Liganden Vitronectin ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$), Fibronectin ($\alpha v\beta 6$) und Fibrinogen ($\alpha IIb\beta 3$) wurden aus humanem Plasma isoliert. Die immobilisierten Integrine wurden in einem Verdrängungsexperiment mit dem löslichen biotinylierten Liganden und der Testsubstanz inkubiert. Aus Messungen bei verschiedenen Konzentrationen ließ sich nach enzymatischer Anfärbung des biotinylierten Liganden photometrisch die Inhibierungskonstante (IC_{50}) bestimmen. IC_{50} ist die Konzentration an Testsubstanz, die benötigt wird, um 50 % der maximalen Rezeptorinhibierung zu erreichen. Definitionsgemäß ist eine Verbindung ein um so *stärkerer* Inhibitor des entsprechenden Rezeptors je *kleiner* die IC_{50} -Konstante ist.

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen sind in Tabelle 5.1 (Bibliothek 1) und Tabelle 5.2 (Bibliothek 2) zusammengefasst. Der in den Tabellen angegebene $cLog P$ ist ein Maß für die Lipophilie der Verbindung (siehe Kapitel 3.2.1).

Tabelle 5.1: Inhibierungsuntersuchung der aza-RGD-Mimetika (Bibliothek 1) bezüglich ihrer Bindung an verschiedene Integrine.



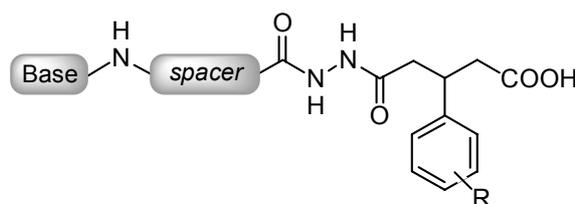
Verb.	R	Base ^b	Spacer ^c	cLog P	Integrin, IC ₅₀ [nM] ^a			
					αvβ3	αvβ5	αvβ6	αIIbβ3
	GRGDSPK ^d	—	—	-8.03	1000	—	—	>10 ⁴
1	c(RGDfV) ^d	—	—	-2.53	2	—	—	850
9^e	(carboxamid)	Gua	aryl	-2.42	150	6000	10 ⁴	>10 ⁴
75a	H	Gua	aryl	0.70	0.8	280	n.b.	8500
75b	4-F	Gua	aryl	0.86	5.7	1000	8.8	10 ⁴
75c	4-Cl	Gua	aryl	1.26	0.1	100	6.0	5500
75d	4-Br	Gua	aryl	1.53	1.3	>100	4.0	>1000
75e	4-OCH ₃	Gua	aryl	0.58	0.9	>1000	4.3	>1000
75f	4-OCF ₃	Gua	aryl	2.23	3.5	10 ⁴	4.3	>1000
75j	3-F,5-F	Gua	aryl	1.02	5.7	>100	12	>1000
75k	3-Cl,5-Cl	Gua	aryl	1.82	1.0	>100	1.4	>1000
75l	(1-Naphthyl)	Gua	aryl	1.70	27	>1000	110	>10 ⁴
64a	H	Apy	alkyl	1.64	37	10 ⁴	32	>10 ⁴
64b	4-F	Apy	alkyl	1.80	48	>1000	23	>10 ⁴
64c	4-Cl	Apy	alkyl	2.20	0.3	710	20	7000
64d	4-Br	Apy	alkyl	2.47	7.5	800	27	n.b.
64e	4-OCH ₃	Apy	alkyl	1.52	42	>1000	4.9	>10 ⁴
64f	4-OCF ₃	Apy	alkyl	3.17	120	>10 ⁴	18	n.b.
64i	3-NO ₂	Apy	alkyl	—	1.8	290	20	>10 ⁴
64j	3-F,5-F	Apy	alkyl	1.96	14	>100	19	>10 ⁴
64k	3-Cl,5-Cl	Apy	alkyl	2.76	64	2500	1.7	>10 ⁴
64l	(1-Naphthyl)	Apy	alkyl	2.64	140	6800	10-100	n.b.

^a n.b. = nicht bestimmt. ^b Apy = Aminopyridin, Gua = Guanidin; ^c aryl = 1,3-subst. Benzol, alkyl = -(CH₂)₄-; ^d die Peptide GRGDSPK und cyclo(RGDfV) wurden als Referenz in den Rezeptor-Bindungsassays verwendet; ^e S-Enantiomer.

Bibliothek 1 der aza-RGD-Mimetika lässt sich anhand der Bausteine **C** und **D** in zwei Gruppen mit jeweils 10 Verbindungen einteilen. Die $\alpha\nu\beta 3$ - und $\alpha\nu\beta 6$ -Aktivitäten der Verbindungen mit Guanidin und Arylspacer liegen im nanomolaren bzw. teilweise sogar subnanomolaren Bereich, während keine Affinität zum $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Rezeptor beobachtet wird. Diese außerordentlich hohe Selektivität gegenüber $\alpha\text{IIb}\beta 3$ liegt durchschnittlich bei drei Zehnerpotenzen. Dagegen zeigen die Verbindungen lediglich (sub)-mikromolare $\alpha\nu\beta 5$ -Aktivität. Die Substanzen mit der **CD**-Baustein-Kombination aus Aminopyridin und Alkylspacer zeigen einen Verlust an Bindungsaffinität zu allen untersuchten Integrinrezeptoren um etwas weniger als eine Größenordnung. Lediglich die außerordentlich hohe $\alpha\nu\beta 3$ -Aktivität der 4-Chlor-substituierten Verbindung **75c** bleibt nahezu erhalten (IC_{50} 0.1 bzw. 0.3 nM).

Bei den in Tabelle 5.2 dargestellten azacarba-RGD-Mimetika der Bibliothek 2 ist mit dem Methylamidin ein weiterer Basenbaustein **D** eingeführt. Diese Bibliothek kann man somit in drei Gruppen unterteilen. Im Vergleich mit Bibliothek 1 werden keine großen Unterschiede beobachtet. Die $\alpha\nu\beta 3$ -Affinität der guanylierten Verbindungen liegt ebenfalls im unteren nanomolaren Bereich mit einer hohen Selektivität zu dem Blutplättchenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Die Affinität dieser Verbindungen zu $\alpha\nu\beta 6$ ist mit IC_{50} -Werten im Bereich von 10 bis 140 nM zwar immer noch sehr hoch, aber um ca. eine Größenordnung niedriger als zu $\alpha\nu\beta 3$. Eine Ausnahme bildet die unsubstituierte Verbindung **76a**, die keine $\alpha\nu\beta 6$ -Inhibierung zeigt. Es ist nahezu keine Affinität der azacarba-Verbindungen zu dem $\alpha\nu\beta 5$ -Integrinrezeptor zu beobachten (mikromolare IC_{50} -Werte), d. h. eine hohe Selektivität. Der Übergang zu den amidinylierten Verbindungen – also der Austausch einer Guanidin- NH_2 - durch eine CH_3 -Gruppe – führt zu einem Affinitätsverlust gegenüber dem $\alpha\nu\beta 3$ - und $\alpha\nu\beta 6$ -Rezeptor um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Die Gruppe der Aminopyridin-Verbindungen zeigt im Vergleich mit den Guanidin-Verbindungen, ähnlich wie bei Bibliothek 1, eine um den Faktor 10 geringere $\alpha\nu\beta 3$ -Aktivität. Die Affinität zu den anderen Integrinen ist annähernd gleich.

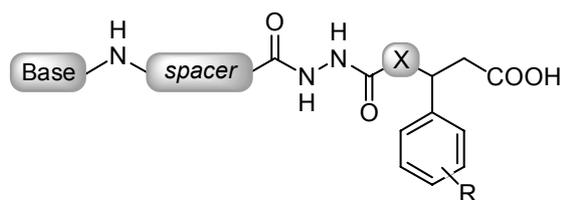
Tabelle 5.2: Inhibierungsuntersuchung der azacarba-RGD-Mimetika (Bibliothek 2) bzgl. ihrer Bindung an verschiedene Integrine.



Verb.	R	Base ^b	Spacer ^c	cLog P	Integrin, IC ₅₀ [nM] ^a			
					αvβ3	αvβ5	αvβ6	αIIbβ3
76a	H	Gua	aryl	1.13	15	280	>10 ⁴	>10 ⁴
76b	4-F	Gua	aryl	1.28	4.0	>1000	140	>1000
76c	4-Cl	Gua	aryl	1.68	1.8	>1000	33	>1000
76d	4-Br	Gua	aryl	1.95	1.9	>1000	32	>1000
76e	4-OCH ₃	Gua	aryl	1.00	1.3	>1000	34	>1000
76g	4-Phenyl	Gua	aryl	2.80	0.7	10 ⁴	12	1000
76i	3-NO ₂	Gua	aryl	0.61	2.7	>1000	24	>100
76k	3-Cl,5-Cl	Gua	aryl	2.24	1.7	370	18	>100
72a	H	Ami	aryl	1.44	23	>1000	1000	>10 ⁴
72b	4-F	Ami	aryl	1.60	160	>1000	>100	>1000
72c	4-Cl	Ami	aryl	2.00	160	7400	n.b.	8000
72d	4-Br	Ami	aryl	2.27	42	>100	1100	>1000
72e	4-OCH ₃	Ami	aryl	1.31	37	>10 ⁴	1600	>1000
72g	4-Phenyl	Ami	aryl	3.11	26	>1000	790	>100
72k	3-Cl,5-Cl	Ami	aryl	2.55	5.9	620	10-100	n.b.
65a	H	Apy	alkyl	2.07	7.3	320	10-100	>10 ⁴
65b	4-F	Apy	alkyl	2.23	35	9400	10-100	n.b.
65c	4-Cl	Apy	alkyl	2.63	15	4600	10-100	n.b.
65d	4-Br	Apy	alkyl	2.90	6.2	6100	>100	9000
65e	4-OCH ₃	Apy	alkyl	1.94	22	>100	220	>10 ⁴
65g	4-Phenyl	Apy	alkyl	3.74	3.5	8700	53	3000
65i	3-NO ₂	Apy	alkyl	—	110	6400	n.b.	>10 ⁴
65k	3-Cl,5-Cl	Apy	alkyl	3.19	6.0	5700	44	>10 ⁴

^a n.b. = nicht bestimmt; ^b Ami = Amidin, Apy = Aminopyridin, Gua = Guanidin ^c aryl = 1,3-subst. Benzol, alkyl = -(CH₂)₄-.

Tabelle 5.3: Inhibierungsuntersuchung ausgewählter aza- und azacarba-RGD-Mimetika bezüglich der Bindung an verschiedene Integrinrezeptoren.



Verb.	R	X	Base ^b	Spacer ^c	cLog P	Integrin, IC ₅₀ [nM] ^a			
						αvβ3	αvβ5	αvβ6	αIIbβ3
77a	H	NH	Gua	alkyl	-0.26	40	26	460	1000
77c	4-Cl	NH	Gua	alkyl	0.29	190	3600	>10 ⁴	n.b.
64n	(H)	NH	Apy	alkyl	-0.70	1400	>10 ⁴	>100	n.b.
64o	(isoProp)	NH	Apy	alkyl	1.14	1300	>10 ⁴	>10 ⁴	n.b.
64p	(Nip)	NH	Apy	alkyl	0.64	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	n.b.
64g	4-Ph	NH	Apy	alkyl	3.32	14	>10 ⁴	10	10 ⁴
64h	2-NO ₂	NH	Apy	alkyl	—	9300	>10 ⁴	>10 ⁴	n.b.
74a	H	NH	Aim	alkyl	0.25	230	>10 ⁴	150	>10 ⁴
74c	4-Cl	NH	Aim	alkyl	0.81	100	>10 ⁴	71	>10 ⁴
78a	H	CH ₂	Gua	alkyl	0.16	220	5000	10-100	2300
78c	4-Cl	CH ₂	Gua	alkyl	0.72	n.b.	n.b.	560	n.b.
65n	(H)	CH ₂	Apy	alkyl	0.55	2000	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
66k	3-Cl,5-Cl	CH ₂	Apy	aryl	3.54	210	2600	560	n.b.
76m^d	4-OH	CH ₂	Gua	aryl	0.74	14	>1000	70	>10 ⁴
65m^d	4-OH	CH ₂	Apy	alkyl	1.68	30	>10 ⁴	130	>10 ⁴

^a n.b. = nicht bestimmt; ^b Aim = Aminodihydroimidazol, Ami = Amidin, Apy = Aminopyridin, Gua = Guanidin; ^c aryl = 1,3-subst. Benzol, alkyl = -(CH₂)₄-; ^d die Synthese dieser Verbindungen ist in Kapitel 6.2.2 beschrieben.

5.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Mit der Herstellung der Bibliotheken 1 und 2, sowie weiterer, ausgewählter Verbindungen ist die Möglichkeit gegeben, Beziehungen zwischen der Struktur der RGD-Mimetika und ihrer biologischen Wirkung zu untersuchen. Hierfür bietet sich eine Unterteilung in die einzelnen Bausteine **A-D** an.

Einfluss der Substitution des Säurebausteins

Ausgehend von der Leitstruktur **9** führt der Austausch des Carboxamids von Säurebaustein **A** durch einen Phenylring in Verbindung **75a** zu einer deutlichen Steigerung der $\alpha\beta3$ -Bindungsaffinität von 150 nM auf 0.8 nM. Durch diese Veränderung kann außerdem die Lipophilie erhöht werden, was sich in einer Erhöhung des cLog P um drei Größenordnungen zeigt.

Die Entfernung des Phenylrings, Verbindungen **64n** und **65n**, sowie der Austausch durch einen *iso*-Propylrest (**64o**) verursacht eine drastische Senkung der $\alpha\beta3$ -Aktivität um drei Zehnerpotenzen (IC_{50} 1.3 bis 2.0 μ M). Diese Variationen zeigen die große Bedeutung des Aromaten (oder Amids) in der Nähe der Carbonsäuregruppe für die Bindungsaffinität zum Vitronectinrezeptor $\alpha\beta3$. Die zusätzliche Einschränkung der Beweglichkeit durch den cyclischen Säurebaustein Nipicotinsäure führt zu der vollständig inaktiven Verbindung **64p**.

Ein Vergleich der unterschiedlichen Substitutionsmuster am Phenylring des Säurebausteins zeigt eine Zunahme der Affinität zu $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta6$ in folgender Reihe:



Die höchste Affinität aller Verbindungen beider Bibliotheken zum Vitronectinrezeptor $\alpha\beta3$ zeigt die guanylierte 4-Chlor-Verbindung **75c** mit einem IC_{50} von 0.1 nM. Daneben besitzen Verbindungen mit großen Substituenten, wie 4-Brom, 4-Methoxy, 3,5-Dichlor, sowie vor allem 4-Phenyl eine erhöhte $\alpha\beta3$ -Affinität. Der Einsatz des Naphthylrestes als Aromat führt dagegen zu einem Aktivitätsverlust um ein bis zwei Größenordnungen.

Für eine hohe Aktivität von 1 nM zum $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -Rezeptor ist die 3,5-Dichlor-Substitution am günstigsten (**64k** und **75k**), aber auch dieser Rezeptor favorisiert große Substituenten. Die von Searle hergestellte 3,5-Dichlor-substituierte RGD-Verbindung **5** besitzt zwar ebenfalls hohe $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Aktivität (IC_{50} 1.1 nM), die Selektivität bezüglich $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ist jedoch relativ schlecht (IC_{50} 150 nM).

Die $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Affinität ist bei den unsubstituierten RGD-Mimetika am höchsten, insbesondere bei Verbindung **77a** mit Alkylspacer und Guanidin (IC_{50} 26 nM). Daneben besitzen die in *meta*-Position mit elektronenziehenden Resten (NO_2 , OCF_3) substituierten Mimetika die größte Affinität, was auch von Merck gezeigt werden konnte.^[280] Große Substituenten, wie Phenyl werden allerdings in keiner Position toleriert.

Einfluss der Gruppe X des Säurebausteins

Der Vergleich der aza- und der azacarba-Bibliothek ermöglicht eine Aussage über die Bedeutung der Gruppe X. Durch den Übergang von der NH-Gruppe der β -Aminosäure zur CH_2 -Gruppe erhöht sich der cLog P um 0.5 Einheiten. Der Einfluss von X auf die metabolische Stabilität bzw. Bioverfügbarkeit wird in Kapitel 6.1 beschrieben. Die Bindungsaffinität zu den verschiedenen Integrinen wird durch X relativ wenig beeinflusst. Tendenziell sind die aza-RGD-Mimetika insbesondere gegenüber dem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor etwas aktiver als die azacarba-Verbindungen. Für den $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Rezeptor lässt sich unter Einbeziehung des (aza)-Glycin-Bausteins folgende Reihe aufstellen^[281]:

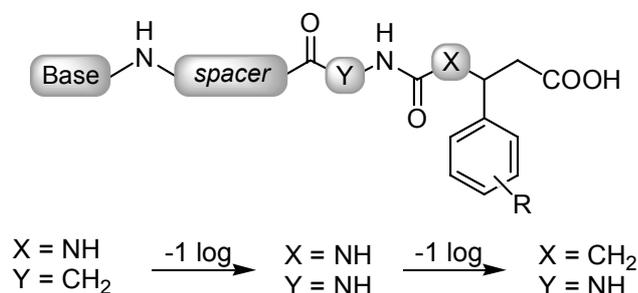


Abbildung 5.1: Einfluss der Gruppen X und Y auf die $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Rezeptoraffinität.

Einfluss des Spacerbausteins

Die Verwendung eines Alkyl- anstelle des *meta*-substituierten Arylspacers (**77**, **78** bzw. **75**, **76**) führt bei guanylierten aza- und azacarba-Verbindungen zu einem Verlust der $\alpha v\beta 3$ -Affinität um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Diese Abnahme der Aktivität lässt sich durch die größere Flexibilität der Alkylkette und die damit verbundenen Freiheitsgrade erklären. Geht man von der Additivität der biologischen Effekte einzelner Bausteine aus, sollte demnach der aromatische Spacer auch in Kombination mit anderen Basenbausteinen zu einer höheren Aktivität führen. Die Verknüpfung des aromatischen Spacers mit dem Basenbaustein Aminopyridin, am Beispiel von Verbindung **66k**, führt jedoch zu einem deutlichen Aktivitätsverlust (IC_{50} 210 nM) verglichen mit den analogen Verbindungen **76k** (IC_{50} 2 nM) und **65k** (IC_{50} 6 nM). Vermutlich sind hierfür sterische Effekte des Aromaten verantwortlich, der in Kombination mit dem starren Spacer zu groß oder zu lang ist. Die besten Kombinationen der Bausteine **C** und **D** sind demnach Aryl-Guanidin und Alkyl-Aminopyridin.

Einfluss des Basenbausteins

Guanidin ist die auch in der natürlichen RGD-Sequenz vorkommende Base. Die Verwendung von Guanidin führt zu sehr potenten Integrinantagonisten mit Aktivitäten im nanomolaren Bereich. Der Übergang zu Amidin als Base entspricht einem Austausch der endständigen NH_2 - durch eine CH_3 -Gruppe. Nimmt man für $\alpha II\beta 3$ eine *end-on*-Bindung und für $\alpha v\beta 3$ eine *side-on*-Bindung an (siehe Kapitel 3.5.4), so sollte sich die $\alpha v\beta 3$ -Affinität nicht verändern. Man beobachtet jedoch eine bis zu 50-fache Abnahme der Affinität zu $\alpha v\beta 3$, sowie auch zu $\alpha v\beta 6$. Lediglich im Fall der 3,5-Dichlor-Substitution bleibt die $\alpha v\beta 3$ -Aktivität mit einem IC_{50} von 6.0 nM (Verbindung **72k**) nahezu erhalten. Die Aktivität bezüglich $\alpha II\beta 3$ bleibt unverändert gering. Anscheinend ist bei den in dieser Arbeit vorgestellten RGD-Mimetika auch die endständige NH_2 -Gruppe an der Bindung beteiligt. Die Lipophilie wird durch Methylamidin als Base nur geringfügig gesteigert. Für oral verfügbare Wirkstoffe sind diese Verbindungen zu polar.

Der Einbau von Amino-Dihydroimidazol als Base entspricht einer Cyclisierung des Guanidins durch Ethylenverbrückung. Dadurch wird die Lipophilie der Verbindungen um etwa 0.5 Einheiten erhöht. Der Vergleich dieser RGD-Mimetika **74a** und **74c** mit den entsprechenden Guanidinverbindungen **77a** und **77c** zeigt einen Verlust an $\alpha\beta 5$ -Affinität um 2-3 Größenordnungen und eine Steigerung der $\alpha\beta 6$ -Affinität um bis zu 2 Größenordnungen. Die Bindung an den $\alpha\beta 3$ -Rezeptor ändert sich kaum.

Der Übergang zu schwächer basischen Gruppen, wie Aminopyridin führt zu einer deutlichen Erhöhung der Lipophilie und des cLog P um eine Einheit. Durch den Einbau von Aminopyridin in Kombination mit einem Alkylspacer erhält man ebenfalls sehr potente Integrinantagonisten (Verbindungen **64** und **65**) mit IC_{50} Werten im nanomolaren Bereich. Im Vergleich mit den analogen RGD-Mimetika mit Guanidin oder Aminodihydroimidazol steigt die $\alpha\beta 3$ -Integrinaffinität um ein bis zwei Zehnerpotenzen an. Die entsprechenden guanylierten Verbindungen mit Arylspacer **75** und **76** zeigen jedoch eine um den Faktor zwei bis zehn höhere Integrinaffinität. Die azacarba-Verbindungen **65** sind dabei etwas aktiver bezüglich $\alpha\beta 3$ als die aza-RGD-Mimetika **64**. Eine Ausnahme bildet die 4-Chlor-substituierte aza-Verbindung **64c**, die weiterhin subnanomolare Aktivität besitzt (IC_{50} 0.3 nM) und damit 50 mal aktiver ist als ihr azacarba-Analogon **65c** (IC_{50} 15 nM). Die Aminopyridin-azacarba-Verbindungen besitzen die höchsten cLog P Werte im Bereich von 1.6 bis 3.2. Damit bieten diese lipophilen RGD-Mimetika einen vielversprechenden Ansatz für weitere Pharmakokinetik-Untersuchungen.

Selektivitätsdiagramm

Die Bindung an die verschiedenen αv -Integrine findet über die RGD-Sequenz statt. Es besteht daher großes Interesse, selektiv bindende Integrinantagonisten zu finden. Diese könnten bei einem Einsatz in der Therapie zu geringeren Nebenwirkungen führen und in der Diagnostik eindeutiger Aussagen liefern. Darüberhinaus sind unterschiedlich selektive Verbindungen für die Untersuchung biologischer Zusammenhänge äußerst interessant.

Mit den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen konnten mono- und biselektive $\alpha\nu\beta 3$ - bzw. $\alpha\nu\beta 6$ -Antagonisten hergestellt werden. Alle RGD-Mimetika besitzen außerdem eine hohe Selektivität gegenüber dem Blutplättchenrezeptor $\alpha IIb\beta 3$. Die Selektivitäten der RGD-Mimetika gegenüber den verschiedenen $\alpha\nu$ -Integrinen sind in einem ternären Selektivitätsdiagramm graphisch dargestellt (siehe Abbildung 5.2).

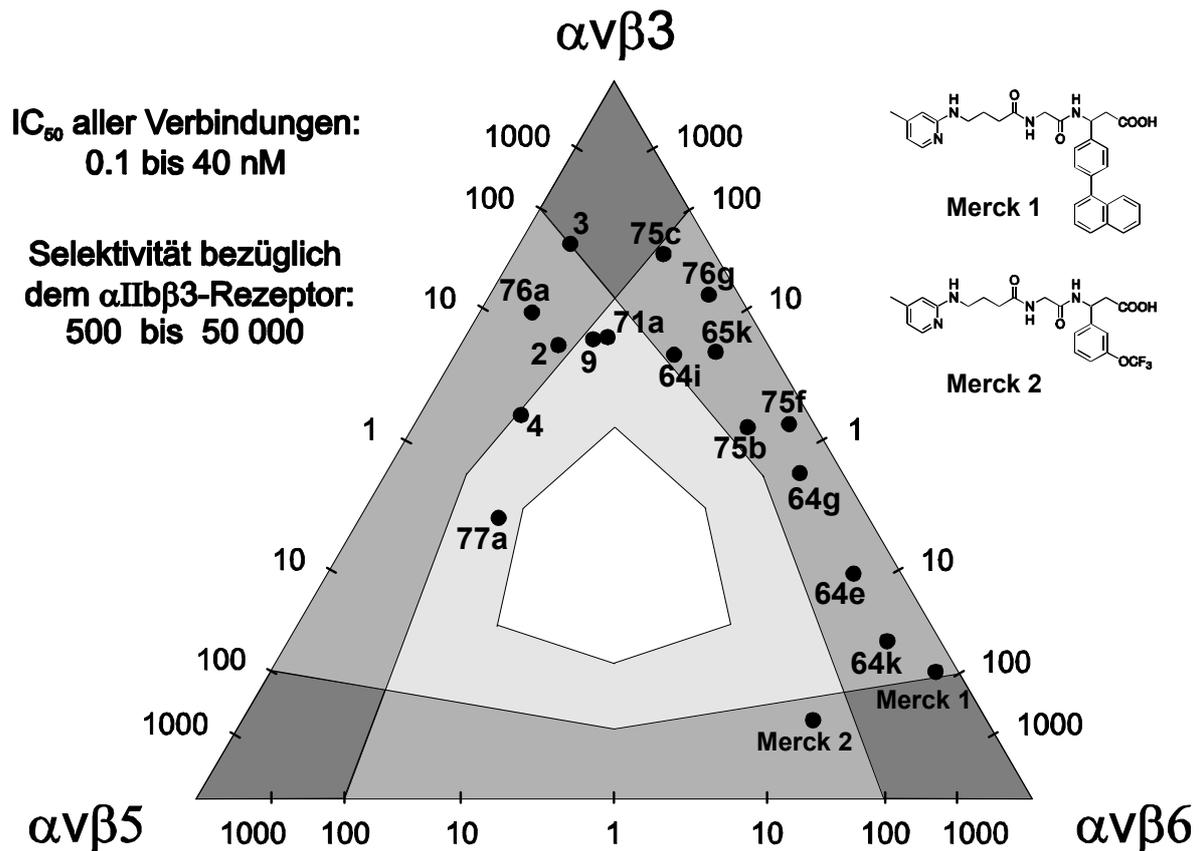


Abbildung 5.2: Graphische Darstellung der Selektivität ausgewählter RGD-Mimetika bezüglich den $\alpha\nu$ -Integrinsubtypen $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$ und $\alpha\nu\beta 6$ (Verbindungen **Merck 1** und **2** stammen von der Firma Merck KGaA).^[281]

In diesem Diagramm repräsentiert jede Ecke einen Integrinsubtyp ($\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$, $\alpha\nu\beta 6$). Die Selektivitäten sind die Verhältnisse der Aktivitäten einer Verbindung zu zwei Integrinen. Jede Verbindung besitzt also drei Werte für die Selektivität, die durch einen Punkt in dem Diagramm dargestellt sind. Die Berechnung der Lage der Punkte lässt sich mit dem ‘Federmodell’ veranschaulichen.

Man kann sich vorstellen, dass jeder Punkt durch drei Federn mit den Ecken verbunden ist. Die Stärke der Feder entspricht der Aktivität der Verbindung. Ist die Aktivität zu einem Integrin deutlich größer, wird der Punkt sehr stark angezogen und liegt folglich in der Nähe der Ecke. Verbindungen in diesen dunkelgrauen Bereichen sind monoselektiv, während die grauen Bereiche an den Kanten des Dreiecks biselektive Substanzen enthalten. RGD-Mimetika ohne Präferenz für einen Rezeptor liegen in der Mitte des Diagramms (hellgrauer oder weißer Bereich).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur eine kleine Auswahl von Integrin-antagonisten graphisch dargestellt. Die meisten RGD-Mimetika liegen im grauen Bereich zwischen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 6$. Diese biselektiven Verbindungen besitzen nur geringe Affinität zu dem $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor. Während der Großteil etwas stärker an $\alpha v\beta 3$ bindet, zeigen vor allem die aza-RGD-Mimetika mit Aminopyridin und großen Substituenten am Säurebaustein (**64e**, **64k**, **Merck1**) eine bis zu zwei Größenordnungen höhere $\alpha v\beta 6$ -Affinität. Eine Abnahme der $\alpha v\beta 6$ -Affinität und gleichzeitige Zunahme der $\alpha v\beta 5$ -Affinität zeigen die unsubstituierten aza-RGD-Mimetika mit Guanidin als Base (**77a**, **76a**, **9**, **72a**). Die Cyclopeptide **2**, **3** und **4** bevorzugen neben $\alpha v\beta 3$ ebenfalls den $\alpha v\beta 5$ -Rezeptor. Das aza-RGD-Mimetikum **77a** stellt eine triselektive Verbindung dar, die keinen αv -Integrintyp favorisiert (hellgrauer Bereich). Es ist bisher nicht gelungen, $\alpha v\beta 5$ -selektive RGD-Mimetika zu identifizieren. Allerdings liefern die Verbindungen **77a** und **Merck 2** mit jeweils nanomolarer $\alpha v\beta 5$ -Aktivität bereits erste Hinweise für die Synthese monoselektiver $\alpha v\beta 5$ -Antagonisten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nahezu alle RGD-Mimetika sehr potente $\alpha v\beta 3$ -Integrinantagonisten darstellen. Die besten $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten sind die Guanylverbindungen mit 4-Chlor-Substitution **75c** (IC_{50} 0.1 nM) und **64c** (IC_{50} 0.3 nM), sowie 4-Phenyl-Substitution, **76g** (IC_{50} 0.7 nM). Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bezüglich einer hohen Affinität zu den unterschiedlichen αv -Integrinen sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

Tabelle 5.4: Struktureller Einfluss, der eine hohe Integrinaffinität induziert.

Strukturelle Eigenschaft	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$
Subst. am Aromaten des Säurebausteins	groß; Halogene (v.a. Cl)	klein, e ⁻ -ziehend (NO ₂ , OCF ₃)	sehr große Aromaten
Position des Subst.	3 (und 5) oder 4	3	3 (und 5) oder 4
Gruppe X	NH oder CH ₂	NH	NH oder CH ₂
Abstand ^a Säure – Base	12 Bind.	11 Bind.	11-12 Bind.
Base ^b	Gua, Apy, (Aim)	Gua, (Ami)	Aim, Gua, Apy,

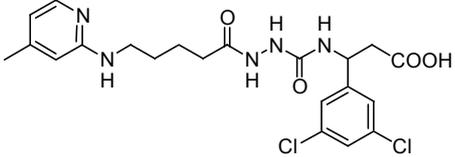
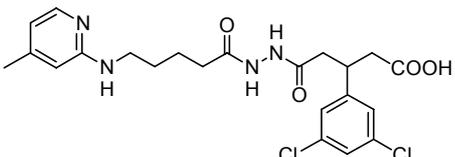
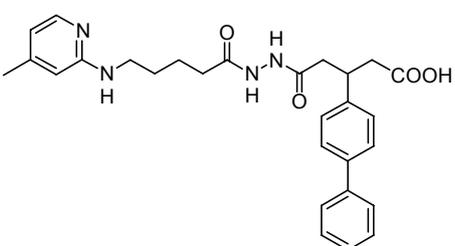
^a Anzahl an Bindungen vom Kohlenstoffatom der Carbonsäure bis zum ersten NH des Guanidins;^[179] ^b Aim = Aminodihydroimidazol, Ami = Amidin, Apy = Aminopyridin, Gua = Guanidin.

5.3 Toxizitäts-Studien

Eine erste Voruntersuchung der Toxizität *in vitro* wird in der Regel mithilfe des Ames-Tests durchgeführt (siehe Kapitel 3.3). Die *Micro-Screening-Assays* wurden im Institut für Toxikologie der Firma Merck KGaA, Darmstadt, von D. Utesch durchgeführt. Die Mutagenitäts-Untersuchungen wurden mit den Salmonella Typhimurium Bakterien-Stämmen TA 1538 und TA 100 in An- und Abwesenheit eines exogenen Metabolisierungssystems (S9-Mix) durchgeführt.^[282]

Der Test ist abgestimmt auf die stark mutagene Nitroverbindung EMD 270292, die große strukturelle Ähnlichkeit zu den untersuchten Substanzen aufweist. Das aza-RGD-Mimetikum **64k** ist sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung (S9-Mix) stark mutagen (TA 1538), obwohl 3,5-Dichlorbenzol und Aminopyridin an sich ein negatives Ergebnis im Ames-Test zeigen. Die azacarba-analoge Verbindung **65k** ist stark cytotoxisch in Konzentrationen, bei denen EMD 270292 positiv ist. Ein mutagenes Potential könnte durch die Cytotoxizität überdeckt werden. Daher muss für weitere Untersuchungen ein anderes Testsystem gewählt werden.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Mutagenitätsuntersuchung (Ames-Test).

Verb.	Struktur	TA 1538		TA 100	
		+ S9-Mix	- S9-Mix	+ S9-Mix	- S9-Mix
EMD 270292	ähnliche Nitroverbindung	++	++	++	++
64k		+	++	-	-
65k^a		-	? ^a	-	? ^a
65g		-	-	-	-

^a Eine Aussage über die Mutagenität ist aufgrund von Cytotoxizität nicht möglich.

Die entsprechende Biphenylverbindung **65g** ist dagegen nicht mutagen. Allerdings ist der Biphenyl-Substituent als mutagen in Mamma-Zellsystemen beschrieben. Problematisch ist auch die potentielle Cancerogenität von Biphenyl auf den Menschen. Ein Vergleich dieser drei Verbindungen zeigt, dass die Bisacylhydrazin-Struktur keine Mutagenität hervorruft. Das positive Ergebnis von **64k** ist demnach entweder auf die Dichlor-Substitution oder die NH-Gruppe des Säurebausteins zurückzuführen. Aufgrund der Mutagenitätsuntersuchungen ist lediglich Verbindung **65g** für eine Weiterentwicklung als Wirkstoffkandidat geeignet.

6 *IN VIVO*-STUDIEN VON RGD-MIMETIKA

Nachdem verschiedene Bindungs- und *in vitro*-Toxizitätsstudien durchgeführt wurden, muss ein Wirkstoff anschließend in der sogenannten präklinischen Phase im lebenden Organismus untersucht werden. Dazu wird die Substanz zunächst in Versuchen mit mindestens zwei verschiedenen Tierarten – Nagern und Nicht-Nagern – bezüglich ihrer Wirkung, Toxizität und Pharmakokinetik geprüft.

In diesem Kapitel werden verschiedene Untersuchungen vorgestellt, die Aufschlüsse über die Verfügbarkeit, die Verteilung, sowie die Wirksamkeit der RGD-Mimetika *in vivo* geben. Im ersten Teil werden Studien zur Bestimmung des pharmakokinetischen Wirkstoffprofils an Ratten beschrieben. Der zweite Abschnitt behandelt die radioaktive Markierung zweier RGD-Mimetika, um die Verteilung des Wirkstoffs in Tumormäusen zu zeigen (Biodistribution). Im dritten Teil dieses Kapitels wird die Auswirkung eines RGD-Mimetikums auf das Tumorwachstum an Mäusen untersucht.

6.1 Untersuchungen zur Pharmakokinetik

Erste Hinweise auf die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs erhält man durch die Bestimmung der logP-Werte oder durch *in vitro*-Untersuchungen, wie Permeabilitätstests mit Caco-2-Zellen. Um weiterführende Aussagen über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus machen zu können, muss die Substanz anschließend im lebenden Organismus untersucht werden. Diese *in vivo*-Untersuchungen des pharmakokinetischen Wirkstoffprofils werden zunächst an Ratten durchgeführt, später auch an anderen Tieren, wie Hunden oder Affen.

Hierbei untersucht man, wie schnell eine Substanz nach intravenöser oder oraler Applikation wieder ausgeschieden bzw. wie schnell der Wirkstoff im Körper abgebaut wird. Diese Eigenschaften lassen sich durch verschiedene Parameter angeben:

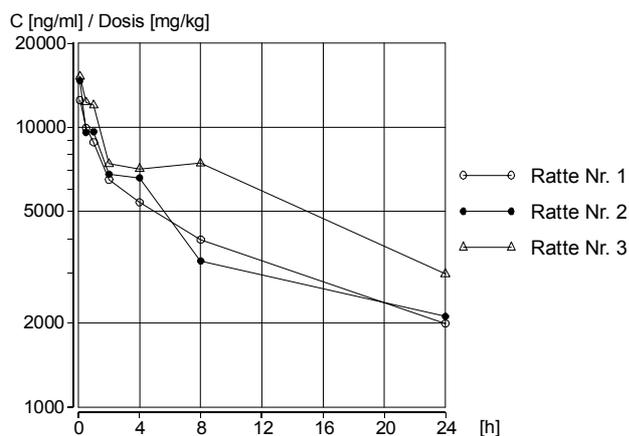
- Halbwertszeit $t_{1/2}$: Zeitspanne, in der sich die Wirkstoffkonzentration im Blut halbiert
- Clearance CL: Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit formal vom Wirkstoff befreit wird

- AUC (*area under curve*): Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (siehe Abbildung 6.1); bei vollständiger Aufnahme des Wirkstoffs unabhängig von der Applikationsart
- orale Bioverfügbarkeit: Wirkstoffmenge, die dem Kreislauf nach oraler Gabe zur Verfügung steht; berechnet sich aus dem Verhältnis der AUC-Werte nach oraler und intravenöser Applikation des Wirkstoffs

$$BV = \frac{AUC_{p.o.}}{AUC_{i.v.}} \cdot \frac{Dosis_{i.v.}}{Dosis_{p.o.}}$$

Im Rahmen einer Kooperation wurden diese Pharmakokinetik-Untersuchungen bei der Firma Merck KGaA in Grafing durchgeführt. Hierfür wurde die zu untersuchende Verbindung Ratten einzeln oder als Mischung mit anderen Verbindungen in geringen Konzentrationen injiziert (0.2 mg/kg Körpergewicht) oder oral verabreicht (0.5 mg/kg Körpergewicht). Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Blut wurde mittels gekoppelter LC-MS-Analyse durchgeführt, wobei innerhalb eines Tages sieben Messwerte nach 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 und 24 h aufgenommen wurden. Durch graphische Darstellung dieser Werte erhält man die in Abbildung 6.1 dargestellten Plasmaspiegelkurven.

intravenös (i.v.) verabreichte
Dosis von **64k**: 0.2 mg/kg



peroral (p.o.) verabreichte
Dosis von **64k**: 0.5 mg/kg

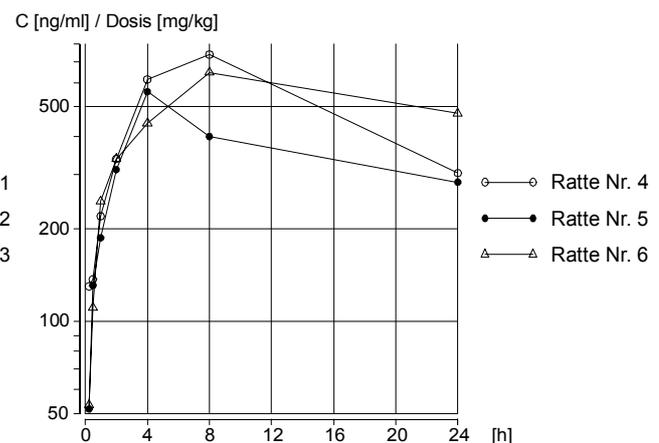
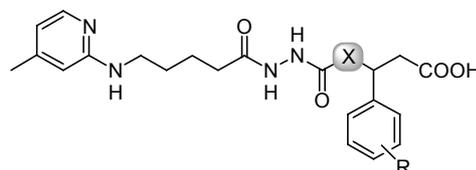


Abbildung 6.1: Plasmaspiegelkurven des RGD-Mimetikums **64k** nach intravenöser und peroraler Applikation.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Anhand der AUC-Werte, die sich aus der graphischen Darstellung der Wirkstoffkonzentrationen ergeben, werden die Halbwertszeit $t_{1/2}$, die *clearance* CL, sowie die orale Bioverfügbarkeit BV berechnet.

Tabelle 6.1: Pharmakokinetische Parameter^a ausgesuchter RGD-Mimetika.



Verb.	Tier	R	X	AUC _{i.v.}	AUC _{p.o.}	$t_{1/2}$ ^b	CL ^b	BV
				[ng/mL·h]	[ng/mL·h]	[h]	[liter/h/kg]	[%]
64c	Ratte	4-Cl	NH	56.4	—	0.50	3.58	—
65c	Ratte	4-Cl	CH ₂	66.1	5.71	0.55	3.13	3
65c^c	Ratte	4-Cl	CH ₂	89.5	7.85	0.46	2.26	4
64d	Ratte	4-Br	NH	92.8	3.18	0.71	2.22	< 2
65d	Ratte	4-Br	CH ₂	103	14.8	0.67	1.93	~ 6
64g	Ratte	4-Ph	NH	362	—	0.65	2.80	—
65g	Ratte	4-Ph	CH ₂	105	1.34	0.91	1.87	< 1
64i	Ratte	3-NO ₂	NH	3460	174	2.90	0.058	2
64l	Ratte	(Naphth)	NH	1740	102	2.54	0.12	< 3
64k^d	Ratte	3-Cl,5-Cl	NH	80200	5510	11.1	0.008	~ 3
64k^e	Hund	3-Cl,5-Cl	NH	78	4.65	0.46	1.28	< 3
64k^e	Affe	3-Cl,5-Cl	NH	30.9	5.34	0.36	3.42	—
c64k^f	Ratte	3-Cl,5-Cl	NH	2570	—	13.0	0.40	—
72k^g	Ratte	3-Cl,5-Cl	CH ₂	683	52.0	0.67	0.29	3
65k	Ratte	3-Cl,5-Cl	CH ₂	858	140	2.74	0.24	~ 7

^a Mittelwert von je drei Versuchstieren; ^b diese Parameter beziehen sich auf intravenöse Applikation; ^c reines *S*-Enantiomer; ^d Mittelwert von 9 Versuchstieren; ^e verabreichte Dosen: 0.1 (i.v.) bzw. 0.25 (p.o.) mg/kg Körpergewicht; Mittelwert von je zwei Versuchstieren; ^f verabreichte Dosis: 0.25 mg/kg; ^g diese Verbindung besitzt die **CD**-Kombination Amidin und Arylspacer.

Die Halbwertszeiten der *para*-substituierten Verbindungen sind mit Werten zwischen einer halben und einer Stunde relativ gering, d. h. die Substanzen werden sehr

schnell wieder aus dem Körper ausgeschieden. Durch eine 3-Nitro-Substitution bzw. einen Naphthylrest lässt sich die Halbwertszeit auf 2.5 bis 3 h steigern, durch ein 3,5-Dichlor-Substitutionsmuster sogar auf bis zu 11 h. Diese hohe Verweildauer der Verbindung **64k** im Körper, die mit einer entsprechend geringen *clearance* korrespondiert, hat bereits eine für einen Wirkstoff optimale Größenordnung.

Die orale Bioverfügbarkeit der untersuchten RGD-Mimetika liegt in den meisten Fällen zwischen 1 % und 3 %. Diese Werte sind für einen oral zu verabreichenden Wirkstoff bei weitem nicht ausreichend. Der Austausch der NH-Gruppe der β -Aminosäure durch eine Methyleneinheit führt in der Gruppe der 4-Chlor-, 4-Brom- und 3,5-Dichlor-substituierten RGD-Mimetika zu einer Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit auf bis zu 7 % (Verbindung **65k**).

Die RGD-Mimetika mit 3,5-Dichlor-Substitutionsmuster am Aromaten wurden aufgrund ihrer guten pharmakokinetischen Parameter eingehender untersucht. Neben Aminopyridin wurde auch Amidin (verknüpft mit aromatischem Spacer) als Basenbaustein verwendet (Verbindung **72k**). Im Vergleich zu **65k** sinkt dabei jedoch sowohl die Bioverfügbarkeit um die Hälfte als auch die Halbwertszeit um den Faktor 4. Die Untersuchung der Pharmakokinetik bei anderen Tierarten zeigt eine Verschlechterung der Verweildauer im Organismus von über 11 Stunden in Ratten auf 20 bis 30 Minuten in Hunden und Affen.

Durch die Anwendung des Prodrug-Konzepts (siehe Kapitel 3.4) lässt sich die Lipophilie der Verbindung erhöhen, was zu einer besseren Membrangängigkeit und damit zu gesteigerter oraler Bioverfügbarkeit führen könnte. Andererseits könnte durch eine langsame Freisetzung der eigentlich wirksamen Verbindung aus dem Prodrug eine Verlängerung der Halbwertszeit dieser Substanz erzielt werden. Als Prodrugs von Verbindung **64k** wurde das cyclische Amid **c64k** untersucht. Die anschließenden Pharmakokinetik-Untersuchungen in Ratten zeigten für das cyclische Amid **c64k** eine relativ lange Halbwertszeit von 13 h. Allerdings wurde die aus dem Prodrug freigesetzte Verbindung **64k** mit weniger als 1 % der Prodrugkonzentration im Blut nachgewiesen. Da die biologisch wirksame Verbindung nicht bzw. nur in sehr geringer Konzentration freigesetzt wird, wurde keine Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit durchgeführt.

6.2 Tumordiagnostik mittels radiomarkierter RGD-Mimetika

Eine in der Tumordiagnostik häufig verwendete Methode ist die Szintigraphie, bei der krankhafte Veränderungen im Organismus durch radioaktive Isotope sichtbar gemacht werden. Bei der Immunszintigraphie werden radioaktiv markierte Antikörper gegen bestimmte tumor-assoziierte Proteine (Tumormarker) eingesetzt. Erste Untersuchungen mit Antikörpern gegen das karzinoembryonale Antigen (CEA) wurden bereits 1965 von P. Gold und S. O. Freedman in Montreal durchgeführt.^[283,284] Nachteile von Antikörpern sind die relativ langsame Aufnahme in den Tumor, sowie die langsame Eliminierung aus dem Körper. Diese langen Zeiten können durch Reduktion der Molekülgröße deutlich verkürzt werden, z.B. durch Verwendung cyclischer Peptide oder kleiner nichtpeptidischer Verbindungen.

Große Fortschritte bei der Diagnose, die auf der Detektion von Radionukliden beruht, wurden durch die Tomographie-Methoden SPECT (*single photon emission computer tomography*) und PET (*positron emission tomography*) erreicht. Sie erlauben eine sehr hohe Auflösung und genaue Quantifizierung (PET) der aufgenommenen Tracermenge.^[285,286] Die wichtigsten Radioisotope für diese Methoden sind in Tabelle 6.2 dargestellt. Die teilweise sehr kurzen Halbwertszeiten machen schnelle Synthesen erforderlich, wobei die Einführung des Radioisotops günstigerweise im letzten Syntheseschritt erfolgen sollte.

Tabelle 6.2: In der Szintigraphie zur Diagnose verwendete Radioisotope.

Isotop	$t_{0,5}$	Strahlung	Energie [keV]	Verfahren	Markierungsmethode
11-C	20 min	β^+	960	PET	Alkylierung mit $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, $\text{S}_{\text{N}}2$ mit $^{11}\text{CN}^-$
18-F	1.8 h	β^+	635	PET	$\text{S}_{\text{N}}\text{-Rkt.}$ mit Fluorid, Acylierung (prothetische Gruppe)
123-I	13 h	γ	159	SPECT	elektr., arom. Substitution
124-I	4.2 d	β^+ (25%)	294	PET	elektr., arom. Substitution
99m-Tc	6 h	γ	140	SPECT	Komplexierung

Für PET-Untersuchungen werden häufig die Positronenstrahler ^{11}C -Kohlenstoff, ^{18}F -Fluor und ^{124}I -Iod eingesetzt. Das ^{11}C -Kohlenstoffisotop hat eine sehr geringe Halbwertszeit ($t_{1/2} = 20$ min), was eine schnelle Synthese erfordert. Kohlenstoff kommt in jeder organischen Verbindung vor, kann also als einziges Isotop ohne Veränderung der Verbindung eingeführt werden. Die Markierung erfolgt häufig durch Methylierung, z.B. eines Alkohols, Amins oder einer Säure mit $[^{11}\text{C}]$ Methyliodid oder durch nukleophile Substitution mit $[^{11}\text{C}]$ Cyanid. ^{18}F -Fluor ist ein optimaler PET-Tracer, da das Isotop ein 100 %iger Positronenstrahler ist und eine Halbwertszeit ($t_{1/2} = 1.8$ h) hat, die ausreichend lang (Detektion), aber nicht zu lang (Strahlenbelastung) ist. Fluor kann durch direkte Substitution z.B. in einer Schiemann-Reaktion mit $[\text{B}^{18}\text{FF}_3]^-$ eingeführt werden. Oftmals werden auch sogenannte $[^{18}\text{F}]$ -markierte prosthetische Gruppen, wie 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropionsäure oder 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorbenzoesäure bzw. die entsprechenden, aktivierten Vorstufen (z.B. als 4-Nitrophenylester) in einer Acylierungsreaktion eingesetzt.^[287] ^{124}I -Iod ist lediglich zu 25 % ein Positronenstrahler und wird eher in der Forschung eingesetzt. Das Isotop kann beispielsweise durch elektrophile aromatische Substitution in ortho-Position zu einer phenolischen OH-Gruppe eingeführt werden.

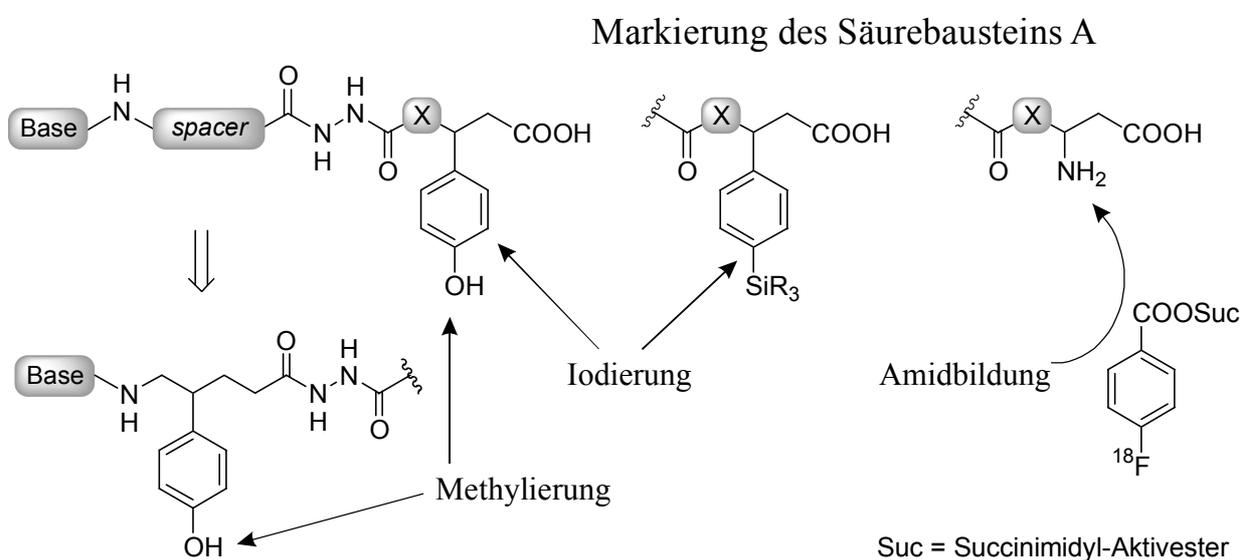
Zu den γ -Strahlern, die in der SPECT zum Einsatz kommen, gehören vor allem ^{123}I -Iod und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Technetium. Die radioaktive Markierung mit dem Iodisotop ^{123}I -Iod entspricht der für ^{124}I -Iod vorgestellten Methode. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Technetium wird insbesondere bei der Markierung von Proteinen verwendet. Die Technetium-Markierung wird durch Komplexierung mit mehrzähligen Liganden, wie DOTA, erreicht, die über Linker an die aktive Verbindung angeknüpft sind.

6.2.1 Überlegungen zur Markierung von RGD-Mimetika

Es ist von großer Bedeutung, dass die eingesetzte Verbindung – ob Antikörper, Peptid oder nichtpeptidisches Molekül – durch die radioaktive Markierung ihre biologische Aktivität und Selektivität nicht verliert. Die Markierung darf demnach nicht im aktiven Zentrum des Antagonisten stattfinden. Im Fall des hochaktiven Peptids cyclo(RGDfV) war die Markierung der Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure aufgrund ihrer Bedeutung für die biologische Aktivität nicht möglich.^[60] Ein

Austausch der Aminosäuren D-Phenylalanin und L-Valin konnte ohne Aktivitätsverlust durchgeführt werden (z.B. durch D- bzw. L-Tyrosin, das selektiv iodiert werden kann).^[288]

Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen RGD-Mimetika bietet sich der Phenylring des Säurebausteins **A** – sowie eventuell der Spacerbaustein **C** – für eine radioaktive Markierung an. Alle anderen Positionen, wie die Säure, das aza-Glycin oder das Guanidinmimetikum würden mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Verlust an Bindungsaffinität zu dem $\alpha\beta 3$ -Rezeptor führen. Einige Möglichkeiten der Markierung sind in Abbildung 6.2 dargestellt.



Markierung des Spacer-Bausteins C

Abbildung 6.2: *Verschiedene Möglichkeiten der radioaktiven Markierung von RGD-Mimetika.*

Die Verwendung des Hydroxy-substituierten Phenylrings eignet sich sowohl für eine Iodierung als auch für eine selektive [¹¹C]-Methylierung. Die bisherigen Untersuchungen unterschiedlich substituierter RGD-Mimetika deuten darauf hin, dass das bei der Iodierung resultierende 4-Hydroxy-3-iodphenyl-Derivat ebenfalls eine hohe Affinität zu $\alpha\beta 3$ besitzen sollte. Zur Überprüfung der Aktivität muss jedoch ebenfalls die entsprechende nicht radioaktiv markierte Iod-Verbindung synthetisiert werden. Die

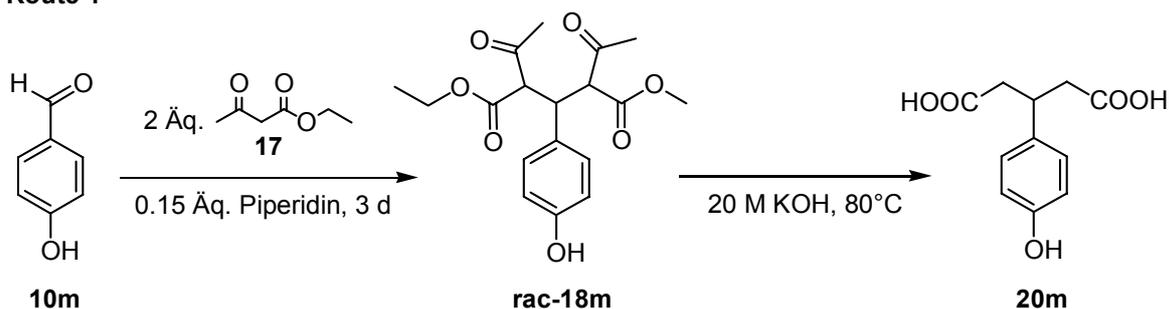
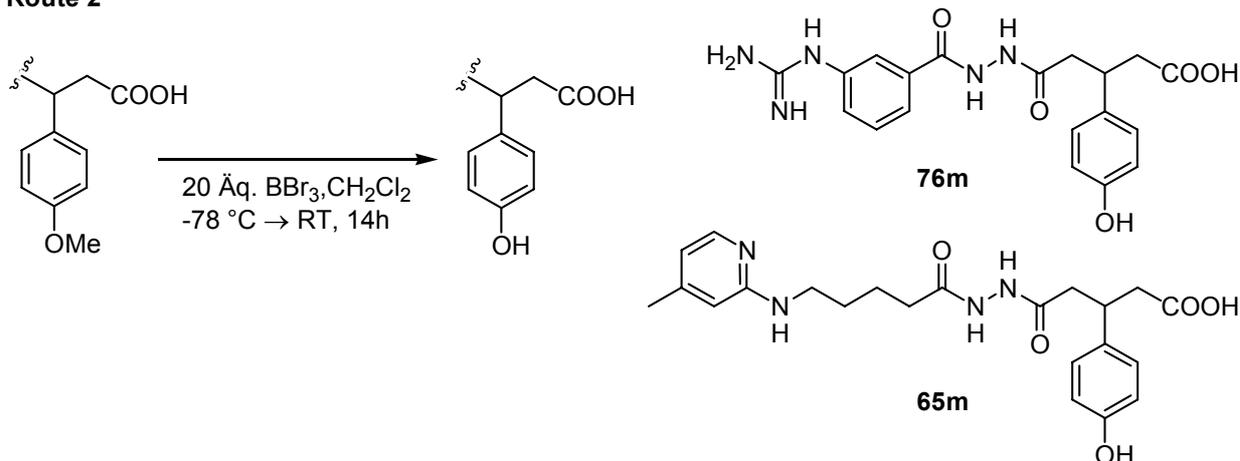
biologischen Aktivitäten der bei einer radioaktiven Methylierung anfallenden 4-Methoxyphenyl-Derivate sind bereits bekannt (IC_{50} 1.0 – 40 nM).

Die *ipso*-Iodierung eines aromatischen Trimethylsilylderivats stellt eine weitere Möglichkeit der Einführung eines radioaktiven Iodisotops dar, die beispielsweise für die *single photon emission computer tomography* (SPECT) verwendet wird.^[289] Ein ebenfalls in Abbildung 6.2 dargestellter Ansatz der Einführung von [^{18}F]Fluor über die Reaktion eines Amins mit 4- $[^{18}F]$ Fluorbenzoesäure wird in unserer Arbeitsgruppe von G. Thumshirn weiter bearbeitet. Die Markierung eines phenolischen Spacerbausteins **C** würde vermutlich zu einer Senkung der Aktivität um ca. zwei Größenordnungen führen, wie Ergebnisse von C. Gibson bei vergleichbaren Verbindungen zeigen.^[225]

6.2.2 Synthese von azacarba-RGD-Mimetika mit freier OH-Gruppe

Für eine radioaktive Markierung der RGD-Mimetika bietet sich die Iodierung einer phenolischen Hydroxy-Gruppe in para-Position am Phenylring des Säurebausteins an. Zur Herstellung hydroxy-funktionalisierter azacarba-RGD-Mimetika wurden zwei Syntheserouten untersucht: die Synthese ausgehend von 4-Hydroxybenzaldehyd (**10m**) in Analogie zur Darstellung der Säurebausteine **A₂** (Route 1; vgl. Kapitel 4.3.2), sowie die Synthese eines 4-Methoxy-substituierten azacarba-RGD-Mimetikums mit anschließender Spaltung des Methylethers (Route 2).

In Analogie zur Synthese der Glutarsäuren **20** wurde 4-Hydroxybenzaldehyd (**10m**) mit Acetessigsäureethylester (**17**) zur entsprechenden Zwischenstufe **18m** umgesetzt (siehe Schema 6.1, Route 1). Dabei entstand zu ca. 20 % ein nicht charakterisiertes Nebenprodukt. Die anschließende Verseifung mit 20 N wässriger Natronlauge lieferte die 4-Hydroxyglutarsäure **20p** in ungenügender Reinheit (ca. 20 % nach HPLC). Eine Möglichkeit, die Ausbeute zu erhöhen, wäre der Schutz der freien OH-Gruppe beispielsweise als *tert*-Butylester vor der Verseifung. Dieser Syntheseweg wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

Route 1**Route 2**

Schema 6.1: Synthese 4-Hydroxy-substituierter azacarba-RGD-Mimetika: Route 1 beschreibt die Synthese ausgehend von 4-Hydroxybenzaldehyd (**10m**). Route 2 stellt die milde Etherspaltung 4-Methoxy-substituierter RGD-Mimetika mit 20 Äquiv. BBr_3 dar.

Als alternative Syntheseroute 2 wurde die milde Spaltung des Methylarylethers von 4-Methoxy-substituierten RGD-Mimetika mit Bortribromid untersucht.^[290,291] Schema 6.1 zeigt die Etherspaltung der 4-Methoxy-substituierten azacarba-RGD-Mimetika **76e** und **65e** durch Zugabe eines 15- bis 20-fachen Überschusses Bortribromid bei -78 °C (ein Äquiv. BBr_3 pro Koordinierungsstelle im Substrat). Da die angefallenen Borsalze nicht von den Produkten abgetrennt werden konnten, lässt sich die Ausbeute der Etherspaltung nur schwer bestimmen. Die nach HPLC-Kontrolle bestimmte Ausbeute betrug 80 %. Die Produkte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt.

6.2.3 Radioaktive Markierung und Untersuchungen der Biodistribution

Die Radiomarkierung der RGD-Mimetika, sowie die Untersuchungen der Verteilung der markierten Verbindungen in Mäusen wurden in Zusammenarbeit mit dem Klinikum rechts der Isar (Prof. Schwaiger) im Labor von Dr. R. Haubner durchgeführt. Für die Iodierung mit radioaktivem ^{123}I -Iod nach der IodoGen[®]-Methode^[288] wurden die Verbindungen jeweils in 300 μL eines Phosphatpuffers (pH 7.4) gelöst und in mit IodoGen[®] beschichtete Eppendorf-*caps* überführt. Zur Markierung wurden 7.40 MBq [^{123}I]Natriumiodid (spezifische Aktivität: 200 MBq) zugegeben. Die radioaktiv markierten Verbindungen wurden mittels reversed phase HPLC gereinigt.

Die Biodistribution wurde mithilfe einer Gamma-Kamera aufgenommen (Szintigraphie). Die aufgenommenen Bilder entsprechen einer zweidimensionalen Projektion der mittels SPECT erhaltenen Szintigraphie. Für die Gamma-Kamera-Studien an Mäusen wurden zwei Melanoma-Modelle (M21 und M21-L) verwendet. Die M21 Melanoma-Zell-Linie exprimiert den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinrezeptor^[151,288], während die M21-L Zell-Linie aufgrund ihrer schwachen $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Expression als Negativkontrolle dient^[151]. Das für die Untersuchungen notwendige Tumorgewicht betrug 300-500 mg. Vier Stunden nach intravenöser Injektion der radioaktiven Verbindung **[3-Iod]-76m** wurden die Mäuse getötet.

Die Ergebnisse der Gamma-Kamera-Untersuchungen sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die linke Seite der Abbildung zeigt eine kernspintomographische Aufnahme (MRT) einer Maus, auf der man zwei Tumoren als hellere Bereiche erkennen kann. Der linke Tumor exprimiert den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor sehr stark (M21), der rechte jedoch nicht (M21-L). Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Szintigraphie einer Maus vier Stunden nach Injektion des radioaktiv markierten [^{123}I]-RGD-Mimetikums **[3-Iod]-76m** dargestellt. Die größte Aktivitätsaufnahme wird im Magen-Darm-Trakt der Maus beobachtet. Eine geringere Menge ist in der Schilddrüse erkennbar. Man kann jedoch sehr gut erkennen, dass sich die radioaktiv markierte Verbindung **[3-Iod]-76m** im $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -positiven Tumor (M21, links) anreichert, während die Negativkontrolle (M21-L, rechts) keine Anreicherung der Radioaktivität aufweist.

Auch im Gewebe und in den Organen lässt sich keine Anreicherung von [**3-Iod**]-**76m** feststellen. Das bedeutet, man hat wirklich eine selektive Anreicherung im Tumor aufgrund der verstärkten Expression des $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptors.

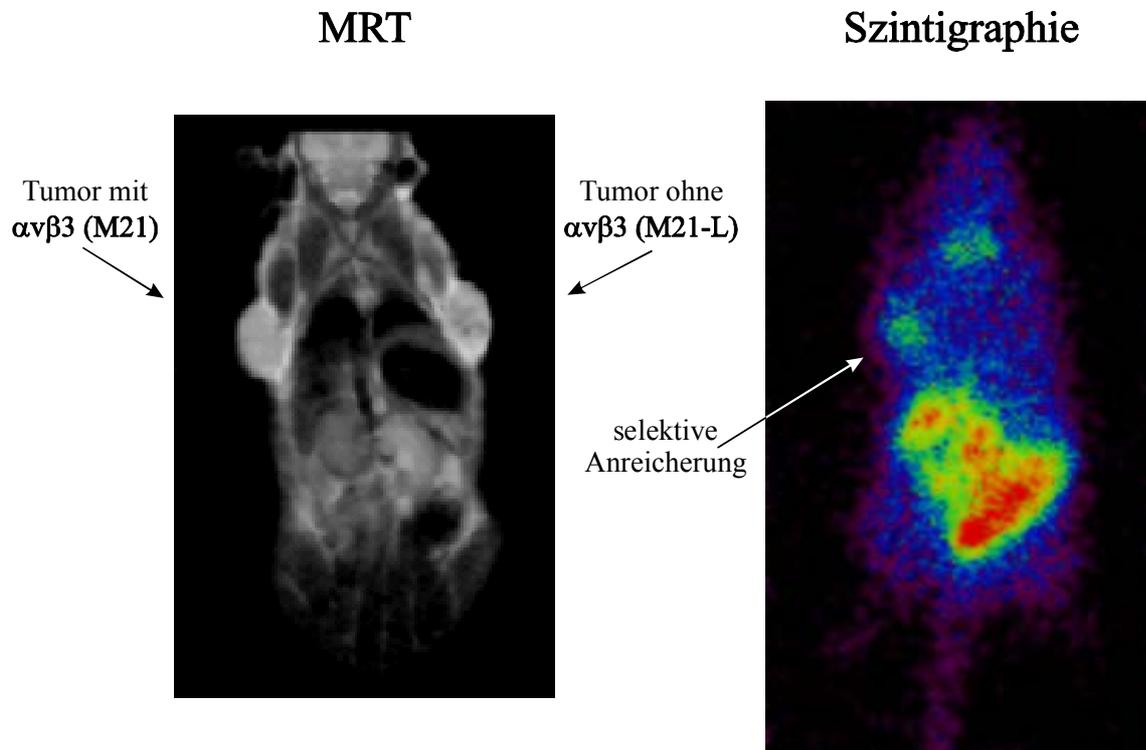


Abbildung 6.3: Verteilung der [^{123}I]-RGD-Verbindung [**3-Iod**]-**76m** im M21-Mausmodell: die Kernspintomographie (MRT) einer Maus zeigt die Tumoren, von denen der linke den $\alpha\beta3$ -Rezeptor exprimiert (M21), der rechte jedoch nicht (M21-L). In der szintigraphischen Aufnahme erkennt man die selektive Anreicherung von [**3-Iod**]-**76m** in dem $\alpha\beta3$ -positiven Tumor (M21).

6.3 Untersuchung von RGD-Mimetika in der Tumorthherapie

Für die weitere Bewertung eines potentiellen Tumor-Wirkstoffs sind zusätzliche Untersuchungen der Wirksamkeit an Tumor-Maus-Modellen notwendig. Hierzu werden auf Mäusen bestimmte Tumoren gezüchtet, die nach Zugabe des Wirkstoffs schrumpfen bzw. zumindest nicht weiter wachsen sollten. Die Prüfung eines Wirkstoffs als Angiogenese-Inhibitor kann mit HT29-Tumorzellen, einer humanen Dickdarmkrebs-Zell-Linie durchgeführt werden. Diese Tumorzellen exprimieren die

Integrinrezeptoren $\alpha\beta5$ und $\alpha\beta6$, während der $\alpha\beta3$ -Rezeptor nicht vorhanden ist.^[154] Man sollte also nur die Inhibierung der $\alpha\beta3$ -Integrine, die aufgrund von Angiogenese gebildet werden, beobachten.

Die *in vivo*-Untersuchungen an Tumor-Maus-Modellen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Merck KGaA in Spanien durchgeführt. Für diese Studien wurde das 3,5-Dichlor-substituierte RGD-Mimetikum **64k** verwendet, da es sowohl eine hohe Affinität zu dem $\alpha\beta3$ -Rezeptor als auch sehr gute pharmakokinetische Eigenschaften, wie eine lange Halbwertszeit besitzt.

Zunächst wurden fünf Wochen alten, männlichen Nacktmäusen subkutan HT29-Tumorzellen injiziert. Als die Tumoren nach 9 Tagen eine durchschnittliche Größe von 40-50 mm³ erreicht hatten, begann die Behandlung mit verschiedenen $\alpha\beta3$ -Integrinantagonisten (siehe Abbildung 6.4). Neben Verbindung **64k** wurde auch ein von Merck synthetisiertes RGD-Mimetikum (**Merck 3**) untersucht. Den Mäusen wurde zwei Wochen lang einmal täglich eine Dosis von 0.5 bzw. 1 mg des Antagonisten als Pufferlösung intraperitoneal (in die Bauchhöhle) injiziert. Als Kontrolle diente eine Pufferlösung ohne Wirkstoff. Durch die zweiwöchige Behandlung mit dem aza-RGD-Mimetikum **64k** konnte keine Veränderung des Tumorwachstums erzielt werden. Auch das von Merck synthetisierte RGD-Mimetikum **Merck 3** zeigte nur bei Verwendung der doppelten Menge (1 mg/Dosis) eine geringfügige Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit. Ein Wachstumsstopp bzw. Schrumpfen des Tumors konnte jedoch nicht erzielt werden.

Es ließen sich mit diesen Versuchen allerdings selbst nach einem positiven Ergebnis keine eindeutigen Aussagen über den Wirkmechanismus machen. Da die RGD-Mimetika nicht nur gute $\alpha\beta3$ -, sondern auch $\alpha\beta6$ -Antagonisten sind, könnten sie auf diese Weise auch direkt mit den Tumorzellen wechselwirken.

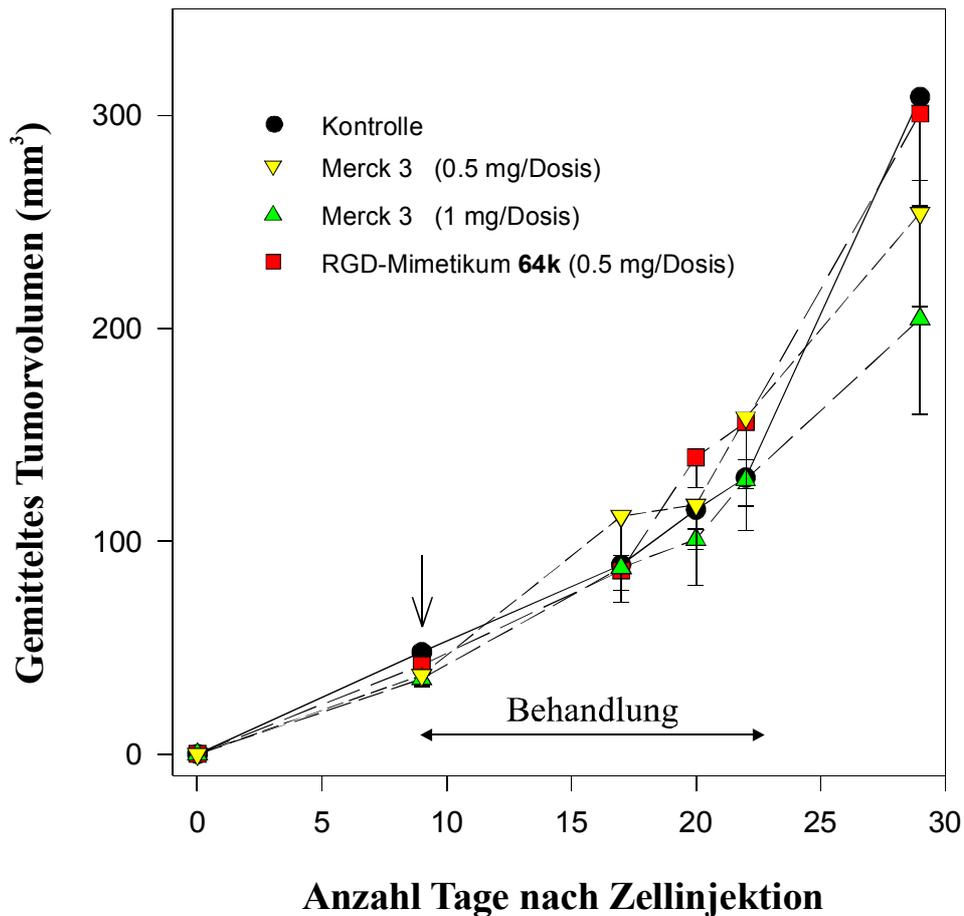


Abbildung 6.4: *Untersuchung der RGD-Mimetika 64k und EMD 328903 als Angiogenese-Inhibitoren in Dickdarmtumoren: das Diagramm zeigt die Entwicklung des Tumorumfugens innerhalb von vier Wochen nach der Tumorzell-Injektion; ab dem 9. Tag beginnt die Behandlung mit den $\alpha\beta_3$ -Antagonisten (tägliche Injektion über zwei Wochen).*

6.4 Klinische Studien – Ausblick

Was passiert mit einem Wirkstoff, wenn er die präklinischen Studien erfolgreich durchlaufen hat? Wenn seine Wirksamkeit in verschiedenen Tierversuchen mit Nagern und Nicht-Nagern gezeigt wurde und er bezüglich Toxizität unbedenklich ist, kann er für klinische Studien bezüglich der Wirksamkeit beim Menschen zugelassen werden.

In Deutschland ist dafür das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zuständig, in Amerika die *Food and Drug Administration* (FDA) (The New Drug Approval Process: <http://www.fda.gov/cder/handbook/develop.htm>).

Die klinischen Studien werden in drei Phasen unterteilt. Die Studien der klinischen Phase I dienen der Untersuchung von Art und Höhe der Dosierung, sowie der Bestimmung der Pharmakokinetik des Wirkstoffs. Man untersucht, ab welcher Wirkstoffdosis Nebenwirkungen auftreten. Während man diese Untersuchungen normalerweise an gesunden Probanden vornimmt, werden in der Krebsmedizin Patienten mit fortgeschrittener Krankheit untersucht, bei denen die auf dem Markt vorhandenen Therapeutika keinen Erfolg gezeigt haben. In den Phase II Studien wird die Wirksamkeit des Präparats erprobt und das Verhältnis zwischen Dosis und Wirkung ermittelt. Die Phase III dient der Bestätigung aller Ergebnisse an einer großen Zahl von Patienten.

Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte, cyclische Pentapeptid cyclo-(RGDf[NMe]V) befindet sich zur Zeit in der zweiten klinischen Entwicklungsphase als Angiogenese-Inhibitor (Angiogenesis Inhibitors in Clinical Trials: <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/table.html>). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sehr potente RGD-Mimetika mit stark verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften vorgestellt, die jedoch für eine weitere Entwicklung als oral einzunehmendes Medikament noch nicht ausreichten (orale Bioverfügbarkeit <10 %). Das aza-RGD-Mimetikum **64k** mit einer hohen Halbwertszeit und einer Bioverfügbarkeit von 3 % zeigte im Tierversuch keine Wirkung. Für diese Untersuchungen wären die RGD-Mimetika mit einer um zwei Größenordnungen höheren Aktivität im subnanomolaren Bereich (**64c**, **75c**, **76g**) besser geeignet. Die Erhöhung der Bioverfügbarkeit bei gleichbleibender Aktivität ist daher das Ziel für weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der Angiogenese-Forschung.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Festphasen-Parallelsynthese hochaktiver und selektiver RGD-Mimetika. Die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) ist ein häufig vorkommendes Integrinbindungsmotiv, das als Leitstruktur für die Entwicklung von Integrinantagonisten dient. Die Inhibition von Integrinrezeptoren erlaubt die Beeinflussung verschiedener, pathophysiologischer Prozesse. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die α v-Integrine und insbesondere der α v β 3-Rezeptor, der an adhäsiven Vorgängen während der Migration und Extravasation von Tumorzellen beteiligt ist und eine entscheidende Rolle bei der tumorinduzierten Angiogenese spielt.

Als Leitstruktur für die Synthese der RGD-Mimetika diente die durch *screening* einer Substanzbibliothek identifizierte Verbindung **9**.^[226] Der Aufbau der RGD-Mimetika an der Festphase wurde durch Kombination der vier Bausteine **A-D** durchgeführt (siehe Abbildung 7.1).

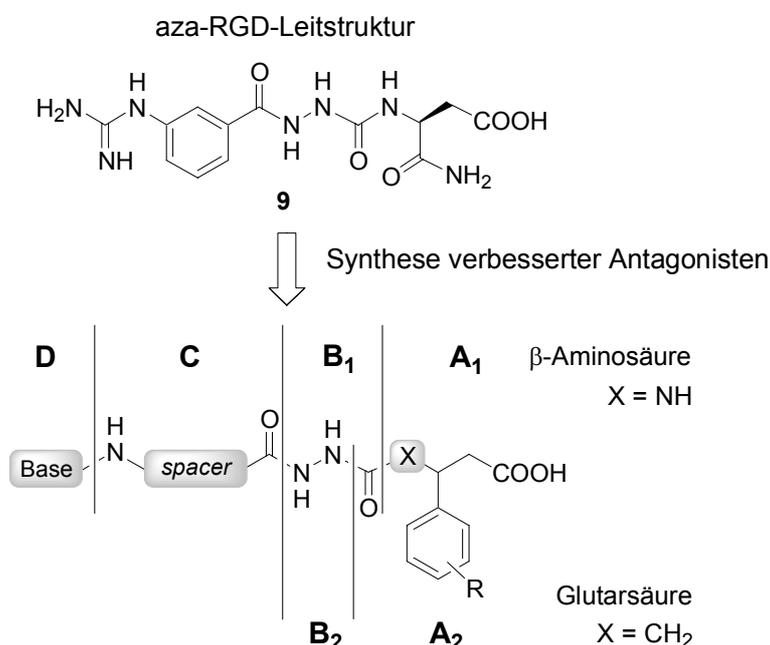


Abbildung 7.1: Entwicklung von RGD-Mimetika-Bibliotheken durch Aufbau aus den Bausteinen **A-D**, ausgehend von der Leitstruktur **9**.

Die wichtigste Modifikation bestand in der Einführung des Phenylrings anstelle des Amids, die zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität und Selektivität führte.

In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss des Substitutionsmusters auf die biologische Wirkung durch Verwendung verschiedener Säurebausteine untersucht. Darüberhinaus wurde mit der Synthese der azacarba-RGD-Mimetika ($X = \text{CH}_2$) eine neue Klasse von Peptidbindungsmimetika als Integrinantagonisten untersucht. Die geschickte retrosynthetische Zerlegung erlaubte die Synthese beider Säurebausteine **A₁** (β -Aminosäuren) und **A₂** (Glutarsäuren) aus Benzaldehyden. Zur Verbesserung der Resorptionseigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung oral bioverfügbarer Wirkstoffe musste die Lipophilie der RGD-Verbindungen gesteigert werden. Diese Steigerung konnte durch Variation des Basenbausteins **D** erreicht werden. Die polare Guanidingruppe wurde durch verschiedene, weniger basische Guanidinmimetika ersetzt.

Basierend auf der Fmoc-Strategie wurden die Bausteine **A-D** schrittweise an fester Phase miteinander verknüpft. Die einzelnen Verknüpfungsreaktionen konnten anhand ausgewählter RGD-Mimetika hinsichtlich ihrer Eignung zur Parallel-Synthese überprüft und entsprechend optimiert werden. Bei der Anknüpfung der Glutarsäure (Baustein **A₂**) an die feste Phase kam es zu Problemen durch Quervernetzung. Daraufhin wurden die Bausteine **A₂** und **B₂** in Lösung miteinander kombiniert und anschließend immobilisiert. Baustein **A₁** wurde an fester Phase mit dem als Oxadiazolon aktivierten aza-Glycin-Baustein **B₁** umgesetzt. Als Spacerbaustein **C** konnten Aminopentan- bzw. Aminobenzoessäure ohne Probleme mit den harzgebundenen Bausteinen **AB** verknüpft werden. Dagegen war die Einführung des Basenbausteins **D** an fester Phase lediglich im Fall von Guanidin, Amidin und Amino-Dihydroimidazol möglich. Die Basen Aminopyridin und Aminobenzimidazol wurden in Lösung zu Baustein **CD** kombiniert und anschließend mit den harzgebundenen Bausteinen **AB** umgesetzt.

Durch die Bestimmung der Integrinaffinität ausgewählter Verbindungen konnten die für hohe Aktivität optimalen Bausteinkombinationen identifiziert werden. Diese wurden dann zur Parallelsynthese zweier RGD-Mimetika-Bibliotheken, bestehend aus 20 aza- und 24 azacarba-RGD-Mimetika als Einzelverbindungen, eingesetzt. Zur Herstellung von RGD-Mimetika im Gramm-Maßstab wurde zusätzlich eine effektive Lösungssynthese ausgearbeitet. Damit lassen sich die Verbindungen ausgehend von billigen Edukten in 9 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 60 % herstellen.

Die biologischen Aktivitäten der RGD-Mimetika wurden bei der Firma Merck, Darmstadt, an isolierten $\alpha v\beta 3$ -, $\alpha v\beta 5$ -, $\alpha v\beta 6$ - und $\alpha IIb\beta 3$ -Rezeptoren untersucht. Beide Bibliotheken enthalten hochaffine αv -Integrin-Antagonisten mit hoher Selektivität bezüglich des Blutplättchenrezeptors $\alpha IIb\beta 3$. Die aktivsten Verbindungen besitzen eine Chlor- bzw. Phenyl-Substitution am Säurebaustein **A** (IC_{50} im subnanomolaren Bereich). Bei den Basenbausteinen **D** führten Guanidin (mit Arylspacer) und Aminopyridin (mit Alkylspacer) zu größter Rezeptoraffinität. Es konnten verschiedene αv -Subtyp-Selektivitäten (Mono- und Biselektivität bzgl. $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 6$) identifiziert werden, die für Untersuchungen biologischer Zusammenhänge von großem Interesse sind. Aufbauend auf den dargestellten Ergebnissen ist die Synthese $\alpha v\beta 5$ -selektiver Verbindungen ein weiteres Ziel.

Die Bestimmung der Pharmakokinetik in *in vivo*-Untersuchungen mit Mäusen zeigte insbesondere bei den hochaktiven RGD-Mimetika mit 3,5-Dichlor-Substitutionsmuster gute pharmakokinetische Eigenschaften: aza-Verbindung **64k** besitzt eine außerordentlich hohe Halbwertszeit von 11 Stunden und eine orale Bioverfügbarkeit von 3 %, azacarba-Verbindung **72k** eine Halbwertszeit von 2.7 Stunden und eine bessere orale Bioverfügbarkeit von 7 %. Studien zur Inhibition der Angiogenese in Ratten mit Verbindung **64k** zeigten jedoch keine Wirkung.

Neben der Tumorthherapie sind die in dieser Arbeit vorgestellten RGD-Mimetika auch für den Einsatz in der Tumordiagnostik geeignet. Dazu wurde das azacarba-RGD-Mimetikum **76e** nach Spaltung des Methylethers radioaktiv mit ^{123}I -Iod markiert. Die Untersuchung der Biodistribution von [**3-Iod**]-**76m** in Tumormausmodellen zeigte eine spezifische Anreicherung in Tumoren mit $\alpha v\beta 3$ -Integrinen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung der Festphasen-Parallelsynthese von RGD-Mimetika-Bibliotheken, sowie die Übertragung auf die Synthese in Lösung. Die Identifizierung hochaktiver, nichtpeptidischer $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten ist ein weiterer Schritt zur Entwicklung oral verfügbarer Tumorthapeutika. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen RGD-Mimetika könnten neue Antagonisten mit verbesserter Integrinselektivität abgeleitet werden.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert. NMP wurde von der Firma *BASF* bezogen und ohne weitere Destillation eingesetzt. Falls erforderlich wurden wasserfreie Lösungsmittel von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* und *Merck* bezogen oder nach den gängigen Methoden absolutiert.

Aminosäure-, Schutzgruppenderivate und Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen *Advanced ChemTech*, *Alexis*, *Bachem*, *ChemPur*, *Neosystem*, *NovaBiochem*, *PerSeptive Biosystems*. Alle anderen **Chemikalien** und **Reagenzien** wurden von den Firmen *Alrich*, *Fluka*, *Lancaster*, *Merck-Schuchardt* und *Sigma* bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Tritylchlorid-Polystyrol-**Harz** (TCP-Harz) stammte von der Firma *PepChem*.

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

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

Säulenchromatographische Trennungen^[292] wurden mit 50- bis 100-fachem Überschuß an Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 - 0.063 mm) der Firma *Merck* bei

0.8 - 1.2 bar Überdruck durchgeführt. Die Bedingungen der Chromatographie werden in der Form „(Ethylester:Hexan **K:L**, ab Vol. **M N:O**, ...)“ angegeben, d. h. es wurde mit einem Gemisch von **K** Teilen Ethylester und **L** Teilen Hexan eluiert. Ab Aufgabevolumen **M** wurde die Polarität auf **N:O** Anteile erhöht usw. Die Volumina der aufgefundenen Fraktionen betragen 30-50 mL.

Analytische und präparative RP-HPLC wurde an zwei Geräten der Firma *Beckman* (Pumpensystem 110B, Gradientenkontrolleinheit Typ 420, *Knauer* Uvicord Detektor, sowie System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166) und an zwei Geräten der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* (Äkta Basic 10F mit Autosampler A 900, bzw. Äkta Basic 100F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte bei der Wellenlänge 220 nm. Es wurden für Analytik (\varnothing 4.6 mm) und semipräparative (\varnothing 20 mm) bzw. präparative Trennungen (\varnothing 30 mm bzw. \varnothing 40 mm) folgende Säulen verwendet: ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 µm, 150 mm × 4.6 mm), ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm), ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 bzw. 10 µm, 250 mm × 20 mm), ODS-A C₁₈ (120 Å, 10 µm, 250 mm × 30 mm) der Firma *Omniscrom YMC*, sowie Nucleosil C₁₈ (120 Å, 7 µm, 250 mm × 40 mm) der Firma *Macherey & Nagel*. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0.1 Vol-% TFA im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 30 Minuten verwendet. Im Fall der Anlage Äkta Basic 100F der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* bestand Laufmittel B gerätebedingt aus 90 % Acetonitril und 10 % Wasser mit jeweils 0.1 Vol- % TFA. Die Flußraten betragen 1 mL/min (analytisch), 8 mL/min (semipräparativ) und 25 mL/min (präparativ).

ESI-Massenspektren sowie LC-MS-Untersuchungen wurden von M. Urzinger und B. Cordes an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard* HP 1100 (Säulenmaterial: *Omniscrom YMC* ODS-A C₁₈ (120 Å, 3 µm, 125 mm × 2 mm), Flußrate 0.2 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser und Acetonitril mit jeweils 0.1 Vol-%

Ameisensäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 Minuten verwendet. Die ESI-Spektren werden in der Form „**X** (**Y**) [**M + Z**]⁺“ angegeben, d. h. es wurde die Molekülmasse **X** mit der Intensität **Y** % detektiert, die dem Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit Kation **Z**⁺ entspricht.

Hochaufgelöste FAB-Massenspektren wurden von Dr. J. Osterodt (Firma Merck KGaA, Darmstadt) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

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

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

Die **NMR-Spektren** wurden an den Geräten der Firma *Bruker* AC 250 und DMX 500 bei 300 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der *Bruker* Bibliothek oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Interner Standard für chemische Verschiebungen von ¹H und ¹³C war das Lösungsmittelsignal von DMSO-d₅ für ¹H ($\delta = 2.49$ ppm) und DMSO-d₆ für ¹³C ($\delta = 39.5$ ppm) bzw. CHCl₃ für ¹H ($\delta = 7.24$ ppm) und CDCl₃ für ¹³C ($\delta = 77.0$ ppm). ¹³C-NMR-Spektren wurden mit ¹H-Breitbandentkopplung aufgenommen. Die Signal- und Konfigurationszuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe verschiedener 2D-Experimente (TOCSY, DQF-COSY, HMBC).^[293] Die NMR-Zuordnung der aza- und azacarba-RGD-Mimetika wird durch folgende Nomenklatur unterstützt: Gua = Guanidin, Ami = Amidin, Pyr = Pyridin, Ar = Arylspacer, Phe = Phenylrest des Säurebausteins A, Naph = Naphthylrest.

Die **cLog P**-Werte, Logarithmen der Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen *n*-Octanol und Wasser, wurden mithilfe der Software ChemDraw Ultra 6.0 nach der von Crippen *et al.* vorgeschlagenen Fragmentierungsmethode berechnet.^[294]

Die Berechnung der Position $\vec{X} = (x_1, x_2)$ der Verbindungen (schwarze Punkte) im **Selektivitätsdiagramm** wurden nach folgenden Formeln mithilfe des Programms Mathematica 4 (Version 4.1.0) durchgeführt:

$$E = \alpha(\bar{x} - \vec{A})^2 + \beta(\bar{x} - \vec{B})^2 + \gamma(\bar{x} - \vec{C})^2$$

$$\frac{\partial E}{\partial x_1} = 2\alpha(x_1 - a_1) + 2\beta(x_1 - b_1) + 2\gamma(x_1 - c_1) \stackrel{!}{=} 0$$

$$\frac{\partial E}{\partial x_2} = 2\alpha(x_2 - a_2) + 2\beta(x_2 - b_2) + 2\gamma(x_2 - c_2) \stackrel{!}{=} 0$$

$$\Rightarrow x_1 = \frac{\alpha \cdot a_1 + \beta \cdot b_1 + \gamma \cdot c_1}{\alpha + \beta + \gamma} \quad \text{und} \quad x_2 = \frac{\alpha \cdot a_2 + \beta \cdot b_2 + \gamma \cdot c_2}{\alpha + \beta + \gamma}$$

mit den Koordinaten für die Integrinrezeptoren $\vec{A}, \vec{B}, \vec{C}$ (Ecken) und den Aktivitätsfaktoren α, β, γ :

$$\vec{A} = \left(\frac{\sqrt{3}}{2}, \frac{3}{2}\right), \quad \alpha = \sqrt[3]{\frac{1}{IC_{50}}} \quad (\alpha\nu\beta 3\text{-Integrin})$$

$$\vec{B} = (0, 0), \quad \beta = \sqrt[3]{\frac{1}{IC_{50}}} \quad (\alpha\nu\beta 5\text{-Integrin})$$

$$\vec{C} = (\sqrt{3}, 0), \quad \gamma = \sqrt[3]{\frac{1}{IC_{50}}} \quad (\alpha\nu\beta 6\text{-Integrin})$$

8.2 Synthese der Bausteine

8.2.1 Synthese der Säurebausteine A₁

AAV 1: Synthese der β -Aminosäuren 11^[234]

Der Benzaldehyd **10** (30 mmol), Malonsäure (30 mmol) und Ammoniumacetat (60 mmol, 2 Äquiv.) werden in absolutem Ethanol (40 mL) suspendiert und 6 h unter Rückfluss gekocht. Die als weißer Niederschlag anfallende Aminosäure wird abfiltriert, mit wenig kaltem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation.

3-Amino-3-(4-fluor)-phenylpropionsäure (**11b**)

4-Fluorbenzaldehyd (**10b**) (3.73 g, 30 mmol) wurde nach AAV 1 umgesetzt und ergab **11b** (3.96 g, 73 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.35$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.45$ (m, 2H, o-CH), 7.16 (m, 2H, m-CH), 4.26 (m, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}$), 2.32 (m, 2H, CH- CH_2); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 23.6$ min; **ESI-MS** m/z 184.0 (12) $[\text{M}+\text{H}^+]$, 125.1 (100) $[\text{M-CH}_2\text{COOH}+\text{H}^+]$.

3-Amino-3-(4-brom)-phenylpropionsäure (11d)

4-Brombenzaldehyd (**10d**) (5.55 g, 30 mmol) wurde nach AAV 1 umgesetzt und ergab **11d** (6.08 g, 83 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.30$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.46$ (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, o-CH), 7.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, m-CH), 4.28 (m, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}$), 2.36 (m, 2H, CH- CH_2); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 15.4$ min; **ESI-MS** m/z 243.9 (8) $[\text{M}^{79\text{Br}}+\text{H}^+]$, 185.0 (100) $[\text{M}^{79\text{Br}}\text{-CH}_2\text{COOH}+\text{H}^+]$.

3-Amino-3-(4-methoxy)-phenylpropionsäure (11e)

4-Methoxybenzaldehyd (**10e**) (4.08 g, 30 mmol) wurde nach AAV 1 umgesetzt und ergab **11e** (4.57 g, 78 %) als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.19$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, arom. m-CH), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, arom. o-CH), 4.24 (m, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}$), 2.30 (m, 2H, CH- CH_2); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 19.7$ min; **ESI-MS** m/z 196.0 (6) $[\text{M}+\text{H}^+]$, 137.1 (100) $[\text{M-CH}_2\text{COOH}+\text{H}^+]$.

3-Amino-3-(4-biphenyl)-propionsäure (11g)

4-Phenylbenzaldehyd (**10g**) (5.16 g, 28.3 mmol) wurde nach AAV 1 innerhalb von 14 h unter Rückfluß umgesetzt und ergab **11g** (5.19 g, 73 %) als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{Na}_2\text{CO}_3$) $\delta = 7.79\text{-}7.67$ (m, 4H, arom.), 7.60-7.42 (m, 5H, arom.), 4.34 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}$), 2.67 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH- CH_2);

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 13.8$ min; **ESI-MS** m/z 241.9 (5) $[M+H^+]$, 183.1 (100) $[M-CH_2COOH+H^+]$.

3-Amino-3-(3,5-difluor)-phenylpropionsäure (11j)

3,5-Difluorbenzaldehyd (**10j**) (0.71 g, 5.0 mmol) wurde nach AAV 1 umgesetzt und ergab **11j** (0.30 g, 31 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.22-7.05$ (m, 3H, arom.), 4.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, NH_2-CH), 2.43 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, $CH-CH_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 7.6$ min; **ESI-MS** m/z 201.9 (8) $[M+H^+]$, 143.0 (100) $[M-CH_2COOH+H^+]$.

3-Amino-3-(3,5-dichlor)-phenylpropionsäure (11k)

3,5-Dichlorbenzaldehyd (**10k**) (5.04 g, 28.8 mmol) wurde nach AAV 1 umgesetzt und ergab **11k** (3.08 g, 46 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.49$ (s, 3H, arom.), 4.23 (m, 1H, NH_2-CH), 2.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, $CH-CH_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.3$ min; **ESI-MS** m/z 235.9 (58) $[M^{37Cl}+H^+]$, 233.9 (86) $[M^{35Cl}+H^+]$, 176.9 (62) $[M^{37Cl}-CH_2COOH+H^+]$, 174.9 (100) $[M^{35Cl}-CH_2COOH+H^+]$.

AAV 2: Synthese der *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren **12** modifiziert nach Bolin *et al.*^[235]

Die Aminosäure **11** (18 mmol) wird unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit in absolutem CH_2Cl_2 (50 mL) suspendiert und mit TMS-Cl (4.5 mL, 36 mmol, 2.0 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend tropft man innerhalb von 15 min bei 0 °C wasserfreies DIPEA (9.2 mL, 48 mmol, 3.0 Äquiv.) zu. (In der Regel entsteht nach DIPEA-Zugabe eine homogene Reaktionslösung). Nach 10 min wird das Reaktionsgemisch bei 0 °C mit festem Fmoc-Cl (4.71 g, 18.2 mmol, 1.1 Äquiv.) versetzt. Dazu wird während der Fmoc-Cl-

Zugabe das Gummiseptum vom Reaktionsgefäß abgenommen. Man läßt die Reaktion innerhalb 1 h auf Raumtemperatur kommen und kontrolliert den Reaktionsverlauf per DC oder HPLC. Nach vollständigem Umsatz wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt, der Rückstand in Et₂O (100 mL) aufgenommen und mit 2.5 %iger wäßriger Na₂CO₃-Lösung (3 × 100 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen (bei manchen Aminosäuren heterogene Suspension) werden nochmals mit Et₂O (1 × 120 mL) extrahiert und mit 1N HCl (50 mL) auf pH = 1-2 angesäuert. Fällt die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure als Feststoff aus, wird diese durch Filtration abgetrennt, mit Wasser (2 × 50 mL) gewaschen und im Exsikkator getrocknet. *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die sich nach Ansäuern als Öl abscheiden, werden mit Ethylacetat (2 × 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 3: Synthese der *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren 12 modifiziert nach Chang *et al.*^[236]

Die Aminosäure **11** (13 mmol) wird in einer 10 %igen wäßrigen Na₂CO₃-Lösung (25 mL) gelöst und bei 0 °C mit Dioxan (12 mL) versetzt. Anschließend wird unter starkem Rühren innerhalb 30 min eine Lösung von FmocCl (3.36 g, 14.3 mmol, 1.05 Äquiv.) in Dioxan (25 mL) zugetropft. Nach 1 h wird das Kühlbad entfernt und 5-25 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC kontrolliert. Danach wird das Reaktionsgemisch in Eiswasser (300 mL) gegossen und mit Et₂O (3 × 100 mL) extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mit konz. HCl auf 1-2 eingestellt. Fällt die *N*-Fmoc-geschützte Aminosäure als Feststoff aus, wird diese durch Filtration abgetrennt, mit Wasser (2 × 50 mL) gewaschen und im Exsikkator getrocknet. *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die sich nach Ansäuern als Öl abscheiden, werden mit Ethylacetat (2 × 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**12a**)

3-Amino-3-phenylpropionsäure (**11a**) (3.10 g, 18.75 mmol) wurde nach AAV 2 mit einem Unterschub Fmoc-Cl (3.235 g, 12.5 mmol, 0.66 Äquiv.) umgesetzt (Fraktion I). Die Etherphase wurde nachträglich nochmals mit 2.5 %iger wäßriger Na₂CO₃-Lösung (3 × 100 mL) ausgeschüttelt, angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert (Fraktion II). Lyophilisieren der vereinigten Fraktionen aus Dioxan ergab **12a** (5.206 g, 100 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.7$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:5:0.1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) $\delta =$ 12.20 (br. s, 1H, COOH), 7.92 (m, 1H, NH), 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.66 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.21-7.43 (m, 9H, arom.), 4.92 (m, 1H, NH-CH), 4.16-4.25 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.66 (m, 2H, CH₂-CO); HPLC (30-80 % in 30 min) $R_t = 28.0$ min; ESI-MS m/z 813.0 (100) [2M+K⁺], 797.0 (32) [2M+Na⁺], 410.1 (17) [M+Na⁺], 387.9 (16) [M+H⁺].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-fluor)-phenylpropionsäure (**12b**)

3-Amino-3-(4-fluor)-phenylpropionsäure (**11b**) (2.00 g, 10.9 mmol) wurde nach AAV 3 innerhalb von 21 h umgesetzt. Reinigung durch Flashchromatographie ergab **12b** (2.63 g, 60 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.5$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) $\delta =$ 12.30 (br. s, 1H, COOH), 7.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, NH), 7.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.45-7.20 (m, 6H, arom.), 7.13 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2H, Phenyl), 4.92 (dt, 1H, NH-CH), 4.31-4.12 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.79-2.54 (m, 2H, CH₂-CO); HPLC (30-80 % in 30 min) $R_t = 21.0$ min (verunreinigt mit 4-Fluorzimtsäure (15 %): $R_t = 10.8$ min); ESI-MS m/z 849.0 (100) [2M+K⁺], 833.0 (28) [2M+Na⁺], 428.1 (10) [M+Na⁺].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-chlor)-phenylpropionsäure (**12c**)

3-Amino-3-(4-chlor)-phenylpropionsäure (**11c**) (1.00 g, 5.0 mmol) wurde nach AAV 3 innerhalb von 25 h umgesetzt und ergab **12c** (1.93 g, 91 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.30 (br. s, 1H, COOH), 7.93 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.38-7.21 (m, 8H, arom.), 4.91 (dt, 1H, NH-CH), 4.26-4.12 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.76-2.56 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 25.4$ min; **ESI-MS** m/z 882.9 (75) [$2\text{M}^{37\text{Cl}}+\text{K}^+$], 880.8 (100) [$2\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{K}^+$], 866.8 (30) [$2\text{M}^{37\text{Cl}}+\text{Na}^+$], 864.8 (38) [$2\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{Na}^+$], 421.8 (28) [$\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{H}^+$].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-brom)-phenylpropionsäure (**12d**)

3-Amino-3-(4-brom)-phenylpropionsäure (**11d**) (1.00 g, 10.0 mmol) wurde nach AAV 3 innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **12d** (1.93 g, 79 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.30 (br. s, 1H, COOH), 7.93 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.38-7.21 (m, 8H, arom.), 4.91 (dt, 1H, NH-CH), 4.26-4.12 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.76-2.56 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 25.4$ min; **ESI-MS** m/z 970.9 (100) [$2\text{M}^{79\text{Br}81\text{Br}}+\text{K}^+$], 954.8 (34) [$2\text{M}^{79\text{Br}81\text{Br}}+\text{Na}^+$], 466.0 (24) [$\text{M}^{79\text{Br}}+\text{H}^+$].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-methoxy)-phenylpropionsäure (**12e**)

3-Amino-3-(4-methoxy)-phenylpropionsäure (**11e**) (3,90 g, 20 mmol) wurde nach AAV 3 umgesetzt und ergab **12e** (6.85 g, 82 %) als weißes Pulver.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.88 (m, 1H, NH), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.44-7.16 (m, 6H, arom.), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, arom.), 4.88 (m, 1H, NH-CH), 4.28-4.15 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.75-2.50 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 24.7$ min; **ESI-MS** m/z 418.1 (16) $[\text{M}+\text{H}^+]$.

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-trifluormethoxy)-phenylpropionsäure (12f)

3-Amino-3-(4-trifluormethoxy)-phenylpropionsäure (**11f**) (531 mg, 2.12 mmol) wurde nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (551 mg, 2.12 mmol, 1 Äquiv.) umgesetzt und ergab **12f** (930 mg, 96 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.7$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.27 (br. s, 1H, COOH), 7.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.45-7.23 (m, 8H, arom.), 4.93 (dt, 1H, NH-CH), 4.28 (m, 2H, CH-CH₂-O), 4.19 (m, 1H, CH-CH₂-O), 2.76-2.60 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 27.2$ min; **ESI-MS** m/z 981.0 (100) $[\text{2M}+\text{K}^+]$, 965.0 (41) $[\text{2M}+\text{Na}^+]$, 471.9 (23) $[\text{M}+\text{H}^+]$.

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(2-nitro)-phenylpropionsäure (12h)

3-Amino-3-(2-nitro)-phenylpropionsäure (**11h**) (1.05 g, 5.0 mmol) wurde nach AAV 3 mit Fmoc-Cl (1.30 g, 5.0 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **12h** (1.67 g, 78 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.41 (br. s, 1H, COOH), 8.21 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, arom.), 7.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.72 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, arom.), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.64-7.19 (m, 6H, arom.), 5.37 (m, 1H, NH-CH), 4.29-4.09 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.78-2.60 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 24.9$ min; **ESI-MS** m/z

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3-nitro)-phenylpropionsäure (12i)

3-Amino-3-(3-nitro)-phenylpropionsäure (**11i**) (1.31 g, 6.23 mmol) wurde nach AAV 3 innerhalb von 23 h umgesetzt und ergab **12i** (2.67 g, 100 %) als grauen Feststoff.

$R_f = 0.55$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.30$ (br. s, 1H, COOH), 8.21 (s, 1H, arom.), 8.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, arom.), 7.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, arom.), 7.70-7.61 (m, 3H, arom.), 7.40-7.21 (m, 4H, arom.), 4.93 (dt, 1H, NH-CH), 4.29-4.13 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.78-2.57 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 22.9$ min; **ESI-MS** m/z 903.1 (100) [2M+K⁺], 987.2 (26) [2M+Na⁺], 433.1 (8) [M+H⁺].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-difluor)-phenylpropionsäure (12j)

3-Amino-3-(3,5-difluor)-phenylpropionsäure (**11j**) (0.28 g, 1.40 mmol) wurde nach AAV 3 innerhalb von 5 h umgesetzt und ergab **12j** (0.34 g, 59 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.7$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.35$ (br. s, 1H, COOH), 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.45-7.20 (m, 4H, arom.), 7.08-6.85 (m, 3H, Phenyl), 4.93 (dt, 1H, NH-CH), 4.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH-CH₂-O), 4.20 (dd, 1H, CH-CH₂-O), 2.73-2.55 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 21.8$ min (verunreinigt mit Fmoc-Dipeptid (20 %): $R_t = 23.7$ min und 24.1 min); **ESI-MS** m/z 884.9 (100) [2M+K⁺], 869.0 (30) [2M+Na⁺], 423.9 (6) [M+H⁺].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlor)-phenylpropionsäure (12k)

3-Amino-3-(3,5-dichlor)-phenylpropionsäure (**11k**) (614 mg, 2.62 mmol) wurde mit Fmoc-Cl (679 mg, 2.62 mmol, 1 Äquiv.) nach AAV 3 innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **12k** (1.04 g, 88 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.7$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.35 (br. s, 1H, COOH), 7.98 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.50-7.28 (m, 7H, arom.), 4.90 (dt, 1H, NH-CH), 4.28 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH- CH_2 -O), 4.19 (dd, 1H, CH- CH_2 -O), 2.76-2.56 (m, 2H, CH_2 -CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 26.7$ min; **ESI-MS** m/z 958.9 (100) [$2\text{M}^{37\text{Cl}+3(35\text{Cl})+\text{K}^+}$], 932.9 (24) [$2\text{M}^{37\text{Cl}^+}+\text{Na}^+$], 455.9 (9) [$\text{M}^{35\text{Cl}^+}+\text{H}^+$].

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-isopropylpropionsäure (**12o**)

3-Amino-3-isopropylpropionsäure (**11o**) (0.52 g, 3.96 mmol) wurde nach AAV 2 umgesetzt und ergab **12o** (0.75 g, 55 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:5:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.30 (br. s, 1H, COOH), 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.69 (m, 2H, arom.), 7.43-7.28 (m, 4H, arom.), 7.22 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 4.34-4.23 (m, 3H, CH- CH_2 -O), 3.72 (m, 1H, NH-CH), 2.39 (dd, $J = 4.8$ Hz/15.1 Hz, 1H, HCH-CO), 2.27 (dd, $J = 9.1$ Hz/15.4 Hz, 1H, HCH-CO), 1.70 (m, 1H, CH-(CH_3) $_2$), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH-(CH_3) $_2$); **HPLC** (20-90 % in 30 min) $R_t = 23.2$ min; **ESI-MS** m/z 745.0 (100) [$2\text{M}+\text{K}^+$], 729.0 (25) [$2\text{M}+\text{Na}^+$], 376.1 (10) [$\text{M}+\text{Na}^+$], 353.9 (16) [$\text{M}+\text{H}^+$].

8.2.2 Synthese der Säurebausteine **A** $_2$

AAV 4a: Synthese der 3-Phenylglutarsäuren **20**: Isolierung des Zwischenprodukts **18**^[239]

Der Benzaldehyd **10** (30 mmol) wird in Acetessigsäureethylester (7.8 g, 60 mmol, 2 Äquiv.) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird Piperidin (0.5 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung drei Tage bei RT stehen gelassen, wobei das Gemisch fest wird. Nach Zugabe von Ethanol (40 mL) erhitzt man die Suspension unter Rückfluß bis eine klare Lösung entsteht. Danach lässt man die Lösung auf RT abkühlen. Der kristalline Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig kaltem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

AAV 4b: Synthese der 3-Phenylglutarsäuren 20: Verseifung des Zwischenprodukts 18^[239]

Das Zwischenprodukt **18** (20 mmol) wird portionsweise zu einer wässrigen, 20N KOH-Lösung (2 mL) gegeben und 3 h bei 80 °C gerührt. Bei Löslichkeitsproblemen wird zusätzlich MeOH (2 mL) zugegeben, das man vor der Aufarbeitung abdestilliert. Nach Zugabe von Eis (50 mL) wird die Lösung mit Ethylacetat (2 × 50 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit konz. HCl auf pH = 1 angesäuert. Die ausfallende Glutarsäure wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3-(4-Fluor)-phenylglutarsäure (20b)

Die Umsetzung von 4-Fluorbenzaldehyd (**10b**) (3.72 g, 30 mmol) nach AAV 4a ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-fluor)-phenylglutarsäurediethylester (**18b**) (6.83 g, 63 %) als weißen Feststoff. Das Zwischenprodukt **18b** (6.89 g, 18.8 mmol) wurde nach AAV 4b verseift und ergab **20b** (3.66 g, 86 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.03 (br. s, 1H, 2×COOH), 7.28 (m, 2H, arom. *o*-CH), 7.06 (m, 2H, arom. *m*-CH), 3.43-3.25 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.69-2.43 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 13.6 min; ESI-MS *m/z* 491.0 (38) [2M+K⁺], 305.8 (66) [5M+4Na⁺].

3-(4-Chlor)-phenylglutarsäure (20c)

4-Chlorbenzaldehyd (**10c**) (7.03 g, 50 mmol) wurde nach AAV 4a unter Argon innerhalb von 5 d umgesetzt und ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-chlor)-phenylglutarsäurediethylester (**18c**) (13.13 g, 69 %) als gelben Feststoff. Das Zwischenprodukt **18c** (13.08 g, 34.2 mmol) wurde sofort nach AAV 4b verseift und ergab **20c** (4.81 g, 58 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.06 (br. s, 1H, 2×COOH), 7.41-7.24 (m, 4H, arom.), 3.44-3.27 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.64 (dd, *J* = 6.2 Hz/15.8 Hz, 2H, CH-(HCH)₂), 2.50 (dd, *J* = 8.8 Hz/15.6 Hz, 2H, CH-(HCH)₂); HPLC (10-90 %

in 30 min) $R_t = 15.6$ min; **ESI-MS** m/z 563.8 (84) [$5M^{3(37Cl)+2(35Cl)+2H^+}$], 321.9 (88) [$4M^{35Cl}+3Na^+$], 263.0 (8) [$M^{35Cl}+K^+$].

3-(4-Brom)-phenylglutarsäure (20d)

Die Umsetzung von 4-Brombenzaldehyd (**10d**) (9.25 g, 50 mmol) nach AAV 4a ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-brom)-phenylglutarsäurediethylester (**18d**) (11.06 g, 52 %) als gelben Feststoff. Das Zwischenprodukt **18d** (11.12 g, 26.0 mmol) wurde sofort nach AAV 4b verseift. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase mit konz. HCl auf pH = 1 wurde die ausgefallene Glutarsäure abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die wässrige Phase wurde zusätzlich mit Ether (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Vereinigung der bräunlichen Feststoffe wurde **20d** (5.68 g, 76 %) erhalten.

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.11$ (br. s, 1H, 2×COOH), 7.46 (m, 2H, arom. *o*-CH), 7.24 (m, 2H, arom. *m*-CH), 3.46 (m, 1H, CH_2 -CH- CH_2), 2.61-2.43 (m, 4H, CH_2 -CH- CH_2); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 16.2$ min; **ESI-MS** m/z 614.9 (58) [$2M^{81Br81Br}+K^+$], 612.9 (98) [$2M^{79Br81Br}+K^+$], 610.9 (58) [$2M^{79Br79Br}+K^+$], 598.8 (36) [$2M^{81Br81Br}+Na^+$], 596.8 (43) [$2M^{79Br81Br}+Na^+$], 594.8 (16) [$2M^{79Br79Br}+Na^+$].

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäure (20e)

4-Methoxybenzaldehyd (**10e**) (6.81 g, 50 mmol) wurde nach AAV 4a umgesetzt. Umkristallisieren aus der 2.5-fachen Menge Ethanol (160 mL, aufgrund schlechter Löslichkeit) ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-methoxy)-phenylglutarsäurediethylester (**18e**) (10.97 g, 58 %) als weißen Feststoff. Das Zwischenprodukt **18e** (11.00 g, 29.1 mmol) wurde sofort nach AAV 4b verseift. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase mit konz. HCl auf pH = 1 wurde die ausgefallene Glutarsäure abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die wässrige Phase wurde zusätzlich mit Ether (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet,

filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Vereinigung der bräunlichen Feststoffe wurde **20e** (5.96 g, 86 %) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.98 (br. s, 1H, 2×COOH), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom. *m*-CH), 6.93 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom. *o*-CH), 3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.70-2.46 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.0 min; **ESI-MS** m/z 515.1 (100) [2M+K⁺], 499.0 (35) [2M+Na⁺].

3-(4-Biphenyl)-glutarsäure (20g)

Biphenyl-4-carboxaldehyd (**10g**) (6.59 g, 36.2 mmol) wurde in Acetessigsäure-ethylester (10.5 mL, 83.0 mmol, 2.3 Äquiv.) suspendiert und bis zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde nach AAV 4a Piperidin (0.8 mL) bei RT zugetropft. Umkristallisieren aus Ethylacetat (40 mL) nach 1 d ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-biphenyl)-glutarsäurediethylester (**18g**) (10.75 g, 71 %) als weiße Nadeln. Das Zwischenprodukt **18g** (4.24 g, 10.0 mmol) wurde nach AAV 4b mit wässriger, 20N NaOH (3.5 mL, 70 mmol, 7 Äquiv.) unter Zugabe von MeOH (20 mL) verseift. Einengen der Reaktionslösung und Aufarbeitung nach AAV 4b ergab **20g** (2.70 g, 95 %) als grauen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.06 (br. s, 1.5H, 2×COOH), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 2H, arom.), 7.56 (d, J = 8.7 Hz, 2H, arom.), 7.44 (t, J = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.35 (d, J = 7.6 Hz, 2H, arom.), 7.31 (t, 1H, arom.), 3.45 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.67 (dd, J = 6.4 Hz/15.9 Hz, 2H, CH-(HCH)₂), 2.51 (dd, J = 8.7 Hz/15.6 Hz, 2H, CH-(HCH)₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 19.1 min; **ESI-MS** m/z 607.0 (100) [2M+K⁺], 591.2 (58) [2M+Na⁺].

3-(3-Nitro)-phenylglutarsäure (20i)

3-(3-Nitro)-benzaldehyd (**10i**) (7.56 g, 50 mmol) wurde nach AAV 4a innerhalb von 26 h umgesetzt. Umkristallisieren aus Ethylacetat (40 mL) ergab 2,4-Bisaceto-3-(3-nitro)-phenylglutarsäurediethylester (**18i**) (12.20 g, 63 %) als graue Nadeln. Das

Zwischenprodukt **18i** (12.20 g, 31.0 mmol) wurde sofort nach AAV 4b mit wässriger, 20N NaOH (11 mL, 220 mmol, 7 Äquiv.) unter Zugabe von MeOH (40 mL) verseift. Einengen der Reaktionslösung und Aufarbeitung nach AAV 4b ergab **20i** (6.90 g, 87 %) als braunen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.12 (br. s, 2H, 2×COOH), 8.13 (d, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, arom. C(2)H), 8.03 (dt, ⁴J = 1.3 Hz und ³J = 8.2 Hz, 1H, arom. C⁴-H), 7.76 (d, J = 7.7 Hz, 1H, arom. C⁶-H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 2H, arom. C⁵-H), 3.45 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.80-2.53 (m, 4H, H₂C-CH-CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 13.7 min.

3-(3,5-Difluor)-phenylglutarsäure (20j)

3,5-Difluorbenzaldehyd (**10j**) (1.42 g, 10 mmol) wurde nach AAV 4a umgesetzt und ergab 2,4-Bisaceto-3-(3,5-difluor)-phenylglutarsäurediethylester (**18j**) (2.78 g, 72 %) als grauen Feststoff. Das Zwischenprodukt **18j** (2.78 g, 7.23 mmol) wurde sofort nach AAV 4b durch langsame Zugabe von 20N, wässriger KOH (5 mL, 100 mmol, 14 Äquiv.) innerhalb von 2 h bei 80 °C verseift und ergab **20j** (0.74 g, 42 %) als gelben Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.04 (br. s, 1H, 2×COOH), 7.11-6.96 (s, 3H, arom.), 7.35 (s, 2H, arom.), 3.45-3.29 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.67-2.52 (m, 4H, H₂C-CH-CH₂); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 172.70, 111.13, 110.79, 102.24, 101.91, 37.94; HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 16.5 min.

3-(3,5-Dichlor)-phenylglutarsäure (20k)

3,5-Dichlorbenzaldehyd (**10k**) (5.0 g, 28.6 mmol) wurde nach AAV 4a unter Argon innerhalb von 5 d umgesetzt. Umkristallisieren aus der 2-fachen Menge Ethanol (70 mL, aufgrund schlechter Löslichkeit) ergab 2,4-Bisaceto-3-(3,5-dichlor)-phenylglutarsäurediethylester (**18k**) (9.81 g, 83 %) als gelblichen Feststoff. Das Zwischenprodukt **18k** (8.87 g, 21.2 mmol) wurde sofort nach AAV 4b verseift und ergab **20k** (5.46 g, 93 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.02 (br. s, 1H, 2×COOH), 7.41 (s, 1H, arom.), 7.35 (s, 2H, arom.), 3.41 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.65-2.51 (m, 4H, H₂C-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 17.5 min; **ESI-MS** *m/z* 593.0 (64) [2M^{35Cl+37Cl}+K⁺], 591.0 (54) [2M^{35Cl+35Cl}+K⁺], 577.0 (56) [2M^{35Cl+37Cl}+Na⁺], 575.1 (28) [2M^{35Cl+35Cl}+Na⁺].

8.2.3 Synthese der aza-Glycinbausteine B

Fmoc-Hydrazin (22) modifiziert nach Carpino *et al.*^[249]

Eine Lösung von Hydrazinhydrat (**21**) (40 mL, 40 g, 800 mmol, 40 Äquiv.) in H₂O (1.0 L) wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einem KPG-Rührer heftig durchmischt, während man eine Lösung von Fmoc-Chlorid (5.17 g, 20.0 mmol) in CH₃CN (100 mL) innerhalb 2-5 h zutropfte. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Trocknen im Vakuum ergab **22** (4.98 g, 98 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.34 (br. s, 1H, H₂N-NH), 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, arom.), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 4.32-4.15 (m, 3H, CH₂-CH), 4.07 (br. s, 2H, H₂N-NH); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 16.2 min (verunreinigt mit ca. 5 % Bis-Fmoc-hydrazin: R_t = 30.2 min); **ESI-MS** *m/z* 179.2 (100) [M-O(CO)-N₂H₃⁻].

5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-3H-[1,3,4]oxadiazol-2-on (24)^[250]

Eine Suspension von Fmoc-Hydrazin (**22**) (0.995 g, 3.91 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) und ges. wässriger NaHCO₃-Lösung (40 mL) wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 5 min heftig gerührt. Danach beließ man die Reaktionsmischung 5 min ohne Rühren, gab mit einer Spritze Phosgen (1.89 M in Toluol, 6.3 mL, 11.7 mmol, 3 Äquiv.) zur organischen (unteren) Phase und begann unmittelbar nach der Zugabe die Reaktionsmischung wieder zu rühren. Nach 10 min wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (15

mL) und CH_2Cl_2 (15 mL) versetzt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (2×40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **24** (1.03 g, 94 %) als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ = 8.00 (br. s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 2H, arom.), 7.45 (t, J = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 4.49 (d, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 4.36 (t, J = 7.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); **$^{13}\text{C-NMR}$** (62.5 MHz, CDCl_3) δ = 156.1, 152.5, 142.4, 141.3, 128.2, 127.3, 125.1, 120.2, 72.9, 46.2; **IR** (KBr) ν = 3300s, 1780s, 1650s, 1451m, 1426m, 1347m, 1224m, 918m, 758w, 740m cm^{-1} .

8.2.4 Synthese der kombinierten Bausteine A_2B_2

AAV 5: Synthese der Glutarsäureanhydride **25**

Eine Suspension der Glutarsäure **20** (10 mmol) wird in Essigsäureanhydrid (2.8 mL, 30 mmol, 3 Äquiv.) bis zur vollständigen Lösung unter Rückfluss auf 130 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird tropfenweise Et_2O (2 mL) zugegeben. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Et_2O (2 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3-Phenylglutarsäureanhydrid (**25a**)

3-Phenylglutarsäure (**20a**) (2.08 g, 10 mmol) wurde nach AAV 5 umgesetzt und ergab **25a** (1.31 g, 77 %) als weiße Nadeln.

R_f = 0.9 (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:2:0.1); **$^1\text{H-NMR}$** (250 MHz, CDCl_3) δ = 7.41-7.29 (m, 3H, arom.), 7.18 (m, 2H, arom.), 3.41 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.10 (dd, J = 4.5/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)_2), 2.85 (dd, J = 11.2/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)_2).

3-(4-Fluor)-phenylglutarsäureanhydrid (25b)

3-(4-Fluor)-phenylglutarsäure (**20b**) (3.69 g, 16.34 mmol) wurde nach AAV 5 umgesetzt und ergab **25b** (1.86 g, 56 %) als weiße Nadeln.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.20-7.03 (m, 4H, arom.), 3.38 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.08 (dd, J = 4.5/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)₂), 2.81 (dd, J = 11.2/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 20.3 min; **ESI-MS** m/z 370.0 (55) [3(M+H₂O)+Na⁺+K⁺].

3-(4-Chlor)-phenylglutarsäureanhydrid (25c)

3-(4-Chlor)-phenylglutarsäure (**20c**) (4.81 g, 19.8 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (7.5 mL, 79.2 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 bei 140 °C 10 min umgesetzt und ergab **25c** (3.51 g, 65 %) als weiße Nadeln.

R_f = 0.8 (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom.), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom.), 3.58 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.90-3.09 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 22.5 min; **ESI-MS** m/z 339.6 (48) [4M^{3(37Cl)+2(35Cl)+3K⁺}], 322.0 (38) [4M^{3(37Cl)+2(35Cl)+H⁺+Na⁺+K⁺}].

3-(4-Brom)-phenylglutarsäureanhydrid (25d)

3-(4-Brom)-phenylglutarsäure (**20d**) (5.59 g, 19.45 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (7.8 mL, 78 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 umgesetzt und ergab **25d** (4.35 g, 84 %) als weiße Kristalle.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom.), 7.26 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom.), 3.56 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.09-2.90 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 23.1 min.

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäureanhydrid (25e)

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäure (**20e**) (5.86 g, 24.6 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (9.9 mL, 98 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 umgesetzt und ergab **25e** (4.16 g, 77 %) als weiße Nadeln.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom.), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, arom.), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 3.34 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.06 (dd, *J* = 4.5/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)₂), 2.90 (dd, *J* = 11.2/17.3 Hz, 2H, CH-(HCH)₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 19.9 min; **ESI-MS** *m/z* 300.0 (46) [3(M-CO)+Na⁺+H⁺].

3-(4-Biphenyl)-glutarsäureanhydrid (25g)

3-(4-Biphenyl)-glutarsäure (**20g**) (2.70 g, 9.5 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (3.6 mL, 38 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 innerhalb von 30 min umgesetzt und ergab **25g** (1.86 g, 74 %) als grauen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.65 (m, 4H, arom.), 7.49-7.32 (m, 5H, arom.), 3.61 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.15-2.95 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 25.8 min; **ESI-MS** *m/z* 554.9 (66) [2M+Na⁺], 267.2 (100) [M+H⁺].

3-(3-Nitro)-phenylglutarsäureanhydrid (25i)

3-(3-Nitro)-glutarsäure (**20i**) (6.90 g, 27 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (10.2 mL, 108 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 innerhalb 1 h umgesetzt und ergab **25i** (5.38 g, 85 %) als bräunlichen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.20-8.11 (m, 2H, arom.), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, arom.), 7.65 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H, arom.), 3.77 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.21-2.98 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 19.8 min; **ESI-MS** *m/z* 492.9 (38) [2M+Na⁺], 341.7 (100) [3(M-CO)+Na⁺+K⁺].

3-(3,5-Difluor)-phenylglutarsäureanhydrid (25j)

3,5-Difluorbenzaldehyd (**20j**) (0.73 g, 3.0 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (1.1 mL, 12 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 umgesetzt und ergab **25j** (0.49 g, 74 %) als grauen Feststoff.

$R_f = 0.9$ (Hexan/Ethylacetat 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.19-7.02$ (m, 3H, arom.), 3.62 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.21-2.96 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$).

3-(3,5-Dichlor)-phenylglutarsäureanhydrid (25k)

3-(3,5-Dichlor)-phenylglutarsäure (**20k**) (4.23 g, 15.3 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (5.8 mL, 61.2 mmol, 4 Äquiv.) nach AAV 5 bei 140 °C 10 min umgesetzt und ergab **25k** (2.90 g, 65 %) als weiße Kristalle.

$R_f = 0.8$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.53$ (s, 1H, arom.), 7.40 (s, 2H, arom.), 3.61 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.13-2.94 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.9$ min; **ESI-MS** m/z 299.1 (45) $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^+]$.

Glutarsäureanhydrid (25n)

Glutarsäure (**20n**) (1.32 g, 10 mmol) wurde nach AAV 5 innerhalb von 30 min auf 150 °C erhitzt und ergab **25n** (0.54 g, 48 %) als weiße Nadeln.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 2.70$ (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.87 (qn, $J = 7.5$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$).

AAV 6: Synthese von 5-(*N'*-Fmoc-Hydrazino)-5-oxopentansäuren 26

Das Glutarsäureanhydrid **25** (2.0 mmol) wird zusammen mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (2.0-2.2 mmol, 1 Äquiv., je nach Reinheit des Fmoc-Hydrazins) in absolutem THF (20 mL) unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC kontrolliert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das ölige Produkt im Ölpumpen-vakuum getrocknet.

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-phenylpentansäure (26a)

3-Phenylglutarsäureanhydrid (**25a**) (380 mg, 2.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (509 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) unter Argon innerhalb von 17 h umgesetzt. Die Reinigung durch Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 1:1, ab 500 mL Ethylacetat; jeweils + 0.5 % AcOH) ergab **26a** (840 mg, 94 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.02$ (br. s, 1H, COOH), 9.70 (s, 1H), 9.19 (s, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, arom.), 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.45-7.13 (m, 9H, arom.), 4.38-4.15 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.54-3.39 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.71 (dd, $J = 4.6/16.6$ Hz, 2H, CH-(HCH)₂), 2.52 (m, 2H, CH-(HCH)₂); **HPLC** (40-90 % in 20 min) $R_t = 14.2$ min; **ESI-MS** m/z 926.9 (88) [2M+K⁺], 910.8 (100) [2M+Na⁺], 483.0 (40) [M+K⁺], 467.1 (36) [M+Na⁺], 444.9 (100) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-fluor)-phenylpentansäure (26b)

3-(4-Fluor)-phenylglutarsäureanhydrid (**25b**) (416 mg, 2.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (509 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **26b** (916 mg, 99 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.02$ (br. s, 1H, COOH), 9.67 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.46-7.05 (m, 8H, arom.), 4.28-4.13 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.51-3.37 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.72-2.33 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 30.2$ min; **ESI-MS** m/z 946.8 (100) [2M+Na⁺], 924.8 (92) [2M+H⁺], 463.0 (82) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-chlor)-phenyl-pentansäure (26c)

3-(4-Chlor)-phenylglutarsäureanhydrid (**25c**) (674 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (840 mg, 3.3 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 48 h umgesetzt und ergab **26c** (1.51 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 12.43 (br. s, 1H, COOH), 9.74 (s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.39-7.10 (m, 8H, arom.), 4.26-4.11 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.52-3.41 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.62-2.33 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 31.0$ min; **ESI-MS** m/z 978.9 (100) [$2\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{Na}^+$], 957.1 (83) [$2\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{H}^+$], 479.0 (67) [$\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{H}^+$].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-brom)-phenyl-pentansäure (26d)

3-(4-Brom)-phenylglutarsäureanhydrid (**25d**) (538 mg, 2.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (509 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **26d** (1.05 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta =$ 9.62 (s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.38-7.09 (m, 8H, arom.), 4.29-4.15 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.56-3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.68-2.30 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 32.2$ min; **ESI-MS** m/z 1046.6 (100) [$2\text{M}^{81\text{Br}79\text{Br}}+\text{H}^+$], 524.9 (58) [$\text{M}^{81\text{Br}}+\text{Na}^+$], 522.9 (62) [$\text{M}^{79\text{Br}}+\text{Na}^+$].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-methoxy)-phenylpentansäure (26e)

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäureanhydrid (**25e**) (440 mg, 2.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (509 mg, 2.0 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **26e** (950 mg, 99 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.68$ (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, arom.), 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, arom.), 7.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Phenyl), 6.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Phenyl), 4.39-4.18 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.70 (s, 3H, O-CH₃), 3.50-3.35 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.67-2.27 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 30.8$ min; **ESI-MS** m/z 948.9 (100) [2M+H⁺], 497.0 (62) [M+Na⁺], 475.0 (74) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-biphenyl)-pentansäure (26g)

3-(4-Biphenyl)-glutarsäureanhydrid (**25g**) (799 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (839 mg, 3.3 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 20 h umgesetzt und ergab **26g** (1.64 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.76$ (s, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.49-7.25 (m, 13H, arom.), 4.38-4.16 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.58-3.42 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.71-2.31 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 24.3$ min; **ESI-MS** m/z 1062.9 (100) [2M+Na⁺], 1041.0 (92) [2M+H⁺], 543.0 (71) [M+Na⁺], 521.1 (56) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3-nitro)-phenyl-pentansäure (26i)

3-(3-Nitro)-phenylglutarsäureanhydrid (**25i**) (706 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (839 mg, 3.3 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 22 h umgesetzt und ergab **26i** (1.55 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.68$ (s, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH), 8.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, arom.), 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, arom.), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.76-7.63 (m, 3H, arom.), 7.58 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, arom.), 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, arom.), 7.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 4.31-4.16 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.52-3.37 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.68-2.29 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 27.1$ min; **ESI-MS** m/z 978.8 (96) [2M+H⁺], 512.0 (52) [M+Na⁺], 490.1 (100) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-difluor)-phenylpentansäure (26j)

3-(3,5-Difluor)-phenylglutarsäureanhydrid (**25j**) (486 mg, 2.1 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (601 mg, 2.4 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 4 h umgesetzt und ergab **26j** (1.09 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.70$ (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, NH), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, arom.), 7.70 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, arom.), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, arom.), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.00 (m, 3H, Phenyl), 4.35-4.15 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.50 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.80-2.50 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 21.4$ min; **ESI-MS** m/z 982.9 (72) [2M+Na⁺], 960.8 (100) [2M+H⁺], 503.1 (30) [M+Na⁺], 480.9 (55) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlor)-phenylpentansäure (26k)

3-(3,5-Dichlor)-phenylglutarsäureanhydrid (**25k**) (777 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (840 mg, 3.3 mmol, 1 Äquiv.) innerhalb von 10 h umgesetzt und ergab **26k** (1.62 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.2$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.69$ (s, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, arom.), 7.48-7.21 (m, 7H, arom.), 4.36-4.13 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.52-3.36 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.72-2.25 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.6$ min; **ESI-MS** m/z 525.1 (100) [M+Na⁺], 513.0 (78) [M+H⁺].

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxopentansäure (26n)

Glutarsäureanhydrid (**25n**) (171 mg, 1.5 mmol) wurde nach AAV 6 mit Fmoc-Hydrazin (**22**) (420 mg, 1.65 mmol, 1.1 Äquiv.) innerhalb von 20 h umgesetzt. Die Reinigung durch Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 1:1, ab 200 mL 1:2, ab 400 mL 1:3, ab 500 mL Ethylacetat; jeweils + 0.5 % AcOH) ergab **26n** (132 mg, 26 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.1$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.23$ (br. s, 1H, COOH), 9.68 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.61-2.50 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.63-1.39 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 18.7$ min; **ESI-MS** m/z 759.0 (100) [2M+Na⁺], 391.0 (75) [M+Na⁺], 369.1 (56) [M+H⁺].

8.2.5 Synthese der Basenbausteine

***N*-Boc-1-guanylpyrazol (31) modifiziert nach Wu *et al.*^[257]**

1-Guanylpyrazolhydrochlorid (**30**) (3.37 g, 23.1 mmol) und DIPEA (11.9 mL, 8.97 g, 69.4 mmol, 3.0 Äquiv.) wurden in CH₂Cl₂ (20 mL) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von Boc₂O (5.58 g, 25.6 mmol, 1.1 Äquiv.) in CH₂Cl₂ (6 mL) versetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und mit H₂O (2 × 30 mL) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden anschließend mit Et₂O (3 × 20 mL) gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Einengen im Vakuum und Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 4:1) ergab **31** (4.64 g, 96 %) als farbloses Öl.

R_f = 0.8 (Hexan/Ethylacetat 2:1); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.80 (br. s, 2H, 2 × NH), 8.40 (br. d, *J* = 2.6 Hz, 1H, C⁵-H), 7.87 (br. s, 1H, C³-H), 6.54 (dd, *J* = 2.7, 1.6 Hz, 1H, C⁴-H), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃); **HPLC** (10-90 % in 30 min) **R_t** = 15.5 min.

***N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol (32) modifiziert nach Wu *et al.*^[257]**

Eine Lösung von **31** (3.763 g, 17.90 mmol) in trockenem THF (13 mL) wurde bei 0 °C innerhalb von 5 min zu einer Suspension von NaH (1.681 g, 55-60 % in Paraffin, ca. 42.0 mmol, ca. 2.3 Äquiv.) in trockenem THF (20 mL) getropft. Nach 5 min wurde das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch noch weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde ein Lösung von Boc₂O (4.310 g, 19.75 mmol, 1.1 Äquiv.) in trockenem THF (26 mL) zugegeben und mit THF (80 mL) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 4 h bei 65 °C gerührt, auf 0 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit Essigsäure/THF (13 mL/40 mL) versetzt. Das ausgefallene Natriumacetat wurde abfiltriert und mit Et₂O (2 × 30 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum auf ein Volumen von ca. 50 mL eingeeengt, mit 10 %iger Na₂CO₃-Lösung (120 mL) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Extraktion mit Et₂O (3 × 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung mittels

Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 10:1, ab 500 mL 5:1) ergab **32** (4.02 g, 72 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat 2:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.91$ (br. s, 1H, NH), 8.30 (dd, $J = 0.7/2.8$ Hz, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 7.62 (dd, $J = 0.7/1.6$ Hz, 1H, $\text{C}^3\text{-H}$), 6.41 (dd, $J = 1.6/2.8$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H}$), 1.55 und 1.49 (2×s, 18H, 2× $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 26.4$ min.

S-2-Naphthylmethyl-thioacetimidat-hydrobromid (35) modifiziert nach Shearer et al.^[259]

Thioacetamid (**33**) (2.25 g, 30 mmol) und 2-Brommethylnaphthalin (**34**) (6.63 g, 30 mmol) wurden in trockenem CHCl_3 (100 mL) unter Rückfluß erhitzt. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung im Eisbad gekühlt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit kaltem CHCl_3 (15 mL) gewaschen. Trocknen im Vakuum ergab **35** (6.73 g, 65 %) als weißen Feststoff.

Smp. 212-215 °C (Lit.: 220-221 °C); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 11.87$ (br. s, 1H, NH), 8.02-7.86 (m, 4H, arom.), 7.57-7.49 (m, 3H, arom.), 4.76 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.64 (s, 3H, CH_3); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 26.4$ min; **ESI-MS** m/z 215.9 (5) [$\text{M}+\text{H}^+$], 141.1 (100) [$\text{M}-(\text{CH}_3(\text{CNH})\text{S})^-$].

8.2.6 Synthese der kombinierten Bausteine CD

5-[N-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäureethylester (38) modifiziert nach McCall et al.^[295]

5-Brompentansäureethylester (**37**) (31.36 g, 12 mL, 150 mmol) wurden zusammen mit 2-Amino-4-methylpyridin (**36**) (32.44 g, 300 mmol, 2 Äquiv.) unter Rühren 16 h auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wurde die Reaktionsmischung mit ges. NaHCO_3 -Lösung (100 mL) versetzt und mit Diethylether (5 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **38** (24 g Rohprodukt) als gelbes Öl.

Reinigung mittels Flashchromatographie (Hexan/ Ethylacetat 1:1, ab 2 L 1:1.5, ab 3 L 1:2.5, ab 4L 1:5) ergab das Produkt **38** (6.30 g, 19 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.5$ (Hexan/Ethylacetat 1:10); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.78$ (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 6.28-6.25 (m, 2H, arom. $C^5\text{-H}$ und $C^6\text{-H}$), 6.22 (s, 1H, arom. $C^3\text{-H}$), 4.02 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O- $CH_2\text{-CH}_3$), 3.18 (dt, $J = 6.6$ Hz, 2H, NH- CH_2), 2.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $CH_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2.10 (s, 3H, $C^{\text{quart.}}\text{-CH}_3$), 1.62-1.42 (m, 4H, $CH_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- $CH_2\text{-CH}_3$); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 14.8$ min; **ESI-MS** m/z 237.1 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$, 191.1 (28) $[\text{M-OEt}^-]$.

5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäure (**40**)

Der Ester **38** (6.30 g, 26.7 mmol) wurde in MeOH (8 mL) gelöst und 20 h bei Raumtemperatur mit 2N wässriger NaOH (16 mL, 32 mmol, 1.2 Äquiv.) behandelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung im Vakuum eingeeengt und mit 1N HCl auf pH 4.5 eingestellt, so dass das Produkt ausfiel. Die Kristallisation der Mischung wurde über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Abfiltrieren des Niederschlags, Waschen mit H_2O (5 mL) und Trocknen im Vakuum ergab das Produkt **40** (4.47 g, 81 %) als gelblichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.79$ (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 6.30-6.26 (m, 2H, arom. $C^5\text{-H}$ und $C^6\text{-H}$), 6.22 (s, 1H, arom. $C^3\text{-H}$), 3.17 (dt, $J = 5.8$ Hz, 2H, NH- CH_2), 2.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $CH_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2.11 (s, 3H, $C^{\text{quart.}}\text{-CH}_3$), 1.58-1.41 (m, 4H, $CH_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174.6$ (COOH), 159.3, 147.3, 146.8, 113.1, 107.9, 40.5, 33.7, 28.8, 22.4, 20.8; **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 9.6$ min; **ESI-MS** m/z 209.2 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$, 191.2 (36) $[\text{M-OH}^-]$.

3-[N-(Pyridin-2-yl)-amino]-benzoesäure (43) modifiziert nach Baumgarth *et al.*^[296]

Natriumhydrid (0.88 g, 55 % Dispersion in Mineralöl, 20.0 mmol, 2 Äquiv.) wurde unter Argon in DMF (20 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Nach langsamer Zugabe von 3-Aminobenzoesäure (**41**) (1.37 g, 10.0 mmol) wurde die Suspension 2 h bei Raumtemperatur gerührt. 2-Fluorpyridin (**42**) (0.86 mL, 10.0 mmol) wurde mit einer Spritze durch das Septum zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 60 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von H₂O (5 mL) beendet, mit wässriger NaHCO₃-Lösung (30 mL) versetzt und mit Ethylacetat (2 × 30 mL) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden durch Zugabe von 1N HCl auf pH = 3 angesäuert und wiederum mit Ethylacetat (2 × 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Produkt **43** (0.42 g, 20 %) als roten Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.65 (s, 1H), 8.12 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz), 7.99 (s, 1H), 7.82 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.72 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.41 (m, 1H), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.85 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 14.5 min; ESI-MS *m/z* 429.2 (14) [2M+H⁺], 215.2 (37) [M+H⁺].

4-[N-(Benzimidazol-2-yl)-amino]-butansäure (48) modifiziert nach Orjales *et al.*^[267]

2-Chlorbenzimidazol (**45**) (1.07 g, 7.0 mmol) wurde unter Argon mit 4-Aminobuttersäureethylester Hydrochlorid (**46**) (3.55 g, 21.0 mmol, 3 Äquivalente) auf 160 °C erhitzt. Nach 30 Minuten wurde die Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt, in Aceton (10 mL) gelöst und mit Ethylacetat (4 mL) zur Kristallisation gebracht. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, mit wässriger NaHCO₃-Lösung (20 mL) versetzt und mit Ethylacetat (2 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab den Ethylester **47** (0.26 g, 15 %) als grauen Feststoff.

Die wässrige NaHCO₃-Phase wurde durch Zugabe von 2N HCl auf pH = 5 angesäuert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab die Säure **48** (0.30 g, 20 %) als weißen Feststoff (zusammen mit NaCl).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.90 (br. s, 1H, COOH), 9.18 (m, 1H, NH), 7.37 (m, 2H, arom.), 7.22 (m, 2H, arom.), 3.45 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 2.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.84 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 8.9 min; ESI-MS *m/z* 438.8 (25) [2M+H⁺], 220.1 (100) [M+H⁺].

N-(*tert*Butyloxycarbonyl)-2-Chlorbenzimidazol (**51**)

2-Chlorbenzimidazol (**45**) (2.00 g, 13.1 mmol) wurde unter Argon in absolutem THF (25 mL) gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (1.8 mL, 13.1 mmol, 1 Äquivalent) wurde Boc-Anhydrid (2.29 g, 10.5 mmol, 0.8 Äquivalente) zugetropft und die Reaktionsmischung 28 h bei Raumtemperatur gerührt. Entfernung des Lösungsmittels nach Beendigung der Reaktion ergab das Rohprodukt **51** (2.57 g, 97 %) als gelblichen Feststoff. Reinigung mittels Flashchromatographie (Hexan/Ethylacetat 4:1, ab 1 L 2:1) ergab das Produkt **51** (1.92 g, 73 %) als weißen Feststoff.

R_f = 0.8 (Hexan/Ethylacetat 1:1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.90 (m, 1H, arom.), 7.65 (m, 1H, arom.), 7.36-7.30 (m, 2H, arom.), 1.70 (s, 9H, (CH₃)₃); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 24.6 min.

N-Benzyl-2-Chlorbenzimidazol (**54**)^[267]

2-Chlorbenzimidazol (**45**) (1.19 g, 7.8 mmol) wurde unter Argon in DMF (8 mL) gelöst, bei 0 °C portionsweise mit NaH (0.312 g, 60 % Dispersion in Mineralöl, 7.8 mmol, 1 Äquivalent) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Benzylbromid (**53**) (0.92 mL, 7.8 mmol, 1 Äquivalent) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension langsam in Wasser (100 mL) gegeben, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Abfiltrieren des Niederschlags, Waschen mit H₂O (10 mL) und Trocknen im Vakuum ergab das Produkt **54** (1.51 g, 81 %) als weißen Feststoff.

Smp. 100 °C (Lit.: 106 °C); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.65-7.57 (m, 2H, arom.), 7.39-7.18 (m, 7H, arom.), 5.52 (s, 2H, N-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 21.4 min; **ESI-MS** *m/z* 506.9 (100) [2M^{35Cl}+Na⁺], 243.1 (82) [M^{35Cl}+H⁺].

8.3 Festphasensynthese der RGD-Mimetika

Allgemeine Anmerkungen zur Festphasensynthese

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

Da die RGD-Mimetika nach saurem Abspalten vom TCP-Harz sowie nach Reinigung per HPLC mit sehr großer Wahrscheinlichkeit als TFA-Salze vorlagen, wurden die Ausbeuten der so erhaltenen RGD-Mimetika auf die molaren Massen der entsprechenden TFA-Salze bezogen.

8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese

AAV 7: Belegung des TCP-Harzes

Das TCP-Harz (2.0 g, Kapazität ca. 0.9 mmol/g) wird in absolutem CH₂Cl₂ (15 mL) suspendiert. Nach 30 min wird das Harz über eine Fritte abgesaugt. Zu dem Harz wird eine Lösung des *N*-terminal geschützten Säurebausteins (**a**: *N*-Fmoc-Aminosäure **12** oder **b**: 5-(*N*'-Fmoc-Hydrazino)-5-oxopentansäure **26**, 2.4 mmol) und DIPEA (0.64 mL, 3.75 mmol, 1.25 Äquiv./Säurebaustein) in trockenem CH₂Cl₂ (15 mL) gegeben und die Mischung 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von DIPEA (0.5 mL, 3.0 mmol) und Methanol (2 mL) wird weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (5 × 15 mL, je 3 min) gewaschen. Zur Bestimmung der Belegung oder für längere Lagerung des Harzes gibt man beim letzten Waschschrift sukzessive kleinere Mengen Methanol zu und wäscht anschließend mit reinem MeOH (2 × 15 mL, je 3 min). Nach Trocknung über Nacht im Vakuum wird die Belegungsichte des Harzes nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{m_{ges} - m_{Harz}}{(M_{Xxx} - M_{HCl}) \cdot m_{ges}}$$

n	Belegungsdichte [mmol Säure / g belegtes Harz]
m_{ges}	Gesamtmasse des Harzes nach der Kupplung [g]
m_{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]
M_{Xxx}	Molmasse des Fmoc-geschützten Säurebausteins [g/mol]
M_{HCl}	Molmasse HCl (36.461 g/mol)

Der Fehler, der dabei durch die unterschiedlichen Massen von Cl- und MeO- entsteht (*capping*), ist zu vernachlässigen.

AAV 8: Einbau von Fmoc-azaGly an der Festphase

Die harzgebundene *N*-Fmoc-Aminosäure **12** (200 mg, 0.4-0.6 mmol/g, 0.08-0.12 mmol) wird mit DMF (1 × 2 mL) 5 min gewaschen und mit 20 % Piperidin in DMF (2 × 2 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Anschließend wird das Harz mit DMF (6 × 2 mL, je 2 min) und absolutem CH₂Cl₂ (5 × 2 mL, je 2 min) gewaschen. Danach wird das harzgebundene freie Amin mit einer Lösung von 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-on (**24**) (0.170 g, 0.609 mmol, 3 Äquiv.) in absolutem CH₂Cl₂ (2 mL) versetzt. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit CH₂Cl₂ (6 × 2 mL, je 2 min) und NMP (4 × 2 mL, je 2 min) abgebrochen.

AAV 9: Kupplung des Spacerbausteins nach der HATU-Methode

Das harzgebundene *N'*-Fmoc-Hydrazin **26** oder **59** (200 mg, 0.08-0.12 mmol) wird mit DMF (1 × 2 mL) 5 min gewaschen und mit 20 % Piperidin in DMF (2 × 2 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Anschließend wird das Harz mit DMF (6 × 2 mL, je 2 min) gewaschen. Das harzgebundene freie Hydrazin wird mit einer ca. 0.1M Lösung des Spacerbausteins (**a**: 3-(*N*-Fmoc)-aminobenzoesäure (**29**) oder **b**: 5-[*N*-(4-Methyl)-pyridin-2-yl]-aminopentansäure (**40**), 2.5 Äquiv. bezogen auf die Harzbelegung), HATU (2.4 Äquiv.) und *sym*-Collidin (30 Äquiv.) in trockenem DMF versetzt. Nach einer Kupplungszeit von 2-12 h wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (6 × 15 mL, je 2 min) beendet.

AAV 10: Guanylierung von harzgebundenen Amin

Harzgebundenes *N*-Fmoc-geschütztes Amin (ca. 200 mg, 0.08-0.12 mmol) wird mit 20 % Piperidin in DMF (2×2 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Anschließend wird das Harz mit DMF (6×2 mL, je 2 min) und mit wasserfreiem CHCl_3 (3×2 mL, je 2 min) gewaschen. Das freie harzgebundene Amin (0.08-0.12 mmol) wird mit einer Lösung von *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol (**32**) (0.8-1.2 mmol, 10 Äquiv.) in CHCl_3 (1.5 mL) versetzt. Das verwendete CHCl_3 wurde über Na_2CO_3 gelagert, um Spuren von HCl zu entfernen. Um das Eintrocknen der Reaktions suspension zu verhindern, wird das Reaktionsgefäß (Kunststoffspritze mit PP-Fritte) zusammen mit einem in CHCl_3 -getränkten Zellstoff in eine 1 l-Flasche mit Schraubverschluß gegeben. Die Flasche wird verschlossen und in einem Trockenschrank auf 50 °C erwärmt. Nach 10 min wird die Flasche kurz geöffnet, um einen kritischen Überdruck abzubauen. Das Reaktionsgefäß wird im Abstand von 3-5 h geschüttelt, so daß eine „homogene“ Suspension entsteht. Andere Möglichkeiten der Reaktionsführung bestehen darin, dass Harz in einem Kolben bei 50 °C im Wasserbad rotieren zu lassen oder in einem beheizbaren Schüttler umzusetzen. Nach 20 h wird das Harz mit CH_2Cl_2 (6×2 mL, je 2 min) gewaschen.

AAV 11: Amidierung von harzgebundenen Amin

Harzgebundenes *N*-Fmoc-geschütztes Amin (ca. 200 mg, 0.08-0.12 mmol) wird mit 20 % Piperidin in DMF (2×2 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Anschließend wird das Harz mit DMF (6×2 mL, je 2 min) und mit NMP (3×2 mL, je 2 min) gewaschen. Das freie harzgebundene Amin (0.08-0.12 mmol) wird durch Öffnen des Stempels der Spritze mit einer Suspension von *S*-2-Naphthylmethylthioacetimidat Hydrobromid (**35**) (0.16-0.24 mmol, 2 Äquiv.) in NMP (2 mL) versetzt. Nach Aufsetzen des Stempels und Ausdrücken wird die Lösung wieder aufgezogen und die Reaktionsmischung 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Reaktion durch Waschen mit NMP (6×2 mL, je 2 min) und CH_2Cl_2 (3×2 mL, je 2 min) abgebrochen.

AAV 11: Dihydroimidazolierung von harzgebundenen Aminen

Harzgebundenes *N*-Fmoc-geschütztes Amin (ca. 200 mg, 0.08-0.12 mmol) wird mit mit 20 % Piperidin in DMF (2×2 mL) zuerst 5 min und danach 20 min entschützt. Anschließend wird das Harz mit DMF (6×2 mL, je 2 min) und mit NMP (3×2 mL, je 2 min) gewaschen. Das freie harzgebundene Amin (0.08-0.12 mmol) wird mit einer Lösung von 2-(3,5-Dimethylpyrazolyl)-4,5-dihydroimidazol (**73**) (0.24-0.36 mmol, 3 Äquiv.) und DIPEA (0.36-0.54 mmol, 4.5 Äquiv.) in NMP (2 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Reaktion durch Waschen mit NMP (6×2 mL, je 2 min) und CH_2Cl_2 (3×2 mL, je 2 min) abgebrochen.

AAV 12: Abspaltung vom TCP-Harz mit TFA

Das Harz (0.25 g) wird mit CH_2Cl_2 (4×2 mL) gewaschen, mit einem 47.5:47.5:5-Gemisch aus CH_2Cl_2 , TFA und TIPS (3×2 mL) einmal 1.5 h, einmal 30 min und einmal 3 min geschüttelt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden eingeeengt und der Rückstand aus *tert*Butanol/Wasser lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch präparative HPLC.

AAV 13: Abspaltung vom TCP-Harz mit Essigsäure oder Hexafluorisopropanol

Das Harz (0.25 g) wird zunächst mit CH_2Cl_2 (4×2 mL, je 2 min) gewaschen und dann einmal 1.5 h, einmal 30 min und einmal 3 min mit einem 3:1:1-Gemisch aus CH_2Cl_2 , Essigsäure und Trifluorethanol (3×2 mL) oder einem Gemisch aus 20 % HFIP in CH_2Cl_2 geschüttelt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden eingeeengt, der Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert (nur bei der Abspaltung mit AcOH) und aus *tert*Butanol/Wasser lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch präparative HPLC.

8.3.2 Festphasensynthese

Bei Unterbrechung der Synthese wird das Harz, wie in AAV 7 beschrieben, mit MeOH geschrumpft und im Vakuum getrocknet.

Harzbelegung mit 3-(*N*-Fmoc)-aminopropionsäure (**12**)

Die Belegung von TCP-Harz mit *N*-Fmoc-geschützter 3-Aminopropionsäure **12** nach AAV 7 ergab die in Tabelle 8.1 dargestellten Belegungsdichten:

Tabelle 8.1: Harzbelegung mit 3-(*N*-Fmoc)-aminopropionsäure (**12**).

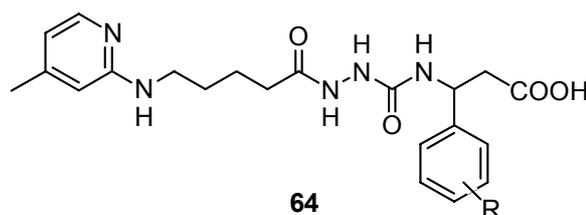
Nr.	Substituent R	Menge 12 [g]	Stoffmenge [mmol]	Harzmenge m _{Harz} [g]	Belegung n [mmol/g Harz]
12aP	4-H	1.05	2.70	2.00	0.576
12bP	4-F	0.97	2.40	2.00	0.507
12cP	4-Cl	1.14	2.70	2.00	0.480
12dP	4-Br	0.94	2.02	2.00	0.450
12eP	4-OMe	1.00	2.40	2.00	0.566
12fP	4-OCF ₃	0.67	1.42	1.48	0.499
12gP	4-Phenyl	0.92	1.98	1.66	0.701
12hP	2-NO ₂	1.17	2.70	2.00	0.570
12iP	3-NO ₂	2.67	6.20	4.00	0.560
12jP	3,5-DiFluor	0.32	0.76	0.97	0.515
12kP	3,5-DiChlor	0.91	1.99	1.80	0.459
12lP	(Naphthyl)	1.06	3.66	2.00	0.610
12nP	(H)	0.84	2.70	2.00	0.620
12oP	(<i>iso</i> Prop)	0.72	2.03	1.50	0.530
12pP	(Nip)	0.71	2.03	1.50	0.550

Harzbelegung mit 5-(*N'*-Fmoc)-hydrazino-5-oxopentansäure (**26**)

Die Belegung von TCP-Harz mit 5-(*N'*-Fmoc)-hydrazino-5-oxopentansäure (**26**) nach AAV 7 ergab die in Tabelle 8.2 dargestellten Belegungsdichten:

Tabelle 8.2: Harzbelegung mit 5-(*N'*-Fmoc)-hydrazino-5-oxopentansäure (**26**).

Nr.	Substituent R	Menge 26 [g]	Stoffmenge [mmol]	Harzmenge m _{Harz} [g]	Belegung n [mmol/g Harz]
26aP	4-H	1.87	4.20	3.10	0.560
26bP	4-F	0.93	2.00	2.00	0.359
26cP	4-Cl	0.96	3.00	3.00	0.490
26dP	4-Br	1.00	2.00	2.00	0.420
26eP	4-OMe	1.42	3.00	2.40	0.457
26gP	4-Phenyl	1.56	3.00	3.00	0.557
26iP	3-NO ₂	1.47	3.00	3.00	0.450
26jP	3,5-DiFluor	1.03	2.15	2.39	0.464
26kP	3,5-DiChlor	1.54	3.00	3.00	0.475



3-*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (**64a**)

Die Umsetzung von **12aP** (0.20 g, 0.576 mmol/g, 0.115 mmol) nach AAV 8, 9b, und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64a** (42 mg, 88 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-45 % in 30 min) ergab **64a** (18 mg, 30 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.15 (br. s, 1H, COOH), 9.47 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.60 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.86 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.26-7.32 und 7.21 (m, 5H, ^{Phe}C²⁻⁶-H), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.83 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.70 (d, J = 6.2 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.03 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 2.63-2.74 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 13.2 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₁H₂₈N₅O₅ 414.2141, gef. 414.2145 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-fluorphenyl)-propionsäure (64b)

Die Umsetzung von **12bP** (0.20 g, 0.507 mmol/g, 0.101 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **24**), 9b, und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64b** (47 mg, 100 % Rohausbeute) als weißen Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-40 % in 30 min) ergab **64b** (5 mg, 9 %) als weißen Feststoff.

Smp. 49-51 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.00 (br. s, 1H, COOH), 12.37 (s, 1H, [^{Pyr}N-H]⁺), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.48 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.87 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.33 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.11 (m, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.80 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.02 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.63-2.75 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.12 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.61 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.9 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₁H₂₇FN₅O₄ 432.2047, gef. 432.2041 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (64c)

Die Umsetzung von **12cP** (2.5 g, 0.570 mmol/g, 1.43 mmol) in einem 50mL-Glasgefäß mit Absaugvorrichtung und Fritte nach AAV 8 (4.2 Äquiv. **24**), 9b, und 13

(AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64c** (785 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64c** (494 mg in 3 Fraktionen, 62 %) als weißen Feststoff.

Smp. 47-49 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.07 (br. s, 1H, COOH), 9.47 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.56 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.89 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.30-7.36 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.82 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.01 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.63-2.75 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.61 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 16.9 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₁H₂₇ClN₅O₄ 448.1752, gef. 448.1769 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-bromphenyl)-propionsäure (**64d**)

Die Umsetzung von **12dP** (1.00 g, 0.450 mmol/g, 0.450 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **24**, 14 h), 9b, und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64d** (229 mg, 92 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64d** (81 mg, 27 %) als gelben Feststoff.

Smp. 58-62 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.03 (br. s, 1H, COOH), 9.47 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.50 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.90 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.81 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.00 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.62-2.77 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.52-1.65 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 17.0 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₁H₂₇BrN₅O₄ 492.1247, gef. 492.1249 [M^{79Br}+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-methoxyphenyl)-propionsäure (64e)

Die Umsetzung von **12eP** (0.20 g, 0.566 mmol/g, 0.113 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **24**), **9b**, und **13** (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64e** (55 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **64e** (22 mg, 35 %) als weißen Feststoff.

Smp. 43-45 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.06 (br. s, 1H, COOH), 12.22 (br. s, 1H, [^{Pyr}N-H]⁺), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.56 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.82 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 6.82 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 4.97 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.71 (s, 3H, O-CH₃), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.60-2.72 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, ^{Pyr}C⁴-CH₃), 2.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.55-1.61 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.4 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₃₀N₅O₅ 444.2247, gef. 444.2239 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-trifluormethoxyphenyl)-propionsäure (64f)

Die Umsetzung von **12fP** (0.50 g, 0.499 mmol/g, 0.250 mmol) nach AAV 8 (14 h), **9b** (2 Äquiv. **40**, 16 h), und **13** (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64f** (139 mg, 99 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64f** (58 mg, 38 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.89 (br. s, 1H, COOH), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.43 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.89 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.80 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.05 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.66-2.77 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO),

1.53-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 19.9 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₂₇F₃N₅O₅ 498.1964, gef. 498.1968 [M+H⁺].

3-{N-[N'-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-biphenyl)-propionsäure (64g)

Die Umsetzung von **12gP** (0.20 g, 0.701 mmol/g, 0.14 mmol) nach AAV 8 (3 h), 9b (13 h), und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64g** (65 mg, 77 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **64g** (29 mg, 35 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.01 (br. s, 1H, COOH), 9.47 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.84 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.44 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, Phe-^{Phe}C^{3',5'}-H), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Phe-^{Phe}C^{2',6'}-H), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Phe-^{Phe}C^{4'}-H), 6.99 (m, 1H, CO-NH-CH), 6.29 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 6.26 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 5.06 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.17 (m, 2H, NH-CH₂), 2.67-2.78 (m, 2H, CH-CH₂-COOH), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.43-1.55 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 20.6 min; **ESI-MS** *m/z* 512.1 (12) [M+Na⁺], 490.1 (100) [M+H⁺].

3-{N-[N'-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(2-nitrophenyl)-propionsäure (64h)

Die Umsetzung von **12hP** (0.50 g, 0.570 mmol/g, 0.285 mmol) nach AAV 8 (14 h), 9b (2 Äquiv. **40**, 16 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64h** (162 mg, 100 % Rohausbeute) als braunen Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-45 % in 30 min) ergab **64h** (51 mg, 31 %) als grünen Feststoff.

Smp. 116-120 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.24 (br. s, 1H, COOH), 9.44 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.64 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.96 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Phe}C³-H), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H),

7.68 (m, 2H, ^{Phe}C^{5,6}-H), 7.54 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.83 (s, H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.45 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.65-2.77 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.52-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.8 min; **ESI-MS** *m/z* 481.1 (6) [M+Na⁺], 459.1 (100) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3-nitrophenyl)-propionsäure (64i)

Die Umsetzung von **12iP** (1.5 g, 0.560 mmol/g, 0.840 mmol) in einem 20mL-Glasgefäß mit Absaugvorrichtung und Fritte nach AAV 8, 9b (2 Äquiv. **40**, 20 h), und 13 (AcOH/TFE/ CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64i** (456 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64i** (1. Fraktion: 67 mg, ca. 54 %) als gelben Feststoff (die restlichen 280 mg wurden nicht gereinigt).

Smp. 163-166 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.49 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ^{Phe}C²-H), 7.96 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.73-7.81 (m, 2H, ^{Pyr}C⁶-H/^{Phe}C⁶-H), 7.59 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ^{Phe}C⁵-H), 7.22 (m, 1H, CO-NH-CH), 6.88 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.33 (m, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.14 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.18 (m, 2H, NH-CH₂), 2.72-2.83 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.07-2.19 (m, 5H, CH₂-CH₂-CO + CH₃), 1.43-1.58 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.9 min; **ESI-MS** *m/z* 481.1 (10) [M+Na⁺], 459.2 (92) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-difluorphenyl)-propionsäure (64j)

Die Umsetzung von **12jP** (0.20 g, 0.515 mmol/g, 0.103 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **24**, 19.5 h), 9b (17 h), und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64j** (48 mg, 100 % Rohausbeute) als gelblichen Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64j** (7 mg, 14 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.89 (br. s, 1H, COOH), 9.50 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.33 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.96 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.00-7.08 (m, 3H, ^{Phe}C^{2,6}-H/CO-NH-CH), 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.71 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.03 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.25 (m, 2H, NH-CH₂), 2.77 (dd, *J* = 3.0/7.2 Hz, 2H, CH-CH₂-CO), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 15.4 min; **ESI-MS** *m/z* 488.2 (12) [M+K⁺], 472.2 (14) [M+Na⁺], 450.2 (100) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorophenyl)-propionsäure (64k)

Die Umsetzung von **12kP** (0.50 g, 0.459 mmol/g, 0.230 mmol) nach AAV 8 (14 h), 9b (16 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64k** (128 mg, 100 % Rohausbeute) als gelblichen Feststoff. Die Reinigung von 24 mg per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **64k** (5 mg, 20 %) als weißen Feststoff, die restlichen 104 mg wurden nicht gereinigt, da das Produkt bereits sehr sauber vorlag (HPLC-Reinheit: > 90 %).

Smp. 150-152 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.05 (br. s, 1H, COOH), 9.50 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.95 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.76 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.42 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.37 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.13 (br. s, 1H, CO-NH-CH), 6.31 (m, 2H, ^{Pyr}C^{3,5}-H), 4.99 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.17 (m, 2H, NH-CH₂), 2.67-2.75 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.59 und 1.53 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 19.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₁H₂₆Cl₂N₅O₄ 482.1363, gef. 482.1371 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(1-naphthyl)-propionsäure (64l)

Die Umsetzung von **12IP** (1.00 g, 0.610 mmol/g, 0.610 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **24**, 14 h), 9b (16.5 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64l**

(389 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **64l** (167 mg, 48 %) als weißen Feststoff.

Smp. 103-106 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.00 (br. s, 1H, COOH), 9.49 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.53 (br. s, 1H, NH-CH₂), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ^{Naph}C⁹-H), 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Naph}C⁶-H), 7.86 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Naph}C⁴-H), 7.76 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, ^{Naph}C⁸-H), 7.50-7.55 (m, 2H, ^{Naph}C^{2,7}-H), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Naph}C³-H), 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.81 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 5.87 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.86 und 2.75 (dd, *J* = 7.2/16.2 Hz, 2H, CH-CH₂-CO), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.58 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 17.6 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₅H₃₀N₅O₄ 464.2299, gef. 464.2284 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-propionsäure (**64n**)

Die Umsetzung von **12nP** (0.50 g, 0.620 mmol/g, 0.310 mmol) nach AAV 8 (14 h), **9b** (2 Äquiv. **40**), und **13** (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64n** (158 mg, 100 % Rohausbeute) als gelbes Öl. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **64n** (83 mg, 45 %) als weißen Feststoff.

Smp. 107-110 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.17 (br. s, 1H, COOH), 9.43 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.62 (s, 1H, Pyr-NH-CH₂), 7.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.78 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 6.84 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.70 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 6.33 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CO-NH-CH₂), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂-(CH₂)₃), 3.19 (m, 2H, CO-NH-CH₂), 2.34 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CO-NH-CH₂-CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 2H, (CH₂)₃-CH₂-CO), 1.52-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 7.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₅H₂₄N₅O₄ 338.1828, gef. 338.1823 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-isopropylpropionsäure (64o)

Die Umsetzung von **12oP** (0.50 g, 0.530 mmol/g, 0.265 mmol) nach AAV 8 (14 h), 9b (2 Äquiv. **40**, 20 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64o** (125 mg, 100 % Rohausbeute) als gelbes Öl. Die Reinigung per HPLC (10-45 % in 30 min) ergab **64o** (91 mg, 70 %) als farbloses Öl.

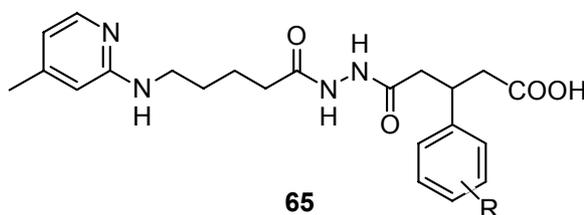
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.28 (br. s, 1H, COOH), 9.98 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.69 (br. s, 1H, Pyr-NH-CH₂), 7.97 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 6.86 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 6.20 (br. s, 1H, CO-NH-CH), 3.28 (m, 2H, NH-CH₂-(CH₂)₃), 3.20 (m, 2H, CO-NH-CH), 2.56 und 2.72 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.22 (m, 2H, (CH₂)₃-CH₂-CO), 1.85 und 1.74 (m, 1H,), 1.56-1.66 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO), 0.76-0.91 (m, 6H, CH-(CH₃)₂); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 11.7 min; ESI-MS *m/z* 402.2 (8) [M+Na⁺], 380.2 (100) [M+H⁺].

N-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-nipecotinsäure (64p)

Die Umsetzung von **12pP** (0.50 g, 0.550 mmol/g, 0.275 mmol) nach AAV 8 (14 h), 9b (2 Äquiv. **40**, 20 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **64p** (120 mg, 99 % Rohausbeute) als gelbes Öl. Die Reinigung per HPLC (10-40 % in 30 min) ergab **64p** (78 mg, 64 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.34 (br. s, 1H, COOH), 9.34 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.71 (br. s, 1H, NH-CH₂), 8.41 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 6.86 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 4.03 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, N-HCH-CH-COOH), 3.81 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, CO-N-HCH-CH₂), 3.28 (m, 2H), 3.19 (m, 2H, NH-CH₂), 2.80 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, N-HCH-CH-COOH), 2.74 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, CO-N-HCH-CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.27 (m, 1H, CH-COOH), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.94 (m, 1H, CO-N-CH₂-HCH-CH₂), 1.55-1.65 (m, 4H, (CH₂)₂-

CH₂-CO), 1.51 (m, 2H, CO-N-CH₂-HCH-CH₂ + HCH-CH-COOH), 1.34 (m, 1H, HCH-CH-COOH); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 9.5 min; **ESI-MS** *m/z* 416.3 (10) [M+K⁺], 400.3 (14) [M+Na⁺], 378.2 (83) [M+H⁺].



5-*N'*-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-phenyl-5-oxopentansäure (**65a**)

Die Umsetzung von 5-(*N'*-Fmoc)-hydrazino-5-oxo-3-phenylpentansäure **26a** (44 mg, 0.100 mmol) mit TCP-Harz (50 mg, theor. Bel. 0.048 mmol) nach AAV 7b (20 h) in CH₂Cl₂ unter Zugabe von DIPEA (21 μL, 0.125 mmol, 2.5 Äquiv.) ergab das belegte Harz **26aP**. Die weitere Umsetzung nach AAV 9b (1.5 Äquiv. **40**, 2 Äquiv. HATU, 44 h), und 13 (AcOH/ TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65a** (22 mg, 97 % Rohausbeute bezogen auf die max. theor. Harzbelegung) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (30-80 % in 40 min) zur Abtrennung von 3-Phenylglutarsäure (**20a**) und des Nebenprodukts **68a** ergab **65a** (4 mg, 18 % bezogen auf die max. theor. Harzbelegung) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.91 (br. s, 1H, COOH), 11.98 (br. s, 1H, [^{Pyr}N-H]⁺), 9.71 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.37 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.20-7.28 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.17 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.79 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.46 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.77 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.39-2.48 (m, 3H, CH₂-CH-HCH), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.57 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 22.1 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₂₉N₄O₄ 413.2190, gef. 413.2187 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(4-fluorphenyl)-5-oxopentansäure (65b)

Die Umsetzung von **26bP** (0.70 g, 0.359 mmol/g, 0.251 mmol), nach AAV 9b (2 Äquiv. **40**, 14 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65b** (82 mg, 68 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (10-50 % in 30 min) ergab **65b** (23 mg, 21 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.07 (br. s, 1H, COOH), 12.07 (br. s, 1H, [PyrN-H]⁺), 9.71 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.59 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.80 (m, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.25 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.01 (t, J = 8.5 Hz, 1H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 6.84 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.70 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.46 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 2.91 (m, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.70 (dd, J = 5.5/16.0 Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.37-2.52 (m, 2H, CH₂-CH-HCH), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.57 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 14.2 min; FAB-HRMS ber. für C₂₂H₂₈FN₄O₄ 431.2095, gef. 431.2110 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(4-chlorphenyl)-5-oxopentansäure (65c)

Die Umsetzung von **26cP** (1.00 g, 0.490 mmol/g, 0.490 mmol), nach AAV 9b (2 Äquiv. **40**, 3.5 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65c** (286 mg, 100 % Rohaus-beute) als gelbes Öl. Die Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **65c** (105 mg, 39 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.11 (br. s, 1H, COOH), 9.72 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.60 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.80 (s, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.40 (m, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.34-7.19 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.84 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.71 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.45 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.28 (m, 2H, NH-CH₂), 3.00-3.18 (m, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.88-2.98 (m, 1H, HCH-CH-HCH), 2.70 (m, 1H, HCH-CH-HCH), 2.39-2.53 (m, 1H, HCH-CH-HCH), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m,

2H, CH₂-CH₂-CO), 1.70-1.52 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 16.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₂₈ClN₄O₄ 447.1800, gef. 447.1807 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(4-bromphenyl)-5-oxo-pentansäure (65d)

Die Umsetzung von **26dP** (0.70 g, 0.420 mmol/g, 0.294 mmol), nach AAV 9b (2 Äquiv. **40**, 14 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65d** (139 mg, 86 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-40 % in 30 min) ergab **65d** (89 mg, 50 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.20 (br. s, 1H, COOH), 12.08 (br. s, 1H, [PyrN-H]⁺), 9.72 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.50 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.80 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.81 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.68 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.44 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.91 (m, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.70 (dd, J = 5.5/16.0 Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.37-2.54 (m, 2H, CH₂-CH-HCH), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.57 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 17.0 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₂₈BrN₄O₄ 491.1295, gef. 491.1296 [M^{79Br}+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(4-methoxyphenyl)-5-oxopentansäure (65e)

Die Umsetzung von **26eP** (0.20 g, 0.457 mmol/g, 0.091 mmol), nach AAV 9b (2.6 Äquiv. **40**, 18.5 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65e** (40 mg, 93 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **65e** (18 mg, 38 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 13.14 (br. s, 1H, COOH), 9.69 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.61 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.80 (d, J = 6.5 Hz, 1H,

^{Pyr}C⁶-H), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.84 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 6.69 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.70 (s, 3H, O-CH₃), 3.41 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.24 (m, 2H, NH-CH₂), 2.67 (dd, $J = 5.5/16.0$ Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.35-2.47 (m, 3H, CH₂-CH-HCH), 2.32 (s, 3H, ^{Pyr}C⁴-CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.66 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 13.7 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₃H₃₁N₄O₅ 443.2294, gef. 443.2279 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(4-biphenyl)-5-oxopentansäure (65g)

Die Umsetzung von **26gP** (0.75 g, 0.557 mmol/g, 0.417 mmol), nach AAV 9b (2 Äquiv. **40**, 14 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65g** (181 mg, 79 %, Reinheit >95 %) als gelblichen Feststoff.

Smp. 176-177 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.00 (br. s, 1H, COOH), 9.73 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 7.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.63 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.44 (m, 2H, Phe-^{Phe}C^{3',5'}-H), 7.30-7.36 (m, 3H, Phe-^{Phe}C^{2',4',6'}-H), 6.35 (m, 1H, NH-CH₂), 6.28 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 6.25 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 3.52 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.17 (m, 2H, NH-CH₂), 2.75 (dd, $J = 5.5/16.5$ Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.55 (dd, $J = 9.8/16.5$ Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.44-2.51 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.09 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.46-1.58 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 20.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₈H₃₃N₄O₄ 489.2503, gef. 489.2522 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-5-oxo-3-(3-nitrophenyl)-pentansäure (65i)

Die Umsetzung von **26iP** (0.20 g, 0.450 mmol/g, 0.090 mmol), nach AAV 9b (2.6 Äquiv. **40**, 18.5 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65i** (78 mg,

100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **65i** (18 mg, 36 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.04 (br. s, 1H, COOH), 9.74 (s, 1H, NH-NH), 9.64 (s, 1H, NH-NH), 8.58 (br. s, 1H, NH-CH₂), 8.09 (s, 1H, ^{Phe}C²-H), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.79 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ^{Phe}C⁶-H), 7.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Phe}C⁵-H), 6.83 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.60 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.78 (dd, *J* = 5.6/16.4 Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.64 (dd, *J* = 9.6/16.4 Hz, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.35-2.47 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.54-1.66 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.7 min; **ESI-MS** *m/z* 953.1 (8) [2M+K⁺], 458.2 (100) [M+H⁺], 440.2 (22) [M-H₂O+H⁺].

5-{*N'*-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-3-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopentansäure (65k)

Die Umsetzung von **26kP** (0.50 g, 0.460 mmol/g, 0.230 mmol), nach AAV 9b (2 Äquiv. **40**, 3.5 h), und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65k** (179 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **65k** (130 mg, 95 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.06 (br. s, 1H, COOH), 9.73 (s, 1H, NH-NH), 9.67 (s, 1H, NH-NH), 8.59 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.80 (m, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.39 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.30 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.84 (m, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.45 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 3.06-3.20 (m, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.95 (m, 1H, CH₂-CH-HCH), 2.71 (dd, *J* = 5.5/16.5 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.58 (dd, *J* = 9.8/16.5 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.28 (m, 1H, CH₂-HCH-CO), 2.12 (m, 1H, CH₂-HCH-CO), 1.54-1.66 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 18.7 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₂H₂₇Cl₂N₄O₄ 481.1410, gef. 481.1402 [M+H⁺].

5-{N'-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-5-oxopentansäure (65n)

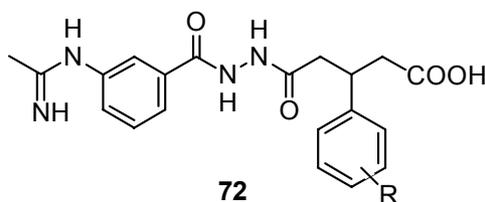
Die Umsetzung von 5-(N'-Fmoc)-hydrazino-5-oxopentansäure **26n** (130 mg, 0.353 mmol) mit TCP-Harz (400 mg, theor. Bel. 0.384 mmol) nach AAV 7b (19 h) in trockenem CH₂Cl₂ unter Zugabe von DIPEA (72 µL, 0.420 mmol, 1.75 Äquiv.) ergab das belegte Harz **26nP**. Die weitere Umsetzung mit 5-(4-Methylpyridin-2-yl)-aminovaleriansäure (**40**) (125 mg, 0.60 mmol, 1.5 Äquiv. bei 60 % Reinheit), HATU und *sym*-Collidin (318 µL, 2.4 mmol, 10 Äquiv.) nach AAV 9b (4.5 h) und Abspaltung vom Harz nach AAV 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **65n** (107 mg, 71 % Rohausbeute bezogen auf die max. theor. Harzbelegung) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (5-45 % in 30 min) ergab **65n** (28 mg, 17 % bezogen auf die max. theor. Harzbelegung) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.93 (br. s, 1H, COOH), 9.66 (s, 1H, NH-NH), 9.65 (s, 1H, NH-NH), 8.53 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 6.83 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.23 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, NH-CO-CH₂), 2.15 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO-NH), 2.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-COOH), 1.71 (dt, 2H, CH₂-CH₂-COOH), 1.56-1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-50 % in 30 min) R_t = 10.8 min; **ESI-MS** *m/z* 359.2 (54) [M+Na⁺], 337.1 (100) [M+H⁺].

3-{N-[N'-(3-(N-Pyridin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-3-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopentansäure (66k)

Die Umsetzung von **26kP** (0.70 g, 0.459 mmol/g, 0.321 mmol) nach AAV 8, 9 (2.3 Äquiv. 3-(N-Pyridin-2-yl)-aminobenzoesäure (**43**), 1.2 Äquiv. HATU, 2 h) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **66k** (205 mg, 100 % Rohausbeute) als braunen Feststoff. Die Reinigung von 65 mg per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **66k** (16 mg, 26 %) als weißen Feststoff.

Smp. 110-114 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.03 (br. s, 1H, COOH), 10.22 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.89 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.65 (s, 1H, NH-ArC), 8.12 (d, 1H, J = 6.5 Hz, $^{\text{Pyr}}\text{C}^6\text{-H}$), 7.99 (s, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^2\text{-H}$), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^6\text{-H}$), 7.72 (t, J = 7.5 Hz, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^5\text{-H}$), 7.46 (d, J = 7.5 Hz, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^4\text{-H}$), 7.41 (m, 1H, $^{\text{Pyr}}\text{C}^4\text{-H}$), 7.39 (s, 1H, $^{\text{Phe}}\text{C}^4\text{-H}$), 7.35 (s, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 1H, $^{\text{Pyr}}\text{C}^3\text{-H}$), 6.85 (t, J = 6.0 Hz, 1H, $^{\text{Pyr}}\text{C}^5\text{-H}$), 3.51 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.78 (dd, J = 5.7/16.2 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.63 (dd, J = 9.8/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.57 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 18.6 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₃H₂₁Cl₂N₄O₄ 487.0941, gef. 487.0945 [M+H⁺].



5-[N'-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-phenyl-5-oxopentansäure (72a)

Die Umsetzung von **26aP** (0.50 g, 0.560 mmol/g, 0.280 mmol) nach AAV 9a (14 h mit 2.5 Äquiv. **35** + 6 h mit 1.5 Äquiv. **35**), 11 und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72a** (57 mg, 53 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (10-50 % in 30 min) ergab **72a** (9 mg, 8 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.10 (br. s, 1H, COOH), 10.26 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.92 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.82 (s, 3H, $^{\text{Ami}}\text{N}_2\text{H}_3$), 7.43 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 7.36 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^5\text{-H}$), 7.28-7.34 (m, 4H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,3,5,6}\text{-H}$), 7.22 (m, 1H, $^{\text{Phe}}\text{C}^4\text{-H}$), 7.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{\text{Ar}}\text{C}^4\text{-H}$), 3.55 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.82 (dd, J = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.47-2.62 (m, 6H, $^{\text{Ami}}\text{CH}_3/\text{CH-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 10.9 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₀H₂₃N₄O₄ 383.1719, gef. 383.1735 [M+H⁺].

5-[N'-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-fluorphenyl)-5-oxopentansäure (72b)

Die Umsetzung von **26bP** (0.20 g, 0.359 mmol/g, 0.072 mmol) nach AAV 9a (19 h), 11 (3 Äquiv. **35**, 22 h) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72b** (31 mg, 94 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **72b** (8 mg, 22 %) als weißen Feststoff.

Smp. 81-85 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.37 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.98 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.52 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.77 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.63 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.30 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.10 (m, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 3.55 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.49-2.59 (m, 3H, CH-CH-CH₂), 2.33 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 12.0 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₀H₂₂FN₄O₄ 401.1626, gef. 401.1621 [M+H⁺].

5-[N'-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-chlorphenyl)-5-oxopentansäure (72c)

Die Umsetzung von **26cP** (0.20 g, 0.490 mmol/g, 0.098 mmol) nach AAV 9a (19 h), 11 (3 Äquiv. **35**, 22 h) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72c** (25 mg, 54 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **72c** (9 mg, 17 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.37 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.98 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.51 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.76 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.23-7.38 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 3.56 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.50-2.60 (m, 3H, CH-CH-CH₂), 2.33 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t

= 14.7 min; **FAB-HRMS** ber. für $C_{20}H_{22}ClN_4O_4$ 417.1330, gef. 417.1342 $[M+H^+]$.

5-[*N'*-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-bromphenyl)-5-oxopentansäure (72d)

Die Umsetzung von **26dP** (0.20 g, 0.420 mmol/g, 0.084 mmol) nach AAV 9a (19 h), 11 (3 Äquiv. **35**, 22 h) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72d** (24 mg, 55 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **72d** (5 mg, 11 %) als weißen Feststoff.

Smp. 98-102 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.08 (br. s, 1H, COOH), 10.34 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.98 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.51 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.76 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.64 (t, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.47 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.23 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 3.55 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76 (dd, J = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.50-2.61 (m, 3H, CH-CH-CH₂), 2.33 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 15.4 min; **FAB-HRMS** ber. für $C_{20}H_{22}BrN_4O_4$ 461.0825, gef. 461.0823 $[M^{79Br}+H^+]$.

5-[*N'*-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-methoxyphenyl)-5-oxopentansäure (72e)

Die Umsetzung von **26eP** (0.20 g, 0.457 mmol/g, 0.091 mmol) nach AAV 9a (14 h), 11 und 13 (20 % HFIP/CH₂Cl₂) ergab **72e** (4 mg, 9 %) nach Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.03 (s, 1H, COOH), 10.37 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.99 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.53 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.77 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.65 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 3.72 (s, 3H, O-CH₃), 3.55 (m, 1H, CH₂-CH-

CH₂), 2.77 (dd, $J = 5.5/16.0$ Hz, 1H, *HCH-CH-CH*₂), 2.50-2.60 (m, 3H, *CH-CH-CH*₂), 2.33 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 10.5$ min; **ESI-MS** m/z 413.3 (95) [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-biphenyl)-5-oxopentansäure (72g)

Die Umsetzung von **26gP** (0.20 g, 0.557 mmol/g, 0.111 mmol) nach AAV 9a (19 h), 11 (3 Äquiv. **35**, 22 h) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72g** (21 mg, 37 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **72g** (4 mg, 7 %) als farbloses Öl.

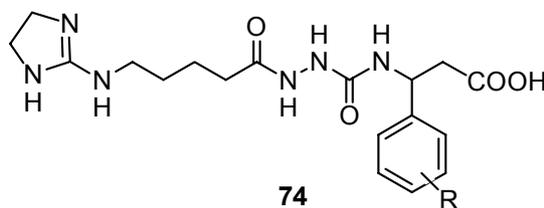
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 11.23$ (br. s, 1H, COOH), 10.39 (s, 1H, *NH-NH-CO-CH*₂), 10.00 (s, 1H, *NH-NH-CO-CH*₂), 9.51 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.77 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.61-7.68 (m, 3H, ^{Ar}C⁵-H/^{Phe}C^{3,5}-H), 7.58 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.45 (m, 2H, *Phe*-^{Phe}C^{3',5'}-H), 7.31-7.39 (m, 3H, *Phe*-^{Phe}C^{2',4',6'}-H), 3.56 (m, 1H, *CH*₂-*CH-CH*₂), 2.79 (m, 1H, *HCH-CH-CH*₂), 2.51-2.63 (m, 3H, *CH-CH-CH*₂), 2.32 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 19.7$ min; **ESI-MS**: m/z 916.9 (40) [2M+H⁺], 459.1 (100) [M+H⁺], 441.2 (20) [M-H₂O+H⁺].

5-[*N'*-(3-Acetimidoylaminobenzoyl)-hydrazino]-3-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopentansäure (72k)

Die Umsetzung von **26kP** (1.00 g, 0.460 mmol/g, 0.460 mmol) nach AAV 9a (2 Äquiv. **29**), 11 (1.5 Äquiv. **35**) und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **72k** (106 mg, 49 %) als weißen Feststoff.

Smp. 110-114 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 12.15$ (br. s, 1H, COOH), 10.38 (s, 1H, *NH-NH-CO-CH*₂), 10.00 (s, 1H, *NH-NH-CO-CH*₂), 9.55 (s, 1H, ^{Ami}NH), 8.63 (s, 1H, ^{Ami}NH), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.76 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.63 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), ^{Ar}C⁴-H, 7.42 (s, 1H,

^{Phe}C⁴-H), 7.35 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 3.50 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.77 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.53-2.69 (m, 3H, CH-CH-CH₂), 2.33 (s, 3H, ^{Ami}CH₃); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 16.6 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₀H₂₁Cl₂N₄O₄ 451.0941, gef. 451.0930 [M+H⁺].



3-{*N*-[*N'*-(5-(4,5-Dihydroimidazol-2-yl)-aminopentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (74a)

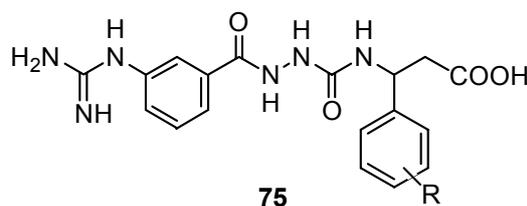
Die Umsetzung von **12a** (0.20 g, 0.576 mmol/g, 0.115 mmol) nach AAV 8, 9 (2 Äquiv. 5-(*N*-Fmoc)-aminopentansäure (**28**), 2 h), 11 und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **74a** (23 mg, 46 % Rohausbeute) als braunen Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-40 % in 30 min) ergab **74a** (4 mg, 8 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.83 (br. s, 1H, COOH), 9.45 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.16 (s, 1H, CH₂-NH-C), 7.83 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.30 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.21 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.84 (m, 1H, CO-NH-CH), 6.50 (s, 1H, C-NH-CH₂), 5.02 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.56 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-NH), 3.09 (dt, 2H, NH-CH₂), 2.68 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.40-1.56 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 10.8 min; **ESI-MS** *m/z* 391.3 (100) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-(4,5-Dihydroimidazol-2-yl)-aminopentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäure (74c)

Die Umsetzung von **12cP** (0.20 g, 0.490 mmol/g, 0.098 mmol) nach AAV 8, 9 (2 Äquiv. 5-(*N*-Fmoc)-aminopentansäure (**28**), 2 h), 11 und 13 (AcOH/TFE/CH₂Cl₂) ergab die Verbindung **74c** (34 mg, 72 % Rohausbeute) als braunes Öl. Die Reinigung per HPLC (15-45 % in 30 min) ergab **74c** (3 mg, 7 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.25 (br. s, 1H, COOH), 9.45 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.16 (s, 1H, CH₂-NH-C), 7.87 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CO-NH-CH), 6.50 (br. s, 1H, C-NH-CH₂), 5.01 (dt, 1H, NH-CH-CH₂), 3.56 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-NH), 3.09 (dt, 2H, NH-CH₂), 2.64-2.75 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.09 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.40-1.54 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 14.6 min; **ESI-MS** m/z 427.2 (34) [M^{37Cl}+H⁺], 425.2 (80) [M^{35Cl}+H⁺].



3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropion-säure (**75a**)

Die Umsetzung von **12aP** (0.50 g, 0.620 mmol/g, 0.310 mmol) nach AAV 8, 9a (2 Äquiv. **29**; 3 Äquiv. HATU; 2 h), 10 (9 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75a** (52 mg, 34 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (5-40 % in 40 min) ergab **75a** (6 mg, 4 %) nach Abtrennung des Nebenprodukts **67a** als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.21 (s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.89 (s, 1H, NH-ArC), 8.09 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.48-7.57 (m, 5H, ^{Gua}N₂H₄/^{Ar}C⁵-H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.28-7.35 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.22 (t, J = 7.0 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.08 (m, 1H, NH-CH), 2.67-2.77 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (0-50 % in 30 min) R_t = 19.1 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₈H₂₁N₆O₄ 385.1625, gef. 385.1634 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-fluorphenyl)-propionsäure (75b)

Die Umsetzung von **12bP** (0.20 g, 0.507 mmol/g, 0.101 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **29**), 9a, 10 und 12 ergab die Verbindung **75b** (45 mg, 86 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **75b** (7 mg, 14 %) als weißen Feststoff.

Smp. 116-120 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.26 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.95 (s, 1H, NH-ArC), 8.12 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.70 (s, 1H, ArC²-H), 7.56 (s, 4H, GuaN₂H₄), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.33-7.42 (m, 3H, ArC⁴-H/PheC^{2,6}-H), 7.13 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, PheC^{3,5}-H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH-CH), 5.06 (m, 1H, NH-CH), 2.65-2.77 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (0-50 % in 30 min) R_t = 20.4 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₈H₂₀FN₆O₄ 403.1530, gef. 403.1537 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (75c)

Die Umsetzung von **12cP** (0.50 g, 0.480 mmol/g, 0.240 mmol) nach AAV 8, 9a (2 Äquiv. **29**; 3 Äquiv. HATU; 4.5 h), 10 (9 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75c** (48 mg, 38 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **75c** (7 mg, 6 %) nach Abtrennung des Nebenprodukts **67c** als weißen Feststoff.

Smp. 124-126 °C; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.29 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.87 (s, 1H, NH-ArC), 8.14 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.70 (s, 1H, ArC²-H), 7.48-7.57 (m, 5H, GuaN₂H₄/ArC⁵-H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.33-7.38 (m, 4H, PheC^{2,3,5,6}-H), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH-CH), 5.06 (m, 1H, NH-CH), 2.66-2.78 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (0-50 % in 30 min) R_t = 22.8 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₈H₂₀ClN₆O₄ 419.1235, gef. 419.1230 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-bromphenyl)-propionsäure (75d)

Die Umsetzung von **12dP** (0.20 g, 0.450 mmol/g, 0.090 mmol) nach AAV 8, 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75d** (35 mg, 67 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **75d** (5 mg, 10 %) als weißen Feststoff.

Smp. 147-152 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.18 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.83 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.13 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-*H*), 7.49 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH-CH), 5.03 (m, 1H, NH-CH), 2.71 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) *R*_t = 14.9 min; **ESI-MS** *m/z* 465.0 (94) [⁸¹Br+H⁺], 463.1 (100) [⁷⁹Br+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-methoxyphenyl)-propionsäure (75e)

Die Umsetzung von **12eP** (0.20 g, 0.566 mmol/g, 0.113 mmol), nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **29**), 9a, 10 und 12 ergab die Verbindung **75e** (52 mg, 87 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **75e** (5 mg, 9 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.89 (br. s, 1H, COOH), 10.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.78 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.06 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.71 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.55 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.48 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-*H*), 5.04 (m, 1H, NH-CH), 3.74 (s, 3H, O-CH₃), 2.65-2.77 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) *R*_t = 11.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₉H₂₃N₆O₅ 415.1730, gef. 415.1690 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-trifluoromethoxyphenyl)-propionsäure (75f)

Die Umsetzung von **12fP** (0.20 g, 0.499 mmol/g, 0.100 mmol) nach AAV 8, 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75f** (40 mg, 69 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-40 % in 30 min) ergab **75f** (8 mg, 14 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.29 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.80 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.15 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.46 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 7.48 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-*H*), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH-CH), 5.10 (m, 1H, NH-CH), 2.75 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 17.6 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₉H₂₀F₃N₆O₅ 469.1447, gef. 469.1435 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-difluorphenyl)-propionsäure (75j)

Die Umsetzung von **12jP** (0.20 g, 0.515 mmol/g, 0.103 mmol) nach AAV 8 (4.5 Äquiv. **29**, 19.5 h), 9a (17 h), 10 und 12 ergab die Verbindung **75j** (34 mg, 63 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **75j** (3 mg, 7 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.36 (br. s, 1H, COOH), 10.24 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.92 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.71 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.47-7.59 (m, 5H, ^{Gua}N₂H₄/^{Ar}C⁵-*H*), 7.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.06 (m, 3H, ^{Phe}C^{2,4,6}-*H*/NH-CH), 5.02 (m, 1H, NH-CH), 2.69 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 13.4 min; **ESI-MS** *m/z* 841.2 (22) [2M+H⁺], 421.1 (100) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorophenyl)-propionsäure (75k)

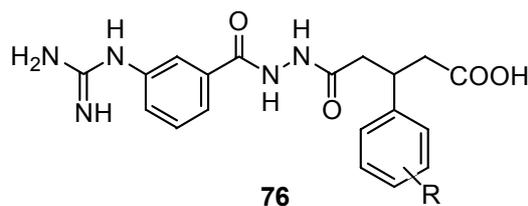
Die Umsetzung von **12kP** (0.20 g, 0.459 mmol/g, 0.092 mmol) nach AAV 8, 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75k** (27 mg, 52 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-45 % in 30 min) ergab **75k** (4 mg, 9 %) als weißen Feststoff.

Smp. 143-147 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.71 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.24 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.71 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.56 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-*H*), 7.54 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.43 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.41 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.40 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 7.11 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, NH-CH), 5.04 (m, 1H, NH-CH), 2.76 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 17.0 min; **ESI-MS** *m/z* 453.1 (100) [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(1-naphthyl)-propionsäure (75l)

Die Umsetzung von **12lP** (0.20 g, 0.610 mmol/g, 0.122 mmol) nach AAV 8, 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **75l** (52 mg, 78 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-50 % in 30 min) ergab **75l** (4 mg, 7 %) als weißen Feststoff.

Smp. 151-154 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.28 (br. s, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.94 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.14 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.09 (m, 1H, ^{Naph}C⁹-*H*), 7.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Naph}C⁶-*H*), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Naph}C⁴-*H*), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.50-7.60 (m, 8H, ^{Gua}N₂H₄/^{Ar}C⁵-*H*/^{Naph}C^{2,7,8}-*H*), 7.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Naph}C³-*H*), 7.39 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.91 (m, 1H, NH-CH), 2.74-2.91 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 15.9 min; **ESI-MS** *m/z* 457.0 (56) [M+Na⁺], 435.2 (100) [M+H⁺].



5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-phenyl-5-oxopentansäure (**76a**)

Die Umsetzung von 3-Phenylglutarsäure (**20a**) (31 mg, 0.150 mmol) mit TCP-Harz (200 mg, theor. Bel. 0.192 mmol) nach AAV 7 in DMF unter Zugabe von DIPEA (31 μ L, 0.180 mmol, 1.2 Äquiv.) ergab das belegte Harz **20aP**. Die harzgebundene Glutarsäure wurde mit DMF (5×2 mL, je 2 min) gewaschen. Anschließend wurde das Harz mit einer ca. 0.1M Lösung Fmoc-Hydrazin (**22**) (76 mg, 0.300 mmol, 2 Äquiv.), TBTU (96 mg, 0.300 mmol, 2 Äquiv.), HOBt (46 mg, 0.300 mmol, 2 Äquiv.) und DIPEA (92 μ L, 0.540 mmol, 3.6 Äquiv.) in NMP versetzt. Nach einer Kupplungszeit von 12 h wurde die Reaktion durch Waschen mit NMP (5×2 mL, je 2 min) beendet. Die weitere Umsetzung nach AAV 10 (1.50 mmol *N,N'*-Bis-Boc-guanylpyrazol, 10 Äquiv.) und 12 ergab die Verbindung **76a** (62 mg, 83 % Rohausbeute) als gelblichen Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-50 % in 30 min) ergab **76a** (6 mg, 8 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.98 (br. s, 1H, COOH), 10.33 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.95 (s, 1H, NH-^{Ar}C^{quart}), 9.78 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.69 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.54 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.49 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.41 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.24-7.30 (m, 5H, ^{Phe}C²⁻⁶-*H*), 3.50 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.77 (dd, 1H, *J* = 5.5/16.0 Hz, HCH-CH-CH₂), 2.49-2.58 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) *R*_t = 13.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₉H₂₂N₅O₄ 384.1672, gef. 384.1668 [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-fluorphenyl)-5-oxopentansäure (76b)

Die Umsetzung von **26bP** (0.20 g, 0.359 mmol/g, 0.072 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab **76b** (17 mg, 46 %) nach Reinigung per HPLC (10-45 % in 30 min) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.32 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.97 (s, 1H, NH-ArC^{quart}), 9.95 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.70 (s, 1H, ArC²-H), 7.59 (s, 4H, GuaN₂H₄), 7.55 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.32 (m, 2H, PheC^{2,6}-H), 7.11 (m, 2H, PheC^{3,5}-H), 3.50 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.77 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.48-2.58 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 11.2 min; ESI-MS *m/z* 402.2 (100) [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-chlorphenyl)-5-oxopentansäure (76c)

Die Umsetzung von **26cP** (0.20 g, 0.490 mmol/g, 0.098 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab **76c** (9 mg, 19 %) nach Reinigung per HPLC (10-50 % in 30 min) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.31 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.96 (s, 1H, NH-ArC^{quart}), 9.93 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.69 (s, 1H, ArC²-H), 7.57 (s, 4H, GuaN₂H₄), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.30-7.37 (m, 4H, PheC^{2,3,5,6}-H), 3.48 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.75 (dd, *J* = 5.7/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.45-2.56 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 13.9 min; FAB-HRMS ber. für C₁₉H₂₁ClN₅O₄ 418.1282, gef. 418.1294 [M+H⁺].

5-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-bromphenyl)-5-oxopentansäure (76d)

Die Umsetzung von **26dP** (0.20 g, 0.420 mmol/g, 0.084 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab **76d** (15 mg, 31 %) nach Reinigung per HPLC (15-45 % in 30 min) als weißen Feststoff.

Smp. 114-118 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.31 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.97 (s, 1H, NH-ArC^{quart}), 9.95 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.74 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.69 (s, 1H, ArC²-H), 7.59 (s, 4H, GuaN₂H₄), 7.53 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.46 (d, J = 8.2 Hz, 2H, PheC^{3,5}-H), 7.40 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.23 (d, J = 8.2 Hz, 2H, PheC^{2,6}-H), 3.49 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76 (dd, J = 5.7/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.47-2.58 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 15.0 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₉H₂₁BrN₅O₄ 462.0777, gef. 462.0757 [M^{79Br}+H⁺].

5-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-methoxyphenyl)-5-oxopentansäure (76e)

Die Umsetzung von **26eP** (0.20 g, 0.457 mmol/g, 0.091 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab **76e** (9 mg, 19 %) nach Reinigung per HPLC (15-40 % in 30 min) als weißen Feststoff.

Smp. 107-111 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.99 (br. s, 1H, COOH), 10.33 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.95 (s, 1H, NH-ArC^{quart}), 9.94 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.71 (s, 1H, ArC²-H), 7.59 (s, 4H, GuaN₂H₄), 7.55 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.41 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.18 (d, J = 8.2 Hz, 2H, PheC^{2,6}-H), 6.85 (d, J = 8.2 Hz, 2H, PheC^{3,5}-H), 3.72 (s, 3H, O-CH₃), 3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.74 (dd, J = 5.5/15.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.44-2.55 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 10.6 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₀H₂₄N₅O₅ 414.1778, gef. 414.1774 [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-biphenyl)-5-oxopentansäure (76g)

Die Umsetzung von **26gP** (0.20 g, 0.557 mmol/g, 0.111 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab **76g** (17 mg, 27 %) nach Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) als weißen Feststoff.

Smp. 102-104 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.35 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.99 (s, 1H, NH-^{Ar}C^{quart}), 9.93 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-*H*), 7.55-7.60 (m, 6H, ^{Gua}N₂H₄/^{Phe}C^{2,6}-*H*), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Phe-^{Phe}C^{3',5'}-*H*), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Phe-^{Phe}C^{2',6'}-*H*), 7.34 (m, 2H, Phe-^{Phe}C^{4'}-*H*), 3.57 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.80 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.55-2.63 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 19.3 min; **FAB-HRMS** ber. für C₂₅H₂₆N₅O₄ 460.1986, gef. 460.1968 [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3-nitrophenyl)-pentansäure (76i)

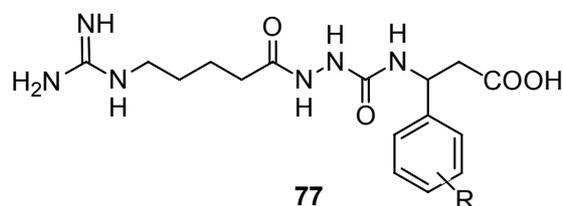
Die Umsetzung von **26iP** (0.20 g, 0.450 mmol/g, 0.090 mmol) nach AAV 9a, 10 (10 Äquiv. **32**) und 12 ergab die Verbindung **76i** (52 mg, 100 % Rohausbeute) als gelbes Öl. Die Reinigung per HPLC (20-35 % in 30 min) ergab **76i** (15 mg, 32 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.33 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.98 (s, 1H, NH-^{Ar}C^{quart}), 9.92 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 8.12 (s, 1H, ^{Phe}C²-*H*), 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-*H*), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.68-7.74 (m, 2H, ^{Ar}C²-*H*/^{Phe}C⁶-*H*), 7.52-7.62 (m, 5H, ^{Gua}N₂H₄/^{Phe}C⁵-*H*), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 3.52 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.78 (dd, *J* = 5.6/15.8 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.45-2.57 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 11.3 min; **ESI-MS** 856.9 (24) [2M+H⁺], 429.1 (100) [M+H⁺].

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopentansäure (76k).

Die Umsetzung von **26kP** (0.20 g, 0.475 mmol/g, 0.095 mmol) nach AAV 9a, 10 (8 Äquiv. **32**, 17 h) und 12 ergab die Verbindung **76k** (74 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (25-45 % in 30 min) ergab **76k** (9 mg, 17 %) als weißen Feststoff.

Smp. 104-107 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.15 (br. s, 1H, COOH), 10.32 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.95 (s, 1H, NH-^{Ar}C^{quart}), 9.91 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 7.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-*H*), 7.69 (s, 1H, ^{Ar}C²-*H*), 7.56 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-*H*), 7.41 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-*H*), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-*H*), 7.35 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 3.50 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.77 (dd, *J* = 5.9/16.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.56-2.66 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) *R*_t = 17.7 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₉H₂₀Cl₂N₅O₄ 452.0892, gef. 452.0890 [M+H⁺].



3-{*N*-[*N'*-(5-Guanidinopentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (77a)

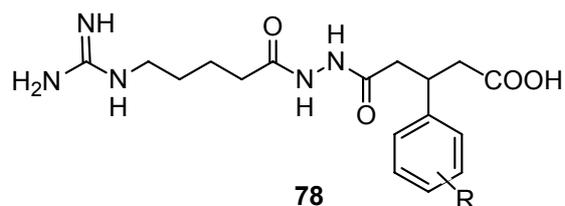
Die Umsetzung von **12aP** (0.50 g, 0.576 mmol/g, 0.288 mmol) nach AAV 8, 9 (2 Äquiv. 5-(*N*-Fmoc)-aminovaleriansäure (**28**) als Spacer, 3 Äquiv. HATU), 10 (5 Äquiv. **32**, 44 h), und 12 ergab die Verbindung **77a** (75 mg, 55 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (5-40 % in 40 min) ergab **77a** (22 mg, 16 %) nach Abtrennung des Nebenprodukts **65a** als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.21 (br. s, 1H, COOH), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.85 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.53 (m, 1H, ^{Gua}NH-CH₂), 7.27-7.32 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.21 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.86 (d, J = 8.7 Hz, 1H, CO-NH-CH), 5.03 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.90 (br. s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 3.08 (m, 2H, NH-CH₂), 2.69 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.10 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.40-1.56 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (0-40 % in 30 min) R_t = 20.1 min; **FAB-HRMS** ber. für C₁₆H₂₅N₆O₄ 365.1859, gef. 365.1939 [M+H⁺].

3-{*N*-[*N'*-(5-Guanidinopentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (77c)

Die Umsetzung von **12cP** (0.50 g, 0.480 mmol/g, 0.240 mmol) nach AAV 8, 9 (5-(*N*-Fmoc)-aminovaleriansäure (**28**) (2 Äquiv.) als Spacer, 3 Äquiv. HATU, 4 h), 10 (5 Äquiv. **32**), und 12 ergab die Verbindung **77c** (83 mg, 67 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (15-40 % in 40 min) ergab **77c** (21 mg, 17 %) nach Abtrennung des Nebenprodukts **65c** als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.28 (br. s, 1H, COOH), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.89 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.59 (m, 1H, ^{Gua}NH-CH₂), 7.29-7.37 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CO-NH-CH), 5.01 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 4.0 (br. s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 3.08 (m, 2H, NH-CH₂), 2.63-2.76 (m, 2H, CH-CH₂-CO), 2.10 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.38-1.56 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (0-50 % in 30 min) R_t = 21.9 min; **ESI-MS** m/z 796.8 (12) [2M^{35Cl}+H⁺], 401.1 (32) [M^{37Cl}+H⁺], 399.1 (100) [M^{35Cl}+H⁺].



5-[N'-(5-Guanidinopentanoyl)-hydrazino]-3-phenyl-5-oxopentansäure (**78a**)

Die Umsetzung von **26aP** (0.45 g, 0.560 mmol/g, 0.252 mmol) nach AAV 9 (5-(*N*-Fmoc)-aminovaleriansäure (**28**) als Spacer), 10 (6 Äquiv. **32**), und 12 ergab die Verbindung **78a** (95 mg, 79 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (10-50 % in 40 min) ergab **78a** (11 mg, 9 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.99 (br. s, 1H, COOH), 9.71 (s, 1H, *NH-NH*), 9.65 (s, 1H, *NH-NH*), 7.46 (m, 1H, ^{Gua}*NH-CH*₂), 7.20-7.29 (m, 4H, ^{Phe}*C*^{2,3,5,6}-*H*), 7.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, ^{Phe}*C*⁴-*H*), 4.0 (br. s, 4H, ^{Gua}*N*₂*H*₄), 3.46 (m, 1H, *CH*₂-*CH-CH*₂), 3.08 (m, 2H, *NH-CH*₂), 2.70 (dd, *J* = 6.0/16.0 Hz, 1H, *CH*₂-*CH-HCH*), 2.50 (m, 1H, *CH*₂-*CH-HCH*), 2.39-2.46 (m, 2H, *CH*₂-*CH-CH*₂), 2.10 (m, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*CO*), 1.41-1.55 (m, 4H, (*CH*₂)₂-*CH*₂-*CO*); **HPLC** (0-50 % in 30 min) *R*_t = 19.4 min; **ESI-MS** *m/z* 749.0 (22) [2M+Na⁺], 364.2 (100) [M+H⁺].

5-[N'-(5-Guanidinopentanoyl)-hydrazino]-3-(4-chlorphenyl)-5-oxopentansäure (**78c**)

Die Umsetzung von **26cP** (0.20 g, 0.490 mmol/g, 0.098 mmol) nach AAV 9 (5-(*N*-Fmoc)-aminovaleriansäure (**28**) als Spacer), 10 (5 Äquiv. **32**, 17.5 h bei RT), und 12 ergab die Verbindung **78c** (76 mg, 100 % Rohausbeute) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-35 % in 30 min) ergab **78c** (9 mg, 19 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 9.71 (s, 1H, *NH-NH*), 9.64 (s, 1H, *NH-NH*), 7.52 (m, 1H, ^{Gua}*NH-CH*₂), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Phe}*C*^{3,5}-*H*), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ^{Phe}*C*^{2,6}-*H*), 4.6 (br. s, 4H, ^{Gua}*N*₂*H*₄), 3.45 (m, 1H, *CH*₂-*CH-CH*₂), 3.08 (m, 2H, *NH-CH*₂), 2.70 (dd, *J* = 5.5/16.0 Hz, 1H, *CH*₂-*CH-HCH*), 2.50 (m, 1H, *CH*₂-*CH-HCH*), 2.37-2.48 (m, 2H, *CH*₂-*CH-CH*₂), 2.10

(m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.41-1.58 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 13.8 min; **ESI-MS** *m/z* 833.0 (6) [2M+K⁺], 398.1 (100) [M+H⁺].

8.4 Lösungssynthese der RGD-Mimetika

8.4.1 Synthese der aza-RGD-Mimetika

3-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäureethylester (79k)

3-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**11k**) (1.40 g, 6.0 mmol) wurde in Ethanol (30 mL) suspendiert und auf -20 °C gekühlt. Nachdem Thionylchlorid (520 µL, 7.2 mmol, 1.2 Äquiv.) innerhalb von 20 min zugetropft worden war, wurde die Temperatur langsam auf RT erhöht. Anschließend wurde die Reaktionsmischung eine Stunde bei RT und eine weitere Stunde unter Rückfluss gerührt. Die Mischung wurde im Vakuum eingedunstet, der Rückstand in ges. NaHCO₃-Lösung (100 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab den Ester **79k** (1.44 g, 92 %) als gelbliches Öl.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.48-7.40 (m, 3H, arom.), 4.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH-CH-CH₂), 4.00 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 2.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH-CH₂-CO), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 15.0 min; **ESI-MS** *m/z* 261.9 (14) [M+H⁺], 215.7 (28) [M-OEt⁻], 174.9 (100) [M-(NH₃+COOEt)+H⁺].

3-Isocyanato-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäureethylester (80k)

Eine Suspension des Esters **79k** (1.41 g, 5.38 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) und ges. wässriger NaHCO₃-Lösung (40 mL) wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 5 min heftig gerührt. Danach beließ man die Reaktionsmischung 5 min ohne Rühren, gab mit einer Spritze Phosgen (1.89 M in Toluol, 5.6 mL, 10.7 mmol, 2 Äquiv.) zur organischen (unteren) Phase und begann unmittelbar nach der Zugabe die Reaktionsmischung wieder zu rühren. Nach 10 min wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (15 mL) und CH₂Cl₂ (15 mL) versetzt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wässrige

Phase mit CH_2Cl_2 (2×40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **80k** (1.43 g, 93 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.36$ (m, 1H, arom.), 7.28 (m, 2H, arom.), 5.19 (dd, $J = 5.2/8.7$ Hz, 1H, OCN-CH-CH_2), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 2.88-2.72 (m, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}$), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) $\delta = 169.4, 143.0, 135.4, 129.0, 128.4, 124.5, 61.3, 54.4, 43.8, 14.1$; **IR** $\nu = 3180_w, 2980_w, 2270_s, 1735_s, 1590_w, 1570_m, 1430_m, 1375_m, 1330_m, 1200_m, 860_m, 795_m$ cm^{-1} .

3-{*N*-[*N'*-(*tert*Butyloxycarbonyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäureethylester (**82k**)

Das Isocyanat **80k** (1.34 g, 4.64 mmol) wurde zusammen mit *N*-Boc-Hydrazin (**81**) (613 mg, 4.64 mmol, 1 Äquiv.) in absolutem THF (30 mL) bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert. Nach 17 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Lyophilisieren aus *tert*Butanol ergab **82k** (2.03 g, 97 %) als weißen Feststoff.

$R_f = 0.4$ (Hexan/Ethylacetat 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.20$ (m, 1H, arom.), 7.18 (m, 2H, arom.), 6.46 (m, 1H, NH-CH-CH_2), 5.22 (m, 1H, NH-CH-CH_2), 4.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 2.70 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}$), 1.45 (s, 9H, $\text{O-C(CH}_3)_3$), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.9$ min; **ESI-MS** m/z 443.9 (62) [$\text{M}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}+\text{Na}^+$], 441.9 (100) [$\text{M}^{35}\text{Cl}+\text{Na}^+$], 419.8 (9) [$\text{M}^{35}\text{Cl}+\text{H}^+$], 363.8 (38) [$\text{M-(isoButen)}+\text{H}^+$].

3-(*N*-Hydrazinocarbonyl)-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäureethylester (**83k**)

Zu einer Lösung von **82k** (1.0 g, 2.21 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) wurde bei -5 °C unter Rühren die gleiche Menge einer 20%igen Mischung von TFA in CH_2Cl_2 (10 mL)

gegeben. Nach 4.5 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Lyophilisieren aus *tert*Butanol ergab **83k** (1.05 g, 98 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.89 (s, 1H, NH₂-NH-CO), 7.85 (d, 1H, CO-NH-CH), 7.49 (m, 1H, arom.), 7.40 (m, 2H, arom.), 5.08 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 2.72 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH-CH₂-CO), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃); HPLC (10-60 % in 30 min) R_t = 21.2 min.

3-{*N*-[*N'*-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäureethylester (**84k**)

5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäure (**40**) (500 mg, 2.40 mmol), EDCI (480 mg, 2.40 mmol) und HOBt (360 mg, 2.40 mmol) wurden in trockenem DMF (40 mL) unter Zugabe von DIPEA (1.22 mL, 7.20 mmol, 3 Äquiv.) gelöst und eine Stunde gerührt. Nach der Voraktivierung der Säure wurde eine Lösung von **83k** (1.05 g, 2.40 mmol) in trockenem DMF (10 mL) zugegeben und durch wiederholte Zugabe von DIPEA (0.20 mL, 1.20 mmol, 0.5 Äquiv.) ein pH-Wert von 8.5 eingestellt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC kontrolliert und nach 11 h Rühren bei RT wurden nochmals 1.0 mmol **40**, EDCI, HOBt und 3.0 mmol DIPEA zugegeben. Nach 4 d wurde die Reaktionsmischung eingeeengt, in H₂O (80 mL) aufgenommen und mit CH₂Cl₂ (4 × 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **84k** (1.59 g, 81 % Rohprodukt) als gelben Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.44 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.96 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.46 (m, 1H, arom.), 7.36 (m, 2H, arom.), 6.92 (m, 1H, CO-NH-CH), 6.37 (m, 2H, ^{Pyr}C^{3,5}-H), 5.06 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 3.20 (m, 2H, NH-CH₂), 2.71 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH-CH₂-CO), 2.16 (s, 3H, ^{Pyr}C-CH₃), 2.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.61-1.46 (m, 4H, CH₂-(CH₂)₂-CH₂), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂-

CH_3); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 17.3$ min; **ESI-MS** m/z 512.1 (32) $[M^{35Cl^{37Cl}}+H^+]$, 510.1 (54) $[M^{35Cl}+H^+]$.

3-{*N*'-[*N*'-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure Hydrochlorid (**64k**)

Der Ester **84k** (1.59 g, 3.0 mmol) wurde in MeOH (2 mL) gelöst und nach Zugabe von 1N wässriger NaOH (5 mL, 5 mmol, 1.7 Äquiv.) bei RT gerührt. Nach 22 h wurde die Reaktionsmischung im Vakuum eingengt und mit 1N HCl langsam angesäuert, so dass das Produkt ausfiel (ab pH 8.5). Die Kristallisation der Mischung wurde über Nacht im Kühlschrank vervollständigt, der Niederschlag abfiltriert und mit H₂O (5 mL) gewaschen. Lyophilisieren aus *tert*Butanol/H₂O ergab das Produkt **64k** (1. Fraktion: 417 mg, 29 %) als weißen Feststoff. Die Mutterlauge wurde eingengt und ergab **64k** (2. Fraktion: 707 mg + NaCl) als weißen Feststoff (Analytik siehe **64k**).

8.4.2 Synthese der azacarba-RGD-Mimetika

5-[*N*'-(*tert*Butyloxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlor)-phenylpentansäure (**85k**)

Das Glutarsäureanhydrid **25k** (777 mg, 3.0 mmol) wurde mit *N*-Boc-Hydrazin (**81**) (396 mg, 3.0 mmol, 1 Äquiv.) in absolutem THF (30 mL) unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und ergab das Produkt **85k** (1.29 g, 100 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.5$ (Hexan/Ethylacetat 1:2); **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 11.50$ (br. s, 1H, COOH), 9.52 (s, 1H, NH-NH), 8.65 (s, 1H, NH-NH), 7.49 (m, 1H, arom.), 7.30 (m, 2H, arom.), 3.44 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76-2.55 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂), 2.46-2.38 (m, 2H, CH₂-CH-CH₂), 1.38 (s, 9H, O-C(CH₃)₃); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 19.6$ min; **ESI-MS** m/z 820.8 (100) $[2M^{35Cl^{37Cl}}+K^+]$, 802.7 (55) $[2M^{35Cl}+Na^+]$, 412.9 (90) $[M^{35Cl}+Na^+]$.

5-[N'-(*tert*Butyloxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlor)-phenylpentansäureethylester (88k) modifiziert nach Cervantes *et al.*^[270]

Zu einer Lösung der Säure **85k** (1.29 g, 3.0 mmol) in DMF (10 mL) wurde KHCO_3 (330 mg, 3.3 mmol, 1.1 Äquiv.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Ethyliodid (270 μL , 3.3 mmol, 1.1 Äquiv.) wurde die Reaktionsmischung langsam auf RT erwärmt, nach 4 h zusätzlich Ethyliodid (120 μL , 1.5 mmol, 0.5 Äquiv.) zugegeben und weitere 4 h gerührt. Anschließend wurde die Mischung in H_2O (50 mL) gegossen und mit Ethylacetat (3×30 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Produkt **88k** (1.28 g, 98 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.6$ (Hexan/Ethylacetat/AcOH 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 9.52$ (s, 1H, NH-NH), 8.66 (s, 1H, NH-NH), 7.40 (m, 1H, arom.), 7.30 (m, 2H, arom.), 3.95 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O- CH_2 - CH_3), 3.45 (m, 1H, CH_2 -CH- CH_2), 2.84-2.60 (m, 2H, CH_2 -CH- CH_2), 2.48-2.40 (m, 2H, CH_2 -CH- CH_2), 1.38 (s, 9H, O- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- CH_2 - CH_3); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.5$ min; **ESI-MS** m/z 440.9 (95) [$\text{M}^{35\text{Cl}} + \text{Na}^+$], 318.9 (42) [$\text{M}^{35\text{Cl}} - \text{Boc} + \text{H}^+$].

8.5 Prodrug

Cyclisches 3-{N-[N'-(5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (c64k)

Zu einer Lösung von **64k** (150 mg, 0.25 mmol) und K_2CO_3 (77 mg, 0.557, 2.2 Äquiv.) in DMAc (1 mL) wurde eine Lösung von Pivalinsäurechlormethylester (**89**) (57 μL , 0.38 mmol, 1.5 Äquiv.) langsam zugetropft. Anschließend wurde 2 h bei RT und weitere 3 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung eingeeengt, in H_2O (10 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (2×10 mL) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. wässriger NaCl-Lösung (2×5 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **c64k** (108 mg, 92 %) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (20-40 % in 30 min) ergab **c64k** (58 mg, 50 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.10 (s, 1H, CO-NH-N), 8.56 (br. s, 1H, ^{Pyr}C-NH-CH₂), 8.50 (d, J = 11.8 Hz, 1H, CO-NH-CH), 7.81 (d, J = 6.2 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁶-H), 7.60 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.54 (s, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.46 (s, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 6.85 (s, 1H, ^{Pyr}C³-H), 6.71 (d, J = 5.8 Hz, 1H, ^{Pyr}C⁵-H), 4.77 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 3.26 und 2.83 (m, 1H, CH-HCH-CO), 3.09 (m, 1H, CH-HCH-CO), 2.32 (s, 3H, ^{Pyr}C-CH₃), 2.25 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.62 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 20.7 min; **ESI-MS** m/z 466.2 (30) [$M^{35Cl^{37Cl}+H^+}$], 464.2 (54) [M^{35Cl+H^+}].

8.6 Etherspaltung

5-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(4-hydroxyphenyl)-5-oxopentansäure (**76m**)^[290]

Eine Lösung des Methylethers **76e** (318 mg, 0.54 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (10 mL) wurde auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde eine gleichermaßen gekühlte Lösung von Bortribromid (1M Lösung in CH₂Cl₂, 11 mL, 11 mmol, 20 Äquiv.) langsam zugetropft und zwei weitere Stunden bei -78 °C gerührt. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auftauen und beendete die Reaktion nach 14 h durch Zugabe von H₂O (50 mL). Die wässrige Mischung wurde mit CH₂Cl₂ (2 × 30 mL) ausgeschüttelt und mit 1N wässriger NaOH-Lösung neutralisiert. Lyophilisieren ergab das Produkt **76m** (2.33 g Rohprodukt mit Borsalzen) als gelben Feststoff. Die Reinigung per HPLC (12-40 % in 30 min) ergab **76m** (77 mg, 7 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.32 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.92 (s, 1H, NH-^{Ar}C^{quart}), 9.83 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.18 (s, 1H, OH), 7.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.70 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.49-7.57 (m, 5H, ^{Gua}N₂H₄), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 3.40 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.71 (dd, J = 5.3/15.5 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.40-2.51 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 7.2 min; **ESI-MS** m/z 438.1 (14) [$M+K^+$], 400.2 (100) [$M+H^+$].

9 LITERATUR

- [1] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491-497.
- [2] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2868-2880.
- [3] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906-908.
- [4] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [5] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 1-40.
- [6] C. H. Damsky, M. Bernfield, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 813-814.
- [7] K. M. Yamada, S. Miyamoto, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 681-689.
- [8] E. A. Clark, J. S. Brugge, *Science* **1995**, *268*, 233-239.
- [9] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 220-231.
- [10] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.
- [11] S. Dedhar, *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, *6*, 37-43.
- [12] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14461-14474.
- [13] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-21758.
- [14] J. Takagi, H. P. Erickson, T. A. Springer, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 412-416.
- [15] N. J. Boudreau, P. L. Jones, *Biochem. J.* **1999**, *339*, 481-488.
- [16] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311-339.
- [17] A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3579-3585.
- [18] S. Suzuki, Y. Naitho, *EMBO J.* **1990**, *9*, 757-763.
- [19] N. Dana, D. M. Fathallah, M. A. Arnaout, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3106-3110.
- [20] R. Briesewitz, M. R. Epstein, E. E. Marcantonio, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2989-2996.
- [21] J. S. Bennett, M. A. Kolodziej, G. Vilaire, M. Poncz, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3580-3585.

- [22] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549-554.
- [23] D. J. Rees, E. S. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature* **1990**, *347*, 685-689.
- [24] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, *373*, 197.
- [25] R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, *373*, 261-264.
- [26] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 721-729.
- [27] T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 65-72.
- [28] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, R121-R126.
- [29] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. C. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631-638.
- [30] A. Qu, D. J. Leahy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10277-10281.
- [31] J. Emsley, S. King, J. Bergelson, R. C. Liddington, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28512-28517.
- [32] M. Nolte, R. B. Pepinsky, S. Y. Venyaminov, V. Koteliansky, P. J. Gotwals, M. Karpusas, *FEBS Lett.* **1999**, *452*, 379-385.
- [33] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, *Cell* **2000**, *101*, 47-56.
- [34] J.-O. Lee, L. A. Bankston, M. A. Arnaout, R. C. Liddington, *Structure* **1995**, *3*, 1333-1340.
- [35] D. C. Altieri, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1891-1898.
- [36] T. Yanai, T. Shimooka, I. Ii, *Cell. Struct. Funct.* **1991**, *16*, 149-156.
- [37] M. Busk, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5790-5796.
- [38] I. Dransfield, C. Cabanas, A. Craig, N. Hogg, *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 219-226.
- [39] A. P. Mould, S. K. Akiyama, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26270-26277.
- [40] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *in press*.
- [41] D. S. Tuckwell, M. J. Humphries, *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 297-303.
- [42] A. P. Mould, J. A. Askari, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20324-20336.
- [43] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9459-9464.
- [44] T. A. Springer, *Nature* **1990**, *346*, 425-434.

- [45] C. M. Isacke, M. A. Horton, in *The Adhesion Molecule Facts Book*, 2 ed., Academic Press, San Diego, **2000**, pp. 149-211.
- [46] V. W. Engleman, M. S. Kellogg, T. E. Rogers, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, 191-200.
- [47] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T.-L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, 3, 545-584.
- [48] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 101-121.
- [49] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, 3, 179-205.
- [50] M. Paulsson, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, 27, 93-127.
- [51] K. Kühn, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 41-83.
- [52] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, 14, 195-228.
- [53] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, 44, 517-518.
- [54] M. Kloczewiak, S. Timmons, T. J. Lukas, J. Hawiger, *Biochemistry* **1984**, 23, 1767-1717.
- [55] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50-54.
- [56] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 911-921.
- [57] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 326-328.
- [58] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. T. J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233-20238.
- [59] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461-7472.
- [60] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440-1456.
- [61] K. Venstrom, L. Reichardt, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 419-431.
- [62] F. Balzac, A. M. Belkin, V. E. Koteliansky, Y. V. Balabanov, F. Altruda, L. Silengo, G. Tarone, *J. Cell Biol.* **1993**, 121, 171-178.

- [63] J. M. Breuss, N. Gillett, L. Lu, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Histochem. Cytochem.* **1993**, *41*, 1521-1527.
- [64] M. Agrez, A. Chen, R. I. Cone, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 547-556.
- [65] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475-1482.
- [66] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209-218.
- [67] J. Savill, I. Dransfield, N. Hogg, C. Haslett, *Nature* **1990**, *343*, 170-173.
- [68] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050-1058.
- [69] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47-54.
- [70] H. Le Breton, E. F. Plow, E. J. Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, *28*, 1643-1651.
- [71] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453-464.
- [72] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
- [73] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- [74] F. G. Giancotti, F. Mainiero, *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1198*, 47-64.
- [75] H. P. Hammes, M. Brownlee, A. Jonczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 529-533.
- [76] J. W. McLean, D. J. Vestal, D. A. Cheresh, S. C. Bodary, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17126-17131.
- [77] H. Ramaswamy, M. E. Hemler, *EMBO J.* **1990**, *9*, 1561-1568.
- [78] J. M. Lewis, D. A. Cheresh, M. A. Schwartz, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 1323-1332.
- [79] A. M. P. Montgomery, R. A. Reisfeld, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8856-8860.
- [80] E. Ruoslahti, J. C. Reed, *Cell* **1994**, *77*, 477-478.
- [81] C. B. Thompson, *Science* **1995**, *267*, 1456-1462.

- [82] S. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1997**, *276*, 1425-1428.
- [83] L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1-7.
- [84] M. M. Zutter, G. Mazoujian, S. A. Santoro, *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 863-870.
- [85] K. Koretz, P. Schlag, L. Boumsell, P. Moller, *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 741-750.
- [86] P. G. Natali, M. R. Nicotra, C. Botti, M. Mottolese, A. Bigotti, O. Segatto, *Br. J. Cancer* **1992**, *66*, 318-322.
- [87] L. Damjanovich, S. M. Albelda, S. A. Mette, C. A. Buck, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, *6*, 197-206.
- [88] J. E. Bridges, P. Englefield, I. E. Boyd, W. R. Roche, E. J. Thomas, *Int. J. Gynecol. Cancer* **1995**, *5*, 187-192.
- [89] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1924-1932.
- [90] J. F. Marshall, S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Polakova, I. R. Hart, *Int. J. Cancer.* **1991**, *49*, 924-931.
- [91] R. M. Lafrenie, S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, F. W. Orr, *Eur. J. Cancer* **1994**, *14*, 2151-2218.
- [92] J. I. Jones, M. E. Doerr, D. R. Clemmons, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, *6*, 319-327.
- [93] H. Rabb, E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, G. Ramirez, *Am. J. Nephrol.* **1996**, *16*, 402-408.
- [94] B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 2018-2022.
- [95] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3247-3254.
- [96] J. Folkman, K. Watson, D. Ingber, D. Hanahan, *Nature* **1989**, *339*, 58-61.
- [97] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, *64*, 327-336.
- [98] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, *235*, 442-447.
- [99] P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, *264*, 569-571.
- [100] P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.

- [101] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheresch, *Science* **1995**, *270*, 1500-1502.
- [102] M. Barinaga, *Science* **1999**, *285*, 1475.
- [103] A. Miyauchi, J. Alvarez, E. M. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, D. Cheresch, et al., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20369-20374.
- [104] M. A. Horton, *Bone* **1995**, *17*, 51S-53S.
- [105] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich, *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 368-375.
- [106] G. Shankar, T. R. Gadek, D. J. Burdick, I. Davison, W. T. Mason, M. A. Horton, *Exp. Cell Res.* **1995**, *219*, 364-371.
- [107] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, *132*, 1411-1413.
- [108] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 612-617.
- [109] A. Rezanian, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 9-19.
- [110] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*, 87-91.
- [111] D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Gioranni, M. G. Ehrlich, R. F. Valentini, *Biomaterials* **1999**, *20*, 2323-2331.
- [112] D. Finsinger, Technische Universität München (München), **1997**.
- [113] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 587-590.
- [114] M. Kantlehner, Technische Universität München (München), **2000**.
- [115] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [116] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [117] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature* **1962**, *194*, 178-180.

- [118] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616-1626.
- [119] L. Wessjohann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 739-742.
- [120] K. C. Nicolaou, F. Roschangar, D. Vourloumis, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2120-2153.
- [121] D. R. Kohler, B. R. Goldspiel, *Pharmacotherapy* **1994**, *14*, 3-34.
- [122] G. M. Cragg, *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 315-331.
- [123] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135-8173.
- [124] J. A. Ellman, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 132-143.
- [125] T. Mander, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 223-225.
- [126] J. Xu, J. Stevenson, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 1177-1187.
- [127] C. W. Thornber, *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 563-580.
- [128] P. S. Farmer, in *Drug Design* (Ed.: E. J. Ariens), Academic Press, New York, USA, **1980**, pp. 119-143.
- [129] D. Gorse, A. Rees, M. Kaczorek, R. Lahana, *Drug Discov Today* **1999**, *4*, 257-264.
- [130] M. Hann, R. Green, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 379-383.
- [131] E. Estrada, A. Pena, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2755-2770.
- [132] A. Crum-Brown, T. R. Fraser, *Proc. R. Soc. Edinburgh* **1869**, *6*, 556.
- [133] B. W. Richardson, *Med. Times Gaz.* **1869**, *18*, 703.
- [134] E. H. Northey, *The Sulfonamides and Allied Compounds*, Reinhold Pub. Corp., New York, **1947**.
- [135] C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, American Chemical Society, Washington, **1995**.
- [136] G. W. Bemis, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2887-2893.
- [137] G. W. Bemis, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5095-5099.
- [138] F. Yoshida, J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2575-2585.
- [139] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [140] C. G. Lehmann, *J. Prakt. Chem.* **1835**, *6*, 113.
- [141] A. Albert, *Selective Toxicity*, Chapman & Hall, London, **1951**.

- [142] A. Albert, *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
- [143] N. Bodor, M. E. Brewster, *Pharmacol. Ther.* **1983**, *19*, 337-386.
- [144] E. Pop, W. M. Wu, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1789-1795.
- [145] I. Ojima, S. Chakravarty, Q. Dong, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 337-360.
- [146] J. Samanen, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 91-100.
- [147] B. S. Coller, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 1467-1471.
- [148] M. Heras, G. Escolar, *Drugs Today* **2000**, *36*, 295-311.
- [149] R. M. Scarborough, D. D. Gretler, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3453-3473.
- [150] J. S. Bennett, *Annu. Rev. Med.* **2001**, *52*, 161-184.
- [151] D. A. Cheresh, R. C. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17703-17711.
- [152] D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6471-6475.
- [153] H. Wu, G. Beuerlein, Y. Nie, H. Smith, B. A. Lee, M. Hensler, W. D. Huse, J. D. Watkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6037-6042.
- [154] F. Mitjans, T. Meyer, C. Fittschen, S. Goodman, A. Jonczyk, J. F. Marshall, G. Reyes, J. Piulats, *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 716-723.
- [155] M. A. Dechantsreiter, B. Mathä, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, in *Peptides 1996 (Proc. 24th European Peptide Symposium, September 8-13, 1996, Edinburgh, Scotland)* (Eds.: R. Ramage, R. Epton), Mayflower Scientific Ltd., England, **1998**, pp. 329-330.
- [156] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [157] H. N. Lode, T. Moehler, R. Xiang, A. Jonczyk, S. D. Gillies, D. A. Cheresh, R. A. Reisfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1591-1596.
- [158] J. Wermuth, Technische Universität München (München), **1996**.
- [159] J. S. Schmitt, Technische Universität München **1998**.
- [160] C. E. Peishoff, F. E. Ali, J. W. Bean, R. Calvo, C. A. D'Ambrosio, D. S. Eggleston, S. M. Hwang, T. P. Kline, P. F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J. M. Samanen, J. Stadel, J. A. Vasko, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3962-3969.
- [161] K. Burgess, D. Lim, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4520-4526.

- [162] T.-A. Tran, R.-H. Mattern, Q. Zhu, M. Goodman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 997-1002.
- [163] F. Schumann, A. Müller, M. Kokschi, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009-12010.
- [164] L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001-1004.
- [165] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881-7891.
- [166] A. C. Bach II, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293-294.
- [167] M. J. Fisher, A. E. Arfstan, U. Giese, B. P. Gunn, C. S. Harms, V. Khau, M. D. Kinnick, T. D. Lindstrom, M. J. Martinelli, H.-J. Mest, M. Mohr, J. J. M. Morin, J. T. Mullaney, A. Nunes, M. Paal, A. Rapp, G. Rühler, K. J. Ruterbories, D. J. Sall, R. M. Scarborough, T. Schotten, B. Sommer, W. Stenzel, R. D. Towner, S. L. Um, B. G. Utterback, R. T. Vasileff, S. Vöelkers, V. L. Wyss, J. A. Jakubowski, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4875-4889.
- [168] V. W. Engleman, G. A. Nickols, F. P. Ross, M. A. Horton, D. W. Griggs, S. L. Settle, P. G. Ruminski, S. L. Teitelbaum, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2284-2292.
- [169] C. P. Carron, D. M. Meyer, J. A. Pegg, V. W. Engleman, M. A. Nickols, S. L. Settle, W. F. Westlin, P. G. Ruminski, G. A. Nickols, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1930-1935.
- [170] M. E. Duggan, J. H. Hutchinson, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1367-1383.
- [171] G. D. Hartman, M. E. Duggan, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1281-1291.
- [172] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1271-1279.
- [173] W. H. Miller, R. M. Keenan, R. N. Willette, M. W. Lark, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 397-408.
- [174] G. Hölzemann, *IDrugs* **2001**, *4*, 72-81.
- [175] A. E. Adang, H. Lucas, A. P. de Man, R. A. Engh, P. D. Grootenhuis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3603-3608.

- [176] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27-40.
- [177] A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606-609.
- [178] M. Miyashita, M. Akamatsu, Y. Hayashi, T. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 859-863.
- [179] A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Breipohl, K.-H. Scheunemann, D. Carniato, J.-M. Ruxer, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 179-182.
- [180] J. W. Corbett, N. R. Graciani, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1371-1376.
- [181] R. M. Keenan, W. H. Miller, C. Kwon, F. E. Ali, J. F. Callahan, R. R. Calvo, S.-M. Hwang, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, A. S. Wong, C.-K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2289-2292.
- [182] R. M. Keenan, W. H. Miller, L. S. Barton, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, D. F. Eppley, S.-M. Hwang, C. Kwon, F. E. Ali, M. A. Lago, T. T. Nguyen, B. R. Smith, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1801-1806.
- [183] W. H. Miller, e. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1807-1812.
- [184] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, P. K. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22-26.
- [185] K. C. Nicolaou, J. I. Trujillo, B. Jandeleit, K. Chibale, M. Rosenfeld, B. Diefenbach, D. A. Cheresh, S. L. Goodman, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1185-1208.
- [186] M. E. Duggan, L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C.-T. Leu, R. M. Nagy, J. J. Perkins, S. B. Rodan, G.

- Wesolowski, D. B. Whitman, A. E. Tartman, G. A. Rodan, G. D. Hartman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3736-3745.
- [187] A. Gopalsamy, H. Yang, J. W. Ellingboe, K. L. Kees, J. Yoon, R. Murrills, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1715-1718.
- [188] A. L. Rockwell, M. Rafalski, W. J. Pitts, D. G. Batt, J. J. Petraitis, W. F. DeGrado, S. Mousa, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 937-942.
- [189] S. A. Mousa, W. Lorelli, S. Mohamed, D. G. Batt, P. K. Jadhav, T. M. Reilly, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 641-646.
- [190] D. G. Batt, J. J. Petraitis, G. C. Houghton, D. P. Modi, G. A. Cain, M. H. Corjay, S. A. Mousa, P. J. Bouchard, M. S. Forsythe, P. P. Harlow, F. A. Barbera, S. M. Spitz, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 41-58.
- [191] A. Peyman, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, J. Knolle, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2996-2999.
- [192] F. Osterkamp, B. Ziemer, U. Koert, M. Wiesner, P. Raddatz, S. L. Goodman, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 666-683.
- [193] N. Moitessier, S. Dufour, F. Chretien, J. P. Thiery, B. Maigret, Y. Chapleur, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 511-523.
- [194] B. Didier, R. Hoffmann, C. G. Wermuth, J.-J. Bourguignon, in *First Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem.* (Eds.: S.-K. Lin, E. Pombo-Villar), Molecular Diversity Preservation International, Illkirch, Frankreich, **1997-1998**, pp. 176-181.
- [195] T. W. Ku, F. E. Ali, L. S. Barton, J. W. Bean, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, L. Chen, D. S. Eggleston, J. G. Gleason, W. F. Huffman, S. M. Hwang, D. R. Jakas, C. B. Karash, R. M. Keenan, K. D. Kopple, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. F. Parker, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8861-8862.
- [196] J. M. Samanen, F. E. Ali, L. S. Barton, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, W. Chen, L. Chen, K. Erhard, G. Feuerstein, R. Heys, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, R. M. Keenan, T. W. Ku, C. Kwon, C.-P. Lee, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. Parker, C. E. Peishoff, G. Rhodes, S.

- Ross, A. Shu, R. Simpson, D. Takata, T. O. Yellin, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C.-K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4867-4870.
- [197] R. M. Keenan, W. H. Miller, M. A. Lago, F. E. Ali, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, T. W. Ku, C. Kwon, T. T. Nguyen, V. A. Reader, D. J. Rieman, S. T. Ross, D. T. Takata, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, B. R. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3165-3170.
- [198] R. M. Keenan, M. A. Lago, W. H. Miller, F. E. Ali, R. D. Cousins, L. B. Hall, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, C. Kwon, C. Louden, T. T. Nguyen, E. H. Ohlstein, D. J. Rieman, S. T. Ross, J. M. Samanen, B. R. Smith, J. Stadel, D. T. Takata, L. Vickery, C. C. K. Yuan, T.-L. Yue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3171-3176.
- [199] K. W. Ward, L. M. Azzarano, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, W. F. Huffman, D. R. Jakas, R. M. Keenan, T. W. Ku, D. Lundberg, W. H. Miller, J. A. Mumaw, K. A. Newlander, J. L. Pirhalla, T. J. Roethke, K. L. Salyers, P. R. Souder, G. J. Stelman, B. R. Smith, *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1232-1241.
- [200] M. W. Lark, G. B. Stroup, R. A. Dodds, R. Kapadia, S. J. Hoffman, S. M. Hwang, I. E. James, B. Lechowska, X. Liang, D. J. Rieman, K. L. Salyers, K. Ward, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 319-327.
- [201] A. M. Badger, S. Blake, R. Kapadia, S. Sarkar, J. Levin, B. A. Swift, S. J. Hoffman, G. B. Stroup, W. H. Miller, M. Gowen, M. W. Lark, *Arthritis Rheum.* **2001**, *44*, 128-137.
- [202] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [203] C. C. Leznoff, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 327-333.
- [204] J. M. Fréchet, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 663-683.
- [205] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527-4554.
- [206] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643-5678.

- [207] S. Booth, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15385-15443.
- [208] B. A. Lorschach, M. J. Kurth, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1549-1581.
- [209] R. E. Sammelson, M. J. Kurth, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 137-202.
- [210] W. Li, B. Yan, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4092-4097.
- [211] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [212] A. C. Comely, S. E. Gibson, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1042-1063.
- [213] F. Balkenhohl, C. v. d. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [214] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [215] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- [216] R. S. Houghten, C. Pinilla, J. R. Appel, S. E. Blondelle, C. T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, J. M. Ostresh, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3743-3778.
- [217] L. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 295-302.
- [218] A. Furka, *Notariell beglaubigtes Dokument Nr. 36237/1982, Budapest* **1982**.
- [219] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [220] E. L. Setti, R. Micetich, *Curr. Med. Chem.* **1996**, *5*, 317-324.
- [221] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 144-154.
- [222] K. Burgess, D. Moye-Sherman, A. M. Porte, in *Libraries of transition-metal catalysts: high-throughput screening of catalysts for synthetic organic methodology* (Eds.: I. M. Chaiken, K. D. Janda), American Chemical Society, Washington, **1996**, pp. 128-136.
- [223] K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 313-319.
- [224] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [225] C. Gibson, Technische Universität München (München), **2000**.
- [226] C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 169-173.
- [227] J. Gante, *Synthesis* **1989**, 405-413.

- [228] D. Limal, V. Semetey, P. Dalbon, M. Jolivet, J.-P. Briand, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2749-2752.
- [229] J. Gante, L. Saniere, R. Henkes, in *European Peptide Symposium, Vol. 25* (Eds.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, **1998**, pp. 658-659.
- [230] W. J. Hoekstra, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 715-719.
- [231] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [232] P. D. White, W. C. Chan, in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* (Eds.: P. D. White, W. C. Chan), Oxford University Press, Oxford, **2000**, pp. 9-40.
- [233] R. M. Scarborough, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 971-981.
- [234] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2351-2353.
- [235] D. R. Bolin, I.-I. Sytwu, F. Humiec, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *33*, 353-359.
- [236] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [237] F. A. Carey, R. J. Sundberg, in *Organische Chemie* (Eds.: H. J. Schäfer, D. Hoppe, G. Erker), VCH, Weinheim, **1995**, pp. 830-831.
- [238] T. I. Crowell, D. W. Peck, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1075-1077.
- [239] J. Perregaard, E. K. Moltzen, E. Meier, C. Sanchez, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1998-2008.
- [240] A. C. Cope, H. L. Holmes, H. O. House, *Org. React.* **1957**, *9*, 107-331.
- [241] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.
- [242] C. J. Gray, M. Quibell, N. Baggett, T. Hammerle, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 351-362.
- [243] G. Bold, A. Fassler, H. G. Capraro, R. Cozens, T. Klimkait, J. Lazdins, J. Mestan, B. Poncioni, J. Rosel, D. Stover, M. Tintelnot-Blomley, F. Acemoglu, W. Beck, E. Boss, M. Eschbach, T. Hurlimann, E. Masso, S. Roussel, K. Ucci-Stoll, D. Wyss, M. Lang, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3387-3401.
- [244] K. Tanaka, *Acta. Crystallogr.* **1978**, *B24*, 2487-2494.
- [245] H. Hope, T. Ottersen, *Acta. Crystallogr.* **1978**, *B34*, 3623-3626.

- [246] H. Hope, T. Ottersen, *Acta. Crystallogr.* **1979**, *B35*, 370-372.
- [247] F. Andre, A. Vicherat, G. Boussard, A. Aubry, M. Marraud, *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 372-381.
- [248] F. André, G. Boussard, D. Bayeul, C. Didierjean, A. Aubry, M. Marraud, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 556-562.
- [249] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [250] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hoelzemann, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388-7394.
- [251] B. H. Nicolet, J. A. Bender, *Organic Synthesis, Vol. 1*, **1956**.
- [252] R. N. Misra, Y. F. Kelly, B. R. Brown, D. G. M. Roberts, S. Chong, S. M. Seiler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2165-2170.
- [253] M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 3389-3392.
- [254] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, M. A. Lipton, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1540-1542.
- [255] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804-3805.
- [256] Y. F. Yong, J. A. Kowalski, J. C. Thoen, M. A. Lipton, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 53-56.
- [257] Y. Wu, G. R. Matsueda, M. Bernatowicz, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2055-3060.
- [258] R. C. Schnur, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3726-3727.
- [259] B. G. Shearer, J. A. Oplinger, S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 179-182.
- [260] T. Usui, Y. Tsubone, A. Tanaka, *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22*, 849-852.
- [261] P. G. Houghton, D. F. Pipe, C. W. Rees, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, *7*, 1471-1479.
- [262] C. Gibson, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1725-1728.
- [263] J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2046-2067.
- [264] E. Brenner, R. Schneider, Y. Fort, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12829-12842.
- [265] M. C. Harris, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5327-5333.
- [266] T. H. Fife, R. Natarajan, M. H. Werner, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 740-746.

- [267] A. Orjales, R. Mosquera, L. Labeaga, R. Rodes, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 586-593.
- [268] J. S. Nowick, D. L. Holmes, G. Noronha, E. M. Smith, T. M. Nguyen, S.-L. Huang, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3929-3934.
- [269] K. Ueda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1879-1880.
- [270] A. Cervantes, C. A. Contreras, A. Guzman, E. E. Vale, E. Velarde, S. L. Berthiaume, J. M. Muchowski, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 336-342.
- [271] B.-C. Chen, A. P. Skoumbourdis, P. Guo, M. S. Bednarz, O. R. Kocy, J. E. Sundeen, G. D. Vite, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9294-9296.
- [272] J. A. Zablocki, J. G. Rico, R. B. Garland, T. E. Rogers, K. Williams, L. A. Schretzman, S. A. Rao, P. R. Bovy, F. S. Tjoeng, R. J. Lindmark, M. V. Toth, M. E. Zupec, D. E. McMackins, S. P. Adams, M. Miyano, C. S. Markos, M. N. Milton, S. Paulson, M. Herin, P. Jacqmin, N. S. Nicholson, S. G. Panzer-Knodle, N. F. Haas, J. D. Page, J. A. Szalony, B. B. Taite, A. K. Salyers, L. W. King, J. G. Champion, L. P. Feigen, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2378-2394.
- [273] T. Weller, L. Alig, M. Beresini, B. Blackburn, S. Bunting, P. Hadvary, M. H. Muller, D. Knopp, B. Levet-Trafit, M. T. Lipari, N. B. Modi, M. Muller, C. J. Refino, M. Schmitt, P. Schonholzer, S. Weiss, B. Steiner, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139-3147.
- [274] Y. Hayashi, J. Katada, T. Harada, A. Tachiki, K. Iijima, Y. Takiguchi, M. Muramatsu, H. Miyazaki, T. Asari, T. Okazaki, Y. Sato, E. Yasuda, M. Yano, I. Uno, I. Ojima, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2345-2360.
- [275] H. U. Stilz, W. Guba, B. Jablonka, M. Just, O. Klingler, W. König, V. Wehner, G. Zoller, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1158-1176.
- [276] H. Herres, *Drugs Today* **1983**, *19*, 499-538.
- [277] K. C. Cundy, J. A. Fishback, J. P. Shaw, M. L. Lee, K. F. Soike, G. C. Visor, W. A. Lee, *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 839-843.
- [278] H. Yanagisawa, Y. Amemiya, T. Kanazaki, Y. Shimoji, K. Fujimoto, Y. Kitahara, T. Sada, M. Mizuno, M. Ikeda, S. Miyamoto, Y. Furukawa, H. Koike, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 323-338.

- [279] G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950.
- [280] G. Hölzemann, *persönliche Mitteilung* **2000**.
- [281] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *in press*.
- [282] D. Utesch, G. Hölzemann, *persönliche Mitteilung* **2000**.
- [283] P. Gold, S. O. Freedman, *J. Exp. Med.* **1965**, *121*, 439-462.
- [284] P. Gold, S. O. Freedman, *J. Exp. Med.* **1965**, *122*, 467-481.
- [285] M. E. Phelps, J. C. Mazziotta, H. R. Schelbert, in *Positron Emission Tomography and Autoradiography. Principles and Applications for the Brain and Heart*, Raven Press, New York, **1986**, p. 690.
- [286] W. A. Weber, N. Avril, M. Schwaiger, *Strahlenther. Onkol.* **1999**, *175*, 356-373.
- [287] R. Haubner, H. J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1781-1785.
- [288] R. Haubner, H.-J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1061-1071.
- [289] A. A. Wilson, R. F. Dannals, H. T. Ravert, J. J. Frost, H. N. Wagner, Jr., *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1057-1062.
- [290] A. D. Fraser, S. J. Clark, H. H. Wotiz, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 170-171.
- [291] J. B. Press, *Synth. Commun.* **1979**, *9*, 407-410.
- [292] W. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2924.
- [293] H. Kessler, S. Seip, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemist and Biochemists*, VCH Publishers, New York, **1994**.
- [294] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, *27*, 21-35.
- [295] I. McCall, G. R. Proctor, L. Purdie, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 1126-1128.
- [296] M. Baumgarth, N. Beier, R. Gericke, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2017-2034.